兵庫教育大学学術情報リポジトリ

高密度条件下におけるDaphnia similisのライフサイクルに関する研究

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2019-03-06
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 笠原, 恵, 三木, 美奈
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/10132/17750

兵庫教育大学　研究紀要　第54巻　2019年２月　pp. 91－94

高密度条件下における *Daphnia similis* のライフサイクルに関する研究

Effect of Crowding Condition on the Life Cycle of *Daphnia similis*

笠　原　　恵*　　三　木　美　奈**
KASAHARA Megumi　MIKI Mina

ミジンコは，食物連鎖の中で一次消費者として生態系を支える重要な役割を担っている。その中でも，*Daphnia* 属は，環境条件が良い場合は雌のみの単為生殖を行い，生息環境が悪化すると雄を産出し有性生殖に切り替え乾燥に強い休眠卵を産みだす循環単為生殖を行うことが知られている。本研究では，*D. similis* の高密度条件下におけるライフサイクルの変化を明らかにすることを目的とした。

D. similis（Hiraike strain）の生存率および総産仔数に関しては，高密度飼育水による影響は見られなかった。成長率に関しては， CRWs（同種高密度水）＞CRWp（異種高密度水）＞STW（M4 飼育液）の順で成長率に違いが見られた。雄産出に関しては，CRWs＞STW＞CRWp となった。また，21日間の実験期間中には，休眠卵の産出は見られなかった。このように，高密度条件下では，成長率や雌雄比に影響を受けていることが分かる。また，同種・異種の高密度水でその反応は異なっていた。同種の CRW の場合，雄産仔の割合が高かった。これは，種の長期的な生存に有利な休眠卵を作るために，同種の高密度状態を察知していると考えられる。異種の CRW の場合，雄産仔の割合が低かった。これは，異なる種の高密度状態を察知することで，雄産出にかかるエネルギーをより多くの雌を増やす単為生殖に使い，自らの種が優勢になるようにするための戦略だと考えられる。

キーワード：ミジンコ，ライフサイクル，高密度条件，*Daphnia similis*，加東市平池
Key words：water flea, life cycle, crowding condition, *Daphnia similis*, Hira Pond in Kato city

Ⅰ　はじめに

ミジンコは池や湖に生息している小型の甲殻類である。植物プランクトンを摂食する捕食者であると同時に，小型の魚や無脊椎動物の餌で，一次消費者としての役割を担っており，食物網におけるキーストーン種である。*Daphnia* は環境条件が良いときには，雌が遺伝的に同一の雌を産み出すという単為生殖によって繁殖し，環境条件が悪くなると，単為生殖から有性生殖へ生殖様式を切り替える（循環単為生殖）。本研究で用いた *Daphnia similis*（タイリクミジンコ）は，奈良県大和郡山，愛知県，神奈川県，河口湖などの各地に出現した種であり，中国大陸からの外来種である（田中　2002）。1966年には大和郡山において存在が確認されている（渡辺　1966）。そして，*D. similis* は有性生殖によって休眠卵を産出する循環単為生殖タイプであると考えられる。

環境悪化条件には，個体数の増加に伴う高密度化や短日条件などがあり，それにより雄が産出され有性生殖を行い休眠卵を産出すると考えられている。*Daphnia* の雄の産仔に関しては既にいくつかの報告がある。*Daphnia magna*（オオミジンコ）においては，高密度条件下，短日条件下（８時間明：14時間暗）において雄の産出の割合が高くなり，餌の量では雌雄の割合の変化はほとんど見られない（Hobaek and Larsson 1990）。また，他の *D. magna* での環境悪化の実験では，高密度条件下，短日条件下（８時間明：14時間暗），餌が不足している状況下での雄の産出割合が高くなったという報告もある（Kleiven *et al.* 1992）。同種，異種間における高密度条件下における実験を９種類の *Daphnia*（*D. pulex*，*D. magna*，*D. pulicalia*，*D. hyalina*，*D. galeata*，*D. cucullata*，*D. laevis*，*D. lumholtzi*，*D. ambigua*）を用いて行った報告もある。高密度条件下で飼育すると大きさ，成長率，一回の産仔数を低下させる。また，比較的小さな種である *D. lumholtzi* と *D. ambigua* においては，体長が大きな種である *D. magna* の高密度水で飼育した場合，殻の形が変化することが明らかになっている（Burns　2000）。このように，多くの *Daphnia* において高密度条件下がライフサイクルへ何らかの影響を与えていることがわかっている。

しかし，循環単為生殖を行う *D. similis* に関しては高密度条件下での詳しい研究が行われていない。加東市平池から採取された *D. similis* については，20℃，長日条件下（14時間明：10時間暗）でのライフサイクルが既に明らかになっている（笠原ら　2018）。そこで，本研究では，循環単為生殖を行う *D. similis* において，高密度条件下がライフサイクルへもたらす影響について明らかにすることを目的とした。

＊兵庫教育大学大学院教科教育実践開発専攻理数系教育コース 准教授　＊＊たつの市立揖西西小学校　平成30年10月25日受理

Ⅱ　材料と方法

A 実験材料

加東市平池の北小池から2015年６月11日に採取し，研究室内で継代飼育していた *D. similis*（Hiraike strain）を使用した。また，異種として，2012年３月28日に淡路市岩屋のため池から採取し，同様に研究室内で継代飼育していた *Daphnia pulex*（Iwaya strain）を使用した。

B 実験方法

(1) 本実験で使用した飼育水および餌について

a）飼育液

飼育液は OECD（Organisation for Economic Cooperation and Development；経済協力開発機構）テストガイドライン 211 のミジンコ急性遊泳阻害実験における Elendt M4（M4飼育液）を用いた（OECD 2012）。

b）高密度飼育水

高密度飼育水を作るにあたり，どれくらいの密度からが高密度とするかを，様々な文献から検討した（表１）。これらをまとめると，60～400匹/L の密度条件が高密度とされている。しかし，実際にミジンコの継代飼育を行っている中で，これらの文献で高密度飼育水と定義されている密度以上に高密度状態になることがあった。したがって，本研究では，500～700匹/L を高密度条件として設定した。

M4 飼育液で *D. similis*（Hiraike strain）を500～700匹/L の高密度状態で３日間以上飼育し，その飼育液を Rapid-Flow 90mm Filter（0.2μm フィルター，Termo Scientific Nalgene）に通した。この飼育液を，高密度飼育水（Crowded Water of *similis*：CRWs）とした。同様にして，異種の *Daphnia pulex*（Iwaya strain）を飼育したものを（Crowded Water of *pulex*：CRWp）とした。これに対して，control 飼育水として，M4 飼育液を（Standard Water：STW）とした。また，作成した STW と CRW の pH を pH メーター（ALTRADER 社）で，溶存酸素をデジタル溶存酸素計（FUSO 社）を用いて計測した。pH については，STW が9.05，CRWs が8.11，CRWp が8.25であった。また，溶存酸素量は，STW が9.1mg/L，CRWs が8.0mg/L，CRWp が7.5mg/L であった。

c）餌

餌として，生淡水産クロレラ（30cc）を（有）日海センター（東京）から購入した。クロレラ懸濁液は，約1.0×10^5cells/μL であった。

(2) 高密度条件下におけるライフサイクルの比較

産まれて24時間以内の仔虫を５日間 STW 中で成長させた後，50mL の STW，CRWs，CRWp にそれぞれ１個体ずつ入れ，20℃で飼育した。これを各飼育水ごとに15個体ずつ行った。飼育容器は50mL 遠心チューブ（IWAKI）を用いた。光周期は長日（14時間明：10時間暗），光量約1000 lx の条件下で飼育した。餌はクロレラを２日に１回の水換えと同時に１μL 加えた。産まれた仔虫は 99.5%エタノールで固定後，仔虫数を数えることによって増殖数，産仔頻度，産仔回数，雌雄の割合を調べた。調査は21日間行なった。また，脱皮殻は，実験開始時と実験終了時の２回，メモリの付いたカバーガラス（はかるくん01，教育出版株式会社）上で胴体長の測定を行なった。胴体長の測定法は，笠原（2018）に示された方法で行なった。また，生存率，休眠卵の有無に関しても，21日間調査を行った。上記はすべて３回の繰り返し実験を行った。

Ⅲ　結果

高密度条件が *D. similis*（Hiraike strain）のライフサイクルにもたらす影響について，生存率，総産仔数，成長率，雌雄比について調べた。

生存率に関しては，STW では７日目に14匹に，17日目に13匹になり，21日間で87%が生存していた。同種高

表１　報告されている高密度条件

著者（発表年）	ミジンコの種	飼育水	高密度条件
Heogen（1987）	*D. pulex*	飼育原液：緩衝液 (D64)	200～300 匹/L
Hobaek ＆ Larsson（1990）	*D. magna*, *D. pulicaria*, *D. pulex*	新鮮な湖の水を0.45μm のフィルターでろ過したもの	100～160 匹/L
Kleiven *et al.*（1992）	*D. magna*	精製水をもとに無機塩類を加えた合成培養水	60～100 匹/L
Burns (1995)	*D. magna, D. pulicalia, D. hyaline, D. galeata*	湖の水を0.45μm のフィルターでろ過したもの	150～400 匹/L
Burns (2000)	*D. magna*, *D. pulicalia, D. pulex, D. hyalina, D. galeata, D. cucullata, D. laevis, D. lumholtzi, D. ambigua*	湖の水を0.45μm のフィルターでろ過したもの	85～300 匹/L

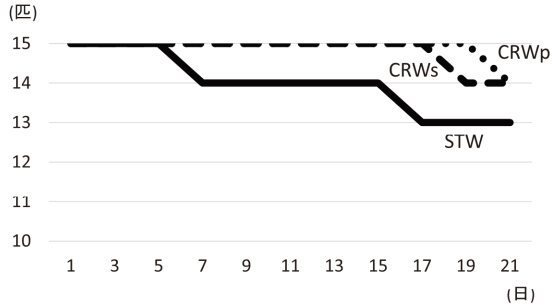

図１　*D. similis*（Hiraike strain）の高密度条件下での生存数.

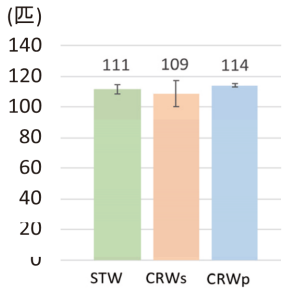

図２　*D. similis*（Hiraike strain）の高密度条件下における21日間の総産仔数．エラーバーは標準誤差を示している.

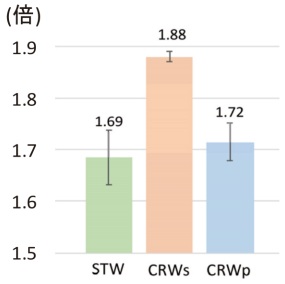

図３　*D. similis*（Hiraike strain）の高密度条件下での成長率：実験開始時の大きさとの比較．エラーバーは標準誤差を示している.

密度水（CRWs）では，19日目に14匹になり，21日間で93%が生存していた。異種高密度水（CRWp）では21日目に14匹になり，21日間で93%が生存していた（図１）。これらより，生存率に関しては，飼育水による大きな違いは見られず，21日間の飼育では約９割が生存した。

総産仔数に関しては，15個体の21日間での総産仔数の平均を比較した。STW で111匹，同種高密度水（CRWs）で109匹，異種高密度水（CRWp）で114匹産仔した（図２）。飼育水の違いによる有意な差は見られなかった。

成長率に関しては，STW で1.69倍，同種高密度水（CRWs）で1.88倍，異種高密度水（CRWp）で1.72倍であった（図３）。CRWs（同種）>CRWp（異種）>STW の順で成長率に違いが見られた。

雌雄比に関しては，形態的にはっきりと雌雄判別できたものを100%とし，雄の割合を算出した。STW で1.3

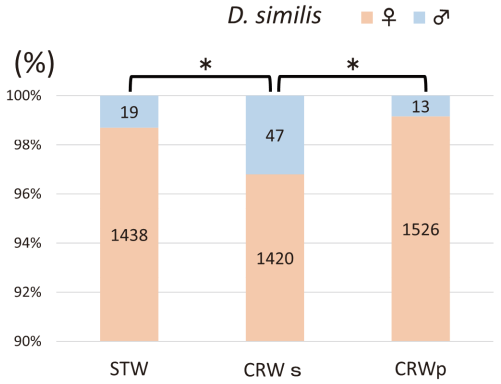

図４　*D. similis*（Hiraike strain）を高密度条件下で飼育した場合の雌雄比．＊は有意な差P<0.01を示す.

%（19個体），同種高密度水（CRWs）で3.2%（47個体），異種高密度水（CRWp）で0.8%（13個体）であった。CRWs（同種）>STW>CRWp（異種）となり，同種高密度水（CRWs）と STW との間，同種高密度水（CRWs）と異種高密度水（CRWp）には有意差（P<0.01）が見られた（図４）。

また，休眠卵に関しては，21日間の実験期間中には産出されなかった。

Ⅳ　考察

高密度条件下での飼育に関して，Hobaek and Larsson（1990）や Kleiven *et al.*（1992）が報告しているように，日本産の *D. similis*（Hiraike strain）においても，雄産仔の割合が増加し，Burns（2000）が報告しているように，大きさ，成長率，１回の産仔数が低下すると予想していた。しかし，同種の高密度水と異種の高密度水での飼育で以下のように結果が異なっていた（表２）。

同種高密度水（CRWs）の場合，成長率が高く，総産仔数は変わらないという結果が出た。これは，同種が多いと察知し，新しい仔虫を産仔するエネルギーを成長するために使い，一個体の体長を大きくすることを優先することを選択していると考えられる。また，同種高密度水（CRWs）の場合，総産仔数は変わらないが，雄の産仔の割合が増加するという結果が得られた。これは，個体数を増加させることよりも，雄の産仔割合を増加することで有性生殖に有利な状況にし，休眠卵を作りやすくしていると考えられる。休眠卵として種を残すことで，長期的な種の存続を図っていると考えられる。*D. similis*

表２　高密度条件が *D. similis* のライフサイクルへ及ぼす影響

生存率	STW と CRW の間に大きな違いは見られない
総産仔数	STW と CRW の間に大きな違いは見られない
成長率	CRWs（同種）>CRWp（異種）>STW
雄の割合	CRWs（同種）>STW>CRWp（異種）

（Hiraike strain）においては，この考え方が適用できるが，日本に生存する *D. pulex* においては，有性生殖を行わずに，休眠卵を作ることができることが明らかになっているため（So *et al.* 2015），*D. similis* とは異なった結果が得られる可能性がある。

異種高密度水（CRWp）の場合，総産仔数は変わらないが、雄産仔割合が少ないという結果が得られた。これは，異なる種の個体数が増加してきたことを察知し，雄を産仔したり成長したりするエネルギーを単為生殖に使い，雌の個体数を増加させることで自らの種が有利になるための生存競争の術であると考えられる。

このように，*D. similis*（Hiraike strain）は，高密度条件によって成長率や雌雄比に影響を受けており，同種と異種の高密度水に対する影響が異なることが明らかとなった。これまで，*D. magna* において，幼若ホルモンやその類似体が産仔数減少や雄産出の誘導に関係していることが報告されている（Tatarazako *et al.* 2003, Oda *et al.* 2005）。このことと実験結果から，高密度状態であることを察知したそれぞれの *Daphnia* が何らかのホルモンを出し，その結果，成長率や雌雄比に影響が出たとも考えられる。

以上のことから，湖や沼において，異種の個体が多くなり，それを察知すると，同種の個体を成長させ同種の雌個体を産出する。同種が高密度状態になると，雄の産仔割合を高くし，有性生殖を行うことで，休眠卵を作成し長期的な種の生存を図ると考えられる（図５）。

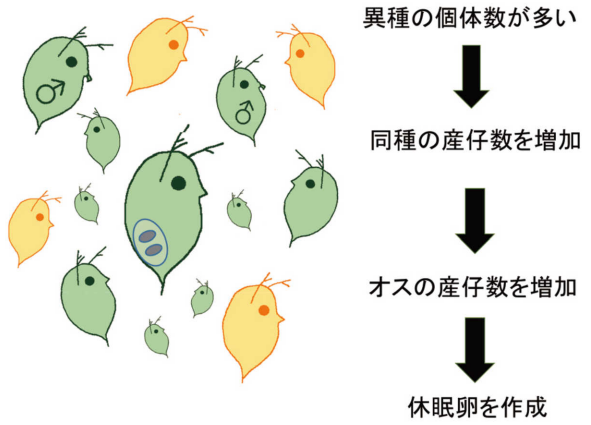

図５　*D. similis*（Hiraike strain）の高密度条件下でのライフサイクル．

Ⅴ　引用文献

1．Burns C. W.（1995）Effects of crowding and different food levels on growth and reproductive investment of *Daphnia*. Oecologia 101(2)：34-244.

2．Burns C. W.（2000）Crowding-induced changes in growth, reproduction and morphology of *Daphnia*. Freshwater Biology 43：19-29.

3．Heogen J. C.（1987）Feeding rate inhibition in crowded *Daphnia pulex*. Hydrobiologia 154：113-119.

4．Hobaek A., and Larsson P.（1990）Sex determination in *Daphnia magna*. The Ecological Society of America 71 (6)：2255-2268.

5．笠原恵，工古田伊代，横山美奈（2018）加東市平池に生息するミジンコ *Daphnia pulex* と *Daphnia similis* のライフサイクルについて．兵庫教育大学研究紀要　53：85-90.

6．Kleiven O. T., Larsson P., and Hobaek A.（1992）Sexual reproduction in *Daphnia* magna requires three stimuli. Oikos 65(2)：197-206.

7．Oda S., Tatarazako N., Watanabe H., Morita M., and Iguchi T.（2005）Production of male neonates in four cladoceran species exposed to a juvenile hormone analog, fenoxycarb. Chemosphere 60：74-78.

8．OECD guideline for the testing of chemicals：*Daphnia magna* reproduction test.（2012）

9．田中正明（2002）日本淡水産動植物プランクトン図鑑．名古屋大学出版会　pp.584.

10．Tatarazako N., Oda S., Watanabe H., Morita M., and Iguchi T.（2003）Juvenile horomone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*. Chemosphere 53：837-833.

11．So M., Ohtsuka H., Makino W., Shida S., Kumagai H., Kenyu Y. G., and Urabe J.（2015）Invasion and molecular evolution of *Daphnia pulex* in Japan. Limnology and Oceanography 60(4)：1129-1138.

12．渡辺仁治（1966）大和郡山における *Daphnia similis* CLAUS の出現．陸水学雑誌　27(2)：83-88.