

## ミジンコ *Daphnia sinensis* (Hiraike strain) の 雄産仔誘導と雄のライフサイクルについて

### Consideration about the Male Offspring Induction and the Male Life Cycles of *Daphnia sinensis* (Hiraike strain)

笠原 恵\* 泉水 麻裕\*\* 上田 美里\*\*\*  
KASAHARA Megumi SENSUI Mayu UEDA Misato

兵庫県加東市平池で採取した *Daphnia sinensis* (Hiraike strain) の雄産仔誘導を試みた。長日条件下 (L14:D10) でパントテン酸暴露により雄を誘導したが、5日齢および1ヶ月齢ともに雄産仔の誘導は見られなかった。また、パントテン酸を常時暴露した場合には正常な仔虫が半数以下であった。1ヶ月齢の個体を用いてパントテン酸暴露を行い、長日条件下 (L13:D11) および短日条件下 (L10:D14) で飼育したところ、雄の産仔が見られた。長日条件下 (L13:D11) と短日条件下 (L10:D14) でパントテン酸の暴露なしで個別飼育を行った際に雄産仔は確認されていないことから、 $400\mu\text{M}$  のパントテン酸暴露により雄産仔が誘導できたと考えられる。次に集団飼育による雄産仔の誘導を試みた。雄の産仔は L14:D10・親5個体、L13:D11・親5個体、以外の条件で確認でき、最も雄を産仔した条件は、L14:D10・親10個体であり2.7個体であった。

雄産仔誘導実験で得られた雄を使って雄のライフサイクルを決定した。最長寿命は77日であり、生存率が50%を下回ったのは41日目であった。成長については、2日に1回の脱皮を繰り返して成長し、約2週間で胴体長の長さが安定し始め、L14:D10条件下では約1.2mm でほぼ一定となった。胴体長から全体長を換算した結果、最大の長さは、約1.8mm であった。

キーワード：ミジンコ, *D. sinensis*, 雄産仔誘導, 雄ライフサイクル

Key words : water flea, *D. sinensis*, male offspring induction, male life cycles

#### 1 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するが、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。

*Daphnia* の生殖様式には、有性生殖を行うことで休眠卵を産出する循環単為生殖タイプと、有性生殖を行わず単為生殖のみで休眠卵を産出する絶対単為生殖タイプがある。*D. pulex* (和名：ミジンコ) は絶対単為生殖タイプの個体群が存在することが分かっており (Crease *et al.*, 1989; Hebert *et al.*, 1989), 日本に生息する *D. pulex* は絶対単為生殖タイプであるとされている (So *et al.*, 2015)。一方、*D. similis* (和名：タイリクミジンコ) グループに属している *D. sinensis* については絶対単為生殖タイプであるという報告がないため、循環単為生殖タイプであると

予想される。

*Daphnia* は性染色体による性決定を行わず、雌雄が同一のゲノム情報を持っている。そのため、母体が何らかの環境シグナルを受容することで性分化機構が働き雌雄を産み分けている。近年、雄産仔に関する環境要因と性分化機構についての報告がある。環境要因としては、日長・温度・個体密度などについての報告がある。日長については、アメリカの West Trenton で採取された *D. pulex* (WTN6 strain) が13時間明11時間暗 (以下、L13:D11) 以上の長日条件下では雌を産仔し、L12:D12及び短日条件下 (特に、L10:D14) では雄を産仔することが報告されている (Toyota *et al.*, 2017)。温度については、大阪の辻ヶ池で採取された *D. pulex* を使用して、温度変化 (2℃から20℃, 12℃・15℃から20℃) によって雄の産仔が誘導されたことが報告されている (水野ら, 1960)。個体密度については、北イタリアの池の *D. pulex* の雄が高密度の時期に出現したという報告 (Rossi *et al.*, 2014) や、*D. pulex* (Iwaya strain) と *D. sinensis* (Hiraike strain) において、高密度水による個別飼育で雄産仔が増加した (笠原

\*兵庫教育大学大学院教育実践高度化専攻数理数系教科マネジメントコース 教授

令和3年4月28日受理

\*\*西宮市立南甲子園小学校

\*\*\*鳥取県立青谷高等学校

ら, 2019) という報告がある。また, 複合的に条件が関わっているものもある。*D. magna* (和名: オオミジンコ) において, 短日 (L8:D16) と高密度の条件下が雄産仔を誘導することが報告されている (Hobæk *et al.*, 1990)。

アメリカで採取された *D. pulex* (WTN6 strain) は, 短日 (L10:D14) で温度が低くなるほど雄産仔の割合が高くなり, *D. magna* (NCSU1 strain) は短日 (L10:D14) で温度が高くなるほど雄産仔の割合が高くなることが報告されている (Camp *et al.*, 2019)。また, *D. magna* に幼若ホルモン (juvenile hormone: JH) を曝露すると, 環境条件に関係なく雄の産仔が誘導され (Olmstead and Leblanc, 2002), JH 合成の前駆体であるファルネソン酸メチル (MF) の曝露によっても雄の産仔が誘導される (Toyota *et al.*, 2015)。*D. pulex* (WTN6 strain) を使用したメタボロミクス解析により, 雄産仔条件下では雌産仔条件下に比べ5倍以上高い濃度でパントテン酸が蓄積していること (Toyota *et al.*, 2016) や Protein Kinase C が雄の産仔に関与していることも報告されている (Toyota *et al.*, 2017)。

*Daphnia* のライフサイクルについては, *D. pulex* (Hiraike strain), *D. sinensis* (Hiraike strain), *D. pulicaria* (Mukaiike strain) について報告されているが (笠原ら 2018, 2021), これらは全て雌のライフサイクルであり, 雄のライフサイクルについては報告されていない。

本研究では, *D. sinensis* の雄産仔誘導条件および産仔された雄のライフサイクルを明らかにすることを目的とする。

## II 材料と方法

### A 実験材料

本研究に用いた *D. sinensis* は, 兵庫県の北播磨地域に位置する加東市東古瀬の平池公園 (34° 53'36.2"N, 134° 57'20.2"E) で採取され, 研究室で継代飼育されていたものである。

### 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障害実験における 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  $\omega$  (有限会社日海センター) を50ml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 (L14:D10), 光量1076lxの条件下で飼育した。飼育容器は500ml 広口T型瓶 (アズワン) を用いた。

#### (2) 雌雄の判別

*Daphnia* の雌雄を判別する際には, 頭部の吻及び第一触覚の観察を行った (図1)。雌は吻が長く, 第一触覚は短いため, 第一触覚は吻に隠れている。一方雄では, 吻が伸びず, 押しつぶされたような形をしており, 第一触覚は長いため, 第一触覚が観察できる (Olmstead and Leblanc, 2002)。これらの特徴を観察する際には, *Daphnia* をプレス式血液反応板 近大式 (東新理興) 上に移し, 動きを制限するためパスツールピペット (IWAKI) で水を抜き, 双眼実体顕微鏡 SZ61-ILST-YIS (OLYMPUS) を用いて前述の特徴を観察し, 判別を行った。



図1 *D. sinensis* (Hiraike strain) の雌雄の形態  
A:雄, B:雌  
赤い矢印は雄に特徴的な第一触角を示す。

#### (3) パントテン酸曝露による雄産仔の誘導

##### ① 5日齢の個体を用いた場合

産仔後すぐの *Daphnia* の仔虫は, 成虫に比べて飼育環境の影響を受けやすく, 死亡率が高い。そこで, 産仔後24時間以内の仔虫を温度20°C, 長日 (L14:D10) 条件で5日間予備飼育した5日齢の個体を用いた。パントテン酸の曝露条件として, 常時曝露したもの, 成熟直前 (5, 6 齢) または成熟後 (11, 12 齢) に2日間曝露したもの, 1日ごと, 2日ごとに曝露したものの5パターンとした (図2(A))。各条件につき6個体を使用した。雌1個体をパントテン酸濃度400  $\mu\text{M}$  のM4飼育水50mLが入った50mL遠心チューブ (IWAKI) に入れ, 個別飼育した。温度は20°C, 日長は個別飼育では雄を産仔しない長日 (L14:D10) 条件に設定した。2日に1回, 毎回調整したパントテン酸添加飼育水に水換えをする際, クロレラ懸濁液を餌として  $1 \mu\text{L}$  与えた。パントテン酸を添加しない時期には, M4飼育水を用いて飼育を行い, 飼育水の変更がない期間においても, 2

日に1回は新たな飼育水に水換えを行った。水換えと同時に餌としてクロレラ懸濁液を、2日に1回水換えを行う条件では1  $\mu$  L、毎日水換えを行う条件では0.5  $\mu$  L与えた。調査項目は産仔数とその仔虫の雌雄とした。

② 1ヶ月齢の個体を用いた場合

継代飼育している個体から1ヶ月齢の雌個体を採取して使用した。パントテン酸濃度および飼育方法は上記①と同様である。条件として、温度20℃・光量1750lx・長日条件(L14:D10またはL13:D11)または短日条件(L10:D14)で飼育し、各条件下それぞれ5個体ずつ調査を行った。L10:D14条件下での飼育のみ、照明付インキュベーターFLI-2000A(東京理科大学)内で行った。パントテン酸への曝露は、実験開始から7日目まで行った(図2(B))。毎日、パントテン酸とクロレラ1  $\mu$  Lを加えた飼育水と水換えを行い、8日目以降は2日に1回、パントテン酸を添加していないM4飼育水に水換えを行った。餌としてクロレラ懸濁液を水換えの際に2  $\mu$  L与えた。飼育はパントテン酸曝露後20日目まで行った。生存の確認、産仔の有無と雌雄の判別を調べ、調査後、産仔された仔虫を取り除き継続飼育を行った。

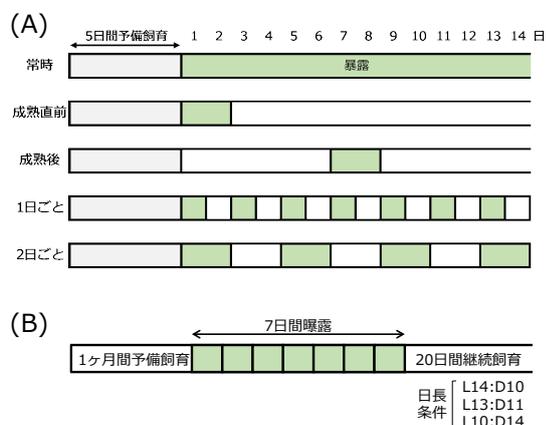


図2 パントテン酸の曝露条件

(A) 予備飼育5日間, (B) 予備飼育1ヶ月間

(4) 日長条件による雄産仔の誘導

予備飼育後5日齢雌1個体を、M4飼育水50mLを入れた50mL遠心チューブで個別飼育した。温度は20℃、日長は長日から短日まで、L13:D11, L12:D12, L11:D13, L10:D14とL10:D14(明期では20℃、暗期では15℃)の5パターンを設定した。この日長は兵庫県内で実在する日長とした(図3)2日に1回新たに作成したM4飼育水に水換えを行った。これと同時にクロレラ懸濁液1  $\mu$  Lを餌として与えた。調査項目は

産仔数とその仔虫の雌雄とした。なお、調べ終わった仔虫はチューブに戻さず、母体は常に1匹飼いとるようにした。仔虫の雌雄を判別する際には、仔虫を99.5%のエタノールで固定し、観察した。

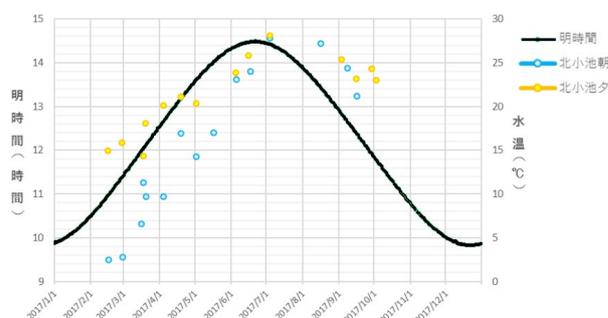


図3 神戸市の明時間の変化と平池の水温

神戸(北緯:34.6833° 東経:135.1833°)の明時間は、国立天文台HP(2017年10月調べ)

<http://eco.mtk.nao.ac.jp/koyomi/dni/2017/m2901.html> のデータより算出。

丸印は、平池(北小池)における野外調査で測定した水温を示す。

(5) 集団飼育による雄産仔の誘導

産仔後すぐの *Daphnia* の仔虫は、成虫に比べて飼育環境の影響を受けやすく、生存率が低い。そこで、個別飼育を行った後に集団飼育を行った。継代飼育している集団から雌1個体を採取し、M4飼育水が50mL入った50mL遠心チューブ(IWAKI)に入れ、個別飼育①を行った。個別飼育①より産仔後24時間以内の仔虫を1個体ずつ採取し、同様な方法で個別飼育②を行った。個別飼育②より産仔後24時間以内の仔虫を本実験に使用した。

予備飼育後の雌個体を、M4飼育水が50mL入った50mL遠心チューブ(IWAKI)に入れ、温度20℃・光量1750lx・長日条件(L14:D10またはL13:D11)で43日間飼育した。個体数は5・10・15・20個体に設定した。餌として2日に1回クロレラ懸濁液を5  $\mu$  L与えた。毎日、生存確認を行い、産仔の有無と雌雄を調べた。調査後、死んだ親個体、産仔された仔虫・休眠卵を取り除き継続飼育を行った。

(6) *D. sinensis* (Hiraike strain) の雄のライフサイクルの決定法

産仔後24時間以内の雄1個体を、M4飼育水が50mL入った50mL遠心チューブ(IWAKI)に入れ、条件として、温度20℃・光量1750lx・長日条件(L14:D10)で飼育した。2日に1回の間隔で水換えを行い、餌としてクロレラ懸濁液を1  $\mu$  L与えた。毎日、生存確認を行い、水換えの際には脱皮の有無を調べた。確認できた脱皮殻は胴体長の測定のために、2.0mLマイクロチューブ(イナ・オプティカ)に採取し、99.5%エタ

ノールで固定した後、冷蔵庫で保存した。測定は、生物顕微鏡 CX21-HKS (OLYMPUS) とマイクロメーター (OLYMPUS) を用いて行った。胴体長の測定方法は笠原らの方法 (2018) に従った。観察は10 個体行い、個体が死ぬまでの期間から生存率を求めた。

### III 結果

#### (1) パントテン酸曝露による雄産仔の誘導について

5 日間予備飼育した5 日齢の個体を用い、長日 (L14; D10) 条件でのパントテン酸曝露を行い、雄誘導を試みたが、どのパターンの曝露方法 (図2(A)) によっても雄の産出は見られなかった (表1)。パントテン酸を常時曝露をした場合には正常な仔虫が半数以下であり、ミジンコ自体の生育に影響を及ぼしていた。

1 ヶ月間予備飼育した1 ヶ月齢の個体を用い、パントテン酸曝露を行った後、日長条件の異なる飼育条件下で雄誘導を試みたところ、短日条件下 (L10:D14) で雄誘導が14個体と最も高かった (表2)。

長日条件下 (L13:D11) においても5 個体の雄誘導は見られたが、長日条件下 (L14:D10) では雄誘導は見られなかった (表2)。

表1 パントテン酸曝露方法の違いによる雄産仔の誘導

L14:D10	常時	成熟直前	成熟後	1日ごと	2日ごと
総産仔数	178	70	67	59	69
正常な仔虫	73	65	59	59	68
雌産仔	73	65	59	59	68
雄産仔	0	0	0	0	0

表2 パントテン酸曝露後の飼育環境の違いによる雄産仔の誘導

	L 14:D10	L 13:D11	L 10:D14
総産仔数	217	415	211
雌産仔	217	410	197
雄産仔	0	5	14

#### (2) 日長条件による雄産仔の誘導について

長日条件下から短日条件下まで、L13:D11, L12:D12, L11:D13, L10:D14と L10:D14 (明期では20°C, 暗期では15°C), どの日長条件で飼育しても雄産出の誘導は見られなかった (表3)。

表3 日長条件の違いによる雄産仔の誘導

	L14:D10	L13:D11	L12:D12	L11:D13	L10:D14	L10:D14 (20°C⇄15°C)
総産仔数	431	540	87	113	47	181
正常な仔虫	431	537	85	113	22	179
雌産仔	431	537	85	113	22	179
雄産仔	0	0	0	0	0	0

#### (3) 集団飼育による雄産仔の誘導について

雄の産仔は L14:D10・親5個体, L13:D11・親5個体, 以外の条件で確認できた (表4, 図4)。最も雄を産仔した条件は、L14:D10・親10個体であり2.7個体であった。雄の産仔が見られる条件では、ある程度雌を産仔してから雄が産仔されるものが多く見られた。また、雄の産仔は20日前後で多く見られ、初期段階ではあまり見られなかった。

表4 集団飼育による雄産仔の誘導

【条件】 温度・日長・親個体数	雌産仔	雄産仔
20°C・L14:D10・5 個体	429.7	0
〃 10個体	281.3	2.7
〃 15個体	192.7	0.3
〃 20個体	149.3	0.3
20°C・L13:D11・5 個体	818	0
〃 10個体	637.3	0.3
〃 15個体	370.7	1.7
〃 20個体	213.3	0.3

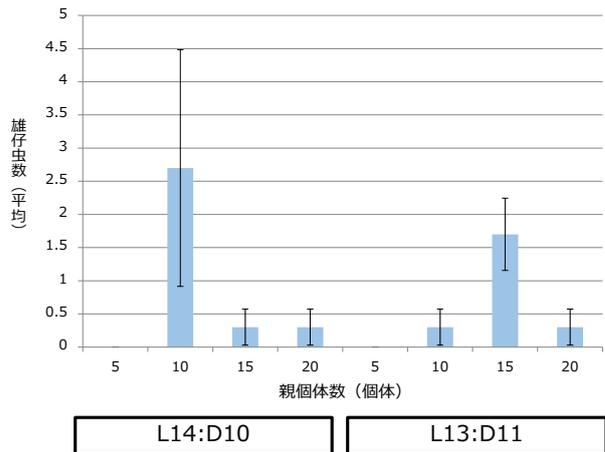


図4 長日条件下 (L14:D10と L13:D11), 集団飼育における雄産仔の誘導

#### (4) *D. sinensis* (Hiraike strain) の雄のライフサイクルについて

最長寿命は77日であり、生存率が50%を下回ったのは41日目であった (図5)。成長については、2日に1回の脱皮を繰り返し成長した。体長については、*Daphnia* は、環境の変化に伴い頭部に突起ができたり、殻刺の長さが変化するため (花里, 1998), 本研究では変化が少ない胴体長の測定を行った。胴体長の長さの推移を図6に示す。約2週間で胴体長の長さが安定し始め、L14:D10条件下では約1.2mm でほぼ一定となった。胴体長から全体長を換算した結果, 最大の長さは、約1.8mm であった。雄のライフサイクルについてまとめたものを図7に示す。

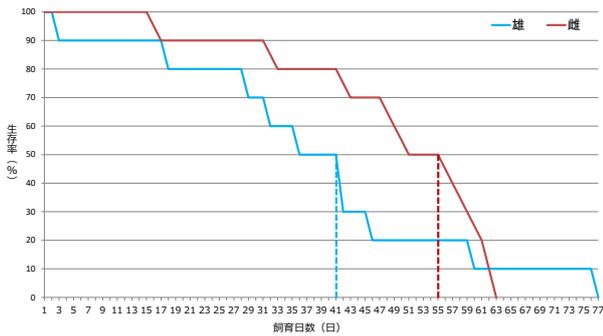


図5 長日条件下(L14:D10)における *D. sinensis* (Hiraikae strain) の生存率  
青線は雄、赤線は雌の生存率を示す。点線は生存率50%の日数を示す。

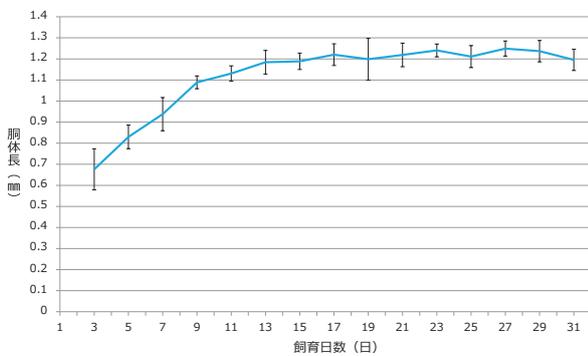


図6 長日条件下 (L14:D10) における雄の胴体長の長さの推移

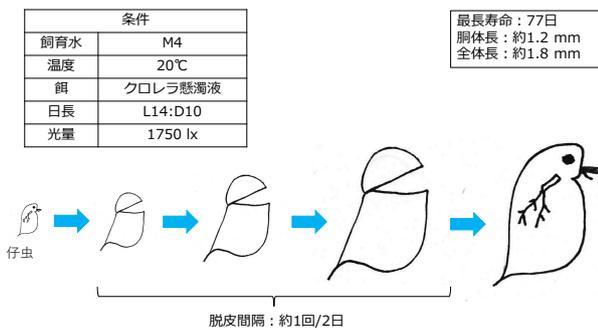


図7 長日条件下 (L14:D10) における *D. sinensis* (Hiraikae strain) 雄のライフサイクル

#### IV 考察

(1) *D. sinensis* (Hiraikae strain) 雄産仔の誘導について  
*Daphnia* は、環境条件が悪いと雄を産仔し、有性生殖を行い休眠卵を産む。この休眠卵は耐久性があり、*Daphnia* の保存に適していると考えられる。循環単為生殖型の *Daphnia* の休眠卵を産出させるためには雄の産出が必須となる。本研究では、循環単為

生殖型と考えられる *D. sinensis* (Hiraikae strain) の雄産出の誘導について様々な検討を行った。

Toyota *et al.* (2016) は、*D. pulex* (WTN6 strain) への20, 40, 100, 200, 400  $\mu$  M のパントテン酸曝露実験を行い、40~400  $\mu$  M では、約7割の母体が雄を産出することを確認した。これにより、パントテン酸が *Daphnia* の性決定に関与していることが報告された。*D. sinensis* においては、まだパントテン酸曝露による雄産仔の誘導は確認されていない。そこで、*D. sinensis* (Hiraikae strain) のパントテン酸添加による雄産仔の誘導を試みた。

*D. sinensis* の5・6日齢(成熟直前)に常時、2日間のみ、1日おき、2日おき、または、11・12日齢(成熟直後)に2日間のみ曝露した結果、いずれの場合も雄産仔は誘導されなかった。1ヶ月齢の *D. pulex* では、雄産仔が誘導されることから、同様に *D. sinensis* でも1ヶ月齢の雌個体を用い、パントテン酸曝露期間を1週間として実験を行った。その結果、雄産仔が L13:D11条件と L10:D11条件で確認できた(表2)。L13:D11条件と L10:D11条件でパントテン酸の曝露なしで個別飼育を行った際に雄産仔は確認されていない(表3)。これより、400  $\mu$  M のパントテン酸曝露により雄産仔が誘導できたと考えられる。また、パントテン酸を曝露してからすぐに雄産仔があるわけではなく、1~2週間ほどの雌産仔を経てから雄産仔が見られているが、短日条件(L10:D14)の方が雄の産仔数も多く、産仔開始から雄産仔の日数が短いため、短日の方が雄産仔の誘導に適しているのではないかと考えられる。また、Camp *et al.* (2019) によると、飼育水は異なるが、短日条件下(L10:D14)において、*D. pulex* は16℃、*D. magna* は22℃で雄の産仔が多く見られている。本実験では20℃で行っているため、温度を変えることで雄産仔を誘導できる可能性がある。

*D. pulex* (Hiraikae strain) および *D. sinensis* (Hiraikae strain) の長日条件下(L14:D10)での個別飼育では、雄と休眠卵産出が行われない(笠原ら, 2018)。しかし、集団飼育を想定した *D. pulex* (Iwaya strain) と *D. sinensis* (Hiraikae strain) の高密度水による個別飼育では、雄産仔が見られた(笠原ら, 2019)。そこで、集団飼育による雄産仔の誘導を試みた。その結果、雄産仔が見られた(表4)。個別飼育では見られず、集団飼育では見られる理由としては、個体密度が関係しているのではないかと考えられる。雄産仔及び休眠卵産出について、高密度条件下で多く見られたという報告が多数あることから(Alekseev *et al.*, 2001; Dinh *et al.*, 2018; Hobæk *et al.*, 1990; 笠原ら, 2019; Rossi *et al.*, 2014; Stross *et al.*, 1965; Stross,

1969), 集団飼育による高密度条件下を環境の悪化と察知し, 雄を産仔するのではないかと考えられる。

(2) *D. sinensis* (Hiraiké strain) の雄のライフサイクルについて

集団飼育で産仔された雄を用いて, 20℃, 長日 (L14:D10), 光量 1750lx 条件下での *D. sinensis* (Hiraiké strain) の雄のライフサイクルを明らかにした (図7)。L14:D10条件下では, 最長77日間生存し, 最大胴体長が約1.2mm, 全体長が約1.8mm に達した。

L14:D10条件下での雄のライフサイクルを, 雌のライフサイクル (笠原ら, 2018) と比較した (表5)。最長生存日数は, 雌の63日に比べ, 雄の方が77日と長い, これは1個体のみの結果であり, 生存率で考えた場合, 50%を下回ったのは, 雄の41日目と比べ, 雌は2週間遅い55日目であった。このことから, 雌の方が雄よりも長生きすることが分かった。また, 全体長については, 雄は約1.8mm, 雌は約4.0mm と雌の方が約2.2倍長かった。更に, 胴体長の長さが安定し始める時期は雌の22日目に比べ, 雄は約14日目と少し早い結果となった。胴体長の長さが安定し始めてからも脱皮は行われ, 雄も雌も2日に約1回のペースで行っていた。以上より, 雌の方が雄よりも生存に強い個体であり, 体長も2倍近く大きくなることが分かった。雄は雌と違い産仔能力はなく, 雌と交尾することが存在意義であると考えられる。そのため, 体長が小さいことで素早く動くことが可能となり, 交尾しやすくなるのではないかと考えられる。また, 交尾をするにあたって, 雌に向かってアタックするなど, 多大なエネルギーが必要であると予想できるため, 体長を小さくすることでエネルギーを最小限に抑えていることも考えられる。

表5 長日条件下 (L14:D10) における *D. sinensis* (Hiraiké strain) 雄雌のライフサイクルの比較

	本研究 <i>D. sinensis</i> (Hiraiké strain) の雄	笠原ら (2018) <i>D. sinensis</i> (Hiraiké strain) の雌
生存率50%以下	41日目	55日目
最長生存日数	77日間	63日間
最大胴体長	約1.2mm	約2.5mm
最大体長	約1.8mm	約4.0mm
脱皮間隔	約1回/2日	約1回/2日

V 引用文献

1. Alekseev V., and Lampert W. (2001) Maternal control of resting-egg production in *Daphnia*. Nature 414:899-901.
2. Camp A. A., Haeba M. H., and LeBlanc G. A. (2019) Complementary roles of photoperiod and temperature in

- environmental sex determination in *Daphnia* spp. Journal of Experimental Biology 222(4):1-7.
3. Crease T. J., Stanton D. J., and Hebert P. D. (1989) Polyphyletic origins of asexuality in *Daphnia pulex*. II. Mitochondrial-DNA variation. Evolution 43:1016-1026.
4. Dinh H. D. K., Tran T. H. N., Lu T. L., Nghiep T. H., Le P. N., and Do H. L. C. (2018) The effect of food, light intensity and tank volume on resting eggs production in *Daphnia carinata*. Journal of Environmental Management 217:226-230.
5. 花里孝幸 (1998) ミジンコ —その成体と湖沼環境問題. 名古屋大学出版会. 92-95.
6. Hebert P. D. N., Beaton M. J., Schwartz S. S., and Stanton D. J. (1989) Polyphyletic origins of asexuality in *Daphnia pulex*. I. Breeding-system variation and levels of clonal diversity. Evolution 43:1004-1015.
7. Hobæk A., and Larsson P. (1990) Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71(6) : 2255-2268.
8. 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.
9. 笠原恵, 三木美奈 (2019) 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. 兵庫教育大学研究紀要. 53:85-90.
10. 笠原恵, 中村勇樹 (2021) ミジンコ *Daphnia pulicaria* × *Daphnia pulex* (Mukaiike strain) のライフサイクルについて. 兵庫教育大学研究紀要. 58:121-126.
11. 水野寿彦, 畑栄男, 河野猪太夫 (1960) *Daphnia pulex* の季節的消長とその要因分析 I -生活環と水温の関係-. Japanese Journal of Ecology 10:1-6.
12. OECD guideline for the testing of chemicals: *Daphnia magna* reproduction test (2012).
13. Olmstead A. W., and Leblanc G. A. (2002) Juvenoid hormone methyl farnesoate is a sex determinant in the crustacean *Daphnia magna*. Journal of Experimental Zoology 293:736-739.
14. Rossi V., Maurone C., Benassi G., and Ferrari I. (2014) Reproduction of *Daphnia pulex* in a Northern Italy pond. Journal of Limnology 73(3):459-467.
15. So M., Ohtsuki H., Makino W., Ishida S., Kumagai H., Tamaki K. G., and Urabe J. (2015) Invasion and molecular evolution of *Daphnia pulex* in

- Japan. Limnology and Oceanography 60(4):1129-1138.
16. Stross R. G. (1969)  
Photoperiod control of diapause in *Daphnia*. III. Two stimulus control of long-day, short-day induction. The Biological Bulletin 137(2):359-374.
  17. Stross R. G., and Hill J. C. (1965)  
Diapause induction in *Daphnia* requires two stimuli. Science 150:1462-1464.
  18. Toyota K., Miyakawa H., Hiruta C., Furuta K., Ogino Y., Shinoda T., Tatarazako N., Miyagawa S., Shaw J. R., and Iguchi T. (2015)  
Methyl farnesoate synthesis is necessary for the environmental sex determination in the water flea *Daphnia pulex*. Journal of Insect Physiology 80:22-30.
  19. Toyota K., Gavin A., Miyagawa S., Viant M. R., and Iguchi T. (2016)  
Metabolomics reveals an involvement of pantothenate for male production responding to the short-day stimulus in the water flea, *Daphnia pulex*. Scientific Reports 6 (April):1-9.
  20. Toyota K., Sato T., Tatarazako N., and Iguchi T. (2017)  
Photoperiodism of male offspring production in the water flea *Daphnia pulex*. Zoological Science 34(4):312-317.