

ミジンコ *Daphnia pulicaria* × *Daphnia pulex* (Mukaiike strain) の ライフサイクルについて

Consideration About the Life Cycles of *Daphnia Pulicaria* × *Daphnia Pulex* (Mukaiike Strain)

笠原 恵* 中村 勇樹**
KASAHARA Megumi NAKAMURA Yuki

兵庫県揖保郡太子町で採取した *Daphnia pulicaria* × *Daphnia pulex* (Mukaiike strain) のライフサイクルを明らかにし、既知の *D. pulex* × *D. pulicaria* (Hiraike strain) と *Daphnia sinensis* (Hiraike strain) の2種のライフサイクルと比較した。20℃条件において、*D. pulicaria* × *D. pulex* は孵化後約 10.8 日で産仔を開始し、約 4.1 日の間隔で産仔を続けた。一回につき約 10.9 匹産仔し、25 日間での総産仔数は 115 匹に達した。最大胴体長は約 2.5 mm であり、そこから算出した最大体長は 3.2 mm であった。最長の生存日数は 61 日間であった。

20℃条件における *D. pulex* × *D. pulicaria* および *D. sinensis* のライフサイクルと比較すると、3種の中で最も体長が大きかったものは *D. sinensis* の 4.0 mm であった。しかし、総産仔数に関しては、*D. pulicaria* × *D. pulex* と *D. pulex* × *D. pulicaria* の 115 匹が最も多かった。また、最長生存日数は *D. sinensis* が 62 日、*D. pulicaria* × *D. pulex* が 61 日と約 2 か月間生存することが明らかとなった。

母系が異なる雑種として、*D. pulicaria* × *D. pulex* (母系が *D. pulicaria*) と *D. pulex* × *D. pulicaria* (母系が *D. pulex*) のライフサイクルを比較すると、*D. pulicaria* × *D. pulex* は *D. pulex* × *D. pulicaria* よりも大きく育ち、長く生きるが、産仔の間隔がやや長い。いずれも総産仔数は同じである。このことから教育現場でこの2種を扱う場合、長く飼育し観察をする場合は *D. pulicaria* × *D. pulex* のほうが適しており、数を短期間に増やす場合には *D. pulex* × *D. pulicaria* が適している。

キーワード：ミジンコ、ライフサイクル、*D. pulicaria* × *D. pulex*、*D. pulex* × *D. pulicaria*、*D. sinensis*

Key words : water flea, life cycle, *D. pulicaria* × *D. pulex*, *D. pulex* × *D. pulicaria*, *D. sinensis*

I はじめに

ミジンコ (*Daphnia* 属) は、動物プランクトンとして池や湖に生息している小型の甲殻類であり、水中の生態系のキーストーン種である。環境条件が良いと、雌が同一の遺伝子をもつ雌を産出する単為生殖によって繁殖している。しかし、環境条件が悪化すると、単為生殖から有性生殖へと切り替える。この有性生殖によって、*Daphnia* は遺伝的な多様性を生みだすことができ、劣悪な環境にも適応することができると考えられている。有性生殖によって硬い殻 (卵鞘) に包まれた休眠卵が産出される。この殻により休眠卵は低温や干ばつなどの環境でも耐えることができ、再び良い環境に変化すると何らかのシグナルを感知して孵化する (Doumont and Negrea 2002, Caceres et al. 2007)。また、*Daphnia* は産まれてから死ぬまでの間の産仔数や産仔間隔などは環境の影響を受けやすいことも報告されている (Toyota 2019)。

Daphnia のライフサイクルについては、*D. pulex* (Hiraike strain) と *D. similis* (Hiraike strain) の2種につ

いて報告されており、いずれの種も 20℃で最も産仔数が多く、体長も大きくなった (笠原ら 2018)。また、これらの種はミトコンドリアの DNA 解析により、*D. pulex* (Hiraike strain) は、*D. pulex* × *D. pulicaria* の雑種であること、*D. similis* (Hiraike strain) は *D. sinensis* であることが報告されている (佐田 2019)。

D. pulicaria は日本では 1999 年に滋賀県琵琶湖に突如として現れた種であるが、本来はアメリカ北部やカナダの池や湖で多くみられる種である (Urabe 2003)。アレシユアッシュ湖 (アメリカ、ウィスコンシン州) で採取された *D. pulicaria* を用いた、3℃と 22℃の温度条件と日光の有無の条件との掛け合わせによる比較実験では、遊泳様式の変化が報告されている (Ziarek 2011)。また、餌の種類がライフサイクルに影響を与えることも報告されている (Nagata 2018)。

D. pulex に関しては、アメリカ北部やカナダの池や湖でよくみられる種であり、日本でも全国各地の池や湖で見られる種である (Ueno 1971)。しかし、兵庫県で採取

* 兵庫教育大学大学院教育実践高度化専攻理数系教科マネジメントコース 教授

令和2年10月23日受理

** 高砂市立荒井小学校

し、形態的に *D. pulex* と思われた種を遺伝子解析するとすべてが雑種であることが確認され (佐田 2019), 純粋な *D. pulex* の生息は不明のままである。本研究で用いた *D. pulicaria* × *D. pulex* は兵庫県の各地の池で確認されている。

そこで, *D. pulicaria* × *D. pulex* を用いて, まだ明らかになっていないライフサイクルを決定するとともに, 生存率や総産仔数などの生育最適条件を他種と比較することにより, 教材としての有効性を検討することを目的とした。

II 材料と方法

A 実験材料

本研究に用いた *D. pulicaria* × *D. pulex* は北緯 34.85'56", 東経 134.59'56" に位置する兵庫県揖保郡太子町広阪の向池にて採取し (佐田 2019), 1 匹の雌由来のクローンを研究室で継代飼育したものである (図 1)。

B 実験方法

(1) 継代飼育

実験で使用したミジンコは, 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) (OECD 2012) を用いて, 実験室内で継代飼育した。餌として生淡水濃縮クロレラ ω (有限会社日海センター) を 50 ml の飼育水につき $1 \mu\text{l}$ 与え, 室温 20 °C の培養室で光周期は長日 (14 時間明 : 10 時間暗 以下 L14 : D10 と記す), 光量 1750 lx の条件下で飼育した。飼育容器は 50 ml 遠心チューブ (IWAKI) を用いた。

(2) ライフサイクル決定のための個別飼育

50 mL の M4 飼育液で満たした 50 mL 遠心チューブに成熟個体を数匹入れ, そこで産仔された 24 時間以内の仔虫を実験に使用した。



図 1 兵庫県揖保郡太子町広阪の向池にて採取された *D. pulicaria* × *D. pulex* (♀) スケールバーは, 1 mm を示す。

ライフサイクル決定のための飼育は, 50 mL 遠心チューブに 1 匹のみを入れた個別飼育で行なった。温度条件は 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C とし, 日長条件と光量は継代飼育のときと同じ条件で行なった。各温度条件について 12 個体を用い, 25 日間の飼育観察を行いライフサイクルを決定した (図 2)。また, 最長寿命を確認するために, 各温度条件で観察期間以降も最後の 1 匹が死ぬまで飼育および観察を続けた。また, 実験条件をそろえるためにエコノミー人工気象器 (LH-40CCFL-TMDT, 日本医化機械製作所) を用いた。

(3) 餌やりおよび脱皮殻と仔虫の分離法

50 mL 遠心チューブの内容物 (飼育液, ミジンコ仔虫, 脱皮殻など) をすべて直径 95 mm のガラスシャーレに開け, ミジンコだけを別の M4 飼育液で満たした 50 mL 遠心チューブへスポイトを用いて移し, そこにクロレラを加えることで餌やりとした。クロレラは M4 飼育液 50 mL に対して $1 \mu\text{L}$ 与え, これを 2 日に 1 回行った。また, この時に脱皮殻を採取し 2 mL マイクロチューブに入れ 99.5% エタノールで固定し, 冷蔵庫で保存した。最後にシャーレ内に残った仔虫の数をカウントした。

(4) 脱皮殻の測定方法

99.5% エタノール中で保存していた脱皮殻をスライドガラスに載せ, キムワイプで水分を取り除いた後, 生物顕微鏡 (CX21-HKS, オリンパス) で観察し, iPhone8 (Apple) で写真を撮影した。撮影した写真をフリーソフト ImageJ (Wayne Rasband (NH)) を用いて脱皮殻の胴体長を測定した。胴体長の測定部位は笠原ら (2018) の方法を参考にした。胴体長からの体長の換算は, ミジンコが 1 匹の親個体由来のクローンという点を踏まえ, その親の体長と胴体長の比から算出した。

(5) ライフサイクルの決定について

D. pulicaria × *D. pulex* のライフサイクルを決定するために光周期 (L14:D10), 光量 (1750 lx), 温度 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C の 4 条件下で各 12 個体を個別に飼育し, 生存率, 生存日数, 総産仔数, 産仔回数, 平均産仔数, 産仔間隔, 脱皮回数, 胴体長の測定, 成長速度について調べた。

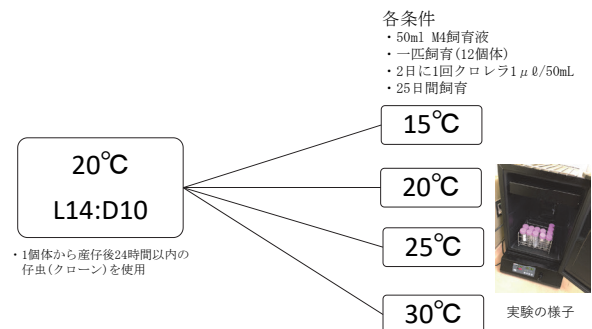


図 2 ライフサイクル決定のための温度条件 光量は 1750 lx に設定した。

Ⅲ 結果

(1) 生存率と最長生存日数について

各飼育温度条件下での生存率を図3に示す。25日の飼育期間で最後まで生存していたのは、15℃、20℃、25℃であった。また各条件で生存率50%以下になった飼育期間は15℃では25日目、25℃では19日目、30℃では9日目であった。20℃条件は50%を下回らなかった。15℃では12個体中6個体、20℃では12個体中9個体、25℃では12個体中5個体が生存していた。30℃では25日までに12個体すべてが死亡した。30℃ではもっとも長く生存した個体でも13日間であった。生存率の高いものから温度条件を並べると20℃ > 15℃ > 25℃ > 30℃であった。また、15℃、20℃、25℃、30℃の4つの温度条件での最長生存日数はそれぞれ、51日、61日、41日、13日であり、20℃ > 15℃ > 25℃ > 30℃の順であった。

(2) 総産仔数について

25日間の飼育期間中すべての温度条件で産仔が確認できたが、30℃では1回のみ1個体が3匹を産仔しただけだった。それ以外の温度条件では複数回の産仔が確認できた。総産仔数の平均は15℃では約70匹、20℃では約115匹、25℃では約12匹となった(図4)。温度と総産仔数についてt検定を行った結果、15℃と20℃、20℃と25℃、25℃と30℃、15℃と25℃の間で $p < 0.01$ で有意差が見られた。総産仔数が多いものから並べると、20℃ > 15℃ > 25℃であった。

(3) 産仔回数、平均産仔数、産仔間隔について

平均産仔回数に関して、20℃では約8回の産仔が確認され最も多い結果となった。15℃では約4回、25℃では約3.6回の産仔であった。30℃では1個体のみが1回の産仔を行った(図5)。温度と産仔回数についてt検定を行った結果、15℃と20℃、20℃と25℃、25℃と30℃の間で $p < 0.01$ で有意差が見られた。しかし、15℃と25℃では有意差が見られなかった。

一回当たりの平均産仔数を図6に示す。温度依存的に1回あたりの平均産仔数は減少していることがわかる。温度と平均産仔数についてt検定を行った結果、20℃と25℃の間で $p < 0.01$ で有意差が見られた。

平均産仔数に関してはその推移を図7に示した。15℃と20℃では他の条件よりも多く産仔が行われ、両条件ともに2回目に6回目にピークがありその間の15℃では5回目に、20℃では4回目に一度大きく産仔数が減った。その後再び産仔数が増えた。

また、産仔間隔に関しては、20℃が最も短い4.1日となった。15℃では7.1日、25℃では9.9日となり、20℃ < 15℃ < 25℃で産仔間隔が短かった(図8)。温度と産仔間隔についてt検定を行った結果、20℃と25℃の間で $p < 0.01$ で有意差が見られた。

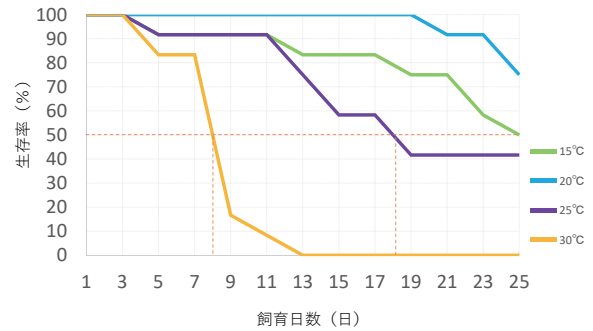


図3 各温度における生存率

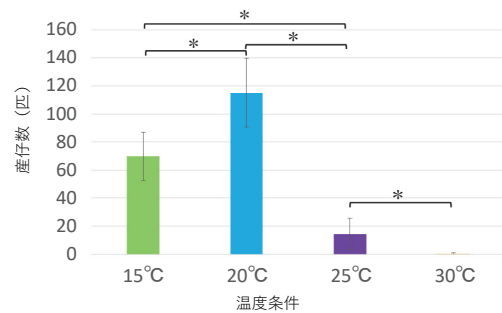


図4 各温度における総産仔数
バーは標準偏差を示す。* t検定の結果、 $p < 0.01$ で有意差が見られた。

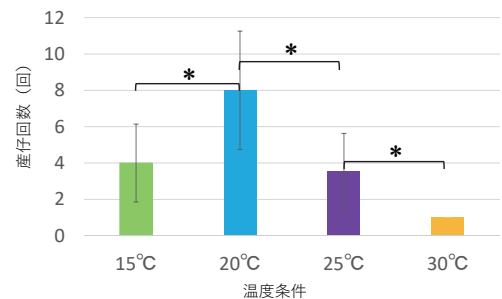


図5 各温度における平均産仔回数
バーは標準偏差を示す。* t検定の結果、 $p < 0.01$ で有意差が見られた。

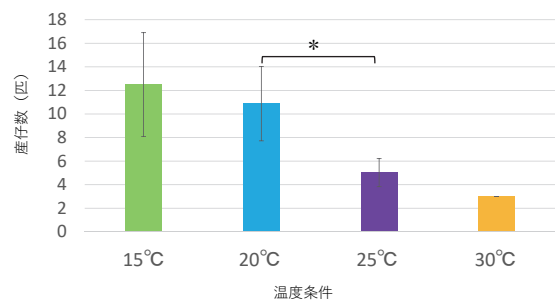


図6 各温度における平均産仔数
バーは標準偏差を示す。* t検定の結果、 $p < 0.01$ で有意差が見られた。

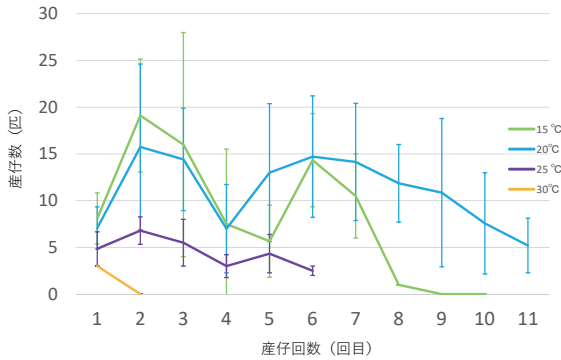


図7 平均産仔数の推移
バーは標準偏差を示す。

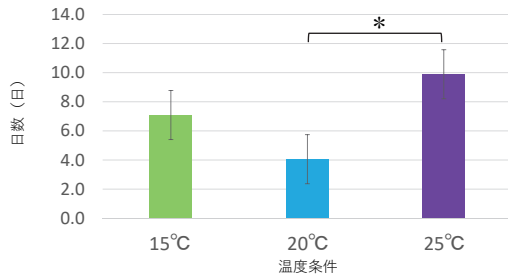


図8 各温度における産仔間隔
バーは標準偏差を示す。* t検定の結果、 $p < 0.01$ で有意な差が見られた。

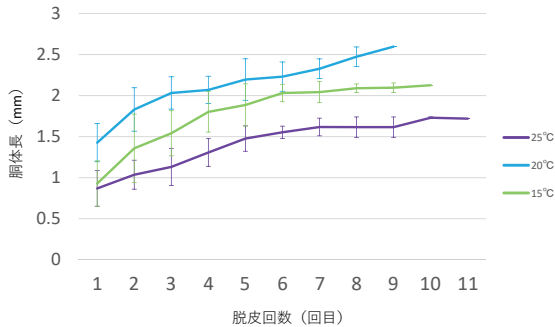


図9 各温度における胴体長の推移
バーは標準偏差を示す。

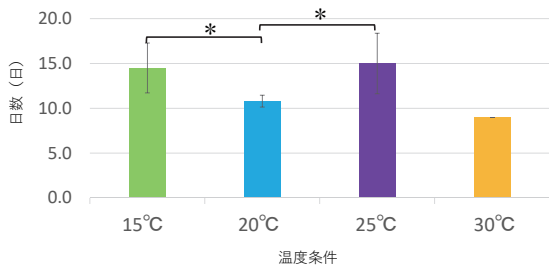


図10 各温度における成長速度
バーは標準偏差を示す。* t検定の結果、 $p < 0.05$ で有意な差が見られた。

(4) 脱皮回数と胴体長について

Daphnia は環境の変化に伴って、頭部、殻刺の長さが変化することが知られているため(花里 1998)、全長ではなく胴体長を測定することで *D. pulicaria* × *D. pulex* の成長を調べた。胴体長は、餌やりの際に採取した脱皮殻を測定することで調べた。25日間の脱皮殻の大きさを調べた結果、1回目の脱皮殻の平均は15°Cが約0.91 mm、20°Cが約1.42 mm、25°Cが約0.87 mmであった。30°Cは1個体が1回だけ脱皮をしたが、保存の状態が悪く測定することができなかった。脱皮回数を重ねるごとに胴体長も大きくなり、15°C、20°C、25°Cではそれぞれ、最高で10回、9回、11回の脱皮をした。また、6回目、9回目、10回目まで脱皮殻が大きくなった(図9)。最終的な胴体長を比較すると、20°C > 15°C > 25°Cの順に胴体長が大きかった。

(5) 成長速度について

孵化後、初めての産仔までに要する期間(成長速度)は、15°Cでは約14.5日、20°Cでは約10.8日、25°Cでは約15日、30°Cでは1個体のみの記録であるが9日であり、20°Cで成長が最も速かった(図10)。t検定を行ったところ、15°Cと20°C、20°Cと25°Cの間で $p < 0.05$ で有意な差が見られた。しかし、15°Cと25°Cでは有意な差が見られなかった。

(6) 20°Cでのライフサイクルについて

D. pulicaria × *D. pulex* のライフサイクルの概要を表1に示す。20°Cでの飼育が生存率、産仔数が最も高く最適条件であった。最適温度の20°Cでは、孵化後約11日間で成長し、仔虫を産出するようになる。産仔は約4日の間隔で行われ、1回で約11個体の仔虫が産み出される。1個体の総産仔数は115匹であり、胴体長は2.5 mmまで大きくなり、最長寿命は61日間であった(図11)。長日(L14:D10)の場合、温度を変えても休眠卵を産出することはなく、単為生殖のみで繁殖した。

表1 *D. pulicaria* × *D. pulex* の各温度条件下でのライフサイクルの概要

	15°C	20°C	25°C	30°C
生存率50%	25日目	25日以上	19日目	9日目
胴体長(最大値)	2.1 mm	2.5 mm	1.7 mm	測定不可
体長(最大値)	2.8 mm	3.2 mm	2.2 mm	測定不可
総産仔数(平均)	69匹	115匹	12匹	3匹 (1個体のみ)
平均産仔回数	4回	8回	3.6回	1回 (1個体のみ)
平均産仔数	13匹	11匹	5匹	3匹
産仔間隔	7日	4日	10日	記録なし
成長速度 (産仔を開始するまでにかった日数)	15日	11日	15日	9日 (1個体のみ)
生存日数(最長記録)	51日	61日	41日	13日
脱皮回数(最大)	10回	9回	11回	1回

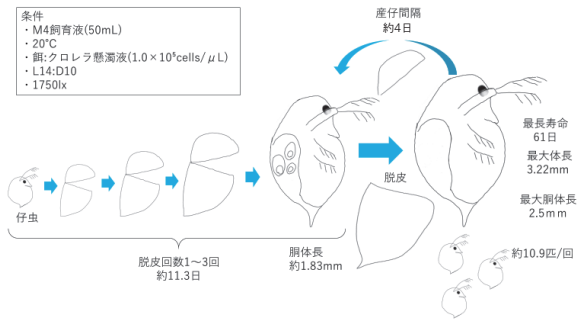


図 11 20 °C条件下でのライフサイクルの概要

IV 考察

兵庫県の各所で採取が可能な *D. pulicaria* × *D. pulex* のライフサイクルを4つの温度条件で比較検討した。

D. pulicaria × *D. pulex* の生存温度範囲に関して、15 °C、20 °C、25 °C、30 °Cのいずれの条件でも10日以上生存することができた。しかし、30 °Cで産仔した個体が1個体であったことから、*D. pulicaria* × *D. pulex* の生存温度範囲の上限として26-29 °Cが考えられる。これは、吉田 (2015) による、*D. pulex* の生存範囲の上限、26-29 °Cとほぼ一致した。本研究では最も低い温度で15 °Cを設定したが、Ziarek (2011) によると、アメリカのウィスコンシン州のアレクアッシュ湖では3-22 °Cの水温でも *D. pulicaria* が生息していることが報告されている。このことから *D. pulicaria* × *D. pulex* の下部限界は15 °Cよりもさらに下にあると考えられる。

これまでに兵庫県の各地で採取が可能な2種類の *Daphnia* の20 °C条件下でのライフサイクルが明らかとなっており (笠原ら 2018)、その2種類の *Daphnia* は遺伝子解析と休眠卵の観察により、*D. pulex* × *D. pulicaria* と *D. sinensis* に同定されている (佐田 2019)。本研究の *D. pulicaria* × *D. pulex* のライフサイクルとの比較を表2に示す。生存率50%を25日以上維持できるのは、*D. pulicaria* × *D. pulex* と *D. sinensis* である。体長は *D. sinensis* が最も大きく4.0 mmに達した。総産仔数は *D. pulicaria* × *D. pulex* と *D. pulex* × *D. pulicaria* が同じ115匹で最も多かった。平均産仔数は *D. pulicaria* × *D. pulex* と *D. pulex* × *D. pulicaria* が同じ11匹で最も多かった。産仔間隔については *D. pulex* × *D. pulicaria* が2.5日と最も短かった。成長速度と生存日数に関しては *D. sinensis* が7.8日と62日と最も長い結果となった。20 °C環境では3種とも1か月以上生存し、100匹以上を産仔することがわかる。

D. pulicaria × *D. pulex* と *D. pulex* × *D. pulicaria* はともに *D. pulicaria* と *D. pulex* との雑種であるが、母系が異なっている。その母系違いによるライフサイクルを比

表2 *D. pulicaria* × *D. pulex*, *D. pulex* × *D. pulicaria*, *D. sinensis* のライフサイクルの比較

	<i>D. Pulicaria</i> × <i>D. pulex</i>	<i>D. pulex</i> × <i>D. pulicaria</i>	<i>D. sinensis</i>
生存率50%	25日以上	24日	25日以上
胴体長(最大値)	2.5 mm	1.8 mm	2.5 mm
体長(最大値)	3.6 mm	2.6 mm	4.0 mm
総産仔数(平均)	115 匹	115 匹	101 匹
平均産仔数	11 匹	11 匹	7 匹
産仔間隔	4.1日	2.5日	2.8日
成長速度 (産仔を開始するまでにかかった日数)	11日	9日	8日
生存日数(最長記録)	61日	44日	62日

表3 *D. pulicaria* × *D. pulex*, *D. pulex* × *D. pulicaria* の母系の違いによるライフサイクルの比較

	生存率 50%	体長	総産仔数	生存日数	産仔間隔
<i>D. pulicaria</i> × <i>D. pulex</i>	25日以上	3.6 mm	115匹	61日	4.1日
<i>D. pulex</i> × <i>D. pulicaria</i>	24日	2.6 mm	115匹	44日	2.5日

較すると、総産仔数と平均産仔数の結果に違いが見られない (表2)。反対に、体長と産仔間隔、生存日数に違いが見られる (表3)。体長は *D. pulicaria* × *D. pulex* が *D. pulex* × *D. pulicaria* より大きく育ち、産仔間隔は *D. pulicaria* × *D. pulex* が4.1日に対して、*D. pulex* × *D. pulicaria* は2.5日と短く、生存日数は *D. pulicaria* × *D. pulex* が *D. pulex* × *D. pulicaria* よりも約1.4倍も長く生きる。*D. pulicaria* × *D. pulex* は *D. pulex* × *D. pulicaria* よりも長く生存するが、産仔間隔が長いこと最終的な総産仔数に差が見られなかった。これらのことから、母系の種が *D. pulicaria* か *D. pulex* によって、ライフサイクルに差が生まれることが明らかとなった。そして、この2種の総産仔数には変化がないことから、長く飼育観察をしたい場合には *D. pulicaria* × *D. pulex* を、短い期間で大量のミジンコを用いる場合は *D. pulex* × *D. pulicaria* を飼育することが望ましいと考えられる。

しかし、本研究の日長条件は24時間20 °Cで一定の温度条件であったことから、昼間と夜間の温度差を考慮していない。今後の課題として、昼と夜の温度差を設定することでさらに詳細なミジンコのライフサイクルが解明されるのではないかと考える。また、*D. pulicaria* × *D. pulex* や *D. pulex* × *D. pulicaria*, *D. sinensis* が同時に生息する場合、どのような動態を示すのか今後検討する必要がある。

IV 引用文献

1. Caceres C. E., Christoff A. N., and Boeing W. J. (2007) Variation in ephippial buoyancy in *Daphnia pulicaria*. *Freshwater Biology* 52:313-318.
2. Doumont H.J., and Negrea S.V. (2002) Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world. Introduction to the class Branchiopoda 19:398.

3. 花里孝幸 (1998) ミジンコ—その生態と湖沼環境問題. 名古屋大学出版会 pp.92-95.
4. 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.
5. OECD guideline for the testing of chemicals : *Daphnia magna* reproduction test. (2012).
6. 佐田貴子 (2019) 兵庫県における *Daphnia* 属の分布と多様性の調査および環境 DNA を利用とした教材開発. 兵庫教育大学平成 30 年度修士論文.
7. Toyota K., Cuenca M.C., Dhandapani V., Suppa A., Rossi V., Colbourne V.J., and Orsini L. (2019) Transgenerational response to early spring warming in *Daphnia*. Scientific Reports 9:4449.
8. Ueno M. (1971) Hybrid populations of *Daphnia* from some lakes on Vancouver Island, British Columbia. 甲殻類の研究 4,5:50-61.
9. Urabe J., Ishida S., Nishimoto M., and Weider L.J. (2003) *Daphnia pulicaria*, a zooplankton species that suddenly appeared in 1999 in the offshore zone of Lake Biwa. Limnology 4:35-41.
10. 吉田愛美 (2015) *Daphnia pulex* (Iwaya strain) のライフサイクルに関する基礎的研究. 兵庫県教育大学平成 26 年度修士論文.
11. Ziarek J.J., Nihongi A., Nagai T., Uttieri M., and Strickler J.R. (2011) Seasonal adaptations of *Daphnia pulicaria* swimming behavior : the effect of water temperature. Hydrobiologia 661:317-327.