

博士論文

ゴミムシダマシ類における
オス間闘争が繁殖生態に及ぼす
影響

令和 8 年 3 月

松浦輝尚

岡山大学大学院

環境生命自然科学研究科

博士論文

ゴミムシダマシ類におけるオス間闘争が繁殖生態に及ぼす影響

令和八年 三月 松浦輝尚

目次

第1章 序論

第2章 性的二型と闘争結果による交尾器の挿入時間、産卵数、孵化数への影響

第3章 闘争結果によるメスの受精嚢内の精子数への影響

第4章 闘争結果におけるオスの貯精嚢内の精子数への影響

第5章 日本のゴミムシダマシ3種における性的二型

第6章 総合考察

摘要

謝辞

本研究の公表論文

引用文献

第1章 序論

ダーウィンが提唱した性選択は、繁殖に有利な形質が進化するという概念であり (Darwin 1871)、今日まで多くの研究者によって研究されてきた。性選択には、異性間選択と同性内選択の2つがある。異性間選択とは、ある性が、特定の形質をもつ異性を選好することであり、例えば、コクホウクジャク (*Euplectes progne*) のオスの長い尾羽 (Andersson 1982)、スゲヨシキリ (*Acrocephalus schoenobaenus*) の複雑なさえずり (Catchpole 1980; Catchpole et al. 1984) によってメスにアピールする。一方、同性内選択とは、同性間で異性を巡って競争することであり、主にオスがメスの卵の受精を巡って競争する場合が多い。このオスがメスを巡る競争は、しばしばオス同士の身体的な攻撃を伴う闘争 (オス間闘争) に発展する。

オス間闘争はオスの勝敗を決定し、受精機会を得るだけでなく、オスのその後の繁殖戦略にも影響を及ぼす。例えば、闘争結果はその後の攻撃行動・探索行動に影響する (Hsu and Wolf 2001; Bacué-Cazenave et al. 2017)。多くの動物種において、前回の闘争で勝利したオスは次回の闘争でより攻撃的になり、勝利しやすくなる。一方、敗北したオスは次回の闘争では逃走行動を示しやすくなり、再び敗北しやすくなる (Hsu et al. 2006)。また、ザリガニ

(*Procambarus clarkii*) では、勝者オスは実験エリアを全体的に探索するのに対して、敗者オスは暗い場所にとどまる行動が確認されている (Bacué-Cazenave et al. 2017)。さらに、闘争結果は精子特性や適応度にも影響を及ぼすことが知られている (Okada et al. 2010; Tunı et al. 2016; Bartlett et al. 2017; Filice and Dukas 2019)。これらの闘争結果による繁殖戦略への影響は、それぞれの種の繁殖生態と関連していると示唆されている (Tunı et al. 2016)。しかし、闘争結果がオスの行動、精子特性、適応度に及ぼす影響を調べた研究は特定の種に限られている (but see Tunı et al. 2016; Filice and Dukas 2019)。

本研究で用いたジャイアントミルワーム (*Zophobas atratus*) は、家畜やペットの飼料として注目されており、大量飼育および累代飼育の手法が確立されている (Rumbos and Athanassiou 2021)。また、本種のオス間闘争では、他の動物種ではあまり見られないオス同士がライバルオスの後脚を大顎で噛み合う闘争 (脚噛み闘争) が観察されている。本研究では、ジャイアントミルワームの性的二型、月齢、体サイズが繁殖に及ぼす影響を調べるとともに、脚噛み闘争の結果が交尾持続時間、精子数、および適応度に及ぼす影響を明らかにし、この脚噛み闘争の適応的意義を解明することを目的とした。

本学位論文の第2章では、ジャイアントミルワームの基本的な生態を調べるとともに、性的二型を明らかにし、闘争結果が交尾器の挿入時間、産卵数、孵化数に及ぼす影響を調べた。その結果、敗者オスと交尾したメスは、未闘争オスと交尾したメスと比較して、産卵数および孵化数が有意に減少することが明らかになった。そこで第3章では、各オスと交尾したメスの受精嚢内に貯蔵されている精子数を比較した。さらに第4章では、これまで交尾後のメスに貯蔵されている精子数を計測してきたが、交尾前におけるオスの貯蔵精子数に対する闘争結果の影響を調べた。最後に第5章では、ゴミムシダマシの繁殖生態学的な知見は豊富な種数に対して、非常に限られているため、日本のゴミムシダマシ3種において、交尾相手の探索と把握に重要である脚の繁殖形質を調べた。

第2章 性的二型と闘争結果による交尾器の挿入時間、産卵数、孵化数への影響

はじめに

多くの生物において、雌雄間で異なる性的二型が観察されている。性的二型は主に、武器形質と装飾形質に分けられる。装飾形質とは、ある性が特定の形質をもつ異性を選好する異性間選択に用いられる形質であり、鳥類の羽などが挙げられる (Andersson 1982)。一方、武器形質とは、同性内で異性を巡る競争に用いられる形質であり、シカやカブトムシの角、クワガタムシの大顎、シオマネキの鋏などが知られている (Emlen 2008)。武器形質は種によって多種多様であり、これは生息環境や闘争様式の違いによるものと推測されている (Emlen 2008 ; de la Cámara et al. 2023)。

また、闘争は勝敗を決定するだけでなく、その後の繁殖戦略にも影響を及ぼす。例えば、ゴミムシダマシ科のオオツノコクヌストモドキ (*Gnatocerus cornutus*) では、闘争に勝ったオスは次の闘争に勝ちやすくなり、敗者オスは負けやすくなることが知られている (Okada et al. 2010)。しかし、敗者オスはメスと交尾する際、未闘争オスや勝者オスと比べて多くの精子を移送することが報告されている (Okada et al. 2010)。また、コオロギ (*Gryllus bimaculatus*) では、勝者オスは敗者オスと比べて、生存率が低く質の悪い精子を含む精包をメスに渡すことが明らかになっており、さらに敗者と勝者間で子孫数に差がないことも示されている (Tuni et al. 2016)。このような敗者オスによる精子量増加戦略は、メスや縄張りを獲得できず交尾機会が減少することへの適応である一方、勝者オスでは交尾機会の増加が見込まれるため、メス一頭あたりへ投資する精子生産エネルギーを節約している可能性が示唆されている。しかし、闘争結果がその後の繁殖戦略や適応度にどのような影響を与えるのかを検証した研究は限られている (but see Tuni et al. 2016; Filice and Dukas 2019)。

甲虫類のゴミムシダマシ科では、種間で形態が多様であり、性的二型も様々である。例えば、オスの武器形質である大顎が発達しているオオツノコクヌストモドキや、角が発達したファンガスフォークドビートル (*Bolitotherus cornutus*)、武器形質ではないものの、闘争や交尾に有利とされる脚が発達しているナミブゴミムシダマシ (*Onyriacris plana*) などが報告されている (Enders et al. 1998)。それに伴い、オス同士の闘争様式も異なり、ファンガスフォークドビートルでは角を用いた押し合い、オオツノコクヌストモドキでは大顎による掴み合い、ナミブゴミムシダマシでは脚で体を支えながら頭部で押し合う闘争が行われる (Benowitz et al. 2012, Okada et al. 2006, Enders et al. 1998)。

本研究で対象とするジャイアントミルワームのオスは、オス同士で後脚を噛み合う闘争を行うことが知られている。本種における脚噛み闘争は大顎を用いて行われるが、大顎が性的二型形質であるかどうかは明らかにされておらず、さらに他の身体部位における性差についても明らかではない。

また、著者の予備観察により、闘争後の敗者オスが後脚で十分に踏ん張ることができず、交

尾器をメスに挿入しにくそうにする交尾行動が確認されている。しかし、脚噛み闘争の結果が、オスの交尾持続時間や適応度（産卵数と孵化数）にどのような影響を及ぼすのかについては、これまで検証されていない。

そこで本研究では、ジャイアントミルワームにおける大顎を含む全身の性差を定量的に評価し、本種の性的二型を明らかにすることを目的とした。加えて、闘争結果が交尾持続時間、産卵数および孵化数に及ぼす影響を検証した。さらに、本種の基礎的な生態に関する知見が限られていることから、月齢による闘争時間、交尾持続時間、産卵数および孵化数の変化、ならびにオス同士の体サイズ差が闘争時間に及ぼす影響についても併せて調査した。

本研究では、後脚を噛まれたため闘争に敗北したオスは交尾が上手くできず、交尾持続時間、産卵数および孵化数が未闘争オスと比較して減少する、という仮説を立てた。

材料および方法

供試虫および飼育条件

本研究ではジャイアントミルワームは国内ブリーダー（Pro Worm, Tokyo）から購入し、岡山大学で1年間累代飼育した個体を用いた。幼虫期では、1グループ500匹で集団飼育を行い、エサは水分補給と食物繊維の摂取のための生のニンジンとタンパク質源（Park et al. 2024）として熱帯魚のエサ（Neopros; Kyorin, Himeji）を与えた。幼虫は隔離処理を行わなければ、蛹化せず成虫を得られなくなるため（Rumbos and Athanassiou 2021）、エサがない条件下で個別飼育した。また、幼虫の体重が300 mgから蛹化が可能になるため（Quennedey et al. 1995）、今回の実験では400 mg以上の幼虫を隔離した。幼虫、蛹、成虫飼育は明暗条件が16:8L:D、温度条件が $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度条件が60-70%で行った。

計測部位とその計測方法

成虫は未交尾のまま冷凍処理（ -18 から -24°C ）を行い、計測した（オス：n=38，メス：n=53）。計測部位は左右の触角長、頭部長と幅（前部、中部、後部）、左右の大顎長と幅、左右の大顎の歯幅、左右の小顎長、左右の下唇枝長、前胸部長と幅（前部、中部）、鞘翅長と幅である（図 2.1）。これらの部位はデジタルカメラ（DP23, Tokyo）が付属した立体顕微鏡（SZX10, Olympus, Tokyo）で撮影し、0.001 mm 単位で付属の計測ソフトウェア（DP23, Olympus; Tokyo）で計測した。

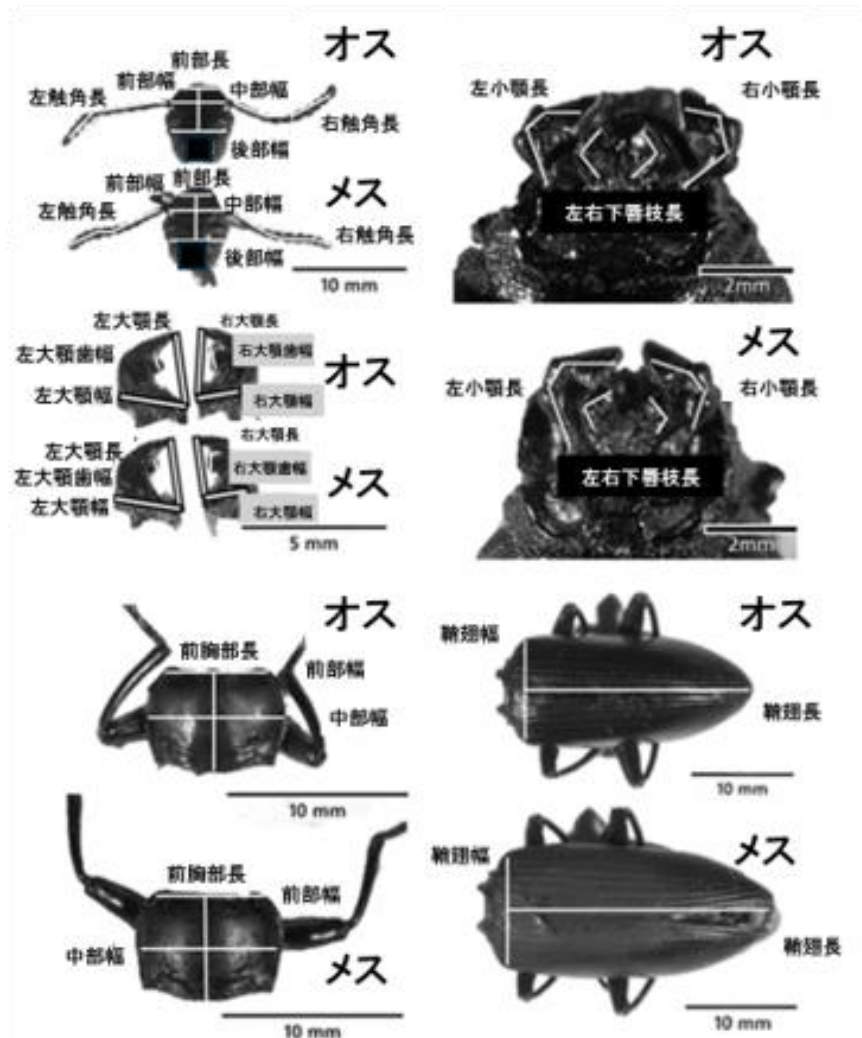


図 2.1 性的二型に関する測定部位。白線は測定した部位を示す。頭部長は前頭部幅の midpoint から後頭部幅の midpoint までの距離。前胸部長は前胸部前部幅の midpoint から前胸の末端までの距離。鞘翅長は鞘翅幅の midpoint から上翅の末端までの距離。

闘争実験

本実験で使われた成虫は蛹化から個別飼育（3と4か月間）を行った。エサは幼虫期と同様に生のニンジン（約0.5 g）と熱帯魚のエサ（約0.05 g）を与えた。個別飼育と闘争実験の明暗、温度、湿度条件は幼虫の飼育条件と同じ条件下で行った。

闘争実験はプラスチック容器（156×149×65 mm；As One, Osaka）にろ紙（Advantec, Tokyo）を敷き、オスを同居させた。敗者の定義は闘争中に逃走し、その直後の攻撃に対しても逃走行動を示した場合とした。この行動を目視で観察し、闘争時間を計測した。

本実験では最初に、体サイズの代替として前胸部幅を採用し、異なる体サイズ同士の闘争（ $0.25\text{ mm} \leq \text{前胸部幅}$ ）と同じ体サイズ同士の闘争（ $0 \leq \text{前胸部幅} \leq 0.2\text{ mm}$ ）を観察した。闘争実験に用いたオスの体サイズは7.05-8.05 mm（同サイズ同士の闘争）と、6.95-10.0 mm（異なるサイズ同士の闘争）である。オス体サイズは、デジタルノギス（CD-10APX, Mitutoyo, Kanagawa）を用いて測定した。また、オスの月齢は3か月と4か月を用意し、どの闘争グループでも同じ月齢同士で闘争させた。

交尾実験

交尾実験には、上記と同一の飼育条件下で3と4か月間、個別飼育した個体を用いた。交尾実験の雌雄ペアは、未闘争オス（ $n=31$ ）と未交尾メス（ $n=31$ ）、勝者オス（ $n=36$ ）と未交尾メス（ $n=36$ ）、敗者オス（ $n=37$ ）と未交尾メス（ $n=37$ ）の3条件とした。なお、勝者オスおよび敗者オスは、同サイズ同士の闘争由来の個体と、異なるサイズ同士の闘争由来の個体の両方を用いた。未交尾メスは、交尾器挿入時間、産卵数および孵化数への影響を考慮し、前胸部幅が7.0-8.0 mmの個体を使用した。オスと同様にメスの体サイズもデジタルノギス（CD-10APX, Mitutoyo, Kanagawa）を用いて測定した。

交尾実験は、闘争の決着から24時間後に実施した。実験は、闘争実験と同様のプラスチック容器およびろ紙を用い、飼育条件と同一の温度・湿度条件下で行った。交尾実験は90分間行い、目視により交尾器の挿入を観察し、挿入の合計時間を計測した。

産卵数および孵化数を計測するため、90分間の交尾実験終了直後にメスをプラスチックカップ（130 × 60 mm, Sanyo; Tokyo）へ移し、足場および産卵床として折ったペーパータオル（Clinpet Japan; Sanyo）を敷き、15日間の個別飼育を行った。ペーパータオルは3日に1度交換し、その都度、産卵数を計測した。ペーパータオルに卵が付着していた場合は、新しいプラスチックカップに移し、すべての卵が孵化するか、または腐敗するまで毎日確認し、孵化した幼虫はその都度取り除いた。なお、産卵および孵化の計測期間中にメスが死亡した場合は、その個体の計測を中断し、統計解析から除外した。

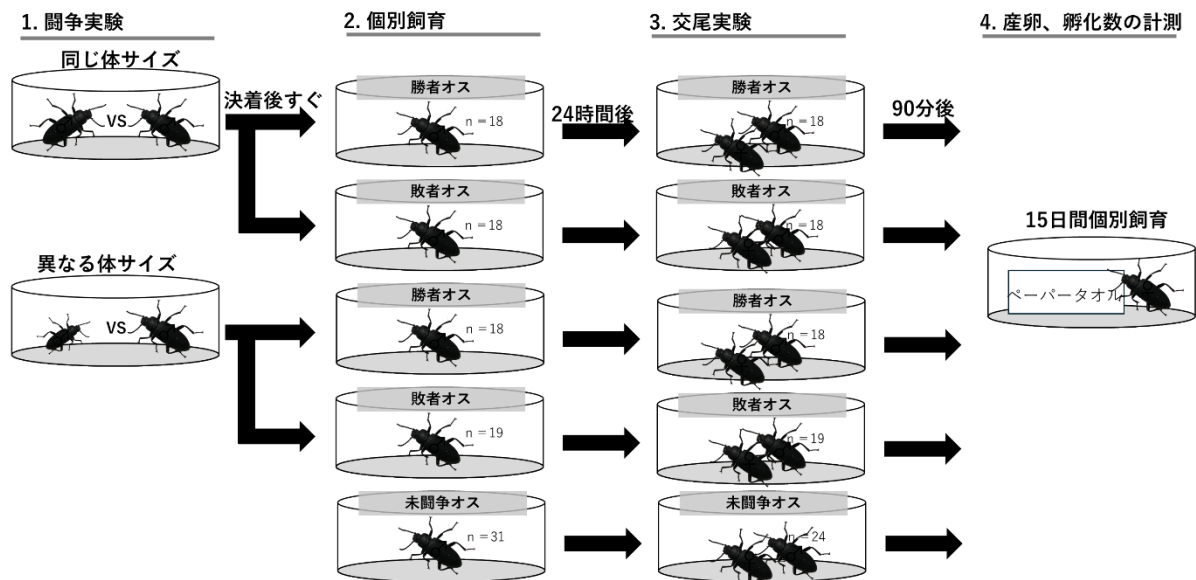


図 2.2 実験デザイン。闘争実験：オスは2つの異なるペアで闘争を行い、その闘争時間を測定した。ペアは体サイズが同じ場合（図の上段）と、体サイズが異なる場合（図の下段）に分けられる。闘争終了後の24時間後に交尾実験を行った。交尾実験：各ペア（勝者とメス、敗者とメス、未闘争とメス）について交尾行動を観察し、交尾器の挿入時間を測定した。交尾実験後、雌は新しい容器に移し、個体ごとに飼育した。産下された卵数は3日ごとに計数し、孵化数は毎日記録した。産卵数およびそれらの卵の孵化数（15日間）を記録した。

統計解析

性的二型の計測には、応答変数には各計測形質を、説明変数には性（雄・雌）を設定し、多変量共分散分析（MANCOVA）を用いた。共変量には前胸部中部幅を使用した。闘争時間、交尾器挿入時間、産卵数および孵化数の解析には、R package *glmmTMB* を用いて一般化線形モデル（GLM）を構築した（表 2.1）。

各 GLM の応答変数には、闘争時間、交尾器挿入時間、産卵数、または孵化数を設定した。説明変数には、オス同士の体サイズ差（闘争時間の GLM のみ）、オスの形質（異なる闘争グループに由来する勝者オス、敗者オス、または未闘争オス）、および月齢を含めた。闘争時間および交尾器挿入時間はガンマ分布に従うと仮定した。産卵数および孵化数については、R package *performance* を用いて過分散およびゼロ過剰の有無を確認した後、ゼロ過剰モデルを適用した。

すべての GLM における事後検定には、R package *multcomp* を用い、ボンフェローニ補正を行った。すべての統計解析は R ソフトウェア（ver. 4.5.1）で実施し、有意水準は $p < 0.05$ とした。

表 2.1 闘争時間、交尾時間、産卵数、孵化数を比較するために用いた一般化線形モデル（GLM）

モデル名	応答変数	分布	リンク関数	説明変数
GLM1	闘争時間	ガンマ	Log	闘争グループ（異なるサイズと同じサイズ）＋月齢
GLM2	交尾器挿入時間	ガンマ	Log	闘争結果（異なるサイズ同士の闘争の勝者と敗者、同じ体サイズ同士の闘争の勝者と敗者、未闘争）＋月齢
GLM3	産卵数	ゼロ過剰	Log	闘争結果（異なるサイズ同士の闘争の勝者と敗者、同じ体サイズ同士の闘争の勝者と敗者、未闘争）＋月齢
GLM4	孵化数	ゼロ過剰	Log	闘争結果（異なるサイズ同士の闘争の勝者と敗者、同じ体サイズ同士の闘争の勝者と敗者、未闘争）＋月齢

結果

性的二型

オスがメスと比べて有意に大きかった部位は頭部の前部幅と中部幅、頭部長、左大顎長、右大顎幅、左右の大顎歯幅であった（表 2.2）。一方メスがオスと比べて有意に大きかった部位は左下唇枝長と鞘翅幅である（表 2.2）。また雌雄差がなかった部位は頭部後部幅、左右の触角

長、左大顎の幅、右大顎長、左右の小顎長、右下唇枝長、中胸部前部幅、前胸部長、鞘翅長であった（表 2.2）。

表 2.2 *Z. atratus* の各形質（オスとの比較）に対する MANCOVA の結果。

計測部位	性別	係数	SE	自由度	<i>t</i>	<i>p</i>
頭部前部幅	メス	-0.173	0.0213	88	-8.115	<.0001
頭部中部幅	メス	-0.0921	0.0244	88	-3.773	0.0003
頭部後部幅	メス	0.00369	0.0258	88	0.143	0.8864
頭部長	メス	-0.201	0.0499	88	-4.023	0.0001
左触角長	メス	-0.044	0.0938	88	-0.469	0.6403
右触角長	メス	0.0187	0.102	88	0.184	0.8547
左大顎幅	メス	-0.0227	0.0221	88	-1.031	0.3054
右大顎幅	メス	-0.0632	0.0203	88	-3.114	0.0025
左大顎長	メス	-0.0584	0.0267	88	-2.185	0.0315
右大顎長	メス	-0.0343	0.0243	88	-1.412	0.1615
左大顎歯幅	メス	-0.049	0.01	88	-4.888	<.0001
右大顎歯幅	メス	-0.141	0.0147	88	-9.597	<.0001
左小顎長	メス	0.027	0.0283	88	0.954	0.3425
右小顎長	メス	-0.0298	0.0312	88	-0.955	0.3421
左下唇枝長	メス	0.0458	0.0174	88	2.629	0.0101
右下唇枝長	メス	0.0313	0.0163	88	1.913	0.0591
中胸部前部幅	メス	0.0345	0.0386	88	0.895	0.3734
前胸部長	メス	-0.0351	0.0535	88	-0.657	0.5131
鞘翅幅	メス	0.249	0.0561	88	4.449	<.0001
鞘翅長	メス	0.191	0.27	88	0.707	0.4816

闘争実験

同サイズ同士の闘争は、異なるサイズ同士の闘争と比較して有意に長く継続した（ $p = 0.008$ ；図 2.3）。同サイズ同士の闘争で敗北したオス 37 個体のうち、後脚の符節および顎節の欠損が認められたのは 2 個体のみであった。なお、3 組のペアでは 3 時間観察しても闘争の決着がつかなかったため、解析から除外した。

すべての闘争において、敗者は勝者よりも体サイズが小さかった。また、月齢の増加に伴い闘争時間が増加する傾向が認められたが、有意な効果は検出されなかった（ $p = 0.835$ ；図 2.4）。

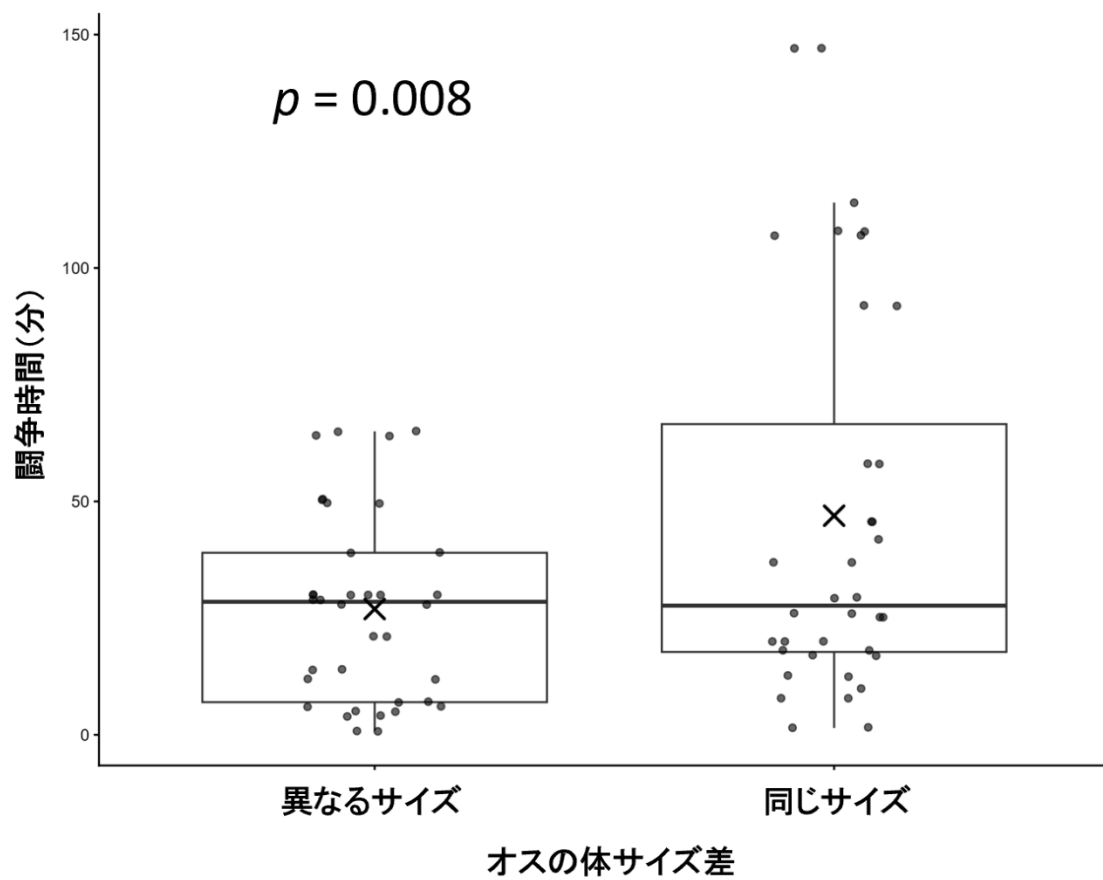


図 2.3 体サイズが同じペア（雄間の体サイズ差が ≤ 0.2 mm と定義）と、体サイズが異なるペア（雄間の体サイズ差が ≤ 0.25 mm と定義）における闘争時間の比較。各グラフ中の「×」印は平均値を示す。

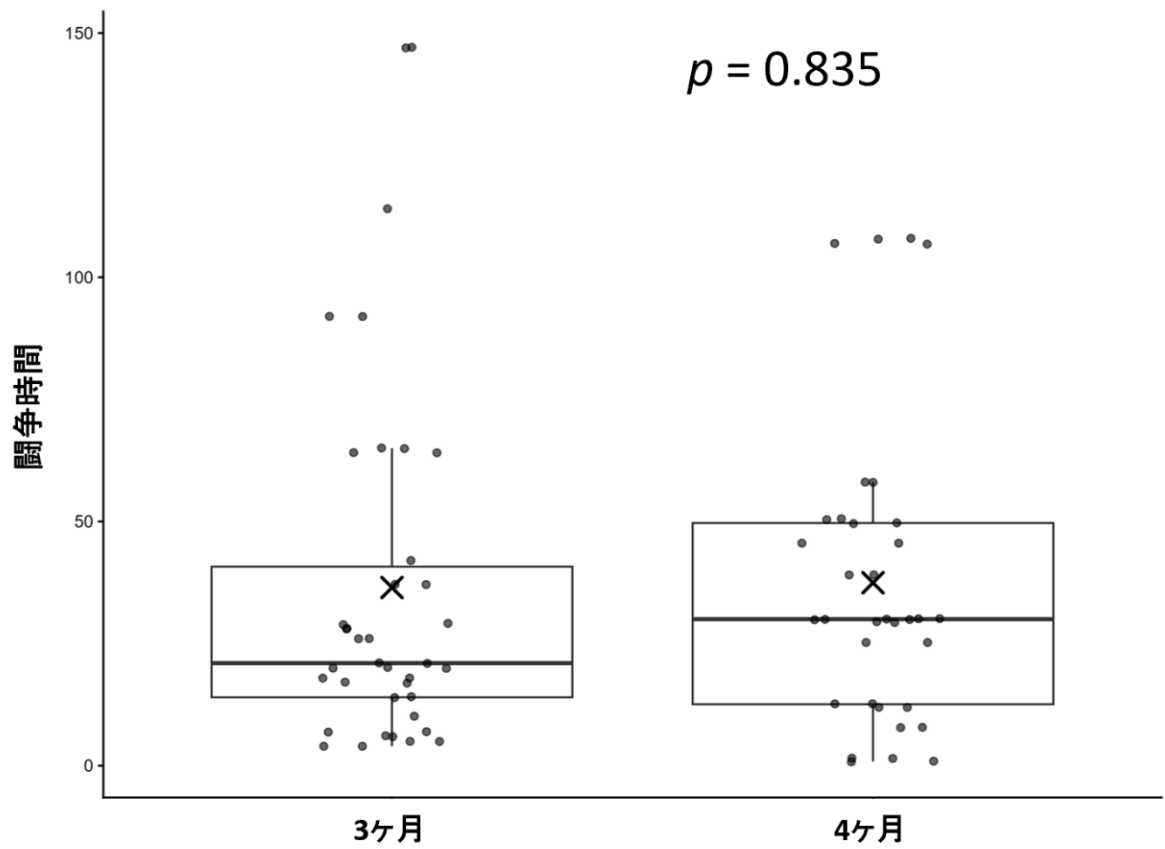


図 2.4 月齢が 3 か月ペアと 4 か月ペアにおける闘争時間の比較。各グラフ中の「×」印は平均値を示す。

交尾実験

未闘争オス (U) 、同じ体サイズ同士の闘争の勝者 (SW) と敗者 (SL)、異なるサイズ同士の闘争の勝者 (DW) と敗者 (DL) の全てのオス間で交尾器挿入時間は有意な差は見られなかった (U-SW $p = 1.000$, U-SL $p = 0.657$, U-DW $p = 1.000$, U-DL $p = 0.098$, SW-SL $p = 1.000$, SW-DW $p = 1.000$, SW-DL $p = 1.000$, SL-DW $p = 1.000$, SL-DL $p = 1.000$, DW-DL $p = 1.000$) (図 2.5)。また、月齢の増加は交尾器挿入時間が有意に増加した ($p < 0.001$; 図 2.8)。

産卵数は同サイズ同士の闘争の敗者は全てのオスと比べて、有意に減少していた (SL-U $p = 0.002$, SL-SW $p = 0.011$, SL-DW $p < 0.001$, SL-DL $p = 0.003$) (図 2.6)。その他のオスの組み合わせでは有意な差はなかった (U-SW $p = 1.000$, U-DW $p = 1.000$, U-DL $p = 1.000$, SW-DW $p = 1.000$, SW-DL $p = 1.000$, DW-DL $p = 1.000$) (図 2.6)。また、月齢の増加は産卵数を有意に増加させた ($p = 0.019$; 図 2.8)。

孵化数は同サイズ同士の闘争の敗者は全てのオスと比べて、有意に減少していた (SL-U $p = 0.002$, SL-SW $p = 0.008$, SL-DW $p = 0.001$, SL-DL $p = 0.005$) (図 2.7)。その他のオスの組み合わせでは有意な差はなかった (U-SW $p = 1.000$, U-DW $p = 1.000$, U-DL $p = 1.000$, SW-DW $p = 1.000$, SW-DL $p = 1.000$, DW-DL $p = 1.000$) (図 2.7)。また、月齢の増加は孵化数を増加させたが有意ではなかった ($p = 0.325$; 図 2.8)。

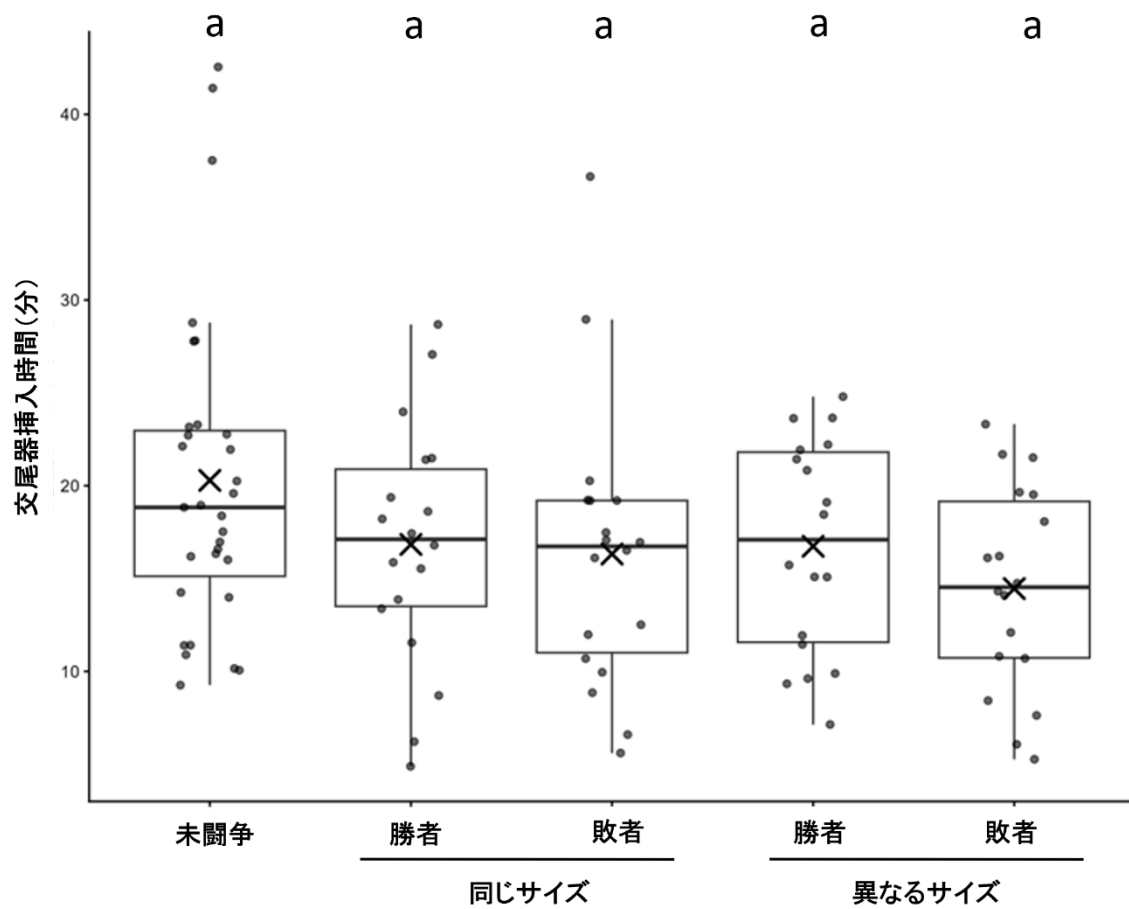


図 2.5 体サイズが同じ闘争ペア（雄間の体サイズ差が ≤ 0.2 mm と定義）の勝者・敗者オスと、体サイズが異なる闘争ペア（雄間の体サイズ差が ≥ 0.25 mm と定義）の勝者・敗者オスにおける交尾器挿入時間の比較。各グラフ中の「×」印は平均値を示す。

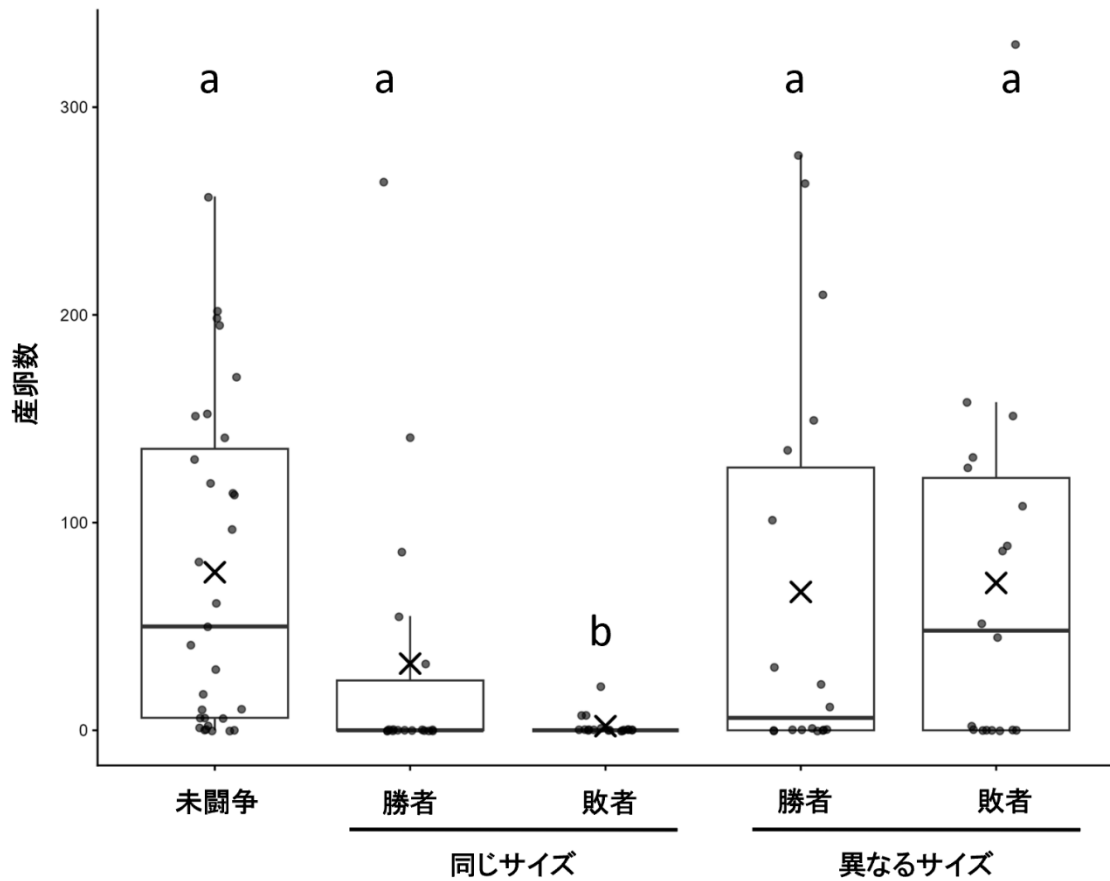


図 2.6 体サイズが同じ闘争ペア（雄間の体サイズ差が ≤ 0.2 mm と定義）の勝者・敗者オスと、体サイズが異なる闘争ペア（雄間の体サイズ差が ≥ 0.25 mm と定義）の勝者・敗者オスにおける産卵数の比較。各グラフ中の「×」印は平均値を示す。

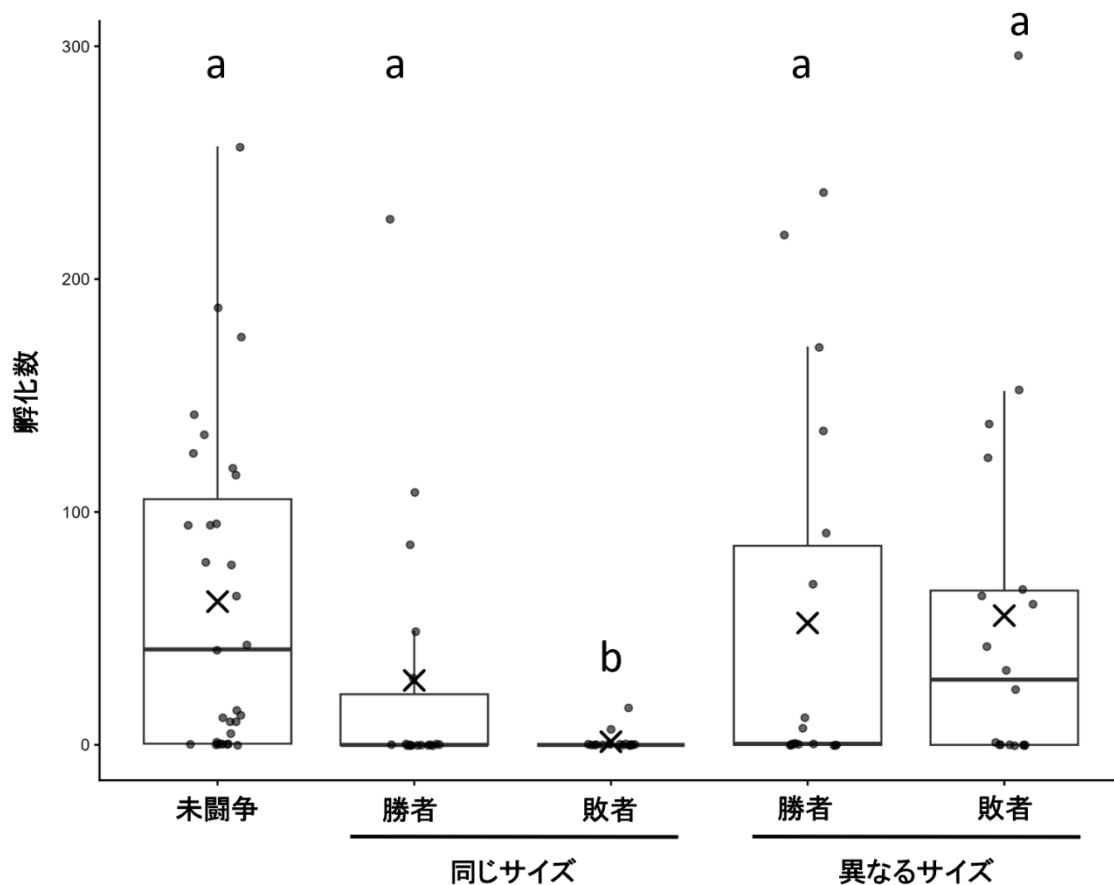


図 2.7 体サイズが同じ闘争ペア（雄間の体サイズ差が ≤ 0.2 mm と定義）の勝者・敗者オスと、体サイズが異なる闘争ペア（雄間の体サイズ差が ≥ 0.25 mm と定義）の勝者・敗者オスにおける産卵数の比較。各グラフ中の「×」印は平均値を示す。

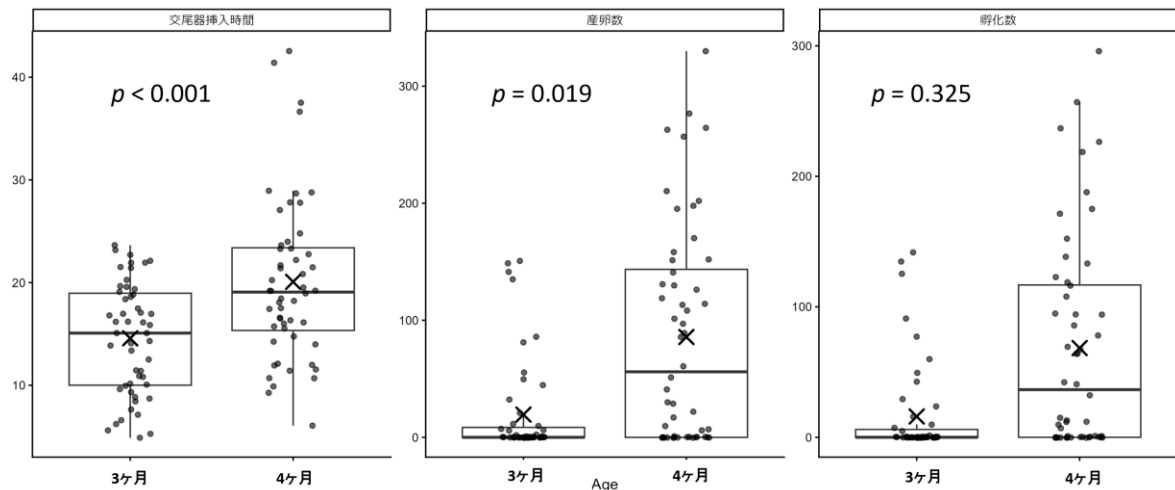


図 2.8 月齢が 3 か月ペアと 4 か月ペアにおける闘争時間の比較。各グラフ中の「×」印は平均値を示す。

考察

交尾実験において、仮説に反して、後脚を欠損したオスであってもメスに交尾器を挿入することが可能であり、交尾器挿入時間については、いずれのグループ間でも有意な差は認められなかった (図 2.5)。しかし、産卵数は、SL オスと交尾したメスはどのオス由来のメスと比べても有意に減少した (図 2.6)。さらに、孵化数も、同様に SL オスと交尾したメスは有意に減少した (図 2.7)。これらの結果は、以下の 2 つの要因によって説明される可能性がある。第一に、激化したオス同士の闘争により後脚を損傷したオスでは、その影響により交尾器の挿入に不具合が生じた可能性である。第二に、隠れたメスの選択 (cryptic female choice ; Eberhard 1996) が関与している可能性である。

一般に、オス同士の体サイズが同程度である場合、オス間闘争は激化することが知られている (例 : Miyatake 1993 ; Enders et al. 1998 ; Tedore and Johnsen 2015 ; Chen et al. 2020)。本実験においても、同サイズ同士のペアで闘争時間が有意に増加し、オス間闘争の激化が確認された (図 2.3)。さらに、SL オスは未闘争オスとは異なる交尾姿勢を示すことが多かった。このことは、オスの交尾器がメスに挿入されていたとしても、精子 (あるいは精包) がメスの生殖器内の適切な位置へと正しく移送されていない可能性を示唆している。今後の研究では、メス体内に挿入された精子数を定量的に評価する必要がある。

複数のオスと交尾する交尾様式をもつ種では、隠れたメスの選択 (cryptic female choice) が生じる可能性がある。*Z. atratus* のメスにおいて異なるオスとの複数回交尾はこれまで観察されていないものの、Tenebrionidae 科の *Tribolium castaneum*、*Tenebrio molitor*、*B. cornutus*、*G. cornutus*、*Onymacris unguicularis* などの種では、メスが複数のオスと交尾することが報告されている (de Villiers and Hanra 1991 ; Conner 1995 ; Fedina and Lewis 2008 ; Okada et al. 2015)。したがって、*Z. atratus* においても複数回交尾が生じている可能性があり、本種における潜在的メス選択の存在が示唆される。

T. castaneum のメスでは、精包内に注入される精子量の調節や、交尾直後の精包の排出といった隠れたメスの選択が確認されている (Fedina 2007)。そのため、本種のメスにおいても、生殖器内へ輸送される精子量を調節している可能性が考えられる。しかし、この効果が後脚の損傷によるものなのか、あるいはメスの選好性によるものなのかは明らかではない。また、この適応度の低下がどの程度の期間持続するのかについても不明であるため、今後はこの適応度低下の機構を解明する必要がある。

Z. atratus のオスはクワガタのような誇張された大顎をもたない。このような違いはなぜ生じるのだろうか。一般に、同種オス間でメスや縄張りをめぐる闘争が起こる場合、武器として用いられる誇張形質が進化し、それらの武器を用いて競争能力の高い個体が不釣り合いに高い受精成功を得ると考えられている (Emlen 2008)。この武器形質は、闘争行動 (Caro et al. 2003) や生息環境 (Butler et al. 2007 ; de la Cámara et al. 2023) などの要因によって、形態やサイズが変化すると示唆されている。本研究では、*Z. atratus* において、前額部幅、頭部中央幅、頭部長、左大顎長、左大顎歯幅、右大顎幅、右大顎歯幅に性的二型が認められた。脚噛み闘争を行うナミビア産 Tenebrionidae の *O. plana* における性的二型を調べた先行研究では、大顎は調査対象とされておらず (Enders et al. 1998)、また *O. plana* は発達した大顎を有していない。*Z. atratus* において観察された雌雄間の形態差は、オスの脚噛み行動への適応である可能性が考えられるが、武器形質を形成する要因は、本種オスの闘争行動とも関連している可能性がある (Caro et al. 2003)。

武器形質の形状は生息環境によっても変化する (Emlen 2008 ; de la Cámara et al. 2023)。*Z. atratus* は屋根裏の柱や瓦の下に生息することが知られている (Tschinkel 1981)。このような環境条件により、本種では、クワガタムシ類に見られるような大型で長い大顎ではなく、閉鎖的または狭隘な空間に適した幅広い大顎が進化した可能性がある。

Z. atratus では、メスの左下唇枝長がオスよりも長かった。Tenebrionidae 科において下唇枝に関する報告は見当たらないが、モモシンクイガ *Carposina sasakii* Matsumura (チョウ目：シンクイガ科) では、下唇枝が産卵に適した場所を探索する機能をもつことが報告されている (Chen and Hua 2016)。*Z. atratus* においても、下唇枝が産卵場所の探索に関与している可能性がある。また、メスの鞘翅幅に見られた性的二型は、より多くの卵を産むための適応である可能性が高い。

Z. atratus のオスは、他のオスの後脚を噛むことで競争相手の適応度を低下させる。本研究では、同サイズ同士のオスによる激化した闘争において、敗者オスの適応度低下が観察された。本実験は、脚噛み闘争における敗者オスと他のオスの間に、適応度の明確な差が存在すること

を示した。しかし、敗者オスの適応度が低下する直接的な原因については、本研究の結果からは明らかではない。したがって、今後は噛み傷と適応度との関係や、隠れたメスの選択の可能性を検証するなど、さらなる実験が必要である。

さらに、ゴミムシダマシ科は種多様性が高く (Kergoat et al. 2014)、性的二型の様式も非常に多様である (Conner 1995 ; Enders et al. 1998 ; Okada et al. 2015 ; Vendl et al. 2018)。例えば、発達した大顎をもつ *G. cornutus* や、顕著な角をもつ *B. cornutus* のような種が存在する。このことから、ゴミムシダマシ科は性的二型の多様性を研究する上で極めて適した分類群であり、本研究の結果は、その理解に重要な知見を提供するものと考えられる。

第3章 闘争結果によるメスの受精嚢内の精子数への影響

はじめに

メスとの交尾機会につながる縄張りをめぐるオス同士の身体的闘争（性選択の種内競争）は、多くの動物種で観察されており、数十年にわたって多くの研究者によって研究されてきた。闘争の結果は、その後のオスの繁殖戦略に影響を及ぼす。その代表的な例が勝者一敗者効果（winner-loser effect）である。過去の闘争に勝利したオスは、その後の闘争に積極的に参加するようになり、再び勝利する確率が高くなる（勝者効果）。一方、過去の闘争に敗北したオスはより消極的になり、再び敗北する確率が高くなる（敗者効果）。これらの効果はホルモンによって柔軟に調節されており、個体が過去の闘争結果に基づいて自身の闘争能力を評価し、それに応じて次の闘争への参加を決定することで生じると考えられている（Hsu et al. 2006 ; Earley et al. 2013）。

また、このようなオス同士の闘争は、オス間の勝敗を決定するだけでなく、交尾後の精子競争を通じてオスの適応度（子の数）にも影響を与える（Parker 1970 ; Simmons 2001）。例えば、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* では、敗者は勝者に比べて繁殖成功が低下するが、交尾持続時間が長くなり、メスの繁殖力を高め、父性占有率を増加させることが示されている（Filice and Dukas 2019）。オオツノコクヌストモドキ *Gnatocerus cornutus* では、敗者のオスが勝者よりも多くの精子を移送した（Okada et al. 2010）。コオロギ *Gryllus bimaculatus* では、勝者と敗者の間で適応度に差は見られなかったが、勝者は敗者よりも質の低い（生存率の低い）精子を産生する一方で、より多くのメスと交尾することが可能であった（Tuni et al. 2016）。カダヤシ *Gambusia holbrooki* では、精子量や精子速度に勝者と敗者の間で差は認められなかったが、勝者は敗者に比べて交尾試行回数およびメスの近くに滞在する時間を有意に増加させた（Harrison et al. 2023）。これらの先行研究に基づくと、闘争結果が繁殖に及ぼす影響は、種の繁殖生態によって大きく異なる可能性が高い。一方で、実験手法の違い（例えば、体サイズを揃えた闘争か否か：Amino and Matsuo 2023 ; 闘争結果が最近か過去か：Hsu and Wolf 1999）が、結果のばらつきの一因となっている可能性もある。したがって、多様な種を対象として、闘争結果が精子競争および適応度に与える両方の影響を検討することが必要である。しかし、私の知る限り、そのような研究は非常に少ない（But see Tuni et al. 2016 ; Filice and Dukas 2019 を参照）。

ゴミムシダマシ科（Tenebrionidae）は、乾燥地域から熱帯地域に至るまで幅広い環境に生息し、多様な生態的特性を示す（Kergoat et al. 2014）。この科におけるオス同士の闘争様式も多様であり、角による突き合い、頭突き、大顎による把持などが知られている（例：Conner 1995 ; Enders et al. 1998 ; Okada et al. 2010）。本研究では、第2章で明らかになった後脚を噛み合うという独特なオス間闘争を示すジャイアントミルワーム *Zophobas atratus* に着目した（第2章）。この種では、闘争が激化すると、オス同士が2時間以上にわたって後脚を噛み続け、一方のオスが逃走するまで闘争が継続し、その時点で勝敗が決定される（第2章）。本種では、エスカレートした後脚噛み闘争に敗れたオスは、未闘争、エスカレートした闘争の勝者オ

ス、エスカレートしなかった闘争の勝者・敗者オスと比べて交尾時間に差は見られないものの、子の数が有意に減少することが明らかになった（第2章）。しかし、この減少のメカニズムはこれまで不明であった。適応度の低下は、闘争後の後脚の損傷によって精子移送が阻害されることに起因する可能性もあれば、精子が正常に移送された場合であっても、交尾後の隠れたメスの選択（cryptic female choice）による可能性も考えられる（Eberhard 1996）。

本研究では、闘争結果がオスによる精子移送に与える影響を調べるため、未闘争、勝者、敗者、引き分けオスをそれぞれ処女メスと個別に交尾させ、メスの受精嚢内に蓄えられた精子量をオスのグループ間で比較した。さらに、闘争時間とメスに移送された精子数との関係についても検討した。

材料および方法

供試虫および飼育条件

本研究では、第2章と同じ国内ブリーダー（Pro-Worm, Tokyo）から購入した *Z. atratus* の基礎系統を用いた。これらの個体は、岡山大学において1年以上にわたり累代飼育された。*Z. atratus* の幼虫は集団（ $n=500$ ）で飼育し、生ニンジンおよび熱帯魚用飼料（Neopros; Kyorin, Himeji）を与えた。すべての幼虫および成虫は、明暗条件 16 : 8（L : D）、温度 25 ± 2 °C、湿度 60~70% に維持された恒温室内で飼育した。

本種は隔離条件下でのみ蛹化するため（Rumbos and Athanassiou 2021）、蛹化を促進する目的で幼虫を個別に隔離した。隔離飼育はサンプルカップ（直径 76 mm × 高さ 38 mm, Risupack, Gifu）を用いて行い、幼虫が蛹化直前になると、カップ内にはいかなる資材も入れずに飼育した。羽化した成虫には、幼虫期と同様に生ニンジンおよび熱帯魚用飼料を与え、同じサンプルカップ内で個別に飼育した。

4 か月齢の雌雄ペアは、3 か月齢のペアと比較して、交尾時間および子の数が有意に高いことが明らかになった（第2章）。そのため本実験では、オスが比較に十分な量の精子を保持していることを保証するため、オスおよびメス成虫をそれぞれ4 か月間個別に飼育し、その後の実験に供した。

予備実験（交尾回数の決定および体サイズの測定）

各オス（未闘争オス、勝者、敗者、引き分けオス）によって移送される精子数を比較するため、本実験では交尾回数を標準化した。十分な精子移送に必要な交尾回数を決定するため、2つの実験区を設定した。1つ目は、未闘争かつ未交尾のオスを、処女メスと1回のみ交尾させた区（ $n=22$ ；オスの体サイズ 6.65~7.80 mm、メスの体サイズ 6.01~7.88 mm）である。2つ目は、処女メスと5回交尾させた区（ $n=20$ ；オスの体サイズ 6.20~7.68 mm、メスの体サイズ 5.87~7.21 mm）である（図 3.1）。

また、体サイズが精子数に及ぼす影響を調べるため、闘争経験のないオスおよび処女メスと5回交尾したオスを対象として解析を行った。オスおよびメスの体サイズは、デジタルノギス（CD-10APX, Mitutoyo, Kanagawa）を用いて測定した。体サイズの指標には、本種の体サイズ

として中前胸幅を用い、(第2章)の方法に従って測定を行った。

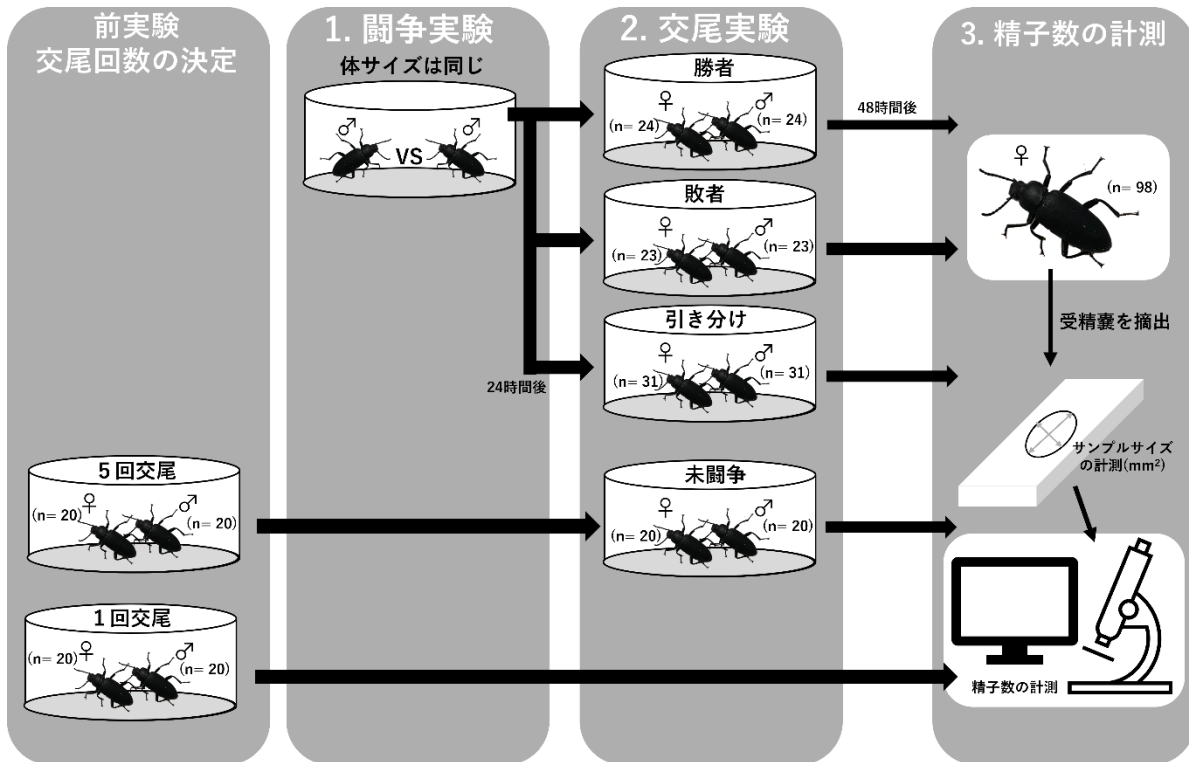


図 3.1 実験デザイン。予備実験：オスとメスのペアを作成し、一方の群では5回交尾させ、もう一方の群では1回のみ交尾させた。48時間後、メスの受精嚢内に存在する精子数を群間で比較した。1. 闘争実験：体サイズが同じオス同士をペアにして闘争させた。闘争が3時間以内に決着した場合、その個体を勝者または敗者として分類した。3時間経過しても闘争が決着しなかった場合は、両方のオスを引き分けと決めた。24時間後、それぞれのオスを処女メスと交尾させた。2. 交尾実験：各オス（勝者×メス、敗者×メス、引き分けオス×メス、未闘争オス×メス）について、同一のメスと5回交尾させた。未闘争オスには、予備実験で5回交尾させたペアに含まれるオスを用いた。48時間後、メスの受精嚢内の精子数を群間で比較した。3. 精子数の計測：オスと交尾したメスを冷凍処理し、受精嚢を解剖した。顕微鏡スライド上に試料（PBS＋受精嚢）を調製した。精子数は、スライド上に設定した一定の観察領域（ $260\text{ }\mu\text{m} \times 420\text{ }\mu\text{m}$ ）内に存在する精子を目視でカウントすることにより算出した。

闘争実験

第2章に基づき、後脚噛み闘争の前に、前述と同じデジタルノギスを用いて体サイズを測定し、体サイズ差が0-0.2 mmとなるようにオス同士をマッチングした。本闘争実験では、同一体サイズ(5.82-7.53 mm)のオスを用いた(図3.1)。実験時間は3時間とし、勝者および敗者が決定するまでに要した時間を記録した。

敗北の定義は第2章に従い、闘争から逃走し、その後再び相手のオスと接触したにもかかわらず、追加の闘争を行わずに再度逃走した個体を敗者と定義した。3時間以内に決着がつかなかった闘争は引き分けと定義した。

その後、闘争によって消費されたエネルギーを回復させるため、各オスを餌とともに24時間個別に隔離し、その後、交尾実験に供した(図3.1)。

交尾実験

交尾実験では、処女メス(体サイズ5.87-7.41 mm)を用いた。予備実験の結果、1回の交尾では測定に十分な精子量が得られず、一方で5回の交尾では十分な精子量が得られることが示された。そこで、前述の勝者オス、敗者オス、および引き分けオスを、それぞれ同一のメスと5回交尾させた(図3.1)。また、対照群として未闘争オスを用い、予備実験において5回交尾させたペアを使用した(図3.1)。

交尾行動の観察はすべて目視で行い、1回の交尾は、オスの交尾器がメスの交尾器に挿入された時点から、オスの交尾器がメスの交尾器から離脱するまでと定義した。ジャイアントミルワームと同じ科に属するミルワーム *Tenebrio molitor* では、精子は交尾後に精包から放出され、メスの受精囊まで泳いで到達するのに約6時間を要することが知られている(Drnevich et al. 2000)。精子が受精囊に到達するのに十分な時間を確保するため、各メスは交尾後に個別に48時間飼育し、その後、精子数の測定に用いた(図3.1)。

精子数の計測

ジャイアントミルワームにおける受精囊はこれまで同定されていなかったため、Drnevich et al. (2000)に記載されたミルワームの受精囊を参考にして同定を行った。解剖の結果、同論文で報告されているものと類似した受精囊が確認された。さらに、処女メスでは精子が観察されず、交尾後のメスでは精子が確認されたことから、受精囊であることが裏づけられた(図3.2)。

精子数の計測はYamane et al. (2010)に従って行った。すなわち受精囊の摘出前に、メスを30分間(-18~-24 °C)凍結した。交尾後のメスから受精囊を解剖により摘出し、スライドガラス上に置いた後、PBS(10 µL)を加えた。その後、受精囊を破碎し、精子が均一に分散するよう溶液を3回混和した。試料は24時間自然乾燥させた後、顕微鏡(BX51、オリンパス、東京、日本)下で観察した。スライド上に設定した一定の観察領域(260 µm × 420 µm)内に存在する精子を目視で計数した(図3.1)。

さらに、精子懸濁液(PBS+破碎した受精囊)の広がり的大小さが精子数に及ぼす影響を調べるため、本実験で用いた乾燥標本を実体顕微鏡(SZX10, Olympus, Tokyo)下で撮影し、内蔵の

測定ソフトウェア（DP23, Olympus, Tokyo ）を用いて液標本面積を測定した。

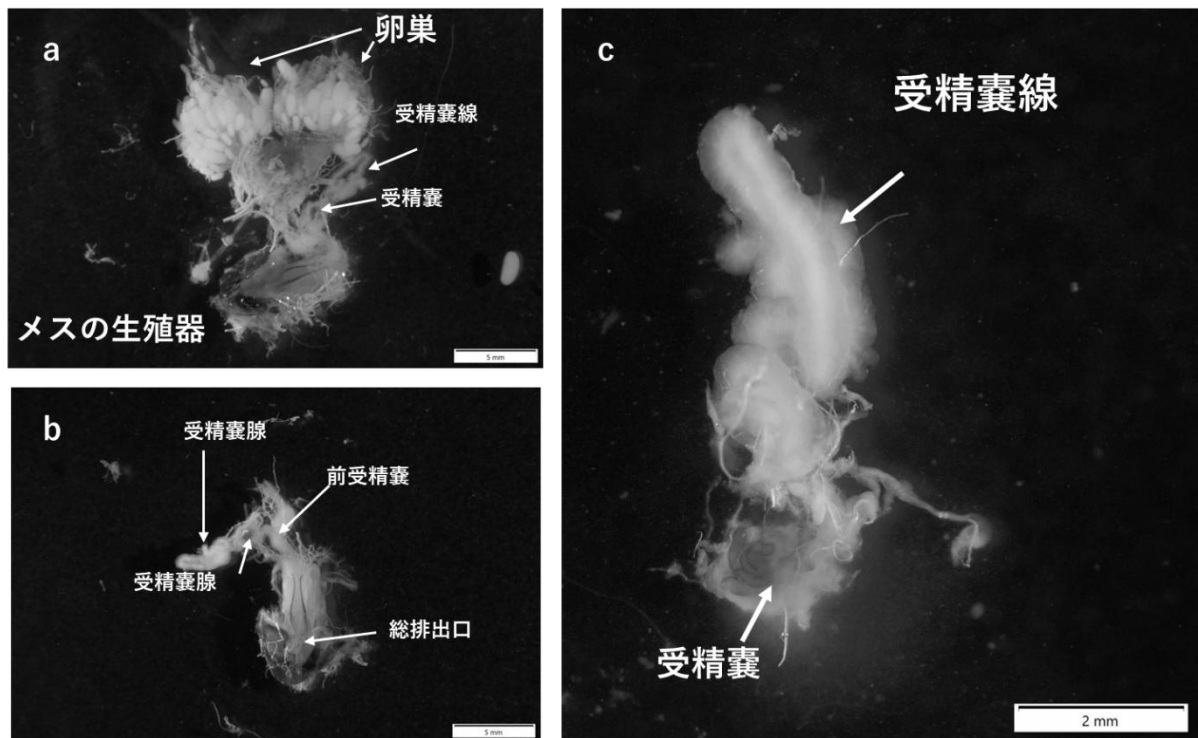


図 3.2 *Zophobas atratus* におけるメス生殖器官の解剖図。

a : 卵巢は一对からなり、受精囊の後方に位置する。 b : 受精囊は膺の近くに位置し、前方には前受精囊、後方には受精囊腺が位置する。 c : 受精囊腺は管状で複雑に巻き込んだ構造をしており、受精囊も同様に管状で、球状になるように巻かれている。

統計解析

すべての統計解析は一般化線形混合モデル (GLM) を用いて行った。交尾回数に関する実験では、精子数を従属変数とし、交尾回数 (1 回または 5 回)、非闘争オスおよびメスの体サイズ、ならびに精子懸濁液の面積 (mm^2) を独立変数として解析した (表 1 の GLM 1)。

闘争時間と精子数の関係については、精子数を従属変数とし、闘争時間、精子懸濁液の面積 (mm^2)、オスおよびメスの体サイズを独立変数として解析した (表 1 の GLM 2)。

オス間での精子数の比較では、精子数を従属変数とし、オスの形質 (非闘争、勝者、敗者、引き分け)、精子懸濁液の面積 (mm^2)、オスおよびメスの体サイズを独立変数として解析した (表 1 の GLM3)。

射精量の個体差を考慮するため、すべての GLMM においてランダム効果として個体 ID を設した。GLM 1–3 における過分散とゼロ過剰分布の検定には、R package *performance* を用いた。その結果、GLM 1–3 でゼロ過剰分布が見られたため、ゼロ過剰モデルを適用した。

統計的に有意な効果については、R package *multcomp* を用いた Tukey HSD 法による多重比較検定を行った (Hothorn et al. 2008)。すべての統計解析は統計ソフト R (version 4.3.2) を用いて実施し、有意水準は $p \leq 0.05$ とした。

表 3.1 GLM のモデル説明

モデル名	応答変数	分布	リンク関数	説明変数
GLM1	精子数	ゼロ過剰	Log	(交尾回数) + (オスの体サイズ) + (メスの体サイズ) + (乾燥標本の面積)
GLM2	精子数	ゼロ過剰	Log	(闘争時間) + (オスの体サイズ) + (メスの体サイズ) + (乾燥標本の面積)
GLM3	精子数	ゼロ過剰	Log	(オスの形質) + (オスの体サイズ) + (メスの体サイズ) + (乾燥標本の面積)

予備実験（交尾回数と精子数）

精子数

$p < 0.001$

1回

5回

交尾回数

27

闘争時間と精子数

闘争時間と精子数の間には負の相関が認められ、コンテスト時間が長いほど精子数は少なくなる傾向があった ($p = 0.0163$; 図 3. 4)。オスの体サイズは精子数の増加に伴って減少する傾向がみられたが、有意ではなかった ($p = 0.3302$; 図 3. 4)。一方、メスの体サイズは精子数の増加に伴って有意に増加した ($p = 0.0353$; 図 3. 4)

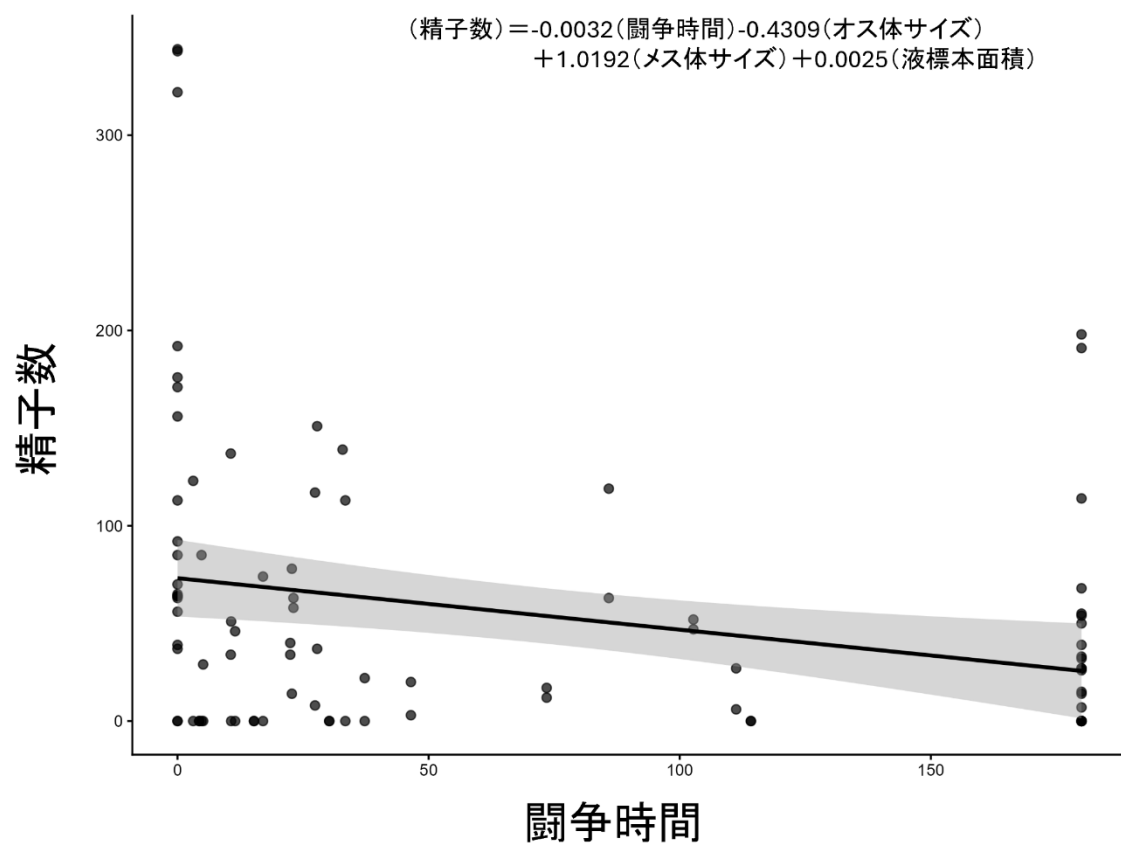


図 3. 4 すべてのオス（未闘争、勝者、敗者、引き分け）における闘争時間（分）と精子数との相関関係。未闘争とは、予備実験における 5 回交尾群のオスを指す。

闘争結果と精子数

敗者および引き分けとなったオスの精子数は、未闘争オスと比較して有意に減少していた。一方で、その他のペア間比較では有意差は認められなかった（未闘争-勝者： $p = 0.0812$ 、未闘争-敗者： $p = 0.0148$ 、未闘争-引き分け： $p = 0.0238$ 、勝者-敗者： $p = 1.0000$ 、勝者-引き分け： $p = 1.000$ 、敗者-引き分け： $p = 1.000$ 、図 3.5.）。オスの体サイズは、精子数の増加に伴って減少する傾向がみられたが、有意ではなかった（ $p = 0.345$ ）。同様に、メスの体サイズは、精子数の増加に伴って増加する傾向がみられたが、有意ではなかった（ $p = 0.0827$ ）。

闘争に参加した 77 個体の雄のうち、3 個体で附節の欠損が確認された（後脚で 2 個体、中脚で 1 個体）。これら 3 個体はいずれも対戦相手より体サイズが小さく、結果は引き分け（ $n = 2$ ）または敗者（ $n = 1$ ）であった。さらに、これら 3 個体の雄と交尾したすべての雌の受精囊（spermatheca）からは、精子が一切検出されなかった。

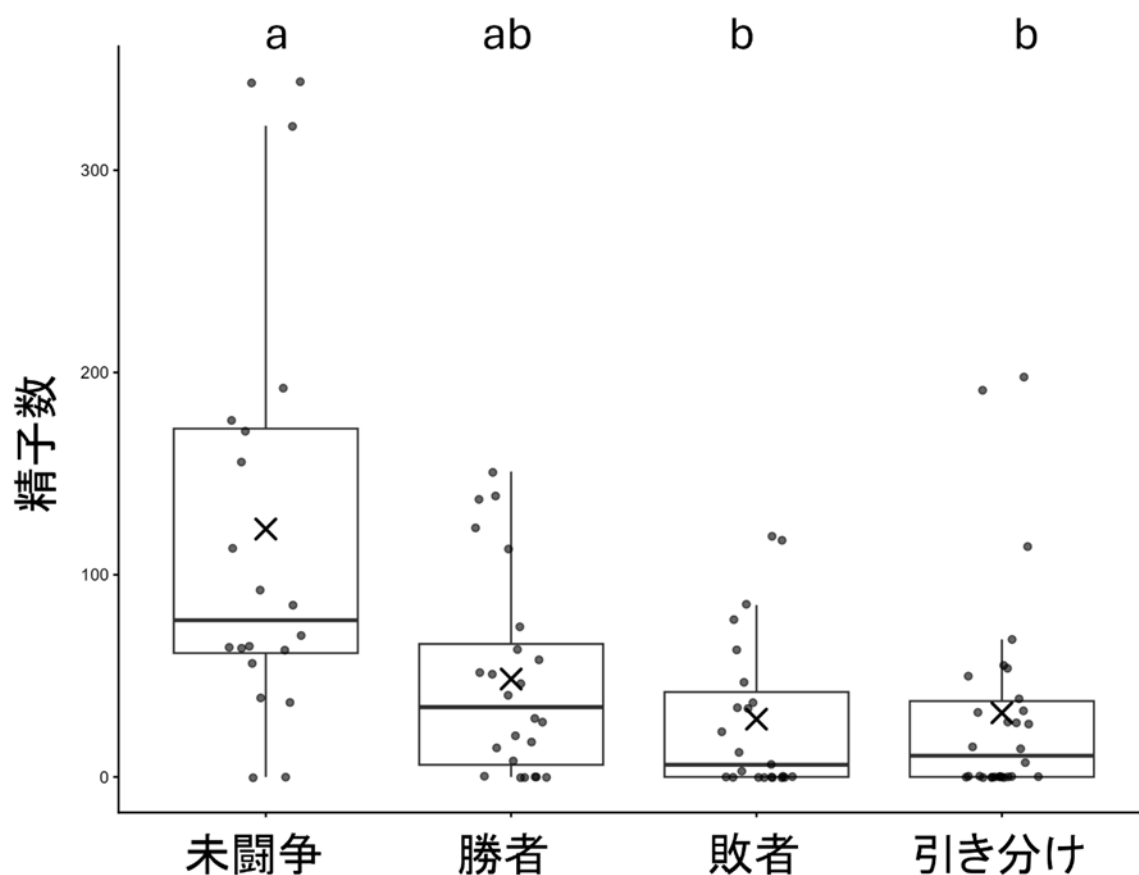


図 3.5 闘争結果（未闘争： $n=20$ 、勝者： $n=24$ 、敗者： $n=23$ 、引き分け： $n=30$ ）間における精子数の比較。各グラフ中の「×」は平均値を示す。未闘争とは、予備実験における 5 回交尾群の雄を指す。異なる文字は、有意水準 $p \leq 0.05$ における有意差を示す。

考察

ジャイアントミルワームの受精嚢 (spermatheca) は、コクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*) やミルワームと非常によく似ており (Fedina and Lewis 2008)、細長く狭い管が絡み合った構造から成っている (図 3. 2)。 *T. castaneum* における受精嚢の形状は、異なるオス由来の精子を層状に分けて貯蔵し、メスが父性の割合を制御できる可能性を示唆している (Fedina and Lewis 2008)。ジャイアントミルワームの受精嚢も、同様の貯蔵機能を有している可能性が高い。

交尾回数を 1 回に制限した場合、5 回交尾と比較して精子数は有意に減少し、1 回の交尾では十分な数の子孫を生産するために必要な精子量を移送するには不十分である可能性が示唆された (図 3. 3)。したがって、本種では十分な精子移送を確保するために、より多くの交尾回数が必要であると考えられる。さらに、5 回交尾を行った敗者オスにおいては、同じく 5 回交尾を行った未闘争オスと比べて精子数が有意に少なく、敗者や引き分けとなったオスが十分な繁殖成功を得るためには、さらに多くの交尾が必要である可能性が示唆された (図 3. 5)。 *Z. atratus* ではメイトガードはこれまで観察されていないが、ミルワームでは、ライバルオスの存在下で交尾後メイトガードを示す可能性が高いことが報告されている (Gage and Baker 1991)。このことから、 *Z. atratus* においても、敗北または引き分けとなった雄は、再交尾の機会を増やす、あるいはメイトガードをとることで、精子移送量の低下を補償している可能性がある。しかし、 *T. castaneum* では、メスが交尾中に低品質な雄から移送される精子量を制御できる可能性が示唆されている (Fedina 2007)。そのため、今後の研究ではオスの形質だけでなく、メスの選好性も考慮に入れる必要がある。

第 2 章で報告されているように、精子数の有意な減少は敗者オスと未闘争・エスカレートした闘争の勝者・エスカレートしなかった闘争の勝者と敗者で観察され、本研究では闘争時間と精子数の間には負の相関が認められた。まれではあるが、敗者オスおよび引き分けオスの一部に脚の欠損が観察された。これらの結果は、産卵数や孵化数の減少が隠れたメスの選択

(cryptic female choice ; Eberhard 1996) によるものではなく、オス自身に起因することを示唆している。さらに、精子量の減少は、長時間の闘争や敗北によって引き起こされている可能性が高い。本研究においても、第 2 章と同様に、交尾姿勢の歪みが観察された。これは、脚を噛み合う闘争によって後脚が損傷し、その結果として交尾姿勢が歪められたことを示唆している。キイロショウジョウバエでは、歪んだ交尾姿勢が適応度を低下させることが示されている (Yamanouchi et al. 2023)。したがって、本種においても交尾姿勢の歪みが精子移送を妨げ、精子が受精嚢に到達できず、受精嚢内の精子量に差が生じたと推測される。さらに、闘争時間と精子数の負の相関、および闘争による脚の損傷の観察結果から、本研究では回復のために闘争実験後 24 時間の間隔を設けたものの、この回復期間が不十分であり、オスが十分な体力を回復できず、メスにごく少量の精子さえ移送できなかった可能性がある。

勝者オスにおいて精子数が未闘争よりも減少する傾向が見られたことは、複数のメスと交尾することを目的とした繁殖戦略によるものかもしれない。野外のジャイアントミルワームは、グアノ (コウモリの糞) 中で産卵することが示唆されている (Tschinkel 1981)。もし勝者オス

がグアノ内に縄張りを形成し、雌が積極的にグアノを産卵場所として利用するのであれば、勝者雄は多くの交尾機会を得る可能性が高い。さらに、近縁種であるフォークドファンガスビートル (*Bolitotherus cornutus*) では、メスが勝者オスの化学的シグナルを好むことが示唆されている (Vilella-Pacheco et al. 2021)。これらを総合すると、ジャイアントミルワームの勝者オスは、より多くのメスと交尾する機会を増やすために、メス1匹あたりに移送する精子量を減少させている可能性がある。将来的には、本種の野外における交尾システムを明らかにする必要があるが、勝者オスの精子数が未闘争オスより少ない傾向は、その一つの説明となり得る。

結論として、ジャイアントミルワームにおける脚を噛み合う闘争は、敗者雄および引き分けオスと交尾したメスの受精嚢内の精子量を有意に減少させた。この減少は、闘争中に負った損傷による交尾姿勢の変形や、闘争に伴うエネルギー消費によって引き起こされた可能性が高い。したがって、今後の研究では、闘争によって生じた後脚損傷の程度、精子数、ならびに適応度との関係を検討する必要がある。本研究では受精嚢内に貯蔵された精子を調査したが、敗者オスおよび引き分け雄が精子をオスに移送できなかったのか、それとも精子は移送されたものの受精嚢に到達できなかったのかは不明である。そのため、受精嚢の上流に位置する前受精嚢 (anterior bursa) や膈内に精子が存在するかどうかを調べる必要がある。最後に、第2章および第3章では、1雌に対して1雄（非競争、勝者、敗者、引き分け）を提示したが、野外ではメスが複数のオスと交尾する可能性がある。精子競争や隠れたメスの選択を扱う研究では、メス1匹に対して複数オスを提示する実験系が一般的である (Fedina and Lewis 2008)。したがって、メスの多雄交尾を考慮した条件下で、闘争結果が父性割合に及ぼす影響を検討することが今後重要となる。

第4章 闘争結果におけるオスの貯精囊内の精子数への影響

はじめに

多くの生物種では、1匹のメスに対して複数のオスが受精をめぐって競争する (Parker 1970)。また、精子や精液の生産はコストの低いものではない (Simmons 2001)。そのため、個体間相互作用をし、オスは戦略的に精子生産量を調節することが予測される。

交尾前のオス間闘争は、メスや縄張りの獲得につながる事が多く、その結果、勝者は敗者よりも多くの交尾機会を得ることができる。このことから、勝者オスは敗者オスに比べて、より多くの精子を生産すると考えられる。例えば、オス間闘争に勝利し優位な立場にあるオス (dominant) のハツカネズミ (*Mus musculus domesticus*) では、劣位オス (subordinate) に比べて精巣が大きく、精子生産量も多いことが報告されている (Bayran et al. 2020)。このような繁殖戦略は他種でも確認されており (シクリッド: Kustan et al. 2012; ロックシュリンプ: Hinojosa and Thiel 2003)、闘争結果と精子生産の関連は一般的な傾向であると考えられてきた。

一方で、種によっては勝者と敗者の間で精子生産量に差が認められない場合や、逆の傾向が示される場合もある。例えば、イースタンモスキートフィッシュ (*Gambusia holbrooki*) では、闘争結果にかかわらず、オスが生産する精子数は変化しなかった (Harisson et al. 2025)。また、キングサーモン (*Oncorhynchus tshawytscha*) では、劣位オスが優位オスよりも多くの精子を生産することが報告されている (Bartlett et al. 2017)。これらの結果は、闘争時におけるオス同士の体サイズの一致・不一致といった実験手法の違いが影響している可能性を示唆するとともに、闘争結果が精子生産に与える影響を理解するためには、より幅広い分類群を対象とした体系的な研究が必要であることを示している。

種数に富むゴミムシダマシ科では、多様なオス間闘争が確認されている (第2章)。ジャイアントミルワームでは、闘争の敗者オスや、長時間の闘争の末に引き分けとなったオスは、未闘争オスと比較して、交尾したメスの体内に貯蔵される精子数が減少することが示されている

(第3章)。この精子数の減少は、主に交尾姿勢の歪みによって精子移送が阻害されたことに起因すると考えられる。以上の結果から、敗者オスや引き分けオスは、闘争によって生じる精子移送量の減少に対する適応的応答として、より多くの精子を生産する繁殖戦略をとる可能性が考えられる。しかし、本種を含むゴミムシダマシ科において、闘争結果がオスの精子生産量に与える影響については、私の知る限り明らかにされていない。

本研究では、体サイズによる精子生産数を調べた。そして体サイズを同じにしたオス同士で闘争させ、24時間後にオスの貯精囊を摘出し、貯蔵されている精子数 (精子の生産数) を計測し、未闘争、勝者、敗者、引き分け間で比較した。加えて、第3章の受精囊内の精子数を用いて、未闘争、勝者、敗者、引き分けオスが5回の交尾でメスにどれほどの精子量を送り出しているのかも調べるため、闘争結果内で貯精囊と受精囊の精子数を比較した。また、基本的な体サイズによる闘争時間への影響も明らかでなかったため、実験条件の統一のため、精子実験で用いた個体とは別に闘争実験を行った。

材料および方法

供試虫および飼育条件

本研究では、第2章と第3章と同じ国内ブリーダー（Pro-Worm, Tokyo）から購入した *Z. atratus* の基礎系統を用いた。これらの個体は、岡山大学において1年以上にわたり累代飼育された。*Z. atratus* の幼虫は集団（n=500）で飼育し、生ニンジンおよび熱帯魚用飼料（Neopros; Kyorin, Himeji）を与えた。すべての幼虫および成虫は、明暗条件 16 : 8（L : D）、温度 25 ± 2 °C、湿度 60-70% に維持された恒温室内で飼育した。

本種は隔離条件下でのみ蛹化するため（Rumbos and Athanassiou 2021）、蛹化を促進する目的で幼虫を個別に隔離した。隔離飼育はサンプルカップ（直径 76 mm × 高さ 38 mm, Risupack, Gifu）を用いて行い、幼虫が蛹化直前になると、カップ内にはいかなる資材も入れずに飼育した。羽化した成虫には、幼虫期と同様に生ニンジンおよび熱帯魚用飼料を与え、同じサンプルカップ内で個別に飼育した。

第3章と同様に第4章では、4か月齢のオスを用いて、実験を行った。実験条件を揃えるため、オス成虫をそれぞれ4か月間個別に飼育し、その後の実験に供した。

闘争実験

第3章と同様に、後脚噛み闘争の前に、前述と同じデジタルノギスを用いて体サイズを測定し、体サイズ差が 0-0.2 mm となるようにオス同士をマッチングした。本闘争実験では、同一体サイズ（5.3-7.5 mm）のオスを用いた（図 4.1）。実験時間は3時間とし、勝者および敗者が決定するまでに要した闘争時間を記録した。敗北の定義は第2章と第3章に従い、闘争から逃走し、その後再び相手のオスと接触したにもかかわらず、追加の闘争を行わずに再度逃走した個体を敗者と定義した。3時間以内に決着がつかなかった闘争は引き分けと定義した。その後、闘争経験を基に精子生産をさせるため、各オスを餌とともに24時間個別に隔離し、その後、解剖し精子数を計測した（図 4.1）。

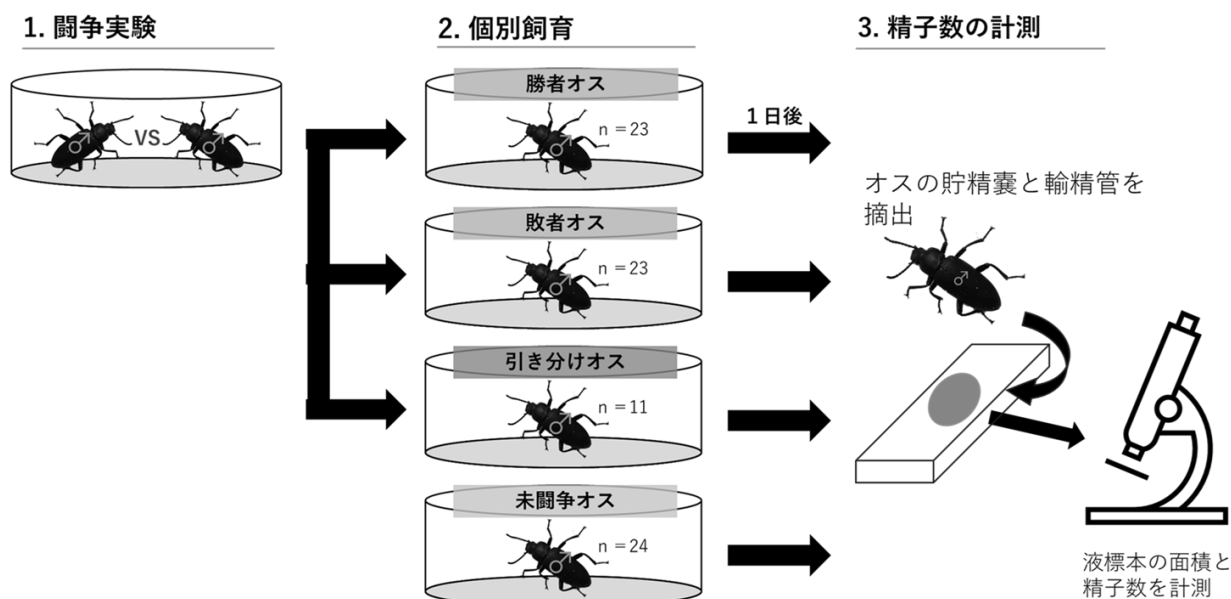


図 4.1 実験デザイン。1. 闘争実験：体サイズが同じオス同士をペアにして闘争させた。闘争が 3 時間以内に決着した場合、その個体を勝者または敗者として分類した。3 時間経過しても闘争が決着しなかった場合は、両方のオスを引き分けと決めた。2. 個別飼育：各オス（勝者、敗者、引き分けオス、未闘争オス）は、24 時間個別させた。未闘争オスは、闘争させず 24 時間個別飼育させたオスを用いた。3. 精子数の計測：個別飼育させたオスを冷凍処理し、貯精嚢を取り出した。顕微鏡スライド上に試料（PBS+受精嚢）を置き、精子数は、スライド上に設定した一定の観察領域（ $260 \mu\text{m} \times 420 \mu\text{m}$ ）内に存在する精子を目視でカウントすることにより算出した。

また、貯精囊内の精子数を計測する実験とは別に闘争実験を行い、体サイズによる闘争時間への影響を調べた。この実験では、オス同士の体サイズ差は第3章と同様に0.2 mm以下とし、体サイズは6.5-7.7mmの個体を用いた。本実験では闘争しなかったオスペアと闘争が成立しなかったオスペア（一方だけ攻撃行動を示す場合）も記録した。

生殖器の同定と精子数の計測

本種の貯精囊は同定されていなかったため、他のゴミムシダマシ種の貯精囊を参考し、形態と体内での位置を特定、最終的に精子の有無で同定した (Rezende et al. 2024)。解剖方法はオスを冷凍処理させ、解剖を行った。同定した貯精囊と輸精管にも精子が確認されたため、貯精囊と輸精管の両方を取り出し、プレパラート上にPBS (10 μl) を滴下し、貯精囊と輸精管を粉砕し、精子を均等に攪拌させるために10回液標本をピンセットで混ぜた。試料は24時間自然乾燥させた後、顕微鏡 (BX51, オリンパス, 東京, 日本) 下で観察した。スライド上に設定した一定の観察領域 (260 μm $\times$ 420 μm) 内に存在する精子を目視で計数した (図 4.1)。さらに、精子懸濁液 (PBS+破砕した貯精囊と輸精管) の広がり的大小さが精子数に及ぼす影響を調べるため、本実験で用いた乾燥標本を実体顕微鏡 (SZX10, Olympus, Tokyo) 下で撮影し、内蔵の測定ソフトウェア (DP23, Olympus, Tokyo) を用いて液標本面積を測定した。

統計

すべての統計解析は一般化線形混合モデル (GLM) を用いて行った。オス間での精子数の比較では、精子数を従属変数とし、オスの形質 (未闘争、勝者、敗者、引き分け)、精子懸濁液の面積 (mm^2)、オスの体サイズを独立変数として解析した (表 4.1 の GLM1)。また、5回交尾でオスがどの程度メスに精子を移送させているのかを調べるため、第3章で調べたメスの貯蔵器官である受精囊の精子数と貯精囊内の精子数を合わせたデータセットを作り、未闘争間、勝者間、敗者間、引き分け間の貯精囊-受精囊を比較した。この統計では応答変数を精子数、説明変数を闘争結果とその調べた器官を表した変数と精子懸濁液の面積 (mm^2) を独立変数とした (表 4.1 の GLM2)。闘争時間と精子数の関係については、貯精囊内の精子数を従属変数とし、闘争時間、精子懸濁液の面積 (mm^2)、オスの体サイズを独立変数として解析した (表 4.1 の GLM3)。また、体サイズによる闘争時間への影響では、応答変数を闘争時間、説明変数をオス体サイズとした (表 4.1 の GLM4)。

GLM 1, 2, 4 における過分散とゼロ過剰モデルの検定には、R package *performance* を用いた。その結果、GLM1 および 4 で過分散が認められたため、負の二項分布を適用した。また、GLM2 ではゼロ過剰モデルの適正が見られたため、ゼロ過剰分布を用いた。

統計的に有意な効果については、GLM1-2 では R package *multcomp* を用いたボンフェロー二補正による多重比較検定を行った。また、GLM3 では受精囊と貯精囊を潰して作成した精子懸濁液の面積に差があったため、推定平均値を扱う、R package *emmeans* を用いて、ボンフェロー二補正をおこなった。すべての統計解析は統計ソフト R (version 4.3.2) を用いて実施し、有意水準は $p \leq 0.05$ とした。

表 4.1 GLM のモデル説明

モデル名	応答変数	分布	リンク関数	説明変数
GLM1	精子数	負の二項	Log	(闘争結果) + (オスの体サイズ) + (液体標本の面積)
GLM2	精子数	ゼロ過剰	Log	(各闘争結果由来の貯蔵器官) + (オスの体サイズ) + (液体標本の面積)
GLM3	闘争時間	ガンマ	Log	(オスの体サイズ) + (液体標本の面積)
GLM4	精子数	負の二項	Log	(闘争時間) + (オスの体サイズ) + (液体標本の面積)

結果

解剖結果

ゴミムシダマシ科のオスには精巢が 1 対あり、その下方に輸精管と貯精囊がある (Koçakoglu and Candan 2022 ; Rezende et al. 2024)。ジャイアントミルワームも同様に確認された (図 4. 2)。

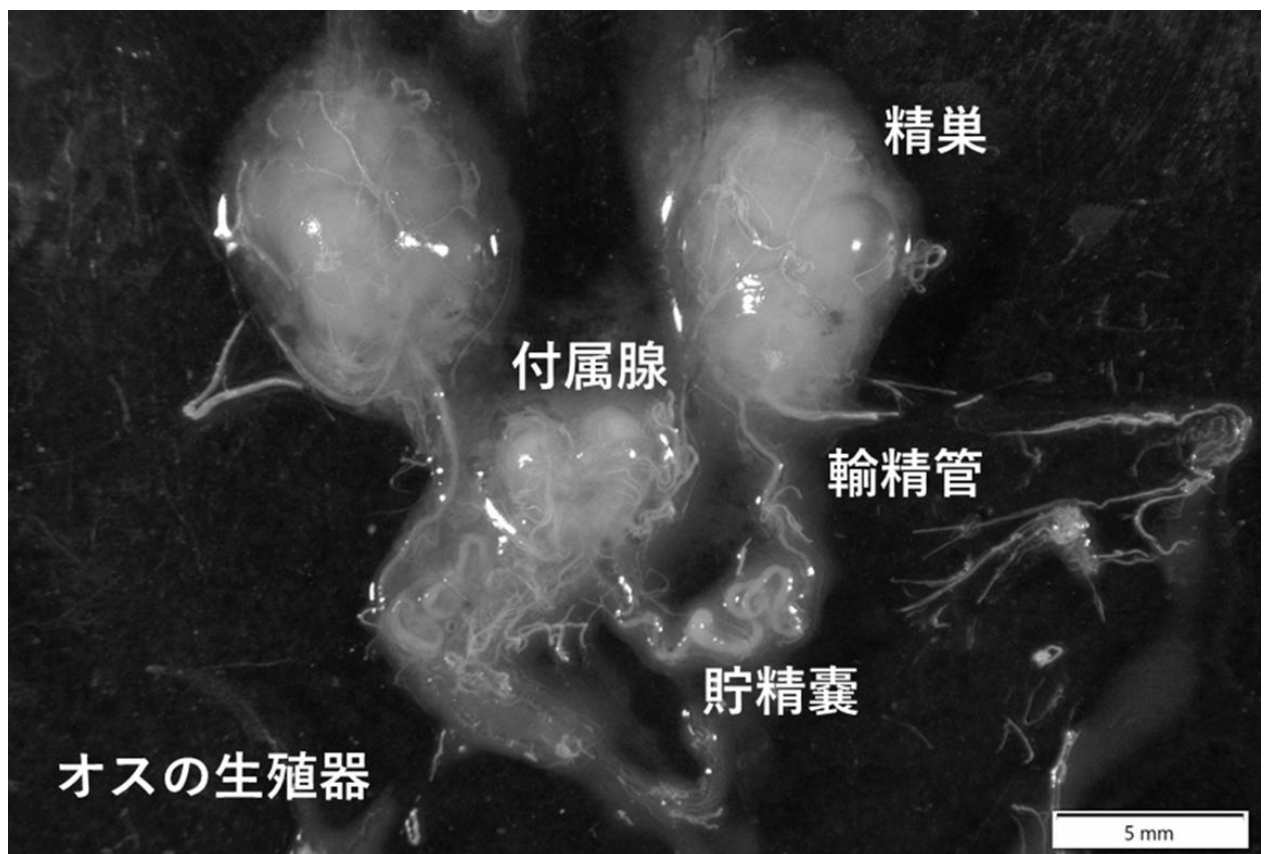


図 4.2 *Zophobas atratus* におけるオス生殖器官の解剖図。

精巢は一対からなり、貯精囊の後方に位置する。貯精囊は付属腺の近くに位置し、後方には輸精管が位置する。

闘争結果と貯精囊内の精子数

全てのオスの組み合わせで貯精囊内の精子数に有意な差はなかった（未闘争-勝者： $p = 1.000$ 、未闘争-敗者： $p = 1.000$ 、未闘争-引き分け： $p = 1.000$ 、勝者-敗者： $p = 1.000$ 、勝者-引き分け： $p = 1.000$ 、敗者-引き分け： $p = 1.000$ 、図 4.3）。オス体サイズと貯精囊内の精子数には有意な相関は見られなかった（ $p = 0.978$ ）。

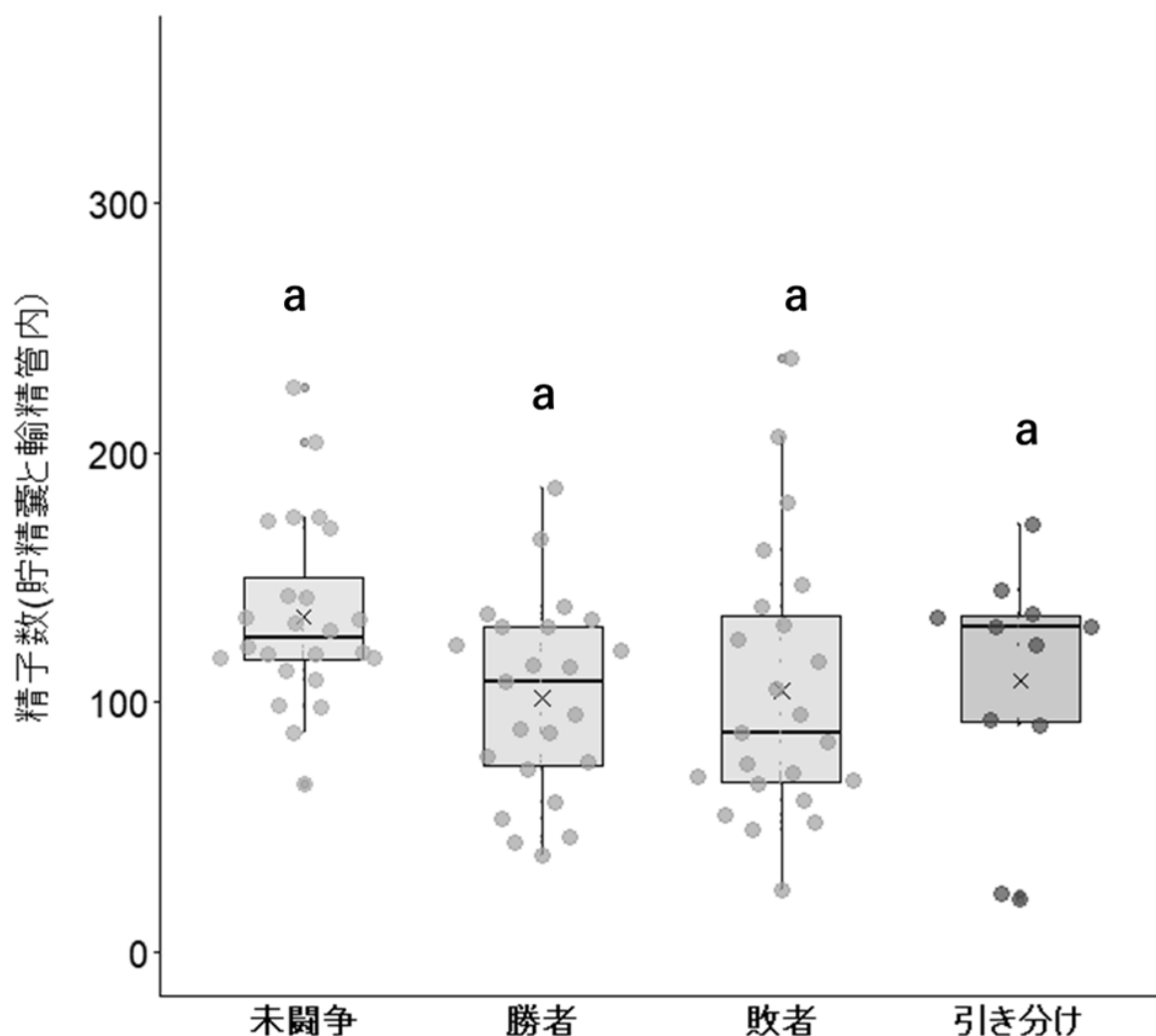


図 4.3 闘争結果（未闘争：n=24、勝者：n=23、敗者：n=23、引き分け：n=11）間における精子数の比較。各グラフ中の「×」は平均値を示す。この図の未闘争とは、4 か月間個別飼育し闘争をさせなかったオスを指す。異なる文字は、有意水準 $p \leq 0.05$ における有意差を示す。

貯精囊と受精囊内（第3章）の精子数の比較

勝者間、敗者間、引き分けオス間の貯精囊と受精囊の精子数に有意な差が見られた（未闘争オス由来の貯精囊内—受精囊 $p = 1.000$, 勝者由来の貯精囊内—受精囊 $p = 0.022$, 敗者由来の貯精囊内—受精囊 $p = 0.001$, 引き分けオス由来の貯精囊内—受精囊 $p = 0.015$ ）。

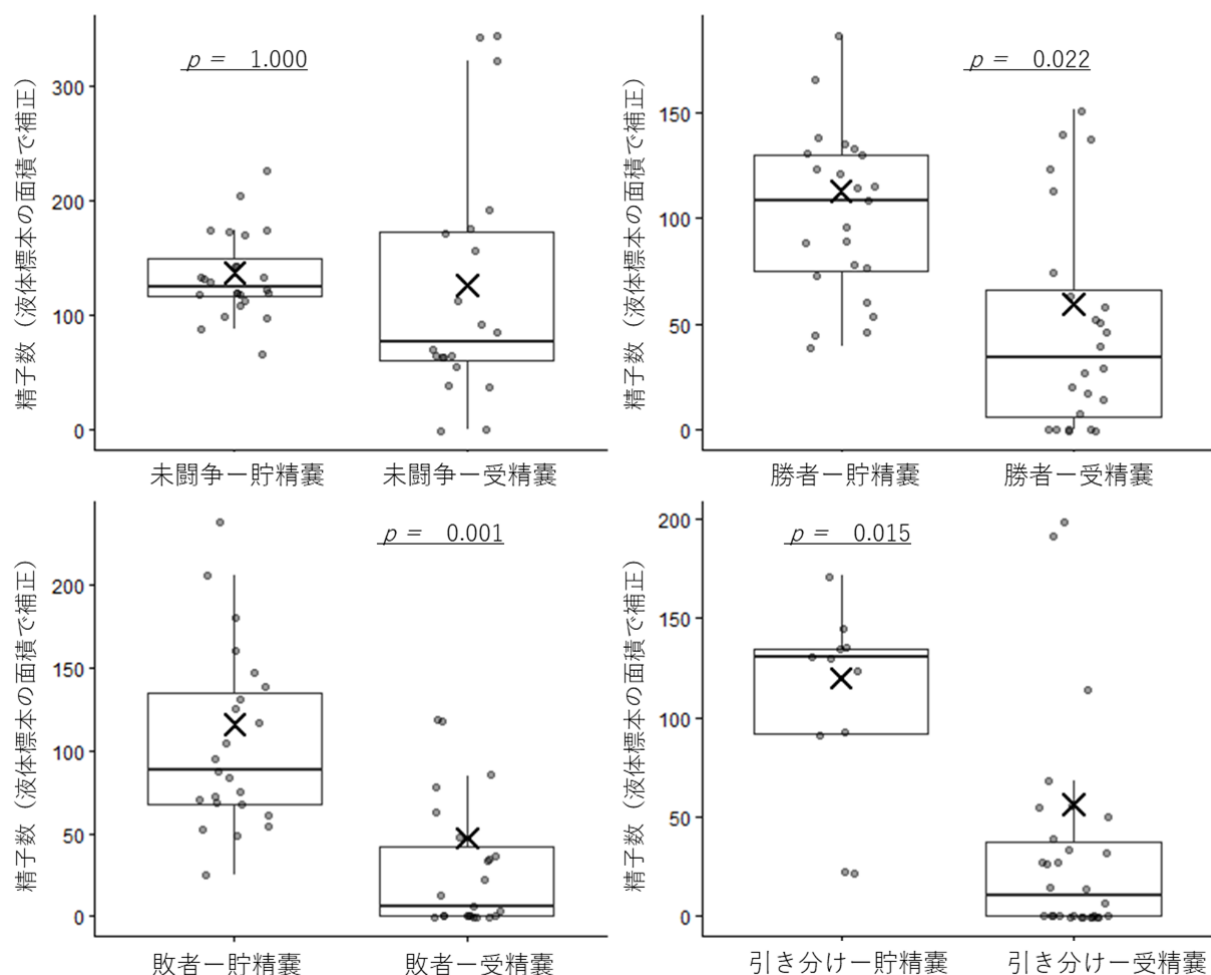


図 4.4 受精囊—貯精囊間における精子数の比較。各グラフ中の「×」は平均値を示す。この図の未闘争とは、4 か月間個別飼育し闘争をさせなかったオスを指す。受精囊の精子数は第3章の未闘争、勝者、敗者、引き分けオスと交尾したメスの受精囊の精子数を用いた。

闘争時間と精子数、闘争時間と体サイズ

闘争時間と貯精囊内の精子数には有意な相関は見られなかった ($p = 0.552$)。しかし、闘争時間と体サイズには有意な相関が見られた ($p = 0.004$)。

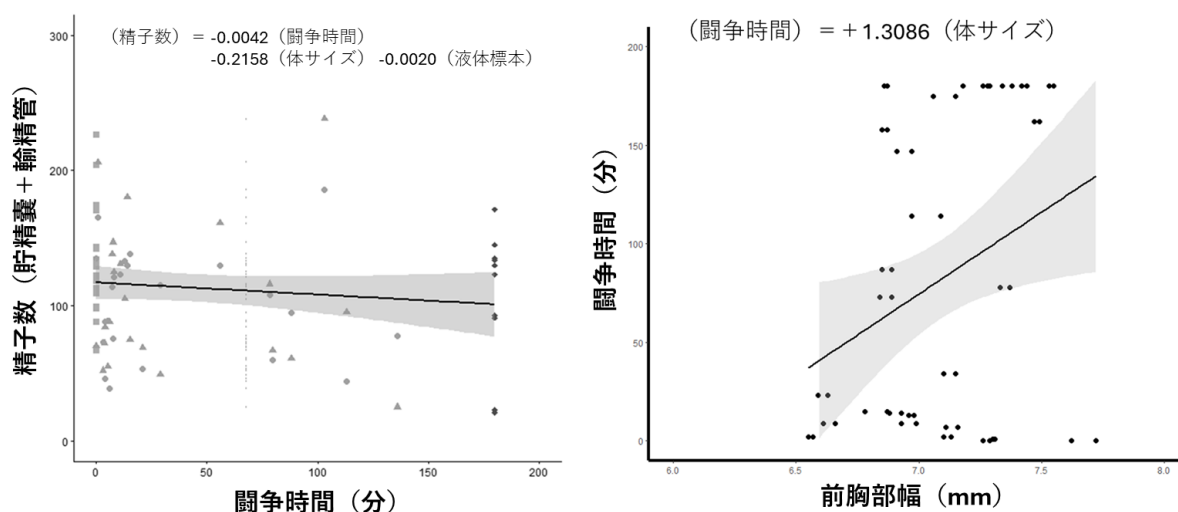


図 4.5 闘争時間（未闘争：n=24、勝者：n=23、敗者：n=23、引き分け：n=11）と精子数における相関図（左図）。左図は貯精囊の実験で用いた実験群であり、闘争時間が 0 の個体は、4 か月間個別飼育し闘争をさせなかったオスを指す。体サイズ（前胸部幅）と闘争時間（逃走：n=1、不戦勝：n=1、勝者：n=20、敗者：n=20、引き分け：n=12）における相関図（右図）。右図の闘争時間 0 の個体は一方は逃走のみを行い一度も闘争しなかった個体と攻撃行動を行い続けて勝利した個体である。

考察

ジャイアントミルワームのオス間闘争では、闘争結果と闘争時間にかかわらず、オスの精子貯蔵器官である貯精囊および輸精管内の精子数に差は認められなかった（図 4.3 と図 4.5）。

Harisson et al. (2025) では、イースタンモスキートフィッシュの勝者オスが敗者オスに比べ

て多くの交尾成功を示すことが報告されていることから、ジャイアントミルワームにおいても、闘争結果と闘争時間は精子生産量ではなく、交尾行動の積極性や交尾成功数に影響を及ぼしている可能性が考えられる。第2-4章では闘争結果における交尾行動の比較は未だ調べられておらず、私が知る限り他の研究例もない。そのため、本種における交尾行動の調査は重要であると示唆される。また、ゴミムシダマシ科における精子生産能力については、これまで十分に調べられておらず、24時間あたりにどの程度の精子を生産できるのか、また生産された精子がどの程度の期間体内に貯蔵されるのかは明らかになっていない。ゴミムシダマシ科では精子競争に関する研究 (review: Fedina 2008) が多く行われていることから、精子生産能力に関する本研究の結果は、今後の精子競争研究において重要な基礎情報となると考えられる。

本実験では未闘争オスと未闘争オスが5回交尾したメスの受精嚢内の精子数には差はなかった (図4.4)。これは5回の交尾でオスに貯蔵されている精子を全てメスに移送することが示唆されている。また勝者・敗者・引き分けオスの貯精嚢に比べて、そのオスが交尾したメスの受精嚢の精子数は有意に減少していた (図4.4)。これは闘争での筋繊維の消費や後脚の傷害による射精障害や、交尾後のメスの精子の選り好みと考えられる (第2章と第3章)。そのため、未だ調べられていない各オスの射精量を調査し、比較する必要がある。

最後に、闘争ペアの体サイズの増加に伴う闘争時間の延長は、体サイズによって闘争を継続する意思決定が異なることを示す重要な結果である。現在、闘争継続の意思決定を説明する主要なモデルには、

- ① 自身の能力に関する情報のみを評価する純粋自己評価 (pure self-assessment)、
- ② 自身の体力と相手から受ける損傷によるコストの累積を評価する累積評価 (cumulative assessment)、
- ③ 両競争者が自身のRHP (resource-holding potential: 資源保持能力) を基準として相手のRHPを評価する相互評価 (mutual assessment)

の3つが提唱されている (Arnott and Elwood 2009)。第2章において体サイズの大きいオスが勝利する傾向が示され、さらにオス同士の体サイズ差が大きい場合には闘争時間が短縮されたこと、第3章において長時間の闘争がメスに貯蔵される精子数の減少を引き起こすことが示されたこと、加えて第4章において体サイズを揃えたオスペアでは、体サイズの大きいペアほど闘争時間が延長したことを踏まえると、本種における闘争継続の意思決定は、自身の能力のみを評価する純粋自己評価モデルによって最もよく説明されると考えられる。なぜなら、累積評価モデルでは、損傷コストを考慮した結果、精子数の減少といった繁殖上の不利益が生じるまで闘争を継続することは想定されにくい。また、相互評価モデルに基づく場合、体サイズが同じオス同士の闘争や、ペア間で体サイズが異なる場合において、体サイズと闘争時間との間に一貫した相関は認められないと予測されるからである。この仮説は敗者や逃走したオスの適応度が著しく減少する場合、相手の能力にかかわらず高コストな闘争に参加せざるを得ない考察とも一致する (Massot et al. 2025)。結論、この結果は闘争における意思決定の研究に重要であり、野外条件を考慮したメスの存在やナワバリの保有、交尾経験の有無も考慮した実験も行うべきである。

第5章 日本のゴミムシダマシ3種における性的二型

はじめに

第2章でも述べた通り、幅広い種において雌雄間で形質が異なる性的二型が確認されている。多くの場合、性的二型はオス同士の闘争で用いられる武器形質や、オスがメスにアピールするための装飾形質などが研究されている。これらの性的二型は種間で多様性が見られ、一説として、種の生息環境や繁殖生態によって、多様化すると考えられている (Caro et al. 2003; Emlen 2008; Stuart-Fox and Moussalli 2007; Tsuboi et al. 2012; Tsuji and Fukami 2020)。シクリッドでは、岩礁のような複雑な生息地に比べて、砂地のような単純な生息地に生息する種では体色や体の形状の性的二型が発達しており、これは環境による魚の視覚能力の差によるものと考えられており、単純な砂地環境では捕食者回避のための運動検出能力が重視され、複雑な岩礁環境では空間認知やナビゲーションへの要求が高いとされるためである (Tsuboi et al. 2012)。

武器形質や装飾形質以外の性的二型も存在する。例えば、ライバルオスの攻撃から自身を守る防御形質 (Emberts and Wiens 2021) や、交尾相手を探し、交尾相手の上にマウントし把握するための脚の性的二型もある (Benowitz et al. 2012; Enders et al. 1998)。この脚の性的二型も生息環境によって、多様化する可能性がある。例えば、交尾相手を探す場合、森林などの込み合った環境では、脚は短く小回りが利くようになり、反対に草原のような開けた場所では、足が長くなるかもしれない。しかし、脚の性的二型 (武器形質や装飾形質以外の) における、種間の生息地による影響を調べた研究は限られている。(But see Stuart-Fox and Moussalli 2007)。

ゴミムシダマシ科は種数が豊富な上、その形態は驚くほど多様である (Kergoat et al. 2014)。種間の形態も豊富であるが、性的二型も多様である。例えば、オスの武器形質である大顎が発達しているオオツノコクヌストモドキや、角が発達したファンガスフォークドビートル (*Bolitotherus cornutus*)、武器形質ではないものの、闘争や交尾に有利とされる脚が発達しているナミブゴミムシダマシ (*Onyriacris plana*) などが報告されている (Enders et al. 1998)。また武器形質や装飾形質以外の脚の性的二型としては、*B. cornutus* は交尾時にライバルオスからの妨害を防ぐため脚を長くし、メスをより強力に把握する (Benowitz et al. 2012)。また *O. plana* はオスの長い脚はメスの探索や地中に潜るメスを把握するために使われているとされている (Enders et al. 1998)。しかし、ゴミムシダマシ科の性的二型での生息地による影響を調べた知見は乏しい。よって本研究では、日本の一般的なゴミムシダマシであり、生息地が異なるユミアシゴミムシダマシ (*Promethis valgipes*) (以下、ユミアシ)、コスナゴミムシダマシ (*Gonocephalum coriaceum*) (以下コスナ)、オオスナゴミムシダマシ (*Gonocephalum pubens*) (以下、オオスナ) の3種における脚の性的二型を調べた。具体的には、前脚、中脚、後脚の長さや各脚の頸節幅と腿節幅を計測し、形態も観察した。また、ゴミムシダマシの生態学的な知見は少ないため、対象種における生活史の観察も行った。

材料および方法

昆虫の採取場所と捕獲方法、

本研究で用いた昆虫は全て 2023 年 9-10 月に岡山県内で捕獲された。ユミアシは半田山 (34.693245° N, 133.919843° E)、コスナは岡山大学内の芝生 (34.68551° N, 133.91918° E)、オオスナは牛窓海浜公園 (34.61898° N, 134.17286° E) で捕獲された。捕獲方法はプラスチックコップ (90 × 45 mm, Artnap; Gihu) を用いたピットフォールトラップを用いた。ただし、ユミアシのみ捕獲が芳しくなかったため、朽木の下や徘徊している個体を捕まえた。

計測部位とその計測方法

全ての個体は冷凍処理 (-18 から -24℃) 行い、計測した。雌雄判別は生殖器の形態に基づいて判別した。その結果、ユミアシ (オス : n=16, メス : n=16)、コスナ (オス : n=30, メス : n=30)、オオスナ (オス : n=30 メス : n=30)、計測部位は前胸部中部幅、左右の前・中・後脚の頸節の長さ、前脚幅および腿節の長さ、中部幅とした (図 5.1)。各種の前脚の頸節では湾曲が見られたため、複数の直線を使い、その合計値を頸節の長さとした。前脚、中脚、後脚の長さは各頸節と腿節の長さの合計値とした。各脚の腿節の中部幅の計測方法は、最初に腿節の長さを計測し、その中間点から幅を計測した。前胸部の中部幅の計測方法は最初に前胸部の前部を測り、その中間点から前胸部長を計測し、その前胸部長の中点から中部幅を計測した。これらの部位はデジタルカメラ (DP23, Tokyo) が付属した立体顕微鏡 (SZX10, Olympus, Tokyo) で撮影し、0.001 mm 単位で付属の計測ソフトウェア (DP23, Olympus; Tokyo)) で計測した。

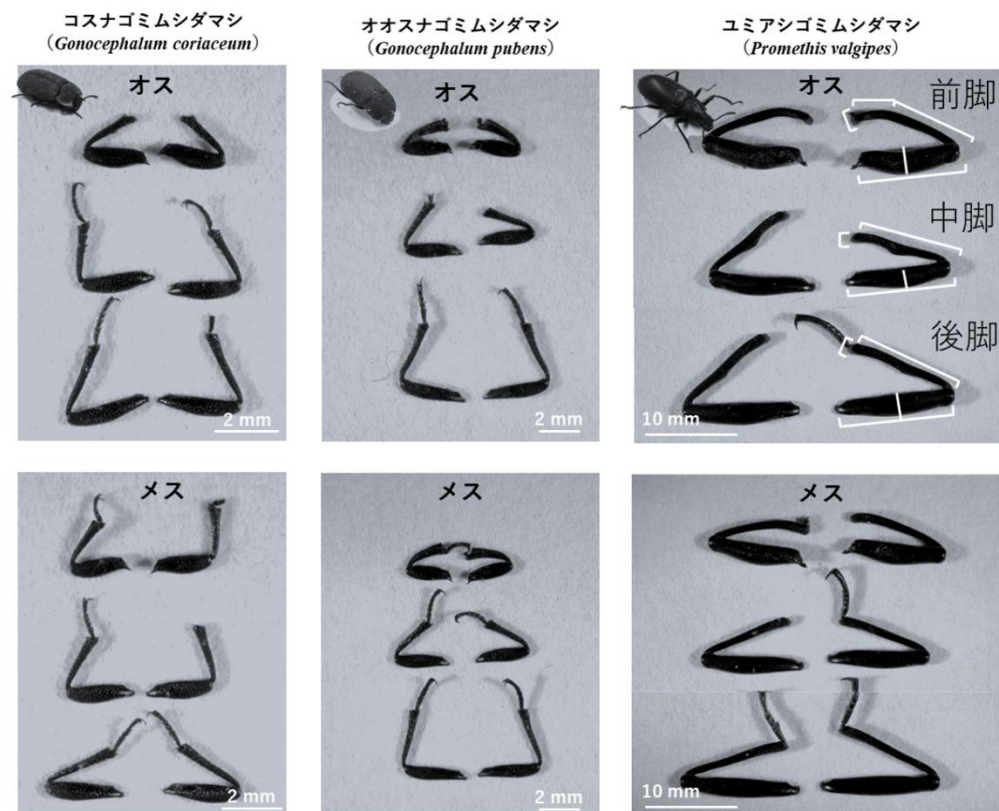


図 5.1 性的二型に関する測定部位。白線は測定した部位を示す。計測部位は左右の前脚の頸節長および頸節の前部幅、左右の前脚の腿節長および腿節の中部幅、左右の中脚の頸節長および頸節の前部幅、左右の中脚の腿節長および腿節の中部幅、左右の後脚の頸節長および頸節の前部幅、左右の後脚の腿節長および腿節の中部幅である。湾曲した部分は複数の直線を用いて計測した。

統計解析

前脚・中脚・後脚の長さや幅に対する種および性別の影響を検討するため、多変量共分散分析（MANCOVA）を行った。応答変数には前脚長・中脚長・後脚長を、説明変数には、種名、性別、およびそれらの交互作用を設定し、共変量として前胸部中部幅を用いた。事後検定には、R package *emmeans* を用い、種間比較ではボンフェローニ補正を行った。

また、種ごとにおける体サイズの性的二型を調べるために、分散分析（ANOVA）を行った。応答変数には前胸部の中部幅（体サイズの代替サイズ）を、説明変数には、種名、性別、およびそれらの交互作用を設定した。事後検定には、R package *emmeans* を用い、ボンフェローニ補正を行った。

すべての統計解析はRソフトウェア（ver. 4.5.1）で実施し、有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果

脚の形態と生活史の観察

ユミアシ（オス：n=16，メス：n=16）では、オス 16 匹の全個体で中脚に凸状の突起がみられた（図 5. 2）。コスナ（オス：n=30，メス：n=30）では、オス 30 匹の全個体で中脚に棘状の突起がみられた（図 5. 2）。オオスナ（オス：n=30 メス：n=30）では、オス 30 匹の全個体で全脚でどの突起もみられなかった（図 5. 2）。

今回のトラップの回収と捕獲は昼間に行った。ユミアシとコスナは徘徊している個体もいたが、オオスナは観察されなかった。また、コスナのトラップにはオオスナは入っておらず、おオオスナのトラップにはコスナは入っていなかった。



図 5. 2 オスの脚の性的二型。オスのコスナの中脚には棘、オスのユミアシの中脚には凸状の突起がみられた。オオスナにはどの脚にも棘や突起は見られなかった。

種ごとにおける体サイズの性的二型

全ての種で体サイズの性的二型は見られた（表 5. 1）。ユミアシではオスがメス比べて体サイズが大きく、オオスナとコスナではメスがオスに比べて大きかった（表 5. 1）。

表 5. 1 種ごとの体サイズ（オスとの比較）に対する ANOVA の結果。

種名	性別	係数	SE	自由度	<i>t</i>	<i>p</i>
ユミアシ	メス	-662.352	145.6193	146	-4.549	<.0001
オオスナ	メス	352.66	106.3453	146	3.316	0.001
コスナ	メス	326.259	106.3453	146	3.068	0.002

種ごとにおける脚の性的二型

ほぼすべての種の前・中・後脚で、オスの脚の長さはメスに比べて長い傾向にあった（表 5.2、図 5.3）。オスのオオスナとコスナは前・中・後脚の長さはメスに比べて長かった（表 5.2）。オスのユミアシでは前・中脚の長さがメスに比べて長かった（表 5.2）。

また、オスのオオスナとコスナでは前・中・後脚の腿節が長く、オスのユミアシでは中・後脚の腿節が長かった（表 5.2）。頸節幅は、オスのコスナの後脚でメスに比べて長く、ユミアシでは、メスの前脚でオスに比べて長かった（表 5.2）。また、これら以外の種ごとの各脚では有意な差は見られなかった（表 5.2）。

表 5.2 種ごとの脚（オスとの比較）に対する MANCOVA の結果。

ユミアシゴミムシダマン

計測部位	性別	係数	SE	自由度	<i>t</i>	<i>p</i>
前脚長	メス	-1129	128	145	-8.839	<.0001
前脚の腿節幅	メス	-13.1	20.4	145	-0.642	0.5219
前脚の頸節幅	メス	115.3	33.3	145	3.467	0.0007
中脚長	メス	-682	102	145	-6.708	<.0001
中脚の腿節幅	メス	-66.9	17.7	145	-3.779	0.0002
中脚の頸節幅	メス	16.8	15.1	145	1.11	0.2687
後脚長	メス	-240	133	145	-1.8	0.0739
後脚の腿節幅	メス	-68.7	16	145	-4.303	<.0001
後脚の頸節幅	メス	-27.5	15.1	145	-1.825	0.0701

オオスナ

計測部位	性別	係数	SE	自由度	<i>t</i>	<i>p</i>
前脚長	メス	-432	90.5	145	-4.769	<.0001
前脚の腿節幅	メス	-50.2	14.5	145	-3.469	0.0007
前脚の頸節幅	メス	0.117	23.6	145	0.005	0.9961
中脚長	メス	-369	72	145	-5.123	<.0001
中脚の腿節幅	メス	-38.3	12.6	145	-3.05	0.0027
中脚の頸節幅	メス	-16.5	10.7	145	-1.542	0.1252
後脚長	メス	-355	94.4	145	-3.758	0.0002
後脚の腿節幅	メス	-23	11.3	145	-2.028	0.0444
後脚の頸節幅	メス	-19.2	10.7	145	-1.801	0.0738

コスナ

計測部位	性別	係数	SE	自由度	<i>t</i>	<i>p</i>
前脚長	メス	-635	90.1	145	-7.046	<.0001
前脚の腿節幅	メス	-98.8	14.4	145	-6.858	<.0001
前脚の頸節幅	メス	-17.3	23.5	145	-0.737	0.4622
中脚長	メス	-510	71.6	145	-7.121	<.0001
中脚の腿節幅	メス	-67.4	12.5	145	-5.394	<.0001
中脚の頸節幅	メス	-13.3	10.7	145	-1.243	0.216
後脚長	メス	-583	93.9	145	-6.208	<.0001
後脚の腿節幅	メス	-56.5	11.3	145	-5.018	<.0001
後脚の頸節幅	メス	-26.8	10.6	145	-2.518	0.0129

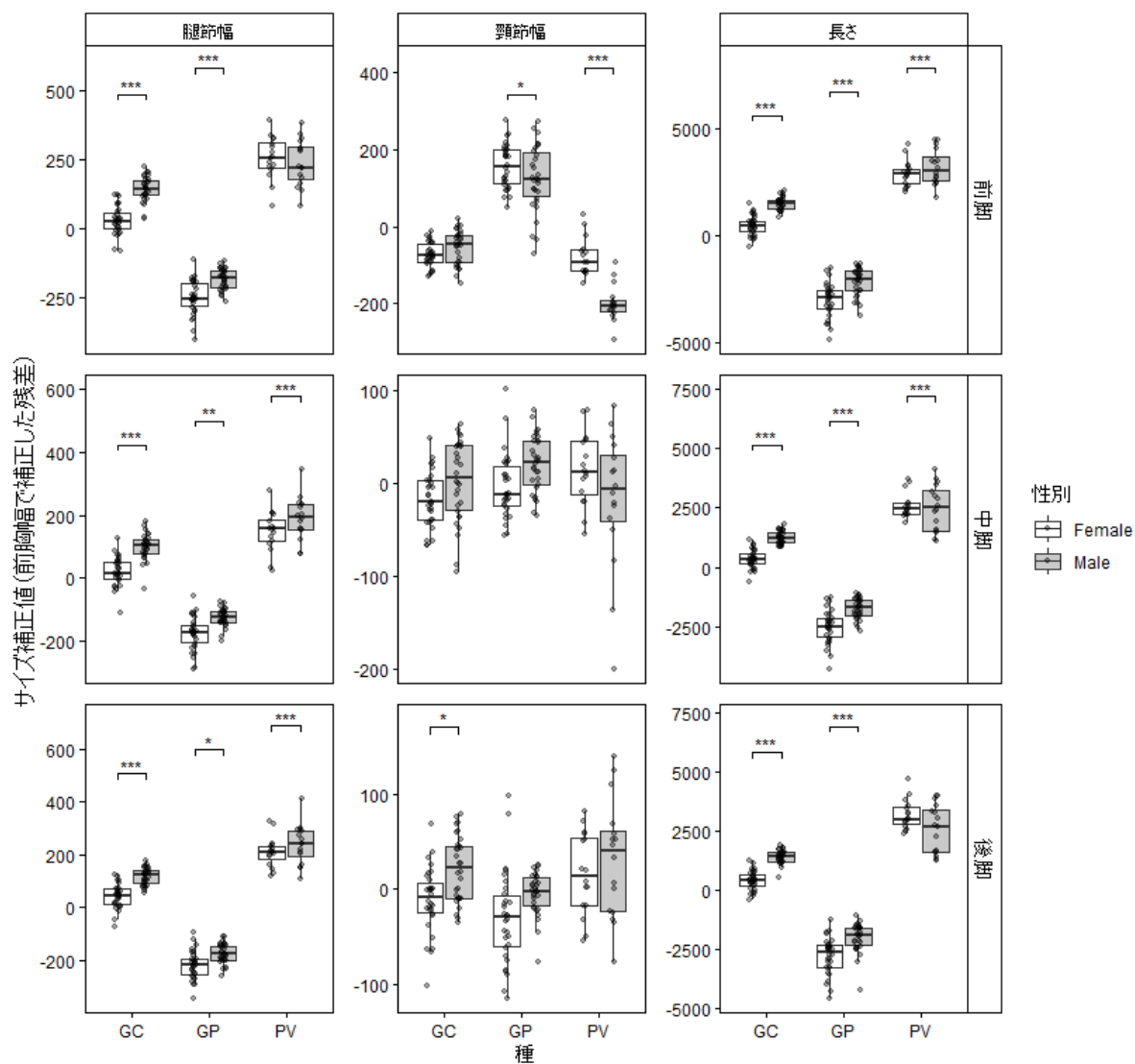


図 5.3 雌雄間の比較結果。縦軸は前胸幅でサイズ補正した各形質の値（回帰残差）を示し、横軸は種を示す。GC=コスナゴミムシダマシ、GP=オオスナゴミムシダマシ、PV=ユミアシゴミムシダマシ。箱ひげ図は分布（中央値、四分位範囲）を示し、点は個体データを示す。白色はメス、灰色はオスを示す。括弧とアスタリスクは各種内における雌雄間の有意性を示し（*emmeans* による事後比較、ボンフェローニ補正）、* $p \leq 0.05$ 、** $p \leq 0.01$ 、*** $p \leq 0.001$ 。

性別ごとの脚の種間比較

前・中・後脚長ではオス間でユミアシ、コスナ、オオスナの順に有意に長かった（表 5.3、図 5.4）。メス間ではユミアシがコスナとオオスナと比べて前・中・後脚が長かく、メスのコスナはオオスナに比べて長かった（表 5.3）。前・中・後脚の腿節幅では雌雄ともにユミアシ、コスナ、オオスナの順に有意に長かった（表 5.3）。前脚の頸節幅では雌雄ともにオオスナがコスナ、ユミアシと比べて長かった（表 5.3）。中・後脚の頸節幅では、ユミアシ、オオスナ、コスナの順に長い傾向があり、メスの中脚の頸節幅ではユミアシ、オオスナ、コスナの順に有意に長かった（表 5.3）。後脚の頸節幅では雌雄ともにユミアシがオオスナとコスナに比べて長かった（表 5.3）。

表 5.3 性別ごとの脚の種間比較 (MANCOVA)。

前脚長						
性別	比較	係数	SE	自由度	<i>t</i>	<i>p</i>
Female	コスナ - オオスナ	678.812	177.021	145	3.835	0.001
	コスナ - ユミアシ	-6795.2	261.219	145	-26.014	<.0001
	オオスナ - ユミアシ	-7474.1	135.053	145	-55.342	<.0001
Male	コスナ - オオスナ	881.732	175.463	145	5.025	<.0001
	コスナ - ユミアシ	-7289.6	323.881	145	-22.507	<.0001
	オオスナ - ユミアシ	-8171.4	186.455	145	-43.825	<.0001

前脚の腿節幅						
性別	比較	係数	SE	自由度	<i>t</i>	<i>p</i>
Female	コスナ - オオスナ	166.992	28.3034	145	5.900	<.0001
	コスナ - ユミアシ	-403.8	41.7655	145	-9.668	<.0001
	オオスナ - ユミアシ	-570.8	21.5932	145	-26.434	<.0001
Male	コスナ - オオスナ	215.545	28.0543	145	7.683	<.0001
	コスナ - ユミアシ	-318.15	51.7844	145	-6.144	<.0001
	オオスナ - ユミアシ	-533.7	29.8117	145	-17.902	<.0001

前脚の頸節幅						
性別	比較	係数	SE	自由度	<i>t</i>	<i>p</i>
Female	コスナ - オオスナ	-240.82	46.1037	145	-5.224	<.0001
	コスナ - ユミアシ	-12.8979	68.03232	145	-0.190	1.000
	オオスナ - ユミアシ	227.927	35.1734	145	6.480	<.0001
Male	コスナ - オオスナ	-223.41	45.6979	145	-4.889	<.0001
	コスナ - ユミアシ	113.0214	53.94674	145	2.095	0.114
	オオスナ - ユミアシ	343.144	48.5606	145	7.066	<.0001

後脚長						
性別	比較	係数	SE	自由度	<i>t</i>	<i>p</i>
Female	コスナ - オオスナ	359.9859	184.5708	145	1.950	0.159
	コスナ - ユミアシ	-7182.1	272.359	145	-26.370	<.0001
	オオスナ - ユミアシ	-7542.1	140.813	145	-53.561	<.0001
Male	コスナ - オオスナ	588.373	182.946	145	3.216	0.005
	コスナ - ユミアシ	-6838.8	337.694	145	-20.251	<.0001
	オオスナ - ユミアシ	-7427.1	194.407	145	-38.204	<.0001

後脚の腿節幅						
性別	比較	係数	SE	自由度	<i>t</i>	<i>p</i>
Female	コスナ - オオスナ	124.179	22.1352	145	5.610	<.0001
	コスナ - ユミアシ	-379.79	32.6634	145	-11.627	<.0001
	オオスナ - ユミアシ	-503.97	16.8873	145	-29.843	<.0001
Male	コスナ - オオスナ	157.737	21.9403	145	7.189	<.0001
	コスナ - ユミアシ	-392	40.4988	145	-9.679	<.0001
	オオスナ - ユミアシ	-549.74	23.3148	145	-23.579	<.0001

後脚の頸節幅						
性別	比較	係数	SE	自由度	<i>t</i>	<i>p</i>
Female	コスナ - オオスナ	-23.1659	20.89519	145	-1.109	0.808
	コスナ - ユミアシ	-93.139	30.8337	145	-3.021	0.009
	オオスナ - ユミアシ	-69.973	15.9413	145	-4.389	<.0001
Male	コスナ - オオスナ	-15.6364	20.71126	145	-0.755	1.000
	コスナ - ユミアシ	-93.877	38.2302	145	-2.456	0.046
	オオスナ - ユミアシ	-78.24	22.0087	145	-3.555	0.002

中脚長						
性別	比較	係数	SE	自由度	<i>t</i>	<i>p</i>
Female	コスナ - オオスナ	201.5076	140.8076	145	1.431	0.464
	コスナ - ユミアシ	-6361.3	207.781	145	-30.616	<.0001
	オオスナ - ユミアシ	-6562.8	107.425	145	-61.092	<.0001
Male	コスナ - オオスナ	342.795	139.568	145	2.456	0.046
	コスナ - ユミアシ	-6532.7	257.624	145	-25.358	<.0001
	オオスナ - ユミアシ	-6875.5	148.311	145	-46.359	<.0001

中脚の腿節幅						
性別	比較	係数	SE	自由度	<i>t</i>	<i>p</i>
Female	コスナ - オオスナ	115.55	24.5502	145	4.707	<.0001
	コスナ - ユミアシ	-254.57	36.2271	145	-7.027	<.0001
	オオスナ - ユミアシ	-370.12	18.7298	145	-19.761	<.0001
Male	コスナ - オオスナ	144.638	24.3341	145	5.944	<.0001
	コスナ - ユミアシ	-254.14	44.9174	145	-5.658	<.0001
	オオスナ - ユミアシ	-398.77	25.8585	145	-15.421	<.0001

中脚の頸節幅						
性別	比較	係数	SE	自由度	<i>t</i>	<i>p</i>
Female	コスナ - オオスナ	-65.765	20.9641	145	-3.137	0.006
	コスナ - ユミアシ	-111.96	30.9354	145	-3.619	0.001
	オオスナ - ユミアシ	-46.192	15.9939	145	-2.888	0.013
Male	コスナ - オオスナ	-69.043	20.7796	145	-3.323	0.003
	コスナ - ユミアシ	-81.9056	38.35627	145	-2.135	0.103
	オオスナ - ユミアシ	-12.8628	22.08131	145	-0.583	1.000

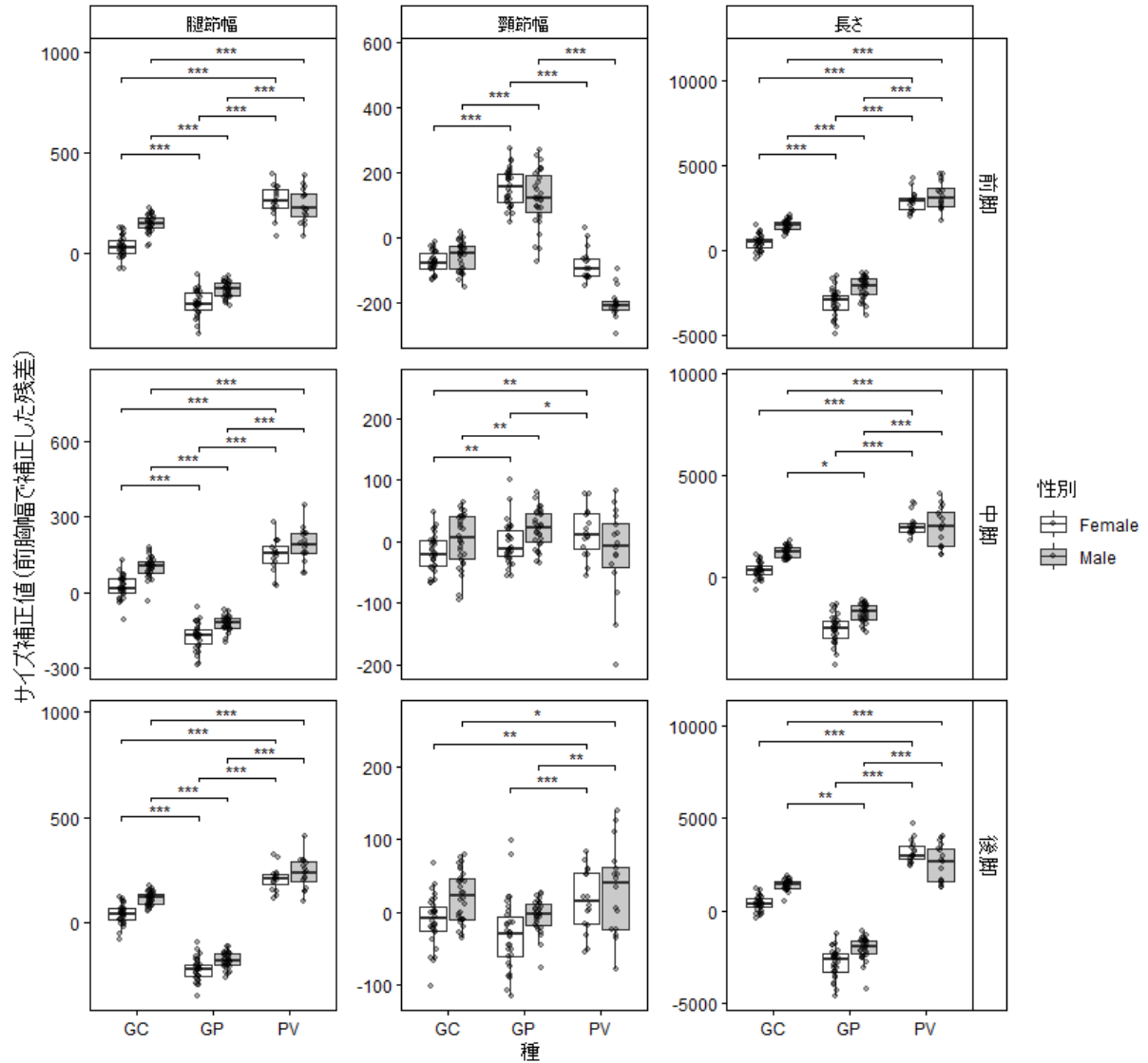


図 5.4 種間の比較結果。縦軸は前胸幅でサイズ補正した各形質の値（回帰残差）を示し、横軸は種を示す。GC=コスナゴミムシダマシ、GP=オオスナゴミムシダマシ、PV=ユミアシゴミムシダマシ。箱ひげ図は分布（中央値、四分位範囲）を示し、点は個体データを示す。白色はメス、灰色はオスを示す。括弧とアスタリスクは雌雄別の種間の有意性を示し（*emmeans* による事後比較、ボンフェローニ補正）、* $p \leq 0.05$ 、** $p \leq 0.01$ 、*** $p \leq 0.001$ 。

考察

オスのユミアシとコスナの中脚には突起の性的二型がみられた。これは交尾時のメスの把握に有利になると考えられるが、ユミアシの凸とコスナの棘の形態の多様性はまだわからない。ユミアシではオスがメスに比べて体サイズが大きく、コスナではメスがオスに比べて体サイズが大きかった（表 5.1）。そのため、オスの体サイズが小さいコスナではより把握しやすくするために棘状にしているのかもしれない。しかし、コスナ同様にオスの体サイズが小さいオオスナ脚にはどの突起もなかった。そのため、交尾相手の把握以外にも機能があるのかもしれない。

オスのオオスナとコスナはすべての脚の長さはメスに比べて長かった。また、オスのユミアシは前・中脚の長さがメスに比べて長かった（表 5.2、図 5.3）。そして、オスのオオスナとコスナはすべての脚の腿節幅はメスに比べて長かった（表 5.2、図 5.3）。これらの性的二型は交尾時の把握、メスの探索に有利になると考えられる。ファンガスフォークドビートルでは、オスの長い脚は交尾時にメスを把握する時に重要であると示唆されている（Benowitz et al. 2012）。また、他のゴミムシダマシでは地中にメス埋まっているメスを把握することにも有利になる（Enders et al. 1998）。そのため、海岸の砂浜に生息するオオスナ、芝の土に生息するコスナでの地中の交尾相手を把握する時に有利に働くかもしれない。そして、今回の3種では、頸節幅はいくつかの脚で性的二型がみられたが、脚の長さとは比べて少なかったため、交尾時の把握、メスの探索にはあまり作用しない可能性がある。

オス内では、全ての脚の長さとは腿節幅はユミアシ、コスナ、オオスナの順で長かった（表 5.3、図 5.4）。メス内では、全ての脚の長さとは腿節幅はユミアシが他の2種よりも長かった（表 5.3、図 5.4）。また、前脚の長さとは全脚の腿節幅では、メスのコスナはメスのオオスナに比べて長かった（表 5.3、図 5.4）。雌雄の種間比較の結果から、森林、芝、砂浜の順に脚の長さとは腿節幅が発達しており、生息地による脚形質の発達が示唆された。これは平坦な芝や砂浜に比べて、複雑な地形である森林で脚形質が重要であると示唆された。その理由は、森林は倒木や地面の凹凸が多いと考えられ、これらの障害物を歩行で超える場合、脚が長く、より多くの筋力があった方が良く考えられる。しかしながら砂漠のゴミムシダマシ種では脚の長い種が多く存在する（Enders et al. 1998; Swichtenberg et al. 2023）。砂漠に生息するゴミムシダマシの長い脚は捕食者からの逃走や砂漠での体温調整に役立つとされている（Enders et al. 1998）。このことから、今後はより幅広い環境で生息する種を加えて解析すべきではある。

第6章 総合考察

進化生態学において、性選択における同性間競争は重要な研究分野であり、とくにオス間闘争は多くの研究者によって研究されてきた (Emlen 2008)。オス同士の闘争は、単にオスの勝敗を決定し、メスや縄張りを獲得するための手段にとどまらず、その後のオスの繁殖戦略を変化させ、探索行動、交尾行動、攻撃行動、精子競争、さらには適応度にも影響を及ぼすことが明らかになっている。しかし、闘争結果に着目し、オスの行動変化や精子競争、適応度への影響を包括的に検討した研究は依然として限られている。

本研究では、他の動物種には見られないジャイアントミルワームに特有の後脚を噛み合う闘争に着目し、闘争結果が繁殖生態に及ぼす影響と、この脚咬み闘争行動の適応的意義を明らかにすることを目的とした。

第2章では、ジャイアントミルワームのオス間闘争において、敗者オスは勝者オスおよび未闘争オスと比較して交尾器の挿入時間に差は見られなかったものの、敗者オスと交尾したメスの産卵数および孵化数が有意に減少することが示された。この結果は、敗者オスの方が子孫数を増加させたキイロショウジョウバエの研究結果とは対照的であり、非常に興味深い。第3章では、産卵数および孵化数が減少した要因を解明するため、各オスとの交尾後におけるメスの精子貯蔵器官である受精嚢内の精子数を測定した。その結果、未闘争オスと比較して、敗者オスおよび長時間の闘争の末に決着がつかなかった引き分けオスと交尾したメスでは、受精嚢内に貯蔵される精子数が有意に減少していた。従来、オス間闘争が精子特性に及ぼす影響を調べた研究では、敗者オスはメスとの交尾機会の減少が予測されるため、自身の適応度を補償的に高める戦略として、射精量の増加 (Okada et al. 2010) や精子の防御能力の向上 (Filice and Dukas 2019) を示すことが報告されている。しかし、本種ではこれらとは逆の結果が得られた。この要因として、闘争による後脚筋繊維の消耗や損傷が不正確な射精を引き起こした可能性が考えられる。多様な動物種で闘争による負傷は確認されてきた (Peixoto and Machado 2025)。しかし、今回の実験結果は、従来想定されてきた闘争による負傷が配偶者探索を妨げることや代謝コストの増大 (Alcock 1996 ; Emberts et al. 2021)、さらには致死的影响 (Bean and Cook 2001) とは異なる、新たな視点を提供するものである。

また、本結果は、「なぜ高いコストを伴う闘争行動が多くの種で維持されているのか」という進化生態学上の根本的な問いに答える上でも重要である。本種において高コストな闘争が進化した理由は依然として不明であるが、敗者が繁殖成功を著しく失うような種において、高コストな闘争が進化しやすいことが示唆されている (Massote et al. 2025)。このことから、本種ではオスの適応度向上において縄張り（繁殖地と同じ意味で使用）の確保が極めて重要である可能性が考えられる。本種は熱帯雨林に生息するが (Rumbos and Athanassiou 2021)、小麦粉を摂食して繁殖する貯穀害虫でもあり (Rumbos and Athanassiou 2021)、さらに著者の飼育経験から、産卵床が湿潤な条件では幼虫の死亡率が高いことが観察されている。これらの点から、本種の繁殖には一定の乾燥環境が必要であると考えられる。そのため、屋根裏部屋

(Tschinkel 1981) や朽木の内部・下部といった雨除け空間をナワバリとして確保する必要があり、その獲得をめぐる高コストな闘争が生じると推察される。また、同じゴミムシダマシ

科の *Phaleria testacea* では、成虫の精巢に成熟精子が多く存在することから、成虫期における連続的な精子生産が行われていない可能性が示唆されている (Rezende et al. 2024)。本種についても同様の検討が必要であるが、もし精子生産が限定的であれば、精子そのものの価値が高く、確実に交尾相手を得る必要がある。そのため高コストな闘争行動が進化したかもしれない。さらに、野生下では個体間の体サイズ差が大きく、長時間闘争が生じやすい大型オス同士の遭遇頻度が低い可能性も考えられる。そのため、自然条件下では脚咬み闘争が成立・エスカレートする機会は稀であるのかもしれない。実際に、闘争が重度の傷害を伴うほどエスカレートする場合は、大型オス同士であることが報告されている (Alcock 1996 ; Eberhard 1998)。これらを踏まえた本種のさらなる研究は、闘争コストの進化理解に大きく貢献すると考えられる。

また、ジャイアントミルワームは家畜の代替飼料 (Rumbos and Athanassiou 2021) やプラスチック分解生物 (Yang et al. 2020) としても注目されており、本種の生態学的知見は産業的観点からも重要である。とりわけ、大量飼育および累代飼育を前提とする代替飼料研究においては、本研究のような繁殖生態学的知見は不可欠である。したがって、本研究は進化生態学のみならず、応用昆虫学の分野においても重要な意義を有すると結論づけられる。

摘要

本研究では、これまで研究例が限られていた闘争結果が繁殖生態に及ぼす影響について検討した。その結果、ジャイアントミルワームにおける闘争結果は交尾器の挿入時間には影響しなかった一方で、産卵数、孵化数、およびオスと交尾したメスの受精嚢内に貯蔵される精子数に影響を及ぼすことが明らかになった。また、闘争結果はオス自身の貯精嚢内の精子数には影響しなかった。本研究で得られた主要な知見を以下に示す。

1. 性的二型と闘争結果による交尾器の挿入時間、産卵数、孵化数への影響

ジャイアントミルワームにおいて、どの形態形質に性的二型が現れるのかを明らかにするため、ほぼすべての部位について長さおよび幅を測定した。その結果、オスでは頭部や大顎およびその歯幅が発達しており、一方でメスでは鞘翅幅が発達していた。これらの結果は、オスでは後脚を噛む闘争行動に適応して頭部および大顎が発達し、メスでは産卵のため腹部（鞘翅部）が発達したことを示唆している。

次に、闘争結果（未闘争、勝者、敗者）が交尾器挿入時間、各オスと交尾したメスの産卵数および孵化数に及ぼす影響を検討した。その結果、敗者オスは未闘争オスおよび勝者オスと比較して、交尾器挿入時間に差は認められなかったものの、産卵数および孵化数は著しく減少していた。これは、闘争による後脚の損傷によって適切な交尾姿勢の維持が困難となり、精子移送が阻害されたためであると考えられる。

2. 闘争結果によるメスの受精嚢内の精子数への影響

闘争結果による適応度低下の要因が精子移送の不具合にあるかを検証するため、未闘争オス、勝者オス、敗者オス、引き分けオスと交尾したメスの受精嚢内に貯蔵された精子数を測定した。その結果、未闘争オスと比較して、敗者オスおよび引き分けオスと交尾したメスでは、貯蔵精子数が有意に減少していた。本研究では雌雄一対一の交尾実験を行っており、さらに、決着がつかず長時間闘争した引き分けオスにおいても精子数の減少が認められたことから、この減少は交尾前後のメスの配偶者選択ではなく、オスの精子移送の不具合によるものであると考えられる。

3. 闘争結果におけるオスの貯精嚢内の精子数への影響

多くの動物種において、社会的地位の変化に応じて繁殖戦略が変化することが知られている。しかし、精子生産に関する戦略は種によって大きく異なり、幅広い分類群における体系的な研究が必要である。本研究では、研究例の少ない甲虫類を対象として、闘争結果（未闘争、勝者、敗者、引き分け）がオスの精子生産に及ぼす影響を調べた。その結果、本種では闘争結果がオスの貯精嚢内精子数に影響しないことが明らかとなり、交尾行動に差異が生じると示唆された。また、本研究は、ゴミムシダマシ科におけるオスの精子生産や精子貯蔵能力について、さらなる詳細な研究が必要であることを示している。

4. 日本のゴミムシダマシ3種における性的二型

多く生物の性的二型は近縁種であっても驚くほど多様である。これは種の生息環境に関連すると考えられている。しかし、これらの調査は武器形質や装飾形質を対象とした研究が多く、その他の性的二型での研究は限られている。そこで本研究では、性的二型や生活史の知見が少ない日本のゴミムシダマシ3種（ユミアシゴミムシダマシ、コスナゴミムシダマシ、オオスナゴミムシダマシ）を対象にした。その結果、森林に生息するユミアシゴミムシダマシはコスナゴミムシダマシとオオスナゴミムシダマシに比べて、脚形質が発達していた。これは倒木や地面の起伏が多い環境に適応した結果かもしれない。しかし、砂漠に生息するゴミムシダマシにおいても脚形質が発達しているため、幅広い種を対象とした更なる研究が必要である。

謝辞

本研究の遂行にあたり、岡山大学大学院環境生命自然科学研究科の宮竹貴久教授ならびに藤岡春菜助教、東京大学大学院総合文化研究科の松村健太郎助教には研究の構想段階から論文完成に至るまで、終始懇切丁寧なご指導と貴重なご助言を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

また、岡山大学大学院環境生命自然科学研究科の兵藤不二夫教授ならび、廣部宗教授、三木直子教授、本研究の遂行過程を通じて多くの有益なご教示を頂きました。厚く御礼申し上げます。

甲南大学の後藤彩子准教授には、第3章および第4章における受精囊および貯精囊の同定に関して、専門的なご助言を賜りましたことに深く感謝いたします。

岡山大学大久保祐作講師には、本論文における統計手法について専門的なご助言を賜りましたことに深く感謝申し上げます。

昆虫生態学研究室の皆様には、本研究の遂行過程を通して多大なるご指導とご協力を頂き、研究活動のみならず、さまざまな面において温かいご支援を賜りました。ここに、研究室に在籍されていたすべての方々に心より感謝申し上げます。

本研究は、大本育英会給付型奨学金の支援を受けて遂行することができました。ここに記して感謝の意を表します。

最後に、長年にわたる学生生活を支え、常に温かく見守り続けてくれた両親に、心より感謝いたします。

本研究の公表論文

Matsuura, T., & Miyatake, T. (2024). Reduced fitness in losers of leg-biting male combat compared to uncontested males in *Zophobas atratus*. *JOURNAL OF ETHOLOGY*, 42(3), 177-185.

Matsuura, T., & Miyatake, T. (2025). Leg-biting fights reduce the number of sperm transferred by the loser and in draws in *Zophobas atratus*. *JOURNAL OF ETHOLOGY*, 43(3), 193-200.

引用文献

- Alcock, J. (1996). Male size and survival: The effects of male combat and bird predation in Dawson's burrowing bees, *Amegilla dawsoni*. *ECOLOGICAL ENTOMOLOGY*, 21(4), 309-316.
- Amino, K., & Matsuo, T. (2023). Effects of a past contest on the future winning probability in a hyper-aggressive fruit fly. *ETHOLOGY*, 129(8), 380-389.
- Andersson, M. (1982). Female choice selects for extreme tail length in a widowbird. *NATURE*, 299(5886), 818-820.
- Arnott, G., & Elwood, R. (2009). Assessment of fighting ability in animal contests. *ANIMAL BEHAVIOUR*, 77(5), 991-1004.
- Bacqué-Cazenave, J., Cattaert, D., Delbecque, J., & Fossat, P. (2017). Social harassment induces anxiety-like behaviour in crayfish. *SCIENTIFIC REPORTS*, 7, Article 39935.
- Bartlett, M., Steeves, T., Gemmell, N., & Rosengrave, P. (2017). Sperm competition risk drives rapid ejaculate adjustments mediated by seminal fluid. *ELIFE*, 6, Article e28811.
- Bayram, H., Franco, C., Brownridge, P., Claydon, A., Koch, N., Hurst, J.,...Stockley, P. (2020). Social status and ejaculate composition in the house mouse. *PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY B-BIOLOGICAL SCIENCES*, 375(1813), Article 20200083.
- Bean, D., & Cook, J. (2001). Male mating tactics and lethal combat in the nonpollinating fig wasp *Sycoscapter australis*. *ANIMAL BEHAVIOUR*, 62, 535-542.
- Benowitz, K., Brodie, E., & Formica, V. (2012). Morphological Correlates of a Combat Performance Trait in the Forked Fungus Beetle, *Bolitotherus cornutus*. *PLOS ONE*, 7(8), Article e42738.
- Butler, M., Sawyer, S., & Losos, J. (2007). Sexual dimorphism and adaptive radiation in Anolis lizards. *NATURE*, 447(7141), 202-205. <https://doi.org/10.1038/nature05774>
- Caro, T., Graham, C., Stoner, C., & Flores, M. (2003). Correlates of horn and antler shape in

- bovids and cervids. *BEHAVIORAL ECOLOGY AND SOCIOBIOLOGY*, 55(1), 32-41.
- Catchpole, C. (1980). Sexual selection and the evolution of complex songs among european warblers of the genus *acrocephalus*. *BEHAVIOUR*, 74, 149-166.
- Catchpole, C., Dittami, J., & Leisler, B. (1984). Differential responses to male song repertoires in female songbirds implanted with estradiol. *NATURE*, 312(5994), 563-564.
- Chen, J., & Hua, B. (2016). Sexual dimorphism of adult labial palps of the peach fruit moth *Carposina sasakii* Matsumura (Lepidoptera: Carposinidae) with notes on their sensilla. *ACTA ZOOLOGICA*, 97(1), 42-48.
- Chen, Z., Hsu, Y., & Lin, C. (2020). Allometry and Fighting Behaviour of a Dimorphic Stag Beetle *Cyclommatus mnischei* (Coleoptera: Lucanidae). *INSECTS*, 11(2), Article 81.
- Conner, J. (1995). Extreme variability in sperm precedence in the fungus beetle, *Bolitotherus cornutus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *ETHOLOGY ECOLOGY & EVOLUTION*, 7(3), 277-280.
- Darwin, C. (1871) *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex*. John Murray, London
- de la Cámara, M., Ponsioen, L., Horta-Lacueva, Q., & Kapralova, K. (2023). The Dynamic Ontogenetic Shape Patterns of Adaptive Divergence and Sexual Dimorphism. *EVOLUTIONARY BIOLOGY*, 50(2), 170-180.
- de villiers, P., & Hanrahan, S. (1991). Sperm competition in the namib desert beetle, *Onymacris unguicularis*. *JOURNAL OF INSECT PHYSIOLOGY*, 37(1), 1-8.
- Drnevich, J., Hayes, E., & Rutowski, R. (2000). Sperm precedence, mating interval, and a novel mechanism of paternity bias in a beetle (*Tenebrio molitor* L.). *BEHAVIORAL ECOLOGY AND SOCIOBIOLOGY*, 48(6), 447-451.
- Earley, R., Lu, C., Lee, I., Wong, S., & Hsu, Y. (2013). Winner and loser effects are modulated by hormonal states. *FRONTIERS IN ZOOLOGY*, 10, Article 6.
- Eberhard, WG. (1996) *Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice*.

Princeton University Press, New Jersey

Emberts, Z., Somjee, U., & Wiens, J. (2021). Damage from intraspecific combat is costly. *BEHAVIORAL ECOLOGY*, 32(6), 1240-1245.

Emberts, Z., & Wiens, J. (2021). Defensive structures influence fighting outcomes. *FUNCTIONAL ECOLOGY*, 35(3), 696-704.

Emlen, D. (2008). The Evolution of Animal Weapons. *ANNUAL REVIEW OF ECOLOGY EVOLUTION AND SYSTEMATICS*, 39, 387-413.

Enders, M., Schüle, H., & Henschel, J. (1998). Sexual dimorphism, fighting success and mating tactics of male *Onymacris plana* Peringuey (Coleoptera: Tenebrionidae) in the Namib desert. *ETHOLOGY*, 104(12), 1003-1019.

Fedina, T. (2007). Cryptic female choice during spermatophore transfer in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *JOURNAL OF INSECT PHYSIOLOGY*, 53(1), 93-98.

Fedina, T., & Lewis, S. (2008). An integrative view of sexual selection in *Tribolium* flour beetles. *BIOLOGICAL REVIEWS*, 83(2), 151-171.

Filice, D., & Dukas, R. (2019). Winners have higher pre-copulatory mating success but losers have better post-copulatory outcomes. *PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY B-BIOLOGICAL SCIENCES*, 286(1900), Article 20182838.

Gage, M., & Baker, R. (1991). Ejaculate size varies with sociosexual situation in an insect. *ECOLOGICAL ENTOMOLOGY*, 16(3), 331-337.

Harrison, L., Stuart, O., & Jennions, M. (2025). Winner-loser effects on life history traits. *JOURNAL OF EVOLUTIONARY BIOLOGY*, 38(4), 530-542.

Harrison, L., Vega-Trejo, R., & Jennions, M. (2023). The Effect of Brief or Prolonged Bouts of Winning or Losing Male-Male Contests on Plasticity in Sexually Selected Traits. *AMERICAN NATURALIST*.

Hinojosa, I., & Thiel, M. (2003). Somatic and gametic resources in male rock shrimp, *Rhynchocinetes typus*:: effect of mating potential and ontogenetic male stage.

ANIMAL BEHAVIOUR, 66, 449-458.

Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous inference in general parametric models. *BIOMETRICAL JOURNAL*, 50(3), 346-363.

Hsu, Y., Earley, R., & Wolf, L. (2006). Modulation of aggressive behaviour by fighting experience: mechanisms and contest outcomes. *BIOLOGICAL REVIEWS*, 81(1), 33-74.

Hsu, Y., & Wolf, L. (1999). The winner and loser effect: integrating multiple experiences. *ANIMAL BEHAVIOUR*, 57, 903-910.

Kergoat, G., Soldati, L., Clamens, A., Jourdan, H., Jabbour-Zahab, R., Genson, G.,...Condamine, F. (2014). Higher level molecular phylogeny of darkling beetles (Coleoptera: Tenebrionidae). *SYSTEMATIC ENTOMOLOGY*, 39(3), 486-499.

Kustan, J., Maruska, K., & Fernald, R. (2012). Subordinate male cichlids retain reproductive competence during social suppression. *PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY B-BIOLOGICAL SCIENCES*, 279(1728), 434-443.

Massote, C., Palaoro, A., Arnott, G., Jennings, D., & Peixoto, P. (2025). Do lifetime contest costs affect the evolution of assessment strategies? A meta-analysis. *JOURNAL OF ANIMAL ECOLOGY*, 94(7), 1335-1345.

Miyatake, T. (1993). Male-male aggressive-behavior is changed by body-size difference in the leaf-footed plant bug, *leptoglossus-australis, fabricius* (heteroptera, coreidae). *JOURNAL OF ETHOLOGY*, 11(1), 63-65.

Okada, K., Archer, C., Katsuki, M., Suzaki, Y., Sharma, M., House, C., & Hosken, D. (2015). Polyandry and fitness in female horned flour beetles, *Gnatocerus cornutus*. *ANIMAL BEHAVIOUR*, 106, 11-16.

Okada, K., Katsuki, M., Kiyose, K., & Okada, Y. (2020). Older males are more competitive in male fights and more aggressive toward females in the broad-horned flour beetle *Gnatocerus cornutus*. *BEHAVIORAL ECOLOGY AND SOCIOBIOLOGY*, 74(3), Article 36.

Okada, K., Yamane, T., & Miyatake, T. (2010). Ejaculatory strategies associated with

- experience of losing. *BIOLOGY LETTERS*, 6(5), 593-596.
- Park, M., Kim, S., & Yoon, H. (2024). Development of optimized artificial diets for enhanced growth of *Zophobas atratus* larvae. *ENTOMOLOGICAL RESEARCH*, 54(12), Article e70002.
- Parker, GA. (1970) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol Rev* 45:525-567
- Peixoto, P., & Machado, G. (2025). What we (don't) know about costs in animal contests. *TRENDS IN ECOLOGY & EVOLUTION*, 40(8), 782-790.
- Quennedey, A., Aribi, N., Everaerts, C., & Delbecque, J. (1995). Postembryonic development of *Zophobas atratus* fab (Coleoptera: Tenebrionidae) under crowded or isolated conditions and effects of juvenile-hormone analog applications. *JOURNAL OF INSECT PHYSIOLOGY*, 41(2), 143-152.
- Rezende, P., Paulo, M., Ayala-Costa, D., Teixeira, A., Nascimento, F., Alves, M.,...Dias, G. (2024). Evidence of antiparallel sperm bundles and limited sperm production in adult males of *Phaleria testacea* Say, 1824 (Tenebrionidae, Diaperinae). *TISSUE & CELL*, 91, Article 102621.
- Rumbos, C., & Athanassiou, C. (2021). The Superworm, *Zophobas morio* (Coleoptera:Tenebrionidae): A 'Sleeping Giant' in Nutrient Sources. *JOURNAL OF INSECT SCIENCE*, 21(2), Article 13.
- Simmons LW (2001) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton University Press, Princeton
- Stuart-Fox, D., & Moussalli, A. (2007). Sex-specific ecomorphological variation and the evolution of sexual dimorphism in dwarf chameleons (*Bradypodion* spp.). *JOURNAL OF EVOLUTIONARY BIOLOGY*, 20(3), 1073-1081.
- Swichtenberg, K., Kaminski, M., Gearner, O., Lumen, R., Kanda, K., & Smith, A. (2023). Preliminary phylogenomic analyses reveal multiple reversions to nocturnal behavior and morphology within the primarily diurnal tribe Adesmiini (Coleoptera: Tenebrionidae). *INSECT SYSTEMATICS AND DIVERSITY*, 7(4), Article 2.

- Tedore, C., & Johnsen, S. (2015). Visual mutual assessment of size in male *Lyssomanes viridis* jumping spider contests. *BEHAVIORAL ECOLOGY*, 26(2), 510-518.
- Tschinkel, W. (1981). larval dispersal and cannibalism in a natural-population of *Zophobas atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *ANIMAL BEHAVIOUR*, 29(NOV), 990-996.
- Tsuboi, M., Gonzalez-Voyer, A., Höglund, J., & Kolm, N. (2012). Ecology and mating competition influence sexual dimorphism in Tanganyikan cichlids. *EVOLUTIONARY ECOLOGY*, 26(1), 171-185.
- Tsuji, K., & Fukami, T. (2020). Sexual Dimorphism and Species Diversity: from Clades to Sites. *TRENDS IN ECOLOGY & EVOLUTION*, 35(2), 105-114.
- Tuni, C., Ferreira, J., Fritz, Y., Meneses, A., & Gasparini, C. (2016). Impaired sperm quality, delayed mating but no costs for offspring fitness in crickets winning a fight. *JOURNAL OF EVOLUTIONARY BIOLOGY*, 29(8), 1643-1647.
- Vendl, T., Stejskal, V., & Aulicky, R. (2018). First Case of Dual Size Asymmetry in an Identical Arthropod Organ: Different Asymmetries of the Combative (Sexual) and Cutting (Non-Sexual) Parts of Mandibles in the Horned Stored-Product Beetle *Gnatocerus cornutus* (Fabricius, 1798). *INSECTS*, 9(4), Article 151.
- Vilella-Pacheco, Z., Mitchem, L., Formica, V., & Brodie, E. (2021). Male competition reverses female preference for male chemical cues. *ECOLOGY AND EVOLUTION*, 11(9), 4532-4541.
- Yamane, T., Okada, K., Nakayama, S., & Miyatake, T. (2010). Dispersal and ejaculatory strategies associated with exaggeration of weapon in an armed beetle. *PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY B-BIOLOGICAL SCIENCES*, 277(1688), 1705-1710.
- Yamanouchi, H., Tanaka, R., & Kamikouchi, A. (2023). Piezo-mediated mechanosensation contributes to stabilizing copulation posture and reproductive success in *Drosophila* males. *ISCIENCE*, 26(5), Article 106617.
- Yang, Y., Wang, J., & Xia, M. (2020). Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating superworms *Zophobas atratus*. *SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT*, 708, Article 135233.