

## 毒性試験用シオダマリミジンコ*Tigriopus japonicus*の 小型容器による飼育及び繁殖

高久 浩<sup>\*1§</sup>・伊藤康男<sup>\*2</sup>・秋本 泰<sup>\*2</sup>  
中村幸雄<sup>\*1</sup>・土田修二<sup>\*2</sup>・木下秀明<sup>\*2</sup>・山田 久<sup>\*1</sup>

Rearing and reproduction procedure of *Tigriopus japonicus* for  
ecotoxicology studies in a small apparatus

Hiroshi Takaku<sup>\*1§</sup>, Yasuo Itoh<sup>\*2</sup>, Yutaka Akimoto<sup>\*2</sup>,  
Yukio Nakamura<sup>\*1</sup>, Shuji Tsuchida<sup>\*2</sup>, Hideaki Kinoshita<sup>\*2</sup> and Hisashi Yamada<sup>\*1</sup>

**要約:** 海産の動物プランクトンを用いた急性及び慢性毒性試験法を開発するために、試験対象生物(シオダマリミジンコ*Tigriopus japonicus*)の飼育繁殖法について検討した。成長速度、産仔数、産仔間隔および性比に与える餌料、飼育密度、温度および照度条件の影響について検討した。植物プランクトン*Tetraselmis tetrathela*を与えた場合は正常に再生産を繰り返したが、非生物餌料を与えた場合は、成長速度および産仔数が低下した。飼育密度は、10個体/mLでは成長速度および産仔数が低下し、2個体/mL以下の飼育密度が再生産に適していると思われた。異なる4つの水温(16, 20, 24及び28°C)で飼育した結果、低温の16°Cで成長速度は抑制され、産仔期間、産仔間隔は、長くなった。産仔数(平均産仔数/卵囊)は、25°Cよりも16°Cの方が多かった。馴致温度より低い16°Cで、性比への影響がより大きかった。雌の割合は世代を追う毎に高くなっていった。これらの結果より、*T. japonicus*を毒性試験に用いる場合は、数世代馴致飼育する必要があることや、飼育水温は25°Cが適していること、200~10,000Luxの間では照度の影響は見られないことが明らかになった。照度は、餌料生物(*T. tetrathela*)に最適である4,000Luxを用いた。

**キーワード:** シオダマリミジンコ, 毒性試験, 飼育技術, 再生産, 試験生物

**Abstract:** The harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* were selected as test organism to develop the acute and chronic toxicity test method using a marine zooplankton. The rearing conditions such as kind of feed, density, temperature and light intensity were evaluated based on reproductive characteristics of *T. japonicus* such as growth rate, brood size, spawning interval and sex ratio. The usage of non-living feed such as formula feed for fish caused a decrease in the growth rate and brood size and a delay in the spawning, although, *T. japonicus* fed by the phytoplankton, *Tetraselmis tetrathela* grew and reproduced normally. Therefore, *T. tetrathela* was selected as a feed. The phytoplankton density of 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> cells/mL was appropriate for rearing of this zooplankton species. In order to examine other parameters, *T. japonicus* was fed with *T. tetrathela* (10<sup>4</sup> cells/mL), and reared at the density of 0.4, 2 and 10 individuals/mL. Results showed that the density of 10 individuals/mL suppressed growth rate and brood size. The density below 2 individuals/mL were suitable for the reproduction of this species. Temperature also affected the reproductive characteristics. The growth rate, spawning period and spawning interval decreased at the lower temperature of 16°C. On the other hand, brood size (nauplii/egg capsule) was larger in *T. japonicus* cultured in lower temperature of 16°C than higher temperature of 25°C. Temperature also affected sex ratio of *T. japonicus*, and the female percentage in the population cultured at lower temperature (16°C) than the acclimatization temperature. The female percentage increased by passage through the generations. These results suggest that *T. japonicus* should be acclimated during several generations before the start of the toxicity test, and that

(2008年9月1日受付, 2008年9月24日受理)

\*1 財団法人海洋生物環境研究所事務局 (〒101-0051 東京都千代田区神田神保町3丁目29番地 帝国書院ビル5階)  
§ E-mail: takaku@kaiseiken.or.jp

\*2 財団法人海洋生物環境研究所中央研究所 (〒299-5105 千葉県夷隅郡御宿町岩和田300)

temperature of 25°C was appropriate for the rearing and reproduction of *T. japonicus*. No effect was observed by the intensity examined between 200 and 10,000 lux. The light intensity of 4,000 lux is chosen because it is sufficient for the photosynthesis of the feed phytoplankton (*T. tetrahele*).

**Keywords:** *Tigriopus japonicus*, toxicity test, rearing method, reproduction, test organism

## はじめに

有害化学物質の水域生態系に対する影響は、各種の水生生物に対する有害性を解明し、それらを総合的にまとめることにより評価される。甲殻類は淡水および海産種を併せて約4,000種で構成され、水域生態系を構成する重要な生物群である。米国環境保護庁 (US-EPA) が定めた「水生生物の保護とその利用のための水質クライテリア導出のためのガイドライン」(1985)では、8つの異なるグループに属する水生生物に対する毒性データが要求されており、その中に枝角類およびカイアシ類の動物プランクトンが含まれている。一方、経済協力開発機構 (OECD) の「化学物質の人の健康や水生生物に及ぼす影響評価」(1995)のためのガイドラインでは、水域生態系影響評価のためには栄養段階の異なる水生生物、すなわち、植物プランクトン、動物プランクトンおよび魚類に対する有害化学物質の毒性データが要求される。

OECD(1998, 2004), U.S.EPA(2002a, b), 米国の試験および材料標準化協会 (ASTM, 1996), 米国公衆衛生協会等 (APHA, 1998), 日本工業規格 (JIS)(日本規格協会, 1997) および農薬取締法などにおいて、動物プランクトンを用いる毒性試験法が開発されている。これらの方法では、淡水産のミジンコ類、主としてオオミジンコ (*Daphnia magna*) を試験生物として用いる。海産動物プランクトンに対する毒性試験法として、アミ類 (*Mysidopsis bahia* および *Holmesimysis coatata*) を試験生物とする急性および慢性毒性試験法が、U.S.EPA(2002c), ASTM (1996) 並びに APHA (1998) によって開発されている。また、海産カイアシ類を使用する急性毒性試験法がISOによって開発されている (ISO, 1999)。

しかし、我国の海域に生息する動物プランクトンを用いる毒性試験法は、シオダマリミジンコ (*Tigriopus japonicus*) のノープリウス幼生を使用

し、遊泳阻害をエンドポイントとする急性毒性試験法が開発されているに過ぎず (堀ら, 2001), 有害化学物質の甲殻類に対する有害性評価の深化のためには、動物プランクトンの繁殖阻害を指標とする慢性毒性試験法の確立が必要である。

シオダマリミジンコは、ハルパクチクス目 (harpacticoid) に属する底生性のカイアシ類である。我国の暖流域沿岸で普通に見られ、主に満潮線より上のタイドプールに生息し、潮汐、波浪、蒸発、降雨等による激しい環境変動に対して抵抗性の強い種である (高野, 1968)。堀ら (2001) は、本種のノープリウス幼生の遊泳阻害および成体の致死を指標にして、6価クロム、ペンタクロロフェノールナトリウム塩、トリブチルスズおよびトリフェニルスズの有害性を調べ、他の甲殻類動物プランクトンの毒性値と比較した。その結果、シオダマリミジンコのノープリウス幼生の上記の有害化学物質に対する感受性は、他のミジンコ類や海産カイアシ類と同等と考えられ、毒性試験の試験生物として適していることが報告されている。また、近年、シオダマリミジンコについて多くの重要なバイオマーカー遺伝子のシーケンスが研究され、さらに、これらのバイオマーカー (例えば、熱ショックタンパク質20, グルタチオン還元酵素及び電子伝達系の酵素等) の有害化学物質暴露への応答が研究され、シオダマリミジンコが生態毒性機構解明のためのモデル生物としての適性を備えていると評価されている (Raisuddin *et al.*, 2007)。

シオダマリミジンコは魚類種苗生産の初期餌料として利用するために、その粗放的な大量培養法は検討されてきた (北島, 1973)。しかし、毒性試験法のための実験室レベルの小容器での精緻な飼育・繁殖法はほとんど検討されていない。そこで、餌料、飼育密度、飼育水温、照度等の環境条件下におけるシオダマリミジンコの生物特性を検討し、ふ化直後のノープリウス幼生から次の世代

の幼生のふ化までの期間の飼育・繁殖法を確立することを本研究の目的とした。

## 実験方法

### 試験生物

千葉県勝浦市墨名海岸のタイドプールに生息しているシオダマリミジンコをスポイトで採取し、現場海水とともに（財）海洋生物環境研究所中央研究所に持ち帰り、24°Cのインキュベーター内で継代飼育し、試験に用いた。

シオダマリミジンコは、ふ化した後、ノープリウス期（1～6期）及びコペポダイト期（1～6期）の変態を経て成体になる。コペポダイト6期が成体であり、体長は約1.0mmで雄は雌よりやや小さい（Ito, 1970；古賀, 1970）。交尾後、雌は卵嚢を作り、2～3日おきに幼生を産出する。生活様式はプランクトンというよりはベントスに近く、室内飼育ではノープリウス幼生は遊泳することなく、容器の底や器壁を這い回って生活する（高野, 1968）。

本研究では、基本的にはふ化直後のノープリウス幼生から次の世代のノープリウス幼生がふ化するまでの期間を研究対象とするが、餌料の研究では第2世代、また、飼育水温の研究では第3世代に対する影響も検討した。

### 飼育試験方法

#### 餌料の検討

（財）海洋生物環境研究所で継代飼育している卵嚢を保有する雌成体シオダマリミジンコを試験に用いた。継代飼育期間中に餌料として投与したブラシノ藻、テトラセルミス (*Tetraselmis tetraethela*) を除くために、試験開始6日前から砂ろ過海水で飼育した。その間、クルマエビ用配合飼料（株式

会社ヒガシマル製）を投与した。

実験開始日に卵嚢を持った雌（第1世代）を砂ろ過海水で洗浄後、個体毎に6穴ウエルパレットに移し、7種類の餌料を投与した。3日に1回供試個体を新たなウエルパレットに移すことによって換水した。1試料につき6個体を用いて試験し、毎日定時に産仔数を個体毎に計数した。

第1世代からふ化したノープリウス幼生を餌料の種類別、かつ、産仔日別にまとめて容積200mL深底シャーレーに収容し、第1世代と同種の餌料で成熟するまで飼育した。ノープリウス幼生の間は飼育水を交換せず、コペポダイト幼生になった時点で1回交換した。交尾中のペアを1ペア毎に6穴ウエルパレットに分離し、交尾終了が確認できた時点で雄は除去した。第2世代については第1世代と同様な方法で飼育し、産仔間隔及び産仔数を毎日定時に観察した。産仔数は、各個体とも4腹目まで観察した。また、第2世代のノープリウス幼生のふ化から卵嚢が形成されるまでの期間を成熟期間とし、餌料によるその差異を調べた。

なお、飼育水中のテトラセルミスの初期細胞密度は $1.0 \times 10^5$  cells/mLであったが、非生物餌料は、飼育水の交換の時点で餌料が残存することを目安にして、水質の悪化を招かない範囲で十分な量を投与した。

#### 飼育密度

実験室内で継代飼育している個体群から卵嚢を有する雌をFig. 1に示す幼生採集容器の内管（底面にプランクトンネット（目合い：200 $\mu$ m）を装着した塩化ビニール製パイプ）に収容して、孔径0.45 $\mu$ mのろ紙でろ過した海水で充分洗浄することにより餌料として投与したテトラセルミスおよびノープリウス幼生を除去した。卵嚢を有する雌を1晩、内管に静置し、幼生をふ化させた。翌日、内管を取り出して親個体を除くとともに、内管の

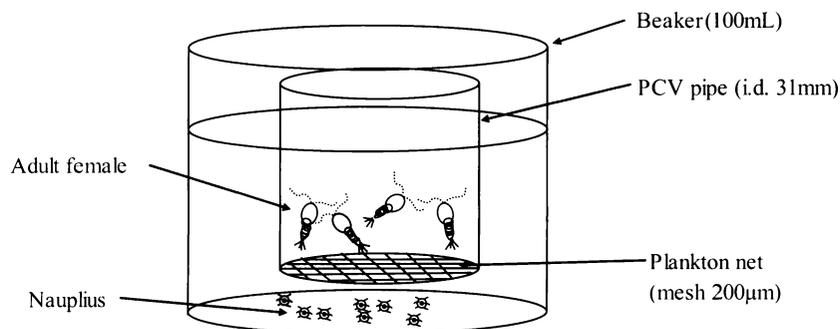


Fig. 1 Schematic diagram of the apparatus for the isolation of nauplius larvae.

外側のビーカーへ移動したふ化後24時間以内のノープリウス幼生を回収し、以下の試験に用いた。

採取したノープリウス幼生を、5mLの飼育水が入ったウエルパレットに2個体（以下2個体区（0.4個体/mL）と言う）、10個体（以下、10個体区（2個体/mL）と言う）、50個体（以下、50個体区（10個体/mL）と言う）ずつ分けて收容した。再現性を確認するために試験を2回行い、実験1では、2個体区で18試験区、10個体および50個体区でそれぞれ6試験区、また、実験2では、2個体区および10個体区でそれぞれ12試験区、50個体区で6試験区を準備した。

飼育水は、孔径0.45 $\mu$ mのろ紙でろ過した海水に細胞密度が約 $1.0 \times 10^4$  cells/mLになるようにテトラセルミスと混合して調製した。シオダマリミジンコの飼育は、水温が24 $^{\circ}$ C、照度が約4,000Lux、光周期が明12時間、暗12時間（以下、12L/12D）に調整されているインキュベーター内で行った。この間、実験1および2では、ウエルパレット内の飼育水の2/3程度を、ノープリウス期では1日1回、それ以外の試験期間中は2日に1回の割合で換水した。卵囊の確認された雌はウエルパレットに1個体ずつ分離し、密度以外の飼育条件を同じにした状態でさらに飼育し、産仔数及び産仔間隔等を4腹目の産仔が観察されるまで続けた。この間、生まれたノープリウス幼生は計数後、ウエルパレットから除去した。さらに1日1回、ウエルパレット内の飼育水の2/3程度を換水した。

#### 飼育水温

水温24 $^{\circ}$ Cで飼育中の親個体から、飼育密度の試験と同様な方法で採集したノープリウス幼生を容積200mLの深底シャーレー4個に、それぞれ、200個体ずつ收容し、温度を16、20、24及び28 $^{\circ}$ Cに調整したインキュベーター内で飼育した。飼育水中のテトラセルミスの密度は約 $1.0 \times 10^5$  cells/mLであったが、照度および明暗周期は飼育密度の試験と同一にした。各温度の試験区ともに、交尾行動がみられるまでは飼育水を交換せずに飼育した。この間、毎日観察し、交尾ペアを見つけ次第、容積約20mLのウエルパレットに1ペアずつ收容し、同じ温度のインキュベーター内で飼育した。各温度区ともに18ペアを集めた。18ペアを集めた後に、シャーレー内に残った個体は10%ホルマリンで固定し、性比を調べた。

交尾行動が終了次第、ウエルパレットから雄を除去し、産仔数及び産仔間隔等を4腹目のノー

プリウス幼生が産出するまで観察した。産出したノープリウス幼生をピペットを用いて計数しながら採集し、温度別かつ産出日別にシャーレーに收容した。これらを第1世代と同様に飼育し、産仔数、産卵間隔及び性比を調べた。この操作を第3世代まで繰り返す行い、飼育温度の成熟期間、産卵期間、産卵間隔および産仔数に対する影響を3世代について調べた。また、飼育水温の性比に対する影響は第3世代の幼生が成長した第4世代まで調べた。

#### 照明

上記の試験と同様に、Fig. 1に示す幼生採集容器を用いてふ化後24時間以内のノープリウス幼生を採集した。

ノープリウス幼生は深底シャーレー3個に收容し、24 $^{\circ}$ C、照度約4,000Lux（12L/12D）に調整されたインキュベーター内で飼育した。コペポダイト期がある程度出現したふ化後9日の時点で照度を200Lux、4,000Luxおよび10,000Luxに変更してさらに飼育を続けた。飼育水温等の試験と同様に卵囊を保有する雌を分離し、産仔数を計数した。これらの実験では、約 $1.0 \times 10^5$  cells/mLのテトラセルミスを含むろ過海水（孔径0.45 $\mu$ mのろ紙でろ過）を飼育水として使用した。脆弱なノープリウス期は換水しなかったが、コペポダイト期以降は毎日換水した。

## 結果及び考察

### 餌料

成熟に要する時間、産仔数、産仔間隔、産仔期間および正常産仔率を各餌料について調べ、シオダマリミジンコの飼育に適する餌料を検討した。

**成熟に要する時間：**ふ化してから最初の卵囊が形成されるまでの期間を成熟に要する時間と定義し、餌料の種類別に第2世代について調べた結果をTable 1に示した。成熟に要する期間は、テトラセルミスの12.3日（12～14日）が最も短く、きな粉の16.5日（16～17日）が最も長かった。成熟までの最短期間と最長期間の差は、乾燥ヨコエビ、金魚用飼料および亀用飼料では5日間であり、テトラセルミスの2日間と比較すると長かった。すなわち、テトラセルミスに比べると、これらの非生物飼料は容器の底に沈殿するためにシオダマリミジンコにとって摂取することが困難であり、個体によって摂取量が異なることが考えられ、その

**Table 1** Difference of maturation period and number of matured individuals in second generation of *Tigriopus japonicus* reared by several kinds of feed

Feed	Maturation period (day)			Matured / Total
	Minimum	Mean	Maximum	
Phytoplankton ( <i>Tetraselmis tetraethela</i> )	12	12.3	14	6 / 6
Formula feed for Kuruma prawn	16	16.3	17	6 / 6
Dried powder of shrimp	13	14.8	18	6 / 6
Soy bean powder	16	16.5	17	2 / 6
Wheat flour	14	15.0	16	5 / 6
Formura feed for fish	13	15.3	18	6 / 6
Formura feed for a turtle	12	14.7	17	6 / 6

**Table 2** Number of brood and ratio of matured individuals in first and second generation of *Tigriopus japonicus* reared by several kinds of feed

Feed	First generation		Second generation	
	brood number (No / egg capsule)	Matured / Total	brood number (No / egg capsule)	Matured / Total
Phytoplankton ( <i>Tetraselmis tetraethela</i> )	20.1	6 / 6	21.3	6 / 6
Formula feed for Kuruma prawn	11.3	2 / 6	32.1	6 / 6
Dried powder of shrimp	22.9	1 / 6	37.3	6 / 6
Soy bean powder	1.0	5 / 6	31.6	2 / 6
Wheat flour	21.1	5 / 6	24.1	5 / 6
Formura feed for fish	27.6	5 / 6	31.0	6 / 6
Formura feed for a turtle	23.7	5 / 6	25.7	6 / 6

ために成熟までの期間も個体によって大きく異なると推察された。また、正常に成熟・産仔した個体（正常産仔率）は、きな粉投与区では6個体中2個体、小麦粉投与区では6個体中5個体であり、テトラセルミスおよびクルマエビ配合飼料等動物性の飼料の投与区に比べて少なかった。非生物飼料で飼育した第3世代の大部分の個体はコペポダイト期まで成長しなかった。したがって、きな粉および小麦粉の植物性非生物飼料は栄養学的にも劣ることが明らかであった。

**産仔数：**餌料種類別の第1世代および第2世代の1卵囊当たりの平均産仔数をTable 2に示した。第1世代の産仔数は、クルマエビ配合飼料で11.3個体/卵囊と低い傾向であるが、他の6種類の餌料の産仔数は20.1～27.6個体/卵囊で著しい差は認められなかった。しかし、テトラセルミスでは調べた6つの卵囊の全てからノープリウス幼生のふ化が認められたのに対し、非生物飼料では一部の卵囊からは産仔が認められなかった。一方、第2世代では、産仔数はテトラセルミスの21.3個体/卵囊から乾燥ヨコエビの37.3個体/卵囊の範囲であり、クルマエビ配合飼料などの動物性非生物飼料が特に劣っていることはなかった。しかし、第

1世代と第2世代を比較すると、産仔した個体および産仔数ともにテトラセルミスで再現性が良いのに対し、非生物飼料では、産仔した個体および産仔数のいずれについても再現性が悪かった。以上の結果からも餌料としてテトラセルミスが適していることが明らかであった。

**産仔間隔および産仔期間：**シオダマリミジンコは雌が卵囊を数日間保持し、卵囊からノープリウス幼生が直接ふ化する。最初のふ化から1～3日後に2番目の卵囊が形成され、二腹目のノープリウス幼生がふ化する。これを繰り返して正常に飼育された場合には10回程度幼生のふ化が認められる。本研究では、ノープリウス幼生がふ化してから次の卵囊中の幼生がふ化するまでの日数を産卵間隔と定義し、第1世代および第2世代の産卵間隔の頻度をFig. 2に示した。Fig. 2では毎日産卵する場合を0日、1日おきに産卵する場合を1日と示している。第2世代の1腹目については、最初に卵囊の確認された日からノープリウス幼生のふ化が認められた日までを産卵間隔とした。また、第1世代が卵囊を持った時点から試験を開始しているので、第1世代の1腹目の産卵間隔は測定することができなかった。したがって、2腹から4腹

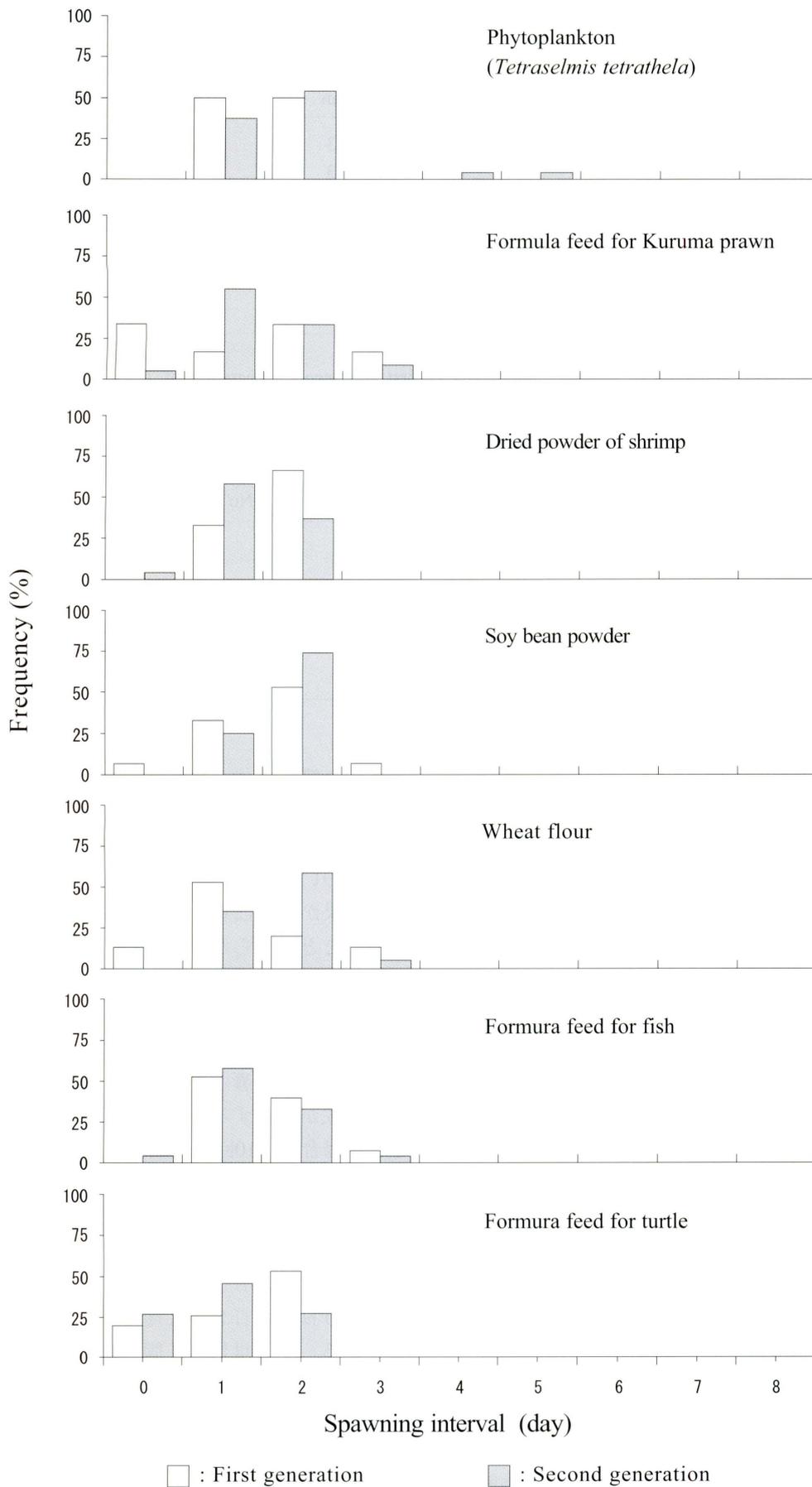


Fig. 2 Changes of spawning intervals in first and second generation by several kinds of feed.

目において得られたデータを用いて解析した。

いずれの餌料についても1日から3日の産仔間隔を合わせると全体の70%以上であり、シオダマリミジンコの大部分が2日おきより短い間隔で産仔していることが明らかである。非生物飼料で飼育したシオダマリミジンコの産仔間隔は、テトラセルミスで飼育した個体に比べて毎日産卵(0日)を含めて幅が広い傾向が図からも認められた。また、同一餌料区における世代間の差違は、どの餌料区においても明確ではなかった。毒性試験の幼生採集および繁殖阻害試験の評価のためには産仔間隔が均一な方が望ましい。この点からも、非生物飼料よりはテトラセルミスが餌料として適していると考えられる。

テトラセルミスで飼育した個体と非生物飼料で飼育した個体の特徴を比較すると、非生物飼料で飼育した場合、①成熟に要する期間が長く、成長が遅い、②産仔数、正常産仔率、産仔間隔等の再現性が悪い、③体色、形態等外観が天然個体と著しく異なる、④第3世代が成熟しないことが指摘できる。

このように、成熟に要する時間、産仔数、産仔間隔および産仔期間を指標として調べると、テトラセルミスが検討した7種の餌料の中では最も優れており、安定した飼育および繁殖のためには餌料として生物餌料、植物プランクトンを投与する必要があることが明らかであった。

動物プランクトンに対する植物プランクトン餌料の適性は、植物プランクトンの摂取の容易さ(植物プランクトンの大きさ)、植物プランクトンの栄養的特性(構成成分)に依存し、対象動物プランクトンにより異なると考えられる。Hicks and Coull (1983) は、ハルパクチクス目のカイアシ類(*Harpacticus uniremis*, *Harpacticus littoralis*, *Tigriopus luvus*, *Tigriopus brevicornis*, *Tigriopus californicus*, *Tigriopus japonicus*)の飼育試験で使用された餌料を集約した。これらのカイアシ類は、珪藻類のような植物プランクトン、細菌、さらには藻類や二枚貝の乾燥粉末飼料など多様な飼料で飼育でき、ハルパクチクス目カイアシ類は餌料に対して適応性が高いと報告している。渦鞭毛藻(*Gymnodinium*)、珪藻(*Phaeodactylum*)、緑藻(*Chlorella*)、プラシノ藻(*Tetraselmis*)、ハプト藻(*Isochrysis*)およびクリプト藻(*Rhodomonas*)などの植物プランクトンが飼育試験において餌料として使用されたことが報告され

ている(Hicks and Coull, 1983)。また、Hagiwaraら(1995)は、テトラセルミスを経験として用いたシオダマリミジンコの飼育試験を行い、良い結果を得ている。以上の研究成果から、テトラセルミスはシオダマリミジンコの餌料として適している植物プランクトン種であると考えられる。

## 飼育密度

**成長速度**：異なる飼育密度のもとで幼生の変態、交尾、卵囊の形成および産仔が最初に観察された日を実験1および2についてまとめてFig. 3に示した。

実験1および2ともに、全ての試験区でふ化後4日目に最初のコペポダイト期が確認された。2個体区(0.4個体/mL)および10個体区(2個体/mL)では個体間の成長速度のばらつきは小さく、コペポダイト期への移行が最も早い個体と最も遅い個体との差は、2~4日以内であった。しかし、50個体区(10個体/mL)では成長速度は個体間でばらつきが大きく、また、実験終了時でもノーブリス幼生が認められた。50個体区では2個体区および10個体区に比べて成長速度が低下することが明らかであった。

交尾が確認された最初の日は、実験1の2個体区および10個体区でふ化後8日目、50個体区で11日目であった。実験2では、全ての試験区でふ化後9日目に最初の交尾が観察されたが、雄雌がペアを形成している期間は、2個体区および10個体区では4日以内であったのに対し、50個体区では6~7日間と長かった。

交尾後卵囊が形成されるまでの時間は、実験1の2個体区および10個体区では3日であるが、50個体区では最初の交尾後5日目に卵囊を有する雌が確認された。すなわち、卵囊形成も飼育密度に依存し、密度が高くなるに従って遅くなる傾向を示した。

産仔の確認は、実験1の2個体区では初交尾後4日目、10個体区では5日目、また、50個体区では6日目であった。実験2では全ての試験区で初交尾確認後5日目に幼生のふ化が認められた。

実験1では飼育密度が高くなるに従って変態、交尾、卵囊形成の時期が遅くなり、成長が抑制されることが明確であるが、実験2では、成長過程の各イベントの最初の確認日で見ると、飼育密度に伴った違いは認められなかった。しかし、実験2の50個体区においては、実験終了時点におい

でもノープリウス幼生が認められるように、多様な成長過程のシオダマリミジンコが混在しており、高い飼育密度では、成長速度が個体毎に異なることが明らかであった。

卵嚢を有する雌が一定数認められる時点（試験開始後約15日目）で、全供試個体に占める卵嚢保有個体の割合を成熟率と定義し、飼育密度による変動を調べた。成熟率は、実験1および2ともに、2個体区および10個体区では86.7~98.3%であった。これに対し、50個体区では、成熟率は、実験1で74.0%、また、実験2で78.7%であった。このように、成長が、特に50個体区で抑制されることは成熟率の観点からも明らかであった。

**産仔数**：実験1および2の各飼育密度区における平均産仔数をFig. 4に示した。実験1における産仔数は、2個体区で18.8個体/卵嚢、10個体区で16.8個体/卵嚢、また、50個体区で10.9個体/卵嚢であった。産仔数は、飼育密度に依存し、密度が高くなるに従って小さくなった。一方、実験2の各飼育密度区の産仔数は、それぞれ、20.6個体/卵嚢（2個体区）、19.2個体/卵嚢（10個体区）および15.7個体/卵嚢（50個体区）であった。実験1に比較すると明確ではないが、実験2においても産仔数は飼育密度に依存して減少する傾向を示

した。実験1および2を合わせた平均値は、2個体区で19.4個体/卵嚢、10個体区で18.5個体/卵嚢、また、50個体区で14.4個体/卵嚢であった。2個体区と10個体区の間では有意差は認められないが、10個体区と50個体区の間では危険率5%で有意差が認められた。飼育密度の高い50個体区では産仔数が減少することが明らかであった。

一卵嚢あたりの産仔数ヒストグラムを調べると、2個体区および10個体区では一卵嚢あたりの産仔数が10~25個体/卵嚢の場合が最も多く、一方、50個体区では一卵嚢あたりの産仔数は減少し、1~10個体/卵嚢の頻度が高くなった。特に、実験1の50個体区では、5個体/卵嚢以下が約30%を占めていた。50個体区で一卵嚢あたりの産仔数が減少する傾向は、実験1および2のいずれにおいても認められた。以上の結果から、飼育密度は産仔数にも影響することが明らかであった。

**性比（雌の割合）**：雌の割合は、実験1の2個体区、10個体区および50個体区で、それぞれ、37.1%、48.1%および51.8%であった。また、実験2においてもこの割合は、2個体区で27.3%、10個体区で27.1%、また50個体区で38.1%であった。実験1の50個体区を除くと雌の割合は50%以下であり、シオダマリミジンコでは雄が優占する傾向

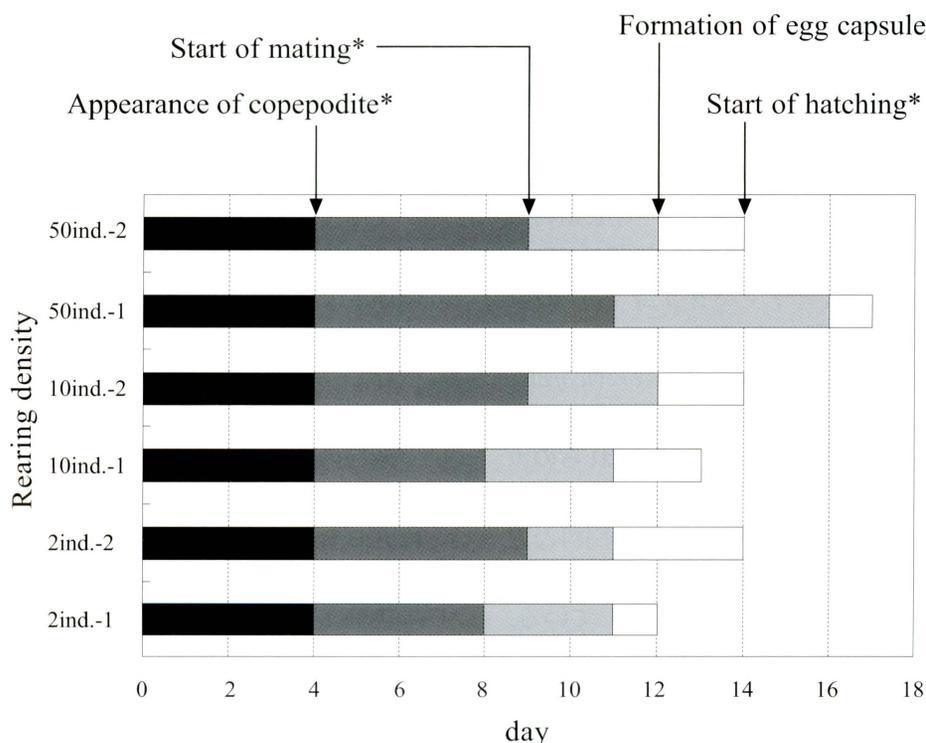


Fig. 3 Changes of growth and maturation rate by each rearing density.

\* Indicate the first day observed these events.

Two sets (1 and 2) of experiments were made for each rearing density.

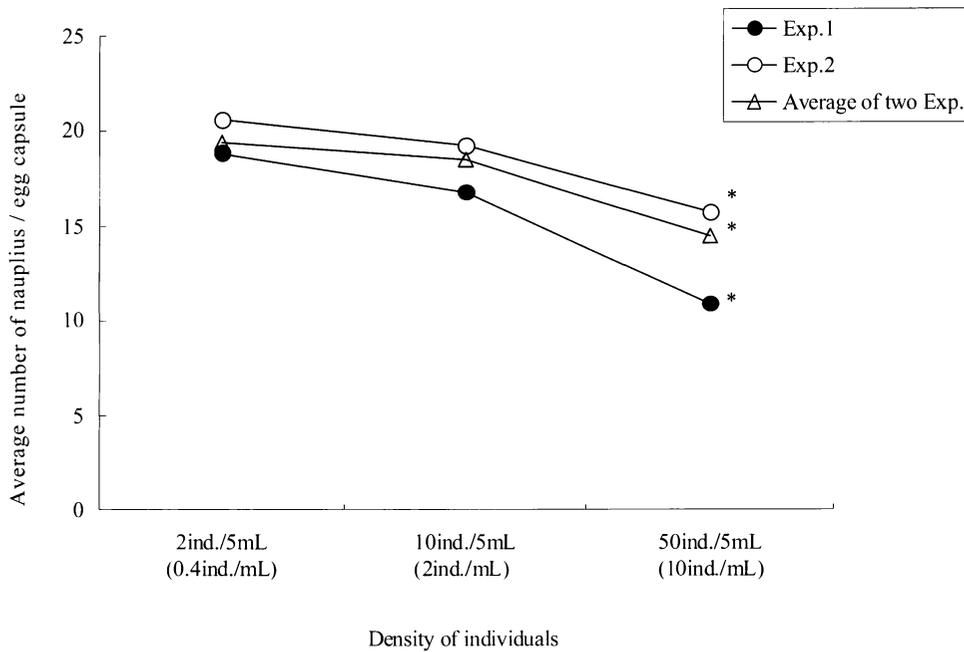


Fig. 4 Changes of brood number spawned from an egg capsule by the density of individuals.  
\* Significant difference was recognized between 2ind./mL and 10ind./mL ( $p < 0.05$ ).

であった。また、雌の割合は飼育密度が高くなるに従って大きくなる傾向を示した。

飼育密度がシオダマリミジンコの成長や産仔数に影響を及ぼすことは、高密度のストレスあるいは摂餌の競合による餌摂取量の減少などに起因すると考えられる。本研究の結果では、飼育海水5 mL当たりのシオダマリミジンコの収容数が10個体（飼育密度が2個体/mL）以下であれば、ノープリウス幼生は100%近く成長・成熟し、また、成長速度のばらつきもあまり見られなかった。また、産仔数も50個体区（10個体/mL）では10個体区に比べて有意（危険率5%）に減少するのに対し、2個体区（0.4個体/mL）および10個体区（2個体/mL）の産仔数には危険率5%で有意差が認められなかった。したがって、餌料生物、テトラセルミスの細胞密度を約 $1.0 \times 10^4$  cells/mLに設定した本研究の飼育条件では、産仔数および性比の変動の視点ではシオダマリミジンコの飼育密度は2個体/mL以下が適正と考えられる。

野外調査の結果では、ハルパクチクス目カイアシ類は、一般的に雄が優占することが報告されている。性比は群の密度により変動し、密度が高い時には雄が、また、低密度の場合には雌が相対的に多くなることが確認されている（Hicks and Coull, 1983）。また、カイアシ類 *Tisbe* spp. の飼

育試験では、遺伝的雄が成長の過程で雌に転換し、高密度では雄が、また、低密度では雌が優占することが明らかにされた（Hicks and Coull, 1983）。これらの結果は本研究の結果とは異なった。また、*Tigriopus californicus*の性比は飼育密度に依存して変動しないことが報告されている（Voordouw et al, 2005）。この結果の相違は、野外調査と飼育試験の違い、あるいは対象種の違いに起因する可能性があるが、さらに詳細な検討が必要である。このように、飼育密度が性比に及ぼす機構は完全には解明されていない。有害化学物質の生殖および繁殖に及ぼす影響の解明においては、対象生物の性比の変動は重要な評価項目である。シオダマリミジンコを試験生物とする有害物質の繁殖阻害試験法を開発する場合には、性比が飼育密度に依存して変動する可能性があることを踏まえて、検討することは重要である。

#### 飼育水温

**成熟期間：**ノープリウス幼生のふ化から交尾までに要した期間を成熟に要した期間（成熟期間）と定義し、成熟期間を世代別、飼育水温別に Table 3に示した。飼育水温別・3世代間の成熟期間は、16°Cで18~19日、20°Cで12~14日、24°Cで10日、28°Cで7~9日であった。成熟期間は世

**Table 3** Changes of the maturation period in three generations of *Tigriopus japonicus* reared by different temperatures

Temperature (°C)	Maturation period (day)		
	First generation	Second generation	Third generation
16	19	18	18
20	12	13	14
24	10	10	10
28	9	8	7

**Table 4** Changes of spawning period in three generations of *Tigriopus japonicus* reared by different temperatures

Temperature (°C)	Average spawning period (day)*			
	First generation	Second generation	Third generation	Average of 3 generations
16	19.0 ± 0.9	20.1 ± 1.0	18.8 ± 0.6	19.3 ± 1.0
20	14.6 ± 1.4	14.1 ± 0.8	13.8 ± 0.7	14.1 ± 1.0
24	11.8 ± 0.8	10.3 ± 1.0	10.7 ± 0.5	10.9 ± 1.0
28	11.2 ± 1.4	9.2 ± 0.9	9.9 ± 1.2	10.0 ± 1.4

\*Average ± SD

代間で大差なく、また、水温の上昇に伴って成熟期間が短くなり、成長が促進した。16°Cの試験区では、餌料プランクトンのテトラセルミスが水面に固まって浮遊している現象が見られ、この水温は餌料プランクトンの増殖を抑制することも示唆された。すなわち、16°Cは餌料用生物、テトラセルミスの増殖の視点からも不適當であると考えられる。

**産卵期間：**供試個体が卵嚢を保有してから4腹目のノープリウス幼生がふ化するまでの期間を産卵期間とし、世代別に、また、飼育温度別にTable 4に示した。産卵期間は世代間では有意な変動を示さないの、3世代の平均値で見ると、産卵期間は、16°Cで19.3 ± 1.0日、20°Cで14.1 ± 1.0日、24°Cで10.9 ± 1.0日、28°Cで10.0 ± 1.4日であった。飼育水温の上昇に伴って産卵期間は短くなるが、24°Cと28°Cでは大差なかった。

**産卵間隔：**餌料の項で述べたのと同じ方法により、産卵間隔を3世代について調べFig. 5に各飼育水温の結果を示した。図では1日おきに産卵する場合を1日と示した。産卵間隔は世代により大きな違いは認められなかった。16°Cでは4および5日で、20°Cでは3および4日で、24および28°Cでは2および3日で90%以上を占め、産卵間隔は水温の上昇に伴って短くなった。

**産仔数：**各水温における世代別の平均産仔数をFig. 6に示した。一卵嚢当たりの産仔数(個体/卵嚢)を3世代について調べると、16°Cでは第1世代(28.5個体/卵嚢)に比較して第2世代(40.6個

体/卵嚢)および第3世代(43.9個体/卵嚢)で、20°Cでは第1世代(19.3個体/卵嚢)および第2世代(22.4個体/卵嚢)に比較して第3世代(30.9個体/卵嚢)が多かったが、逆に、28°Cでは第1世代(14.8個体/卵嚢)および第2世代(17.5個体/卵嚢)に比較して第3世代(9.0個体/卵嚢)で少なかった。24°Cのみ、世代間の平均産仔数に有意な差はみられなかった。

平均産仔数を第1世代と第2世代で比較すると、試験開始前の馴致温度(24°C)より低い、20および16°Cでは有意差(危険率5%)が認められたのに対して28°Cでは有意差は認められなかった。第2世代と第3世代の平均産仔数を比較すると、最も低い16°Cで有意差(危険率5%)は認められなかったが、20および28°Cでは有意差(危険率5%)が認められた。Fig. 6から明らかのように、第3世代の産仔数は第2世代に比較して20°Cでは有意に増加し、28°Cでは有機に減少した。以上の結果から、平均産仔数は親世代の履歴水温が影響することが考えられる。また、馴致水温とは異なる新たな水温に完全に馴致するまでに、少なくとも3世代以上は必要であることも示唆された。

産仔数を3世代にわたって平均してFig. 7に示した。3世代の平均産仔数は、16°C、20°C、24°Cおよび28°Cで、それぞれ、37.7、24.2、16.7、および13.8個体/卵嚢であった。3世代平均産仔数は、全ての温度間で統計的に有意な差(危険率5%)が認められた。また、温度が低いほど、平均産仔数は多くなり、低水温では産仔の頻度は低下

するものの、1回当たりの産仔数は増大した。

**性比（雌の割合）：**各飼育水温において世代別の性比を調べた結果をFig. 8に示した。

第1世代（ノープリウス幼生から飼育）の雌の割合は、29～37%の間であった。16℃の試験区で高い傾向であるが、飼育水温によって大差なかった。16℃試験区の第2、第3および第4世代の雌の割合は、それぞれ、50.7、70.5および80.9%であった。20℃試験区の雌の割合は、第1世代で34.3%から第3世代の44.0%へ世代を経るに従って僅かに大きくなった。特に第4世代の雌の割合は72.5%へ著しく増大した。24および28℃試験区

の雌の割合は近似していた。また、24℃試験区の第1世代で33.0%、第4世代で42.0%であり、世代を経るに従って雌の割合が多くなる傾向を示したが、その差は小さかった。

以上の結果から、継代飼育の水温（馴化されていた水温）より低水温環境での飼育は、シオダマリミジンコの性比を変化させ、雌が多くなることが明らかであった。第1世代は、ふ化直後のノープリウス幼生から水温を変化させて飼育したが、その成体の性比は飼育水温により著しく異ならなかった。しかし、成体の成熟、交尾、卵形成の過程も各飼育水温で飼育された第2世代以降は性比

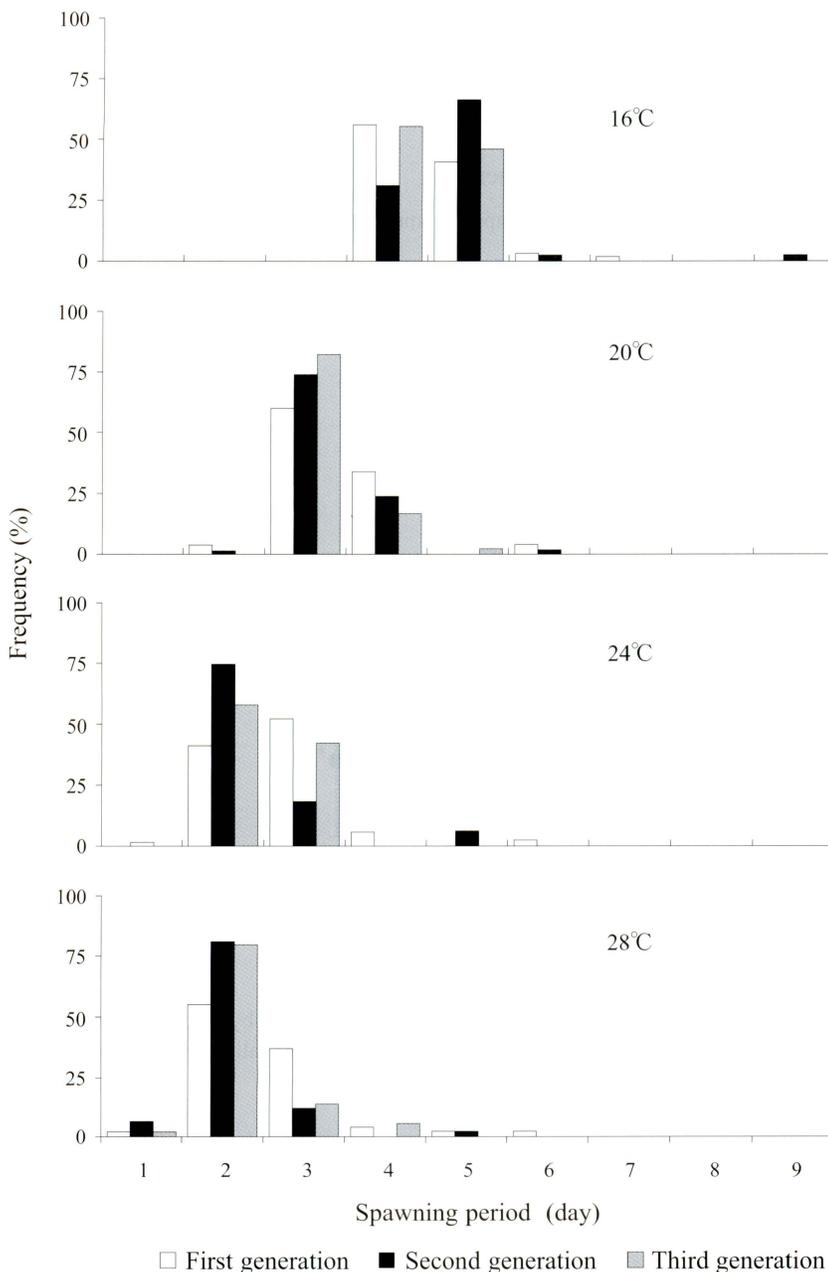


Fig. 5 Changes of spawning interval by the rearing temperature.

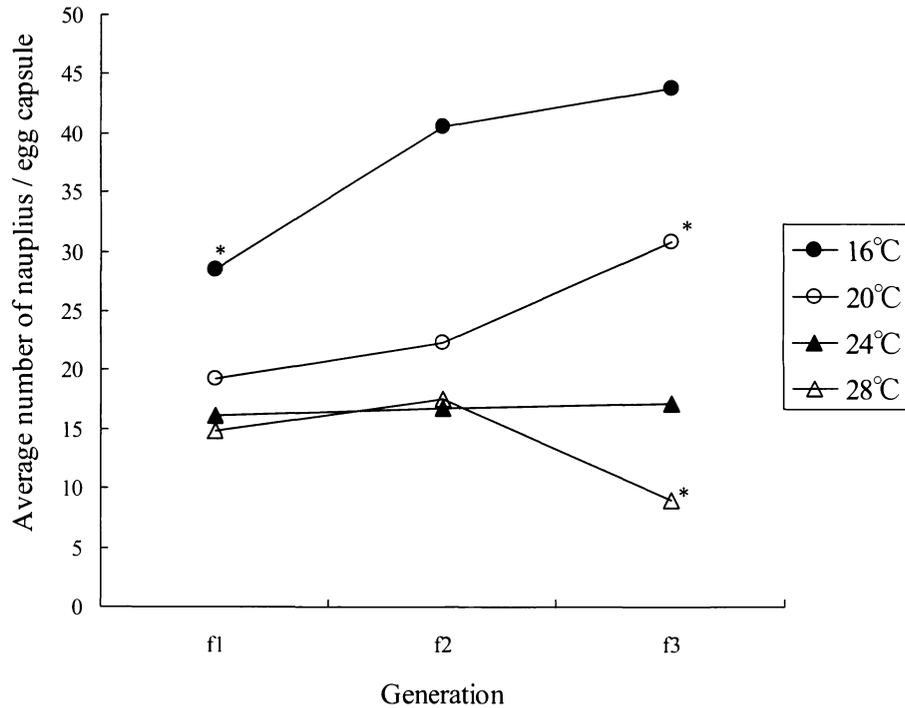


Fig. 6 Changes of brood number spawned from an egg capsule among the generation (first, second and third generation) by each rearing temperature.

\* Significantly different ( $p < 0.05$ ) from other two generations in each temperature.

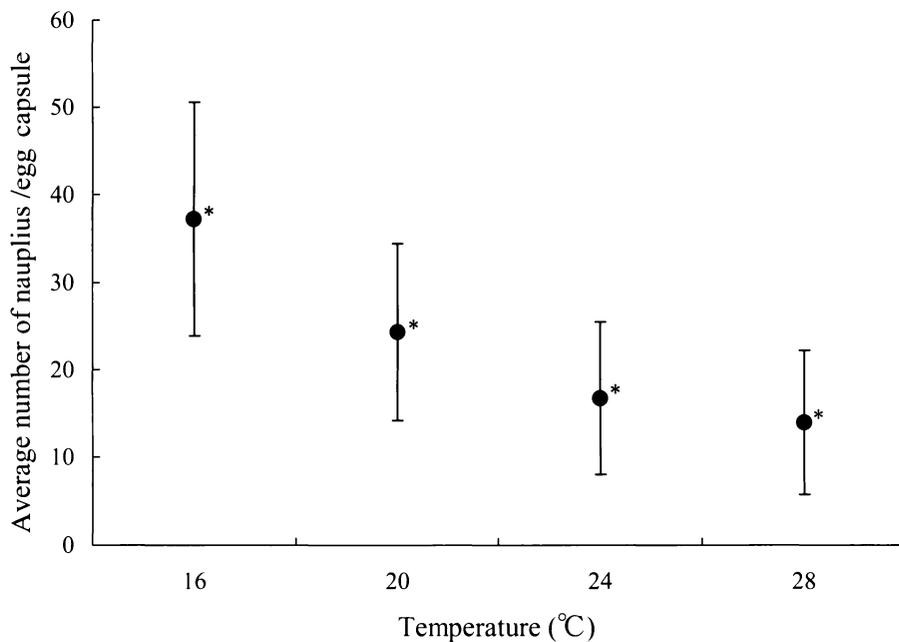


Fig. 7 Changes of brood number spawned from an egg capsule by rearing temperature.

\* Significant difference ( $p < 0.05$ ) was recognized among all temperatures.

が温度によって異なることから、飼育水温はノープリウス幼生以降の生活史ではなく、交尾・成熟・卵形性の過程で性決定に対して影響を及ぼしていると推察された。

シオダマリミジンコの性の決定は、遺伝的要因

の他に環境要因によって支配され、環境要因として水温、塩分、餌料の種類および量、水圧および化学物質、また、生物的要因として成熟の抑制、雌親の年齢、群の密度などが考えられている。

Hagiwara *et al.* (1995) は塩分を変化させた飼

育水を用いた *T. japonicus* の飼育試験を行い、性比に及ぼす塩分の影響を調べた。調べた塩分、4~32PSUでは、雌の割合は38.9~43.6%の間であり、性比は雄に偏る傾向であった。しかし、性比は各塩分の試験区の間で有意差が認められず、飼育水の塩分は性比に影響を及ぼさないことが報告されている。

Voordouw and Anholt (2002) は *T. californicus* の詳細な2種類の飼育試験を行い、飼育水温による性比の変動を研究した。第1の試験では、野外(カナダ、ブリティッシュコロンビアのロー島(HG)およびアルバタス入り江(VIC))で採集した *T. californicus* の雌親から卵嚢をとり、さらにふ化したノープリウス幼生を15°Cおよび22°Cで成体になるまで飼育した後にそれらの性を調べた。第2の試験では、実験室で15°Cおよび22°Cで継代飼育していた雌親それぞれから採取したノープリウスを2つの温度(15°Cおよび22°C)で成体まで飼育した後に第1の試験と同様に性を調べた。

第1の試験では、性比(雄の割合)±SDは、HGを15°Cおよび22°Cで飼育した試験で、それぞれ、 $0.59 \pm 0.038$  および  $0.68 \pm 0.028$  であり、また、VICの試験でも性比(雄の割合)は、15°Cで  $0.55 \pm 0.022$ 、また、22°Cで  $0.61 \pm 0.024$  であった。15°Cで継代飼育した *T. californicus* のノープリウス幼生を15°Cおよび22°Cで飼育した第2の試験では、性比(雄の割合)は、 $0.50 \pm 0.029$  (15°C) および

$0.58 \pm 0.029$  (22°C) であった。また、22°C継代飼育 *T. californicus* から得たノープリウス幼生を15°Cおよび22°Cで飼育した試験でも、性比(雄の割合)は、 $0.49 \pm 0.027$  (15°C) および  $0.53 \pm 0.032$  (22°C) であった。性比は各試験区間で有意差が認められたと報告している。すなわち、自然から採集した個体および継代飼育個体のいずれについても、履歴水温よりも低い水温で飼育した場合雄の占める割合が低下(雌の割合が増大)した。

飼育水温が *T. japonicus* の性比に影響を及ぼす本研究の結果は、Voordouw and Anholt (2002) による *T. californicus* の結果と同様な傾向を示した。すなわち、シオダマリミジンコの性比は飼育水温により変動し、低水温の飼育環境では雌の割合が増大した。

以上まとめると、飼育水温の上昇に伴って成熟期間が短縮され、産卵期間および産卵間隔の短縮により産仔の機会が増大するが、一卵嚢あたりの産仔数は減少した。16°Cおよび20°Cの低水温並びに28°Cの高水温では産仔数の世代間のばらつきも大きかった。さらに、継代飼育(馴化水温)より低い水温では性比が変動することも確認された。また、長期の慢性毒性試験では餌料を投与するが、餌料植物プランクトンの増殖が可能な水温に設定する必要がある。シオダマリミジンコはタイドプールのような環境変動が大きく、かつ、過酷な環境でも生存できることが知られているが、その成

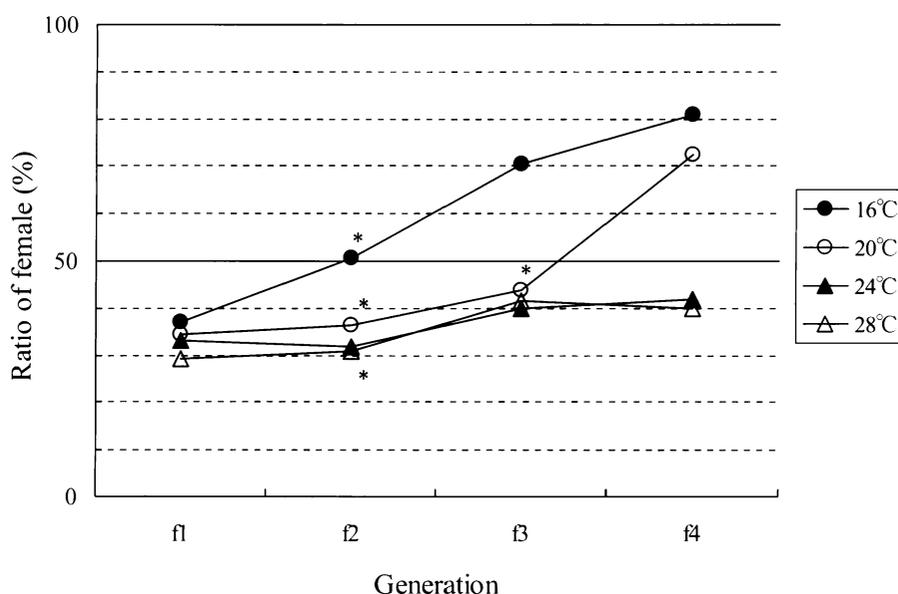


Fig. 8 Changes of sex ratio (percentage of female) in the generations from first to forth by several rearing temperatures.

\* Significant difference was recognized between f2-f3 (16°C), f2-f3 (20°C), f3-f4 (20°C) and f2-f3 (28°C).

\*\* Significant difference of f1 was not calculated, because of N=1.

Table 5 Changes of brood spawned from *Tigriopus japonicus* reared under three luminous intensities

Luminous intensity (Lux)	Number of brood (brood / capsule)			Coefficient of variation
	Minimum	Average $\pm$ SD	Maximum	
200	7	27.5 $\pm$ 10.6	51	0.385
4,000	2	18.0 $\pm$ 9.1	35	0.506
10,000	3	21.1 $\pm$ 8.7	42	0.412

長および繁殖に好適な水温は23～25℃、また、最適水温は25℃であり、20℃以下では成長が抑制されると報告されている（古賀，1979）。したがって、以上の試験結果を踏まえると、シオダマリミジンコの至適水温である23～25℃で試験することが推奨される。また、飼育水温によって性比が変動する可能性があるために、試験水温と同じ温度で継代飼育し、さらに、野外で採集したシオダマリミジンコを試験に用いる場合、少なくとも4世代以上の長期間試験水温に馴化する必要があると考えられる。

#### 照明

**成長速度および産仔間隔：**ノープリウス幼生のふ化後7日目にコペポダイト幼生が出現した。ふ化後9日目に3つの試験照度に移したが、翌日（10日目）には交尾が確認された。最初の産仔は、200Luxおよび4,000Luxの試験区ではふ化後14日目、10,000Lux試験区では15日目に観察された。4腹目の産仔が終了するまでの日数は、200Lux区で8～9日、また、4,000および10,000Lux区で8～10日であった。産仔間隔は全ての試験区で2日以内であり、すなわち、大部分の個体が2日より短い間隔で産仔した。

**産仔数：**1卵囊あたりの産仔数（個体/卵囊）をTable 5に各試験区について示した。200Lux区、4,000Lux区および10,000Lux区の平均産仔数は、それぞれ、27.5  $\pm$  10.6（最小～最大：7～51）、18.0  $\pm$  9.1（2～35）および21.1  $\pm$  8.7（3～42）個体/卵囊であり、200Lux区と4,000Lux区の間および200Lux区と10,000Lux区の間には危険率5%で有意差が認められ、4,000Lux区および10,000Lux区に比較して200Lux区で産仔数が多い結果となった。また、変動係数は200、4,000、10,000Lux区でそれぞれ、0.385、0.506、0.412であり、200Luxが最小であった。すなわち、200～10,000Luxの範囲では、200Luxが最も平均産仔数が多く、かつ変動幅が小さかった。

以上をまとめると、繁殖阻害試験等の暴露試験を実施する場合は、最も安定しかつ産仔数が多い200Luxが適当と考えられる。しかし、長期間の培養時の照明条件は、水質管理の労力等も考慮し、総合的に決める必要がある。照度は餌料用植物プランクトンの生長に大きく影響するが、一方で今回の試験範囲（200～10,000Lux）ではシオダマリミジンコの繁殖を著しく阻害するほどではなかった。したがって、長期飼育のための照明条件は、餌料用植物プランクトンの生長に適している4,000Luxが適当と考えられる。

#### まとめ

有害化学物質の動物プランクトンの繁殖に及ぼす影響を解明する試験法の確立を目的として、試験生物として選定したシオダマリミジンコの飼育および繁殖に係る項目（餌料、飼育密度、飼育水温および照度）を検討した。

非生物飼料で飼育すると、成長が抑制され、産仔数が減少するとともに、産仔間隔の再現性も悪く、テトラセルミスが餌料として適しており、さらに餌料密度は $10^4$ ～ $10^5$ cells/mLレベルが必要であった。成長速度、産仔間隔、産仔数および正常産仔率などを指標として適正な飼育密度、飼育水温および照度を検討した。その結果、餌料生物、テトラセルミスの細胞密度を約 $1.0 \times 10^4$ cells/mLに設定した本研究の飼育条件では、10個体/mLの飼育密度では、成長速度および産仔数が低下し、本種の飼育密度は2個体/mL以下が適正であった。

飼育水温は成長速度、産仔期間、産仔間隔に影響を及ぼし、低水温（16℃）で成長が抑制された。1卵囊あたりの産仔数（個体/卵囊）は、産仔頻度の高い高水温よりは産卵間隔の長い低水温で多かった。餌料植物プランクトンの増殖を含めて総合的に考えると、24℃が飼育温度として適当であった。飼育水温は性比を変動させ、継代飼育（予備飼育）の温度より低い温度（16～20℃）で飼育す

ると雌の割合が増加した。また、低水温における雌の割合は継代するにしたがって次第に大きくなり、新たな飼育温度に順応（性比が安定）するまでに数世代を要した。これらの結果から、野外で採集したシオダマリミジンコを繁殖阻害慢性毒性試験に用いる場合、少なくとも4世代以上の長期間試験水温に馴化する必要があることが指摘できる。シオダマリミジンコの生育および繁殖に対する照度の影響は小さいが、長期間の試験では餌料植物プランクトンの光合成（増殖）に必要なと考えられる4,000Lux（明暗周期：12L/12D）が適当と考えられる。

### 謝 辞

本研究は、水産庁の事業「海産生物再生産影響評価技術開発事業」（平成12年度～14年度）および「海産生物再生産影響評価技術高度化事業」（平成15年度～19年度）により行ったものであり、本研究の推進のためにご指導およびご助言を賜った検討委員会委員長清水 誠東京大学名誉教授並びに検討委員の先生方に深謝する。また、本稿の取りまとめに際しご指導を賜った沖山宗雄東京大学名誉教授並びに研究推進等においてご支援を賜った水産庁生態系保全室長はじめ担当官に深謝する。

### 引用文献

American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition.

American Society for Testing and Materials (ASTM) (1996). 1996 Annual Book of ASTM Standards, West Conshohocken, vol. 11.05.

Hagiwara, A., Lee, C-S. and Shiraishi, D. J. (1995). Some reproductive characteristics of the broods of Harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* cultured in different salinities. *Fish. Sci.*, **61**, 618-622.

Hicks, G.R.F. and Coull, B.C. (1983). The ecology of marine meiobenthic harpacticoid copepods. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, **21**, 67-175.

堀 英夫・立石晶浩・山田 久 (2001). 海産動物プランクトンによる有害物質急性毒性試験

法の開発, 環境毒性学会誌, **4**, 73-86.

ISO (1999). International Standard, ISO 14669, Water quality - Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). (<http://www.iso.org/>)

Ito, T. (1970). The biology of Harpacticoid copepod, *Tigriopus japonicus* Mori. *J. Fac. Sci.Hokkaido Univ. Ser. VI, Zool.*, **17**, 474-500.

北島 力(1973). コペポーダの大量増殖の試験的試み, 日本プランクトン学会誌, **20**, 54-60.

古賀文洋(1970). *Tigriopus japonicus* Mori, かいあし類の生活史について, 日本海洋学会誌, **26**, 11-21.

古賀文洋(1979). V ティグリオプス (*Tigriopus japonicus*) の培養, 「水産増殖叢書28, 餌料用動物プランクトンの大量培養」(餌料プランクトン大量培養研究連絡協議会編), 日本水産資源保護協会, 東京, pp.64-77.

日本規格協会 (1997). 化学物質などによるミジンコ類の遊泳阻害試験法, 「JISハンドブック環境測定」, 日本規格協会, 東京, pp.1354-1361.

西内康浩・橋本 康 (1991). 水産動物に対する毒性, コイ・ミジンコ類に対する試験法, 「毒性試験講座17農薬・動物医薬品」, 地人書館, 東京, pp.95-102.

OECD (1995). Guidance Document for Aquatic Effects Assessment.

OECD (1998). *Daphnia magna* Reproduction Test, OECD Guideline for Testing of Chemicals.

OECD (2004). *Daphnia* sp., Acute Immobilization Test, OECD Guideline for Testing of Chemicals.

Raisuddin, S., Kwok, K.W.H., Leung, K.M.Y., Schlenk, D. and Lee, J-S. (2007). The copepod *Tigriopus*: A promising marine model organisms for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquatic Toxicology*, **83**, 161-173.

高野秀明 (1968). かわった養殖, シオダマリミジンコ, 養殖, **5**, 105-108.

U.S.EPA (1985). Guideline for Deriving Numerical Water Criteria for the Protection of Aquatic Organisms and Their Use, 1-98pp.

U.S.EPA (2002a). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving

- Waters to Freshwater and Marine Organisms.
- U.S.EPA (2002b). Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms.
- U.S.EPA (2002c). Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms.
- Voordouw, M.J. and Anholt, B.R. (2002). Environmental sex determination in a splash pool copepod. *Biol. J. Linnean Soc.*, **76**, 511-520.
- Voordouw, M.J., Ronbinson, H.E., Stebbins, G., Albert, A.Y.K. and Anholt, B.R. (2005). Larval density and the Charnov-Bull model of adaptive environmental sex determination in a copepod. *Can. J. Zool.* **83**, 943-954.