

キタキチヨウの夏型雄の精子生産と注入精子数

誌名	日本応用動物昆虫学会誌
ISSN	00214914
著者	小長谷, 達郎 渡辺, 守
巻/号	57巻4号
掲載ページ	p. 243-248
発行年月	2013年11月

キタキチョウの夏型雄の精子生産と注入精子数

小長谷 達郎・渡辺 守*

筑波大学生命環境学群生物学類

Number of Sperm Produced and Ejaculated by Male Small Yellow *Eurema mandarina* in Summer Generations. Tatsuhiro KONAGAYA and Mamoru WATANABE* College of Biological Sciences, University of Tsukuba; 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 57: 243–248 (2013)

Abstract: Mating activity of male *Eurema mandarina* in the summer generation is low shortly after emergence. Changes in the ejaculate potential of virgin males with age were examined for spermatophore mass as well as the number of eupyrene and apyrene spermatozoa produced. Fresh males just after emergence showed little mating activity. Only a single 1-day-old male succeeded in copulating with a virgin female, transferring a small spermatophore of 0.47 mg that contained 7 eupyrene sperm bundles and 47,000 apyrene spermatozoa. Spermatophore mass increased with male age. The number of spermatozoa for both types produced also increased with age. Maximum mass of spermatophore (2.0 mg) was estimated in 14-day-old males, with 107 eupyrene sperm bundles and 650,000 apyrene spermatozoa. The number of sperm transferred to the female was positively related to the number of sperm produced. Older males of more than 14 days old produced and ejaculated larger spermatophore with more sperm than younger males. Because females mate with multiple males, resulting in sperm competition across their mates, older males have higher potential to overcome this situation. The low mating activity of younger males in *E. mandarina* is a waiting strategy until the accumulation of a full-size spermatophore and a full complement of sperm.

Key words: Apyrene sperm; bursa copulatrix; eupyrene sperm bundles; male age; spermatophore

緒 言

一般に、蝶類の雄は羽化後まもなく交尾可能であるといわれてきた。例えば、モンシロチョウ *Pieris rapae* (Linnaeus) の雄は、羽化した当日から交尾可能であり、その際、約 4.5 mg の精包を雌に注入し、その中には約 10,000 本の有核精子及び約 100,000 本の無核精子が含まれていたと Wedell and Cook (1999) は報告している。羽化当日に注入された精包の重さは、注入物質 (精包) による交尾嚢への物理的的刺激が雌の交尾拒否姿勢の解発因になるという知見 (Sugawara, 1979) を考慮すると、雌の再交尾活性を抑制するために十分な量であったといえよう。また、平均的な雌の生涯産下卵数が約 450 個 (Watanabe and Ando, 1993) であることを考えると、注入された有核精子の数は、雌が生産するすべての卵を授精させるのに十分な量でもある。一方、Watanabe and Hirota (1999) によると、羽化翌日のナミアゲハ *Papilio xuthus* (Linnaeus) の 1 日齢の雄は、十分な量 (約 6 mg) の精包を雌に注入しており、

幼虫期に得た栄養で 1.5 個分の精包を生産できるという。しかし、すべての蝶類の雄が羽化直後から高い交尾活性をもつわけではないと本田 (2005) は示唆した。実際、キタキチョウ *Eurema mandarina* (de l'Orza) において、成虫越冬する秋型雄は越冬後にならないと交尾を行わず (Kato, 1986)、冬を越せない夏型雄も羽化後 3 日は経たなければ交尾活性が高まらないという (Kato, 1989)。

塚口・黒津 (1922) はキタキチョウ (原文はキチョウ) の有核精子の長さがおおよそ 1,550 μm であり、モンシロチョウ (約 580 μm) やモンキチョウ *Colias erate* (Esper) (約 560 μm) に比べ、2 倍以上長いことを明らかにした。精子の長さは雌の繁殖器官の形態と共進化すると Higginson et al. (2012) は示唆しており、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (Meigen) では長い精子ほど雌の再交尾時に起こる精子置換への抵抗性が高いと Pattarini et al. (2006) は報告している。Kato (1986) によれば、キタキチョウの野外雌は生涯に最高 4 回は交尾するので、雄が長い精子を生産しているのも、雌の多回交尾戦略への対抗

* 責任著者

2013 年 2 月 18 日受領 (Received 18 February 2013)

2013 年 7 月 26 日登載決定 (Accepted 26 July 2013)

DOI: 10.1303/jjaez.2013.243

戦略かもしれない。一方、長い精子を生産することのコストとして、羽化後の雄の性成熟の遅延が報告されている。例えば、ショウジョウバエ類では、長い精子を生産する種の雄ほど交尾活性の高まるのが遅いという (Pitnick, 1996)。したがって、キタキチョウは、精子生産において他種より時間のかかる可能性があり、それが雄にみられる羽化直後の交尾活性の低さと関係しているのかもしれない。

本研究では、キタキチョウの夏型雄が交尾時に注入する精包や精子の量を調べるとともに、雄の日齢に伴う精子保有量を調べ、羽化直後の交尾活性の低さと精子注入戦略について考察した。

なお、本研究の一部は JSPS 科研費 24570019 の助成を受けた。また、本文に入るに先立ち、様々なご指導を下さった筑波大学生命環境系保全生態学研究室の横井智之助教と藤浪理恵子特任助教、飼育に関する多くのご助言を下さった生物資源研究所の成田聡子博士に御礼申し上げる。

材料および方法

実験に用いたキタキチョウの夏型の成虫は、2012 年の 6 月から 9 月の間に、筑波山周辺 (茨城県つくば市) で採集した夏型雌を産卵させ、孵化幼虫を飼育して羽化させた個体である。採集した雌は直径 40 cm、高さ 50 cm の円柱状の採卵ケージ (網目: 0.5 cm×0.5 cm) に入れ、毎日 20% スクロース溶液を与えて飼育した。採卵ケージは北東向きの窓辺に置き、自然日長の下、室温 (25±2°C) で管理した。採卵ケージの中には産卵基質としてメドハギ *Lespedeza cuneata* (Fabaceae) の鉢植えを入れ、雌が適宜産卵できるようにした。産下卵は回収せず、孵化幼虫が 3 齢になった時に幼虫飼育用のケージに移した。

3 齢以降の幼虫は、縦 15 cm×横 20 cm×高さ 50 cm の幼虫用飼育ケージ (網目: 0.5 cm×0.5 cm) において、室温と自然日長で引き続き管理した。食草は、野外から採集したメドハギ (長さ 30 cm 前後) を水の入った瓶に差して与えた。1 本の枝につける幼虫の数は 5 頭以下とした。メドハギの枝は適宜交換し、餌が不足しないようにした。蛹は直径 15 cm、高さ 30 cm の円柱状の羽化用ケージ (網目: 0.5 cm×0.5 cm) に移して静置した。

羽化した成虫は、その日のうちに湿重量を測り、雌雄を確認したのち、後翅裏面にフェルトペンを用いて個体番号を記した (雄: 41.97±1.13 mg (SE), $n=40$; 雌: 45.81±1.28 mg (SE), $n=40$)。その後、成虫用飼育ケージ (縦 40 cm×横 40 cm×高さ 50 cm) に雌雄別に入れ、自由に飛翔させた。成虫用飼育ケージの中には、20% スクロース溶液で満たした皿型で桃色の造花 (プラスチック製、直径 2 cm) を入れ、成虫が自由に吸蜜できるようにした。この造花は毎日交換した。また、ケージ内の乾燥を防ぐため、毎日霧吹きを

使って湿度を保った。

交尾実験は、7 月から 10 月の 9 時から 17 時 30 分までの充分明るい時間帯に、気温 25±2°C の室内で行った。交尾用ケージは成虫用飼育ケージと同じ大きさである。交尾ケージ内に、羽化後 1 日以上経った様々な日齢の未交尾雄と未交尾雌を同居させ、交尾が行われるのを観察した。多くの場合、雌雄を同居させてから 30 分以内に交尾は開始された。交尾を開始したペアは、静かにケージから取り出し、小さなカップに移して交尾の終了を待った。交尾時間を測定した後、交尾終了後 15 分以内に雌を解剖し、交尾嚢内に注入されていた精包の重さを量った (AE240, メトラー・トレド, 精度 0.00001 g)。取り出した精包は、スライドガラス上で切開し、含まれていた有核精子束を実体顕微鏡下 (SMZ-U, Nikon, 40 倍) で直接数えた。無核精子数は、Watanabe et al. (2000) の方法に従って乾燥標本を作製し、計数した。

鱗翅目の雄は保有していた精子をすべて注入しているとは限らないため (Cook and Gage, 1995; Hiroyoshi and Mitsuhashi, 1998)、交尾終了後 1 時間以内に雄も解剖し、貯精嚢と輸精管に残存していた有核精束と無核精子の数を調べた。この残存精子数と雌に注入した精子数の合計を雄の保有していた精子数と定義した。また、様々な日齢の雄を解剖して、保有精子数を直接調べることも行った。

結 果

交尾実験において、羽化翌日 (すなわち 1 日齢) までの雄は、どのような日齢の雌と出会ってもほとんど求愛・交尾を行わなかった。実際、およそ 40 頭の羽化翌日の雄に対して交尾実験を試行したものの、雌に求愛し交尾を成功させた雄は 1 頭のみであった。一方、羽化後 1 週間程度経った雄は、交尾ケージに入れると直ちに雌に求愛し、雌は雄を受け入れた。解剖の結果、雌と結合した 62 個体の雄のうち、60 個体が雌に精包を注入していた。残りの 2 個体は雌に精包を注入していなかったため、以降の解析から除外した。精包を注入した雄の交尾継続時間は 97.6±22.6 分 (平均±SD) で、最短 55 分、最長 150 分だった。

交尾終了直後の雌の交尾嚢内には、涙滴型で白色の精包が注入されていた。また、付属腺物質は交尾嚢の奥に付属する球状の器官に注入され、ゾル状であった。この付属腺物質が注入された球形の器官は、精包の大きさとほぼ同じであった。

交尾継続時間と注入された精包の重さに有意な関係は認められなかった ($F=0.014$, n.s., $n=40$)。また、交尾継続時間と精包内の有核精子束数や無核精子数との間にも有意な関係が認められなかった (有核精子束, $F=0.023$, n.s., $n=39$; 無核精子, $F=0.273$, n.s., $n=31$)。Table 1 には、雄の注入物質質量に対する雌雄の体サイズや日齢による影響

Table 1. Linear regression of body parameters for each sex in respective age classes of mated males and quality of ejaculates

	Age of mated males (days)					
	1-7		8-14		>15	
	<i>n</i>	<i>F</i>	<i>n</i>	<i>F</i>	<i>n</i>	<i>F</i>
Male body size						
- Spermatophore mass	22	0.002	11	2.366	7	1.080
- Number of eupyrene sperm bundles	22	0.237	11	0.000	6	0.573
- Number of apyrene sperm	20	0.010	9	2.810	1	—
Female age						
- Spermatophore mass	22	0.112	11	4.705	7	0.184
- Number of eupyrene sperm bundles	22	3.161	11	0.470	6	0.000
- Number of apyrene sperm	20	0.000	9	1.213	1	—
Female body size						
- Spermatophore mass	22	0.262	11	1.374	7	0.312
- Number of eupyrene sperm bundles	22	0.200	11	0.500	6	0.517
- Number of apyrene sperm	20	0.229	9	4.474	1	—

n: number of samples. No relationship is significant.

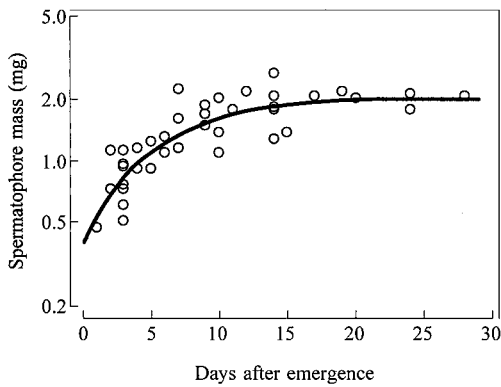


Fig. 1. Change in the spermatophore mass (*Y*) ejaculated by virgin males with age after emergence (*X*). $\log Y = 0.30(1 - 2.33 \exp(-0.20X))$ ($n = 41$).

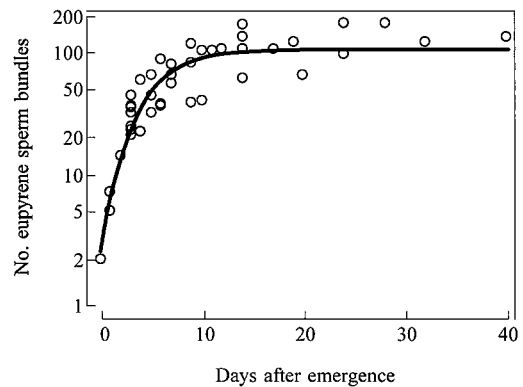


Fig. 2. Change in the number of eupyrene sperm bundles (*Y*) accumulated by virgin males with age after emergence (*X*). $\log Y = 2.03(1 - 0.81 \exp(-0.31X))$ ($n = 43$).

の検討結果を示した。ここでは、雄の日齢を羽化後1~7日、8~14日、15日以上に分けてある。その結果、いずれの場合でも有意な結果は得られていない。

Fig. 1に、注入された精包の重さと雄の日齢の関係を示した。羽化翌日に交尾した雄の注入した精包の重さは0.47mgであった。注入した精包は、雄の日齢が進むにつれて重くなっていき、羽化後14日目の個体では2.6mgになっている。しかし、このような精包の増大傾向は雄の日齢が14日齢を超える頃には止まり、注入精包の量には上限のあることが認められた。上限を推定する方法として非線形成長曲線(例えば、Brown et al., 1976)をあてはめることとし、本研究では三好ら(1995)の方法に従ってBrodyモデルを採用した。R 2.14.1 (R Developmental Core Team, 2011)によってモデルをあてはめたところ、精包重量の上限は約2.0mgと予測された。これは羽化直後の雄の体重の約4.8%に相当する。

キタキチョウの夏型雄が生産する有核精子束は螺旋状

で、長さは $1,301.3 \pm 38.8 \mu\text{m}$ (平均±SE, $n = 4$)であった。この有核精子束はそのまま束の形で雌に注入され、交尾終了直後の精包内でも同様の形態で観察された。雄が保有していた有核精子束は、羽化当日(すなわち0日齢)の雄ではわずか2本だった(Fig. 2)。その後、保有有核精子束数は日齢とともに増加し、羽化後10日以上経った雄では、ほとんどの個体が100本以上の有核精子束をもつようになっていた。しかし、さらに日齢を重ねた雄では有核精子数の増加が認められず、有核精子束の生産数にも上限があったと考えられる。モデルの予測する有核精子束の生産数の上限は約107本だった。

無核精子の長さは $413.1 \pm 11.0 \mu\text{m}$ (平均±SE, $n = 5$)で、羽化当日(すなわち0日齢)の雄は、約19,000本を保有していた(Fig. 3)。羽化後1週間以上経つと、100,000本を超える無核精子が認められ、無核精子数の生産量も日齢とともに増加する傾向にあったといえる。しかし、羽化後20日以上経つと無核精子は増加しなくなり、無核精子の

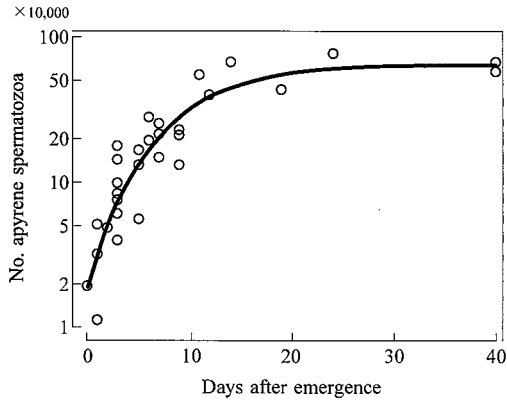


Fig. 3. Change in the number of apyrene spermatozoa (Y) accumulated by virgin males with age after emergence (X). $\log Y = 5.8(1 - 0.26 \exp(-0.16X))$ ($n=30$).

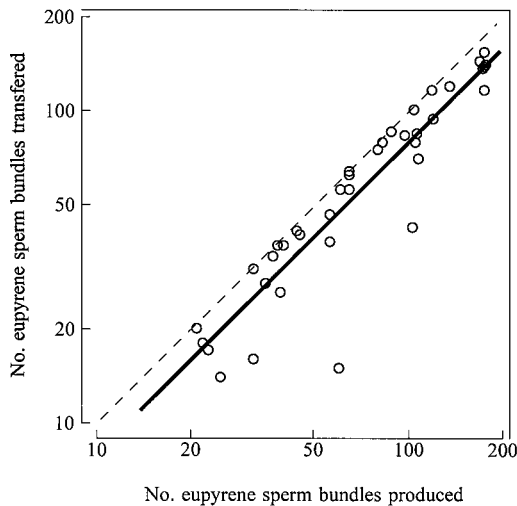


Fig. 4. Relationship between the number of eupyrene sperm bundles transferred (Y) and the number of eupyrene sperm bundles produced (X) by virgin males. Broken line represents diagonal. $\log Y = 1.12 + 1.01 \log X$ ($r^2 = 0.87$, $n=37$).

生産数にも上限があったと考えられる。モデルの予測する上限は約 650,000 本と計算された。

雄が注入した有核精子束数と、交尾前に保有していた有核精子束数の関係を Fig. 4 に示した。スネデカー・コ克蘭 (1967) に従って線形回帰したところ、回帰直線の傾きは、1 と有意に異ならず ($b=1.004$, $t=0.067$, n.s.), 保有有核精子束数が増えるとともに注入有核精子束数も対応して増加することがわかった。すなわち、有核精子束の保有量に関わらず、注入される有核精子束の割合は一定だったといえる。精子の注入数を保有数で割った精子注入率は平均約 81% だった。

交尾時に注入された無核精子の数も、保有していた無核精子数とともに増加していた (Fig. 5)。回帰係数は 1.014

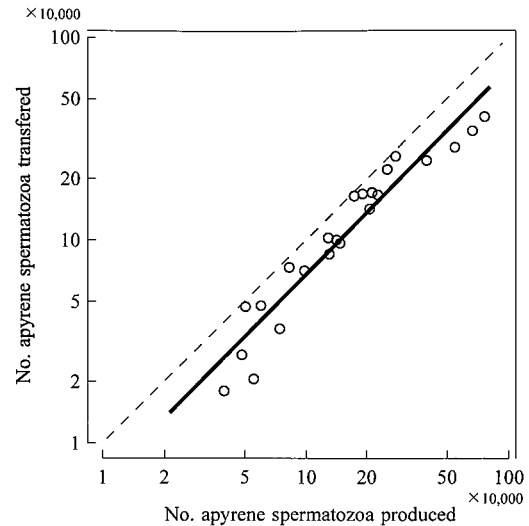


Fig. 5. Relationship between the number of apyrene spermatozoa transferred (Y) and the number of apyrene spermatozoa produced (X) by virgin males. Broken line represents diagonal. $\log Y = 0.25 + 1.01 \log X$ ($r^2 = 0.91$, $n=23$).

となり、1 と有意には異ならなかった ($t=0.215$, n.s.)。したがって、無核精子も、保有無核精子数に対して一定の割合で注入されていたといえ、精子注入率は平均約 69% だった。

考 察

蝶類の雌は、交尾時に受け取った精包を栄養として吸収し、卵生産や体の維持に用いることが明らかにされてきた (例えば Boggs and Gilbert, 1979)。Rutowski et al. (1987) によると、小さな精包を受け取ったオオアメリカモンキチョウ *Colias eurytheme* (Boisduval) の雌の生存日数は短く、産下卵数は減少したという。すなわち、大きな精包を注入した雄は、自らの精子で授精させた卵を増加させられるといえる。しかも、交尾嚢内に存在する精包は、雌の再交尾を抑制する (例えば, Sugawara, 1979)。この再交尾抑制効果は精包の大きさに依存しており、大きな精包を注入された雌ほど再交尾を受け入れるまでの日数が長くなるという (Kaitala and Wiklund, 1995; McNamara et al., 2009)。雌の再交尾抑制は精子間競争の回避につながるため、精包に再交尾抑制効果のある場合は、大きな精包を生産する雄が適応的になるといえる。したがって、大きな精包を注入できるキタキチョウの老齢雌は高い繁殖成功率を得ている可能性がある。

大きな精包を生産することは、雄にとって負担になるかもしれない。例えば、スウェーデン産のモンシロチョウの精包は雄の体重の 6% に達する (Watanabe et al., 1998)。Svärd and Wiklund (1989) は、エゾスジグロシロチョウ *Pieris napi* (Linnaeus) の生産した精包が雄の体重の 15%

にもなったことを報告した。本研究におけるキタキチョウの場合は、上限の生産量であっても体重の約4.8%にすぎなかった。しかも、羽化翌日の雄が注入した精包は0.47mg(上限の約1/4)で、はるかに小さかった。したがって、若齢雄は、交尾できたとしても、精包の大きさを利用して雌の再交尾を抑制できない可能性が高いといえよう。なお、野外で採集した雌で交尾嚢内に4個の精包をもっていた個体は、その精包の合計重量が4.56mgだった(小長谷・渡辺, 未発表)。この結果は、雌が受け取る精包の上限がかなり大きいことを示唆している。

雌の再交尾の抑制に無核精子が関与している可能性も指摘されている(Wedell, 2005)。Cook and Wedell (1999)は、エゾスジグロシロチョウにおいて、なかなか再交尾を行わなかった雌ほど多くの無核精子を受精嚢内に保持していると述べた。ノシメマダラメイガ, *Plodia interpunctella* (Hubner)の雄は、再交尾する可能性の高い若齢の未交尾雌に対して選択的に多くの無核精子を注入していたという(Cook and Gage, 1995)。

雌が複数回交尾し、雌体内に複数の雄由来の精子が同時に存在すると、卵の授精を巡って精子間競争が生じる(Parker, 1970)。これらの精子を受精嚢内に均一に分布していたとすれば、多くの精子を注入した雄の精子ほど受精に用いられる確率が高くなるので、授精能力をもつ有核精子は可能な限り多く注入されているに違いない。しかし、蝶類の雄が1日に生産できる精子の数には限りがある。例えば、メイガ科の一種 *Anagasta kuniella* (Zeller)の雄は1日に20本程度の有核精子束しか生産できない(Riemann et al., 1974)。Wedell and Cook (1999)は、モンシロチョウの若い未交尾雄は1日に有核精子を約5,600本(有核精子束に換算して約22本)、無核精子を約36,000本しか生産できないと報告した。

充分な量の精包や精子を蓄積していなければ、未交尾の雌であっても、積極的に交尾しない可能性が考えられる。例えば、Oberhauser (1988)は、オオカバマダラ *Danaus plexippus* (Linnaeus)の雄が4日齢になるまで交尾しないうえ、その際に注入された約25mgの精包とは、19日齢の雄が注入した精包の半分程度であると述べた。また、Iwasa et al. (1983)は、ヒョウモンモドキの一種 *Euphydryas editha* (Boisduval)について、羽化後まもない雄の交尾活性が低い理由として、精包や精子の生産能力の影響する可能性を示唆している。Kato (1986)によれば、キタキチョウの平均的な雄の交尾活性が高まるのは、少なくとも羽化後3日以上経ってからだという。今回の実験では3日齢未満の雄も少数が交尾を行ったが、狭いケージ内で多数の未交尾雌と同居させたためといえ、羽化後まもなくの交尾活性は原則として低いといえる。これらの若い雄の注入した精包は小さく、含まれていた精子も少なかった。

キタキチョウの場合、羽化翌日の夏型雄が保有していた有核精子束の数は約6.3本であり、そのうちの81%(有核精子束で約5.1本、自由有核精子に換算すると約1,300本)が雌に注入されていた。確かに、それらすべての有核精子が受精嚢に達すれば、雌のもっているすべての卵を授精させられるだけの数ではある。しかし、蝶類では、交尾嚢に注入された精子の一部だけしか受精嚢に到達しない(Watanabe et al., 2000)。しかも、この数は有核精子束の生産上限である約107本(自由有核精子に換算すると27,000本)に比べるとはるかに少なかった。これは、モンシロチョウの雄が羽化翌日に10,000本もの自由有核精子を注入できたというWedell and Cook (1999)の報告と対照的である。

キタキチョウの雄が羽化翌日に保有していた無核精子数も約31,000本と少なく、上限の5%以下であった。雌に注入される無核精子が保有数の69%とすると、羽化翌日の雄は21,000本しか雌に注入しないことになる。有核精子と同様に、交尾嚢に注入された無核精子のうち、受精嚢に達するのは一部にすぎない(Watanabe et al., 2000)。したがって、若齢雄が交尾できたとしても雌の受精嚢に到達できる無核精子の数はさらに少なくなり、無核精子を受精嚢に充満させて雌の再交尾を抑制するという効果は期待できなくなる。すなわち、若齢雄は、交尾相手となった雌の再交尾を抑制しにくく、注入する有核精子も少ないため、精子間競争では不利になるといえる。若齢雄の交尾活性が低いのは、精子競争に打ち勝つために、充分な量の精包や精子を生産できるまで待つ戦略を採用していると考えられた。

摘 要

キタキチョウの夏型雄は、羽化後数日間の交尾活性が低いと報告されてきた。室内飼育をして羽化させた様々な日齢の未交尾雄と未交尾雌をケージ内で交尾させ、交尾終了後に雌を解剖して、注入されていた精包の重量、有核精子の数、無核精子の数を調べた。また、雄を解剖し、体内に残存していた精子の数を調べた。羽化翌日の雄は40頭中1頭しか交尾しなかった。交尾した雄は0.47mgの精包と、7本の有核精子束、47,000本の無核精子を注入していた。精包重量と保有精子数は、雄の日齢とともに増加したが、上限が認められた。モデルをあてはめたところ、それらの上限は、精包重量で2.0mg、有核精子束数で107本、無核精子数で650,000本と計算された。上限に達するまでには、約14日間を要した。有核精子束と無核精子は保有数に対して常に一定の割合で注入されていたので、14日齢までの雄なら、老齢の個体ほどより大きな精包とたくさんの精子を生産・注入できるといえる。若齢雄の交尾活性が低いのは、充分な量の精包や精子を生産し、精子競争で有利になるまで待つ戦略であると考えられた。

引用文献

- Boggs, C. L. and L. E. Gilbert (1979) Male contribution to egg production in butterflies: Evidence for transfer of nutrients at mating. *Science* 206: 83–84.
- Brown, J. E., H. A. J. Fitzhugh and T. C. Cartwright (1976) A comparison of nonlinear models for describing weight-age relationships in cattle. *J. Anim. Sci.* 42: 810–818.
- Cook, P. A. and M. J. G. Gage (1995) Effects of risks of sperm competition on the numbers of eupyrene and apyrene sperm ejaculated by the moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 36: 261–268.
- Cook, P. A. and N. Wedell (1999) Non-fertile sperm delay female remating. *Nature* 397: 486.
- Higginson, D. M., K. B. Miller, K. A. Segraves and S. Pitnick (2012) Female reproductive tract form drives the evolution of complex sperm morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 4538–4543.
- Hiroyoshi, S. and J. Mitsuhashi (1998) Effects of environmental conditions and aging on eupyrene sperm movement in male adults of *Polygonia c-aureum* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Zool. Sci.* 15: 561–565.
- 本田計一 (2005) 配偶行動. 蝶の生物学 (本田計一・加藤義臣編). 東京大学出版会, 東京, pp. 302–349. [Honda, K. (2005) Mating behavior. In *Biology of Butterflies* (K. Honda and Y. Kato, eds.). University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 302–349.]
- Iwasa, Y., F. J. Odendaal, D. D. Murphy, P. R. Ehrlich and A. E. Launer (1983) Emergence patterns in male butterflies: a hypothesis in male butterflies and a test. *Theor. Popul. Biol.* 23: 363–379.
- Kaitala, A. and C. Wiklund (1995) Female mate choice and mating costs in the polyandrous butterfly *Pieris napi* (Lepidoptera: Pieridae). *J. Insect Behav.* 8: 355–363.
- Kato, Y. (1986) The prediapause copulation and its significance in the butterfly *Eurema hecabe*. *J. Ethol.* 4: 81–90.
- Kato, Y. (1989) Differences in reproductive behavior among seasonal wing morphs of the butterfly *Eurema hecabe*. *J. Insect Behav.* 2: 419–429.
- McNamara, K. B., M. A. Elgar and T. M. Jones (2009) Large spermatophores reduce female receptivity and increase male paternity success in the almond moth, *Cadra cautella*. *Anim. Behav.* 77: 931–936.
- 三好俊三・鈴木三義・光本孝次 (1995) 採卵鶏の体重変化に対する非線形成長曲線モデルの適用. 家禽会誌 32: 394–401. [Miyoshi, T., M. Suzuki and T. Mitsumoto (1995) Application of non-linear growth curve models to body weight in egg-type chicken. *Jpn. Poult. Sci.* 32: 394–401.]
- Oberhauser, K. S. (1988) Male monarch butterfly spermatophore mass and mating strategies. *Anim. Behav.* 36: 1384–1388.
- Parker, G. A. (1970) Sperm competition and its evolutionary effect on copula duration in the fly *Scatophaga stercoraria*. *J. Insect Physiol.* 16: 1301–1328.
- Pattarini, J. M., W. T. Starmer, A. Bjork and S. Pitnick (2006) Mechanisms underlying the sperm quality advantage in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 60: 2064–2080.
- Pitnick, S. (1996) Investment in testes and the cost of making long sperm in *Drosophila*. *Am. Nat.* 148: 57–80.
- R Development Core Team (2011) R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Riemann, J. G., B. J. Thorson and R. L. Ruud (1974) Daily cycle of release of sperm from the testes of the Mediterranean flour moth. *J. Insect Physiol.* 20: 195–207.
- Rutowski, R. L., G. W. Gilchrist and B. Terkalian (1987) Female butterflies mated with recently mated males show reduced reproductive output. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 20: 319–322.
- スネデカー・コクラン (1967) [畑村又好・奥野忠一・津村善郎訳, 1972] 統計的方法 (原著第6版). 岩波書店, 東京. 546 pp. [Snedecor, G. W. and W. G. Cochran (1967) [Hatamura, M., T. Okuno and Z. Tsumura Japanese translation, 1972] *Statistical Methods*. 6th ed. The Iowa State University Press, Ames.]
- Sugawara, T. (1979) Stretch reception in the bursa copulatrix of the butterfly, *Pieris rapae crucivora*, and its role in behavior. *J. Comp. Physiol. A* 130: 191–199.
- Svärd, L. and C. Wiklund (1989) Mass and production rate of ejaculates in relation to monandry/polyandry in butterflies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 24: 395–402.
- 塚口利三郎・黒津敏行 (1922) 鱗翅類の無核精子に就いて. 動雑 34: 310–317. [Tsukaguchi, T. and T. Kurotsu (1922) On apyrene sperm in Lepidoptera. *Doubutsugaku Zasshi* 34: 310–317.]
- Watanabe, M. and S. Ando (1993) Influence of mating frequency on lifetime fecundity in wild females of the small white *Pieris rapae*. *Jpn. J. Entomol.* 61: 691–696.
- Watanabe, M. and M. Hirota (1999) Effects of sucrose intake on spermatophore mass produced by male swallowtail butterfly *Papilio xuthus* L. *Zool. Sci.* 16: 55–61.
- Watanabe, M., C. Wiklund and M. Bon'no (1998) Ejaculation timing of eupyrene and apyrene sperm in the cabbage white butterfly *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) during copulation. *Entomol. Sci.* 1: 15–19.
- Watanabe, M., M. Bon'no and A. Hachisuka (2000) Eupyrene sperm migrates to spermatheca after apyrene sperm in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* L. (Lepidoptera: Papilionidae). *J. Ethol.* 18: 91–99.
- Wedell, N. (2005) Female receptivity in butterflies and moths. *J. Exp. Biol.* 208: 3433–3440.
- Wedell, N. and P. A. Cook (1999) Strategic sperm allocation in the small white butterfly *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). *Funct. Ecol.* 13: 85–93.