

# 岩手医科大学矢巾キャンパスの貯水池に生息する ミジンコ類 (甲殻亜門 : 鯰脚綱)

阿部 博和<sup>1)\*</sup>・佐々木 あゆ<sup>2)</sup>・伊藤 えみ<sup>2)</sup>

Identification of cladocerans (Crustacea : Branchiopoda) in impounding reservoirs of the Yahaba Campus, Iwate Medical University using DNA barcoding. Hirokazu ABE<sup>1)\*</sup>, Ayu SASAKI<sup>2)</sup>, Emi ITOH<sup>2)</sup>. *Journal of the Natural History of Aomori*, (27) : 157–166, 2022

**Abstract:** A survey of cladocerans live in the impounding reservoirs of the Yahaba Campus of Iwate Medical University was conducted on the morning of August 3 and night of August 30, 2021. The specimens collected in this study were identified as four cladoceran species, *Chydorus sphaericus* complex sp. A3, *Diaphanosoma* cf. *macrophthalma*, *Ilyocryptus* cf. *cuneatus*, and *Scapholeberis smirnovi*, by DNA barcoding using mtCOI sequences. *Diaphanosoma* cf. *macrophthalma*, *I. cf. cuneatus*, and *S. smirnovi* are the first records from Iwate Prefecture. The presence of the A3 lineage of the *C. sphaericus* species complex, which was previously reported in Yamagata and Toyama Prefectures, Japan by Belyaeva & Taylor (2009), was confirmed also in Iwate Prefecture in the present study. All the sequences newly generated in this study were deposited in the DDBJ/ENA/GenBank nucleotide sequence database under accession numbers LC667438–LC667445. Voucher specimens were deposited in the Iwate Prefectural Museum under the registration numbers 276672 (*Chydorus sphaericus* complex sp. A3), 276673 (*Diaphanosoma* cf. *macrophthalma*), 276674 (*Ilyocryptus* cf. *cuneatus*), and 276675 (*Scapholeberis smirnovi*)

**Key words:** *Chydorus sphaericus*, *Diaphanosoma macrophthalma*, *Ilyocryptus cuneatus*, *Scapholeberis smirnovi*, zooplankton.

## 1. はじめに

岩手医科大学矢巾キャンパスは、2007年3月に岩手県紫波郡矢巾町の水田地帯に開設された。それに先立つ2006年12月には、キャンパス敷地内に大雨時の浸水を防ぐ目的で雨水を集積・貯留するための貯水池が作られた。貯水池には、完成から15年を経て様々な生物がみられるようになり、これまで、稲わらトラップを用いたゾウリムシ *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1834 とアメーバ *Amoeba proteus* (Pallas, 1766) の調査や (八島他, 2007), カイアシ類の調査 (阿部他, 2021) が行われている。このカイアシ類の調査の際にはミジンコ類も採集されていたが、種同定には至らず未報告であった。

近年のDNA解析技術の発展により、淡水動物プランクトンのDNA情報の蓄積は急速に加速しており、DNAの塩基配列の比較による種同定 (DNAバーコーディング) のための土台が整備されつつある (e.g., Makino et al., 2013, 2017)。これと同時に、これまで汎世界種と考えられてきたものの中に複数の隠蔽種が含まれていることが示される事例が増加しており、ミジンコ類においてもいくつかの隠蔽種群の存在が報告されている (Colbourne et al., 1998 ; Belyaeva & Taylor, 2009 ; Petrussek et al., 2012)。本研究では、DNAバーコーディングの手法を用いて岩手医科大学矢巾キャンパスの貯水池で採集されたミジンコ類の分類について検討を行った。

## 2. 材料と方法

ミジンコ類の採集は2021年8月3日 (10:00～11:00) と8月30日 (19:30～21:00) に岩手医科大学矢巾キャンパスの第1～第3貯水池で行った (阿部他, 2021 参照)。採集には目合い100 $\mu$ mの柄付小型プランクトンネット (ケニス HP) を用い、表層を数回ずつ水平に曳網することで動物プランクトンを採集した。また、池底を攪拌して巻き上げた底泥を柄付小型プランクトンネットで採取することで、底生性のグループの採集を行った。採集されたミジンコ類は70%のエタノールで固定し、水野・高橋 (2000), 田中 (2002), 田中・牧田 (2017) を参照しながら実体 (Wraymer LW-820T) および生物顕微鏡 (Olympus BX51) を用いた形態観察により属レベルでの同定を行った。実体顕微鏡には Sony  $\alpha$  6000, 生物顕微鏡には Olympus, DP71 のカメラを取り付けて観察した個体の写真を撮影した。なお、本稿中の生物の種名については、学名との対応の混乱を避けるために和名は使用せず、すべて学名で表記することとした。本研究で得られた標本の一部は、資料登録番号276672 (*Chydorus sphaericus* complex sp. A3), 276673 (*Diaphanosoma* cf. *macrophthalma*), 276674 (*Ilyocryptus* cf. *cuneatus*) および276675 (*Scapholeberis smirnovi*) で70%エタノール液浸標本として岩手県立博物館に収蔵した。

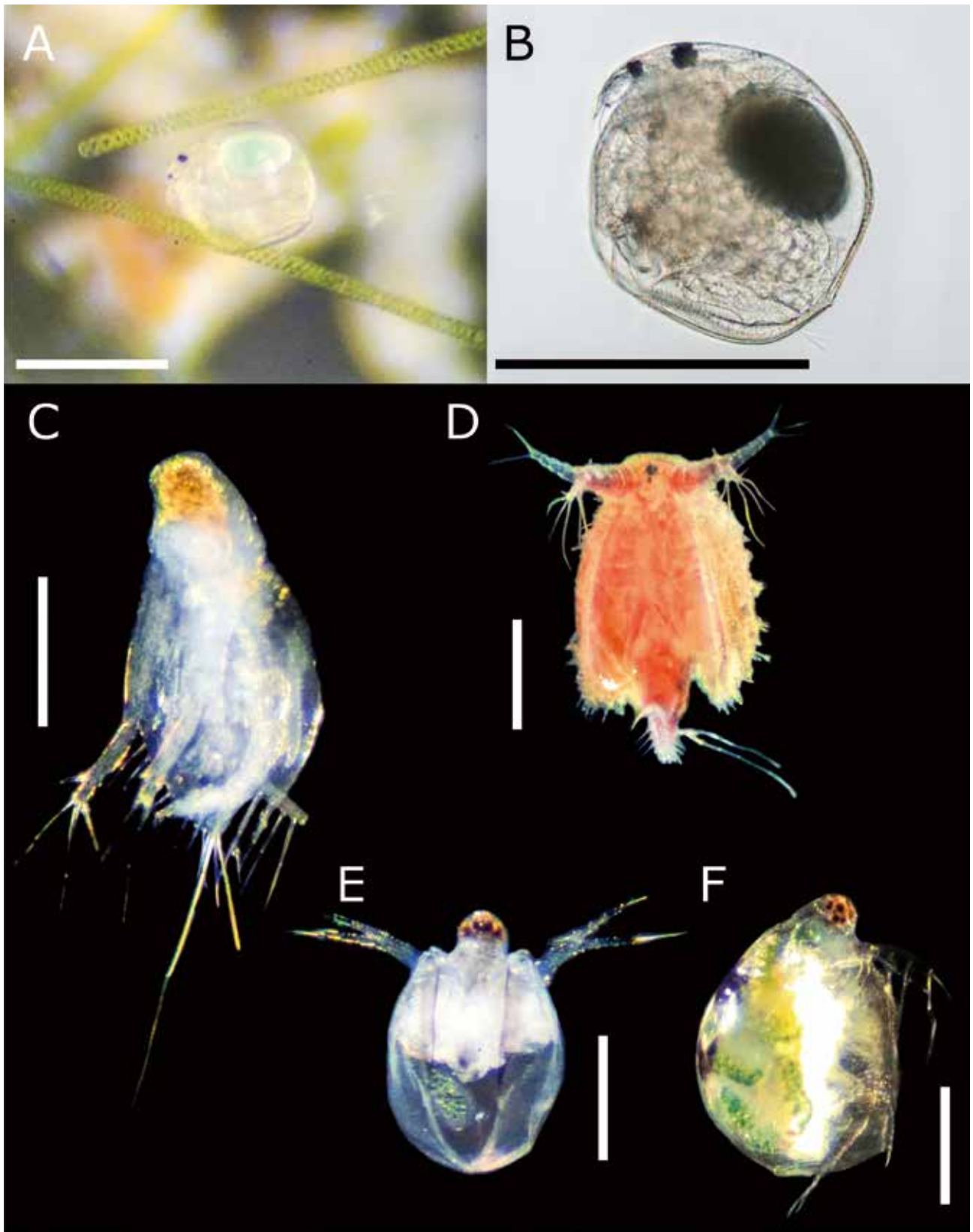
DNA解析では、マルミジンコ属 (*Chydorus*) 1個

1) 岩手医科大学教養教育センター生物学科 (〒028-3694 岩手県紫波郡矢巾町医大通1-1-1)

Department of Biology, Center for Liberal Arts & Sciences, Iwate Medical University, 1-1-1 Idai-dori, Yahaba, Shiwa, Iwate 028-3694, Japan

2) 岩手医科大学医学部医学科第1学年 First year student of School of Medicine, Department of Medicine, Iwate Medical University, 1-1-1 Idai-dori, Yahaba, Shiwa, Iwate 028-3694, Japan

\*Corresponding author: Hirokazu Abe, E-mail: abehiro13@gmail.com



**Fig. 1.** Stereomicrographs (A, C–F) and light micrograph (B) of the cradocerans collected in the present study. A, B: *Chydorus sphaericus* complex sp. A3 (lateral view). C: *Diaphanosoma* cf. *macrophthalma* (ventral). D: *Ilyocryptus* cf. *cuneatus* (ventral). E, F: *Scapholeberis smirnovi* (E: ventral, F: lateral). Scale bars = 300  $\mu$ m.

体と、オナガミジンコ属 (*Diaphanosoma*), フトオケブカミジンコ属 (*Ilyocryptus*), アオムキミジンコ属 (*Scapholeberis*) のそれぞれ3個体をサンプルとして供した。DNAの抽出はRichlen & Barber (2005) の手法に従い、エタノール固定サンプル1個体全体を50 µlのTEバッファー (pH 8.0) および10%のChelex 100 (Bio-Rad社) とともに容量0.2mlのPCRチューブ内に入れ、95°Cで20分間インキュベートを行った。抽出したDNAを鋳型として、PCR法によりミトコンドリアCOI遺伝子部分配列の増幅を行った。PCRは1サンプルあたり1 µlの鋳型、10 µlの滅菌蒸留水 (DDW), 8.8 µlのKOD One PCR Master Mix -Blue- (東洋紡), 各0.1 µlのフォワードプライマーとリバープライマー (濃度50 µM) を含む20 µlの反応液で行い、PCRプライマーにはProsser et al. (2013) のZplankF1\_t1とZplankR1\_t1を使用した。PCRのサイクル条件は、98°C 10秒, 45°C 5秒, 68°C 1秒の3ステップを5サイクルの後、98°C 10秒, 51°C 5秒, 68°C 1秒の3ステップを35サイクルとした。PCR産物は、1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動で目的断片長のDNAの増幅の有無の確認を行った後、Enz-Sap (Edge BioSystems社) で精製を行った。シーケンスプライマーにはMessing (1983) のM13FとM13Rを使用し、シーケンス解析はEurofins Genomics社 (東京) によって行われた。フォワードおよびリバーの相補的配列はGeneStudio ver. 2.2.0.0. (GeneStudio社) を用いてアセンブルを行った。本研究で得られたCOI遺伝子部分配列は、アクセッション番号LC667438 ~ LC667445でDDBJ/ENA/GenBankの国際塩基配列データベースに登録を行い (Table 1), NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) Webサイト (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) のBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を用いた相同性検索により国際塩基配列データベースに登録されている塩基配列との比較を行った。

マルミジンコ属とオナガミジンコ属については、BLAST検索により多くの一致率の高い配列がヒットしたため、分子系統解析により分類の検討を行った。マルミジンコ属とオナガミジンコ属のmtCOI登録配列をDDBJ/ENA/GenBankから取得し (マルミジンコ属: 317配列, オナガミジンコ属: 399配列), 本研究で得られたマルミジンコ属とオナガミジンコ属の配列とともにMAFFTオンラインサービス ver. 7によりFFT-NS-iアルゴリズムを用いてアライメントを行った (Katoh et al., 2017)。アウトグループには、マルミジンコ属の解析ではWang et al. (2021) に従い *Paralona pigra* (Sars, 1862) の配列 (Accession number: EU719117) を、オナガ

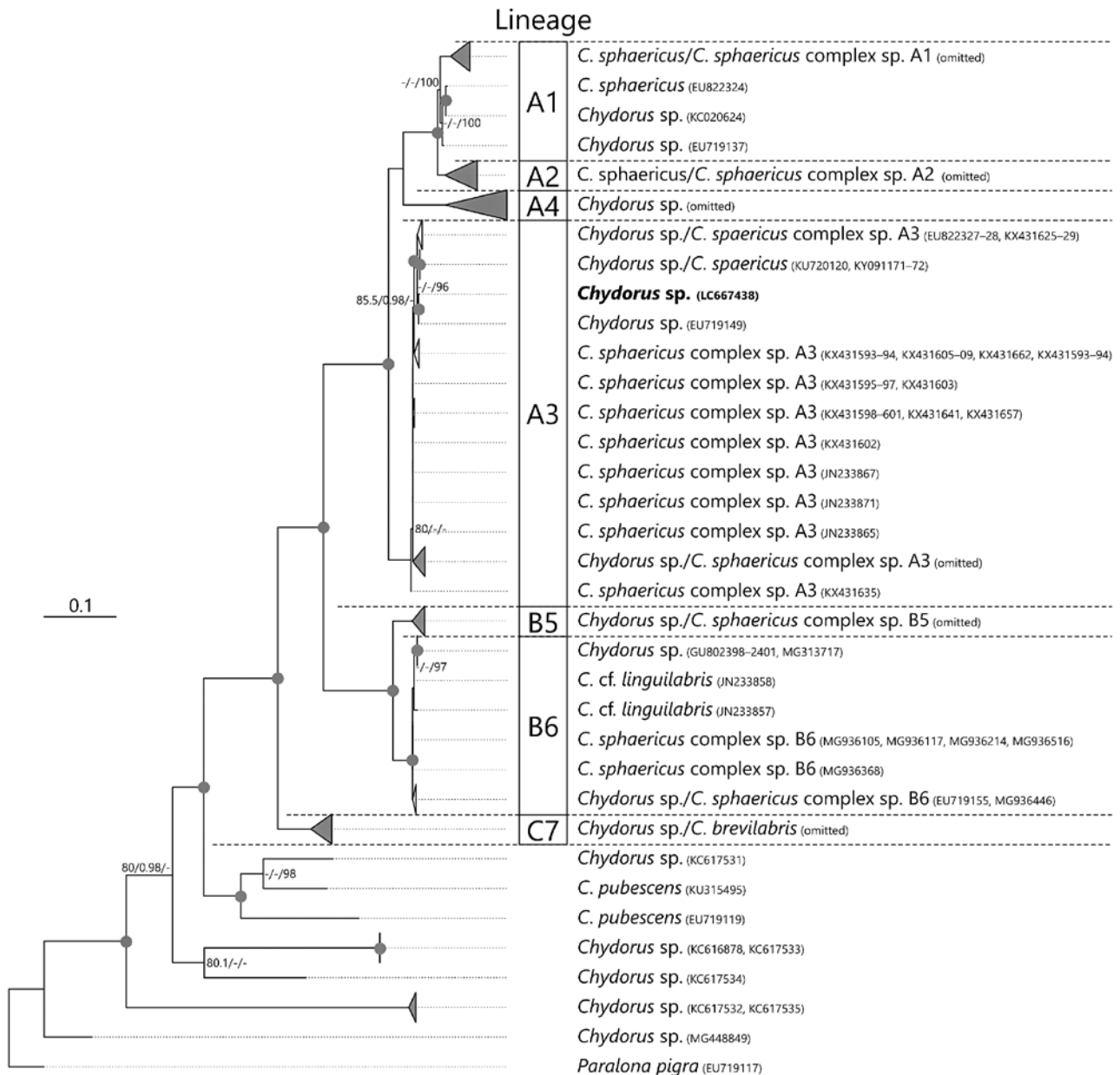
ミジンコ属の解析ではLakatos et al. (2015) に従い *Holopedium gibberum* Zaddach, 1885の配列 (LC434036) を使用した。アライメントの配列長はいずれも658bpであり、マルミジンコ属のアライメントではdistinct patterns = 385, parsimony-informative sites = 260, singleton sites = 22, constant sites = 376であり、オナガミジンコ属ではそれぞれ396, 286, 22, 350であった。最尤 (ML) 法を用いた分子系統解析は、PhyloSuite v.1.2.2 (Zhang et al., 2020) に実装されているIQ-TREE (Nguyen et al., 2015) を用いて行い、塩基置換モデルはベイズ情報量規準 (BIC) をもとにModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) で最適と推定されたTVM+F+I+G4モデルを使用した。ML系統樹の頑健性は、5000反復のSH-aLRT検定 (Shimodaira-Hasegawa-like approximate likelihood ratio test) (Guindon et al., 2010), aBayes検定 (approximateBayestest) (Anisimova et al., 2011), および5000反復のUltrafast Bootstrap (Minh et al., 2013) によって評価した。

### 3. 結果

形態観察の結果、マルミジンコ属、オナガミジンコ属、フトオケブカミジンコ属、アオムキミジンコ属の4属が同定された (Fig. 1)。マルミジンコ属はサンプル中に混入したアオミドロ類に付着していた個体が採集され、オナガミジンコ属とアオムキミジンコ属はプランクトンサンプルから、フトオケブカミジンコ属は巻き上げた底泥から得られた。

DNA解析の結果、マルミジンコ属1個体、オナガミジンコ属2個体、フトオケブカミジンコ属2個体、アオムキミジンコ属3個体からmtCOI遺伝子の部分配列 (658 bp) が得られた。オナガミジンコ属、フトオケブカミジンコ属、アオムキミジンコ属における個体間の配列の一致率はそれぞれ99.85%, 99.09%, 98.48 ~ 100%であった。

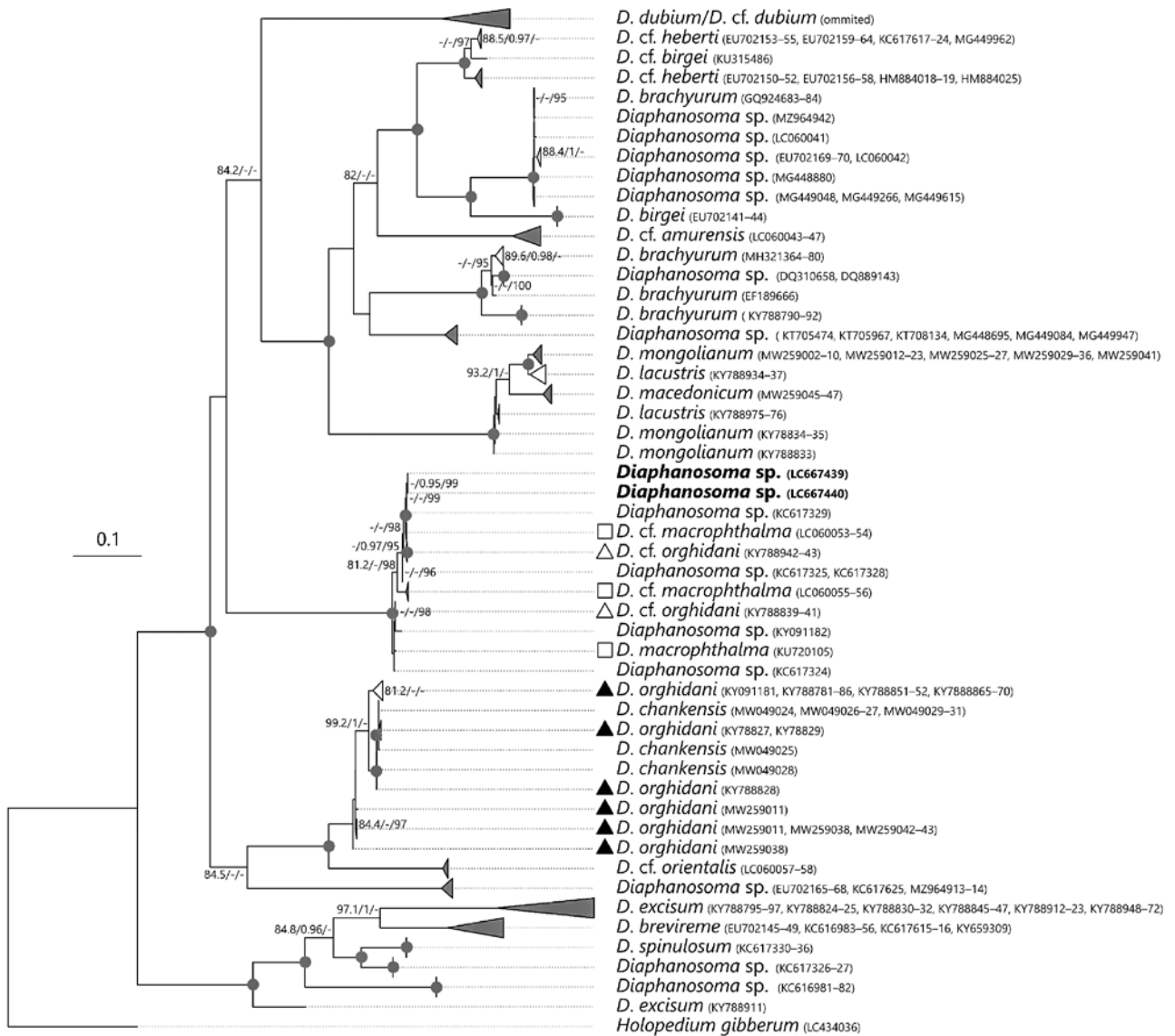
BLAST検索の結果 (代表配列の結果をTable 1に示す), 本研究で得られたマルミジンコ属のmtCOI配列は、Belyaeva & Taylor (2009) の *Chydorus* sp. (99.35 ~ 99.78%), Jiang et al. (2017) の *Chydorus sphaericus* (Müller, 1776) (99.36%), Kotov et al. (2016) およびJeffery et al. (2011) の *Chydorus sphaericus* complex sp. A3 (99.20 ~ 99.35%) の配列と一致率が高かった。オナガミジンコ属では、Lakatos et al. (2015) により報告された *Diaphanosoma* cf. *macrophthalma* Korovchinsky & Mirabdullaev, 1995の配列と最も一致率が高く (99.54 ~ 99.70%), 次いでProsser et al. (2013) による *Diaphanosoma* sp. (99.24 ~ 99.54%), Liu et al. (2018) による *Diaphanosoma* cf. *orghidani* Negrea, 1982



**Fig. 2.** Maximum likelihood tree inferred from mtCOI gene sequences of *Chydorus* species obtained in the present and from DDBJ/EMBL/GenBank database. The gene sequences obtained in the present study are highlighted in boldface. The lineages of *Chydorus sphaericus* species complex recognized previously (Belyaeva & Taylor 2009, Kotov et al. 2016, Wang et al. 2021) are shown in the panel at the left of species names. Several branches are collapsed and displayed as triangles. SH-aLRT/ approximate Bayes support/ultrafast bootstrap support values of  $\geq 80\%/ \geq 0.95/ \geq 95\%$ , respectively are given beside the respective nodes. Nodes with gray circles and collapsed nodes with gray triangles indicate triple high support values of SH-aLRT  $\geq 80$ , approximate Bayes support  $\geq 0.95$ , and ultrafast bootstrap support  $\geq 95$ . The scale bar represents the number of substitutions per site. Sequences of *Paralona pigra* (EU719117) was used for outgroup rooting. Accession numbers for each sequence are given in brackets (those in the collapsed nodes are omitted as they were huge lists).

(99.02 %) と一致率が高かった。フトオケブカミジンコ属では、Makino et al. (2017) による *Ilyocryptus cf. cuneatus* Štifter, 1988 (DDBJ/ENA/GenBank には *Ilyocryptus* sp. として登録されている) の配列 (98.48 ~ 100 %), 次いで iBOL (International Barcode of Life) により登録されている *Diplostraca* sp. (ミジン

コ下綱) の配列 (93.16 %) と一致率が高く、それ以降の一致率は 80 % 台に低下した。アオムキミジンコ属では、Garibian et al. (2020) による *Scapholeberis smirnovi* Garibian, Neretina, Taylor & Kotov, 2020 (*Scapholeberis* sp. 1 として登録されている) の配列 (97.26 ~ 97.75 %), 次いで Yang et al.



**Fig. 3.** Maximum likelihood tree inferred from mtCOI gene sequences of *Diaphanosoma* species obtained in the present and from DDBJ/EMBL/GenBank database. The gene sequences obtained in the present study are highlighted in boldface. The phylogenetic position of sequences registered in DDBJ/EMBL/GenBank database as *Diaphanosoma macrophthalma* and *Diaphanosoma cf. macrophthalma* are indicated by open squares, and that of sequences registered as *Diaphanosoma orghidani* and *Diaphanosoma cf. orghidani* by solid and open triangles, respectively. Several branches are collapsed and displayed as triangles. SH-aLRT/ approximate Bayes support/ ultrafast bootstrap support values of  $\geq 80\%$  /  $\geq 0.95$  /  $\geq 95\%$ , respectively are given beside the respective nodes. Nodes with gray circles and collapsed nodes with gray triangles indicate triple high support values of SH-aLRT  $\geq 80$ , approximate Bayes support  $\geq 0.95$ , and ultrafast bootstrap support  $\geq 95$ . The scale bar represents the number of substitutions per site. Sequences of *Holopedium gibberum* (LC434036) was used for outgroup rooting. Accession numbers for each sequence are given in brackets (that of *Diaphanosoma dubium*/*Diaphanosoma cf. dubium* are omitted as it was a huge list).

(2017) による *Scapholeberis mucronata* (Müller, 1776) (96.81 ~ 97.44 %) の配列と一致率が高く、それ以降の一致率は 80 % 台に低下した。

分子系統解析では、本研究で得られたマルミジンコ属の配列は、*C. sphaericus*, *C. sphaericus* complex sp. A3, および *Chydorus* sp. として登録されている配列とともにクレードを形成した (Fig. 2)。本研究

で得られたオナガミジンコ属の配列は、Jiang et al. (2017) により *D. macrophthalma*, Lakatos et al. (2015) により *D. cf. macrophthalma* (Fig. 3, open squares), Liu et al. (2018) により *D. cf. orghidani* (Fig. 3, open triangles), および Prosser et al. (2013) により *Diaphanosoma* sp. として登録されている配列とともにクレードを形成した (Fig. 3)。また、Yang et al.

(2017) や Liu et al. (2018, 2021), Alexiou et al. (2021) により *D. orghidani* や *D. cf. orghidani* として登録されている別の配列 (Fig. 3, solid triangles) は, Liu et al. (2021) により *Diaphanosoma chankensis* Ueno, 1939 として登録されている配列とともに異なるクレードを形成した。

#### 4. 考察

Makino et al. (2017) による霞ヶ浦での淡水動物プランクトンの DNA バーコーディングの研究では, mtCOI 配列の種内変異は 7% までと設定され, 一致率が 93% 以上で同種であるとみなされている。また, Makino et al. (2020) では, 形態同定の結果との対応付けによるタマミジンコ属 (*Moina*) の mtCOI 配列の種内変異の最大値の結果に基づき, 95% の一致率を種同定の閾値としている。このいずれの基準においても, 本研究で mtCOI の配列が得られた 4 属のすべてで同種の配列が DDBJ/ENA/GenBank のデータベースに登録されていたと判断できる (Table 1)。

フトオケブカミジンコ属では, Makino et al. (2017) で *Ilyocryptus cf. cuneatus* として登録されている配列とほぼ完全に一致しており, iBOL により *Diplostraca* sp. として登録されている配列との一致率が 93% 台と種内変異の閾値の境界付近であることも踏まえると (Table 1), 本研究で採集された種は, *I. cf. cuneatus* であると判定できる。Makino et al. (2017) では本種の学名に cf. (= confer: その種である可能性が高いが断定できないことを示す) が付記されている理由については言及されていないが, *I. cuneatus* のタイプ産地がチェコ共和国と日本から遠いこと, 中国や, 南アフリカ, オーストラリア, ニュージーランドに本種に似た個体群が存在し, これらの分類について見直しが必要であると考えられていることを踏まえると (Kotov & Štifter, 2006; Kotov & Elmoor-Loureiro, 2008), 現状では種の断定は避けるのが無難であると思われる。

アオムキミジンコ属で一致率が 93% 以上となったのは, Garibian et al. (2020) で *Scapholeberis smirnovi* として登録されている配列と Yang et al. (2017) で *S. mucronata* として登録されている配列のみであり, 本研究で採集された種はこのいずれかの種である可能性が高いと考えられる。*S. smirnovi* は Garibian et al. (2020) により極東ロシアをタイプ産地として新種記載された種であり, 分布域はロシア極東南部, 朝鮮半島, 日本, 中国東北部とされている。この報告と同時に和歌山県産の標本から得られた mtCOI 配列が本種の DNA 情報として登録されており, Yang et al. (2017) により *S. mucronata* として登録されていた配列とクレード (clade L1) を形

成することから, Yang et al. (2017) の配列は *S. smirnovi* のものと判定されている (Garibian et al. 2020)。Garibian et al. (2020) が提示した系統樹では, 4 つの地理的なクレードからなる *S. mucronata* 種群は *S. smirnovi* とは系統的に離れているため, Yang et al. (2017) の *S. mucronata* は種名の誤りと判断できる。これにより, 本研究で採集されたアオムキミジンコ属の種は, *S. smirnovi* と判断できる。なお, 田中・牧田 (2017) は, 国内から知られているアオムキミジンコ属の種として *Scapholeberis kingi* Sars, 1888, *S. mucronata*, *S. uenoi* Tanaka, 2002 の 3 種を挙げているが, Garibian et al. (2020) によれば *S. kingi* は現在までのところオーストラリアでのみ確認されている種であり, *S. mucronata* 種群は東アジアからは発見されていないとされている。田中・牧田 (2017) では形態観察のみに基づき種同定を行っているため, 国内に *S. kingi* と *S. mucronata* が分布しているかどうかは検証を要するといえる。また, 田中・牧田 (2017) によると *S. uenoi* は田中 (2002) により記載・命名された種であると読み取れるが, そうであれば「1999 年よりも後に設立された名義種階級群タクソンでは担名タイプは設立時に固定しなければならない」(動物命名法国際審議会, 2000) という国際動物命名規約の適格性の要件を満たしていないようであり, *S. uenoi* は適格な学名とはいえないかもしれない。

マルミジンコ属の分子系統解析の結果, 本研究で得られた配列は, *Chydorus sphaericus*, *C. sphaericus* complex sp. A3, および *Chydorus* sp. として登録されている配列とともにクレードを形成した (Fig. 2)。かつて生物地理区の全北区 (Holarctic) に広く分布すると考えられていた *C. sphaericus* は, 狭義の *C. sphaericus* のほか, *C. biovatus* や *C. brevilabris* を含む複数の種を内包する種群であることが明らかとなり, 現在では A1 (ヨーロッパ, 西シベリア), A2 (北ヨーロッパ, 西シベリア, 東シベリア, 極東ロシア, チベット高原), A3 (極東ロシア, 東シベリア, 中国, 韓国, 日本), A4 (カナダ), B5 (カナダ), B6 (カナダ), C7 (北アメリカ大陸) の 7 つの系統が遺伝的に認められている (Belyaeva & Taylor, 2009; Kotov et al., 2016; Wang et al., 2021)。このうち, A1 の系統は狭義の *C. sphaericus*, C7 の系統が *C. brevilabris* に該当するとみなされており, *C. biovatus* についてはどの系統と対応するかは未だ決着がついていない (Belyaeva & Taylor, 2009)。これまで日本から報告があるのは A3 の系統のみであり, 分子系統解析の結果から本研究で採集された個体も A3 の系統に属するものであると判断された。

オナガミジンコ属の分子系統解析の結果, 本

**Table 1.** Results of the nucleotide BLAST search for representative mtCOI sequences from each of the four cladoceran genera collected in the present study. Shown in order of increasing percentage of identity.

Result of BLASTN search (Dec. 17, 2021)									
Species of query sequence (Accession number)	Identity (%)	Query cover (%)	Max score	E value	Accession length (bp)	Species name	Locality	Accession number	Reference
<i>Chydorus</i> sp. (LC667438)	<b>99.78</b>	70	846	0.0	461	<i>Chydorus</i> sp.	Japan (Toyama)	EU719149	Belyaeva & Taylor (2009)
	<b>99.36</b>	94	1125	0.0	647	<i>Chydorus sphaericus</i>	China	KU720120	Jiang et al. (2017)
	<b>99.35</b>	70	835	0.0	461	<i>Chydorus sphaericus</i> complex sp. A3	South Korea	KX431625	Kotov et al. (2016)
	<b>99.35</b>	70	835	0.0	461	<i>Chydorus</i> sp.	Japan (Yamagata)	EU822328	Belyaeva & Taylor (2009)
	<b>99.20</b>	95	1129	0.0	626	<i>Chydorus sphaericus</i> complex sp. A3	Canada	JN233871	Jeffery et al. (2011)
<i>Diaphanosoma</i> sp. (LC667439, LC667440)	<b>99.70</b>	100	1205	0.0	658	<i>Diaphanosoma</i> cf. <i>macrophthalmia</i>	Japan	LC060053	Lakatos et al. (2015)
	<b>99.54</b>	100	1199	0.0	658	<i>Diaphanosoma</i> cf. <i>macrophthalmia</i>	Japan	LC060054	Lakatos et al. (2015)
	<b>99.54</b>	100	1199	0.0	658	<i>Diaphanosoma</i> sp.	South Korea	KC617329	Prosser et al. (2013)
	<b>99.24</b>	100	1188	0.0	658	<i>Diaphanosoma</i> sp.	South Korea	KC617325	Prosser et al. (2013)
	<b>99.02</b>	92	1094	0.0	610	<i>Diaphanosoma</i> cf. <i>orghidani</i>	China	KY788943	Liu et al. (2018)
<i>Ilyocryptus</i> sp. (LC667441, LC667442)	<b>100</b>	100	1216	0.0	658	<i>Ilyocryptus</i> cf. <i>cuneatus</i> (as <i>Ilyocryptus</i> sp.)	Japan (Lake Kasumigaura)	LC215487	Makino et al. (2017)
	<b>99.85</b>	100	1210	0.0	658	<i>Ilyocryptus</i> cf. <i>cuneatus</i> (as <i>Ilyocryptus</i> sp.)	Japan (Lake Kasumigaura)	LC215488	Makino et al. (2017)
	<b>99.09</b>	100	1182	0.0	658	<i>Ilyocryptus</i> cf. <i>cuneatus</i> (as <i>Ilyocryptus</i> sp.)	Japan (Lake Kasumigaura)	LC215486	Makino et al. (2017)
	<b>93.16</b>	100	966	0.0	658	Diplostraca sp.	USA	JN294867	iBOL (Unpublished)
<b>84.77</b>	98	652	0.0	658	<i>Moina</i> cf. <i>mukhamedievi</i>	Japan (Kumamoto)	LC503924	Makino et al. (2020)	
<i>Scapholeberis</i> sp. (LC667443–LC667445)	<b>97.75</b>	94	1075	0.0	623	<i>Scapholeberis smirnovi</i> (as <i>Scapholeberis</i> sp. 1)	Japan (Wakayama)	MT371620	Garibian et al. (2020)
	<b>97.44</b>	47	534	$4 \times 10^{-147}$	313	<i>Scapholeberis mucronata</i>	China	KY091215	Yang et al. (2017)
	<b>83.73</b>	88	549	$1 \times 10^{-151}$	615	<i>Simocephalus congener</i>	Slovakia	KF484648	Kohout et al. (2014)
	<b>83.72</b>	91	566	$1 \times 10^{-156}$	634	<i>Simocephalus congener</i>	Slovakia	KF484643	Kohout et al. (2014)
	<b>83.55</b>	91	560	$6 \times 10^{-155}$	634	<i>Simocephalus congener</i>	Slovakia	KF484644	Kohout et al. (2014)

研究で得られた配列は, Jiang et al. (2017) で *Diaphanosoma macrophthalma*, Lakatos et al. (2015) で *D. cf. macrophthalma*, Liu et al. (2018) で *D. cf. orghidani*, Prosser et al. (2013) で *Diaphanosoma* sp. として登録されている配列とともにクレードを形成した (Fig. 3). これらの配列は 97 % 以上と高い一致率を示すことから, すべて同種の配列と判断することができる. このうち, Lakatos et al. (2015) では補足資料により日本産標本の形態観察による種同定の根拠が示されており, 最も信頼できる同定結果であると判断できる. なお当論文では, 本種のタイプ産地 (ウズベキスタン) の標本は未検討であることから, 今後の混乱を避けるために種名に cf. を付したと記されている. Liu et al. (2018) の *D. cf. orghidani* については, ① *D. orghidani* として登録されている他の多くの配列が系統的に離れたクレードを形成していること (Fig. 3), ②このうち Alexiou et al. (2021) により登録されている配列では形態学的な精査も行われていることから, 種名の誤りである可能性が危惧される. 以上の検討の結果, 本研究で採集された種は Lakatos et al. (2015) に従い *D. cf. macrophthalma* とするのが適切であると判断できる. *D. macrophthalma* は, 琵琶湖産の標本をもとに田中他 (2004) によって国内から初めて報告され, その後, Lakatos et al. (2015) では北海道から九州まで 26 か所の湖沼で確認されている (この研究では琵琶湖からは確認されていない). 田中・牧田 (2017) の日本産ミジンコ図鑑では, 「琵琶湖での出現が報告された *Diaphanosoma macrophthalma* Korovchinsky & Mirabdullaev については疑問があり, 国内産としては取り上げていない」と記されているが, その詳細については述べられていない.

## 5. 結論

mtCOI 配列による DNA バーコーディングの結果, 岩手医科大学矢巾キャンパスの貯水池から採集された 4 属のミジンコ類の標本は, *Chydorus sphaericus* complex sp. A3, *Diaphanosoma* cf. *macrophthalma*, *Ilyocryptus* cf. *cuneatus*, *Scapholeberis smirnovi* と同定された. 岩手県のミジンコ類は, これまで, 庄司 (1972) により *Alona affinis* (Leydig, 1860), *C. sphaericus*, *Daphnia longispina* (Müller, 1776), *Diaphanosoma barachyurum* (Liévin, 1848) の 4 種が, 盛岡市自然環境総合調査団 (1977) により *Daphnia pulex* Leydig, 1860 が, 国土交通省河川水辺の国勢調査により *Alona costata* Sars, 1862, *Alona guttata* Sars, 1862, *Alona quadrangularis* (Müller, 1776), *Bosmina fatalis* Burckhardt, 1924, *Bosmina longirostris* (Müller, 1785), *Bosmina tanakai* Kotov, Ishida & Taylor, 2009, *Bosminopsis deitersi*

Richard, 1895, *Camptocercus rectirostris* Schödler, 1862, *Ceriodaphnia quadrangula* (Müller, 1785), *Chydorus gibbus* Sars, 1890, *C. sphaericus*, *Coronatella rectangula* (Sars, 1862) (as *Alona rectangula*), *Daphnia galeata* Sars, 1864, *D. longispina*, *D. pulex*, *D. brachyurum*, *Disparalona rostrata* (Koch, 1841), *Holopedium gibberum*, *S. mucronata*, *S. kingi* (as *S. kingii*) の 20 種が記録されている. 本研究で採集された *D. cf. macrophthalma*, *I. cf. cuneatus*, *S. smirnovi* の 3 種は岩手県初記録であると思われる. *C. sphaericus* 種群については, 国内からは山形県と富山県に A3 系統が生息していることが知られていたが (Belyaeva & Taylor, 2009), 今回, 岩手県からも A3 系統の生息が確認された.

## 6. 謝辞

岩手医科大学教養教育センター生物学科の松政正俊氏には, 本研究の実施にあたり様々な面でサポートいただいた. また, 松政正俊氏と同生物学科の菅孔太郎氏には, 本論文に対して有益なコメントをいただいた. 岩手医科大学学務部全学教育企画課の長岡慶介氏, 阿部あゆ氏には, キャンパス内での調査実施に係る各部署との調整や資料の収集にご助力いただいた. 岩手県立博物館の渡辺修二氏には, 標本の収蔵についてご快諾いただいた. この場を借りて心より感謝申し上げます.

## 7. 引用文献

- 阿部博和, 佐々木あゆ, 伊藤えみ (2021) 15 年の時を経て形成されたプランクトンの世界を覗く～岩手医科大学矢巾キャンパスの貯水池に生息するカイアシ類～. 岩手医科大学教養教育研究年報 56: 7–19.
- Alexiou R, Stamou G, Minoudi S, Tourli F, Tsartsianidou V, Triantafyllidis A, Michaloudi E (2021) The genus *Diaphanosoma* (Diplostraca: Sididae) in Greece: morphological and molecular assessment. *Zootaxa* 5082: 572–582.
- Anisimova M, Gil M, Dufayard JF, Dessimoz C, Gascuel O (2011) Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. *Systematic Biology* 60: 685–699.
- Belyaeva M, Taylor DJ (2009) Cryptic species within the *Chydorus sphaericus* species complex (Crustacea: Cladocera) revealed by molecular markers and sexual stage morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 534–546.
- Colbourne JK, Crease TJ, Weider LJ, Hebert PDN,



- Dufresne F, Hobaek A (1998) Phylogenetics and evolution of a circumarctic species complex (Cladocera: *Daphnia pulex*). *Biological Journal of the Linnean Society* 65: 347–365.
- 動物命名法国際審議会 (2000) 国際動物命名規約第4版日本語版. 日本動物分類学会連合, XVIII + 133pp.
- Garibian PG, Neretina AN, Taylor DJ, Kotov AA (2020) Partial revision of the neustonic genus *Scapholeberis* Schoedler, 1858 (Crustacea: Cladocera): decoding of the barcoding results. *PeerJ* 8: e10410.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59: 307–321.
- Jeffery NW, Elías-Gutiérrez M, Adamowicz SJ (2011) Species diversity and phylogeographical affinities of the Branchiopoda (Crustacea) of Churchill, Manitoba, Canada. *PLoS ONE* 6: e18364.
- Jiang X, Xie J, Xu Y, Zhong W, Zhu X, Zhu C (2017) Increasing dominance of small zooplankton with toxic cyanobacteria. *Freshwater Biology* 62: 429–443.
- Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermiin LS (2017) ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* 14: 587–589.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD (2017) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 20: 1160–1166.
- Kohout J, Illyová M, Čiampor F, Čiamporová-Zaťovičová Z (2014) Discrimination between four *Simocephalus* species from Slovakia using a PCR-RFLP technique. *Biologia* 69: 76–79.
- 国土交通省河川水辺の国勢調査. 河川環境データベースシステム東北地方 ([http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/dl\\_82\\_index.html](http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/dl_82_index.html)) (Accessed: Sep. 30, 2021)
- Kotov AA, Elmoor-Loureiro A (2008) Revision of *Ilyocryptus* Sars, 1862 (Cladocera: Ilyocryptidae) of Brazil with description of two new subspecies. *Zootaxa* 1962: 49–64.
- Kotov AA, Karabanov DP, Bekker EI, Neretina TV, Taylor DJ (2016) Phylogeography of the *Chydorus sphaericus* group (Cladocera: Chydoridae) in the Northern Palearctic. *PLoS ONE* 11: e0168711.
- Kotov AA, Štifter P (2006) Cladocera: family Ilyocryptidae (Branchiopoda: Cladocera: Anomopoda). In: Dumont HJ (Ed.), *Guides to the identification of the microinvertebrates of the Continental Waters of the world*, Vol. 22. Kenobi Productions, Ghent & Backhuys Publishers, Leiden, 172 pp.
- Lakatos C, Urabe J, Makino W (2015) Cryptic diversity of Japanese *Diaphanosoma* (Crustacea: Cladocera) revealed by morphological and molecular assessments. *Inland Waters* 5: 253–262.
- Liu P, Xu L, Xu SL, Martínez A, Chen H, Cheng D, Dumont HJ, Han BP, Fontaneto D (2018) Species and hybrids in the genus *Diaphanosoma* Fisher, 1850 (Crustacea: Branchiopoda: Cladocera). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 118: 369–378.
- Liu P, Xu SL, Liao J, Dumont HJ, Han BP (2021) Development of microsatellite markers for *Diaphanosoma dubium* (Crustacea, Cladocera) and application to seasonal population dynamics. *Aquatic Ecology* 55: 1189–1206.
- Makino W, Machida RJ, Okitsu J, Usio N (2020) Underestimated species diversity and hidden habitat preference in *Moina* (Crustacea, Cladocera) revealed by integrative taxonomy. *Hydrobiologia* 847: 857–878.
- Makino W, Maruoka N, Nakagawa M, Takamura N (2017) DNA barcoding of freshwater zooplankton in Lake Kasumigaura, Japan. *Ecological Research* 32: 481–493.
- Makino W, Ohtsuki H, Urabe J (2013) Finding copepod footprints: A protocol for molecular identification of diapausing eggs in lake sediments. *Limnology* 14: 269–282.
- Messing J (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymology* 101: 20–78.
- Minh BQ, Nguyen MA, von Haeseler A (2013) Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular Biology and Evolution* 30: 1188–1195.
- 水野寿彦・高橋永治 (2000) 日本淡水動物プランクトン検索図説. 東海大学出版会, 551 pp.
- 盛岡市自然環境総合調査団 (1977) 盛岡市域の自然環境調査報告書総集編. 盛岡市市民生活部環境保全課, 112 pp.
- Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32: 268–274.
- Petrusek A, Thielsch A, Schwenk K (2012) Mitochondrial sequence variation suggests extensive cryptic diversity within the Western Palearctic *Daphnia longispina* complex. *Limnology and*

- Oceanography 57: 1838–1845.
- Prosser S, Martínez-Arce A, Elías-Gutiérrez M (2013) A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans. *Molecular Ecology Resources* 13: 1151–1155.
- Richlen ML, Barber PH (2005) A technique for the rapid extraction of microalgal DNA from single live and preserved cells. *Molecular Ecology Notes* 5: 688–691.
- 庄司定悦 (1972) 八幡平付近の湖沼の動物プランクトンとくにその甲殻類について 付 湿原のこけ内微小水域の有殻原生生物. 日本自然保護協会調査報告 42 (十和田八幡平国立公園後生掛地区地熱発電所計画に伴う学術調査報告): 280–286.
- 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, 584 pp.
- 田中正明・牧田直子 (2017) 日本産ミジンコ図鑑. 共立出版, 520 pp.
- 田中晋・大高明史・西野麻知子 (2004) 琵琶湖沿岸帯および内湖のミジンコ相. *陸水学雑誌* 65: 167–179.
- Wang J, Ni Y, Hu W, Yin M (2021) Lineage diversity and gene introgression in freshwater cladoceran crustaceans of the *Chydorus sphaericus* species complex. *Limnology and Oceanography* 66: 95–107.
- Yang J, Zhang X, Zhang W, Sun J, Xie Y, Zhang Y, Burton Jr GA, Yu H (2017) Indigenous species barcode database improves the identification of zooplankton. *PLoS ONE* 12: e0185697.
- 八島洋一・三枝聖・松政正俊 (2007) 稲わらトラップ法によるゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) およびアメーバ (*Amoeba proteus*) の採集と小麦粒を加えた KCM 溶液による簡易培養. 岩手医科大学共通教育センター研究年報 42: 13–18.
- Zhang D, Gao F, Jakovlić I, Zou H, Zhang J, Li WX, Wang GT (2020) PhyloSuite: an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies. *Molecular Ecology Resources* 20: 348–355.