

## 海産ツボワムシ類 *Brachionus* の分類とその手法

小谷 知也

海産ツボワムシ類は海産魚介類種苗生産では初期餌料として利用されている産業上重要な動物プランクトンである。海産ツボワムシ類の分類については、長い間論争が続けられており、未だに解決していない。かつては1種に分類されていたが、形態、増殖特性、遺伝的変異、生殖隔離状況から2種に分類された。しかし、いくつかの変異株が発見されるようになり、また、遺伝的変異解析から3種以上のタイプが存在するとの報告もある。一方で、遺伝的変異や形態的変異があると判断された場合でも、他の増殖特性や生殖隔離状況などが詳細に分析されているわけではない。本稿では、ワムシ分類の経緯と行われてきた分類の方法について検討を行い、将来ワムシ分類が向かうべき方向性について考察する。

キーワード：海産ツボワムシ類、*Brachionus*、分類、形態的特徴、遺伝的変異、生殖隔離

動物を分類する際には様々な手法が用いられるが、19世紀から20世紀初頭まで形態による分類手法が主流であった。一方、形態では区別できない動物種が発見されるようになり、Mayr<sup>1)</sup> は姉妹種 (sibling species) の概念を取り入れるようになった。姉妹種は水圏に生息する無脊椎動物では一般的である<sup>2)</sup>。そのため、水産業などで取り扱われる動物種の中で、姉妹種であることが認識され得なかった場合、産業上大きな混乱を招くことに繋がりがかねない<sup>2-4)</sup>。

海産ツボワムシ類 (以下ワムシと略称) は、海産魚介類種苗生産で初期餌料として用いられている動物プランクトンであり、産業上極めて重要な動物種である。このワムシには、形態によって数種に分類されることが知られているが、過去には1種として分類されていた経緯がある。その後再分類されたが、熱帯域から変異株が発見されるようになり、それらの分類について検討が行われている。ある研究グループは、ワムシが数種のタイプに分けられると報告している。これにより、ワムシ分類は混迷を極めてしている状態である。

本稿では、ワムシ分類の経緯について説明すると共に、これまで行われてきた分類の方法について検討を行い、将来ワムシ分類が向かうべき方向性について考察する。

### 海産ツボワムシ類の分類

主として汽水域に分布する海産ツボワムシ類は、大きさや形態が稚仔魚の餌料として適当であるうえ、短期間に大量生産が可能なることから、海産魚介類の種苗生産用初期餌料として不可欠な汽水産動物プランクトンである。従来ワムシには、*Brachionus plicatilis* と *B. dimidiatus* が存在するとされてきたが、*B. dimidiatus* は先に述べた初期餌料として用いられるワムシ (*B. plicatilis*) とは形態的に明瞭に区別され、*B. plicatilis* は左右3対であるのに対し、*B. dimidiatus* の後頭棘は左右2対である。一方 *B. plicatilis* には、天然域で地理的に隔離された個体群の間に大きな形態的変異があり、Rylov<sup>5)</sup> はヨーロッパのワムシに長型 (Ferlängerte Form) と幅広型 (Breite Form) があることを指摘している。日本では種苗生産機関のワムシ培養槽中に大型のワムシと小型のワムシが混在していることが報告されている<sup>6)</sup>。大上<sup>7)</sup> は、大型で後頭棘

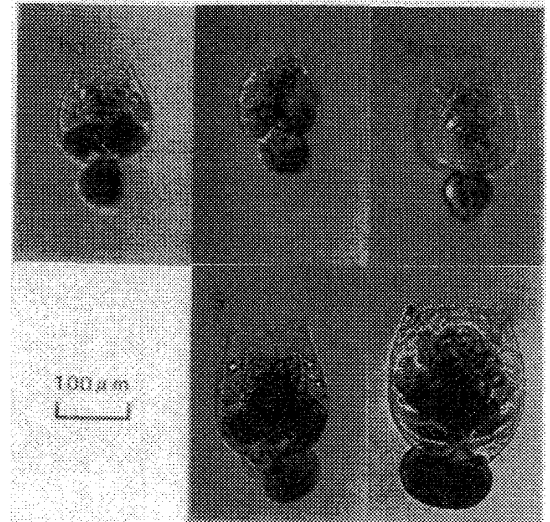


Fig. 1 Five strains of euryhaline rotifer *Brachionus*. Upper pictures show very small size of rotifer strains from tropical regions, lower-middle does the type of small size (S type) and lower-right does large type (L type).

の先端が鈍角のワムシをL型、小型で後頭棘の先端が鋭角のワムシをS型と二つの型に分類した (Fig. 1 下段)。Fu et al.<sup>8-9)</sup> は世界各地から67株のワムシを集め、後頭棘の形態から37株をS型、30株をL型とし、それぞれについて形態的特徴を調べると共に、アイソザイム分析を行い各ワムシ株の遺伝的変異を検討した。その結果、67株のワムシは形態的特徴でも遺伝的変異でも全く同一の株群とみなされる2グループに分けることができ、それぞれが後頭棘形状に基づいて識別可能なグループと同じであることを確認した。また、Rumengan et al.<sup>10)</sup> は、L型3株、S型3株について核型を調べ、染色体の数と形をそれぞれ求めた。その結果、L、S型の染色体数はそれぞれ22および25で、2型間で異なることを明らかにした。Hirayama and Rumengan<sup>11)</sup> はS型10株とL型9株の増殖パターンを17~34℃の4段階の水溫で調べ、S型は高温域で、L型は低温域でよく増殖することを明らかにした。また、Hagiwara and Hirayama<sup>12)</sup> は温度や塩分がワムシの両性世代の発現パターンにもS型とL型の間で異なる作用を与えることを報告している。これらの結果から、S型とL型は形態的にも遺伝的にも大きく異なることが分かる。Fu et al.<sup>13)</sup> は前述の計67株のうち両性生殖を活発に行うS型3株、L型4株を材料として交雑実験を行い、同型内のワムシ間の交雑では休眠卵が形成されたが、S型とL型との異型間には、休眠卵が形成されなかったことを報告している。このことから、S型とL型は生殖的に隔離されている可能性が高い。以上のような経緯を基に Segers<sup>14)</sup> はS型とL型と呼ばれていた *B. plicatilis* の2型を別種であると結論し、S型を *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff、L型は *B. plicatilis* O. F.

## 海産ツボワムシ類 *Brachionus* の分類とその手法

Müller とした。その後、*B. plicatilis* か *B. rotundiformis* が容易には判断できない株が発見されるようになった<sup>15-18)</sup>。*B. rotundiformis* よりも小型の株は熱帯域で発見され、仔魚期の口径が小さいハタ類やシロギスの種苗生産に初期餌料として用いられるようになった (Fig. 1 上段)。これらは海産魚類種苗生産関係者に *B. rotundiformis* (S 型) よりも小さいことから SS 型と呼ばれるようになり、この呼び名が浸透していった<sup>18)</sup>。Hagiwara et al.<sup>18)</sup> は SS 型は *B. rotundiformis* (S 型) と形態的、生態的、遺伝的に似通っており交配前生殖隔離が無いことから考えて、SS 型は *B. rotundiformis* (S 型) の変異株であることを示唆した。また、スペイン・バレンシア近郊の Torreblanca 湿地帯から、形態的、遺伝的に異なる 3 タイプのワムシ株が発見された<sup>15-17)</sup>。その内、小型の 2 株は SM 型、SS 型と呼ばれ、形態的に *B. rotundiformis* の特徴を示していたが、その後の詳細な研究で、この 2 型は遺伝的、形態的に異なっており、互いに生殖的に隔離されていることが明らかとなった<sup>15-17, 19)</sup>。これに関係した研究グループはこの 2 型を別種として記載することを求め<sup>17, 20)</sup>、Ciros-Pérez et al.<sup>21)</sup> は大型の株 (SM) に *B. ibericus* と新しい種名を付け、小型の株 (SS) は *B. rotundiformis* に属すると判断した。こうしたスペインのワムシ株や熱帯域から発見された超小型のワムシ株については形態的及び遺伝的特徴から研究が進められ、それぞれ個々の遺伝的類似性についてもアイソザイム分析などの手法を用いて判明してきていた。Kotani et al.<sup>22)</sup> は最も多くのワムシ 67 株を用いた Fu et al.<sup>8-9)</sup> のデータに、スペインや熱帯域産のワムシ株の形態的、遺伝的解析データを加えて、既に分類の明らかである 67 株との関係について検討した。アイソザイムによる遺伝的変異の解析の結果、熱帯域産及びスペイン産 SS 型株は *B. rotundiformis* (S 型) とは別のグループを形成していた (Fig. 2; D が熱帯域産及びスペイン産 SS 型のグループ)。また、ミトコンドリア DNA 中の COI 及び ITS 遺伝子の塩基配列の解析により *B. rotundiformis* (SS) と *B. ibericus* (SM) との間には大きな差があることが明らかにされており<sup>23)</sup>、スペイン株以外でもマイクロサテライト DNA 解析で一般に *B. rotundiformis* と判断されている株と熱帯域産の超小型ワムシ株との間には大きな遺伝的変異が存在していることが明らかにされている<sup>24)</sup>。したがって、別種として記載されるには至っていないが、熱帯域産の超小型ワムシやスペインの研究グループが *B. rotundiformis* と判断したワムシ株を含むグループと、*B. ibericus* を含む中型サイズの *B. rotundiformis* のグループは互いに遺伝的、形態的に異なる特徴を示していると考えられている。

一方で、Gómez et al.<sup>23)</sup> は塩基配列多様性から海産ツボワムシ類 *Brachionus* の分子系統について検討した結果、

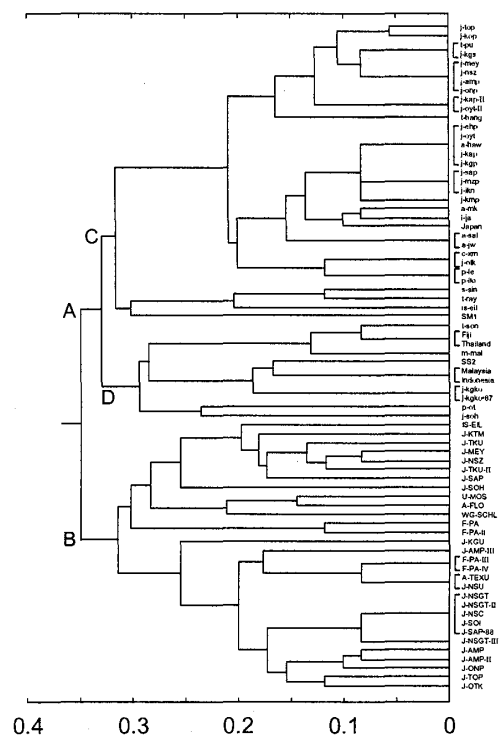


Fig. 2. Dendrogram for 74 strains according to a genetic distance index. The dendrogram is the result of the UPGMA analysis of Rogers' genetic distance (1972). Lower case letters indicate the S morphotype; capital letters indicate the L morphotype. (Kotani et al., 2005)

少なくとも9つの遺伝的系統に分けられると報告している。彼らは、スペイン国内各地で採取した株と世界各地から取り寄せた株を用い、遺伝子解析のみを行っている。その内、約8割がスペイン国内のものであるため、直ちに世界中の *Brachionus* 属のワムシ株にこの結果が適用できるとは限らない。しかし、否定する材料もなく、現在までのところ結論は出ていない。

### 海産ツボワムシ類分類の手法

海産ツボワムシ類の分類は、形態や増殖特性、遺伝的変異、生殖隔離状況の研究結果を通じて検討され、従来一種として扱われてきた *B. plicatilis* が、大型の *B. plicatilis* と小型の *B. rotundiformis* に分類されるに至っている<sup>14)</sup>。種の同定・分類は、形態的な相違点だけで行われることが多い。しかし、対象とする個体あるいは個体群の、特定の形態が、遺伝的に規定されるものかどうかを見極めるのは必ずしも容易ではない<sup>25)</sup>。ワムシについては、被甲の長さ及び後頭棘の形状を形態的分類形質とすることが多い。大上<sup>7)</sup>が検討した後頭棘形状は、前述の *B. plicatilis* と *B. rotundiformis* の種の標徴ともなる非常に特徴的なものであった

(Fig. 3)。Fu et al.<sup>8)</sup>は形態的特徴の解析でワムシ被甲の各部位の測定を行い (Fig. 4)、各部位長さ及び部位比から解析を行っている。また、Ciros-Pérez et al.<sup>21)</sup>も Fu et al.<sup>8)</sup>の方法に2測定部位を増やして形態的特徴の解析を行っている。被甲長さや被甲幅などの各部位長は変異に富んでおり<sup>8, 26-29)</sup>、熱帯域産のSS型ワムシのように被甲長・幅が他株とは非連続性を示すような場合、突然変異か、或いは種内変異なのかを判断するのは難しい。

遺伝的変異については、Rumengan et al.<sup>10)</sup>が核型を調べ、染色体の数と形を報告しているが、*B. plicatilis* と *B. rotundiformis* についてのみ、しかもそれぞれ2株と3株のみで行われているだけで、広範に渡って行われておらず、1995年以降発見された変異株でも全く行われていない。また、集団 (個体群) 間の遺伝的変異を求めるアイソザイム分析も、ワムシに対して用いられているが<sup>9, 16)</sup>、報告によって対象とする遺伝子座 (酵素) や出現したバンドの判定法が異なり、それぞれの研究結果を比較して総合的に論議することは難しい。根井<sup>30)</sup>によれば、種間の遺伝的距離は0.22から1.6、亜種間は0.05以上、地域別個体群 (品種) 間では0.00から0.05の値を示すことが多い。Fu et al.<sup>9)</sup>やKotani et al.<sup>22)</sup>によって示された *B. plicatilis*

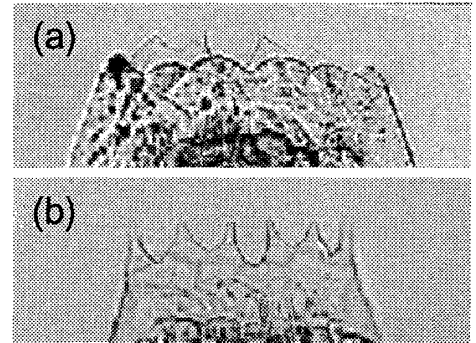


Fig. 3. Shape of lorica spine of *Brachionus plicatilis* and *B. rotundiformis*. Upper (a) shows *B. plicatilis* and lower (b) *B. rotundiformis*.

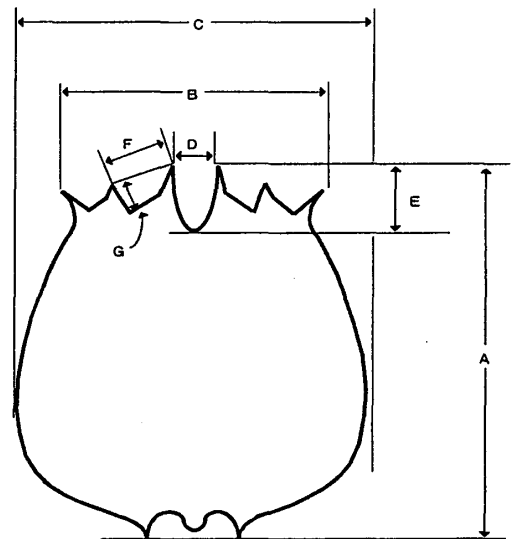


Fig. 4. Seven characteristics (A-G) of the lorica of the euryhaline *Brachionus*, as measured by Fu et al. (1991a).

と *B. rotundiformis* の間の遺伝的距離は 0.3 であるが (Fig. 2)、種内でみた場合、*B. plicatilis* の中の 2 つの大きな系統群間では 0.27、*B. rotundiformis* では 0.28 で種間レベルの遺伝的距離に近い。また亜種レベルの遺伝的距離もいくつかの系統群間でみられる。したがって、種判別を行うためには、アイソザイム分析だけでは不十分である。

*B. rotundiformis* と *B. plicatilis* の間の生殖隔離を、Fu et al.<sup>13)</sup> は交雑実験を通じ、両性世代の最終産物である受精卵 (休眠卵) が形成されるかどうかによって確かめた。両性生殖雌虫は単性生殖雌虫から生じる。この両性生殖雌虫は雄による交尾を受けなかった時、半数体の卵を生む。この半数体卵が孵化して雄虫が産まれる。雄虫が両性生殖雌虫と交尾して受精すると、休眠卵が形成される。Snell<sup>31)</sup> によると、ワムシの交尾行動は、雄虫が雌虫の持つ性フェロモンを認識することが引き金となって始まる。Fu et al.<sup>13)</sup> の実験方法で休眠卵が形成されなかった場合、その意味は一義的に定まらない。即ち、①雄が雌の性フェロモンを認識できなかったために、交尾に至らなかったのか、②それとも認識はしたが交尾が出来なかったのか、③性フェロモンを認識して交尾に至ったけれども受精しなかったのかを判別できない。したがってワムシの生殖隔離が交尾完了前に起こるのか、交尾完了後に起こっているのか確認するためには交尾行動を観察することが、受精卵形成の確認以前に重要であると考えられる。最近の研究では *B. rotundiformis* と *B. plicatilis* の間の生殖隔離状況を知る方法として交尾行動の観察がよく用いられるようになり、*B. plicatilis* と *B. rotundiformis* の雄は互いの雌を区別して認識していることが明らかになっている<sup>16, 32)</sup>。Kotani et al.<sup>33)</sup> は、*B. plicatilis* と *B. rotundiformis* との間では、一連の交尾行動が行われる過程で生殖隔離が生じることを報告している。一方、株間の交尾行動を詳細に観察すると、形態及びアイソザイム分析からは同種と判断されているにも関わらずコピュレーションを起こさない例や、逆に別種と判断された株間でもコピュレーションを起こす例が少数ではあるが存在する<sup>32)</sup>。Kotani et al.<sup>33)</sup> も、*B. plicatilis* の雄が、いくつかの *B. plicatilis* 株の雌に対して全く交尾を完了しないケースを報告している。また、Rico-Martínez and Snell<sup>32)</sup> や Gómez and Serra<sup>16)</sup> の報告では実験に用いた全ての *B. plicatilis* 株間で相互にコピュレーションを起こしているが、その頻度は低い。Kotani et al.<sup>33)</sup> でドイツ産株が自株の雌にはコピュレーションを起こさなかったが他株の雌に対しては起している。したがって、観察において交尾を完了しなかったからといって単純に、別種と判断するわけにもいかない。

雄虫の交尾行動は接触、雌体周辺の旋回、生殖器の挿入の 3 つの段階から構成されている<sup>34, 35)</sup>。このうち、生殖器の挿入のほとんどは被甲に覆われていない繊毛冠部でみられる<sup>34, 36)</sup>。ワムシの性フェロモンは、被甲の至る所に分布し、被甲だけではなく咀嚼器にもその分布は及ぶが、雄の生殖器が挿入される雌の繊毛冠部に最も集中する<sup>37)</sup>。さらに、ワムシ性フェロモンは分子量 29kDa の糖タンパク質であることが明らかにされている<sup>38-40)</sup>。また、Snell et al.<sup>40)</sup> は *B. plicatilis* ロシア株性フェロモンの分離、及び性フェロモンに対するポリクローナル抗体作製に成功した。分離された性フェロモンはロシア株の雄の受容器に強く結合し、この処理をした雄は雌を認識できず、交尾行動が起こらないことを確認した。さらに、作製された抗体は雌のもつ性フェロモンと強く結合し、さらに反応した抗体にビオチン-アビジン系を利用して蛍光物質を付着させることによって性フェロモンが存在している位置を見いだすことができる<sup>40)</sup>。Rico-Martínez & Snell<sup>41)</sup> は *B. plicatilis* と *B. rotundiformis* の 6 株を用いて、前述のロシア株の性フェロモンを反応させた各株の雄を用いた

雌との同株交配を試みたところ、*B. plicatilis* では交尾頻度が下がるが、*B. rotundiformis* の幾つかの株では交尾頻度が下がらなかったことを報告している。また、Rico-Martínez & Snell<sup>42)</sup> は上記と同じ *B. plicatilis*、*B. rotundiformis* の 6 株の雌を Snell et al.<sup>40)</sup> が作成した *B. plicatilis* ロシア株性フェロモン抗体で処理し、その反応度を求めた。その結果、抗体の反応度は株によって異なることが分かった。その際には、*B. plicatilis* 株で反応が強く *B. rotundiformis* 株では反応が弱かった。Kotani et al.,<sup>33)</sup> は *B. plicatilis*、*B. rotundiformis* 及び熱帯域産超小型ワムシ株とロシア株性フェロモン抗体を用いて、同様の結果を報告している。また、Kotani et al.<sup>43)</sup> は *B. rotundiformis* に属している鹿児島県上甕島貝池産のワムシ株性フェロモンから抗体を作成し、*B. plicatilis*、*B. rotundiformis* 及び熱帯域産超小型ワムシ株に反応させている。反応度は株によって異なるが、ロシア株性フェロモン抗体の反応の傾向とは逆で *B. rotundiformis* 株や熱帯域産超小型ワムシ株で反応が強かった。以上のことから、性フェロモンの化学性状が *B. plicatilis* と *B. rotundiformis*・熱帯域産超小型ワムシ株で異なることが分かり、これらの化学構造を解析することによる分類手法が確立できるように思う。また、上記の実験は、両性生殖雌と単性生殖雌を区別しておらず、作成された抗体は強く反応している株の個体には一様に反応している。したがって、単性生殖を行う雌の体表上にも、この性フェロモンは存在していることが分かり、両性生殖を行わない株にも使用できる可能性がある。性フェロモン化学構造はワムシ株間の生殖隔離機構を裏付ける証拠ともなり、重要な要素となるであろう。しかし、今のところ化学構造は完全には明らかにされておらず、技法確立の目途は立っていない。

近年、ミトコンドリア DNA の塩基配列解析やマイクロサテライトマーカーを利用した DNA 解析が行われている<sup>22,23,44,45)</sup>。これらの分子生物学的手法は、系統解析の手法としては他の多くの動物群で用いられており、信頼性の高い手法である<sup>46)</sup>。ワムシに対して用いられるようになったのは近年になってからである。特にミトコンドリア DNA は系統進化を反映していると言われており、その信頼性も高い。スペイン国内のワムシ株の系統解析では、生殖隔離状況なども反映して信頼のおける結果も得られている。しかし、生殖隔離状況については解析結果からある程度の推測は出来るものの、実際に交尾・交雑実験を行わないと明らかにはならない。したがって、こういった分子生物学的手法も単独で分類に用いることは出来ない。一方、ワムシ株の中には両性生殖を起こさない株も存在し、そういう株に対してはこのような手法は有効であると考えられる。

## 展望

Mayr<sup>1)</sup> は「種は互いに交配しうる自然集団の群で、他のそのような群から生殖的に隔離されている。」という生物学的種概念を提唱している。この考え方は、その後多くの研究者によって支持されており、個体群間の生殖隔離の有無は、客観的に種の異同の判別を行う上で、有力な手掛かりとなり得る。一方で、ワムシの場合、単性生殖しか行わない株の場合にも、雄を実験材料に提供できないことから信頼性の高い判断が出来ない可能性もある。前述のように、分子生物学的手法を用いれば、そのような懸念も無くなるが、生殖隔離は無視の出来ない要素である。交配前生殖隔離の原因ともなる性フェロモンの化学構造の違いから、生殖隔離状況を判断するのも 1 つの方法である。いずれの方法も一長一短があるが、これらの結果を総合的に

## 海産ツボワムシ類 *Brachionus* の分類とその手法

評価しなければ、信頼性の高い分類は実施できない<sup>47)</sup>。

海産ツボワムシ類の分類は、学術的意義だけではなく、産業上も重要である。伊藤<sup>48)</sup> がワムシを餌料とした海産魚介類の幼生飼育をして以来、各地の種苗生産機関でワムシの大量培養が開始され、人工種苗生産の初期餌料として汎用されるに至っている。しかし、大半の機関では水温、ワムシ接種密度等が原因でワムシの増殖不良やワムシ密度の急減現象が起こっている<sup>49)</sup>。この対策として、各機関の立地条件や生産時期に適した優良株を導入することにより、良好な増殖が期待できる<sup>49)</sup>。以上のような経緯から、各機関の間では頻繁にワムシ株の譲渡が行われてきたが、その為に多くの株が交流して、現在はワムシ株の由来が全く把握できない状況にある。種苗生産では対象とする魚種やその成長ステージでの体の大きさに合わせて、餌を選択することが重要である。同時に、種苗生産施設の培養設備や気候等の立地条件に適した増殖能力、環境耐性をもつワムシ株を選択することも重要である。しかし、適切な株が存在しない場合、ワムシ株間で育種を行ってしかし現在のように、ワムシ株の由来が把握できていない、あるいは分類が定まっていない状況では、適切なワムシ株選択・作出は不可能である。したがって、海産ツボワムシ類の分類確定は緊急性を持った課題であり、それに伴う簡便な種同定法の確立も急務である。

## 文献

- 1) Mayr, E., Systematics and the Origin of Species. Columbia Univ. Press, New York. 334 pp (1942)
- 2) Knowlton, N., Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**, 189-216 (1993)
- 3) Paterson, H. E. H., The recognition of cryptic species among economically important insects, pp. 1-10. In P. Zalucki (Ed.), *Heliothis: Research Methods and Prospects*. Springer Verlag, New York. (1991)
- 4) Knowlton, N., and Jackson, J. B. C., New taxonomy and niche partitioning on coral reefs: jack of all trades or master of some? *Trends in Ecology & Evolution* **9**, 7-9 (1994)
- 5) Rylov, W. M., Das Zooplankton der Binnengewässer. In, A. Thienemann (ed.), *Die Binnengewässer*. Band XV E. Schweizebart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 62-65 (1935)
- 6) 日野 明德・平野 礼次郎, シオミズツボワムシの大きさの変異について. *日本水産学会講演要旨集*, 昭和 48 年春季大会, 73 (1973)
- 7) 大上皓久, シオミズツボワムシの形態について. *伊豆分場だより*, **184**, 2-5 (1976)
- 8) Fu, Y., Hirayama K., and Natsukari, Y., Morphological differences between two types of the rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Müller. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **151**, 29-41 (1991)
- 9) Fu, Y., Hirayama K., and Natsukari, Y., Genetic divergence between S and L type strains of the rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Müller. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **151**, 43-56 (1991).
- 10) Rumengan, I. F. M., Kayano, H., and Hirayama, K., Karyotypes of S and L type rotifers *Brachionus plicatilis* O. F. Müller. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **154**, 171-176 (1991)
- 11) Hirayama, K., and Rumengan, I. F. M., The fecundity patterns of S and L type rotifers of *Brachionus plicatilis*.

- Hydrobiologia*, **255/256**, 153-157 (1993).
- 12) Hagiwara, A., and Hirayama, K., Preservation of rotifers and its application in the fish hatchery. In, *Finish hatchery in Asia: Proc. Finish Hatchery in Asia '91. TML Conf. Proc., Vol. 3*, edited by C. S. Lee, M. S. Su and I. C. Liao, Tungkang Marine Lab., Taiwan Fisheries Research Inst., Tungkang, Pitung, Taiwan, pp. 66-71 (1993)
  - 13) Fu, Y., Hagiwara, A. and Hirayama, K., Crossing between seven strains of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 2009-2016 (1993)
  - 14) Segers, H., Nomenclature consequences of some recent studies on *Brachionus plicatilis* (Rotifera, Brachionidae). *Hydrobiologia*, **313/314**, 121-122 (1995)
  - 15) Carmona, M. J., Gómez A., and Serra, M., Mictic patterns of the rotifer *Brachionus plicatilis* Müller in small ponds. *Hydrobiologia*, **313/314**, 365-371 (1995)
  - 16) Gómez, A., and Serra, M., Behavioral reproductive isolation among sympatric strains of *Brachionus plicatilis* Müller 1786: insights into the status of this taxonomical species. *Hydrobiologia*, **313/314**, 111-119 (1995)
  - 17) Gómez, A., Temprano, M., and Serra, M., Ecological genetics of a cyclical parthenogen in temporary habitats. *Journal of Evolutionary Biology*, **8**, 601-622 (1995)
  - 18) Hagiwara, A., Kotani, T., Snell, T. W., Assava-Aree, M., and Hirayama, K., Morphology, genetics, and mating behavior of small tropical marine *Brachionus* strains (Rotifera). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **194**, 25-37 (1995)
  - 19) Ortells, R., Snell, T. W., Gómez, A., and Serra, M., Patterns of genetic differentiation in resting egg banks of a rotifer species complex in Spain. *Archiv für Hydrobiologie*, **149**, 529-551 (2000)
  - 20) Serra, M., Gómez, A., and Carmona, M. J., Ecological genetics of *Brachionus* sympatric sibling species. *Hydrobiologia*, **387/388**, 373-384 (1998)
  - 21) Ciro-Pérez, J., Gómez, A. and Serra, M., On the taxonomy of three sympatric sibling species of the *Brachionus plicatilis* (Rotifera) complex from Spain, with the description of *B. ibericus* n. sp. *Journal of Plankton Research* **23**, 1311-1328 (2001)
  - 22) Kotani, T., Hagiwara, A., Snell, T. W., and Serra, M., Euryhaline *Brachionus* strains (Rotifera) from tropical habitats: morphology and allozyme patterns. *Hydrobiologia*, **546**, 161-167 (2005)
  - 23) Gómez, A., Serra, M., Carvalho, G. R. and Lunt, D. H., Speciation in ancient cryptic complexes: evidence from the molecular phylogeny of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Evolution*, **56**, 1431-1444 (2002)
  - 24) Boehm, E. W. A., Gibson, O., and Lubzens, E., Characterization of satellite DNA sequences from the commercially important marine rotifers *Brachionus rotundiformis* and *Brachionus plicatilis*. *Marine Biotechnology*, **2**, 38-48 (2000)
  - 25) 佐々治寛之, 動物分類学入門, 東京都, 東京大学出版, 124pp (1989)
  - 26) Serra, M., and Miracle, M. R., Biometric analysis of *Brachionus plicatilis* ecotypes from Spanish lagoon. *Hydrobiologia*, **104**, 279-291 (1983)
  - 27) Serra, M., and Miracle, M. R., Biometric variation in three strains of *Brachionus plicatilis* as a direct response to



- abiotic variables. *Hydrobiologia*, **147**, 83-90 (1987)
- 28) Snell, T. W., and Carrillo, K., Body size variation among strains of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, **37**, 359-367 (1984)
- 29) Sudzuki, M., Intraspecific variability of *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, **147**, 45-48 (1987)
- 30) 根井正利. 分子進化遺伝学, 五條堀孝・斉藤成也訳, 培風館, 東京都, 433 pp (1990)
- 31) Snell, T. W., Systematics, reproductive isolation and species boundaries in monogonont rotifers. *Hydrobiologia*, **186/187**, 299-310 (1989)
- 32) Rico-Martínez, R., and Snell, T. W., Male discrimination of female *Brachionus plicatilis* Müller and *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff (Rotifera). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **190**, 39-49 (1995)
- 33) Kotani, T., Hagiwara, A., and Snell, T. W., Genetic variation among marine *Brachionus* strains and function of mate recognition pheromone (MRP). *Hydrobiologia*, **358**, 105-112 (1997)
- 34) Gilbert, J. J., Contact chemoreception, mating behaviour, and sexual isolation in the rotifer genus *Brachionus*. *J. Exp. Biol.*, **40**, 625-641 (1963)
- 35) Snell, T. W. and Hawkinson, C. A., Behavioral reproductive isolation among populations of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Evolution*, **37**, 1294-1305 (1983)
- 36) Snell, T. W. and Hoff, F. H., Fertilization and male fertility in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, **147**, 329-334 (1987)
- 37) Snell, T. W., Morris, P. D., and Cecchine, G., Localization of the mate-recognition pheromone in *Brachionus plicatilis* O.F. Müller (Rotifera) by fluorescent labeling with lectins. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **165**, 225-235 (1993)
- 38) Snell, T. W., Childress, M. J., and Winkler, B. C., Characteristics of the mate recognition factor in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **89A**, 481-485 (1988)
- 39) Snell, T. W. and Nacionales, M. A., Sex pheromone communication in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Comp. Biochem. Physiol.*, **97A**, 211-216 (1990)
- 40) Snell, T. W., Rico-Martínez, R., Kelly, L. S., and Battle, T. E., Identification of a sex pheromone from a rotifer. *Mar. Biol.*, **123**, 347-353 (1995)
- 41) Rico-Martínez, R. and Snell, T. W., Mating behavior and mate recognition pheromone blocking of male receptors in *Brachionus plicatilis* Müller (Rotifera) strains. *Hydrobiologia*, **313/314**, 105-110 (1995)
- 42) Rico-Martínez, R. and Snell, T. W., Comparative binding of an antibody to a mate recognition pheromone on female *Brachionus plicatilis* and *Brachionus rotundiformis*. *Hydrobiologia*, **358**, 71-76 (1997)
- 43) Kotani, T., Ozaki, M., Matsuoka, K., Snell, T. W., and Hagiwara, A., Reproductive isolation among geographically and temporally isolated marine *Brachionus* populations. *Hydrobiologia*, **446/447**, 283-290 (2001)
- 44) Gómez, A., Clabby, C., and Carvalho, G. R., Isolation and characterization of microsatellite loci in a cyclically

- parthenogenetic rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Molecular Ecology*, 7, 1613-1621 (1998)
- 45) Gómez, A., Carvalho, G. R., and Lunt, D. H., Phylogeography and regional endemism of a passively dispersing zooplankter: mitochondrial DNA variation in rotifer resting egg banks. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 267, 2189-2197 (2000)
- 46) 長谷川政美・岸野洋久, 分子系統学, 岩波書店, 東京, 257pp (1996)
- 47) Knowlton, N., Molecular genetic analysis of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia*, 420, 73-90 (2000)
- 48) 伊藤 隆, 輪虫の海水培養と保存について. *Report of Faculty of Fisheries, Prefectural University of Mie*, 3, 708-740 (1960)
- 49) 杉本 洋, 問題点と対策 - ワムシ密度の急減現象の原因究明. *In: 初期餌料生物-シオミズツボワムシ*, 福所邦彦、平山和次編, 恒星社厚生閣, 東京, 167-173 (1989)

\*\*\*\*\*

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (5), 17-26 (2006)

### Classification and its methodology of euryhaline rotifer *Brachionus*

Tomonari Kotani

Department of Marine Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology,  
Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan

Euryhaline rotifer *Brachionus* is the zooplankton used as the first feed for marine larval fishes and therefore it is important for aquaculture industries. The taxonomy of euryhaline rotifer have been argued for long time and not decided yet. They were classified into one species, then were divided into two species because of divergence of morphologic, reproductive and genetic character. After that, some different type of rotifer were found and more than three species of rotifer were reported based on the results of analysis of genetic divergence. Each factor on the classification of euryhaline rotifer have been investigated separately by plural authors, every factor have not been taken into consideration yet. Therefore taxonomic problems on euryhaline rotifer were still unsolved. In this review, I describe the details and course of classification of euryhaline rotifer.

**Key words: euryhaline rotifer, *Brachionus*, classification, morphometry, genetic divergence, reproductive isolation**