

浅間山におけるツツジ科小低木 3 種をめぐる 花粉媒介者の推定と評価

Estimating the pollinators of three ericaceous dwarf shrub species
in the alpine zone of Mount Asama, Japan

野 原 那 月*

須 藤 翔 大**

高 橋 一 秋***

Natsuki NOHARA

Syouta SUTO

Kazuaki TAKAHASHI

要旨

山岳生態系は、地球温暖化による気温上昇による影響を最も受けやすい脆弱な生態系の一つに数えられている。また、動物との相利共生関係によって成り立っている花粉媒介と種子散布は、特に気温上昇の影響を受けやすく、崩壊・消滅してしまう可能性が指摘されている。本研究では、高山帯に分布する木本種の優占種であるクロマメノキ、コケモモ、シラタマノキの3種を対象に、花に訪れるハナバチ類、スズメバチ類、ハナアブ類、アリ類を特定した。また、DNAメタバーコーディングを用いて、捕獲された昆虫の体に付着している花粉の植物種を同定し、各昆虫種が運ぶ全植物種の花粉量と、各昆虫種が運ぶ各ツツジ科小低木種の花粉量を推定した。調査は、浅間山の高山帯で行った。訪花昆虫の捕獲調査は、標高1670m、1770m、1870mの3つの地点に、それぞれ設置された約20m×50mの調査プロットの中で、2021年は6月中旬～8月上旬、2022年は6月下旬～7月下旬にかけて行った。花冠に侵入したアリ類の滞在時間も計測した。クロマメノキの花には、8種のハナバチ類、3種のスズメバチ類、4種のアリ類が訪れ、コケモモの花には、2種のハナバチ類、1種のハナアブ類、3種のアリ類が訪れ、シラタマノキの花には、3種のアリ類が訪れた。花冠に侵入したアリ類の滞在時間は、コケモモよりシラタマノキの方が有意に長く、クロマメノキとシラタマノキの間と、コケモモとシラタマノキの間には有意な違いが認められなかった。各昆虫種の訪花頻度(花に訪れた個体数)、体の付着花粉量(1個体当たり)、花冠に侵入したアリ類の滞在時間の結果に基づいて、各ツツジ科小低木種の他家受粉と自家受粉に貢献しうる花粉媒介者の推定を試みた。その結果、クロマメノキにとって、他家受粉を担う飛翔性昆虫として重要な種は、オオマルハナバチ(創設女王バチ・働きバチ・雄バチ)、コマルハナバチ(働きバチ)、クロマルハナバチ(働きバチ)、ミヤママルハナバチ(働きバチ)、シロオビホオナガスズメバチ、ツヤクロスズメバチ、ヤドリホオナガスズメバチで、自家受粉を担う徘徊性昆虫として重要な種は、トビイロケアリとハラクシケアリ隠蔽種群だと推定された。コケモモにとって、他家受粉を担う飛翔性昆虫として重要な種は、クロマルハナバチ(働きバチ)とミヤママルハナバチ(働きバチ)で、自家受粉を担う徘徊性昆虫として重要な種は、トビイロケアリとハラクシケアリ隠蔽種群だと推定された。シラタマノキにとって、他家受粉を担う飛翔性昆虫として重要な種を特定することはできなかったが、自家受粉を担う徘徊性昆虫として重要な種は、トビイロケアリだと推定された。

Abstract

Mountain ecosystems are highly vulnerable to the effects of rising temperatures due to global warming. Pollination

and seed dispersal, which are based on mutualistic relationships with animals, are particularly vulnerable, and there is concern that some such relationships may collapse or disappear altogether. In this study, we identified insects of the Anthophila (bees), Vespidae (wasps), Syrphidae (hoverflies), and Formicidae (ants) that visited flowers of *Vaccinium uliginosum*, *Vaccinium vitis-idaea*, and *Gaultheria pyroloides*, the dominant woody species in the alpine zone of Mount Asama, Japan. We used DNA metabarcoding to identify the species of pollen on the bodies of captured insects and to estimate the amount of pollen of all plant species, and of each ericaceous dwarf shrub species, carried by each insect species. We captured flower-visiting insects in survey plots (approximately 20 m × 50 m), at three sites with elevations of 1670, 1770, and 1870 m, respectively, from mid-June to early August in 2021, and from late June to late July in 2022. The time ants spent invading the corolla was also measured. In total, 8 bee species, 3 wasp species, and 4 ant species visited *V. uliginosum* flowers; 2 bee species, 1 hoverfly species, and 3 ant species visited *V. vitis-idaea* flowers; and 3 species visited *G. pyroloides* flowers. The time spent by ants in invading the corolla was significantly longer in *G. pyroloides* than in *V. vitis-idaea*, and there were no significant differences between *V. uliginosum* and *G. pyroloides* or between *V. vitis-idaea* and *G. pyroloides*. Based on the frequency of visits (number of individuals visiting flowers) by each insect species, the amount of pollen attached to the insect body (per individual), and the time spent by ants in invading the corolla, we attempted to estimate the pollinators that could contribute to the cross- and self-pollination of each ericaceous dwarf shrub species. For *V. uliginosum*, the flying insects chiefly responsible for cross-pollination were estimated to be *Bombus hypocrita* (foundress queen, worker, and male), *Bombus ardens* (worker), *Bombus ignitus* (worker), *Bombus honshuensis* (worker), *Dolichovespula pacifica*, *Vespula rufa*, and *Dolichovespula adulterina*, and the roaming insects chiefly responsible for self-pollination were estimated to be *Lasius japonicus* and the *Myrmica ruginodis* cryptic species complex. For *V. vitis-idaea*, the flying insects chiefly responsible for cross-pollination were estimated to be *B. ignitus* (worker) and *B. honshuensis* (worker), and the roaming insects chiefly responsible for self-pollination were estimated to be *L. japonicus* and the *M. ruginodis* cryptic species complex. For *G. pyroloides*, the flying insect(s) responsible for cross-pollination could not be identified, but the roaming insect chiefly responsible for self-pollination was estimated to be *L. japonicus*.

キーワード : DNAメタバーコーディング, 花粉分析, マルハナバチ類, スズメバチ類, アリ類

Keywords: DNA metabarcoding, pollen analysis, bumblebee, wasp, ant

I. はじめに

中部日本の高山帯には、さまざまな種類のツツジ科小低木が広く分布している(曾根 2006; 高橋・高橋 2019)。その中でも、ガンコウラン *Empetrum nigrum* var. *japonicum*、クロマメノキ *Vaccinium uliginosum* var. *japonicum*、コケモモ *Vaccinium vitis-idaea*、シラタマノキ *Gaultheria pyroloides* は、高山帯に分布する木本種の優占種である(高橋・高橋 2019; Takahashi and Takahashi 2022)。これら4種は、関東・中部(山岳)の国立・国定公園の特別地域では、環境省が定める指定植物であり、採取と損傷することが規制されている(環境省 1981–2023)。そのうち、クロマメノキ、コケモモ、シラタマノキの3種については、昆虫類が花粉媒介を、鳥類や哺乳類が種子散布をそれぞれ担っており、動物との相利共生関係によって花粉媒介と種子散布

が成り立っている(曾根 2006; 高橋・高橋 2019; 井出ら 2020a; Takahashi and Takahashi 2022)。

一方で、高山帯と亜高山帯を含む山岳地帯は、その面積が地球上の全陸域面積の約3%と極めて小さいものの、世界に分布する生物多様性ホットスポットの約50%が山岳地帯に含まれている(Millennium Ecosystem Assessment 2005)。しかしながら、山岳生態系は、地球温暖化による気温上昇による影響を最も受けやすい脆弱な生態系の一つに数えられている(Millennium Ecosystem Assessment 2005)。さらに、Hughes (2000) と Memmott *et al.* (2007) は、動物との相利共生関係によって成り立っている花粉媒介と種子散布は、特に気温上昇の影響を受けやすく、これらの相利共生関係が崩壊・消滅してしまう可能性を指摘している。これは、気温上昇の影響で、植物の開花期や

結実期にズレが生じることで、適切な時期に動物が訪れなくなるためだと説明されている (Kudo 2014; 中静 2015)。したがって、高山帯に優占するツツジ科小低木は、予測される気温上昇が相利共生関係に及ぼす影響をモニターする種として適していると考えられる。

ツツジ科小低木をめぐる花粉媒介者の研究は、海外で進んでおり、クロマメノキとコケモモを含むスノキ *Vaccinium* 属 (*V. myrtilloides*, *V. myrtillus*, *V. stamineum* など)、シラタマノキと同属 (*G. eriophylla*, *G. leumeriana*, *G. mucronata*, *G. phillyreifolia*, *G. procumbens*, *G. serrata* など) の花粉媒介者として、ハナバチ類 Anthophila、ハナアブ類 Syrphidae、アリ目 Formicidae、シジミチョウ科 Lycaenidae の昆虫、ハチドリ科 Trochilidae の鳥類のうちの複数あるいは一部が関与している (Mirick and Quinn 1981; Cane *et al.* 1985; Jacquemart 1993; Smith-Ramírez *et al.* 2005; Freitas *et al.* 2006; Stephens 2012; Daubaras *et al.* 2017)。その中でも特にマルハナバチ類 *Bombus* とアリ類を重要な花粉媒介者として指摘している研究が多い。それに対して、日本では、マルハナバチ類によるクロマメノキとコケモモへの訪花 (井出ら 2020a) や、アリ類による同属のクロウスゴ *V. ovalifolium* への訪花 (根来 2002) がそれぞれ確認されているものの、ツツジ科小低木の花の花粉媒介者に関する知見は乏しい。

ここで、本研究の対象とするクロマメノキ、コケモモ、シラタマノキの花の形態的特徴を整理する (図-1)。

花冠は、クロマメノキとシラタマノキがつぼ型で、開口部がすばまっていて全体的に丸みを帯びた形状をしているのに対して、コケモモは鐘型で、開口部がやや広がっていて全体的に細長い形状をしている。いずれの種も、花冠の開口部は下を向いている。雄しべは、クロマメノキとコケモモが膨らみのある葯からラッパ状の管が2本ずつ伸びた形状をしているのに対して、シラタマノキは膨らみのある葯から伸びるラッパ状の管はなく、葯自体に開口部を持つ形状をしている。いずれの種も葯には刺状突起を持つが、雄しべに対する刺状突起の長さはシラタマノキが最も長く、次いでクロマメノキ、コケモモの順である。刺状突起は、昆虫が触れることで葯が動き、花粉が昆虫の体につく仕組みであるという (Dorr 1981; Hermann and Palser 2000)。これらの花冠と雄しべの形態的特徴から、クロマメノキ、コケモモ、シラタマノキはハナバチ類やアリ類などの昆虫による花粉媒介に適した花冠の形状を有するといえる。

最近の研究では、昆虫の体に付着した花粉の種類をDNAメタバーコーディングで分析し、昆虫種とその昆虫種が運ぶ花粉種との間のネットワークを明らかにする手法が用いられている (例えば、Galliot *et al.* 2017; Encinas *et al.* 2023; Ronca *et al.* 2023)。本研究では、クロマメノキ、コケモモ、シラタマノキの3種を対象に、それらの花に訪れるハチ類、アブ類、アリ類の体に付着している花粉の種類をDNAメタバーコーディングで同定し、各昆虫種が運ぶ全植物種の花粉量と、各

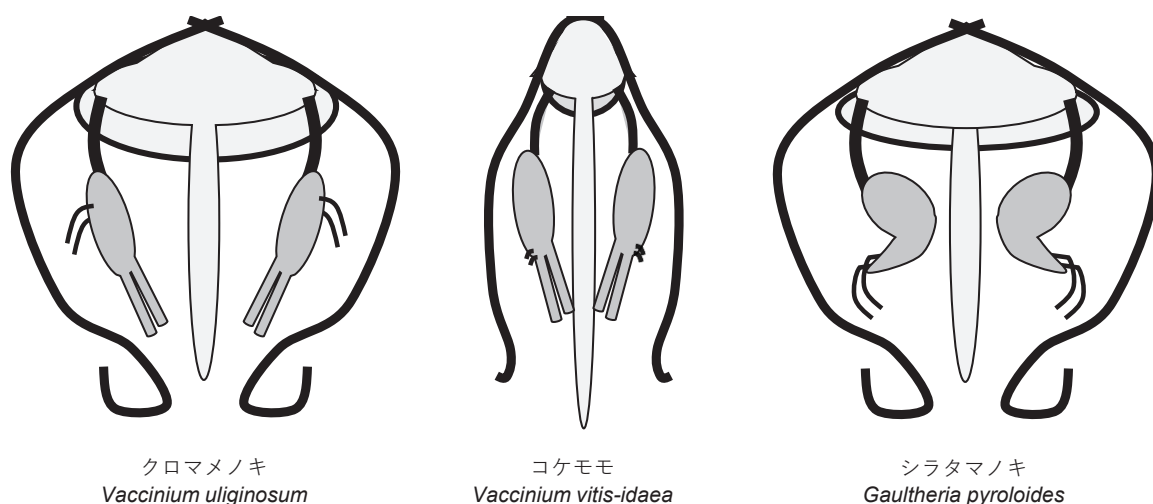


図-1. クロマメノキ・コケモモ・シラタマノキの花の形態的特徴

Figure 1. Morphological characteristics of the flowers of *Vaccinium uliginosum*, *Vaccinium vitis-idaea*, and *Gaultheria pyrolloides*.

昆虫種が運ぶ各ツツジ科小低木種の花粉量を把握することを目的とした。また、ツツジ科小低木3種の他家受粉と自家受粉に貢献する可能性のある重要な花粉媒介者、ツツジ科小低木3種と花粉媒介者をめぐる競争が発生しそうな植物種について考察した。

II. 方法

1. 調査地

調査は、長野県軽井沢町の北部に位置する浅間山(標高2568m)の高山帯で行った。平均気温は9.0℃(最高気温:32.1℃、最低気温:-14.2℃)、年間降水量は1258.5mm、最大積雪深は32.0cmである。これらの気象データは、調査地から約14km離れた軽井沢特別地域気象観測所(標高999m)で2021~2022年に

記録されたものである。調査地の浅間山東向き斜面では、研究対象のクロマメノキは標高1670m~2100m、コケモモは標高1670m~1780m、シラタマノキは標高1670m~2050mで分布が確認されている(高橋・高橋 2019)。これら3種の分布域の中で、大きな群落が確認されている標高1670m、1770m、1870mの3つの地点に、調査プロット(約20m×50m)を設置し、調査を行った(図-2)。

2. アリ類の捕獲調査

アリ類の捕獲調査は、クロマメノキ・コケモモ・シラタマノキの開花期に行った。調査を行った2年の開花期はおおむね同じであり、コケモモは6月上旬~6月下旬、クロマメノキは6月中旬~8月中旬、シラタマノキ

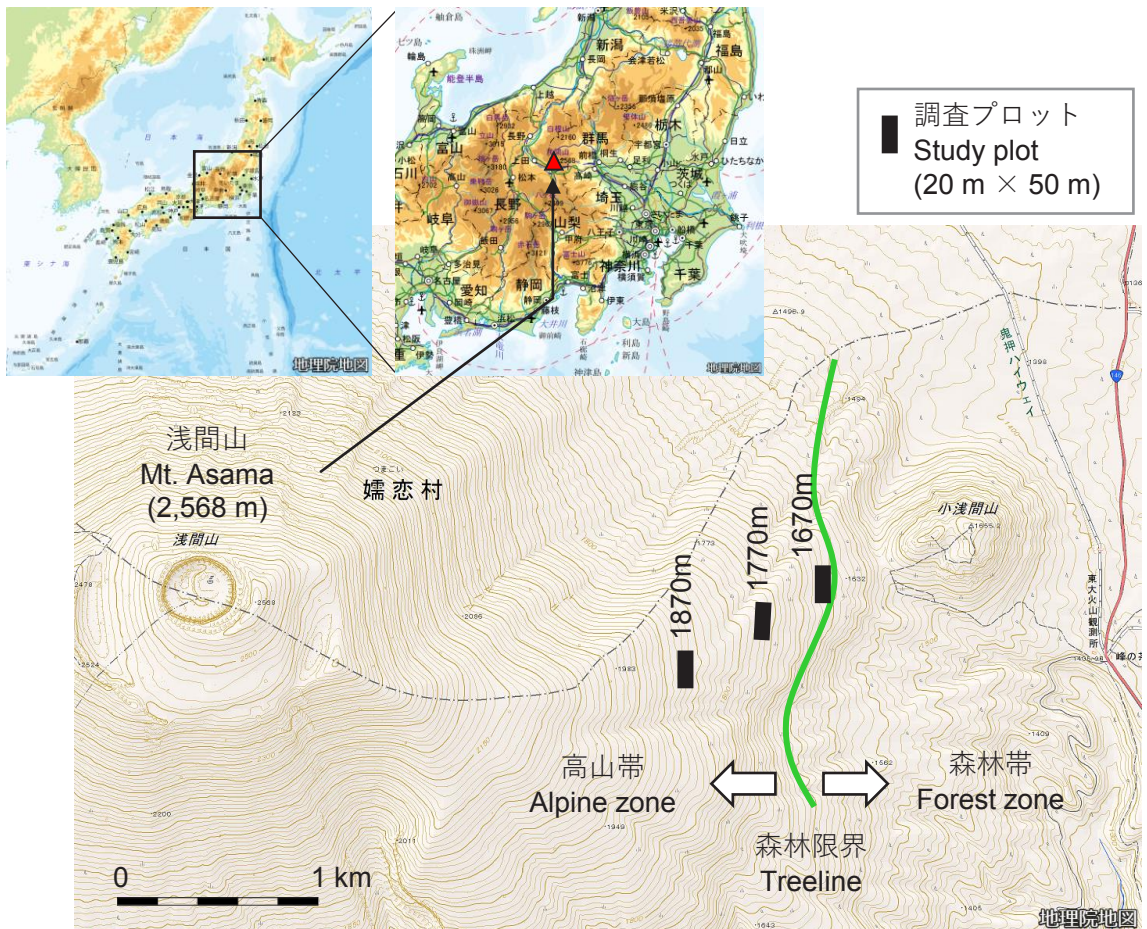


図-2. 浅間山(標高2,568m)の高山帯の東向き斜面の調査地

Figure 2. Study area on an east-facing slope in the alpine zone of Mount Asama, Japan (2,568 m.a.s.l.). Map based on Digital Topographic Map 25000 (Geospatial Information Authority of Japan).

は7月上旬～下旬であった。コケモモでは、2021年6月中旬と2022年6月下旬に1回ずつ、クロマメノキでは、2021年6月下旬・8月上旬と2022年6月下旬・7月上旬・7月下旬に1回ずつ、シラタマノキでは、7月下旬と7月上旬に1回ずつ、それぞれ調査を行った。各標高の3つの調査プロット内で、各種の花冠の中に潜り込んだアリ類を捕獲した。各調査回・各調査プロット・各種当たり調査時間は30分とし、時間帯は花蜜の分泌量が多い正午を挟む10:00～14:00の範囲とした。2021年の調査では、花冠の中に潜り込んだアリ類の滞在時間を記録した後、花冠から出てきた個体を捕獲した。2022年の調査では、花冠での滞在時間の記録は行わずに、花冠に潜り込んでいるアリ類を捕獲し、1個体ずつビニール袋に入れた。捕獲したアリ類は、冷凍庫(-20℃)で保管した。同定には、「日本産アリ類図鑑」(寺山ら 2014)、「アリハンドブック 増補改訂版」(寺山ら 2018)、日本産アリ類画像データベース(アリ類データベース作成グループ2008 2008)を用いた。

3. ハチ類・アブ類の捕獲調査

調査は、各標高の3つの調査プロット内で、アリ類の捕獲調査と同じ日に行った。各種の花冠の中に潜り込んだり、頭部を入れたり、口吻を差し込んだハチ類・アブ類を捕虫網で捕獲し、酢酸エチルで殺虫したのち、1個体ずつビニール袋に入れた。各調査回・各調査プロット・各種当たり調査時間はアリ類の調査と同様に30分とし、時間帯も花蜜の分泌量が多い正午を挟む10:00～14:00の範囲とした。同定には、「日本産マルハナバチ図鑑」(木野田ら 2013)、「日本産ハナバチ図鑑」(多田内・村尾 2014)、「スズメバチはなぜ刺すか」(松浦 1988)を用いた。

4. データ解析

花冠の中に潜り込んだアリ類の滞在時間が植物種あるいはアリの種によって異なるのかをKruskal-Wallis検定とその後のBonferroni法とMann-Whitney U検定による多重比較検定、もしくはMann-Whitney U検定を用いて分析した。なお、アリの種による滞在時間の違いに関する検定は、5個体以上観察できた種のみで行った。この解析には、無料統計ソフトEZR(Easy R)(version 1.54 2020/12/24)(R version 4.0.3 2020/10/10)(Kanda 2013)を用いた。

5. 訪花昆虫に付着した花粉のDNAメタバーコーディング解析

2022年に捕獲したハチ類・アブ類、アリ類の各個体に付着している花粉を綿棒で拭き取り、綿棒の先端部分を切って、昆虫種ごとにマイクロチューブに入れた。DNA解析は、1個体ずつではなく、同昆虫種の全個体をまとめて行った。なお、マルハナバチ類については、カーストで分けて解析した。株式会社生物技研に依頼して、花粉のDNAメタバーコーディング解析(アンプリコンシーケンス解析)を行った。

1) DNA抽出

サンプルにLysis Solution F(ニッポンジーン)とproteaseK(TaKaRa)を添加した後、Shake MasterNeo(bms)を用いて、1,500 rpmで2分間粉碎した。破碎されたサンプルは、56℃で10分間静置した。なお、クロマルハナバチとミヤママルハナバチの2種の場合は、VD-250R Freeze Dryer(TAITEC)を用いて、サンプルを凍結乾燥した。凍結乾燥したサンプルをマルチビーズショッカー(安井器械)で1,500 rpm、2分間粉碎した。破碎されたサンプルにLysis Solution F(ニッポンジーン)とproteaseK(TaKaRa)を添加し、56℃で10分間静置した。

その後、いずれのサンプルも、12,000 x gで2分間遠心分離を行い、上清を分取した。分取した溶液にPurification Solution(ニッポンジーン)とクロロホルムを添加し、よく攪拌した。攪拌後、12,000 x gで15分間遠心分離を行い、上清を分取した。Lab-Aid824s DNA Extraction kit(ZEESAN)を用いて、分取した溶液からDNAを精製した。

2) ライブラリー作製とシーケンシング方法

マルハナバチ類の場合は、Synergy LX(Bio Tek)とQuantiFluor dsDNA System(Promega)を用いて、DNA溶液の濃度測定を行い、2-step tailed PCR法を用いてライブラリーを作製した。そして、Synergy H1(Bio Tek)とQuantiFluor dsDNA Systemを用いて、作製されたライブラリーの濃度測定を行った。マルハナバチ類以外のハナバチ類、ハナアブ類、スズメバチ類、アリ類の場合は、Synergy LX(Agilent Technologies)とQuantiFluor dsDNA System(Promega)を用いて、DNA溶液の濃度測定を行い、2-step tailed PCR法を用いてライブラリーを作製した。そして、Synergy H1(Agilent Technologies)とQuantiFluor dsDNA Systemを用いて、作製されたライブラリーの濃度測定を行った。

いずれのサンプルも、Fragment Analyzer とdsDNA

915 Reagent Kit (Agilent Technologies) を用いて、作製したライブラリーの品質確認を行った。そして、MiSeq システムと MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) を用いて、2x300 bp の条件でシーケンシングを行った。

3) データ解析方法

いずれのサンプルも、FASTX-Toolkit (ver. 0.0.14) の fastx_barcode_splitter tool を用いて得られたリード配列の読み始めが使用したプライマー配列と完全に一致するリード配列のみを抽出した。抽出したリードからプライマー配列を FASTX-Toolkit の fastx_trimer で削除した。その後、sickle (ver. 1.33) を用いて品質値が 20 未満の配列を取り除き、40 塩基以下の長さとなった配列とそのペア配列を破棄した。ペアエンドリード結合スクリプト FLASH (ver. 1.2.11) を用いて、最小の重なりを 10 塩基の条件でリードを結合した。

Qiime2 (ver. 2022.8) の dada2 プラグインでキメラ配列とノイズ配列を除去した後、代表配列と ASV 表を出力した。取得した代表配列を NCBI の nt に対し、BLASTN (ver. 2.13.0) を行い、系統推定致した。その他のパラメーターは標準の条件で行った。Qiime2 の tools export プラグインで qzv 形式のデータを閲覧可能なデータに変換した後、株式会社生物技研のオリジナルプログラムによって閲覧しやすいデータに加工した。

III. 結果

1. コケモモ・クロマメノキ・シラタマノキで捕獲された昆虫

2021 年と 2022 年の両年合わせて、クロマメノキ、コケモモ、シラタマノキの花で捕獲されたハナバチ類、ハナアブ類、スズメバチ類、アリ類は、計 16 種であった (図-3a,b)。その内訳は、ハナバチ類がオオマルハナバチ、コマルハナバチ、クロマルハナバチ、ミヤママルハナバチ、ミヤマツヤコハナバチ、ハラナガツヤコハナバチの 4 種 25 個体、ハナアブ類がナミホシヒラタアブの 1 種 1 個体、スズメバチ類がシロオビホオナガスズメバチ、ツヤクロスズメバチ、ヤドリホオナガスズメバチの 4 種 6 個体、アリ類がトビイロケアリ、ハラクシケアリ隠蔽種群、クロヤマアリ隠蔽種群、エゾアカヤマアリの 4 種 121 個体 (2021 年: 4 種 27 個体、2022 年: 4 種 94 個体) であった。

花に訪れたハナバチ類、ハナアブ類、スズメバチ類の飛翔性昆虫のうち、最も多くの個体が訪れた植物種は、クロマメノキの 11 種 26 個体であり、次いでコケモモの 3 種 3 個体、シラタマノキの 0 種 0 個体であった

(図-3a,b)。その内訳は、個体数が多い順に、クロマメノキの花には、オオマルハナバチが 15 個体 (女王バチ: 2 個体、働きバチ: 1 個体、雄バチ: 12 個体)、シロオビホオナガスズメバチが 3 個体、コマルハナバチ (雄バチ) とツヤクロスズメバチが 2 個体ずつ、オオマルハナバチ (働きバチ)、クロマルハナバチ (雄バチ)、ミヤママルハナバチ (働きバチ)、ミヤマツヤコハナバチ (働きバチ)、ハラナガツヤコハナバチ (働きバチ)、ヤドリホオナガスズメバチが 1 個体ずつ、コケモモの花には、クロマルハナバチ (雄バチ)、ミヤママルハナバチ (働きバチ)、ナミホシヒラタアブが 1 個体ずつであった。

花に訪れたアリ類の徘徊性昆虫のうち、最も多くの個体が訪れた植物種は、2021 年では、クロマメノキの 3 種 12 個体であり、次いでコケモモの 2 種 6 個体、シラタマノキの 3 種 9 個体であった。その内訳は、個体

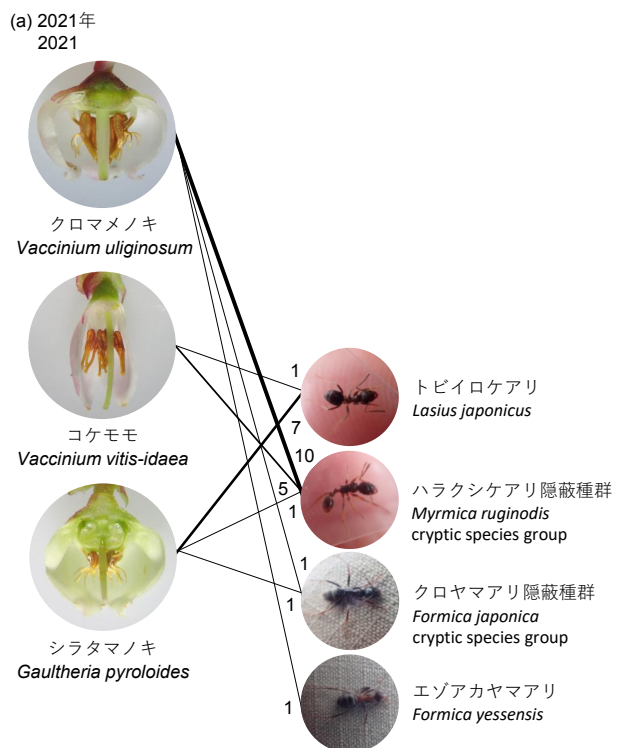


図-3. クロマメノキ・コケモモ・シラタマノキの花に訪れたハナバチ類・ハナアブ類・スズメバチ類・アリ類の個体数

Figure 3. Number of insects of the Anthophila, Syrphidae, and Vespidae that visited flowers of *Vaccinium uliginosum*, *Vaccinium vitis-idaea*, and *Gaultheria pyrolloides*.

数が多い順に、クロマメノキの花には、ハラクシケアリ隠蔽種群が10個体、クロヤマアリ隠蔽種群が1個体、エゾアカヤマアリが1個体、コケモモの花には、ハラクシケアリ隠蔽種群が5個体、トビイロケアリが1個体、シラタマノキの花には、トビイロケアリが7個体、ハラクシケアリ隠蔽種群とクロヤマアリ隠蔽種群が1個体ずつであった。2022年については、クロマメノキの4種58個体であり、次いでコケモモの3種18個体、シラタマノキの0種0個体であった(図-3a,b)。その内訳は、個体数が多い順に、クロマメノキの花には、トビイロケアリが47個体、クロヤマアリ隠蔽種群が5個体、ハラクシケアリ隠蔽種群が4個体、エゾアカヤマアリが2個体、コケモモの花には、トビイロケアリが8個体、ハラクシケアリ隠蔽種群が7個体、クロヤマアリ隠蔽種群が3個体であった。

2. ハナバチ類・ハナアブ類・スズメバチ類に付着していた花粉のDNAメタバーコーディングによる解析結果

ハナバチ類・ハナアブ類・スズメバチ類の体に付着していた花粉を解析した結果、クロマメノキとコケモモを含む19種の花粉が昆虫の体から検出された(表-1)。

クロマメノキの花粉は、5種のハナバチ類(オオマルハナバチ(女王バチ・働きバチ・雄バチ)、コマルハナバチ(雄バチ)、クロマルハナバチ(雄バチ)、ミヤママルハナバチ(働きバチ)、ハラナガツヤコハナバチ)と3種のスズメバチ類(シロオビホオナガスズメバチ、ツヤクロスズメバチ、ヤドリホオナガスズメバチ)の体から検出された。コケモモの花粉は、2種のハナバチ類(クロマルハナバチ(雄バチ)、ミヤママルハナバチ(働きバチ))と1種のハナアブ類(ナミホシヒラタアブ)の体から検出された。シラタマノキの花粉は、いずれの個体からも検出されなかった。

(b) 2022年
2022

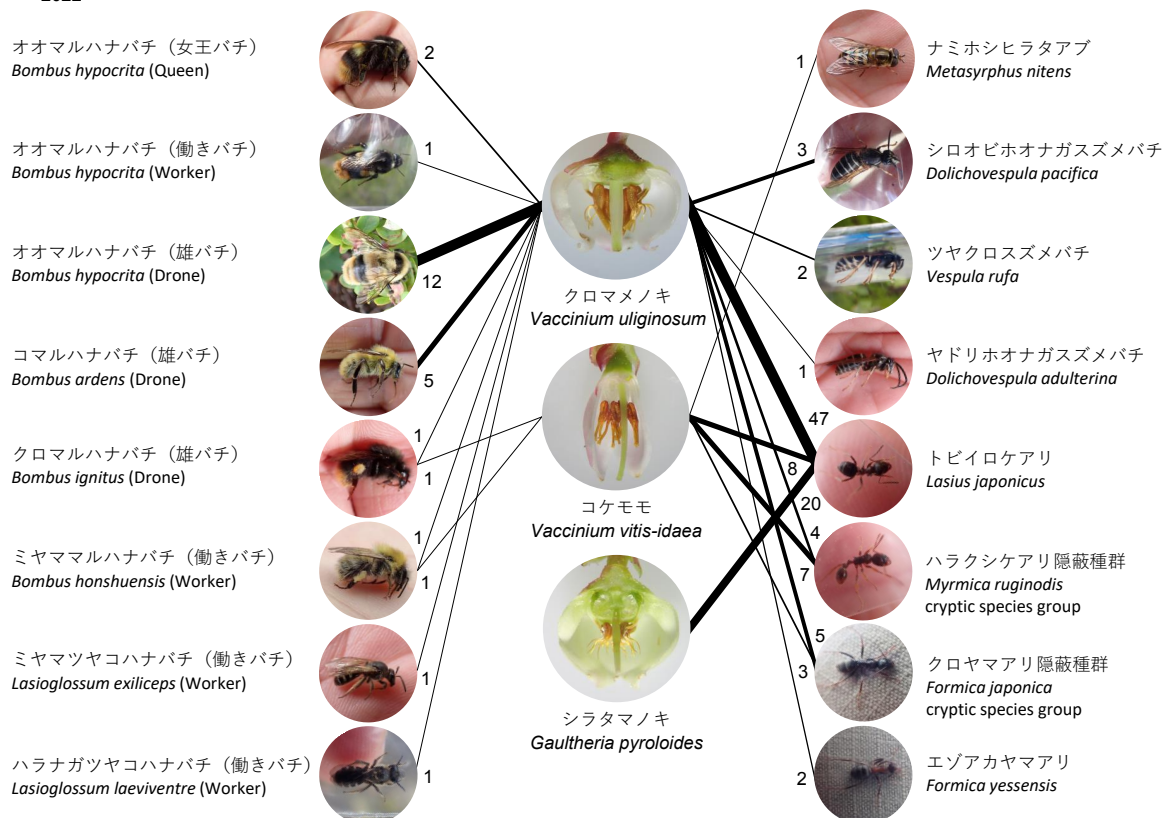


図-3. 続き
Figure 3. Continued

表-1. ハナバチ類・ハナアブ類・スズメバチ類の体に付着していた花粉のアンブリコンシーケンス解析の結果、数値は、植物種が同定された花粉の、対象となる塩基配列を読み取った回数（リード数）で、昆虫1個体当たりに換算した値を示しており、全植物種の総リード数に占める各植物種のリード数の割合（%）で表記している。

Table 1. Results of amplicon sequencing analysis of pollen grains on the bodies of insects of the Anthophila, Syrphidae, and Vespidae. Values represent the number of times the target sequence was read (number of reads) for pollen grains from identified plant species, converted to number of reads per individual insect, and are expressed as the percentage (%) of the number of reads for each plant species as a function of the total number of reads for all plant species.

昆虫種 Insect species	カースト Caste	個体数 No. of insects	植物種 Plant species																															
			<i>Vaccinium uliginosum</i>	<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	<i>Pinus densiflora</i>	<i>Sorbus commixta</i>	<i>Rosaceae</i> sp.	<i>ノリウツギ</i>	<i>Hydrangea paniculata</i>	<i>Cedrus deodara</i>	<i>コナギ</i>	<i>Viburnum sieboldii</i>	<i>コナラ</i> 属 sp.	<i>Quercus</i> sp.	<i>ハナカシノヤナギナツ</i>	<i>Rhododendron brachycarpum</i>	<i>ヤマノシ</i>	<i>Wisteria brachybotrys</i>	<i>エゾイチヤクソウ</i>	<i>Pyrola minor</i>	<i>Ilex</i> sp.	<i>マツ</i> 属 sp.	<i>Pinus</i> sp.	<i>レノハツウツシ</i>	<i>Rhododendron japonicum</i>	<i>ヤマノイ</i>	<i>Vitis coignetiae</i>	<i>ハナカシノツシ</i>	<i>Rhododendron semibarbatum</i>	<i>サルスシ</i>	<i>Actinidia arguta</i>	<i>Celastrus orbiculatus</i>		
オオマルハナバチ <i>Bombus hypocrita</i>	女王バチ	2	30,484	55,683	11,688	2,145																												
	Queen																																	
	働きバチ	1	100,000																															
	Worker																																	
	雄バチ	12	52,946					36,630	10,209																									
	Drone																																	
	Drone	5	100,000																															
<i>Bombus ardens</i>	働きバチ	1	18,367	8,722	0,566	71,326																												
<i>Bombus ignitus</i>	Worker																																	
<i>Bombus ignitus</i>	働きバチ	2	3,803	94,197	1,429	0,430																												
<i>Bombus honshuensis</i>	Worker																																	
<i>Bombus honshuensis</i>	働きバチ	1																																
<i>Lasiglossum exiliceps</i>	Worker																																	
<i>Lasiglossum exiliceps</i>	働きバチ	1	100,000																															
<i>Lasiglossum laevis</i>	Worker																																	
<i>Metasyrphus nitens</i>		1		24,698	75,302																													
<i>Dolichovespula pacifica</i>		3	90,205																															
<i>Vespa rufa</i>		2	100,000																															
<i>Dolichovespula adulterina</i>		1	99,389																															
合計リード数 (%)			52,061	16,726	9,435	9,414	9,234	2,178	0,420	0,245	0,087	0,075	0,045	0,026	0,021	0,013	0,006	0,005	0,004	0,003	0,002													
Total no. of reads (%)																																		

各昆虫種の体から検出された全植物種の花粉の合計リード数(対象となる塩基配列を読み取った回数(リード数)に占めるクロマメノキの花粉のリード数の割合は、オオマルハナバチ(働きバチ)[1個体当たりのリード数:16328、以下、〔 〕内はリード数を示す]、コマルハナバチ(雄バチ)[5443.2]、ハラナガツヤコハナバチ[33981]、ツヤクロスズメバチ[3938.5]の100%が最も高い値を示し、次いで、ヤドリホオナガスズメバチの99.4%[39557]、シロオビホオナガスズメバチの90.2%[6416.3]、オオマルハナバチ(雄バチ)の52.9%[565.3]、オオマルハナバチ(女王バチ)の30.1%[995]、クロマルハナバチ(働きバチ)の18.4%[7501]、ミヤママルハナバチ(働きバチ)の3.8%[814.5]の順であった。コケモモの花粉については、ミヤママルハナバチ(働きバチ)の94.2%[20177]が最も高く、次いで、ナミホシヒラタアブの75.3%[8167]、クロマルハナバチ(働きバチ)の8.7%[3562]の順であった(表-1)。

オオマルハナバチ(女王バチ)は、クロマメノキの花のみで捕獲されたが、クロマメノキの他に、コケモモの花粉も体から検出された。ミヤマツヤコハナバチ(働きバチ)は、クロマメノキの花で捕獲されたが、その花粉は体から検出されなかった。オオマルハナバチ(働きバチ・雄バチ)、コマルハナバチ(雄バチ)、クロマルハナバチ(雄バチ)、ミヤママルハナバチ(働きバチ)、ハラナガツヤコハナバチ(働きバチ)、ナミホシヒラタアブ、シロオビホオナガスズメバチ、ツヤクロスズメバチ、ヤドリホオナガスズメバチでは、捕獲された花の種と体から検出された花粉の種が一致した(表-1)。

ハナバチ類・ハナアブ類・スズメバチ類のうち、全昆虫種の全個体から検出されたクロマメノキの花粉の合計リード数(対象となる塩基配列を読み取った回数(リード数)の合計)が、各昆虫種の1個体当たりになどのように配分されていたのかを比較すると、ヤドリホオナガスズメバチの34.2%[1個体当たりのリード数:39557、以下、

表-2. ハナバチ類・ハナアブ類・スズメバチ類の体に付着していたクロマメノキとコケモモの花粉のアンプリコンシーケンス解析の結果。数値は、植物種が同定された花粉の、対象となる塩基配列を読み取った回数(リード数)で、昆虫1個体あたりに換算した値を示しており、クロマメノキとコケモモの総リード数に占める各昆虫種のリード数の割合(%)で表記している。

Table 2. Results of amplicon sequencing analysis of *Vaccinium uliginosum* and *Vaccinium vitis-idaea* pollen grains attached to the bodies of insects of the Anthophila, Syrphidae, and Vespidae. Values represent the number of times the target sequence was read (number of reads) for the pollen grains, converted to the number of reads per individual insect, and are expressed as the percentage (%) of the number of reads for each insect species as a function of the total number of reads for *Vaccinium uliginosum* and *Vaccinium vitis-idaea*, respectively.

植物種 Plant species	昆虫種 Insect species												
	女王バチ Queen	働きバチ Worker	雄バチ Drone	雄バチ Drone	働きバチ Worker	働きバチ Worker	働きバチ Worker	働きバチ Worker	働きバチ Worker	働きバチ Worker	ナミホシヒラタアブ <i>Metasyrphus nitens</i>	シロオビホオナガスズメバチ <i>Dolichovespula pacifica</i>	ツヤクロスズメバチ <i>Vespa rufa</i>
オオマルハナバチ <i>Bombus hypocrita</i>	0.9	14.1	0.5	4.7	6.5	0.7			29.4			5.6	3.4
コマルハナバチ <i>Bombus ardens</i>													
クロマルハナバチ <i>Bombus ignitus</i>													
ミヤママルハナバチ <i>Bombus honshuensis</i>													
ミヤマツヤコハナバチ <i>Lasioglossum exiliceps</i>													
ハラナガツヤコハナバチ <i>Lasioglossum laevis</i>													
ナミホシヒラタアブ <i>Metasyrphus nitens</i>													
シロオビホオナガスズメバチ <i>Dolichovespula pacifica</i>													
ツヤクロスズメバチ <i>Vespa rufa</i>													
ヤドリホオナガスズメバチ <i>Dolichovespula adulterina</i>													
合計リード数 (%)													
Total number of reads (%)													
クロマメノキ <i>Vaccinium uliginosum</i>													
コケモモ <i>Vaccinium vitis-idaea</i>													

表-3. アリ類の体に付着していた花粉のアンプリコンシーケンス解析の結果。数値は、植物種が同定された花粉の、対象となる塩基配列を読み取った回数（リード数）で、昆虫1個体あたりに換算した値を示しており、全植物種の総リード数に占める各植物種のリード数の割合（%）で表記している。

Table 3. Results of amplicon sequencing analysis of pollen grains on the bodies of insects of the Formicidae. Values represent the number of times the target sequence was read (number of reads) for pollen grains from identified plant species, converted to number of reads per individual insect, and expressed as the percentage (%) of the number of reads for each plant species as a function of the total number of reads for all plant species.

昆虫種 Insect species	個体数 No. of insects	植物種 Plant species					
		クロマメノキ <i>Vaccinium uliginosum</i>	アメリカセンダングサ <i>Bidens frondosa</i>	シラタマノキ <i>Gaultheria pyroloides</i>	アカマツ <i>Pinus densiflora</i>	コケモモ <i>Vaccinium vitis-idaea</i>	
トビイロケアリ <i>Lasius japonicus</i>	75	62.0		29.8		8.2	
ハラクシケアリ隠蔽種群 <i>Myrmica ruginodis</i> cryptic species group	11	20.1	49.1		26.5	4.3	
クロヤマアリ隠蔽種群 <i>Formica japonica</i> cryptic species group	8	100.0					
合計リード数 (%) Total number of reads (%)		63.9	20.2	2.5	10.9	2.4	

[]内はリード数を示す]が最も高く、次いで、ハラナガツヤコハナバチ(働きバチ)の29.4%[33981]、オオマルハナバチ(働きバチ)の14.1%[16328]、クロマルハナバチ(働きバチ)の6.5%[7501]、シロオビホオナガスズメバチの5.6%[6416.3]、コマルハナバチ(雄バチ)の4.7%[5443.2]、ツヤクロスズメバチの3.4%[3938.5]、オオマルハナバチ(女王バチ)の0.9%[995]、ミヤママルハナバチ(働きバチ)の0.7%[814.5]、オオマルハナバチ(雄バチ)の0.5%[565.3]の順であった(表-2)。コケモモの花粉については、ミヤママルハナバチ(働きバチ)の63.2%[20177]が最も高く、次いで、ナミホシヒラタアブの25.6%[8167]、クロマルハナバチ(働きバチ)の11.2%[3562]の順であった(表-2)。

3. アリ類に付着していた花粉のDNAメタバーコーディングによる解析結果

アリ類の体に付着していた花粉を解析した結果、ク

ロマメノキ・コケモモ・シラタマノキを含む5種の花粉がアリの体から検出された(表-3)。

クロマメノキの花粉は、トビイロケアリ、ハラクシケアリ隠蔽種群、クロヤマアリ隠蔽種群の体から検出された。シラタマノキの花粉は、トビイロケアリの体から、コケモモの花粉は、トビイロケアリとハラクシケアリ隠蔽種群の体から、それぞれ検出された。

各昆虫種の体から検出された全植物種の花粉の合計リード数(対象となる塩基配列を読み取った回数の合計)に占めるクロマメノキの花粉のリード数の割合は、クロヤマアリ隠蔽種群の100%[1個体当たりのリード数:2797、以下、[]内はリード数を示す]が最も高い値を示し、次いで、トビイロケアリの62.0%[285.9]、ハラクシケアリ隠蔽種群の20.1%[459.5]の順であった(表-3)。シラタマノキの花粉については、トビイロケアリのみで検出され、29.8%[137.2]であった

表-4. アリ類の体に付着していたクロマメノキ・シラタマノキ・コケモモの花粉のアンプリコンシーケンス解析の結果。数値は、植物種が同定された花粉の、対象となる塩基配列を読み取った回数（リード数）で、昆虫1個体あたりに換算した値を示しており、クロマメノキ・シラタマノキ・コケモモの総リード数に占める各昆虫種のリード数の割合（%）で表記している。

Table 4. Results of amplicon sequencing analysis of *Vaccinium uliginosum*, *Gaultheria pyrolloides*, and *Vaccinium vitis-idaea* pollen grains attached to the bodies of insects of the Formicidae. Values represent the number of times the target sequence was read (number of reads) for the pollen grains, converted to number of reads per individual insect, and expressed as the percentage (%) of the number of reads for each insect species as a function of the total number of reads for *Vaccinium uliginosum*, *Gaultheria pyrolloides*, and *Vaccinium vitis-idaea*, respectively.

植物種 Plant species	昆虫種 Insect species				
	トビイロケアリ <i>Lasius japonicus</i>	ハラクシケアリ隠蔽種群 <i>Myrmica ruginodis</i> cryptic species group	クロヤマアリ隠蔽種群 <i>Formica japonica</i> cryptic species group	合計リード数 (%)	Total number of reads (%)
クロマメノキ <i>Vaccinium uliginosum</i>	8.1	13.0	79.0	92.9	
シラタマノキ <i>Gaultheria pyrolloides</i>	100.0			3.6	
コケモモ <i>Vaccinium vitis-idaea</i>	27.9	72.1		3.5	

(表-3)。コケモモの花粉については、トビイロケアリの8.2%〔37.7〕が最も高く、次いで、ハラクシケアリ隠蔽種群の4.3%〔97.2〕であった(表-3)。

トビイロケアリとハラクシケアリ隠蔽種群では、捕獲された花の種と体から検出された花粉の種が一致した。クロヤマアリ隠蔽種群は、クロマメノキとコケモモの花で捕獲されたが、クロマメノキの花粉のみが体から検出され、コケモモの花粉は検出されなかった。エゾアカヤマアリは、クロマメノキの花で捕獲されたが、その花粉は体から検出されなかった。

アリ類のうち、全昆虫種の全個体から検出されたクロマメノキの花粉の合計リード数(対象となる塩基配列を読み取った回数の合計)が、各昆虫種の1個体当たりどのよう配分されていたのかを比較すると、クロヤマアリ隠蔽種群の79.0%〔1個体当たりのリード数:2797、以下、〔 〕内はリード数を示す〕が最も高く、次いで、ハラクシケアリ隠蔽種群の13.0%〔459.5〕、トビイロケアリの8.1%〔285.9〕の順であった(表-4)。シラ

タマノキの花粉については、トビイロケアリのみで検出され、100%〔137.2〕であった(表-4)。コケモモの花粉については、ハラクシケアリ隠蔽種群の72.1%〔97.2〕が最も高く、次いで、トビイロケアリの27.9%〔37.7〕であった(表-4)。

4. 花冠に侵入したアリ類の滞在時間

花冠の中に侵入したアリの滞在時間は、植物種によって有意に異なり、コケモモよりシラタマノキの方が長く、クロマメノキとシラタマノキの間と、コケモモとシラタマノキの間には有意な違いが認められなかった(図-4a、Kruskal-Wallis検定: $\chi^2 = 9.0$, $df = 2$, $P = 0.01$ 、Bonferroni法とMann-WhitneyのU検定による多重比較: $P < 0.05$)。滞在時間の中央値は、クロマメノキが341.5秒($n = 10$)、コケモモの133.5秒($n = 10$)、シラタマノキが61.5秒($n = 10$)であった。

一方、アリの種による滞在時間の違いについては、5個体以上観察されたハラクシケアリ隠蔽種群とト

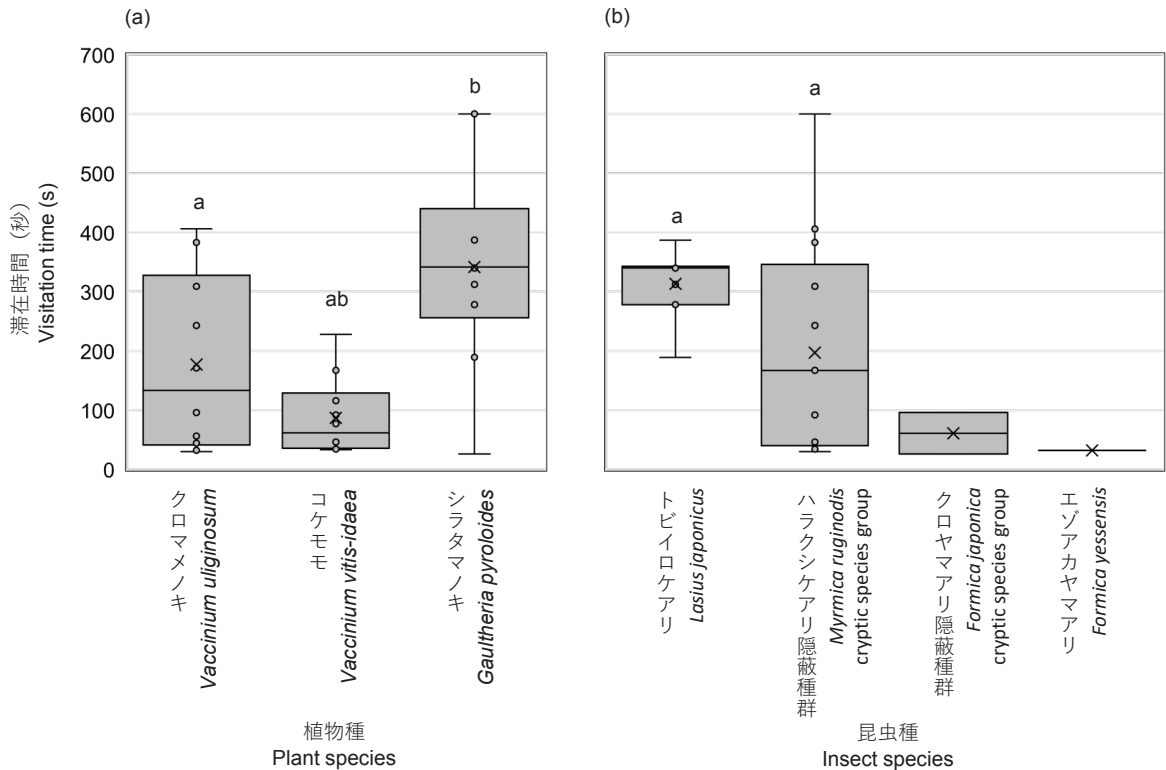


図-4. 花冠に侵入したアリ類の滞在時間（植物種別（a），昆虫種別（b））. 図の中の異なるアルファベットは，（a）植物種間，（b）昆虫種間に有意差があることを示す（ $p < 0.05$ ；（a）Kruskal-Wallis検定後のBonferroni法とMann-Whitney U検定を用いた多重比較，（b）Mann-Whitney U検定）。

Figure 4. Visitation time of ants invading the flower corolla by (a) plant species and (b) insect species. Different letters in figures indicate significant differences among (a) plant species and (b) insect species ($p < 0.05$; (a) multiple comparisons using Mann-Whitney U test with Bonferroni adjustment after Kruskal-Wallis test and (b) Mann-Whitney U test).

ピロケアリで検定した結果、有意な違いは認められなかった（図-4b, Mann-Whitney U検定: $W = 68, P = 0.08$ ）。滞在時間の中央値は、クロマメノキが341.5秒、コケモモの133.5秒、シラタマノキが61.5秒であった。滞在時間の中央値は、ハラクシケアリ隠蔽種群が167秒（ $n = 13$ ）、トビイロケアリが340秒（ $n = 7$ ）、クロヤマアリ隠蔽種群が61秒（ $n = 2$ ）、エゾアカヤマアリが32秒（ $n = 1$ ）であった。

IV. 考察

1. クロマメノキ、コケモモ、シラタマノキの受粉様式

本研究と同じ調査地で、クロマメノキとコケモモを対象に行われた人工授粉実験では、両種は、ともに自家受粉と他家受粉の受粉様式を持つが、コケモモは自家受粉より他家受粉の方が結実率が高く、成熟した

種子数が多かったことから、クロマメノキよりコケモモの方が他家受粉への依存度が高いことを報告している（井出ら 2020a）。また、同調査地で、シラタマノキを対象に、同様の人工授粉実験が行われており、自家受粉と他家受粉の受粉様式を持つことが報告されている（井出ら 2020b）。さらに、ベルギーのアルデンヌ高地で、クロマメノキ *Vaccinium uliginosum* の変種 *Vaccinium uliginosum* var. *microphyllum* を対象に行われた調査によると、クロマメノキはクローン繁殖もできるが、風や重力による自家受粉と、昆虫による他家受粉で種子繁殖をする種であり、特にマルハナバチ類による他家受粉は種子生産量を促進させる重要な受粉様式であることを指摘している（Jacquemart 1996）。また、フィンランドで行われたコケモモの受粉実験によると、コケモモは自家受粉より他家受粉で種子生産が良好であり、

種子の発育停止も起こりにくいという(Nuortila *et al.* 2002)。さらに、アメリカのニュージャージー州とペンシルベニア州の森林で、シラタマノキの近縁種*Gaultheria procumbens*を対象に行われた受粉実験では、自家受粉と他家受粉の両方で結実したという(Mirick and Quinn 1981)。したがって、研究対象のクロマメノキ、コケモモ、シラタマノキの3種は、他家受粉と自家受粉の2つの受粉様式を持つハイブリッド型だと考えるのが妥当であろう。

本調査で、これら3種の花で観察されたハナバチ類・ハナアブ類・スズメバチ類・アリ類は、いずれも他家受粉と自家受粉を担う可能性がある。行動範囲の広い飛翔性昆虫のハナバチ類・ハナアブ類・スズメバチ類は、より他家受粉への貢献が大きく、行動範囲が狭く徘徊性昆虫のアリ類は、より自家受粉への貢献が大きいと予想される。

2. 潜在的な花粉媒介者としてのハナバチ類・ハナアブ類・スズメバチ類

ベルギーのアルデンヌ高地のヒース泥炭地で、スノキ属3種(クロマメノキ、コケモモ、*Vaccinium myrtillus*)を対象に行われた調査では、3種の中でも特にクロマメノキの花に、マルハナバチ類・単独性ハナバチ類・ハナアブ類などの多様な昆虫が訪れたことを報告している(Jacquemart 1993)。本調査でも、クロマメノキ・コケモモ・シラタマノキの3種のうち、クロマメノキの訪花昆虫が最も多く、6種のハナバチ類と3種のスズメバチ類が観察されたことから、Jacquemart(1993)の報告と類似する結果が得られた。したがって、クロマメノキの花粉媒介は、多様な昆虫種が貢献していると考えられる。

クロマメノキの花には、マルハナバチ類(オオマルハナバチ(創設女王バチ・働きバチ・雄バチ)、コマルハナバチ(働きバチ)、クロマルハナバチ(働きバチ)、ミヤママルハナバチ(働きバチ))が最も多く訪れ、特に、個体数が多かった昆虫種はオオマルハナバチであった。井出ら(2020a)でも、クロマメノキへのミヤママルハナバチ(働きバチ・雄バチ)、オオマルハナバチ(創設女王バチ)、コマルハナバチ(雄バチ)の訪花が確認されており、これらのマルハナバチ類が重要な花粉媒介者になりうると指摘している。本研究でも同様の見解である。また、1個体当たりの体に付着していた花粉量(リード数に相関するとみなす)は、マルハナバチの種によって異なる傾向がみられ、オオマルハナバチ(働きバチ)が

最も多く、最も少なかったミヤママルハナバチ(働きバチ)の約20倍であった。したがって、1訪花当たりの受粉貢献度は、マルハナバチの種によって異なることが予想される。

スズメバチ類(ヤドリホオナガスズメバチ、ツヤクロスズメバチ、ヤドリホオナガスズメバチ)は、マルハナバチ類と比べて、観察された個体数は少なかったものの、クロマメノキの花に訪れ、1個体当たりの体に付着していた花粉量は、ヤドリホオナガスズメバチで最も多かった。アラスカ州のタナナ溪谷の氾濫原で、コケモモの亜種*Vaccinium vitis-idaea* subsp. *minu*を対象に行われた調査では、ホオナガスズメバチ属の昆虫(*Dolichovespera arenaria*, *D. norvegicoides*)の訪花が確認され、体に付着していた花粉も多かったという(Davis *et al.* 2002)。また、スズメバチ類の成虫は、樹液や花蜜を餌資源として利用する(根来 1995)。このことから、本調査で観察されたスズメバチ類は、花蜜を求めてクロマメノキの花に訪れていたと考えられる。これらのスズメバチ類も、クロマメノキの重要な花粉媒介者になりうるといえよう。

マルハナバチ類以外のハナバチ類(コハナバチ科のミヤマツヤコハナバチ、ハラナガツヤコハナバチ)は、個体数が少なく、ミヤマツヤコハナバチにはクロマメノキの花粉が付着していなかったが、花粉が付着していたハラナガツヤコハナバチの花粉量は、コハナバチ科の中で2番目に多かった。訪問頻度は少ないが、これらのコハナバチ科の昆虫も、クロマメノキの花粉媒介者となりうる可能性があるだろう。

コケモモの花には、2種のマルハナバチ類(クロマルハナバチ(働きバチ)、ミヤママルハナバチ(働きバチ))、1種のハナアブ類(ナミホシヒラタアブ)が訪れた。井出ら(2020a)では、コケモモへのオオマルハナバチ(創設女王バチ)の訪花が確認されており、重要な花粉媒介者になりうると報告している。海外の報告をみると、カナダ・サスカチュワン州のバンクスマツ*Pinus banksiana*が優占する林で、コケモモを対象に行われた調査では、マルハナバチ類を含むハチ類(マルハナバチ属*Bombus*、*Andrena*属、ツツハナバチ属*Osmia*、コハナバチ属*Lasioglossum*、ムカシハナバチ属*Colletes*、メンハナバチ属*Hylaeus*)、アリ類(Formicidae)、チョウ類(シジミチョウ科Lycaenidae)、ハナアブ類(hoverflies)の訪花が確認され、特にマルハナバチ類が全訪花昆虫の20%~40%を占めていたことから、重要な花粉媒介者である可能性が高いとしている(Stephens 2012)。

これらの報告も踏まえると、本調査地でも、クロマルハナバチとミヤママルハナバチなどのマルハナバチ類がコケモモの重要な花粉媒介者になりうると考えられる。一方で、体に付着していた花粉量(リード数)を比較すると、クロマルハナバチ(働きバチ)よりミヤママルハナバチ(働きバチ)の方が約5.7倍も多かったため、ミヤママルハナバチの方が花粉媒介者としての貢献度が高い可能性がある。しかし、それぞれ1個体ずつしか、花粉分析ができなかったため、さらなる調査が必要であろう。

本調査でコケモモの花に訪れたクロマルハナバチとミヤママルハナバチは、ともに働きバチであった。一般に、マルハナバチ類の巣外活動はカーストによって季節的な違いがみられ、春から夏には越冬から目覚めた創設女王バチ、夏から秋には働きバチ、夏の終わりから秋には雄バチと新女王バチが、それぞれ野外で多く観察される傾向がある(木野田ら 2013)。一方、本調査地のコケモモの開花期は、6月上旬～6月下旬であり、クロマメノキ・コケモモ・シラタマノキの3種の中では最も開花期が早い(高橋・高橋 2019)。したがって、早春に、創設女王バチがコケモモの花粉媒介を担う可能性が高いと考えられる。しかし、気温上昇の影響で春の早期化が進むと、開花期と花粉媒介者の活動時期が一致せず、他家受粉の失敗や自家受粉への偏りが起こることが予想されている(Kudo 2014)。コケモモは、このような気温上昇の影響を最も受けやすい植物種であると考えられる。

ハナアブ類のナミホシヒラタアブは、マルハナバチ類と比べて、観察された個体数は少なかったものの、コケモモの花に訪れ、体にも花粉が付着していた。Stephens (2012)の調査でも、コケモモへのハナアブ類の訪花が報告されていたことから、訪問頻度は少ないが、ハナアブ類もコケモモの花粉媒介者となりうる可能性はあるだろう。

シラタマノキの花には、ハナバチ類・ハナアブ類・スズメバチ類は訪れなかった。また、クロマメノキ・コケモモの訪花昆虫の体からも、シラタマノキの花粉は検出されなかった。しかし、本調査地では、シラタマノキへのオオマルハナバチ(働きバチ・雄バチ)の訪花が観察されている(井出ら 2020b)。海外の報告をみると、アメリカのニュージャージー州・ペンシルベニア州の森林で、シラタマノキ属 *Gaultheria* の一種 (*G. procumbens*) を対象に行われた調査では、花粉媒介者の多くがマルハナバチ類であったという (Mirick and Quinn 1981)。また、

チリ南部、チロエ島北部の温帯雨林で、シラタマノキ属の低木 (*G. phillyreifolia*, *G. mucronata*) を対象に行われた調査では、これらの花にマルハナバチ属 *Bombus* を含むハチ目 Hymenoptera と *Cadeguala* 属 (コハナバチ科 Halictidae) の昆虫が訪れたことを報告している (Smith-Ramirez *et al.* 2005)。さらに、ブラジル南東部、セーハ・ド・マール山脈のセーハ・ダ・ボカイナ国立公園内の草原とナンヨウスギ属 *Araucaria* の森林で、シラタマノキ属の低木 (*G. sleumeriana*, *G. serrata*, *G. eriophylla*) を対象に行われた調査によると、これらの花にハチドリ類 (カンムリハチドリ *Stephanoxis lalandi*、アオムネヒメエメラルドハチドリ *Chlorostilbon aureoventris*) とマルハナバチ類 (*Bombus atratus*) が訪れたという (Freitas 2006)。本研究では、シラタマノキの花粉媒介者となりうる飛翔性昆虫類を特定できなかったが、これまでの報告からも、主にマルハナバチ類が花粉媒介を担っている可能性が高いと考えられる。

3. 潜在的な花粉媒介者としてのアリ類

クロマメノキの花には、4種のアリ類(トビイロケアリ、クロヤマアリ隠蔽種群、ハラクシケアリ隠蔽種群、エゾアカヤマアリ)、コケモモとシラタマノキの花には、3種のアリ類(トビイロケアリ、クロヤマアリ隠蔽種群、ハラクシケアリ隠蔽種群)が、それぞれ訪れた。本調査で観察されたトビイロケアリ・クロヤマアリ隠蔽種群・エゾアカヤマアリはヤマアリ亜科 Formicinae、ハラクシケアリ隠蔽種群はフタフシアリ亜科 Myrmicinae にそれぞれ含まれ、いずれもクシケアリ族群 Myrmicine tribe group に属する。ヤマアリ亜科は、雑食性で、花蜜や同翅類昆虫からの分泌物(甘露)を主な餌資源として利用する種が多く、特にトビイロケアリはアブラムシの分泌物(甘露)を好んで利用する(寺山ら 2014)。また、ハラクシケアリ隠蔽種群が属するフタフシアリ亜科は、雑食性で食性の幅が広く、同群のツヤクシケアリ属のアリは昆虫の死骸や分泌物(甘露)を餌として利用する(寺山ら 2014)。これらの食性から、本調査で確認されたアリ4種も、雑食性で、花蜜や分泌物(甘露)といった糖度の高い液体を餌として利用すると考えられる。したがって、これら4種のアリは、潜在的な花粉媒介者になりうる可能性があるだろう。

日本では、クロマメノキ・コケモモ・シラタマノキについて、アリ類の訪花に関する報告例がないが、立山・室堂平の高山帯で行われた調査では、クロマメノキとコケモモと同属のクロウスゴ *Vaccinium ovalifolium* の

花にアリ類が訪れている(根来 2002)。一方、海外の報告をみると、カナダ・サスカチュワン州のバンクスマツ *Pinus banksiana* が優占する林で行われた調査では、コケモモの花にアリ類 (Formicidae) が訪れ、全訪花昆虫の約 4 % を占めていたという (Stephens 2012)。また、リトアニアの北方マツ林の成熟林と伐採地で、スノキ属の一種 (*Vaccinium myrtillus*) を対象に行われた調査では、アリ類 (Formicidae) の訪花が観察され、全訪花昆虫の約 95 % を上回っていたことから、アリ類が重要な花粉媒介者になる可能性が指摘されている (Daubaras et al. 2017)。

一方で、タスマニア固有種のツツジ科 Ericaceae の一種 (*Richea dracophylla*) の花には、ヤマアリ亜科のアリ的一种 (*Notoncus hickmani*) が訪れ、自家受粉を促進する (Nicol et al. 2023)。また、中国雲南省の亜熱帯地域で発見された新属 *Chenorchis* の一種 (*Chenorchis singchii*、ラン科 Orchidaceae) は、フタフシアリ亜科のムネボソアリ属 *Temnothorax* のアリ類を花粉媒介者に利用し、自家受粉と近親交配を促進する多くの受粉機構を形成している (Zhongjian et al. 2008)。つまり、これらの植物種の自家受粉に、本調査でも観察されたヤマアリ亜科とフタフシアリ亜科のアリ類が貢献している。したがって、本調査でのアリ類が、クロマメノキ・コケモモ・シラタマノキの自家受粉に貢献する可能性は十分にあると考えられる。

また、クロマメノキの花には、トビイロケアリ・ハラクシケアリ隠蔽種群・クロヤマアリ隠蔽種群の 3 種が訪れたが、個体数を比べると、トビイロケアリが最も多く、ハラクシケアリ隠蔽種群の約 3.4 倍、クロヤマアリ隠蔽種群の約 7.8 倍であった。一方、1 個体当たりの体に付着していたクロマメノキの花粉量 (1 個体当たりのリード数) を比べると、クロヤマアリ隠蔽種群が最も多く、ハラクシケアリ隠蔽種群の約 6.1 倍、トビイロケアリの約 9.8 倍であった。コケモモの場合でも、花に訪れたハラクシケアリ隠蔽種群の個体数は、トビイロケアリの約 1.3 倍であったが、1 個体当たりの体に付着していた花粉量を比べると、ハラクシケアリ隠蔽種群の方が多く、トビイロケアリの約 2.6 倍であった。したがって、1 訪花当たりの受粉貢献度は、アリの種によって異なることが予想される。アリの種による花粉量の違いには、体への付着のしやすさが関係しているかもしれない。

花冠に侵入したアリ類の滞在時間は、コケモモよりシラタマノキの方が長く、クロマメノキはその間に位置する傾向があった。これは、刺状突起が発達している

種の順番と一致していた (図-1)。一方、アリの種による滞在時間の違いは認められなかった。アリの滞在時間が長いほど、花の中でアリの体が刺状突起に触れ、花粉が葯から飛び出し、体に付着した花粉が、同じ花の雌しべの柱頭に付着する可能性も高くなると考えられる。したがって、アリの種によらず、アリ類の訪花によって自家受粉に最もなりやすい種は、シラタマノキで、次いで、クロマメノキ、コケモモの順であると考えられる。

4. クロマメノキ、コケモモ、シラタマノキの重要な花粉媒介者になりうる昆虫

本調査から得られた各昆虫種の訪花頻度 (花に訪れた個体数) と体の付着花粉量 (1 個体当たり) の結果に基づいて、各植物種の他家受粉と自家受粉に貢献しうる花粉媒介者について検討した結果を、以下に整理する。クロマメノキにとって、他家受粉を担う飛翔性昆虫として重要な種は、オオマルハナバチ (創設女王バチ・働きバチ・雄バチ)、コマルハナバチ (働きバチ)、クロマルハナバチ (働きバチ)、ミヤママルハナバチ (働きバチ)、シロオビホオナガスズメバチ、ツヤクロスズメバチ、ヤドリホオナガスズメバチで、自家受粉を担う徘徊性昆虫として重要な種は、トビイロケアリとハラクシケアリ隠蔽種群だと考えられる。

コケモモにとって、他家受粉を担う飛翔性昆虫として重要な種は、クロマルハナバチ (働きバチ) とミヤママルハナバチ (働きバチ) で、自家受粉を担う徘徊性昆虫として重要な種は、トビイロケアリとハラクシケアリ隠蔽種群だと考えられる。シラタマノキにとって、他家受粉を担う飛翔性昆虫として重要な種を特定することはできなかったが、自家受粉を担う徘徊性昆虫として重要な種は、トビイロケアリだと考えられる。

5. 花粉媒介者をめぐる競争

ハナバチ類の中には、限られた分類群のみに訪花する狭訪花性の種もいるが、多く種はさまざまな植物に訪花するジェネラリストである (多田内・村尾 2014)。そのため、特にハナバチ類を花粉媒介者として利用する植物種の間では、花粉媒介者をめぐる競争が発生しやすい (Campbell 1985; 多田内ら 2014)。したがって、このような競争が、クロマメノキ・コケモモ・シラタマノキの 3 種間で、あるいは、これら 3 種と他の種間で発生している可能性がある。

研究対象の 3 種の開花期は、調査を行った 2 年間

でおおむね同じであり、コケモモは6月上旬～6月下旬、クロマメノキは6月中旬～8月中旬、シラタノキは7月上旬～下旬であった。よって、コケモモとクロマメノキの開花期は6月中旬～下旬、クロマメノキとシラタノキの開花期は7月上旬～下旬に、それぞれ重なり合い、競争が発生しやすいと予想される。6月中旬に観察されたクロマルハナバチ(働きバチ)とミヤママルハナバチ(働きバチ)は、クロマメノキとコケモモの花を訪れ、これらの花粉を体に付着させていたことから、クロマメノキとコケモモの間には、この2種のマルハナバチをめぐる競争が発生しやすいと考えられる。7月に観察されたトビイロケアリは、クロマメノキとシラタノキを訪れ、これらの花粉を体に付着させていたことから、クロマメノキとシラタノキの間には、トビイロケアリをめぐる競争が発生しやすいと考えられる。しかし、両種とも他家受粉と自家受粉で種子生産ができる種であり、他家受粉を促進させるためには、むしろアリによる自家受粉が起らない方が都合はよい。よって、アリをめぐる競争は両種にとって不都合なことではないかもしれない。

次に、研究対象の3種以外で、飛翔性昆虫の体に付着していた花粉量が多かった植物種に着目すると、オオマルハナバチでは、クロマメノキの他に、アカマツ、ノリウツギ、ゴマギの花粉、クロマルハナバチでは、クロマメノキとコケモモの他に、ナナカマドの花粉、ナミホシヒラタアブでは、コケモモの他に、アカマツの花粉が、それぞれ確認された。これらの植物種が、研究対象の3種の花粉媒介者をめぐる競争種になりうると考えられる。このうち、アカマツは風媒花で、ノリウツギ、ゴマギ、ナナカマドは虫媒花である。

アカマツの花粉は、オオマルハナバチとナミホシヒラタアブの他に、少量ではあるが、クロマルハナバチとミヤママルハナバチの体からも検出された。アカマツの開花期は、4月から6月頃であり(中井ら 1983)、この時期に、花粉が大気中を飛散していると考えられる。飛翔中に、この花粉が体に付着した可能性もあるが、オオマルハナバチ(創設女王バチ)とナミホシヒラタアブの体に付着していたアカマツの花粉量は、それぞれクロマメノキとコケモモよりも多かった。このことから、オオマルハナバチ(創設女王バチ)とナミホシヒラタアブは、クロマメノキとコケモモの開花期と重なっている時期に、アカマツの花粉を利用していたと考えた方が妥当であろう。したがって、アカマツは風媒花ではあるが、クロマメノキとコケモモにとっては、花粉媒介者をめ

ぐる競争種になりうる可能性を指摘しておきたい。

虫媒花のノリウツギ、ゴマギ、ナナカマドのうち、ノリウツギとナナカマドは本調査地に隣接する森林限界(標高1670m)から森林帯にかけて数多く分布しており、ナナカマドについては、森林限界付近の高山帯にも、個体数は少ないが分布している。したがって、ノリウツギ、ナナカマド、クロマメノキ、コケモモの間には、花粉媒介者をめぐる競争が発生しやすいと考えられる。

6. 昆虫の体に付着した花粉のDNAメタバーコーディング解析の有効性

Pornon *et al.* (2016) は、フランス中央・ピレネー山脈のツツジ科Ericaceaeの一種(*Rhododendron ferrugineum*)が優占する亜高山群落で、マルハナバチ類を含むハナバチ類、ハエ類、チョウ類などの昆虫を捕獲し、その体に付着した花粉量をDNAメタバーコーディングを用いて分析を行った。その結果、これらの昆虫による花粉媒介に関与する植物種が特定できたこと、その植物種の数が現地で昆虫による訪花を直接観察した場合の2.5倍にも及んだことを報告している。さらに、DNAメタバーコーディングでは、新たな質的・量的情報が得られるため、昆虫と植物の花粉媒介をめぐる相互作用の多様な側面を解明する上で、大きな可能性を秘めている手法であると指摘している。

本研究でも、昆虫の体に付着した花粉のDNAメタバーコーディング解析によって、花粉の植物種の同定と花粉量を推定できた。それによって、その植物種ごとの花粉量から、各昆虫種が研究対象とするツツジ科小低木3種(クロマメノキ、コケモモ、シラタノキ)の花粉媒介へ果たす貢献度を評価できた。また、研究対象とする植物以外の花粉についても、体に付着した花粉の種を同定し、花粉量を推定できた。それによって、本調査地を含む周辺全体の植物群集の中で、対象とする昆虫(個体レベル、種レベル)が研究対象とする3種の花粉媒介にどの程度貢献しているのかを相対的に評価できた。

一方、エゾアカヤマアリはクロマメノキの花で捕獲されたものの、その花粉が体から検出されなかった。いずれの個体も、その花冠の中に潜り込んでいる個体を捕獲したため、体に花粉が全く付着していない可能性は極めて低いと考えられる。それにもかかわらず、アリの体から花粉が検出されなかった理由として、2つの可能性を挙げておきたい。1つ目は、アリの体に、花粉は付着していたが、何らかの理由で、花粉のDNAがPCR

で増幅されなかった可能性である。もう一つは、エゾアカヤマアリの体は花粉が付着しづらい構造や性質を持っていた可能性である。もし、アリの種にとって、そのような違いがあるならば、クロマメノキは、体に花粉が付着しやすい種を花粉媒介者として選んでいる可能性もみえてくる。今後、検証実験が必要である。

謝辞

本研究は長野大学里山再生学ゼミナール学生の皆様に調査をご協力いただいた。心より感謝申し上げます。

引用文献

- アリ類データベース作成グループ2008 (2008) 日本産アリ類画像データベース2008. <http://ant.miyakyo-u.ac.jp/J/>, 2024年1月18日最終閲覧
- Campbell DR (1985) Pollinator sharing and seed set of *Stellaria pubera*: competition for pollination. *Ecology* 66(2): 544–553
- Cane JH, Eickwort GC, Wesley FR, Spielholz J (1985) Pollination Ecology of *Vaccinium stamineum* (Ericaceae: Vaccinioideae). *American Journal of Botany* 72(1): 135–142
- Daubaras R, Cesoniene L, Zych M, Tamutis V, Stakėnas V (2017) Effect of forest clear cuts on plant–pollinator interactions: the case of three ericaceous subshrubs in Lithuanian pine forests. *Acta agrobotanica* 70(1): 1707
- Davis AN, Holloway PS, Kruse JJ (2002) Insect visitors and potential pollinators of lingonberries, *Vaccinium vitis-idaea* subsp. *minus*, in sub-arctic Alaska. XXVI International Horticultural Congress: Berry Crop Breeding, Production and Utilization for a New Century 64: 441–447
- Dorr LJ (1981) The pollination ecology of *Zenobia* (Ericaceae). *American Journal of Botany* 68(10): 1325–1332.
- Encinas-Viso F, Bovill J, Albrecht DE, Florez-Fernandez J, Lessard B, Lumbers J, Rodriguez J, Schmidt-Lebuhn A, Zwick A, Milla L (2023) Pollen DNA metabarcoding reveals cryptic diversity and high spatial turnover in alpine plant–pollinator networks. *Molecular Ecology* 32(23): 6377–6393
- Freitas L, Galetto L, Sazima M (2006) Pollination by hummingbirds and bees in eight syntopic species and a putative hybrid of Ericaceae in Southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 258: 49–61
- Galliot JN, Brunel D, Bérard A, Chauveau A, Blanchetête A, Lanore L, Farruggia A (2017) Investigating a flower–insect forager network in a mountain grassland community using pollen DNA barcoding. *Journal of Insect Conservation* 21: 827–837
- Hermann PM, Palser BF (2000) Stamen development in the Ericaceae. I. Anther wall, microsporogenesis, inversion, and appendages. *American Journal of Botany* 87(7): 934–957
- Hughes L (2000) Biological consequences of global warming: is the signal already apparent?. *Trends in Ecology & Evolution* 15(2): 56–61
- 井出 萌・芳賀由奈・高橋一秋 (2020a) 浅間山高山帯におけるツツジ科小低木の受粉様式 ―クロマメノキ・コケモモの人工受粉実験―. 長野大学紀要 41(3): 13–26
- 井出 萌・芳賀由奈・黒岩爽真・高橋香織・高橋一秋 (2020b) ツツジ科小低木の強制受粉実験: 浅間山高山帯の事例. 第131回日本森林学会大会講演要旨 P2-215. https://doi.org/10.11519/jfsc.131.0_790
- Jacquemart AL (1993) Floral visitors of *Vaccinium* species in the High Ardennes, Belgium. *Flora* 188: 263–273
- Jacquemart AL (1996) *Vaccinium uliginosum* L. *Journal of Ecology* 84(5): 771–785
- Kanda Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48(3): 452–458
- 環境省 (1981–2023) 国立・国定公園における植物の保護対策について (指定植物). https://www.env.go.jp/nature/np/plant_prot/index.html, 2024年1月16日閲覧
- 木野田君公・高見澤今朝雄・伊藤誠夫 (2013) 日本産マルハナバチ図鑑. 196pp. 北海道大学出版会, 札幌
- Kudo G (2014) Vulnerability of phenological synchrony between plants and pollinators in an alpine ecosystem. *Ecological Research* 29(4): 571–581
- Matsu 松浦 誠 (1988) スズメバチはなぜ刺すか. 312pp. 北海道大学図書刊行会, 札幌

- Memmott J, Craze PG, Waser NM, Price MV (2007) Global warming and the disruption of plant–pollinator interactions. *Ecology Letters* 10(8): 710–717
- Millenium Ecosystem Assessment (2005) *Ecosystems and human well-being: Synthesis*. Island Press, Washington, DC.
- Mirick S, Quinn JA (1981) Some observations on the reproductive biology of *Gaultheria procumbens* (Ericaceae). *American journal of botany* 68(10): 1298–1305
- 中井 勇・大畠誠一・真鍋逸平・藤本博次・加藤景生・赤井龍男(1983)マツ属の開花に関する研究 (I): クロマツとアカマツの開花期について. 京都大学農学部演習林集報 16: 66–76
- 中静 透(2015)気候変動に伴う生態系影響と適応. 森林環境 7–16.
- 根来 尚(1995)スズメバチはどんなハチ?. とやまと自然 18: 6–8
- 根来 尚(2002)立山高山帯室堂平周辺における訪花昆虫調査. 富山市科学文化センター研究報告 25: 23–39
- Nicol SC, McLachlan-Troup TA, McQuillan PB (2023) Pollination of *Richea dracophylla* (Ericaceae) and the role of the nocturnal ant *Notoncus hickmani* (Formicinae). *Austral Ecology* 48(8): 1762–1778
- Nuortila C, Tuomi J, Laine K (2002) Inter-parent distance affects reproductive success in two clonal dwarf shrubs, *Vaccinium myrtillus* and *Vaccinium vitis-idaea* (Ericaceae). *Canadian Journal of Botany* 80(8): 875–884
- Pornon A, Escaravage N, Burrus M, Holota H, Khimoun A, Mariette J, Pellizzari C, Iribar A, Etienne R, Taberlet P *et al.* (2016) Using metabarcoding to reveal and quantify plant–pollinator interactions. *Scientific Reports* 6: 27282
- Ronca S, Ford CS, Allanguillaume J, Szabo C, Kipling R, Wilkinson MJ (2023) The value of twinned pollinator–pollen metabarcoding: bumblebee pollination service is weakly partitioned within a UK grassland community. *Scientific Reports* 13: 18016
- Smith-Ramírez C, Martínez P, Nuñez M, González C, Armesto JJ (2005) Diversity, flower visitation frequency and generalism of pollinators in temperate rain forests of Chiloé Island, Chile. *Botanical Journal of the Linnean Society* 147(4): 399–416
- 曾根綾子(2006)立山高山帯におけるライチョウなどによる種子散布. 立山カルデラ研究紀要 7: 15–21.
- Stephens D (2012) Pollination ecology and the floral reward of *Vaccinium myrtilloides* and *V. vitis-idaea* (Ericaceae). University of Saskatchewan Master's Thesis
- 多田内修・村尾竜起(2014)日本産ハナバチ図鑑. 480pp. 文一総合出版, 東京.
- 多田内修・大石久志・鈴木まほろ(2014)日本産ハナバチ類と訪花性双翅目に関するインベントリーの現状と課題(<特集 1>ハナバチと訪花性双翅目の多様性研究の現状と課題). 日本生態学会誌 64(1): 27–35
- 高橋一秋・高橋香織(2019)浅間山高山帯におけるツツジ科小低木の開花・結実フェノロジーと果実特性—ガンコウラン・クロマメノキ・シラタマノキ・コケモモ—. 長野大学紀要 41(1): 49–56
- Takahashi K, Takahashi K (2022) Alpine ericaceous dwarf shrubs as summer food resources for Asiatic black bears in Japan. *Ursus* 33: 1–15
- 寺山 守・久保田敏・江口克之(2014)日本アリ類図鑑. 278pp. 朝倉書店, 東京.
- 寺山 守・久保田敏(2018)アリハンドブック 増補改訂版. 88pp. 文一総合出版, 東京.
- Zhongjian L, Lijun C, Kewei L, Liqiang L, Xueyong M, Wenhui R (2008) *Chenorchis*, a new orchid genus, and its eco-strategy of ant pollination. *Acta Ecologica Sinica* 28(6): 2433–2444