

多摩川水源域に生育する草本植物集団の遺伝的 組成におよぼす集団孤立化の影響の定量的評価

2 0 0 1 年

大 原 雅

北海道大学大学院地球環境科学研究科助教授

目 次

はしがき	1
研究目的	2
実施内容	3
研究発表	6
第1章 アマドコロの繁殖生態	
要 旨	8
材料と方法	10
繁殖特性	12
結 果	14
考 察	33
引用文献	36
第2章 コバギボウシ(ユリ科)の種子繁殖における送粉昆虫の役割と環境評価	
要 旨	38
材料と方法	40
結 果	41
考 察	43
引用文献	45
第3章 Visitation frequency of <i>Melampyrum roseum</i> var. <i>japonicum</i> (Scrophulariaceae) by three bumblebee species and its relation to pollination efficiency	
要 旨	46
材料と方法	49
結 果	52
考 察	55
引用文献	57
第4章 Effect of the number and position of flowers on seed set of <i>Melampyrum roseum</i> var. <i>japonicum</i> (Scrophulariaceae)	
要 旨	65
材料と方法	68
結 果	72
考 察	74
引用文献	78

は し が き

1998年度～2000年度、財団法人とうきゅう環境浄化財団調査・試験研究助成

「多摩川水源域に生育する草本植物集団の遺伝的組成におよぼす
集団孤立化の影響の定量的評価」

の研究成果を取りまとめて報告します。

研 究 組 織

- 代表研究者

大 原 雅 : OHARA, Masashi
(北海道大学大学院地球環境科学研究科・助教授)
(平成12年3月、東京大学大学院総合文化研究科より異動)

- 共同研究者:

鈴 木 和 雄 : SUZUKI, Kazuo
(山口県立大学生活科学部・教授)

日江井香弥子 : HIEI, Kayako
(東京大学大学院総合文化研究科・博士課程3年)

研究目的

近年、都市化の進展や道路建設などの開発行為に伴い、植物集団が「孤立化」する現象が多く見られる。このような集団の孤立化は、残された植物集団の絶滅を直ちに導くものではないが、種子結実や集団の遺伝的組成に大きな変化をもたらすと考えられる。

例えば、集団サイズ（開花個体数）の減少は、花粉媒介昆虫への餌（蜜や花粉）の減少をもたらす。その結果、昆虫の訪花頻度が減少し、結実種子数の低下を導く。従って、長期的には集団の個体数を減少させ、集団の絶滅を引き起こす危険性がある。また、集団サイズの減少は数少ない近隣個体間で交配を生じ、集団の遺伝的多様性を減少させることが予想される。遺伝的多様性の減少は、環境変動時の集団の絶滅を引き起こしやすくさせ、長期的な意味で集団の存続が危ういものとなる。

本研究では多摩川源流域に生育し、マルハナバチを媒介として受粉を行う草本植物を対象に、現存する大小さまざまなサイズの集団で繁殖率・死亡率などの個体群動態に関する情報と遺伝的組成（遺伝子多様度や近交係数）に関する情報を集約する。そして、遺伝的多様性を維持するために必要な集団サイズを定量的に評価することを目的として行った。

実施内容

本研究に係わる野外調査ならびに実験試料の採集は、すべて山梨県塩山市犬切峠（標高約1400m、北緯35°49'10"、東経138°51'45"）の尾根づたいに設けられた防火帯で行った。

調査研究は大きく「各種の基本的な繁殖特性の把握」「個体群動態の長期観察」「集団の遺伝構造の解析」の3つの項目になるが、各年度での研究の流れは以下の通りである。

	1998年度	1999年度	2000年度
•繁殖特性の把握→		
•個体群動態の長期観察→		
•集団の遺伝構造の解析	→	

<1998年度>

初年度は、アマドコロ、オオバギボウシ、ママコナの3種に関して繁殖特性ならびに個体群動態など基本的な生活史の把握を行った。

1) 繁殖特性の把握（交配実験）：

「袋かけ」を行うことにより、送粉昆虫の訪花を排除した状態で、同じ花の雌蕊と雄蕊が自動的に接触して結実するかどうか（自動的な自家受粉の可能性）を調査することができる。結果は、アマドコロ、オオバギボウシ、ママコナとも結実せず、自動的な自家受粉はしないことが明らかになった。「強制自家受粉」を行うことにより、自家花粉を送粉されて結実できるかどうか（自家和合性の有無）を調査することができる。オオバギボウシ、ママコナについて、自家和合性があることが確認できた。

2) 個体群動態調査：

1年生のママコナ群落のうち比較的密度の高いパッチに1㎡の調査区を設置し、調査区内の各個体の位置を記録し、マーキングを施した。また、前年度に設置したコドラートの当年度の発芽個体数を調査した結果、個体数に年変動があることが明らかになった。

<1999年度>

2年度は、天候不順および人為的な攪乱により当初調査を予定していた種の成熟個体数が急減したため、個体数が安定的に多いアマドコロとママコナについて、昨年に引き続き繁殖特性ならびに個体群動態に関する調査をおこなった。また、これらの種に関して酵素多型を用いた遺伝解析のスクリーニングを行った。

1) 繁殖特性の把握 (交配実験) :

昨年度は個体上の花をいくつか選抜して人為交配を施したが、今年度は個体上のすべての花について交配実験を実施した。「袋かけ」処理により送粉昆虫の訪花を排除した状態では、両種ともに、同じ花の雌蕊と雄蕊が自動的に接触せず、自動自家受粉が生じないことを示している。また「強制自家受粉」処理においては、アマドコロは自家不和合を示し、ママコナは自家和合性があることが明らかになった。

2) 個体群動態調査 :

アマドコロ群落において、さまざまな大きさの個体が比較的多く存在しているパッチに1 m²のコドラートを設置し、各個体の位置をマッピングし、個体当たりの葉数を計数した。また、ママコナについては、前年度に設置したコドラートの当年度の発芽個体数を調査した結果、個体数に年変動があることが明らかになった。

3) 遺伝解析 :

アクリルアミド電気泳動法を用いて、12酵素について多型遺伝子の有無などに関してスクリーニングを行った。その結果、アマドコロでは、PGI、SKDH、PGM、6PG、LAPの5酵素で、ママコナでは、AAT、SKDH、TPI、6PGの4酵素で明瞭なバンドが確認された。

<2000年度>

最終年度は、まとめとして過去2年間に行ってきた継続調査の精度をあげるとともに、集団の遺伝解析に関しては、4種ならびに複数の集団に関する調査を行った。

1) 繁殖特性の把握 (送粉昆虫の調査) :

ママコナに訪花する昆虫の種類と訪花頻度を調査した。今年はミヤママルハナバチの個体数が例年より多く、訪花頻度も増加した。また、8月下旬には、ナガマルハナバチやトラマルハナバチの個体数も増え、ママコナへの訪花頻度が急増し、ミヤママルハナバチの訪花頻度は減少した。ミヤママルハナバチはミヤマハギが開花するとそちらを主に訪花するようになった。また、オオバギボウシに関連して、オオバギボウシと若干開花形態が異なるコバギボウシを九州および東北の自生地から

移植し、調査区の送粉昆虫に訪花させ、その送粉効率を昆虫種毎に比較した。

2) 個体群動態調査 (ママコナの種子発芽動態) :

98年度12月に鉢植えに播種し現地に埋めておいた種子の発芽を99年、00年春の2年間にわたって観察した。その結果、一年目に発芽しなかった種子も次年度に発芽する可能性が高いこと、発芽には土壌の影響はほとんどないこと (ママコナの発芽には寄生主の有無が関係するため現地の土である必要性があるとの仮説の否定) が明らかになった。

3) 遺伝解析 :

アマドコロ、ママコナ、ナルコユリ、オオバギボウシについて酵素多型解析による集団の遺伝構造の解析を行った。その結果、アマドコロに関しては、群落全体としては、高い遺伝的多様性を示しながらも、パッチ内はそれぞれ遺伝的に均一であり、遺伝的多様性が低いことが明らかになった。この事実は、アマドコロがマルハナバチによる送粉を介した種子繁殖を行う一方で、地下茎による栄養繁殖も頻繁に行っていることと密接に関係があると考えられた。一方、ママコナに関しては、山梨県の3集団はいずれも類似した遺伝的構造を示したが、茨城、福島のママコナとは遺伝的に大きく異なることが明らかになった。

研究発表

<口頭発表>

- 日江井香弥子：ママコナへ訪花する3種のマルハナバチの送粉効果の違い
種生物学会シンポジウム講演（1998年12月、鹿児島）
- 日江井香弥子・大原 雅：マルハナバチのいないツシマママコナ群落の繁殖特性
日本生態学会46回大会（1999年3月、松本）
- Suzuki, Kazuo：Generalization and specialization in bumblebeepollinated plants. International Symposium, the 30th years anniversary of the SSSB（1999年4月、京都）
- 大原 雅：集団サイズの減少に伴う結実率低下とその要因
北海道環境科学研究センター公開セミナー（1999年12月、札幌）
- 日江井香弥子：ママコナへ訪花する3種のマルハナバチの送粉効果の違い
種生物学会シンポジウム第30回大会講演（1999年12月、鹿児島）
- 日江井香弥子・大原 雅：ママコナの結実における資源分配
日本生態学会47回大会（2000年3月、広島）
- 大原 雅：オオバナノエンレイソウの集団分化と交配システムの役割
日本植物学会第64回大会シンポジウム講演（2000年9月、静岡）
- 鈴木 和雄：植物において訪花昆虫による交配前隔離の進化
日本生態学会48回大会シンポジウム講演（2001年3月、熊本）

<学会誌等>

- Hiei, K. and Suzuki, K. : Visitation frequency of *Melampyrum roseum* var. *japonicum* (Scrophulariaceae) by three bumblebee species and its relation to pollination efficiency. Canadian Journal of Botany (2001)79:1164-1174
- Hiei, K. and Ohara, M. : Variation fruit and seed set among and within inflorescences of *Melampyrum roseum* var. *japonicum* (Scrophulariaceae). Plant Species Biology (2002)17 (印刷中)

本報告書に掲載された研究成果一覧

- 1) 広瀬智之、日江井香弥子、大原 雅：アマドコロの繁殖生態
- 2) 鈴木和雄：コバギボウシ（ユリ科）の種子繁殖における送粉昆虫の役割と環境評価
- 3) Hiei, K. and Suzuki, K. :
Visitation frequency of *Melampyrum roseum* var. *japonicum* (Scrophulariaceae) by three bumblebee species and its relation to Pollination efficiency
- 4) Hiei, K. and Ohara, M. :
Effects of the number and position of flowers on seed set of *Melampyrum roseum* var. *japonicum* (Scrophulariaceae).

第1章 アマドコロの繁殖生態

広瀬 智之 (東京大学教養学部)

日江井 香弥子 (東京大学大学院総合文化研究科)

大原 雅 (北海道大学大学院地球環境科学研究科)

要 旨

顕花植物にとって、個体群構造、個体当たりの花数、開花時期、開花パターンなどの生活史特性は繁殖成功に関わる重要な要素であり、多くの春植物が同時期に開花する早春の林床では多様な繁殖戦略が展開されている。特に、個体当たりに複数の花を開花させる植物では、必ずしも全ての花が同様に結果・結実に至らず、複数の花を持つことの適応的意義を明らかにすることは、植物の繁殖戦略の進化を解明する重要な要素の1つである。

本研究は、複数の花を持つ春植物アマドコロ (*Polygonatum odoratum*) を対象として、個体群構造ならびに繁殖特性を調査することにより、花序の持つ意義を含む、この植物の繁殖生態を明らかにすることを目的とした。

葉数を基準としたステージ・クラス構造の解析の結果、単位面積当たりで未成熟個体に比べて多数の成熟個体が存在した。全体の構造も種子繁殖に依存する林床性多年生植物に見られる構造とは異なっており、この理由の1つとしては栄養繁殖による影響が考えられた。野外で行った種々の交配実験により、アマドコロは自家不和合性を持ち、完全他殖による種子繁殖を行っていることが示された。特に、花粉媒介には送粉昆虫が必要不可欠であり、花序の下位置から上位置へ向かって進行するアマドコロの開花フェノロジーとマルハナバチの活動時期がよく一致していた。

花の持つ形態・形質に関しても、花当たりの花粉数、花冠長、花冠直径、花筒直径に関して、花序の下位置では大きく、上位置になると小さくなる傾向が観察された。自然条件下での交配において、結果率では下位置の花で高く、上位置の花で低い値を示したが、結実率では花の位置による変異がみられなかった。しかし強制他家受粉により、下位置の花で顕著な結実率の増加が認められたが、上位置では明瞭な増加は認められなかった。このことより、下位置の花では花粉制限が大きく効いており、一方、上位置の花では資源制限がより効いていることが示唆された。

春植物は冬が終わって気温が上がり始めた早春、まだ上層の落葉樹の葉が展開しな

い明るい林床下に開花し、受粉・受精を行う。早春は気候変動が大きく送粉昆虫（ポリネータ）の活動も不安定であるため、この時期に咲く虫媒花植物は必ずしも十分な花粉を得られるわけではない（Schemske et al., 1978）。従って、そのような変動環境の中、春植物は多様な生活史戦略を展開している。顕花植物にとって個体当たりにつける花の数や、開花の時期、開花パターンなどは繁殖成功に関わる重要なものである。例えば、複数の花を咲かせるためには1つの花を咲かせるよりも多くの資源（コスト）を必要とするが、その一方で花が食害を受けたときにその影響を小さくすることができるという一面も存在する（Lee and Bazzaz, 1982; Stephenson, 1980, 1984; Helenurm and Barret, 1986）。また、花序を形成する植物では、花を一度に咲かせることでポリネータに対する誇示効果の増大が期待できるが、逆に順次開花をすることにより、隣花受粉を避けたり受粉の機会を増やすことができる（Harder and Thomson, 1989）。しかし、開花を維持するコストは花を形成するコストに比べて決して小さなものではない（Ashman and Schoen, 1994）。また資源分配の観点では、同じ花序内の花でも、花の形成や結果に関して資源に差が生じることがあり、花に割り当てられる資源の違いは、花の胚珠数や結実率の違いとしても確認されている（Holtsford, 1985; Marshall et al., 1985; Thomson, 1989; Young and Stanton, 1989）。従って、複数の花を咲かせても必ずしも全ての花が同様に結果し、種子生産に直接寄与するわけではない。

Holtsford (1985) はそのような結実に至らない両性花の役割について、(1)雄機能説（雄としての機能を果たしている）。(2)媒介者誘引説（ポリネータを惹きつけるのに役立っている）。(3)保険仮説（他の花が損傷を受けたときの保険）。(4)資源待望説（資源が十分あるときは結果する）。(5)選択的結果仮説（良い果実を選択するために多くの花をつける）の5つの仮説に整理している。これらの仮説は互いに背反しあうものではない（菊沢, 1995）ことから、複数の両性花をつける植物の花序は多様な繁殖戦略上の機能を備えているといえることができる。

本研究では、同様に個体当たりにも複数の花を付けるアマドコロ (*Polygonatum odratum* Ohwi) を対象として有性繁殖に関わるその基本的繁殖生態と、花序の持つ役割を把握するため、以下の3点を大きな目的とした。1) 生活史特性と開花フェノロジーとの関連性を把握する。2) 自家不和合性の有無、花粉制限の存在などを含む繁殖生態を明らかにする。3) 花序内での各花の特徴（結実率やサイズなど）から、花の位置による資源分配の違いを解明し、その繁殖戦略的な意義を解明する。

材料と方法

材料と調査地

アマドコロ (*Polygonatum odoratum* Ohwi) はユリ科ナルコユリ属の多年生草本である。ナルコユリ属植物は北半球の温帯に40種、そのうち、日本には約12種の生育が知られており (佐竹ら, 1981)、アマドコロは日本 (北海道から九州) ならびに朝鮮半島、中国に分布する。

葉は互生し、肥厚した根茎が地中を這う。成熟個体は茎を1つ持ち、1-10数個の花を開花させる。花糸は小葉の基部につき、1ヶ所から1-3個の花を付ける。花は両性花で、雄蕊は6本、子房は3室に別れ各室に4-6個の胚珠が存在する。

野外調査ならびに資料の採集は1999年、山梨県塩山市犬切峠 (標高約1400m、北緯35°49'10"、東経138°51'45") の尾根づたいに設けられた防火帯で、アマドコロの開花期 (5月) から結実期 (9月) にかけて行った。

生活史過程と開花特性

アマドコロの生活史段階を把握するため、アマドコロが優占し、花をつけている成熟個体が高頻度で観察される場所と、まだ花をつけていない未成熟個体が比較的高頻度で観察される場所の2箇所に2m×5mの調査区を設定した。そして、アマドコロの成長段階を反映していると考えられる葉数を、両調査区内の全ての個体について調査した。さらに葉数を基準に調査区内の全ての個体を分類し、ステージ・クラス構造の解析を行った。また、成熟個体については花数も記録した。

開花フェノロジーを把握するために、やはりアマドコロが優占する場所に1m×1mの調査区を設置し、その中の全ての成熟個体に関して、開花した花の個体内における位置と日付を随時記録した。花序における花の位置は上、中、下位置の3部位に分類した (図1)。さらに、地中の温度変化を見るために調査地内の地温の測定を行った。測定には一定の時間間隔をおいて温度を記録することができる StowAway TidbiT (Onset computer corporation 製) を用いた。測定は30分間隔で行うように設定し、5月初旬から7月末にかけて1日当たり48回の測定を行った。そのデータをもとに開花期間中の一日の平均地温と最高・最低地温を求めた。

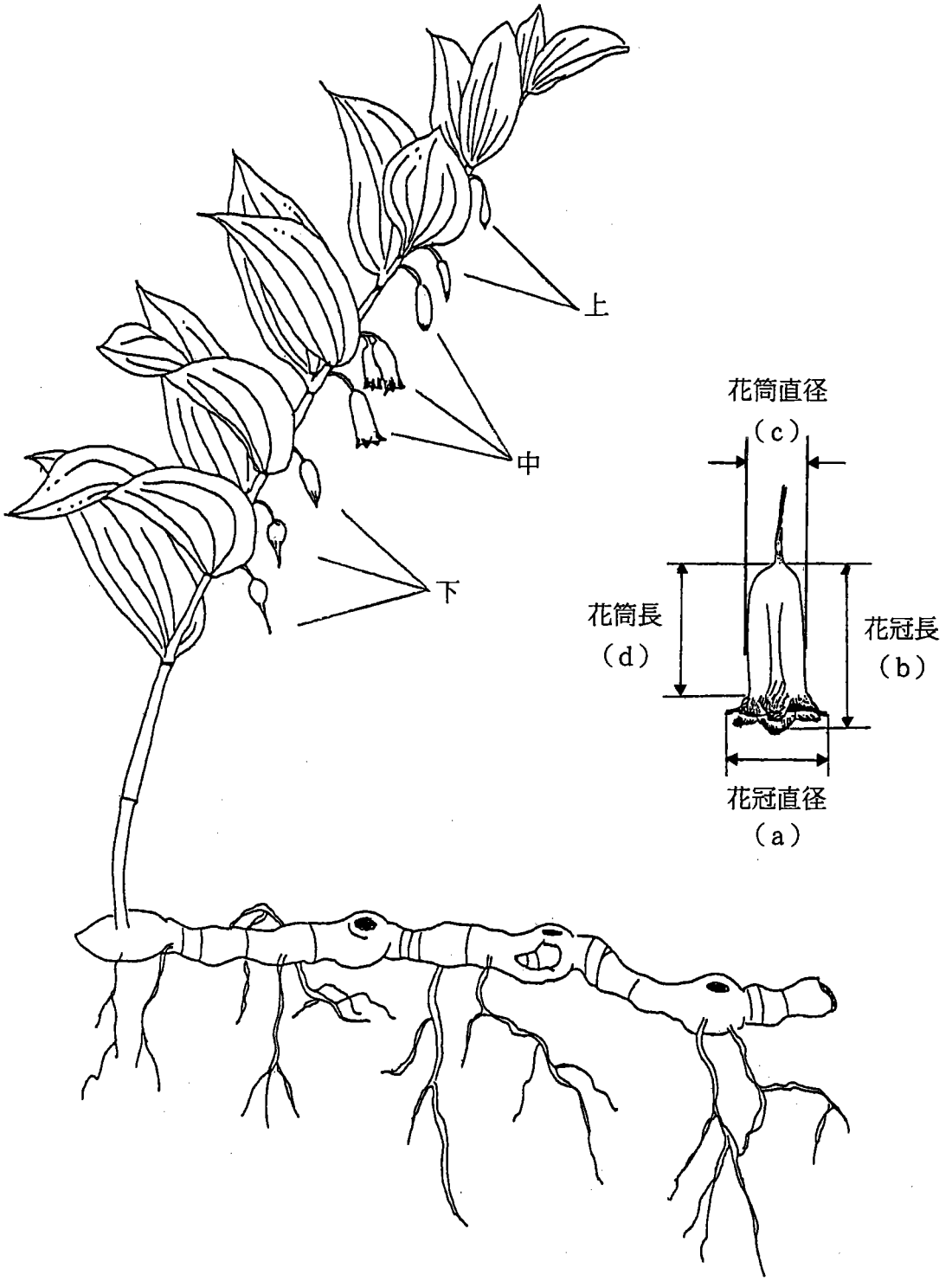


図1 花の位置の分け方と花サイズの測定部位

繁殖特性

訪花昆虫

アマドコロの主なポリネータであるマルハナバチの活動を把握するため、調査期間中に調査区全域（120m×40m）に飛来してきたマルハナバチの種類ならびに訪花数を記録した。1回の調査は3～4日間連続して行い、また1日当たりの調査は朝7時から昼の3時頃までの間に行った。調査はマルハナバチを発見後、随時捕獲し、種を記録し、個体識別のためにペイントマーカーを用いて羽にマーキングを施した後、再び放すという方法で行った。

種子繁殖

アマドコロの種子による有性生殖に関わる繁殖特性を調査するため、以下の4つの交配処理を行なった。調査はそれぞれ、群落内よりランダムに30個の開花個体を選択し、行った。

1. 自動自家受粉の可能性を調べるため袋がけ処理を行った。送粉昆虫の訪花を防ぐため、開花期に入る前にメッシュサイズが2mmのナイロン製のネットを個体全体にかけ、開花が終了するまで放置した。(bagging)
2. 自家不和合性の有無を調査するために強制自家受粉処理を行なった。各個体は送粉昆虫の訪花により他個体由来の花粉がつかないように開花前に袋がけを施し、開花開始後に葯3本を用いて柱頭に擦りつけ、受粉処理を行った。処理後、再び袋をかけ、開花期間中は常にかけておいた。(selfing)
3. 花粉制限ならびに資源制限の程度を明らかにするため強制他家受粉処理を行なった。強制自家受粉処理と条件を揃えるとともに、送粉昆虫の訪花による自家受粉を防ぐため、開花期間中は袋がけ処理を施した。受粉処理には、処理個体から50m以上離れた個体より採集した葯を用いた。1つの花の受粉処理に対して異なる3個体の葯を用いた。受粉処理は上記の処理と同様に葯を柱頭に擦りつけて行なった。(outcrossing)
4. 対照実験として自然条件下で受粉させた。(control)

資源分配

a) 花と果実の中絶

開花終期になるとすでに受粉に成功し、子房が膨らみ始めた花と、何らかの理

由で結実せずに落花してしまう花とを識別することができる。そこで、この開花終了時に落花してしまう現象をここでは「花の中絶」と考え、花の中絶の程度と個体サイズの関係調べた。この調査にはステージ・クラス調査で設定した調査区内の開花個体を用いた。また、結実した果実の中にも、成熟まで至らずに落果してしまうものが認められる。そこで、この現象を「果実の中絶」と考え、果実の中絶が行われた後で、個体サイズと種子生産の関係を調べるために、個体の葉数と結果率の関係を調べた。この調査には交配実験で用いたコントロール個体(30個体)を用いた。

b) 花サイズと花の位置との関係

花への資源分配と、各個体内における花の位置との関係を調べるため、花のサイズを以下の4つの部位に関して計測した(図1参照)。

花冠直径：花の開口部の直径 (a)

花冠長：花糸と花の接合箇所から、花弁の先端までの距離 (b)

花筒直径：花被片の緑色部位と白色部位の境界線付近における花筒の直径 (c)

花筒直径：花糸と花の接合部から花被片の緑色部位と白色部位の境界までの距離 (d)

測定には群落内よりランダムに選んだ30個体を用いた。測定する花は花被片が外側に反り返るまで開花した段階のものを選んだ。この調査では、同じ個体でも開花の早い下側1/3に位置する花と、遅い上側1/3に位置する花について測定を行なった。

c) 花の雌雄性

個体内における花の位置による雌雄器官への資源投資の変化を見るために、各花の雄蕊と子房の乾燥重量を測定した。花の採集は個体当りに6-8個の花を持ち、かつ葉柄基部に花を1つのみつけている個体を対象とした。個体内の花の位置を上、中、下に3分割し、花の採集を行った。ただし同一個体から全ての部位に関する採集が困難であったため、野外で開花段階の異なる個体を選び、各部位に関してそれぞれ上位置21、中位置21、下位置16個体より花を独立に採集した。採集された花は各位置に関して2-3個であるが、計測にはそのうち1個を用いた。

また交配様式の1つの指標と考えられる花粉数(pollen)と胚珠数(ovule)の比(P/O比)(Cruden, 1977)を各花の位置別に測定し、花序内の変異を調査した。

結 果

生活史過程と開花特性

a) ステージクラス構造

アマドコロの主な生活環を図2に示す。種子から発芽した実生個体は被針形の1枚葉を持ち、光合成を通じて同化産物を蓄積し、葉数の増加及び地下茎の肥大を伴いながら経年成長を行う。従って、長年にわたる栄養成長の後に花を持つ成熟段階になる。成熟個体は種子を通じた有性繁殖のほかに、地下茎が分離する栄養繁殖も行う。地下茎には、過去の地上茎の痕跡が残るため、幼植物段階では年齢の推定がある程度可能であるが、成長に伴い末端部が腐食するため正確な年齢の把握が困難になる。また、栄養繁殖は成熟個体のみならず未成熟段階の個体でも行う可能性があるが、その点については今回の調査では確認できなかった。

そこでアマドコロに関しては、成長段階を反映していると考えられる個体当たりの葉数によりステージ・クラス分けを行い、このステージ・クラスを基準に、2つの調査区の個体を分類し、ステージ・クラス構造の解析を行った(図3)。調査区1では、成熟個体は6葉段階から出現し、最大16葉段階までの個体が認められた。一方、調査区2では、8葉段階から成熟個体が出現し、最大17葉段階までの個体が観察された。個体数に関しては、調査区1ではまだ開花段階に達していない未成熟個体が379、成熟個体が236、合計615個体が存在したのに対し、調査区2では未成熟個体168、成熟個体166、合計334個体で、調査区1のおよそ半数であった。また未成熟個体と成熟個体の比率でも調査区1では未成熟個体が成熟個体の1.5倍以上あるのに対し、調査区2では未成熟個体と成熟個体の数はほぼ同じであった。ステージ・クラス構造全体に関しては、調査区1では4葉段階に個体数のピークを持ち、その後徐々に個体数が減少する構造が観察された。一方、調査区2ではステージ・クラス後半(12葉段階)に個体数のピークを持つ構造が観察された。

個体の各サイズ(茎長、地際直径、葉枚数)と花数の関係を図4に示す。いずれの関係も一次回帰分析の結果、正の相関関係が認められた($p < 0.05$)。従って、茎長、地際直径、葉数は、生育段階の指標である個体の成長量を強く反映していると考えられることから、これらのサイズと花数との間に有意な相関関係が認められたことは、個体当たりの花数の多少も、アマドコロの生育段階と密接に関連していると考えられる。

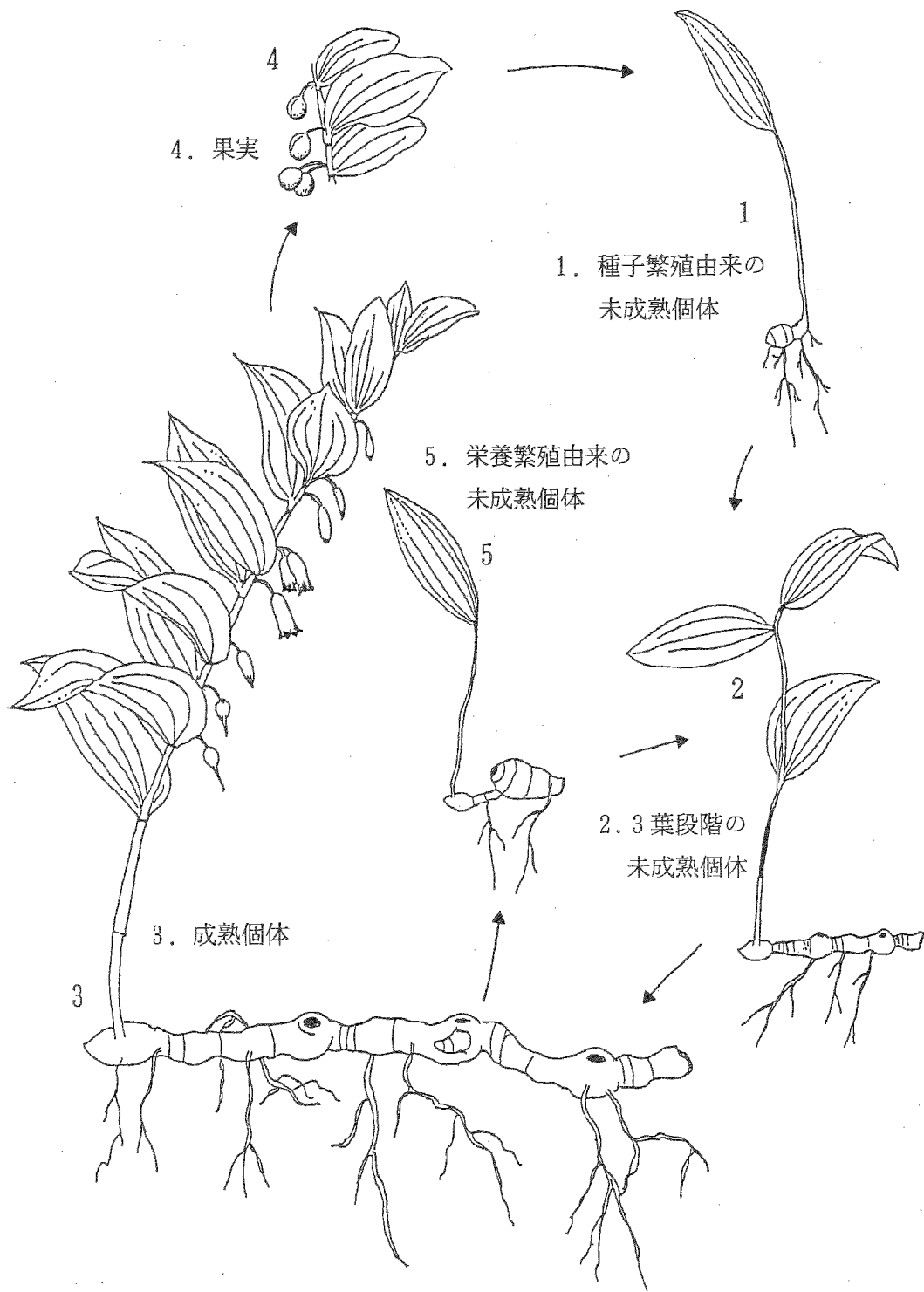
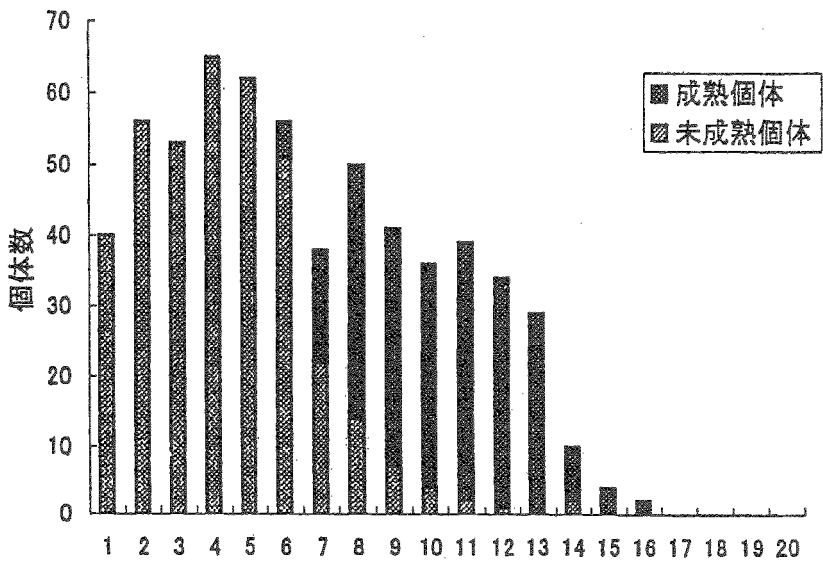
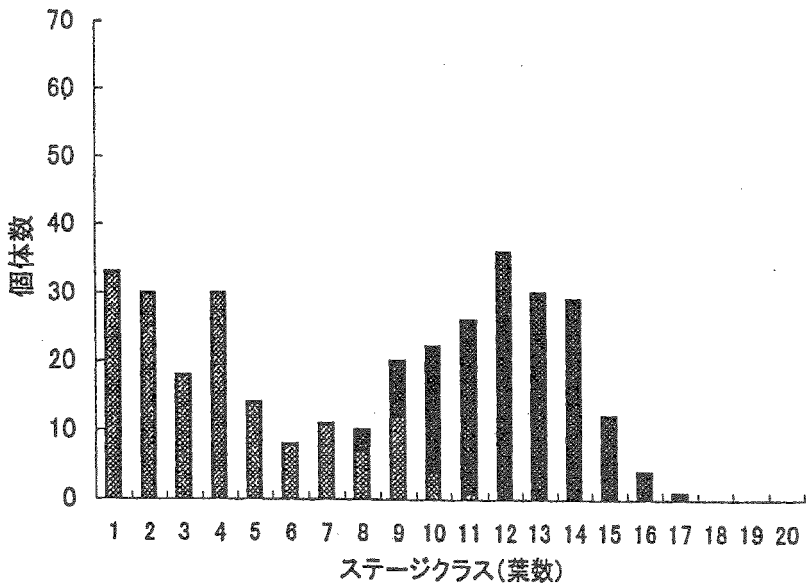


図2 アマドコロの生活環



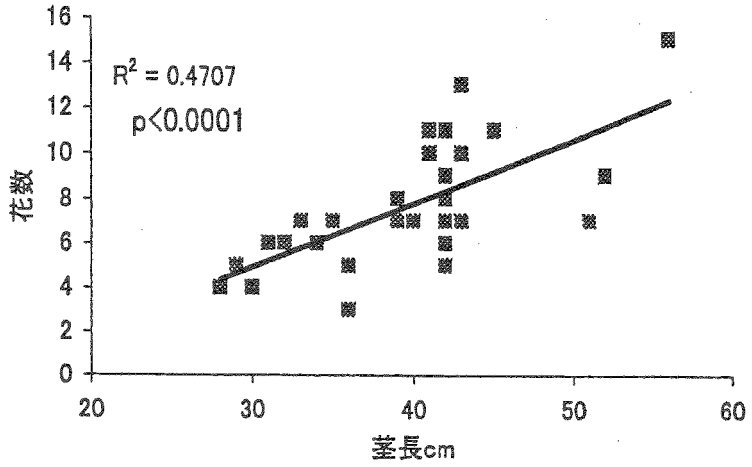
a) 調査区 1



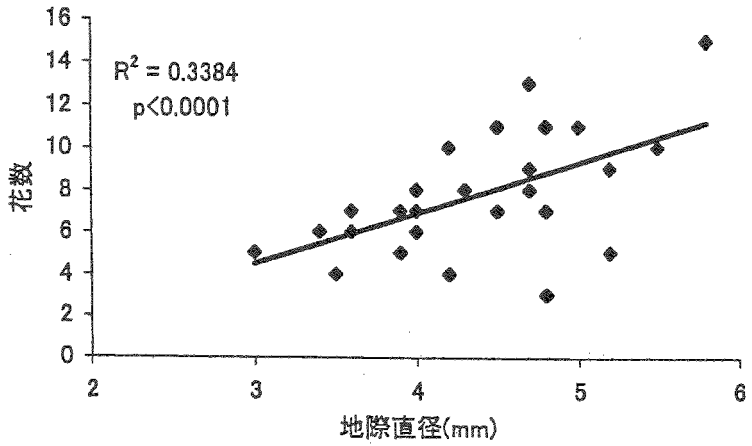
b) 調査区 2

図3 アマドコロのステージ・クラス構造

a) 莖長



b) 地際直径



c) 葉枚数

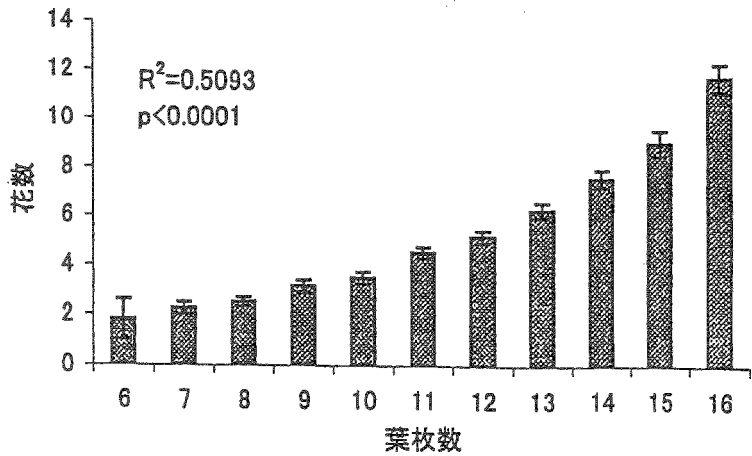


図4 個体サイズと花数の関係

c) のグラフは平均値を表し、バーは土標準誤差を示す。

開花フェノロジー

図5と図6に、アマドコロの開花フェノロジー及び地温の経時変化を示す。開花フェノロジーに関する調査の結果、まず開花は花序の下方から上方へ進行していくことが明らかになった。1999年の調査では、5月22日に下位置の花が開花を開始し、上位置の花の開花が始まる5月25日頃には下位置の花は約半分が完全に開花していた。しかし、5月25日から5月30日の間は開花数の顕著な増加は認められなかった。6月4日になると下位置の花の新たな開花は見られなくなり、開花は中、上位置の花へと移行した。

地温のデータでは、開花を開始した時期は日平均温度が17°C近くまでであったが、5月26日から5月30の間では15°Cを下回っていた。その後6月1日から再び温度が上昇するようになると、開花数の方も再び増加した。最高地温に関しても、5月20日から5月25の間は、22°Cをほぼ上回り、5月26日と5月30日は21°Cを下回った。そして、開花数が増加する6月1日、2日の両日は再び22°Cを越えていた。

繁殖特性

a) 訪花昆虫

ナガマルハナバチ (*B. consobrinus wittenburgi*) の訪花の様子を図7に示す。花が下向きに開花するため、蜂は花の下側から回り込むように飛行して花の開口部に掴まり、仰向けになって訪花していた。また訪花は下方の花から上方の花へ向かっていく傾向が観察された。アマドコロの開花期間中に4回の訪花昆虫の調査を行ったが、この調査期間中に観察されたマルハナバチは全部で5種で、コマルハナバチ (*B. ardens ardens*) は女王蜂のほかにワーカーが観察されたが、他のマルハナバチは女王蜂しか観察されなかった(表1)。ミヤママルハナバチ (*B. honshuensis*) は5月21日から24日までの1回目の調査の間に6個体が観察されたが、6月4日以降は観察されなかった。オオマルハナバチ (*B. hypocrita hypocrita*) は2回目の調査(5月28~31日)で2個体の女王が観察されただけで、それ以外の時期には観察されなかった。コマルハナバチの女王は1回目(5月21~22日)と2回目(5月28~31日)の調査で計2個体が観察されたがその後は観察されなかった。2回目の調査ではコマルハナバチのワーカーが5個体観察された。ナガマルハナバチは調査期間中最も高頻度で観察され、2回目の調査では6個体の女王が観察された。トラマルハナバチ (*B. diversus diversus*) は1回目の調査で4個体が観察された後は、各調査で1個体ずつ観察された(図8)。2

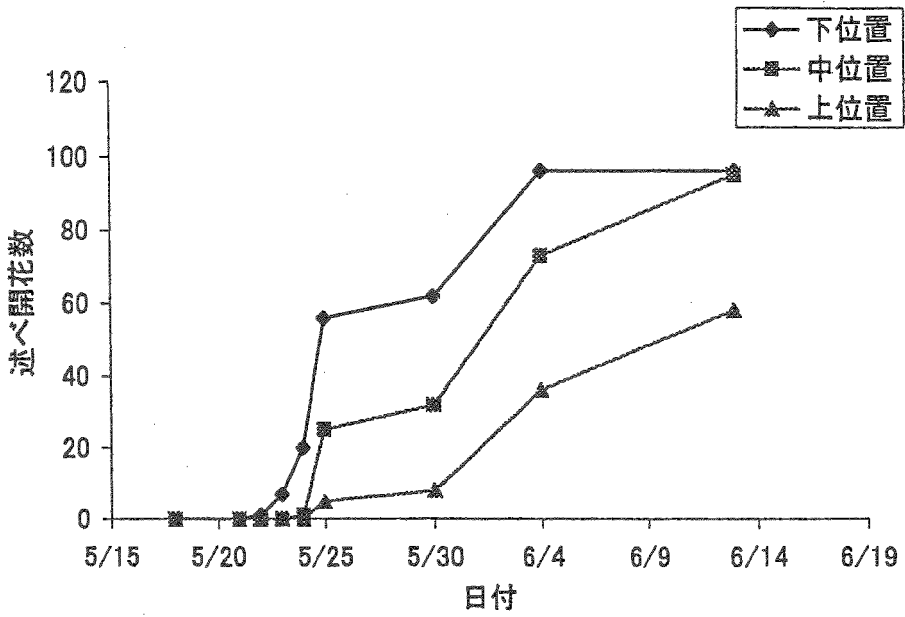


図5 花序における各位置の花の開花フェノロジー (延べ数)

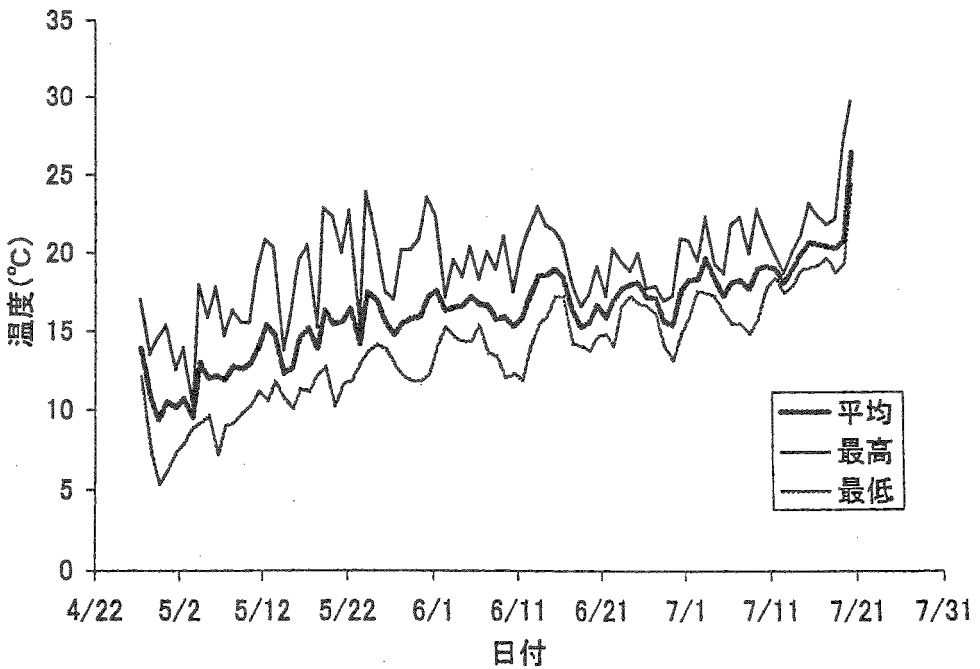


図6 地中温度の経時変化

a)



b)



図7 アマドコロに訪花するナガマルハナバチ
(*B.consobrinus wittenburgi* Voget)

回目の調査は地温が上がらず、延べ開花数も増えなかった時期であったが、実際に開花していた花の数はこの時期が一番多く、全体として最も多くのマルハナバチが観察された。3回目の調査（6月4日～6日）以降は全体のマルハナバチの個体数は減少していった。この頃になるとアマドコロの開花は上位置の花で見られるようになり、全体の開花数も減少傾向にあった（図5参照）。

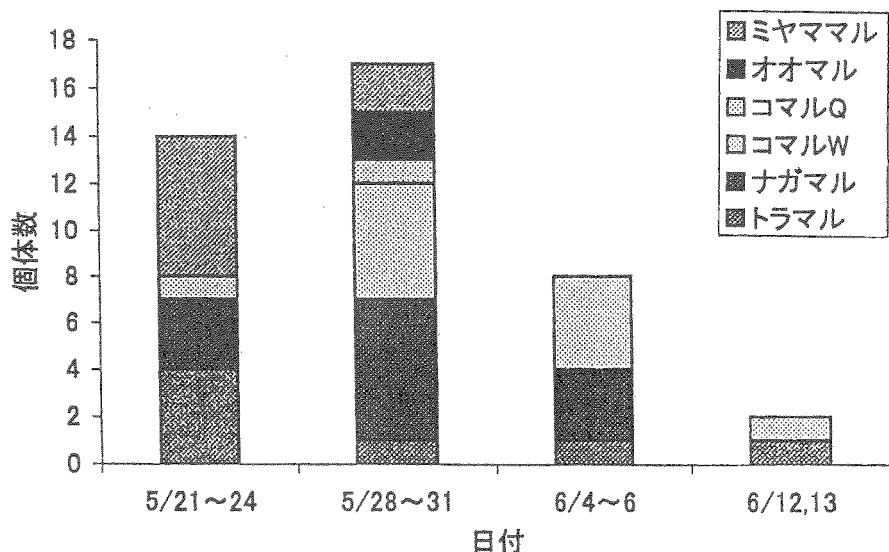


図8 マルハナバチ5種の出現頻度の経時変化

表1 観察されたマルハナバチ (*Bombus*)

和名	学名	観察されたステージ	
		女王 (Q)	ワーカー (W)
ミヤママルハナバチ	<i>B.honshuensis</i> Tkalcu	○	-
オオマルハナバチ	<i>B.hypocrita hypocrita</i> Perez	○	-
コマルハナバチ	<i>B.ardens ardens</i> Smith	○	○
ナガマルハナバチ	<i>B.consobrinus wittenburgi</i> Voget	○	-
トラマルハナバチ	<i>B.diversus diversus</i> Smith	○	-

種子繁殖

交配実験の結果を図9に示す。コントロール個体はマーキングした30個体のうち3個体が枯死していたため、残り27個体に関する結果を基に解析を行った。コントロール以外の処理に関しては30個体全てが回収された。その結果、コントロール個体では平均34.5%の結果率および平均21.0%の結実率を示し、袋がけ処理 (bagging) では平均0.7%の結果率および平均13.6%の結実率を示した。また、強制自家受粉処理 (selfing) では平均3.3%の結果率および平均8.0%の結実率を示した。一方、強制他家受粉処理 (outcrossing) では平均68.7%の結果率および平均47.9%の結実率を示した。強制他家受粉とコントロールの間でt検定を行った結果、結果率で危険率 $P=2.32e-5$ 、結実率で危険率 $P=8.3e-19$ であった。危険率はいずれも両側検定のもので、強制他家受粉の方がコントロールよりも結果率と結実率のいずれも高くなることが示され、自然条件下では花粉制限を受けていると判断された。袋がけ処理と強制自家受粉処理ではそれぞれ2つの花において結実が認められたが、アマドコロに関しては他殖が優占していることが示された。従って、これらの処理ではほとんど結実しないと判断し、統計検定を行わなかった。

資源分配

a) 個体サイズとの関係

開花後期の花序の様子および、正常な花と子房が形成されていない花の様子をそれぞれ図10に示す。開花後、受粉に成功した花は子房が膨らみ始めていたが、受粉に失敗あるいは中絶された花は落花していた (10-a)。また、図10-aの上部の花のように、子房が形成されていない花は、花の外見による観察からも正常な花と識別されるが、このような花の内部の様子を比較したのが図10-bと図10-cである。図10-bの花は子房がはっきりと確認できるのに対し、図10-cでは子房の存在は確認されず、わずかに痕跡が見られるだけであった。しかしこのような花においても雄蕊は確認された。

個体サイズ (花数) と、落花することなく、今後結実する可能性の残っている花 (以下、結実可能花と呼ぶ) の割合の関係を調べた結果を図11に示す。調査区1では結実可能花の割合は、個体当たり1花の個体で平均23.5%と最も低く、7花の個体で平均75.8%と最も高かった。一方、調査区2では、個体当たり2花の個体で平均21%と最も低い値を示し、10花の個体で最も高い平均95%を示した。

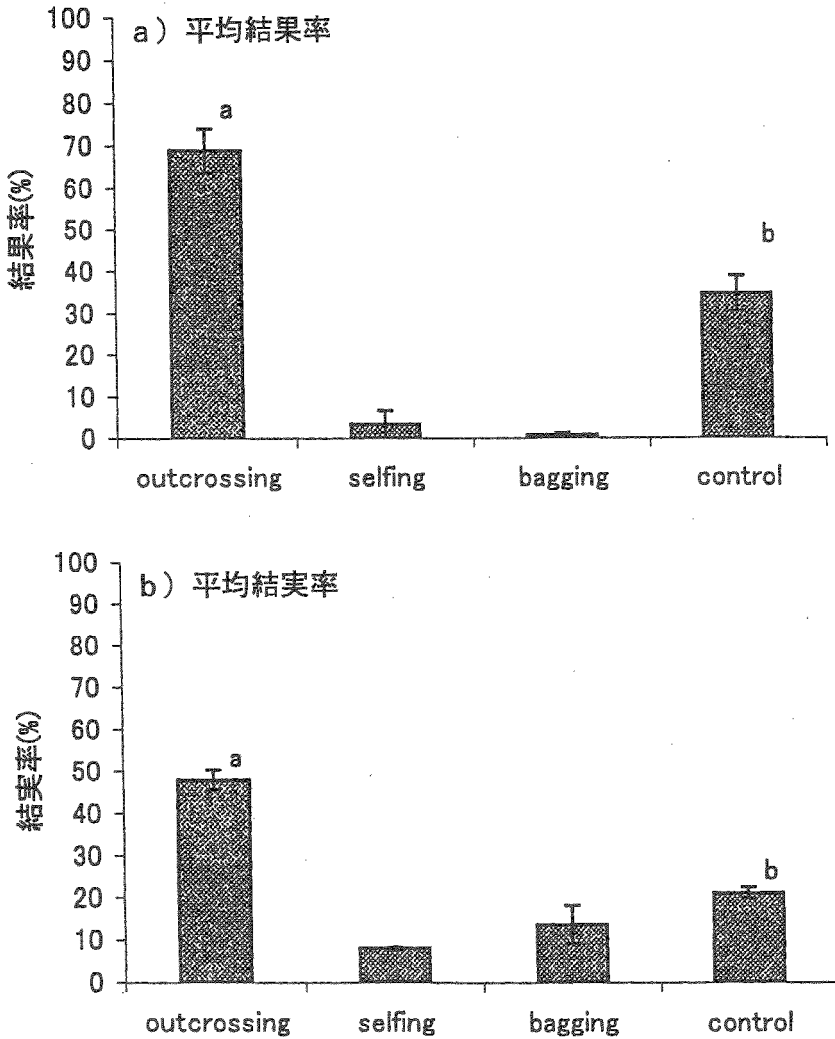


図9 交配実験の結果

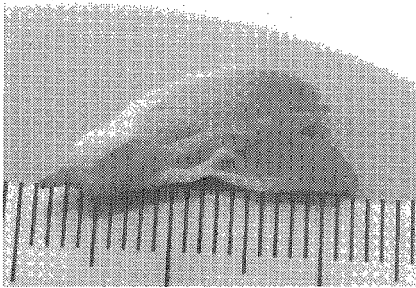
グラフ中のバーは平均値±標準誤差を示す。
異なるアルファベットは有意差 (t検定; $p < 0.05$) を示す。

調査区1、調査区2のどちらにおいても、花数の増大とともに結実可能花の割合も増大する傾向が認められ、回帰分析の結果 (直線回帰)、両者の間では有意な相関関係 ($p < 0.05$) が認められた。

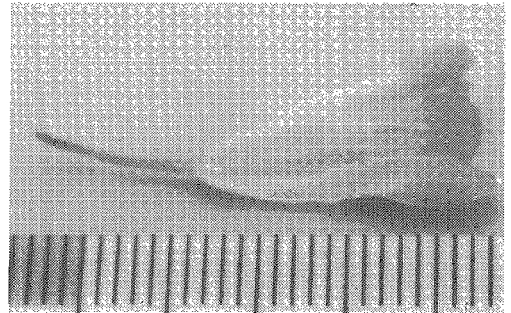
図12には、個体のサイズ (葉数) と結果率の関係を示す。測定した個体は11葉段階から18葉段階までで、また花数は3-15個であった。回帰分析の結果、個体サイズと結果率の間には有意な相関は見られなかった ($p > 0.05$)。



a) 花全体



b) 正常な雌蕊を持つ花

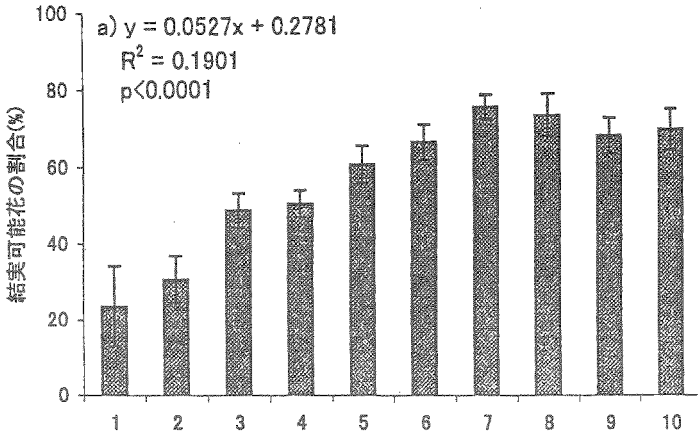


c) 雌蕊が矮小化した花

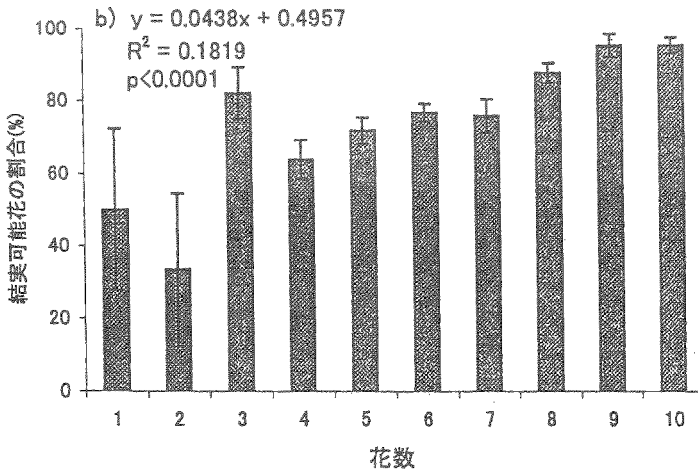
図10 開花後期の花の様子

b) 花サイズと花の位置との関係

図13と 図14には花序内の花の4つの形質（花筒長、花筒直径、花冠長、花冠直径）における、位置による変異を調査した結果を示す。グラフは中位置の花を除いた下1/3と上1/3の位置の花について解析した結果である。その結果、花筒長では上下各位置で、平均値に有意な差は認められなかったが、花筒直径（上位置；平均4.92mm、下位置；平均5.45mm）、花冠長（上位置；平均15.41mm、下位置；平均15.97mm）、花冠直径（上位置；平均8.20mm、下位置；平均9.57mm）では下位置の花が上位置より有意に大きい傾向が認められた（ $p < 0.05$ ）。



a) 調査区1
 (6月6、12日調査)



b) 調査区2
 (7月20日調査)

図11 開花期終盤における結実可能な花の割合と、個体の花数の関係
 ヒストグラム及びグラフ中のバーはそれぞれ平均値±標準誤差を示す。

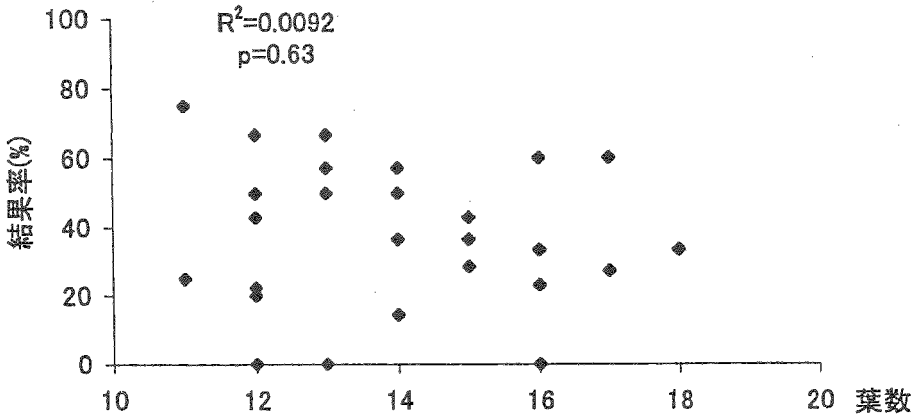


図12 個体の葉数と結果率の関係

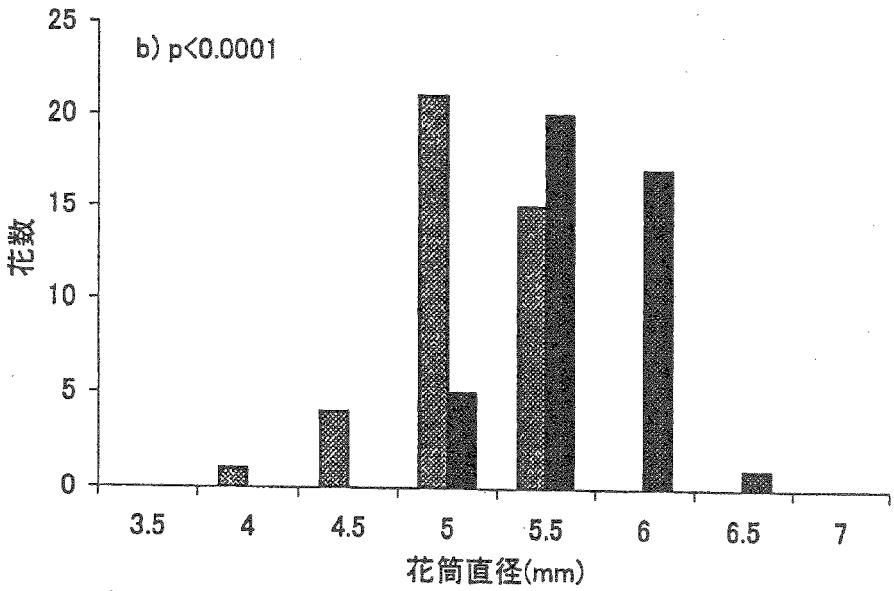
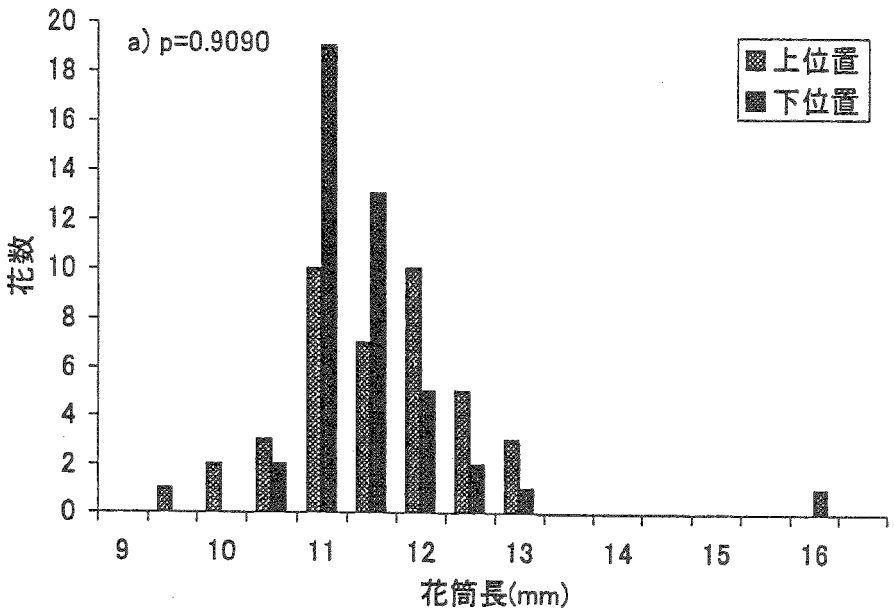


図13 花の位置と花筒長a)、花筒直径b)のサイズ頻度分布

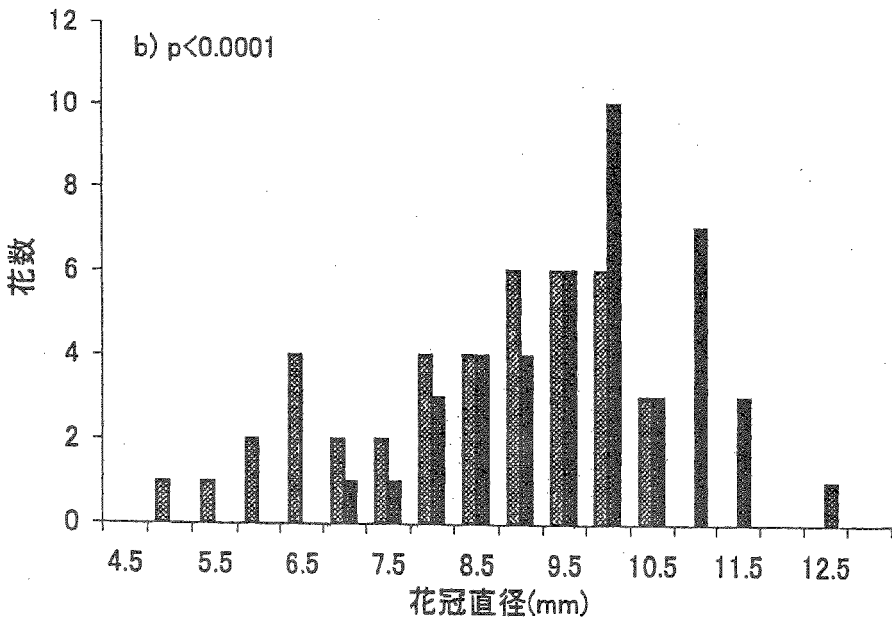
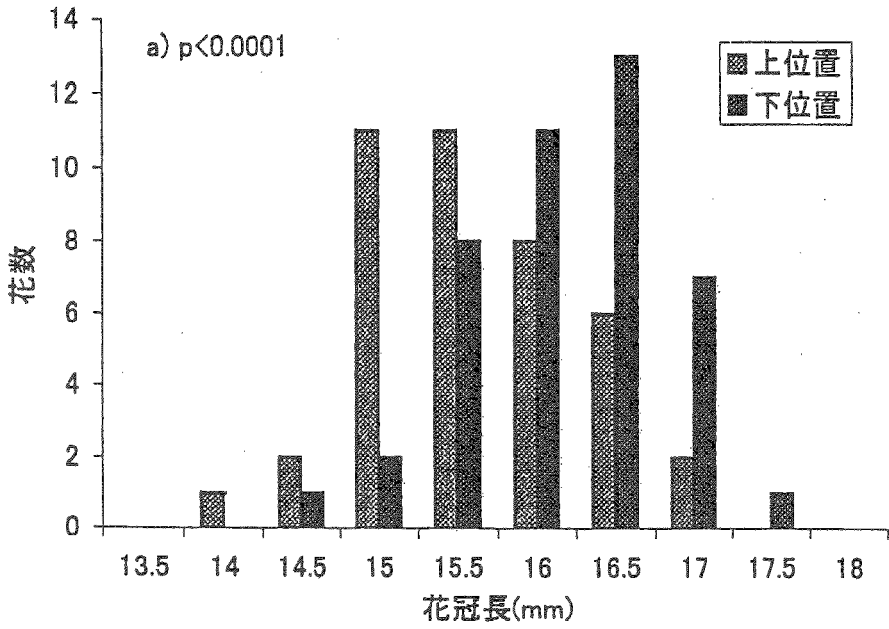


図14 花の位置と花冠長a)、花冠直径b)のサイズ頻度分布

c) 花の雌雄性

図15は雄蕊と雌蕊の乾燥重量比を、花序内の上、中、下各位置で比較したものである。雌蕊が矮小化して、乾燥重量が秤量できないほど軽量であったため、重量比は雌器官の乾燥重量を雄器官の乾燥重量で割ることで算出した。重量比の平均値は下位置で約0.90、中位置で約0.95、上位置で約1.12を示したが、統計検定 (Fisher's PSLD法) の結果、各位置の重量比には有意な差が認められなかった ($p > 0.05$)。

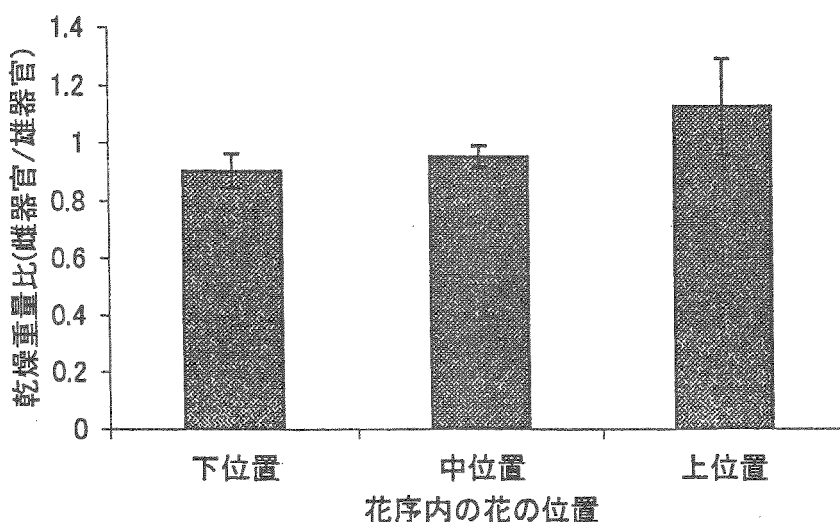


図15 花の位置と雌雄器官の重量比 (雌器官/雄器官)

ヒストグラム及びグラフ中のバーはそれぞれ平均値±標準誤差を示す。

花の位置と胚珠数の関係を図16に示す。花序内の上、中、下、各位置毎に胚珠数を示したものである。上位置の花には子房が存在しないものが見られたが、そのような花に関しては、胚珠数0として解析した。子房は3室に分かれており、調査した花の内、子房が正常に形成されていたものでは1室当りおおよそ4-6個の胚珠が含まれ、花当りの胚珠数はおおよそ14-19個であった。各位置別にみると、下位置と中位置の胚珠数はそれぞれ17個と16個にピークを示した。一方、上位置の花では子房が矮小化した結果、胚珠が確認できなかった花が17個存在したが、子房が正常に形成されている花の胚珠数は17個にピークを示した。子房が正常に形成されている花については、各位置における胚珠数に有意差はみられなかった ($p < 0.05$)。

表2にP/O比測定の結果を示す。表記した花粉数は、6本の雄蕊中、2本の雄蕊に含まれる花粉を実際に計測し、その値を3倍することで花当りの花粉数に換算した。花当りの花粉数は20000-90000個で、花の位置が上側になるほど花粉数は減少する傾向がみられた。従って、胚珠数が花の位置により大きく変異しないことからP/O比は花の位置が上側になるほど減少する傾向が認められた。

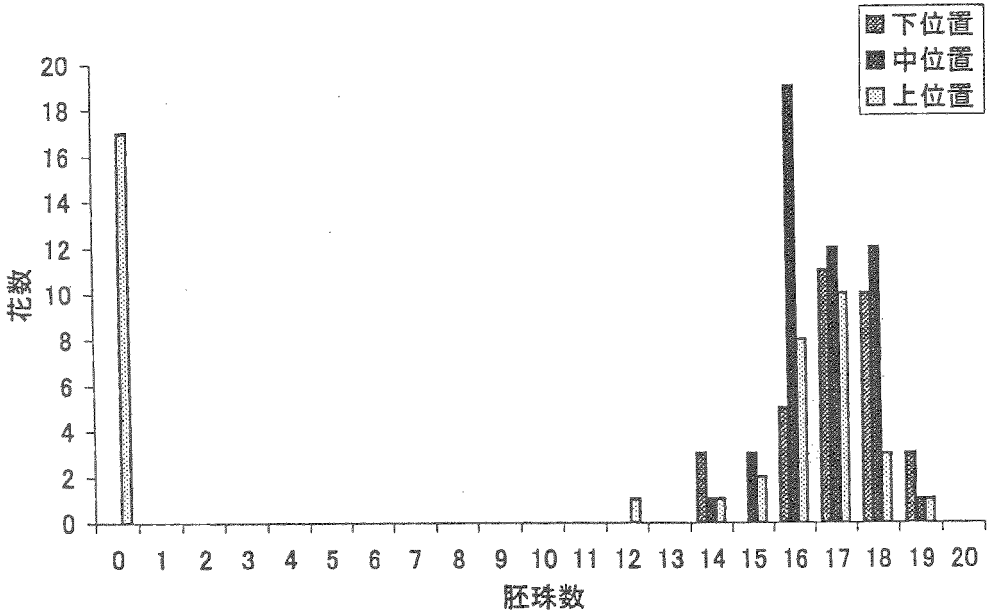


図16 花の位置と胚珠数の関係

表2 花の位置とP/O比

測定した花の下からの位置 個体当たりの総花数	花粉数 (P)	胚珠数 (O)	P/O 比
5/8	90000	17	5300
4/7	48900	17	2900
7/8	42300	16	2600
8/8	28200	0	-

図17にコントロール個体における、花の位置と結果率の関係を示す。結果率は上位置では55.2%、中位置では35.8%、下位置では17.3%を示した。統計検定(Fisher's PLSD法)の結果により、下位置と中位置、及び下位置と上位置の間で有意な差が認められ ($p < 0.05$)、その結果花の位置が上側になるにしたがって、結果率が減少する傾向が認められた。

さらに、強制他家受粉を行った個体とコントロール個体の、花の位置と結実率の関係を図18に示す。強制他家受粉個体では花の位置が上に行くほど結実率が下がる傾向がみられたのに対し、コントロール個体では同様の傾向はみられなかった。回帰分析を行った結果、強制他家受粉個体においては、有意な相関関係が見られたが ($p < 0.05$)、コントロール個体では、花の位置と結実率の間には一定の傾向は見られなかった ($p < 0.05$)。強制他家受粉処理における回帰直線を見ると、最も上位置の花(相対位置が1.0)では結実率は約25%で、この値はコントロールの平均結実率(21.0%)と大きく変わらないが、下位置の花、例えば相対位置が0.2の花では結実率は約60%になり、コントロールの平均結実率の3倍近くの値になった。このように、コントロールと比較して強制他家受粉では下位置の花に結実率の上昇が顕著にみられた。

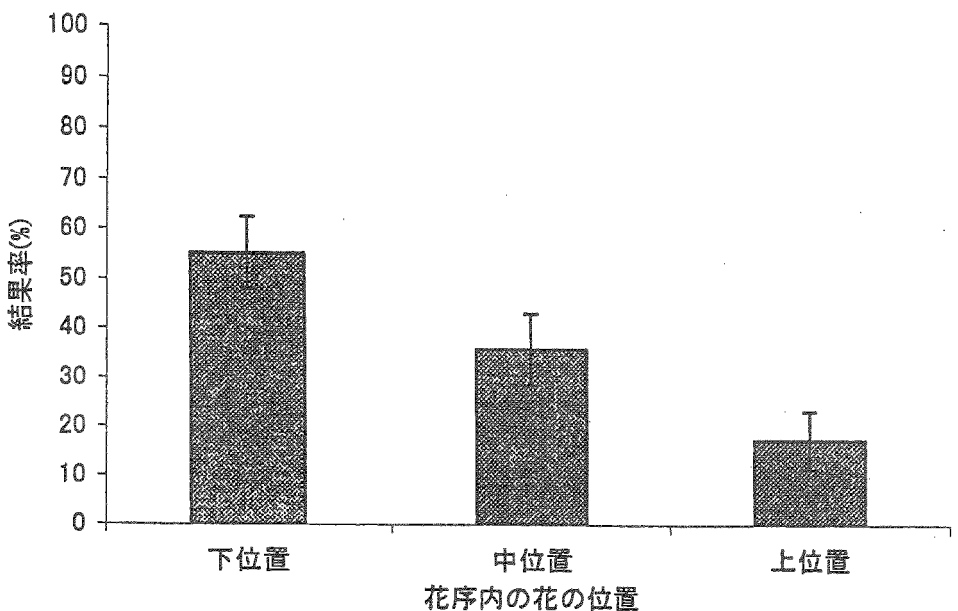
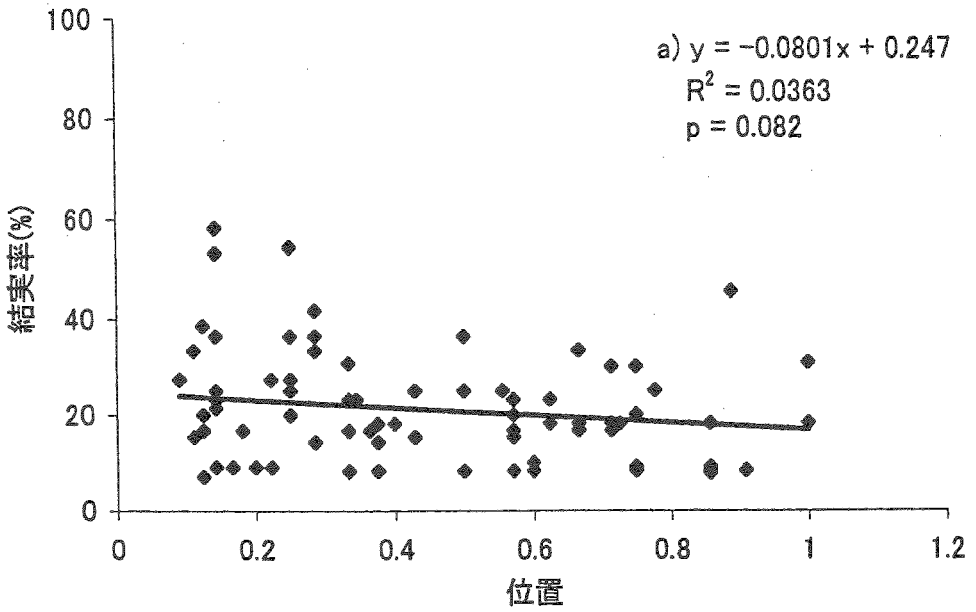
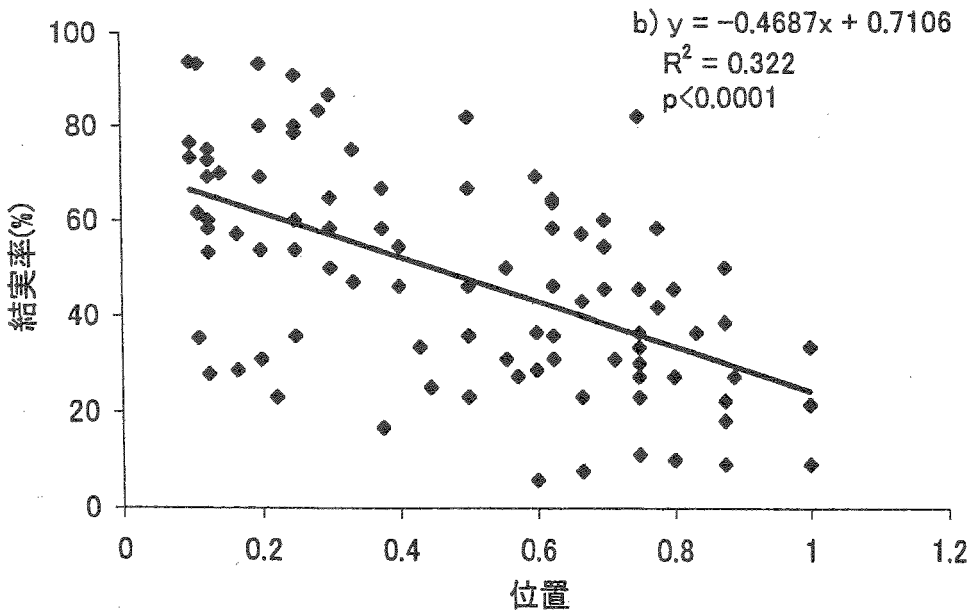


図17 コントロール個体の花の位置と平均結果率の関係
グラフ中のバーは土標準誤差を示す。



a) コントロール



b) 強制他家受粉

図18 花の位置と結実率の関係

栄養繁殖

栄養繁殖由来の個体の写真を図19に示す。図19-aは1葉段階の個体で親個体由来と思われる根茎の断片の付着が見られる。また3葉段階の個体を示した図19-bでも同様に親個体由来の根茎が見られるが、色が褐変していることから、親個体から分離した後、ある程度期間を経ているものと考えられる。地上茎の基部に見える紡錘形の部分は当年形成された地下茎である。

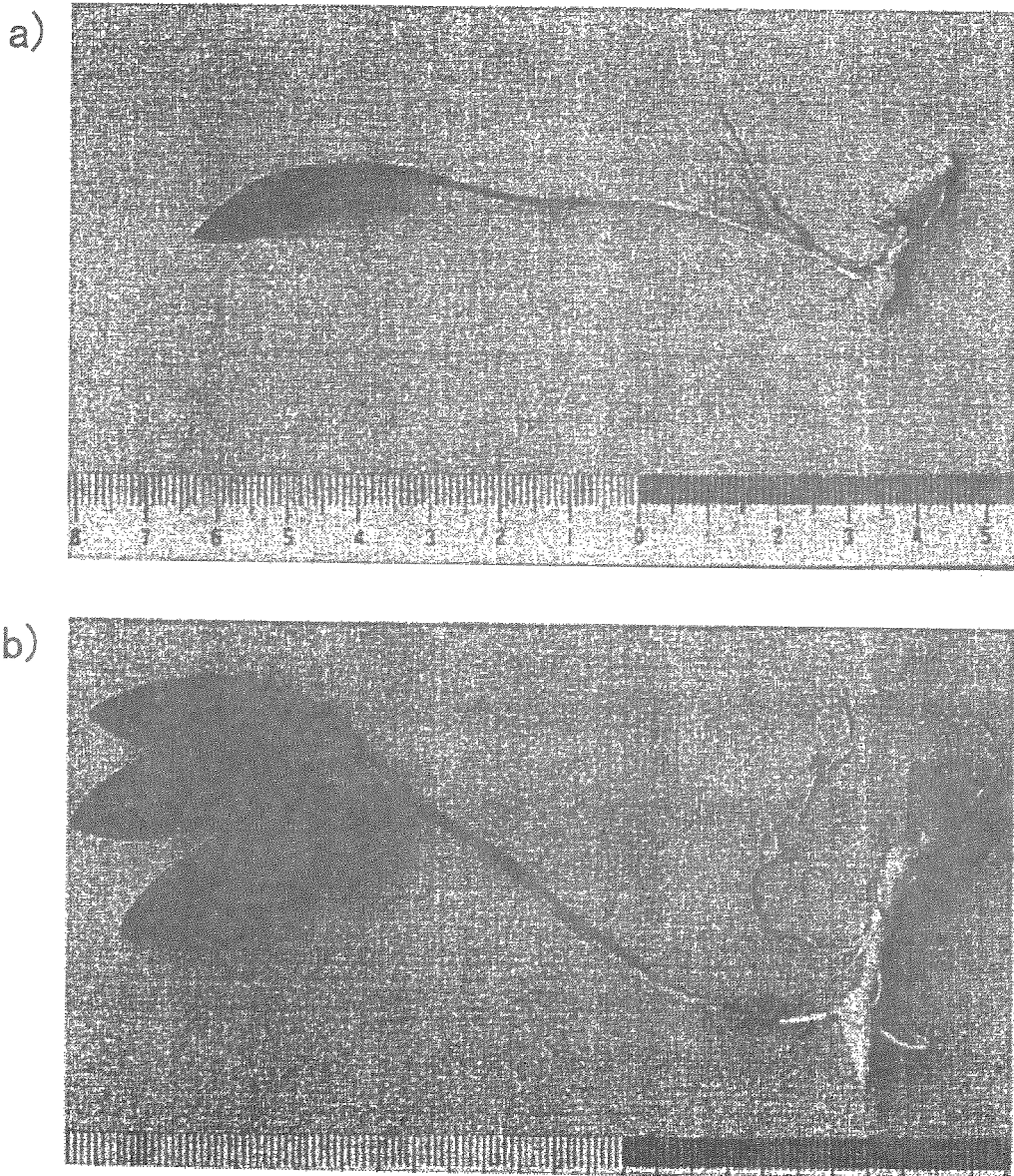


図19 栄養繁殖個体の写真

考 察

ステージ・クラス構造

ステージ・クラス構造は個体のサイズを基準に成長段階を区分しているため、直接的に齡構造を評価することはできない。しかし植物においては、栄養成長から生殖成長への移行には一定の個体サイズ (critical size) に達する必要がある、齡構造よりも個体サイズに基づくステージ・クラス構造の方が、個体群の動態を良く反映することが知られている (河野 1984)。Ohara and Kawano (1986) ならびに Ohara and Utech (1986) が行ったエンレイソウ属植物の繁殖様式の分化に関する一連の研究では、種子繁殖を優占的に行う種群では、実生段階における顕著な個体数の減少の後、その後のステージで減少傾向が安定するという構造を示した。同様のステージ・クラス構造は、やはり種子繁殖を行う他の林床性の多年生植物でも確認されている (Kawano et al., 1982)。一方、栄養繁殖を行う種群では、中間のステージで一時的な個体数の増加がみられ、凸型の構造を示した。この凸型のステージ・クラス構造は個体群への、種子繁殖を介した個体の移入の程度の低さを示すとともに、栄養繁殖由来の個体が中間のステージから出現することを示している。このようにステージ・クラス構造は植物の繁殖様式と密接に関連している。

本研究で行ったアマドコロに関する調査では、調査区 1 では 4 葉段階に個体数のピークを持ち、その後、徐々に個体数が減少する構造が観察された。一方、調査区 2 では、ステージ・クラス後半に個体数のピークを持つ構造が観察された。従って、両調査区ともに、これまで種子繁殖に依存している植物群で得られたステージ・クラス構造とは異なる構造を示した。この理由として、栄養繁殖の存在が考えられるが、アマドコロの栄養繁殖の様式ならびにその程度に関しては、不明な点が多く、今後詳しい調査が必要である。

開花フェノロジー

交配実験において、強制自家受粉処理ならびに袋がけ処理の結果率は、それぞれ 2.0% 及び 0.7% と、非常に低い値を示したことから、アマドコロは自家不和合性を持ち、自動自家受粉は行わないと判断された。実際には、この両処理では、それぞれ 2 個の花において結実が認められたが、強制自家受粉では受粉処理の際に他個体の花粉が付着したことによる他家花粉の混入の可能性が考えられ、袋がけ処理では袋の隙間より、虫が侵入したものと考えられる。また、強制他家受粉により結果率

および結実率が上昇したことから、調査地のアマドコロは強い花粉制限を受けていることが示された。以上のことからアマドコロは種子繁殖においては自家不和合性を持ち完全他殖を行い、種子生産にはポリネータが必要不可欠であることが示唆された。

調査地では、チゴユリ (*Disporum smilacinum*)、ミツバツチグリ (*Potentilla freyniana*) 等が同時期に開花していたが、いずれもアマドコロに比べて非常に個体数が少なかった。このため、アマドコロの開花の終了とともにマルハナバチを誘引し、餌を提供する資源植物が急激に減少すると考えられる。実際、アマドコロの開花フェノロジーとマルハナバチの個体数の経時変化から、マルハナバチの活動時期とアマドコロの開花時期が良く一致しており、アマドコロの種子繁殖とマルハナバチの訪花活動が密接に関わっていることが示された。

花への資源分配

本研究では花サイズに関して、花筒長、花筒直径、花冠長、花冠直径の4つの形質について測定を行った。これらの形質のうち、花筒直径、花冠長、花冠直径の3つの形質においては、いずれも上位置の花の方が比較的大きく、下位置の花が比較的に小さいという結果が得られた。花筒直径は子房の直径を近似していると考えられるために、花の段階における種子生産への投資の指標の一つとして捉えることができる。また、花冠長、ならびに花冠直径は送粉昆虫への誇示のための投資を表す指標の一つとして考えることができる。従って、花の位置による、3つの形質の違いは媒介者の誘引と種子の質にも影響を及ぼしているものと考えられる。また、花当たりの花粉数でも下位置の花ほど多く、上位置の花になるほど少なくなる傾向がみられた。このように、花の多くの形態の変異に関して、花序の下方では大きく上方では小さいという共通した傾向がみられた。

さらに、アマドコロの開花フェノロジーに関しては、花序の下方の花から徐々に上方の花へと開花が進行していった。この開花フェノロジーに対応して、ポリネータであるマルハナバチの訪花頻度も、下位置の花が開花していた時期は高く、開花順序の遅い上位置の花が開花していた時期は訪花頻度も低かった。また、コントロールの結果率は、花序の下位置の花で高い結果率を示し、上位置の花で低い結果率を示した。以上のことから、花の形態の違い、及びポリネータの訪花頻度の違いが種子結実にも、影響を及ぼしていると考えられる。

さらに、多くの両性花植物では開花順序が遅くなるに伴い、結実への資源投資も

少なくなることが知られている (Holtsford, 1985; Stephenson, 1979; Matshall et al., 1986; Lee, 1988; Thomson 1989)。しかし、コントロールにおいては、花の位置と結実率との間に、一定の傾向はみられなかった。また、強制他花受粉による結実率の上昇が認められたが、コントロールの結実率と比較すると、花序の下位置の花では結実率に顕著な増大がみられたが、上位置の花ではその差は明瞭ではなかった。従って、マルハナバチの訪花頻度が下位置の花の開花している時期により高いにも関わらず、この結果は、花粉制限が下位置の花でより強く効いているということを示していると考えられる。この理由については、マルハナバチが1回の訪花で媒介する花粉数の多少、ならびに、自家花粉及び近親個体の花粉が柱頭を覆うことにより他家花粉の受粉が阻害されることによる影響 (clogging) などが考えられる。しかしながら、本実験ではこれらの点に関する定量的な調査を行っていないため、今後の調査が必要である。

引用文献

- Ashman, T.L., and Schoen, D.J. 1994. How long should flowers live?
Nature 371 : 788-791.
- Cruden, R.W. 1977. Pollen-ovule ratios : A conservative indicator of breeding systems in flowering plants. Evolution 31 : 32-46.
- Harder, L.D., and Thomson, J.D. 1989. Evolutionary options for maximizing pollen dispersal of animal-pollinated plants.
American Naturalist 133 : 323-344.
- Helenium, K., and Barrett, S.C.H. 1986. The reproductive biology of boreal forest herbs. II. Phenology of flowering and fruiting.
Canadian Journal of Botany 65 : 2047-2056.
- Holtsford, T.P. 1985. Nonfruiting hermaphroditic flowers of it *Calochortus leichtlinii* (Liliaceae) : potential reproductive functions. American Journal of Botany 72 : 1687-1694.
- Kawano, S., Hiratsuka, A. and Hayashi, K. 1982. Life history characteristics and survivorship of *Erythronium japonicum*.
Oikos 38 : 129-149.
- 菊沢喜八郎, 1995. 「植物の繁殖生態学」 蒼樹書房, 東京.
- 河野 昭一, 1984. 「植物の生活史と進化」 培風館, 東京.
- Lee, T.D., and Bazzaz, F.A. 1982. Regulation of fruit and seed production in an annual legume, *Cassia fasciculata*. Ecology 63 : 1363-1373.
- Marshall, D.L., Levin, D.A., and Fowler, N.L. 1985. Plasticity in yield components in response to fruit predation and date of fruit initiation three species of it *Sesbania* (Leguminosae). Journal of Ecology 73 : 71-81.

- Ohara M., and Kawano, S. 1986. Life history studies on the genus *Trillium* (Liliaceae) IV. Stage class structures and spatial distribution of four Japanese species. *Plant Species Biology* 1 : 147-161.
- Ohara M., and Utech, F.H. 1986. Life history studies on the genus *Trillium* (Liliaceae) III. Reproductive biology of six sessile flowered species occurring in the southeastern United States with special reference to vegetative reproduction. *Plant Species Biology* 1 : 135-145.
- 佐竹 義輔, 大井 次三郎, 北村 四郎, 巨理 俊次, 富成 忠夫, 1982. 「日本の野生植物」 平凡社, 東京.
- Schemske, D.W., Willson, M.F., Melampy, M.N., Miller, L.J., Verner, L., Schemske, K.M., and Best, L.B. 1978. Flowering ecology of some spring woodland herbs. *Ecology* 59 : 351-366.
- Stephenson, A.G. 1980. Fruit set, herbivory, fruit reduction, and the fruiting strategy of *Catalpa speciosa* (Bignoniaceae). *Ecology* 61 : 57-64.
- Stephenson, A.G. 1984. The regulation of maternal investment in an indeterminate flowering plant (*Lotus coeniculatus*). *Ecology* 65 : 113-121
- Suzuki, K. 1992. Bumblebee pollinators and pollination ecotypes of *Isodon umbrosus* and *I. shikokianus* (Lamiaceae). *Plant Species Biology* 7 : 37-48
- Young, H.J., and Stanton, M.L. 1989. Temporal patterns of gamete production within individuals of *Raphanus sativas* (Brassicaceae). *Canadian Journal of Botany* 68 : 480-486.

第2章 コバギボウシ(ユリ科)の種子繁殖における送粉昆虫の役割と環境評価

鈴木 和 雄 (山口県立大学生生活科学部)

要 旨

- 1) 地理的変異の大きな花は特定の地域の送粉者に特化していることが考えられる。コバギボウシはそのような植物の一つである。
 - 2) もっぱらトラマルハナバチによって送粉されていた九州産のコバギボウシを関東山地に移植し、今まで訪花したことのないミヤママルハナバチマルハナバチ及び九州でも訪花していたトラマルハナバチを訪花させて、それらの間で送粉効果に違いがあるか比較し、特化の程度を評価した。
 - 3) 1回訪花時の葯からの花粉持ち去り量ではトラマルハナバチ、ミヤママルハナバチの間で有意差はなかった。また、1回訪花時の柱頭への花粉付着量では2種の間で有意差があり、トラマルハナバチが有意に多くの花粉を柱頭に付着させていた。
 - 4) トラマルハナバチでは花冠全長 (CL)、花冠全長/花冠高さ (CL/CH)、広筒部高さ (BH)、広筒部長さ (BL) が大きいほど花粉持ち去り量が大きくなるが、ミヤママルハナバチではそのような傾向は見られなかった。オシベの長さ-花冠全長 (StL-CL) に対する花粉持ち去り量は、トラマルハナバチでは有意な関係はなかったが、ミヤママルハナバチでは、StL-CLが小さいほど花粉持ち去り量が大きくなるという関係があった。トラマルハナバチ、ミヤママルハナバチともに、花サイズと柱頭への花粉付着量には相関がなかった。
 - 5) ミヤママルハナバチは、トラマルハナバチよりも体が小さく、九州産のコバギボウシにも花粉を持ち去るという点では対応しているが、花粉付着という点ではトラマルハナバチより劣り、それほど対応していないと考えられる。ミヤママルハナバチでは、花粉持ち去り量がStL-CLに影響されるということから、サイズのより小さいミヤママルハナバチではStL-CLの値が小さくなるほど葯にある花粉に接する機会が多くなると考えられる。柱頭への花粉付着量の差は2種のハチのサイズ差によるものであろう。
- 花の形は驚くほど多様である。このような様々な花の形はどのようにして進化し

てきたのだろうか。ダーウィン (1859) は花とその花粉を媒介する者 (送粉者) との関係に注目し、それぞれの形態が形作られてきた過程を共進化で説明しようとした。この研究以来、特定の花の形を特定の送粉者と結びつけて解釈しようとする試みが多くなされてきた (Grant and Grand 1968, Stebbins 1974)。しかし、最近になって、特定の送粉者だけによって送粉される植物は少なく、多くの植物では複数の種類の送粉者によって送粉されることが指摘され、多くの花がジェネラリスト型であることが言われるようになってきた (Herrera 1996, Waser 1998)。このことから、実際に複数種の送粉者がいるのかどうか、訪花者ごとに詳しい送粉能力を明らかにし、比較することがまず必要であると言われている (Johnson and Steiner 2000)。すなわち、花形態を送粉者との関係から考えるためには訪花者の実際の送粉効果を調べておく必要がある。

オオバギボウシとコバギボウシは共に複数の訪花昆虫が認められているが、特定の訪花者が送粉しているとされている (Takahashi et al . 1994)。しかし、注目すべきは、コバギボウシではその花の狭筒部と広筒部との境界がはっきりとしている一方、オオバギボウシではその境界がはっきりせずなだらかに移行するような形態をとっていることである。この違いにはどのような意味があるのだろうか。ギボウシ属植物はすべて先が開いたベル型の花形態をしている。このような花形態そのものも送粉効果の上でどのような意味をもって進化してきたのだろうか。

コバギボウシは広く北海道から九州まで分布している。また形態的な変異が大きく、特に花形態での地理的変異が著しいことが報告されている (藤田,1976)。しかし、オオバギボウシでは花形態の変異が大きいとは特に言われていない (藤田 1976)。ギボウシ類の訪花昆虫はマルハナバチ類が主であるが、マルハナバチ類は種類によって分布域が異なる (伊藤1991) ことから、地域によって種構成が大きく変わる。例えば、中国、四国、九州地方では種類がかなり限定され、秋にギボウシ類に訪花するのは、トラマルハナバチマルハナバチだけである。一方、本州中部山地には、場所によってはトラマルハナバチマルハナバチの他にナガマルハナバチ、ミヤママルハナバチマルハナバチ、オオマルハナバチが同所的に様々な頻度で分布し、これらのマルハナバチが訪花していることが予想される。岐阜ではそれにもかかわらずトラマルハナバチマルハナバチが主要な送粉昆虫となっていることが報告されている (Takahashi et al . 1994)。ところで、関東山地のオオバギボウシではナガマルハナバチ、トラマルハナバチマルハナバチ、ミヤマ

マルハナバチマルハナバチの3種が訪花し、これら3種は同じ送粉効果を持っていることが示されている (Suzuki unpubl.)。しかし、コバギボウシは花形態がオオバギボウシと異なり、狭筒部と広筒部との境がはっきりしており、かつ地理的変異が激しいことから特定の送粉昆虫との結びつきがより大きいと予想される。従って、本州中部のコバギボウシに訪花するマルハナバチ類のそれぞれの送粉効果を比較することが、コバギボウシとオオバギウシの花形態の違いの意味を考える上で重要なことである。また、九州産のトラマルハナバチマルハナバチにもっぱら訪花されているコバギボウシが、今まで訪花されたことのない他のマルハナバチ種の訪花を受けた場合、どのくらいの送粉効果があるのか、興味深いことである。つまりどの程度コバギボウシが九州で特化しているかが判断できるからである。今回は九州産のコバギボウシを本州中部に移植し、そこのトラマルハナバチマルハナバチとミヤママルハナバチマルハナバチに訪花させ、送粉効果を比較した。

材料と方法

山梨県塩山市一ノ瀬高原犬切峠付近の防火帯（標高1500m）において調査を行った。コバギボウシの花におけるマルハナバチ各種の送粉効果は1回訪花時の柱頭への花粉付着量と葯からの花粉持ち去り量でもって評価した。

訪花実験の手順は次の通りである。

- 1) 熊本県人吉市田野の自生地から20株ほどを鉢植えにし、用意した。
- 2) 咲く直前のつぼみを探し、蚊帳をかけておいた。
- 3) 翌日、蚊帳をはずし、開花していたものにマルハナバチが一回訪花するのを待った。
- 4) 一回訪花した後、次の3つの処理をした。
 - a) 葯からの花粉持ち去り量 …… 葯を採取し、花粉をフクシン・ゼリーで染色し、プレパラートに固定した。
 - b) 柱頭への花粉付着量 …… 柱頭を採取し、花粉をフクシン・ゼリーで染色し、プレパラートに固定した。
 - c) 花サイズの測定 …… コバギボウシの雄しべの長さ(StL)、雌しべの長さ(PiL)、狭筒部の長さ(TL)・高さ(TH)・幅(TW)、広筒部の長さ(BL)・高さ(BH)・

幅(BW)、花冠全長(CL)、花開口部の高さ(CH)・幅(CW)をノギスで測定した(図2)。

- 5) 訪花していない2つの花の葯を採取し、同様の操作でプレパラートに固定し、コントロールとした。
- 6) 上記プレパラートを研究室に持ち帰り実体顕微鏡を用いて、花粉数を数えた。花粉持ち去り量(removal)はコントロールから葯に残った花粉量を引いて算出した。

結 果

トラマルハナバチとミヤママルハナバチの送粉効果の比較

- 1) マルハナバチ1回訪花時の葯からの花粉持ち去り量はの平均値は、トラマルハナバチでは10316.056個であった。一方ミヤママルハナバチでは10192.611個であり、2種の間で有意な差は見られなかった($p=0.9318$)(図1)。
- 2) マルハナバチ1回訪花時の柱頭への花粉付着量の平均値は、トラマルハナバチでは201.056個であった。一方ミヤママルハナバチでは半分以下の75.444個であり、2種の間で有意差がありトラマルハナバチが有意に多くの花粉を柱頭に付着させていた($p=0.0043$)(図2)。

花サイズと送粉効果の関係

- 1) CLとremovalでは、トラマルハナバチではCLが大きくなるほど、removalも大きくなることが分かった。このような関係は、CL/CH、BH、BLにおいても見られた。CL/CHとは花の形を表している。一方、ミヤママルハナバチではどの花サイズにおいてもこのような傾向は見られなかった。
- 2) StL-CLとremovalでは、ミヤママルハナバチではStL-CLが小さくなるほど、removalが大きくなることが分かった(図3)。一方このような関係はトラマルハナバチでは見られなかった。
- 3) トラマルハナバチ、ミヤママルハナバチともに花サイズと柱頭への花粉付着量には相関が見られなかった。

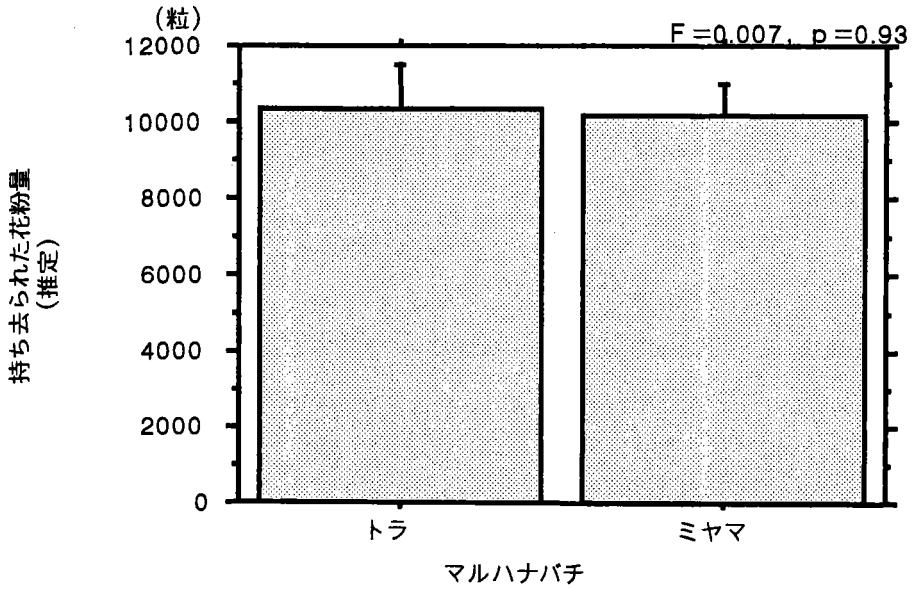


図1 マルハナバチ 1 回訪花時の葯からの花粉持ち去り量
(推定花粉量-残った花粉量)
トラ：n=18、ミヤマ：n=18

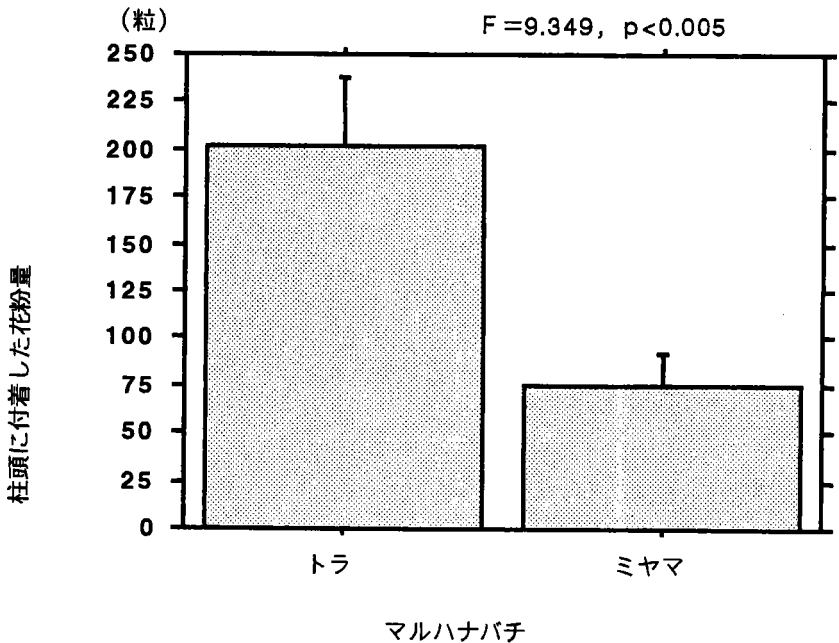


図2 マルハナバチ 1 回訪花時の柱頭への花粉付着量

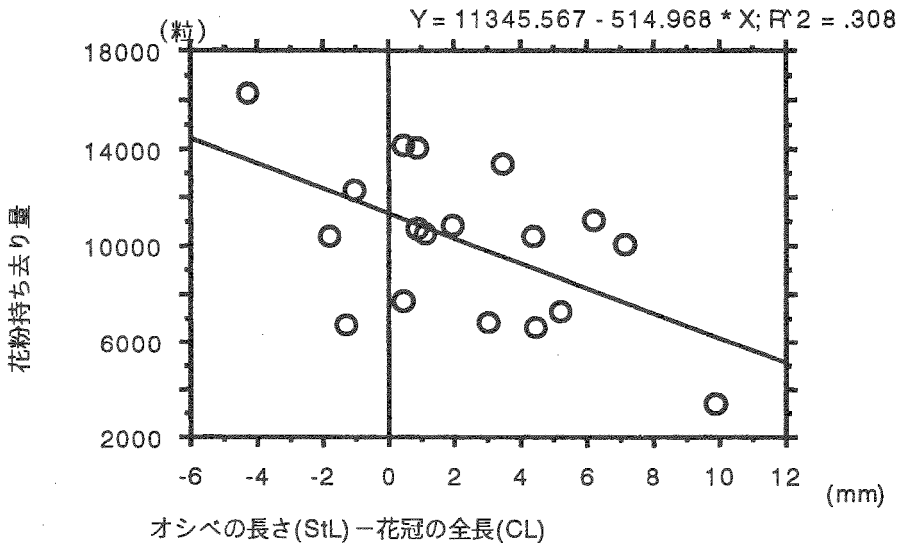


図3 ミヤママルハナバチにおけるオシベの長さ(StL)－花冠の全長(CL)と花粉持ち去り量の関係

考 察

トラマルハナバチとミヤママルハナバチの送粉効果の比較に関連して、removalで2種の間には有意な差が見られなかったことから、花冠全長とオシベの間が狭く、体の大きさに関係なく薬に触れることができ、トラマルハナバチ、ミヤママルハナバチともに花粉を十分に持ち去ることができると考えられる。また、柱頭への花粉付着量に有意な差が見られたことから、花冠全長とメシベの間が広く、体の大きいトラマルハナバチの方がミヤママルハナバチより柱頭に触れやすいため、花粉を多く付着させると考えられる。したがって、ミヤママルハナバチは九州産のコバギボウシにも、花粉を持ち去るという点では対応しているが、花粉付着という点ではトラマルハナバチより劣り、対応していないと考えられる。

花サイズと送粉効果の関係に関連して(図4参照)、トラマルハナバチでは、removalがCL、CL/CH、BH、BLに影響されるということから、この値が大きくなるほど花の中に滞在する時間が長くなり、薬にある花粉に接する機会が多くなると考えられる。あるいは、これらの花サイズが大きいほど、もともと薬にある花粉量も多くなり、

removalも大きくなるということも考えられる。一方、体の小さいミヤママルハナバチは、これらの花サイズに影響を受けず、花粉を持ち去ることができると考えられる。一方、ミヤママルハナバチでは、removalがStL-CLに影響されるということから、体のより小さいミヤママルハナバチではこの値が小さくなるほど葯にある花粉に接する機会が多くなると考えられる。一方、体の大きいトラマルハナバチはオシベの長さに関わらず花粉に接することができる。つまり、ハチサイズの差によってこのような違いが生じたと考えられる。この他、トラマルハナバチ、ミヤママルハナバチともに花サイズと柱頭への花粉付着量には相関が見られなかったことから、柱頭への花粉付着においてはハチサイズが影響していると考えられる。以上のことより、コバギボウシの花は地域ごとに特定のマルハナバチ種に対応して変異していることが示唆された。

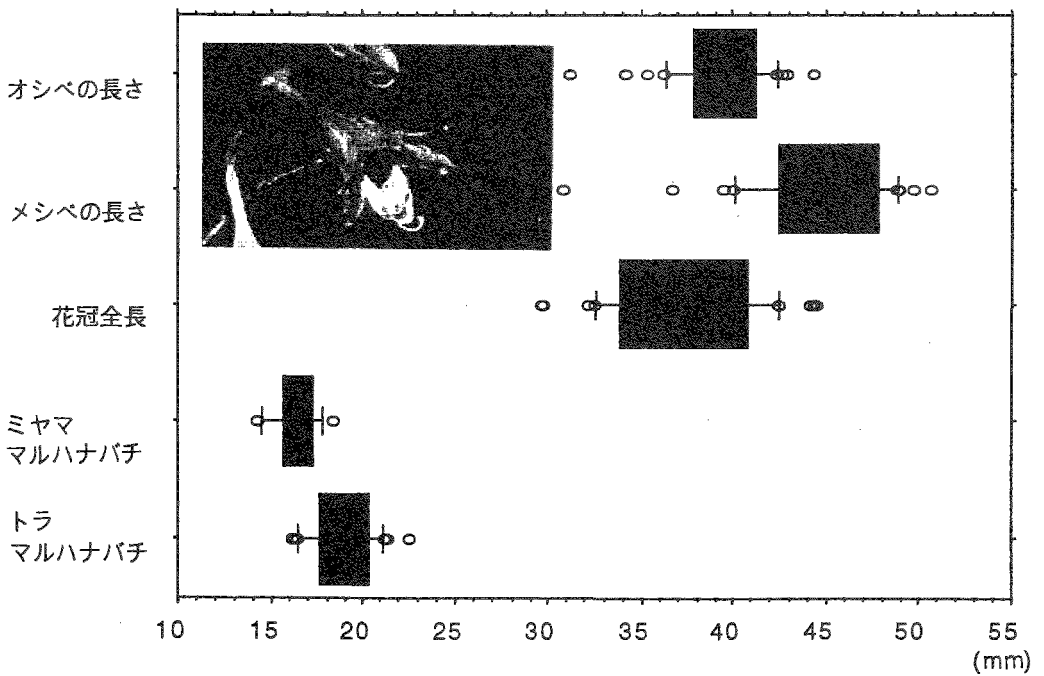


図4 コバギボウシとマルハナバチ2種のサイズの比較

引用文献

- Darwin, C. 1859. On the Origin of Species by Natural Selection. John Murray, London
- 藤田 昇 1976. 日本産ギボウシ属 (ユリ科) 植物分類地理27 : 66-96.
- Herrera, C. M. 1996. Floral traits and plant adaptation to insect pollinators : a devil's advocate approach. In D. G. Lloyd and S. C. H. Barrett(eds.), Floral biology : studies on floral evolution in animal-pollinated systems. Chapman and Hall, New York, pp.65- 87.
- 伊藤誠夫 1991. 日本産マルハナバチの分類、生態、分布 ベルンド、ハインリッ
チ (井上民二 監訳) マルハナバチの経済学 文一総合出版 258-292.
- Johnson, S. D. and K. E. Steiner. 2000. Generalization versus specialization in
plant pollination systems. Trends in Ecology and Evolution15 : 140-143.
- Kearns, C.A. and D.W. Inouye. 1993. Techniques for Pollination Biologists.
University Press of Colorado, Niwot, CO
- Takahashi, H., Y. Goto, S. Kanematsu, S. Niwa, K. Mori and K. Nozaki. 1994.
Pollination biology of *Hosta sieboldiana* (Lodd.) Engler and *H. sieboldii*
(Paxton) J. Ingram (Liliaceae). Plant Species Biology 9 : 23 30.

第 3 章

Visitation frequency of *Melampyrum roseum* var. *japonicum* (Scrophulariaceae) by three bumblebee species and its relation to pollination efficiency

Kayako Hiei : Department of General Systems Studies,
The University of Tokyo

Kazuo Suzuki : Faculty of Human Life Sciences,
Yamaguchi Prefectural University

要 旨

ママコナを訪花している 3 種のマルハナバチ（ナガマルハナバチ、トラマルハナバチ、ミヤママルハナバチ）の訪花回数を制御し、マルハナバチ種間の送粉効果を比較する実験を行った。

まずはじめに、ミヤママルハナバチは口吻長が短く、花の中に頭部を深く押し入れて吸蜜するため、胸部背板と葯の部分との接触があり、送粉効果が高かった。3 種の中ではミヤママルハナバチの一回訪花により、ママコナの柱頭に付着させる花粉数が最も多く、結実率も最も高いことが明らかになった。一方、口吻長が中位のトラマルハナバチでは、頭部と葯の部分とが接触し、一回の訪花における葯からの花粉の持ち出し量が最も多く、結実率はミヤママルハナバチと同程度であった。口吻長が最も長いナガマルハナバチは、調査地の優先種で自然状態における訪花頻度は最も高かったが、頭楯部と葯との接触では、柱頭への付着量も花粉の持ち出し量も少なく、結果として結実率は最も低かった。以上から、マルハナバチ花間の形態的な一致は一回の訪花で得られる送粉効果に影響を与える重要な要因であることが明らかになった。

次に、どのマルハナバチ種においても結実率及び花粉持ち出し量は訪花回数の増加とともに増すが、3 回以上の訪花では一定値に落ち着くことがわかった。結実率の安定値は、調査地のママコナ群落全体の平均結実率に一致していた。マルハナバチ種間の訪花効果の違いも訪花回数の増加により不明瞭になることが示唆された。以上のことから、マルハナバチの訪花頻度が極端に少なくなった場合、すなわち送粉者の減少による花粉制限が生じるような事態においては、マルハナバチ種間の訪花効果の違いがママコナの群落維持に影響を与えることが示唆された。

Abstract

The efficiency of pollination of *Melampyrum roseum* var. *japonicum* by three bumblebee species, *Bombus consobrinus*, *B. diversus* and *B. honshuensis* was examined under experimental conditions where visitation frequencies in the field were controlled. First, we found that *B. honshuensis* with the shortest proboscis showed the highest pollination intensity in single visit experiments. Among the three bumblebee species, *B. honshuensis* deposited the most pollen per stigma, resulting in the highest seed set, though *B. diversus* removed the most pollen from the anthers. The pollination behavior of the bumblebees and the morphological match between pollinators and flowers were found to be important factors affecting the per-visit pollination intensity. Second, we detected that seed set and pollen removal increased and the difference in pollination intensity among the three bumblebee species disappeared when flowers were visited twice by any of the three bumblebee species. When flowers were visited three or four times, seed set and pollen removal did not increase anymore. These findings indicate that only when any bumblebee species visits scarcely, i.e., under conditions of pollinator limitation, pollination effectiveness differs among the bumblebee species.

Introduction

Flowers of animal-pollinated plants have become adapted in terms of shape, structure, color, and odor to particular pollinators (Grant 1971; Levin 1978; Robertson and Wyatt 1990; Wilson and Thomson 1996; Johnson and Steiner, 2000). Such floral features, therefore, may have evolved to fit traits of the most effective pollinators (Stebbins 1970; Grant 1971; Waser 1983a; Wilson and Thomson 1991). For example, the length of spurs or corolla tubes in various groups of plants is known to be closely related to the length of the proboscis of their pollinators (Grant and Grant 1965; Kwak 1979; Miller 1981; Nilsson 1988; Robertson and Wyatt 1990; Herrera 1996; Johnson and Steiner 1997). However, more than a few plants have a generalized pollination system (Herrera 1988,

1996; Waser et al. 1996). These flowers are pollinated by animals of various orders. We questioned whether these pollinators are evenly effective. Also, we questioned whether the flowers morphologically specialized for one specific pollinator can be pollinated effectively by other minor visitors. In the case of Japanese *Isodon*, it was known that each species has a specific bumblebee pollinator (Suzuki 1992) and the length of the corolla tube is related to the length of the proboscis of the dominant bumblebee visitors. Recently, Suzuki and Akazome (2000) showed that a minor bumblebee pollinator was also effective in the case of *Isodon umbrosus*. The pollination system in *I. umbrosus* is generalized for two bumblebee species. This suggests that some mechanism could make the pollination system generalized for dominant and minor pollinators (Wyatt 1983; Hulbert et al. 1996; Suzuki et al 2001). Therefore, the pollination efficiency of minor pollinators should be examined to clarify the pollination system of this plant which appears to be specialized. The question of most concern is what mechanisms make the pollination system generalized for plural bumblebee pollinators.

Flowers of *M. roseum* examined in this study have long corolla tubes and are visited mainly by three bumblebee species which differ significantly in proboscis length (Kudo 1993). The questions we asked were as follows. (1) Which bumblebee species is the most effective in terms of pollen removal, pollen deposition, and seed set upon a single visit? Are there differences in pollination efficiency among these three pollinators? (2) To what degree is a morphological match between pollinators and flowers related to the differences in pollination efficiency? In the case of the flowers of *M. roseum*, how important is a morphological match between pollinators and flowers for pollination success? (3) To what degree does seed set increase when each of three bumblebee species visits more than once? Or, to what degree is the visitation frequency related to pollination efficiency? In the present study, to answer these questions we examined the per-visit and multiple-visit pollination efficiencies of three bumblebee species in visitation of the flowers of *M. roseum* and the relationship between the pollination efficiency and a morphological match between pollinators and flowers. We also examined what mechanisms of the flower are related to the bumblebee-generalized pollination system of *M. roseum*.

Materials and Methods

Plants

Melampyrum roseum Maximowicz var. *japonicum* Franchet et Savatier (Scrophulariaceae) is an annual hemiparasitic herb which is distributed throughout the southern part of Korea, and throughout Kyushu, Shikoku, Honshu and the southern part of Hokkaido, Japan (Yamazaki 1954). The plants commonly grow in sunny meadows in montane areas. The corolla is pinkish purple with two lips, having one pistil and four stamens in its upper lip and two white gibbous swellings on its lower lip. Anthers dehisce simultaneously with flowering, however, the stigma becomes receptive a few hours later. Each flower contains four ovules. Flowering begins in July and continues until early September. In each inflorescence, the lowest two flowers open first, and then the others sequentially open towards the top.

Study site

The field study was carried out at the Pass of Inukiri, about 1500 m above sea level, in Yamanashi prefecture of central Japan, during the summers of 1995 through 1998. The study site was located at the source of the Tama River. At this site, the dominant plant species was *M. roseum*. All of the herbaceous plants are mowed in October every year, as this grassland is a firebreak.

Flower visitors

At the study site, *M. roseum* was visited by five bumblebee species: *B. consobrinus wittenburgi* Vogt, *B. diversus diversus* Smith, *B. honshuensis* Tkalcu, *B. hypocrita hypocrita* Pérez and *B. beaticola beaticola* Tkalcu. These bumblebee species differ in size and foraging behavior.

The population of bumblebees around the study site differed depending on the year and the season. The bumblebees around and in the study site were counted through 1995-1998. The visitation frequency of the bumblebees per flower per day was calculated

based on video camera recordings made 20 times (the duration in each instance ranged from 30 to 100 minutes). As only a few *B. beaticola* were seen in 1995, we were unable to accumulate data on this species, and therefore we excluded it from this study. Also, as *B. hypocrita* visited the flowers irradically and its foraging behavior was quite different from that of each of the other three species, we eliminated it from some analyses. *M. roseum* was also visited by other insects, such as syrphid flies (flower flies), ants and butterflies. However, in this study, we did not take them into account as pollinators, as their visiting frequency was much lower than that of bumblebees, and their bodies did not touch the anthers or stigmas of the flowers (Kojima and Hori 1994).

M. roseum breeding system

To examine the possibility of autonomous self-pollination and self-compatibility, a hand-pollination experiment was carried out. Flower buds were randomly selected and some flower buds in each individual were bagged before opening using cellophane paper to exclude pollinators. After flowering, the following treatments were applied. (1) Bagging: flowers were left untouched. (2) Self-pollination: flowers were unbagged and were pollinated with their own pollen and geitonogamous pollen. (3) Cross-pollination: flowers were unbagged, anthers were removed carefully in order not to touch a stigma of the same flower, and then pollen from three different individuals was applied to the stigma to outcross. After these treatments, the flowers were bagged again for three or four weeks until the seeds matured. Then the seeds in each capsule were counted. (4) Emasculation and open-pollination: anthers were removed and flowers were left unbagged, i.e., only xenogamous pollen could be deposited on the stigmas. (5) Open-pollination: intact flowers were pollinated freely by bumblebees. Three or four weeks later, open-pollinated flowers were collected and the seeds in each capsule were counted. These experiments were carried out in 1995 and 1996.

Amount of pollen deposition and pollen removal, and their relation to visitation frequencies

Flower buds of *M. roseum* were bagged with cellophane paper to exclude pollinators.

After flowering, each flower was pollinated by each bumblebee species. We controlled the visitation ensuring that only one species of bumblebees could visit a flower by brushing-off other species approaching the flower. After bumblebee visited once, stigmas were collected and stored in sampling tubes. These treatments were repeated to obtain more than 40 samples per one bumblebee species. The number of pollen grains deposited on a stigma was determined by counting them under a microscope. This experiment was carried out in 1997.

Flower buds were bagged until flowering. After bumblebee visited a flower once, twice, three times or four times, anthers of the plants were collected and stored in sampling tubes. 12 samples per visit condition per bumblebee species were collected in 1995. In the laboratory, pollen was removed from sampled anthers in 70% ethanol using an ultrasonic cleaner and the number of grains was determined by means of a particle counter (Model Z Coulter Counter). The total number of pollen grains produced by a flower was estimated from analysis of anthers of other flowers at bud.

To clarify the effects of bumblebee species and their visitation frequency to a flower on seed set, other randomly selected 332 flowers were used. After bumblebee visited a flower once, twice, three times or four times, bumblebee species and visitation frequency were recorded, and then the flower was bagged again in order to avoid additional visits. These treatments were repeated more than 25 times per each condition. Capsules were collected after 3 weeks in September. Seed set (%) was evaluated from seeds in a capsule divided by the number of ovules (=4). This experiment was carried out in 1995.

Measurement of flower size and bumblebee size, and size match

White gibbous flowers at the matured stage were randomly selected and the (1) length of the corolla, (2) length of the stamen, and (3) length of the pistil were measured with calipers (precision 0.05 mm).

Bumblebees that visited *M. roseum* flowers were captured, anesthetized using CO₂ gas and the (1) glossa length, (2) prementum length, (3) head length and (4) thorax length were measured. Each bumblebee was marked with an oil-based paint before being released,

in order to ensure that the same one was not measured again.

Fluorescent powdered dyes were applied to some dehiscent anthers with toothpicks, in order to examine which parts of the bumblebee touched the anthers. Bumblebees were captured immediately after visiting the flower and the position where pollen grains were deposited was defined.

Results

M. roseum breeding system

Hand-pollination verified that *M. roseum* was self-compatible, but this plant could not produce seeds when the pollinator was excluded by bagging (Table 1). This shows that there was not autonomous selfing. Homogamy forces self-pollination by pollinators. Seed set fertilized through self-pollination was lower than that in the case of cross-pollination, 10 % and 17 %, respectively in 1996. *M. roseum* is self-compatible and therefore is able to produce seeds not only by cross-pollination but also by self-pollination, though it needs pollinators for seed production. Two flowers on opposite sides of a node bloom a day and the four anthers of each flower dehisce at the same time. Therefore, these flowers always have the potential for geitonogamy.

Pollination efficiency at single visits

The number of pollen grains deposited on a stigma at a single visit by each bumblebee is shown in Fig. 1. *B. honshuensis* deposited 63 ± 6 (mean \pm SE, $n=43$) pollen grains on a stigma of a flower. In the case of *B. consobrinus*, a stigma received 48 ± 4 ($n=76$) grains, whereas in the case of *B. diversus*, a stigma received 35 ± 4 ($n=53$) grains. Moreover, in the case of *B. hypocrita*, a stigma received only 14 ± 6 ($n=6$) grains. Since *B. hypocrita* was scarce in 1997 and we couldn't collect enough samples, we excluded them from analysis. The amount of pollen was significantly different among the species (ANOVA: $F(2,169)=8.872, p=0.0002$). As to the pollen deposition, *B. honshuensis* was the most effective.

In order to estimate the number of pollen grains removed by bumblebees, the pollen grains remaining in anthers of a flower were counted. The amount of pollen grains remaining in anthers was significantly different among the species (ANOVA: $F(2,33)=5.916, p=0.006$). The single visit experiment showed that *B. diversus* removed the largest amount of pollen from the anther (cf. Fig. 3).

The seed set as a result of a single visit by *B. honshuensis*, *B. diversus* and *B. consobrinus* was 37%, 31% and 15%, respectively (cf. Fig. 4). On a single visit, production of seeds was affected by bumblebee species (ANOVA: $F(2,74)=4.317, p=0.0169$). The number of seeds fertilized through pollination by *B. honshuensis* was significantly higher than that in the case of *B. consobrinus* (Fisher's Protected LSD: $F=7.929, p=0.0062$).

Morphological match between flower and bumblebees

The average length of the corolla, stamen and pistil was 17.7 ± 0.1 mm, 14.2 ± 0.1 mm and 16.9 ± 0.1 mm (mean \pm SE, $n=277$), respectively. There were not significant fluctuations in flower size among these four years. The mean values of (1) glossa length, (2) prementum length, (3) head length and (4) thorax length (dorsal part) are shown in Table 2. The average glossa length in the case of *B. consobrinus*, *B. diversus* and *B. honshuensis* was 12.0 ± 0.3 mm ($n=60$), 9.8 ± 0.2 mm ($n=46$) and 6.32 ± 0.19 mm ($n=25$), respectively.

B. consobrinus, *B. diversus* and *B. honshuensis* visited flowers mainly to collect nectar and pollinated them nototribically (head-thorax pollination). Fluorescent-dye powder was deposited on the frons of *B. consobrinus*, on the head between the eyes of *B. diversus* and on the dorsal part of the thorax of *B. honshuensis*. Comparing the lengths from the tip of the glossa to these spots, where fluorescent-dye powder was deposited, with the length of the stamen of *M. roseum*, it became clear how each bumblebee approached the nectary (Fig.2). In the case of *B. honshuensis* with a short proboscis, the total length of the glossa plus the prementum plus the head was equal to the mean length of the stamen, and it matched the length from the tip of the glossa to the spot (pronotum). This means that *B. honshuensis* had to extend its glossa and prementum to suck nectar.

However, *B. consobrinus* and *B. diversus* which have glossa long enough to suck nectar, did not need to extend their prementum. Therefore, such morphological matching was important for determining the position where a larger amount of pollen was deposited. *B. hypocrita* with the shortest proboscis did not reach the nectary. This species of bumblebee visited flowers to collect pollen and received pollen on the side of its thorax sternotribically.

Effect of visitation frequency

The relationship between visitation frequency and pollen removal by bumblebee species is shown in Fig. 3. The total number of pollen grains in four anthers was estimated to be about 120000. The number of pollen grains remaining in the anthers decreased markedly with an increase in visitation frequency (ANOVA: $F(3,132)=9.532, p=0.0001$). Most of the pollen was removed by the time of the second visit of any of the bumblebees, therefore, the difference in pollination intensity among bumblebee species disappeared after more than one visit.

The relationship between the visitation frequency of the three bumblebee species and the seed set of the visited flowers is shown in Fig. 4. The seed set as a result of a single visit by any bumblebee was significantly lower than that in the case of multiple visits (ANOVA: $F(3,320)=9.171, p=0.0001$). When the flowers were visited more than once, the seed set increased up to 45-55%, irrespective of the species of bumblebees. However, the seed set of the flowers visited by any bumblebee species more than once was not significantly different.

Bumblebee fauna and visitation frequency

The number of bumblebee species visiting the flowering plants at the study site varied through the years (Fig. 5). In 1996, there were fewer *B. diversus*. In 1997, the number of *B. diversus* increased but the number of *B. honshuensis* decreased significantly. In August, at the peak of flowering, all four bumblebee species appeared to forage for nectar and pollen every year. The most predominant species was *B. consobrinus* at this site.

At the study site, a flower of *M. roseum* was pollinated 0.5-4 times per hour. As bumblebees visited the site from around 6:00 in the morning until 4:00 in the afternoon, we can assume from our observations that they worked about 10 hours a day. Then, a flower of *M. roseum* might be pollinated by bumblebees at least five times a day, and 40 times a day at the highest visitation frequency.

Discussion

Importance of a morphological match for pollination efficiency

Bombus honshuensis is the best matched pollinator for *M. roseum* since it accounts for the largest amount of pollen deposition and the highest seed set at single visits, although the most predominant visitor was *B. consobrinus*, and the pollinator which removed the largest amount of pollen was *B. diversus*. The first reason for this is that the best match between proboscis length and corolla tube length and also between proboscis length and the relative position of the stigma was seen in the case of *B. honshuensis*. To suck nectar, *B. honshuensis* needs to expand both the glossa and the prementum. It is said that bumblebees seldom use the prementum because its expansion required extra energy (Harder 1982). Indeed, both *B. diversus* and *B. consobrinus* with a longer proboscis sucked nectar from the flowers of *M. roseum* without expanding their prementa. These species could obtain food from other flowers with longer tubes, e. g., *Hosta sieboldiana*, whereas *B. honshuensis* could not reach their nectaries. Therefore, the reproductive organs of flowers, especially the length of the stamens and the length of the pistil were the best match to the proboscis length of *B. honshuensis*, although they needed much energy to collect nectar. The second reason is that the body part of bumblebees used for carrying pollen is important in terms of the availability of pollen for pollen deposition. In the case of *B. honshuensis*, the body part used for this purpose is the dorsal part of the thorax, i.e., “a safe site” of the body (Harder and Barrett 1996). Pollen scarcely falls from this site as a result of grooming. This may be closely related to the finding that *B. honshuensis* deposits the largest amount of pollen on the stigma, and is related to the higher seed set. On the

other hand, *B. diversus* deposits a smaller amount of pollen though it removes the largest amount of pollen, among the three bumblebee species. When a bumblebee inserts its head into a flower of *Melampyrum arvense*, stamens in two inward-facing pairs which are normally pressed together are released allowing pollen to fall from them onto its head (Kwak 1988). The width of the head of *B. diversus* was the best fit for pollen removal. Consequently, the largest amount of pollen was removed by *B. diversus*, but the position was not “a safe site” to carry much pollen to another flower.

Pollinator limitation and the bumblebee-generalized pollination system

In spite of *B. honshuensis* showing the highest pollination intensity among the three bumblebee species, it is predicted that this bumblebee species could not be a specific pollinator readily. In multiple-visit experiments, it appeared that there was no difference in the pollination intensity of the three bumblebee species, upon more than one visit.

Under natural circumstances, plants may suffer reduced seed set because co-occurring plant species share pollinators (Waser 1983b). It includes two mechanisms that may act simultaneously: pollinators may be attracted away from one plant to another more rewarding species resulting in reduced visitation, thereby lowering pollen deposition and seed set in the abandoned plant, or pollinators may switch between the two species resulting in interspecific pollen transfer. However, Kwak and Jennersten (1991) showed that *Melampyrum pratense* was not significantly affected by the presence of heterospecific pollen grains on their stigmas.

At the study site, although there were a few co-occurring plants, every randomly collected stigma (n=25) have received 50 conspecific pollen grains on average (Hiei, unpublished data). And every flower of *M. roseum* was pollinated at least five times a day. Results of multiple-visit experiments also showed that the seed set from open pollinated flowers was almost the same as that from the flowers visited more than once, thus multiple visits occurred under natural circumstances.

To confirm pollen limitation, many researchers have proposed extra hand pollination on stigmas in general (e.g., Kwak 1988; Murphy and Vasseur 1995; Juenger

and Bergelson 1997; Johnson and Bond 1997; Totland 1997; Corbet 1998). If pollen is limited, extra hand pollination raises the seed set. However, in the case of *M. roseum*, the seed set produced through hand pollination was always lower than that through open pollination. We, therefore, conclude that there was no pollen limitation at this site. This means that the contribution to pollination success (here, female success=seed set) is not based on the pollination intensity of a single visit but on the visitation frequency of each bumblebee species. *B. consobrinus* may be the most effective pollinator, since this bumblebee species was the most frequent pollinator of *M. roseum* at this site.

Without pollinator limitation, the pollination system of *M. roseum* is generalized for three bumblebee species. This is one of the cases of generalization for plural bumblebee pollinators. Morphological features of the flowers of *M. roseum* respond to the three bumblebee species differently, but the difference in these responses is small. This may be closely related to a change in abundance of certain bumblebee species among years and within a given year.

References

- Corbet, S.A. 1998. Fruit and seed production in relation to pollination and resources in bluebell, *Hyacinthoides non-scripta*. *Oecologia*, **114**: 349-360.
- Grant, V., and Grant, K.A. 1965. Flower Pollination in the Phlox Family, Columbia Univ. Press, New York.
- Grant, V. 1971. Plant Speciation. Columbia Univ. Press, New York.
- Harder, L.D. 1982. Measurement and estimation of functional proboscis length in bumblebees (Hymenoptera: Apidae). *Canadian Journal of Zoology*, **60**: 1073-1079.
- Harder, L.D., and Barrett, S.C.H. 1996. Pollen dispersal and mating patterns in animal-pollinated plants. *In Floral Biology: Studies on Floral Evolution in Animal-Pollinated Systems*. Edited by D.G. Lloyd and S.C.H. Barrett. Chapman and Hall, New York. pp. 140-190.

- Herrera, C.M. 1988. Variation in mutualisms: the spatio-temporal mosaic of a pollinator assemblage. *Biological Journal of the Linnean Society*, **35**: 95-125.
- Herrera, C.M. 1996. Floral traits and plant adaptation to insect pollinators: a devil's advocate approach. *In* *Floral biology: Biology: Studies on Floral Evolution in Animal-Pollinated Systems*. Edited by D.G. Lloyd and S.C.H. Barrett. Chapman and Hall, New York. pp. 65-87.
- Hulbert, A.H., Hosoi, S.A., Temels E.J., and Ewald, P. J. 1996. Mobility of *Impatiens capensis* flowers: effect on pollen deposition and hummingbird foraging. *Oecologia*, **105**: 243-246.
- Johnson, S.D., and Steiner, K.E. 1997. Long-tongued fly pollination and evolution of floral spur length in the *Disa draconis* complex (Orchidaceae). *Evolution*, **51**: 45-53.
- Johnson, S.D., and Bond, W.J. 1997. Evidence for widespread pollen limitation of fruiting success in cape wildflowers. *Oecologia*, **109**: 530-534.
- Johnson, S.D., and Steiner, K.E. 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems. *TREE*, **15**: 140-143.
- Juenger, T., and Bergelson, J. 1997. Pollen and resource limitation of compensation to herbivory in scarlet gilia, *Ipomopsis aggregata*. *Ecology*, **78**: 1684-1695.
- Kojima, J., and Hori, Y. 1994. Bumblebee pollination of *Melampyrum ciliare* (Scrophulariaceae). *Plant Species Biology*, **9**: 85-90.
- Kudo, N. 1993. Interactions between bumblebees and their visiting flowers in Okutama region. M.Sc. thesis, Department of Biology, Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan (in Japanese)
- Kwak, M.M. 1979. Effects of bumblebee visits on the seed set of *Pedicularis*, *Rhinanthus* and *Melampyrum* (Scrophulariaceae) in the Netherlands. *Acta Bot. Neerl.* **28**: 177-195.
- Kwak, M.M. 1988. Pollination ecology and seed-set in the rare annual species *Melampyrum arvense* L. (Scrophulariaceae). *Acta Bot. Neerl.* **37**: 153-163.

- Kwak, M.M. and Jennersten, O. 1991. Bumblebee visitation and seedset in *Melampyrum pratense* and *Viscaria vulgaris*: heterospecific pollen and pollen limitation. *Oecologia*, **86**: 99-104.
- Levin, D.A. 1978. Pollinator behavior and the breeding structure of plant populations. *In* The Pollination of Flowers by Insects. *Edited by* A.J.Rechards. Academic Press, London.
- Miller, R.B. 1981. Hawkmoths and the geographic patterns of floral variation in *Aquilegia caerulea*. *Evolution*, **35**: 763-774.
- Murphy, S.D., and Vasseur, L. 1995. Pollen limitation in a northern population of *Hepatica acutiloba*. *Can. J. B.* **73**: 1234-1241.
- Nilsson, L.A. 1988. The evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature*, **334**: 147-149.
- Robertson, J.L., and Wyatt, R. 1990. Evidence for pollination ecotypes in the yellow-fringed orchid, *Platanthera ciliaris*. *Evolution*, **44**: 121-133.
- Sttebins, G. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I: Pollination mechanisms. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **1**: 307-326.
- Suzuki, K. 1992. Bumblebee pollinators and pollination ecotypes of *Isodon umbrosus* and *I. shikokianus* (Lamiaceae). *Plant Species Biology*, **7**: 37-48.
- Suzuki, K., and Akazome, Y. 2000. Flexibility of pollinator-flower relationship in *Isodon umbrosus* and *I. effusus* (Lamiaceae) and its relation to fruit-set and seed-set. *J. Plant Res.* **113**: 149-155.
- Suzuki, K., Dohzono, I., and Hiei, K. 2001. Generalization and specialization in the pollination system of bumblebee-pollinated plants. *Plant Species Biology* (in press)
- Totland, O. 1997. Limitation on reproduction in alpine *Ranunculus acris*. *Can. J. Bot.* **75**: 137-144
- Waser, N.M. 1983a. The adaptive nature of floral traits: ideas and evidence. *In* *Pollination Biology*. *Edited by* L.A. Real. Academic Press, New York. pp. 241-285.

- Waser, N.M. 1983b. Competition for pollination and floral character differences among sympatric plant species: a review of evidence. *In Handbook of Experimental Pollination Biology*. Edited by C.E. Jones and R.J.Little. Van Nostrand Reinhold Co. Inc., New York. pp. 277-293.
- Waser, N.M., Chittka, L., Price, M.V., Williams, N., and Ollerton, J. 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology*, 77: 279-296.
- Wilson, P. and Thomson, J.D. 1991. Heterogeneity among floral visitors leads to discordance between removal and deposition of pollen. *Ecology*, 72:1503-1507.
- Wilson, P. and Thomson, J.D. 1996. How do flowers diverge? *In Floral Biology: Studies on Floral Evolution in Animal-Pollinated Systems*. Edited by D.G. Lloyd and S.C.H. Barrett. Chapman and Hall, New York. pp. 88-111.
- Wyatt, R. 1983. Pollinator-plant interactions and the evolution of breeding systems. *In Pollination Biology*. Edited by L. Real. Academic Press, New York.
- Yamazaki, T. 1954. *Melampyrum* of Eastern Asia. *J. Jap. Bot.* 29: 97-105.

Table 1. *Melampyrum roseum* var. *japonicum* breeding system. Seed set (%) was evaluated from number of seeds in a capsule divided by number of ovules (=4) in 1995 and 1996. Values shown are means \pm SE. Sample sizes are shown in parentheses.

Year	no-pollination	hand-pollination		open-pollination	
	(1) bagged	(2) selfed	(3) outcrossed	(4) emasculated	(5) intact
1995	0.5 \pm 0.4 (50)	19 \pm 4 (35)	16 \pm 7 (14)	-	42 \pm 2 (100)
1996	0.3 \pm 0.4 (80)	10 \pm 2 (56)	17 \pm 4 (37)	22 \pm 3 (86)	46 \pm 2 (95)

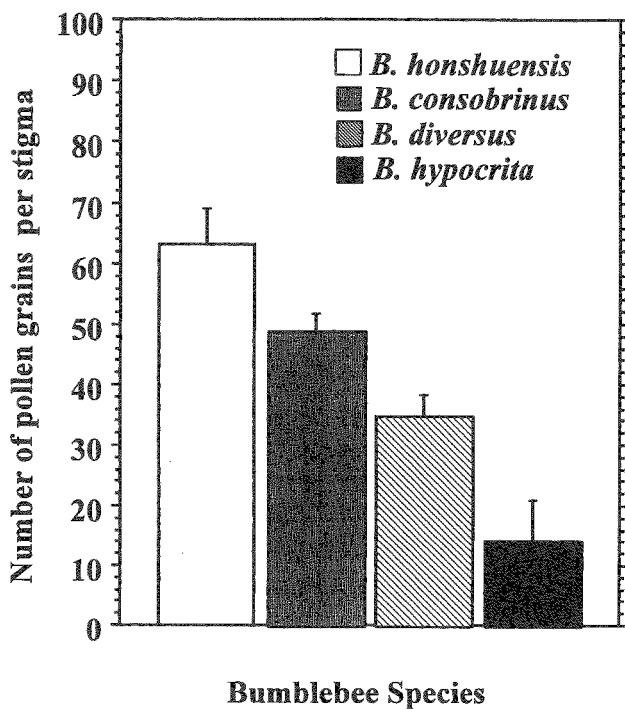


Fig. 1. Deposition of pollen grains per stigma of *Melampyrum roseum* by each of four bumblebee species.

Bar shows mean \pm SE.

Sample size: *B. honshuensis* (n=43)

B. consobrinus (n=76)

B. diversus (n=53)

B. hypocrita (n=6)

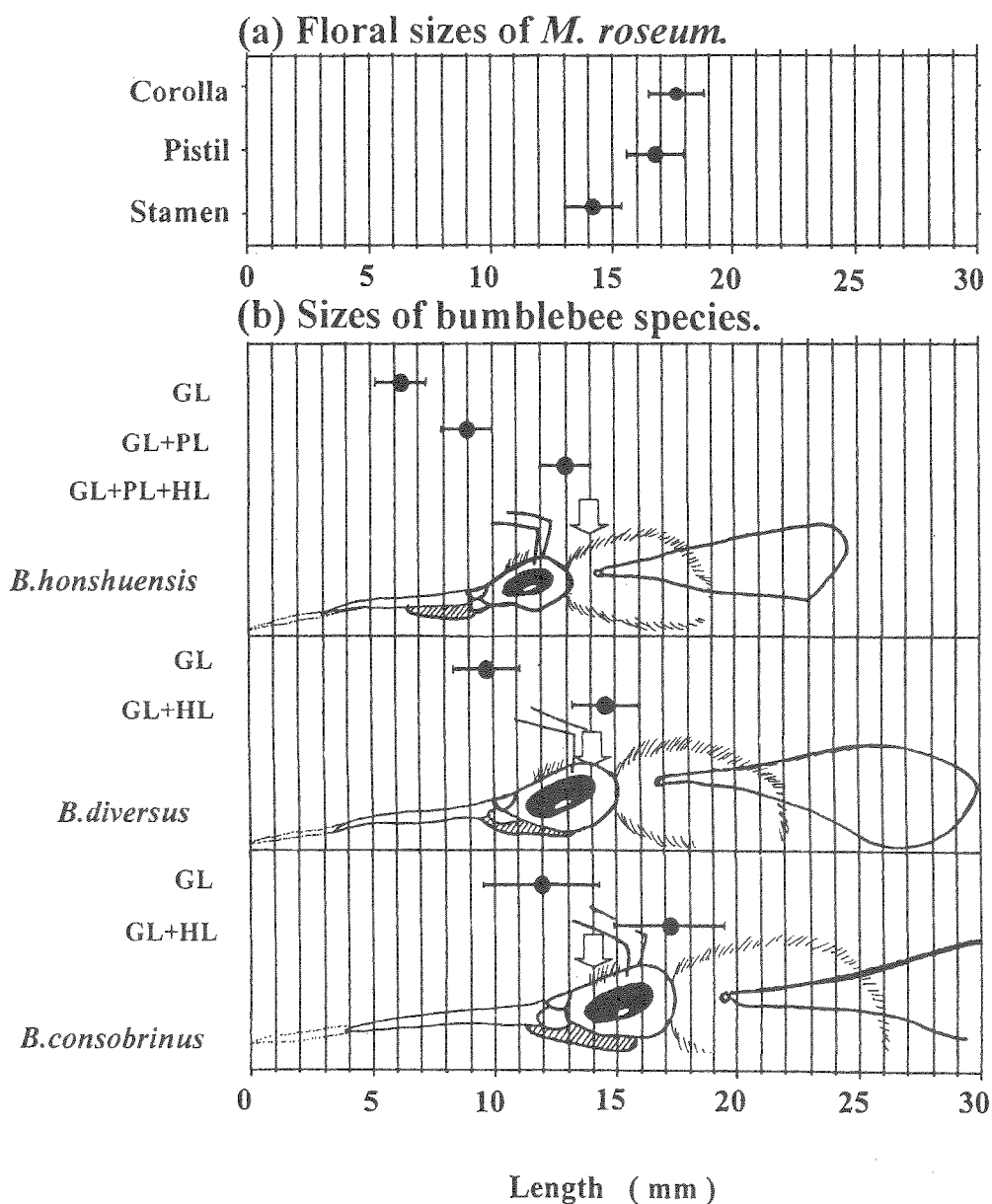


Fig. 2. Morphological match between flower and three bumblebee species.

(a) Floral sizes of *M. roseum*.

(b) Sizes of bumblebee species. GL: glossa length.

PL: prementum length.

HL: head length.

Solid circles indicate means.

Bars indicate \pm SE. Arrows show where fluorescent powder deposited.

Table 2. Comparison of bumblebee species. Mean values ($\bar{x} \pm SE$) for glossa length, prementum length and head length (mm) of each bumblebee species. Sample sizes are shown in parentheses. ANOVA results are presented with F test denominations adjusted to account for significant effects as indicated: ****, $p < 0.0001$. As post hoc test, Fisher's PLSD was used to compare each effect.

Species	<i>B. consobrinus</i>	<i>B. diversus</i>	<i>B. honshuensis</i>	<i>B. hypocrita</i>	F (ANOVA)
1) Sizes					
glossa length	12.0 ± 0.3 (60)	9.8 ± 0.2 (46)	6.32 ± 0.19 (25)	4.6 ± 1.0 (2)	71.738****
prementum length	4.29 ± 0.11 (60)	3.72 ± 0.09 (46)	2.71 ± 0.08 (25)	3.0 ± 0.4 (2)	62.767****
head length	5.23 ± 0.06 (60)	4.79 ± 0.07 (46)	4.05 ± 0.08 (25)	4.9 ± 0.5 (2)	48.883****
2) Pollinating style					
	nototribic	nototribic	nototribic	sternotribic	
3) Pollen deposition					
	frons	vertex	pronotum	side part	

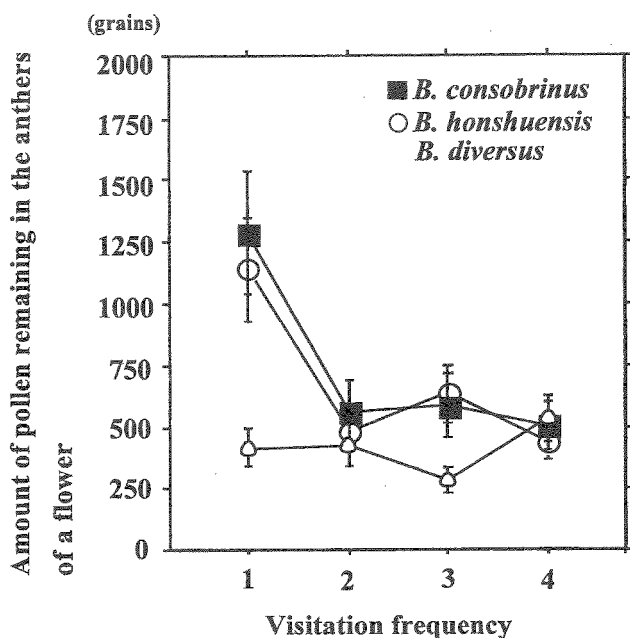


Fig. 3. Relationship between pollen removal and visitation frequency of three bumblebee species. Vertical axis indicates amount of pollen remaining in the anthers of a flower. Symbols indicate means \pm SE. Sample size: $n=12$ for each condition.

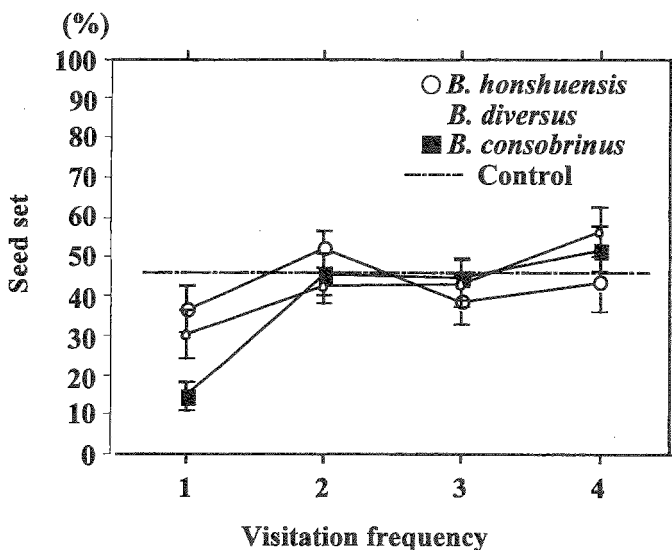


Fig. 4. Relationship between seed set and visitation frequency of three bumblebee species. Seed set (%) was evaluated from seeds in a capsule divided by the number of ovules (=4). Each treatment was repeated over 25 times and means \pm SE were shown in the figure. Broken line shows the mean seed set of this study sites.

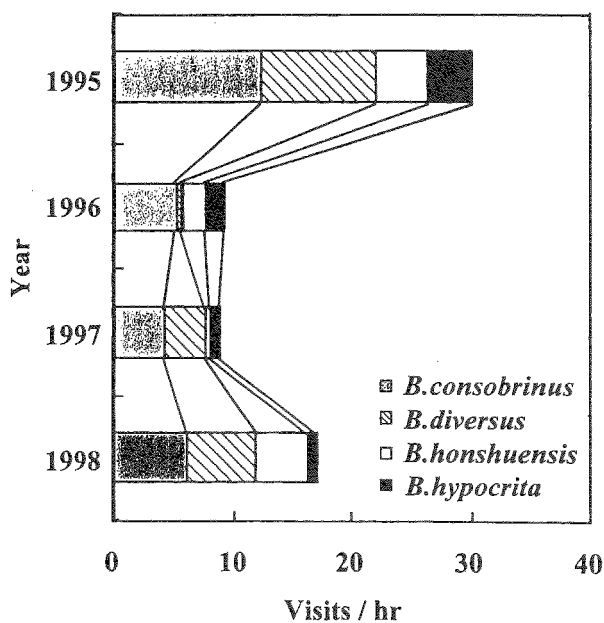


Fig. 5. Interyear fluctuation of bumblebee fauna at the site examined.

第 4 章

Effect of the number and position of flowers on seed set of *Melampyrum roseum* var. *japonicum* (Scrophulariaceae)

Kayako Hiei : Department of General Systems Studies,
The University of Tokyo

Masashi Ohara: Graduate School of Environmental Earth
Science, Hokkaido University

要 旨

ゴマノハグサ科ママコナ属ママコナは一年生の草本で、主軸の他に8~10本の側枝をもち、主軸及び各側枝に花序が形成される。花序内では基部に近い方から順に2つずつ花を咲かせる。我々は山梨県塩山市一ノ瀬高原において、ママコナの雌的繁殖成功が花序間で、あるいは花序内の花の位置によって異なるか否かを調査した。

ママコナ一植株中の花数は主軸の花序がもっとも多く、平均して22花、残りの花序は約10花であった。開花は7月下旬に主軸の花序の花から始まり、10日後に他の花序の花がほぼ同時に咲き始め、8月末にはほとんどの個体の花期が終了した。

ママコナは虫媒花で、送粉者がいない場合は結実することはない。しかし、自家和合性を持っているので、送粉者の訪花があれば結実可能となる。調査地において、ママコナは4種のマルハナバチによって訪花されていた。ママコナのひとつの花は一日に最低5回はマルハナバチの訪花を受けていて、ママコナにとって花粉制限の生じていない環境だった。また、マルハナバチの訪花行動には、特定の花序への訪花選好性は認められなかった。

ママコナの結果率、結実率は、花序間による差異は認められなかった。しかし、花序内の花の位置によって結果率は異なり、先に咲く花ほど結果率が高く76%で、徐々に減少し7番目に咲く花では45%であった。一方、結実率は、花の位置によらず平均して30%であった。

そこで、ママコナは花数が多いために結実にまわす資源が不足している可能性があると考え、ママコナの花芽を切除することにより花数を制限した場合の結果率、結実率を調べた。ママコナの花序内の花数をそれぞれ12, 8, 4, 2花にした場合、花数の

Abstract

The fruit set and seed set of between-inflorescences and within- inflorescence of *Melampyrum roseum* var. *japonicum* were evaluated under experimental conditions in central Japan. The plant is an annual herb with an inflorescence per each inflorescence in which the bottom two flowers open first. It was sufficiently pollinated by four bumblebee species in July and August every year. Under natural condition, mean fruit set and seed set of each inflorescence were not significantly different from each other. Within an inflorescence, fruit set significantly decreased as the flower position shifted toward the top, however, seed sets of flowers at different position were more or less similar of 30% on average. If the number of flowers was reduced by clipping, fruit set and seed set gradually increased. Seed set increased from 35% for ones without removing to 52% for the condition that two flowers remained in each inflorescence. However, half of ovules were still not used under the condition. In addition, position effect of flowers in an inflorescence on seed set was investigated. Flowers of any position have ability to produce seed equally. Therefore we consider that the variation of reproductive success according to position is due to the order of flowering. Early blooming flowers were allocated more resource than later ones.

Introduction

Most of plant species are sessile, they can not move to find their foods, change living places nor mate like other animals do. They are autotrophs which carry out photosynthesis. They use limited resources for vegetation, reproduction and maintenance. In spite of their limited condition, most of the plants produce more flowers than fruits. Hermaphroditic plants produce more flowers than fruits in general (Willson and Price, 1977; Lloyd, 1980; Stephenson, 1981; Sutherland and Delph, 1984; Sutherland, 1986 a, b; Guitián, 1993). Excess flowers, that is, more ovules and ovaries are commonly

produced than fruits and seeds.

Seed production is mostly limited by environmental factors, such as pollen limitation (Zimmerman and Aide, 1989; Burd, 1994; Stantandreu and Lloret, 1999), resource limitation (Lloyd, 1980; Herrera, 1991; Medrano, Guitián and Guitián, 2000), herbivory or predation (Coley, Bryant and Chapin, 1985; Gómez, 1993) and physical conditions (Juenger and Bergelson, 1997). Since plants are sessile, they always exposed to the risk of being damaged. Therefore, compensation has been considered as an alternative or supplement to plant defenses, and regrowth capacity has been considered as a responses after damage (Lehtilä and Syrjänen, 1995). In this aspect, excess flowers were considered to lessen the effects of damage. However, in the absence of damage, it is often assumed that the availability of resources limits fruits and seeds production (Lloyd, 1980; Stephenson, 1981).

Flowers often have different reproductive values among individual. Early bloomed flowers produce more fruits and seeds (Lee, 1988; Diggle, 1989). This phenomenon was interpreted as “resource conflict between early and late blooming flowers” or “resource competition” within individual (Stephenson, 1981; Bawa and Webb, 1984; Nakamura, 1986; Lee, 1988; Thomson, 1989; Guitián, 1994). The early fertilized fruits and seeds take more resources than later ones. In another case, fruits located close to the source of nutrients deprive more resource (Solomon, 1988).

The “architectual limitations” have some effect on reproductive success of flowers in different position within the inflorescence (Wyatt, 1982; Lee, 1988; Thomson, 1989; Wolfe, 1992; Diggle, 1992, 1995, 1997). This is based on studies in which the fruit set of late-opening flowers is not affected by the removal of early-opening flowers or the prevention of their fruiting (Sutherland, 1987).

In some cases, unevenness of pollinator visitations through out flowering phenology was considered as the reason of variation of reproductive success (Thomson, 1985, 1989; Lee, 1988; Berry and Calvo, 1991; Goldingay and Whelan, 1993; Brunet and Charlesworth, 1995). In these cases, extra hand pollination may increase fruit set or seed set. Even though there is no pollen limitation, not all of the ovules would mature to seeds.

In the present study, female reproductive success of an annual insect-pollinated plant, *Melampyrum roseum*, among inflorescences and within inflorescence were investigated. Since the plant is annual, all of its life history (germination, vegetation, flowering, fructification and death) is completed in one year and doesn't carry over any resource for next year's germination. Therefore, this species is appropriate to investigate the allocation system of resource within an individual. Our aims are to clarify the female reproductive patterns of *M. roseum* and to identify the factors concerned with the variation of reproduction within an individual.

In this study, investigation was carried out from the point of view of the plant. The plant forms several raceme-like inflorescences with more than ten flowers. Flowers bloom sequentially. Although the plant has four ovules in a flower, it is seldom that all the ovules mature into seeds. Therefore we assumed the factors which may affect on reproduction are the number of flowers and the position of flowering within an inflorescence. In order to adjust the number of flowers, we removed flower buds from its inflorescence. This technique was reported by many researchers (Wyatt, 1980; Guitián, 1993; Lehtilä and Syrjänen, 1995; Corbet, 1998; Nishikawa, 1998; Medrano, Guitián and Guitián, 2000), but few studies deal with annual plants.

Then, the questions we asked were as follows. At first, how is the reproductive success of *M. roseum*? Do fruit set and seed set differ among flowers in an individual? Secondly, does the number of flowers affect reproductive success? Thirdly, does the female reproduction potentially differ according to the position of flowers within an inflorescence?

Materials and Methods

The study plant and the study site

Melampyrum roseum Maximowicz var. *japonicum* Franchet et Savatier (Scrophulariaceae) is an annual hemiparasitic herb which is distributed throughout the southern part of Korea,

and throughout Kyushu, Shikoku, Honshu and the southern part of Hokkaido, Japan (Yamazaki 1954). The plants commonly grow in sunny meadows in montane areas.

The structure of the plant is illustrated in Fig.1. The plant consists of a main stem and several branches. A main stem usually has four or five nodes and each node carries two lateral branches (Fig.1(b)). A main stem and each branch are terminated by an inflorescence, consisting of 8 to 24 flowers. In this study, each inflorescence was numbered from the top, an inflorescence on main stem, to downward. Furthermore, as shown in Fig.1(c), the position of flowers within each inflorescence was sequentially numbered from the bottom toward the top, which is consistent with flowering order. The corolla of *M. roseum* is pinkish purple with two lips. Each flower unexclusively contains four ovules.

The plants are mainly visited by bumblebee species (Hiei, 1998). *M. roseum* is potentially self-compatible but no seed could be produced when flower visitors were excluded, suggesting that this plant needs flower visitors for seed production and these bumblebee species are major pollinators (Hiei, 1998).

The field study was carried out at the Pass of Inukiri, about 1350 m above sea level, in Yamanashi Prefecture in central Japan, during the summers of 1999 through 2000. It is located at the source of the Tama River. The study site is south facing open grassland. At this site, *M. roseum* is dominated and flowering begins in July and continues until early September.

Flowering phenology

In order to understand the variation in flowering phenology among inflorescences, 11 individuals with seven inflorescences were selected in July, before flowering season. After plant started to flower (24 July), the number of flowers bloomed and the position within inflorescence were recorded every day until the end of flowering season (1 September) in 1999.

Reproductive success of M. roseum

In order to estimate seed production of the plant, 20 individuals were collected in September 1999, after this species has fructified. For each of them fruit set and seed set for every inflorescences and for every flowers were carefully obtained, respectively. Fruit set was calculated from the number of capsules per the total number of flowers produced. The total number of flowers was estimated from sum of capsules and scars of flowers, which did not develop to mature capsules. Seed set was calculated for every matured capsule. The value was calculated from the number of seeds divided by the number of ovules, that is four.

Foraging behaviours of bumblebees

A quadrat of 2 m X 2.5 m (Q1) was established in the study site in order to investigate the foraging preference of bumblebees. 105 individuals were recognized in the quadrat. The study was carried out on 8, 9, 11, 12 August 2000, middle of flowering season of *M. roseum* at this site. In each individual, we marked plants in flower in the quadrat, and the position of inflorescences (c.f. Fig. 1(b)) with flowers bloomed was recorded. Observations of flower visitors, bumblebees, within the quadrat were conducted from 8:00 a.m. to 16:00 p.m. When a bumblebee visited flowering plant in the quadrat, we recorded carefully the position of inflorescence which were visited by bumblebee.

Effects of the number of flowers on reproductive success

In order to examine effects of the number of flowers on fruit set and seed set, clipping experiment was performed where *M. roseum* is exclusively dominated (80-100 individuals per m²) in 1999. Fifty individuals with seven inflorescences including a main stem were marked. In order to accord flowering phenology between inflorescences, the main stems were cut when the flowers of third position from the bottom opened and the number of flowers in each inflorescence was artificially manipulated. In each inflorescence, the bottom two, four, eight, twelve flower buds were remained by removing other flowers, respectively. Each treatment was applied to ten individuals. A treatment was maintained

without any reduction. These plants were just left under open-pollination. Since flowering phenology varies among individuals to some extent, clipping treatments mentioned above were performed when the flower of third position in main stem inflorescence opened. In addition, it is known that main stem clipping enhanced the performance of lateral branches in *M. sylvaticum*, main stem inflorescence was removed in this clipping treatment.

Effects of position of flowers within an inflorescence

In order to clarify effects of flower position within an inflorescence on fruit set and seed set, we also performed clipping experiment to the flowers within inflorescence. In this experiment, we firstly cut all lateral inflorescences and clipped the flowers on a main stem inflorescence. Since we would like to examine the effect of different flowering position, clipping treatment were performed to main stem inflorescence which has twice as much flowers as others. By clipping other flower buds, two flowers at each position, from one to ten from the bottom of inflorescence were remained, respectively. Leaves were not removed at all. All the flowers were hand-pollinated using three distant individuals. Each treatment was applied to ten individuals each.

Data analysis

For the statical analysis of fruit set and seed set, arcsine transformation was adapted. We used ANOVA to test the effects of inflorescence, position of flowers within an inflorescence, the number of flowers and position of two flowers left in a main stem. Fisher's PLSD Test was used to test the differences of mean of fruit set and seed set between inflorescences, positions of flowers within an inflorescence, the number of flowers and positions of two flowers left in a main stem. Chi-square testing for goodness of fit was used to analyze the foraging preference of bumblebees. In all cases $P < 0.05$ was taken to indicate statistical significance.

Results

The number of flowers in each inflorescence

The mean number of flowers per individual of *M. roseum* was 100, ranging from 50 to 300. With regard to the number of flowers in each inflorescence, inflorescence on main stem had 22 flowers on average, about twice as many as flowers of other inflorescences (Fig.2). Among inflorescence on lateral branches, no.4 and no.5 had slightly more flowers than the others (Fig.2).

Flowering phenology

In this study site, *M. roseum* usually starts to bloom in late July and their flowering period continues until early-September every year. Figure 3 represents flowering phenology of each inflorescence. The flowers on main stem, inflorescence no.1, began to flower on 24 July, exclusively earlier than the flower of other inflorescence which bloomed about 10-14 days later. The flowers at inflorescence no.2-no.7 opened almost simultaneously except for no.5. Regardless of the differences in the timing of blooming, flowering period of each inflorescences mostly ceased at the end of August.

Within an inflorescence, two flowers located at the bottom started to bloom first, and after a few days the second two flowers from the bottom flowered. It continues sequentially towards the top of each inflorescence. A flower remains in flower for about five days.

Foraging behaviours of bumblebees

Melapyrum roseum received the visitations of four bumblebee species (*Bombus consobrinus*, *B. diversus*, *B. honshuensis* and *B. hypocrita*) in August every year at this site (Hiei,1998). Four days observation conducted in the middle of flowering period revealed that the bumblebees visited the quadrat 18 times per hour on average, and once any bumblebee visited an inflorescence, they foraged all the flowers within an inflorescence. The number of inflorescence with flowers in bloom on the day of

observation, a total number of bumblebee visitations to each flowering inflorescence and expected value for visitation were summarized in Table 1. The null hypothesis for this visitation-preference experiment is that bumblebee species visits any inflorescence equally as far as the inflorescence has blooming flowers. Total of chi-squares are much smaller than $\chi^2_{0.05,9} = 16.919$, therefore, null hypothesis is not rejected. Accordingly, the bumblebees do not have any particular visitation preference to the inflorescences on different position in *M. roseum*.

Fruit set and seed set among inflorescences

Mean fruit set and seed set of *M. roseum* flower were $57 \pm 2\%$ and $30 \pm 1\%$, respectively. Mean fruit set and seed set for each inflorescence were shown in Fig.4. Although mean fruit set varied from 47% (no.2) to 67% (no.1), and mean seed set from 24% (no.7) to 35% (no.4), no significant difference among inflorescences was detected (ANOVA: $F(8,150) = 1.248, p = 0.2749$ for fruit set and $F(8,143) = 1.785, p = 0.0846$ for seed set).

Fruit set and seed set within an inflorescence

Fruit set within an inflorescence decreased significantly as the flower position shifted toward the top within an inflorescence (Fig.5; ANOVA: $F(11,1285) = 6.743, p < 0.0001$). That is, the bottom two flowers that bloomed the earliest within an inflorescence showed the highest fruit set of 76%, and the fruit set gently decreased to 46% in ninth position. However, seed sets of flowers at different position were more or less similar of 30% on average (ANOVA: $F(11,943) = 1.278, p = 0.2318$). Hence, no significant difference in seed set was found according to the position of flowers in an inflorescence.

Effects of the number of flowers on fruit and seed set

Reducing flowers in inflorescence resulted in increase of both fruit set and seed set (Fig.6). When the number of flowers reduced by clipping flower-buds, fruit set increased significantly, from 45% for no removing flower to 89% for the condition that two flowers left in each inflorescence (Fig.6(a)). Fruit set showed significant difference according to the

number of flowers (ANOVA: $F(5,63)=20.482, p<0.0001$). On the other hand, inflorescences in which only two flowers were left showed 1.5 times higher seed set (52%) than ones without removing flowers (35%) (Fig.6(b); ANOVA: $F(5,63)=16.943, p<0.0001$). However, there were no significant differences in seed sets between other clipping treatments, 4-12 flowers were left in inflorescence, and control inflorescence.

Mean seed weight of control, no removing flower, was 5.4mg (Fig.6(b)). Mean seed weights for the conditions that two, four, eight and twelve flowers were left in each inflorescence were 7.5mg, 6.0 mg, 6.4 mg and 6.2 mg, respectively. Inflorescence with two flowers showed significantly higher seed weight than control. (ANOVA: $F(4,106)=4.000, p<0.005$, Fisher's Protected LSD). Accordingly, reduction of flower number inflorescence also resulted in increase of seed weight.

Effect of position of flowers in an inflorescence

From the result of flower removing experiment, fruit and seed set were significantly affected by the number of flowers. In addition, position effect of flowers in an inflorescence on seed set was investigated. When only two flowers were left in an inflorescence of main stem, high mean fruit set (88%) and seed set (55%) were obtained, regardless of the flower position. That is, there is no position effect on fruit set (ANOVA: $F(9,111)=0.759, p=0.6543$) nor seed set (ANOVA: $F(9,104)=0.229, p=0.9896$; Fig.7), suggesting that there was no functional difference in flower position in an inflorescence.

Discussion

Female reproductive success of M. Roseum

Under natural condition, mean fruit set and seed set of *M. roseum* are 57% and 30%, respectively. Though the number of flowers on main stem is as twice as flowers on the other inflorescences, mean fruit set and seed set of each inflorescence were not significantly different from each other. However, within an inflorescence, fruit set

decreased significantly according to flowering position. The earliest opened flowers which located at the bottom of each inflorescence have the highest fruit set 76% and gently decreased to 46% at the ninth position. On the other hand, seed set did not decrease according to flowering position. It is shown that seeds per ovules ratio in a matured capsule was not significantly different from each other. Therefore, variation of female reproduction of *M. roseum* was caused by availability of production of fruits. Why the fruit set of *M. roseum* varied according to flowering position?

Pollen limitation is thought to be one of the reasons to explain the variation of reproduction (Schemske, 1980; Thomson, 1985, 1989; Brunet and Charlesworth, 1995). In case of *M. roseum*, seeds can not be produced when pollinators were excluded. Reproduction of the plants was directly affected by visitation frequency of pollinators. At the study site, the plant has received visitations of 3.6 times per hour per m² by four bumblebee species during the period of flowering phenology. A flower of *M. roseum* was pollinated at least five times a day (Hiei, 1998). And from the observation of stigma by optical microscope, mean pollen grains deposited on a stigma per day was 50 grains on average (n=25; Hiei, 1998). In general, in order to confirm pollen limitation, many researchers proposed extra hand pollination on stigmas. In case of *M. roseum*, extra hand pollination does not raise seed set (Hiei, 1998). Therefore we consider that there is no pollen limitation in this site and *M. roseum* can receive sufficient and constant intensity of visitation by bumblebees to produce seeds.

Effect of the number of flowers

The reproductive success of the plant was affected by the number of flowers in an inflorescence. Although fruit set increased gradually, seed set and seed weight increased drastically on the condition that two flowers were left in an inflorescence, the most severe condition for *M. roseum* to produce offsprings. Results indicate that if there were enough resource, female reproductive success would increase and there is a threshold of increasement of seed production. However, even if the plant has enough resource, it can mature 52% of ovules, that is, half of ovules were still not used.

Position effect of the flowers in an individual

1) *Comparison of flowers between inflorescences*

In this study, fruit set and seed set of *M. roseum* were not significantly different between inflorescences. And we also confirmed that if we adjust the number of flowers of each inflorescence, fruit set and seed set shows no significant difference between inflorescences. Therefore we believe that there are no considerable difference due to structure of the plant.

2) *Comparison of flowers within an inflorescence*

Under natural condition, the early blooming flowers in each inflorescence produce more numerous fruits than later ones. Is this due to the position of flower or the order of flowering? Results of experiment indicate that there is no functional difference between each position of flower. Flowers of any position have ability to produce seed equally. Therefore we consider that the variation of reproductive success according to position is due to the order of flowering. Early blooming flowers were allocated more resource than later ones. This phenomenon was interpreted as resource conflict between early and late blooming flowers (Lee, 1988; Diggle, 1995;), and due to resource limitation of the plant.

Excess ovules, excess flowers

Even though the plant has sufficient resource to fertilize seeds, not all of ovules could mature into seeds. About half of them were aborted in any way. If there are much more nutrient, seeds will be larger. The reason why *M. roseum* has twice more flowers than its resource limitation is still not explained in this study, however, the upper limit of female reproductive success is obtained.

Several hypotheses have been formulated to explain this apparent overproduction of flowers in animal-pollinated, outcrossed, hermaphroditic plants (Sutherland, 1987).

1) Pollen limitation: Lack of pollen or pollinators limits fruit and seed production. (Willson and Schemske, 1980).

2) Pollinator attraction: Large inflorescences provide a larger signal to attract pollinators. Therefore an overproduction of flowers ensures the pollinator visitation (Willson and

Price, 1977; Schaffer and Schaffer, 1979; Stephenson, 1980; Bell, 1985) and results in sufficient for adequate pollination.

3) Bet hedging: Production of excess flowers allows the plant to compensate for variations in resources available for fruit maturation or variations in pollination (Stephenson, 1980; Bawa and Webb, 1984).

4) Selective abortion: The plant can selectively abort some fruits and mature only those fruits which are of a high quality, if pollination success is high and more fruits are initiated than matured (Stephenson, 1981; Bawa and Webb, 1984; Lee, 1984).

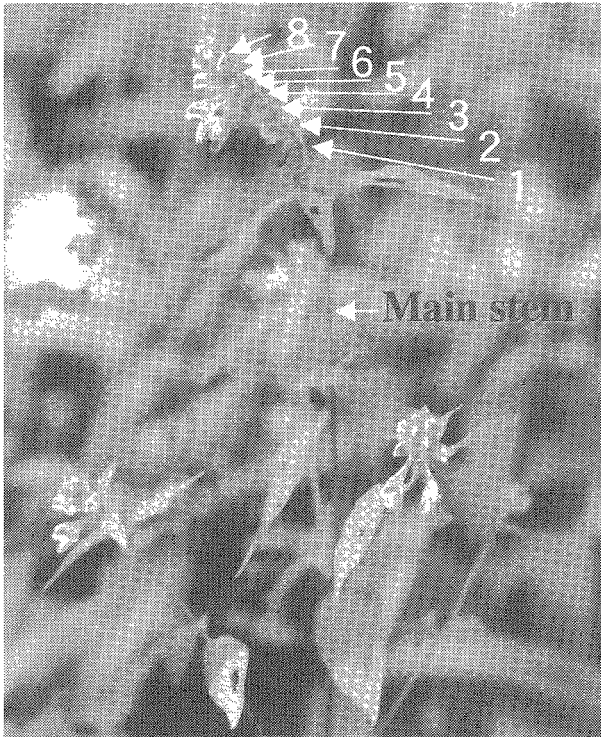
5) Pollen donation: Hermaphroditic plants achieve fitness through fruit maturation (female function) and through pollen donation (male function). Flowers that result in the production of matured fruits contribute to female fitness and potentially contribute to male fitness. Flowers that do not develop into fruits can contribute only to male fitness (Willson and Price, 1977; Bawa and Webb, 1984; Sutherland and Delph, 1984)

From the observation of pollinator's behaviors indicates that fruits and seed production of *M. roseum* is not pollinator-limited. And larger inflorescences are not result in the larger amount of reproduction. The pollen-limitation and pollinator attraction hypotheses do not account for low fruit and seed production of *M. roseum*. Results of the reducing-flowers experiment indicate that if the plants have sufficient resources, fruit production of *M. roseum* increased significantly. Bed-hedging hypothesis can account for fruit and seed production of *M. roseum*. Although selective abortion hypothesis is not confirmed in this study, difference of pollen tube elongation between selfing and outcrossing will provide some results. Results of this study may indicates that half of flowers contribute to female fitness. Therefore pollen donation hypothesis can account for fruit and seed production of *M. roseum*.

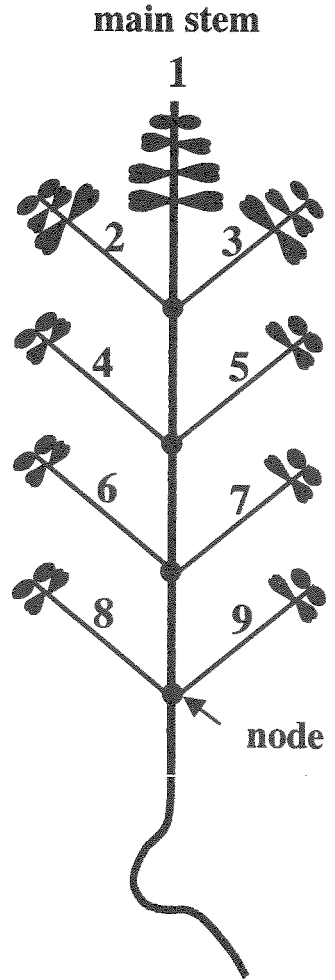
References

- Bawa, K.S. & Webb, C. J. 1984. Flower, fruit and seed abortion in tropical forest trees: Implication for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. *Amer. J. Bot.* 71:736-751
- Bell, G. 1985. On the function of flowers. *Proc. Roy. Soc. Lond.* 224: 223-265
- Coley, P.D., Bryant, J.P. & Chapin, F.S III. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defence. *Science* 230,895-899
- Corbet, S.A. 1998. Fruit and seed production in relation to pollination and resource in bluebell, *Hyacinthoides non-scripta*. 114: 349-360
- Gómez, J.M. 1993. Phenotypic selection on flowering synchrony in a high mountain plant, *Hormathophylla spinosa* (Cruciferae). *J. Ecol.* 81: 605-613
- Gutián, J. 1993. Why *Prunus mahalab* (Rosaceae) produces more flowers than fruits. *Amer. J. Bot.* 80:1305-1309
- Gutián, J. 1994. Selective fruit abortion in *Prunus mahalab* (Rosaceae). *Amer. J. Bot.* 81:1555-1558
- Hiei, K. 1998. Reproductive biology of *Melampyrum roseum* (Scrophulariaceae) in association with bumblebees. Master's thesis, Tokyo Metropolitan University
- Juenger, T. & Bergelson, J. 1997. Pollen and resource limitation of compensation to herbivory in scarlet gilia, *Ipomopsis aggregata*. *Ecology.* 78: 1684-1695
- Lehtilä, K. and Syrjänen, K. 1995. Compensatory responses of two *Melampyrum* species after damage. *Functional Ecology*, 9, 511-517
- Lee, T. D. 1984. Patterns of fruit maturation: A gametophyte competition hypothesis. *Amer. Natur.* 123: 427-432
- Lloyd, D.G. 1980. Sexual strategies in plants. 1. An hypothesis of serial adjustment of maternal investment during one reproductive session. *New Phytol.* 86:69-79
- Medrano, M., Gutián, P. & Gutián, J. 2000. Patterns of fruit and seed set within inflorescences of *Pancratium maritimum* (Amaryllidaceae): Nonuniform pollination, resource limitation, or architectural effects? *Amer. J. Bot.* 87:493-501

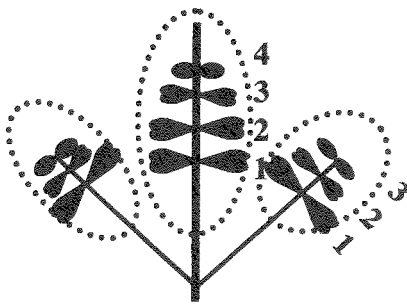
- Schaffer, W. S. and Schaffer, V. 1979. The adaptive significance of variations in reproductive habit in Agavaceae. II. Pollinator foraging behavior and selection for increased reproductive expenditure. *Ecology* 34:489-493
- Schemske, D. 1980. Evolution of floral display in *Brassavola nodosa*. *Evolution* 34: 490-493
- Solomon, B.P. 1988. Pattern of pre- and postfertilization resource allocation within an inflorescence: evidence for interovary competition. *Amer. J. Bot.* 75:1074-1079
- Stephenson, A.G. 1980. Fruit set, herbivory, fruit reduction, and the fruiting strategy of *Catalpa speciosa*. *Ecology* 61: 57-64
- Stephenson, A.G. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 12: 253-279
- Stantandreu, M. & Lloret, F. 1999. Effect of flowering phenology and habitat on pollen limitation in *Erica multiflora*. *Can. J. Bot.* 77:734-743
- Sutherland, S., and Delph, L. F. 1984. On the importance of male fitness in plants: Patterns of fruits-set. *Ecology* 65: 1095-1104
- Sutherland, S. 1987. Why hermaphroditic plants produce many more flowers than fruits: Experimental tests with *Agave Mckelveyana*. *Evolution* 41:750-759
- Willson, M. and Price, P. 1977. The evolution of inflorescence size in *Asclepias* (Asclepiadaceae). *Evolution* 31:495-511
- Willson, M. and Schemske, D. 1980. Pollinator-limitation, fruit production and floral display in paw paw. *Bull. Torrey Bot. Club* 107: 401-408



(a) *Melampyrum roseum*



(b) A model of the plant.
Inflorescence number was shown.



(c) Flowering position in each inflorescence.

Fig.1 Structure of *Melampyrum roseum*.

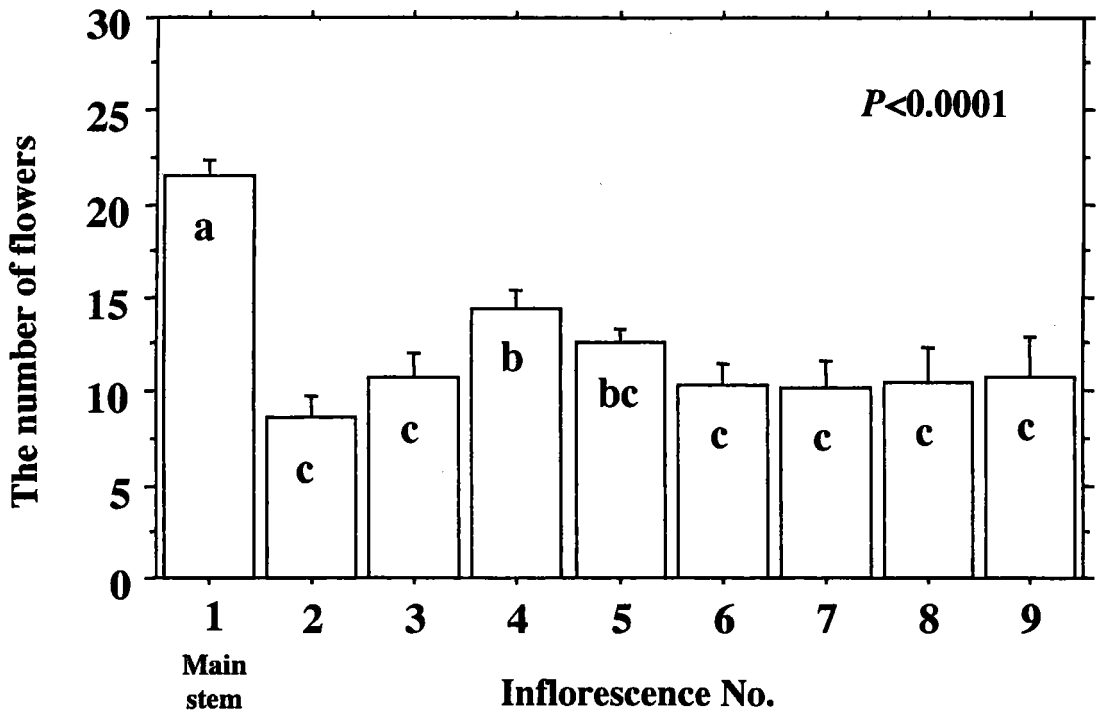


Fig.2 Variation of the number of flowers between branches.

Table 1. Preference to visits of branch by bumblebee species

No. of branch	1	2	3	4	5	6	7	8~10	Total
the total number of flowering branches	47	34	23	48	29	21	15	9	226
the total number of branches visited by bumblebees	29	19	7	36	11	12	4	2	120
expected value	24.96	18.05	12.21	25.49	15.40	11.15	7.96	4.78	120
Chi-square value	0.655	0.050	2.225	4.337	1.256	0.065	1.973	1.616	12.177

$\chi^2_{(7)} = 14.067$

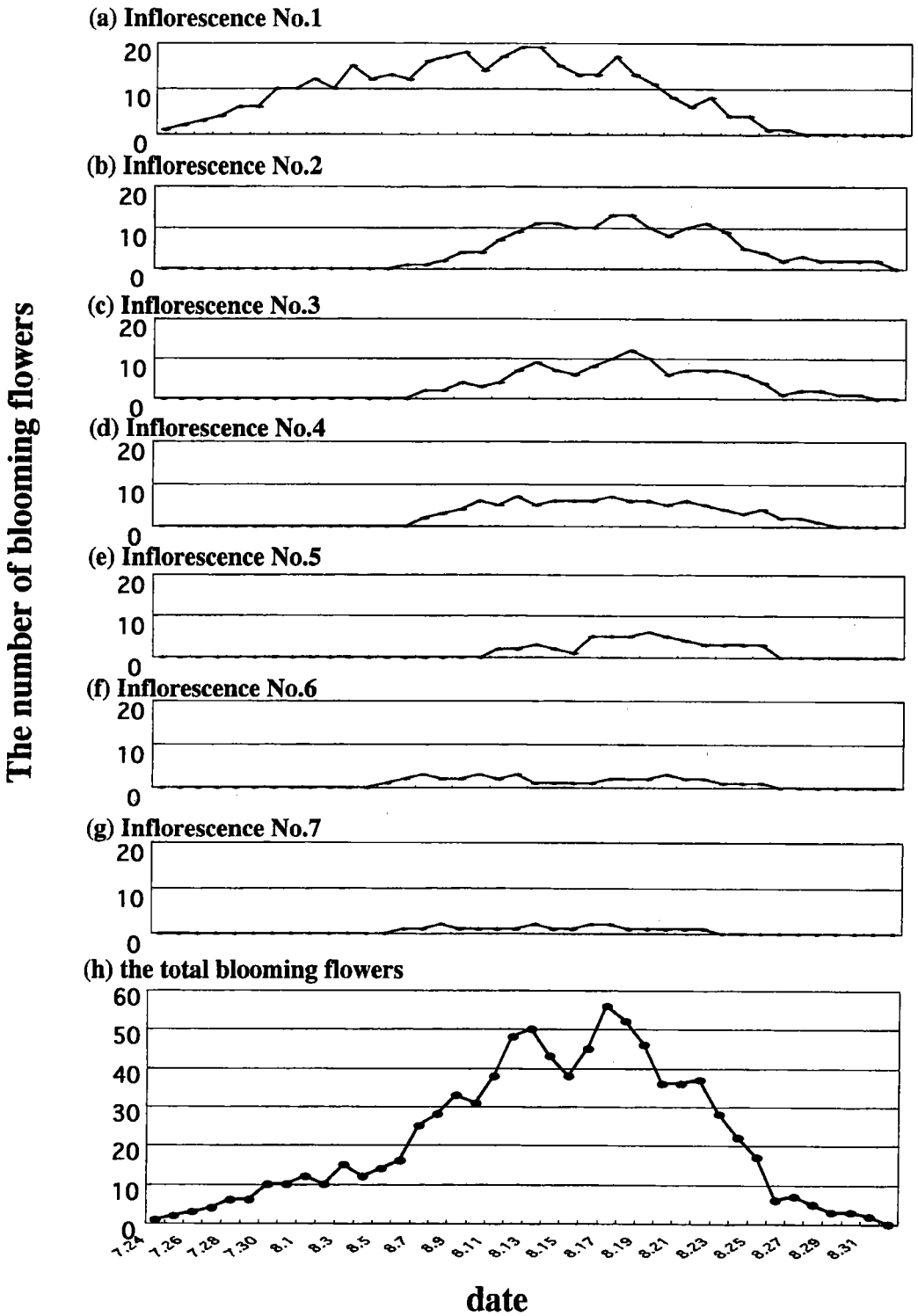


Fig.3 Flowering phenology of *Melampyrum roseum*.

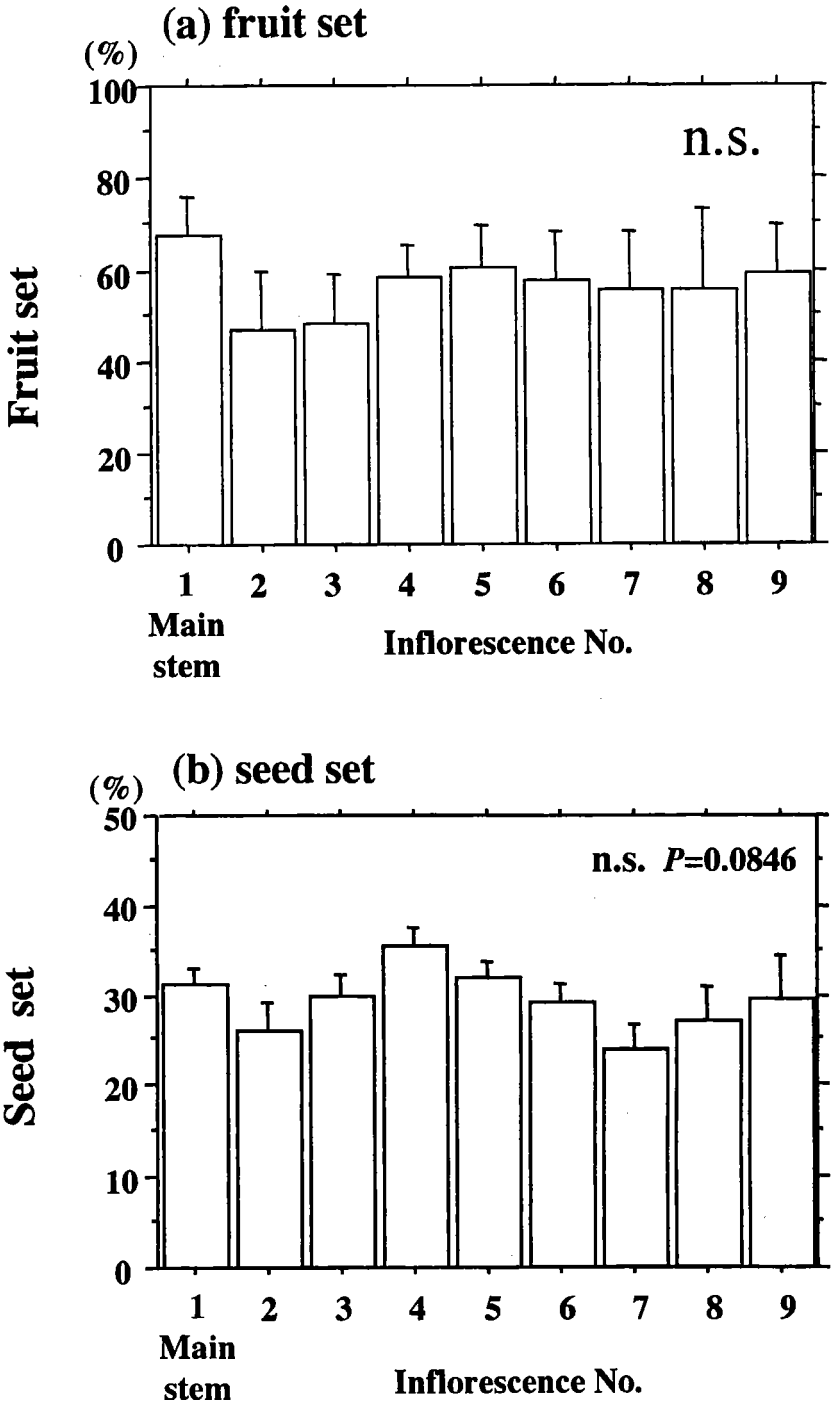
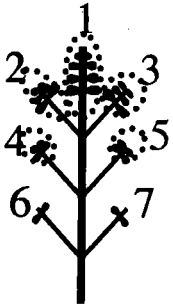
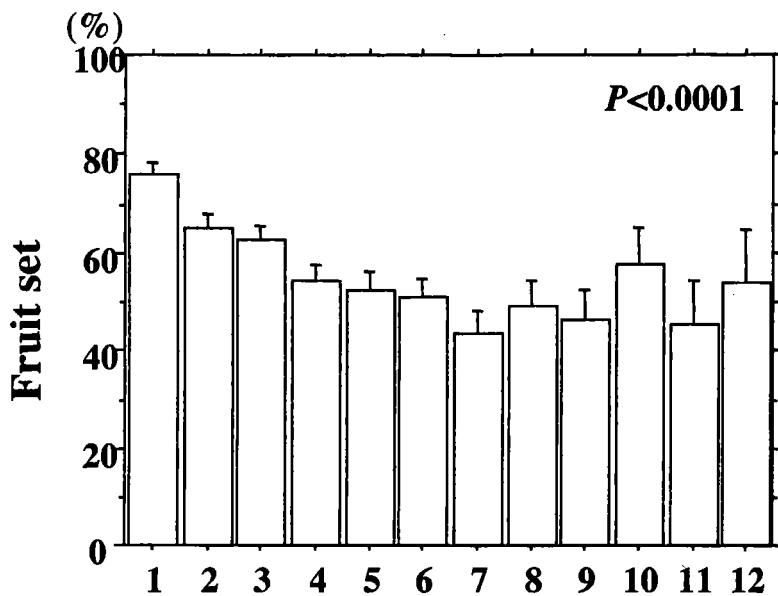


Fig.4 Reproduction of *M. roseum* between inflorescences. (a)fruit set, (b)seed set of the plant. Mean values were obtained per each branch. Bar shows +SE.

(a) fruit set



(b) seed set

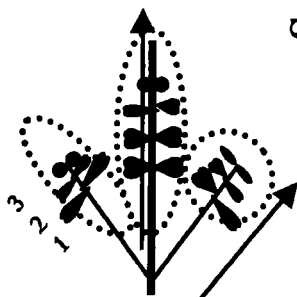
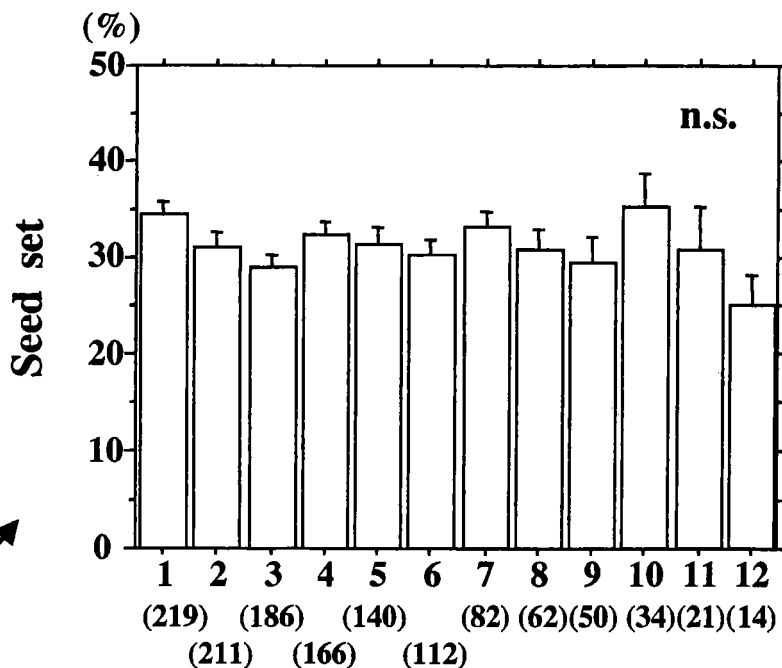
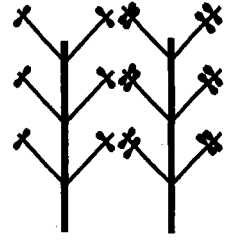
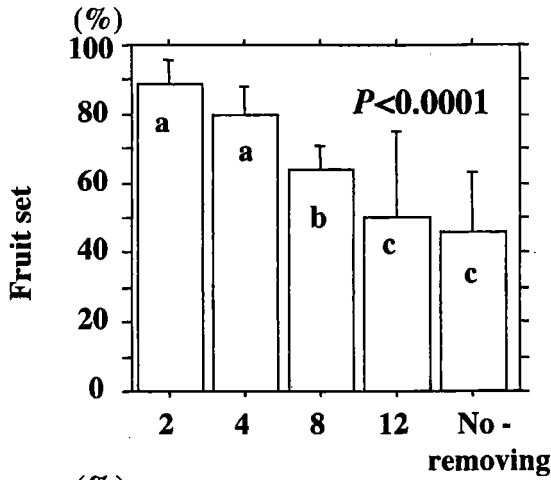
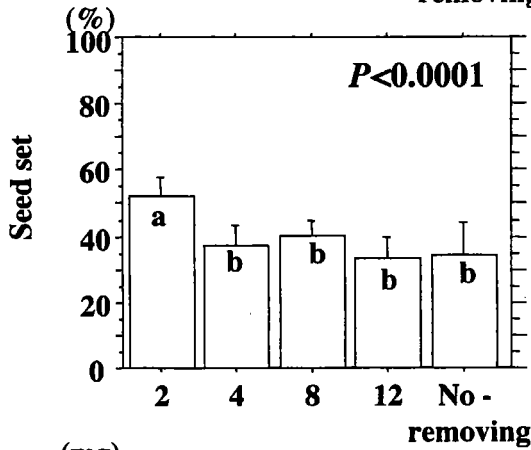


Fig.5 Reproduction of *M. roseum* within inflorescence. Mean values of (a) fruit set and (b) seed set are shown with +SE. Sample sizes are shown in parentheses.

(a) fruit set



(b) seed set



(c) seed weight

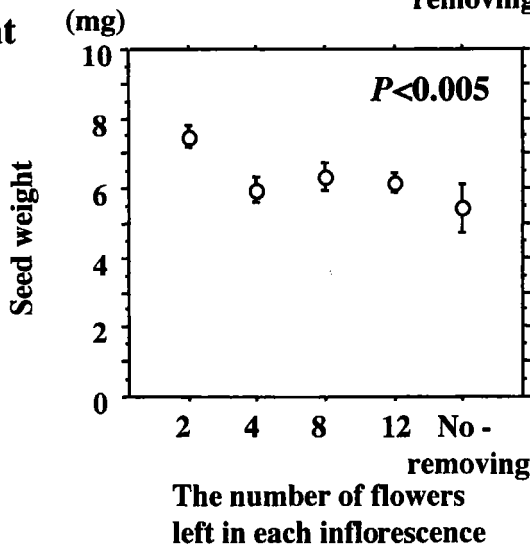


Fig.6 Effect of the number of flowers on seed set. The number of flowers were adjusted by removing buds.

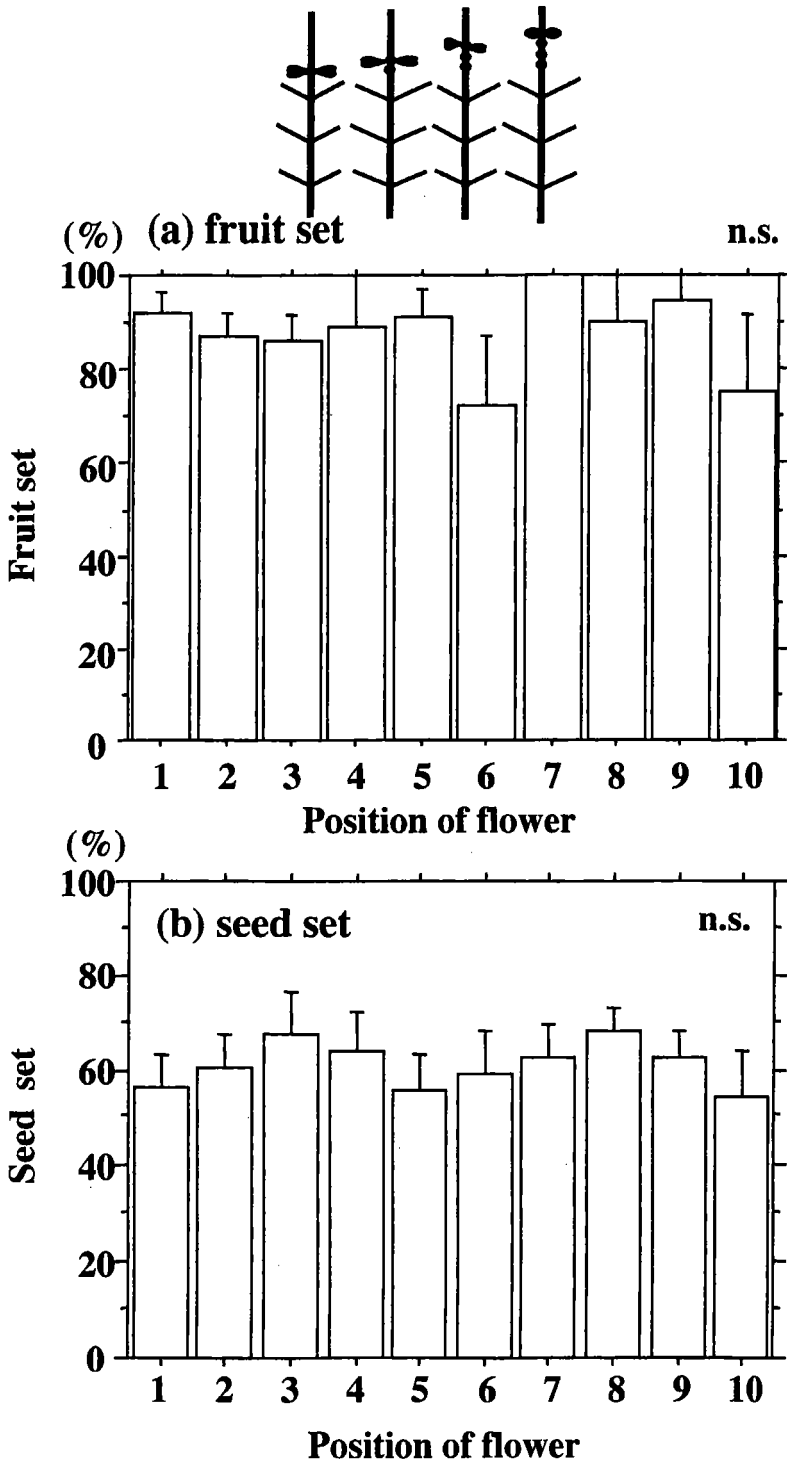


Fig.7 Effect of position of flowers in main stem on reproduction.

た まがわすいげんいき せいいく そうほんしよくぶつしゅうだん
「多摩川水源域に生育する草本植物集団の
いでんてき そせい しゅうだん こりつ か えいきょう ていりょうてきひょうか
遺伝的組成におよぼす集団孤立化の影響の定量的評価」

(研究助成・学術研究VOL. 30-No.215)

著 者 おお ほら まさし
大 原 雅
発行日 2002年3月31日
発 行 財団法人 とうきゅう環境浄化財団
〒150-0002
渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)
TEL (03)3400-9142
FAX (03)3400-9141
