

# TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

水産上重要な海産大型甲殻類の人工繁殖に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-06-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 神保, 忠雄 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1566">https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1566</a>

博士学位論文

水産上重要な海産大型甲殻類の人工繁殖に関する研究

平成 29 年度

(2018 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

応用生命科学専攻

神保忠雄



博士学位論文

水産上重要な海産大型甲殻類の人工繁殖に関する研究

平成 29 年度

(2018 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

応用生命科学専攻

神保忠雄

博士学位論文内容要旨  
Abstract

専攻 Major	応用生命科学	氏名 Name	神保 忠雄
論文題目 Title	水産上重要な海産大型甲殻類の人工繁殖に関する研究		

水産上重要種の増養殖を推進していく上で、対象種の人工繁殖技術の開発が不可欠である。人工繁殖技術の開発は、1) 親養成技術の開発と 2) 種苗生産技術の開発に分けられる。本研究は、我が国において水産上重要な海産大型甲殻類であるイセエビ *Panulirus japonicus* およびケガニ *Erimacrus isenbeckii* を対象種とし、人工繁殖に関する研究に取り組んだ成果をとりまとめたものである。

イセエビは、主に日本周辺の太平洋沿岸域に分布する重要な漁業対象種である。本種は増養殖の対象種であり、種苗生産技術の確立を目指して小型水槽を用いた人工飼育技術の開発が進められている。幼生の飼育技術開発を効率よく進めるためには、限られた飼育スペースでふ化幼生を安定的かつ大量に確保する必要があり、そのためには親エビの性比や体サイズ構成を適正に調整することが重要である。しかし、本種の繁殖生態に関する知見は乏しく、他のイセエビ類で知られているような雌雄の体サイズが繁殖行動に与える影響については、これまで詳細に検討されていない。また、イセエビフィロソーマ幼生の人工飼育技術の開発では、幼生が水槽底面へ沈降・蟄集し、個体干渉による体部位の損傷や細菌性疾病が発生して生残率が低下する問題が発生している。したがって、幼生の行動を制御して沈降・蟄集現象を防ぐことは、幼生飼育技術の向上に向けた重要な課題となっている。そこで、一般的な十脚甲殻類の幼生と同様にフィロソーマ幼生も走光性を有することから、それを利用することで水槽内の幼生の行動を制御し、その浮遊性を確保するなど飼育方法を改良できる可能性が考えられる。

ケガニは、日本では主に北海道に分布する重要な漁業対象種である。漁獲量は過去に乱獲によって急激に減少したことから、北海道は、資源回復を図るために許容漁獲量制度等の資源管理を施行してきたが、その漁獲量は未だ低水準で近年は約 0.2 万トンで推移している。そのため、種苗放流等による積極的な資源増殖が望まれ、1970 年代から人工繁殖技術に関する研究が行われてきた。その結果、過去にはメガロパ期で数万尾が生残する事例もみられたが、ゾエア期後半からメガロパにかけて幼生が水槽底に沈降後に大量死する事例が頻発したため、生残率は低く不安定で、種苗生産技術は確立されていない。また、これまでに種苗生産における適正な飼育環境や餌料等の基礎的飼育条件について検討されきたが、生残率の不安定さ等の理由から適正な基礎的飼育条件の解明には至っていない。

このような背景のもとに、本研究では、第 1 章の緒言に続き、第 2 章では親養成技術開発としてイセエビ親エビの体サイズが繁殖生態に与える影響について (第 1, 2 節)、第 3 章では種苗生産技術開発としてイセエビフィロソーマ幼生の成長に伴う走光性の変化 (第 1 節) およびケガニ幼生の飼育環境条件の検討 (第 2~5 節) について取り組み、第 4 章では本研究内容を総括した。

第 2 章第 1 節では、イセエビにおける雌雄の体サイズが配偶行動および産卵に及ぼす影響について調べた。体サイズを雌雄とも大, 中, 小の 3 段階に設定し、全ての組み合わせで雌雄 1 個体ずつのペアを水槽に収容し、赤外線カメラを用いて夜間の配偶行動を観察した。その結果、配偶行動のパターンが確認され、そのパターン頻度、交接時間、交接回数および産卵は、雌雄の体サイズの影響を受けることが明らかになり、小型雄 (甲長 55mm 以下) は繁殖に不利であると考えられた。また、第 2 節では、雄親エビにおける体サイズが繁殖能力に与える影響について調査した。大, 中, 小の雄 1 尾に対して、体サイズを揃えた雌 10 尾と混合飼育し、雌の抱卵率、産卵数および受精率について調査

した。その結果、雌の抱卵率と受精率は、雄の体サイズの影響を受けることが明らかになり、小型の雄では数回の配偶行動によって繁殖能力が低下し、さらに一旦低下した繁殖能力は繁殖期間中には回復しないことが明らかになった。

第3章第1節では、イセエビフィロソーマ幼生について、成長に伴う光量別（7段階、0～310  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）および波長別（16段階、20 nm 間隔で 400～660 nm）の光に対する走光性の変化を調べた。その結果、幼生の走光性は、光量別、波長別および日齢の影響を受けることが明らかになった。幼生は強い光量下では正の走光性を、弱い光量下では負の走光性を示した。また、正の走光性を惹起する波長は当初は 400～620nm で広がったが、中期以降には 500 nm 未満の短波長側に変化し、特に VI 期幼生は 400～620nm の広い波長で負の走光性を示すのが特徴的であった。

第3章第2～5節では、ケガニ幼生の飼育環境条件の検討を行った。第2節では、アルテミアの給餌密度がケガニ幼生の生残、各齢期へ脱皮するまでの所要日数、成長および摂餌量に及ぼす影響を調べた結果、2～4 個体/mL で飼育成績が高く、適正給餌密度は 2 個体/mL 以上と結論付けた。第3節では、飼育水温の影響を調べた結果、生残は 6～15°C で高く、成長は 15°C まで水温の上昇に伴い速くなったが、15°C 以上でバラツキが大きかったことから、適正飼育水温は 9～12°C と結論付けた。第4節では、飼育水の塩分の影響を調べた結果、生残率は 30～35 psu で高く、成長は 25 psu で最も速かったがバラツキが大きかったことから、適正塩分は 30～35 psu と結論付けた。第5節では、n-3 高度不飽和脂肪酸の影響について調査するために、各種の栄養強化剤（無強化、ナンノクロロプシス、オレイン酸、高・低濃度の EPA および DHA）で強化したアルテミアを給餌し、その影響を調べた。その結果、生残率はいずれも高かったが、成長速度は高濃度 EPA で促進されたことから、アルテミアの栄養強化は高濃度 EPA が有効であることが明らかになった。

第4章では、本研究の総括として、各章の節ごとにそれぞれ実施した研究について要約するとともに、今後の課題等について言及した。イセエビ親エビの養成技術開発では、効率的にふ化幼生を確保するための集団での親エビの養成技術の開発について、また、種苗生産技術開発では、イセエビフィロソーマ幼生の走光性を利用した飼育技術の開発、およびケガニ幼生の適正な飼育環境条件の種苗生産技術開発への利用について検討する必要がある。

## 公表論文および学会発表

### 公表論文

- 1) Jinbo, T., Sugiyama, A., Murakami, K. & Hamasaki, K. 2017. Effects of body size on mating behavior and spawning success of Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824) (Decapoda: Palinuridae): implications for broodstock management techniques. *Journal of Crustacean Biology*, **37**: 90–98. (第2章第1節)
- 2) Jinbo, T., Sugiyama, A., Murakami, K. & Hamasaki, K. 2017. Reproductive potential of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824) (Decapoda: Palinuridae) male: implications for broodstock management techniques. *Journal of Crustacean Biology*, **37**: 458–464. (第2章第2節)
- 3) 神保忠雄, 水本 泰, 村上恵祐, 浜崎活幸. 2018. イセエビフィロソーマ幼生の成長に伴う走光性の変化. 日本水産学会誌, 印刷中. (第3章第1節)
- 4) 神保 忠雄・浜崎活幸・芦立 昌一. 2005. ケガニ幼生の生残・発育および摂餌に及ぼすアルテミア給餌密度の影響, 日本水産学会誌, **71**: 563–570. (第3章第2節)
- 5) 神保 忠雄・浜崎活幸・芦立 昌一. 2007. ケガニ幼生の生残, 発育および摂餌に及ぼす水温の影響. 日本水産学会誌, **73**: 1081–1089. (第3章第3節)
- 6) 神保 忠雄・浜崎活幸・芦立 昌一. 2012. ケガニ幼生の生残, 発育および摂餌に及ぼす塩分の影響. 日本水産学会誌, **78**: 405–412. (第3章第4節)

- 7) Jinbo, T., Dan, S., Nakaya, M., Ashidate, M. & Hamasaki, K. 2013. Effects of n-3 highly unsaturated fatty acid content in *Artemia* on survival and development of laboratory-reared horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* larvae. *Fisheries Science*, **79**: 459–467. (第3章第5節)

## 学会発表

- 1) 水元 泰・神保忠雄・那波洋子・下川あゆみ・浜崎活幸・村上恵祐. イセエビフィロソーマの成長に伴う比重および走地性の変化. 第45回日本甲殻類学会大会ポスター発表, 2007年10月13日, 東京海洋大学.
- 2) 神保忠雄・水元 泰・下川あゆみ・那波洋子・浜崎活幸・村上恵祐. イセエビフィロソーマの成長に伴う走光性の変化. 第45回日本甲殻類学会大会口頭発表, 2007年10月14日, 東京海洋大学.
- 3) 杉山 輝・神保忠雄・村上恵祐・浜崎活幸. イセエビの配偶行動. 第46回日本甲殻類学会大会口頭発表, 2008年11月15日, 鹿児島大学.
- 4) 神保忠雄・杉山 輝・村上恵祐・浜崎活幸. イセエビ雄の繁殖能力. 第53回日本甲殻類学会大会口頭発表, 2015年10月10日, 東京海洋大学.

## 目 次

第 1 章	緒言	1
第 2 章	親養成技術開発のための基礎的研究：イセエビの繁殖生態	
第 1 節	イセエビにおける体サイズが配偶行動および産卵に及ぼす影響	18
第 2 節	イセエビの雄親エビにおける繁殖能力の評価	52
第 3 章	種苗生産技術開発のための基礎的研究：イセエビフィロソーマ幼生の走光性およびケガニ幼生の適正な飼育環境条件	
第 1 節	イセエビフィロソーマ幼生の成長に伴う走光性の変化	79
第 2 節	ケガニ幼生の生残，発育および摂餌に及ぼすアルテミア給餌密度の影響	101
第 3 節	ケガニ幼生の生残，発育および摂餌に及ぼす水温の影響	121
第 4 節	ケガニ幼生の生残，発育および摂餌に及ぼす塩分の影響	144
第 5 節	ケガニ幼生の生残および発育に及ぼす n-3 高度不飽和脂肪酸の影響	163
第 4 章	総括	187
	謝辞	196

# 第 1 章

## 緒 言

## 緒 言

我が国の栽培漁業の基本的な方針となる「水産動物の種苗の生産及び放流並びに水産動物の育成に関する基本方針」（以下「基本方針」という）は、沿岸漁場整備開発法（昭和 49 年法律第 49 号）に基づき、農林水産大臣により定められており、現在は平成 27 年度から 33 年度までの第 7 次基本方針が策定されている（農林水産省，2015）。栽培漁業を推進させるにあたり、水産上重要な対象種において、人工繁殖技術の開発は積極的な増養殖を実施するための基礎となる有効かつ必要な手段の一つである。人工繁殖技術開発を実施する上で、その開発項目は大きく二つに分類することができ、一方は、親を飼育管理し、採取した良質卵から安定的かつ大量に良質のふ化幼生を得るための親養成技術の開発であり、他方は、種苗の生残，成長，ならびに種苗の質に関わる健苗性と種苗性を改善しつつ、種苗を安定的に量産するための種苗生産技術の開発である。本論文では、我が国の水産上重要な大型甲殻類であるイセエビ *Panulirus japonicus* とケガニ *Erimacrus isenbeckii* を対象に人工繁殖技術の開発に取り組んだ。

イセエビは、十脚目イセエビ科イセエビ属に属し、生息域は、我が国では茨城県以西の太平洋側から九州の北・西部，周辺諸国では韓国南部，濟州島，台湾までであり，主に岩礁性の浅海域に生息している（三宅，1983a；Sekiguchi, 1997）。味は美味で，その姿形により古くから縁起物や結婚その他の祝宴の料理に重宝され，水産上重要な大型甲殻類を代表するものの一つである（Harada, 1957；Nonaka *et al.*, 2000）。一般に，イセエビ類の幼生はフィロソーマと呼ばれ（Anger, 2001），透明で扁平な体と長い付属肢を持ち，沿岸域でふ化した後，海流に乗り脱皮と成長を繰り返しながら長期間の浮遊生活を経て，やがてプエルルス幼生に変態し，再び沿岸域で遊泳から着底生活へと移行する（Phillips & Sastry,

1980 ; Booth & Philips, 1994 ; Phillips, *et al.*, 2006 ; Anger, 2001)。イセエビの生活史においても同様な初期生活様式を示し，初夏から夏にかけて沿岸域でふ化したフィロゾーマ幼生は，浮遊生活を送りながら初期は黒潮内側の沿岸域で過ごし，中期以降は黒潮本流を超えた沖合域へと移動し，複数の中規模渦で形成される循環域で脱皮を繰り返して成長した後，再び黒潮本流へ再突入してプエルルス幼生へと変態し，沿岸域へ遊泳して着底生活へ移行すると考えられている (Sekiguchi, 1997 ; Yoshimura *et al.*, 1999, 2009 ; 吉村, 2001 ; Sekiguchi & Inoue, 2002 ; 吉村ら, 2010 ; Miyake *et al.*, 2015)。フィロゾーマ幼生は，形態の発育段階によって I~X 期のステージに分けられ (松田, 2006)，その期間はおよそ 1 年，また，プエルルス幼生の期間はおよそ 2 週間であるとされている (Kittaka & Kimura, 1989 ; Yamakawa *et al.*, 1989 ; Sekine *et al.*, 2000 ; Matsuda & Takenouchi, 2006 ; 松田, 2006 ; 村上, 2011)。プエルルスの着底後から漁獲制限サイズ (例 : 千葉県海面漁業調整規則では全長 13 cm 以下，三重県漁業調整規則では頭胸甲長 4.2 cm 以下の採捕禁止) 以上に成長するまでの期間は 2 年以上とされる (山川, 1997 ; Noanaka *et al.*, 2000)。

イセエビは，主にエビ刺し網によって漁獲され (野中, 1988)，近年の漁獲量は 1100~1500 トン程度で推移して比較的安定しているが，海域ごとの漁獲量には変動が見られ，九州では減少傾向が続いているが，逆に関東では増加傾向を示している (吉村, 2001)。単価はおよそ 5,000 円 / kg，漁獲高は 50 億円程度である (農林水産省，漁業・養殖業生産統計)。また，イセエビは沿岸漁業での重要な対象種の一つであることから，地域ごとに積極的な資源管理が進められており，夏期の産卵期にあたる期間の禁漁，抱卵雌や体長制限等の漁獲規制の施行，体長制限以下の小型個体の放流などが実施されている (山川, 1997 ; Noanaka *et al.*, 2000)。その資源管理に加えて，古くから増養殖を目的とした研究も行われており，その始まりは，服部・大石 (1899) が水産講習所でフィロ

ソーマの飼育試験を行ったこととされる (Noanaka *et al.*, 2000)。その後、野中ら (1958) がアルテミアを餌料として初めてフィロソーマ幼生を脱皮させることに成功し、井上 (1981) は初めて最終齢の X 期幼生まで飼育することに成功した。続く 1989 年には、Yamakawa *et al.* (1989) および Kittaka & Kimura (1989) が、人工飼育で初めてふ化から稚エビまでの飼育に成功した。他の研究機関においてもイセエビの飼育研究に取り組んでおり、それらの成果の一部は「イセエビに関する国内文献目録抄」(日本栽培漁業協会, 1990) および「イセエビ種苗生産技術開発」(日本栽培漁業協会, 1993) にて公表されている。社団法人日本栽培漁業協会南伊豆事業場(現国立研究開発法人水産研究・教育機構増養殖研究所南伊豆庁舎)では、1988 年からイセエビの種苗生産技術開発を開始し、1993 年には数十尾程度の稚エビを生産できる技術を開発した (Sekine *et al.*, 2000)。現在では、飼育方法を改善した結果、ふ化幼生から稚エビまでの生残率が 20%以上を示す事例も得られている (村上, 2011)。しかしながら、フィロソーマ幼生がプエルルスに変態するまでの期間はおよそ 1 年と長く、さらに適正な餌料の開発および飼育環境の解明など解決すべき課題が多く残されており、現在までに量産化には成功していないことから (Murakami *et al.*, 2007 ; 村上, 2011)、その種苗生産技術の確立が望まれている。

一方、種苗生産技術開発を実施する上で、飼育試験に供するふ化幼生を安定的かつ大量に確保することが必要となるが、そのためには、種苗生産技術開発と並行して親エビの養成技術開発も実施すべき重要な課題である。イセエビの繁殖生態に関する知見は、親エビの養成技術開発の基礎となるが、これまでに永井 (1956)、出口 (1988) および Deguchi *et al.* (1991) の報告等がある。それらによれば、イセエビの配偶行動は夜間に行われ、最初に雄が雌を 0.5~3 時間追尾して捕え、正面から互いに向かい合いながら第 1~3 歩脚をからませた後、尾扇を曲げ、第 4~5 歩脚を支えにして、徐々に直立姿勢となる。その後、雄は

雌の腹側へ潜り込みながら歩脚で雌を抱えつつ後方に倒れ、互いの胸部腹側を合わせるが、この時に雄から雌への精包の授受が行われていると考えられている。その後、雌雄は離れて配偶行動は終了するが、雄が雌を捉えてから雌雄が離れるまでの時間は20~30秒とされる。やがて、雌は、水槽壁面等で直立姿勢をとりつつ腹部で空所を作り、そこへ産卵して抱卵する。また、出口(1988)は、雄よりも雌の方が大きい組み合わせでは、交接に成功することがほとんどなかったことを報告しているが、これは雌雄の体サイズが、配偶行動に影響を与えていることを示唆している。他のイセエビ類においても、雌雄の体サイズが繁殖生態に影響を与えることが知られており、例えば、ミナミイセエビ *Jasusu edwardsii* では小型の雄ほど産卵した雌の個体数や総抱卵量が少なく、カリブイセエビ *Panurilus argus* では大型の雌ほど授受した精包の表面積は大きく、さらに精包の表面積が大きいほど抱卵量も多いことが報告されている(MacDiarmid & Butler, 1999)。現在、研究現場でのふ化幼生を得るための親エビの基本的な養成方法は、繁殖期の前に生理的成熟サイズに達していると考えられる個体を確保し、雄1:雌2の割合で複数を水槽に同居させて飼育管理する方法としている。しかし、イセエビでは、これまでに雌雄の体サイズが繁殖生態に及ぼす影響について詳細に調べられた事例はなく、水槽内での実際の配偶行動については不明であり、例えば水槽内の大型の雄1尾のみしか繁殖に関与していない等の、体サイズに由来する影響が発生している可能性がある。そこで、本研究では、親エビの養成技術開発の改善に向けた基礎的知見を得ることを目的とし、雌雄の体サイズと繁殖生態の関連を調べた。

また、イセエビの種苗生産技術開発では、主に小型水槽を使用して飼育が行われてきた。このような人工飼育下で発生するフィロソーマ幼生の死亡原因の一つとして、フィロソーマ幼生が沈降して水槽底面に蝟集し、個体干渉による損傷と水槽壁面の汚れが原因と思われる細菌感染症の発生があり、解決すべき

重要な問題となっている (Murakami *et al.*, 2007, 村上, 2011)。光は甲殻類幼生の行動に大きな影響を与え (Forward, 1988 ; Anger, 2001), イセエビ類のフィロソーマ幼生も走光性を有することが知られている (Ritz, 1972 ; Matsuda *et al.*, 2006 ; Matsuda & Takenouchi, 2006 ; 税所, 1966)。したがって, フィロソーマ幼生の行動を制御して沈降現象を防御できる可能性が考えられる。そこで, イセエビフィロソーマ幼生の行動制御に基づいた飼育方法を改良するため, ふ化から変態直前までの成長に伴う走光性の変化を調査した。

ケガニは, 十脚目クリガニ科に属し, アラスカ, ベーリング海から, 南サハリンを経て, 日本では北海道沿岸域から太平洋側は宮城, 福島まで, 日本海側は福井, 鳥取, 島根から韓国沿岸まで広く分布している冷水性の大型甲殻類である (酒井, 1976 ; 三宅, 1983b)。本種は, 我が国では主に北海道沿岸域, 特にオホーツク海域と東部太平洋海域に多く分布し, 主に水深 150 m 以浅, 水温 15°C 以下で, 底質が砂あるいは砂泥の場所に生息し, 最大で雄が甲長 15 cm, 雌が甲長 12 cm 達する (三原, 2003)。ケガニの雌は, 脱皮直後に交尾を行ってから 1 年近くを経て産卵・抱卵し, さらにふ化まで 13~16 カ月を要するため, 産卵周期が 2~3 年と長期間を要する (Abe, 1992 ; 佐々木, 1999 ; 三原, 2003)。幼生は 3~5 月にかけてプリゾエアとしてふ化し, その後 5 期のゾエア, 1 期のメガロパ期と浮遊生活を送りながら脱皮・成長し, 6~7 月に第 1 齢期稚ガニとなり海底での底生生活へ移行する (倉田, 1963 ; Abe, 1992 ; Sasaki & Mihara, 1993 ; 三原, 2003)。第 1 齢稚ガニはその後 2 年間で第 9 齢期まで成長するが, その後の脱皮周期は, 雄では 1~2 年, 雌では約 3 年と考えられており, また, 漁獲対象である雄 (小型の雄および全ての雌は採捕禁止) が漁獲制限サイズ (甲長 8 cm) 以上に達するまで 7 年以上を要するとされる (佐々木・栗原, 1999 ; 三原, 2003)。

ケガニの主な分布域である北海道では, 大変美味であることから水揚げ単価

が2~3,000円/kg前後と高く重要な漁業対象種となっているが、漁獲量は1955年に過去最高の約2.7万トンのピークに達した後、乱獲によって急激に減少し、近年は10分の1程度の約0.2万トンで推移している（Abe, 1992；三原, 2003；北海道水産林務部, 2016）。資源回復を図るために、これまでに様々な対策が講じられてきており、1957年に全ての雌と甲長7cm満の雄の採捕禁止、1964年に雄の漁獲制限甲長を8cmに引き上げ、および1968年に許容漁獲量制度をケガニかご漁業に導入、等が施行されてきた。また、海域ごとに操業漁船数やかご数の上限、操業期間などを設定して資源管理が施行されてきたものの、その漁獲量は未だ低水準で推移している（池原・小川, 1997；阿部, 1999；三原, 2003；三原ら, 2005）。

このような背景から、種苗放流による資源増殖が望まれ、1970年代から北海道立の釧路水産試験場（現、地方独立行政法人北海道立総合研究機構水産研究本部釧路水産試験場）（尾身, 1971；尾身・水島, 1972）および栽培漁業総合センター（現、地方独立行政法人北海道立総合研究機構水産研究本部栽培水産試験場）（尾身・山下, 1974, 1976；水島・山下, 1986, 1987）において、小型容器を用いてケガニ幼生の適正飼育水温（尾身・水島, 1972；尾身・山下, 1974；水島・山下, 1986）や飼育塩分（尾身・山下, 1976）、餌料系列（尾身・山下, 1974；水島・山下, 1986, 1987）等の解明を目指した人工繁殖研究が実施されてきた。1980年代からは、社団法人日本栽培漁業協会（現、国立研究開発法人水産教育・研究機構）の宮古事業場（現、国立研究開発法人水産教育・研究機構東北区水産研究所宮古庁舎）（宮古事業場, 1982）および厚岸事業場（現、国立研究開発法人水産教育・研究機構北海道区水産研究所厚岸庁舎）（宮古事業場・厚岸事業場, 1983）においても、ケガニの人工繁殖に関する研究が実施されてきた。宮古事業場では1979年より（宮古事業場, 1982）、厚岸事業場では1981年より（宮古事業場・厚岸事業場, 1983）親ガニの養成技術開発および種

苗生産技術開発が開始された。宮古事業場では、1981年には大型水槽（実水量30 kL）で種苗生産試験を実施し、1.4万尾のメガロパ（生残率9.9%）を得ることに成功し（宮古事業場、1982）、厚岸事業場においても、1989年に大型水槽（実水量20 kL）で種苗生産試験を実施し、9.5万尾のメガロパ（生残率43.2%）を得ることに成功した（成生ら、1991）。その後も引き続き種苗生産技術開発を実施したが、特にゾエア期後半からメガロパにかけて、幼生が沈降し水槽底に蟻集後大量死する現象が頻繁に発生することから、メガロパでの生残率は低く不安定で、稚ガニを安定して大量生産することが困難であった（中川・熊谷、1996、1997）。そのため、大量死の防除を目的として、配合飼料（成生ら、1991）、疾病対策（中川・熊谷、1996、1997）、幼生の水槽底面への沈降・蟻集の防止を目的とした通気および換水方法（中川・熊谷、1997）等を検討したが、安定して生残率を向上させ得るには至らず、種苗生産技術が確立したとは言い難い。これまでに、種苗生産における適正な飼育環境や餌料等の基礎的飼育条件に関して、複数の公的機関等で検討されていたものの、生残率の不安定さ等の理由から適正な基礎的飼育条件の解明には至っていない。そこで本研究では、ケガニ幼生の適正な飼育条件、すなわち給餌密度、飼育水温、飼育塩分、並びに餌料栄養価を明らかにする飼育実験に取り組んだ。

本論文は4つの章から成り立っており、第1章の緒言に続く第2章では、イセエビ親養成技術開発の基礎として、親エビの繁殖生態に関する行動実験を実施した。第3章では、イセエビとケガニ種苗生産技術開発のための基礎的な知見を得ることを目的に、第1節においてはイセエビフィロソーマ幼生の走光性と、第2章第2～5節においては、ケガニ幼生における適正な飼育環境条件について検討した。第4章ではこれらの研究結果を取りまとめ、今後の展開等について言及した。具体的な取り組み内容は以下のとおりである。

第2章第1節では、イセエビにおける雌雄の体サイズが配偶行動および産卵

に及ぼす影響について明らかにするために、体サイズを雌雄とも大、中、小に設定し、全ての組み合わせで雌雄1個体ずつのペアの配偶行動を観察し、配偶行動のパターンの確認と雌雄の体サイズの影響について検討した。第2節では、雄親エビにおける体サイズが繁殖能力に与える影響について明らかにするために、大、中、小の各体サイズの雄1尾に対して、体サイズを揃えた雌10尾と混合飼育し、雌の抱卵率、産卵数および受精率について調査した。その結果、雄の体サイズが繁殖行動と繁殖能力に大きな影響を及ぼし、繁殖における大型雄の優位性が明らかとなった。第3章第1節では、イセエビフィロゾーマ幼生の成長に伴う走光性の変化について明らかにすることを目的に、幼生の成長に伴う光量別および波長別の光に対する走光性の変化を調べ、幼生の走光性は、光量別、波長別および日齢の影響を受けることを明らかにした。第2節では、アルテミア給餌密度がケガニ幼生の生残、各齢期へ脱皮するまでの所要日数、成長および摂餌量に及ぼす影響を調べ、適正な給餌密度を明らかにした。第3節と第4節では、第2節と同様にそれぞれケガニ幼生の生残、発育および摂餌に及ぼす水温と塩分の影響について検討した結果、適正な飼育水温と塩分を明らかにした。第5節では、ケガニ幼生の生残および発育に及ぼすn-3高度不飽和脂肪酸の影響について検討するために、各種の栄養強化剤で強化したアルテミアを給餌し、その影響について調べた結果、高濃度エイコサペンタエン酸で栄養強化したアルテミアでケガニ幼生の成長が促進されることを明らかにした。最終の第4章では、総括として、本研究で得られた研究結果を取り纏めるとともに、得られた成果に基づき、イセエビ親エビの養成技術開発、およびイセエビおよびケガニの種苗生産技術開発への応用と今後の展開等について言及した。なお、第2章および第3章の内容は、既に下記学術論文として公表済みである。

- 1) Jinbo, T., Sugiyama, A., Murakami, K. & Hamasaki, K. 2017. Effects of body size on mating behavior and spawning success of Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824) (Decapoda: Palinuridae): implications for broodstock management techniques. *Journal of Crustacean Biology*, **37**: 90–98. (第2章第1節)
- 2) Jinbo, T., Sugiyama, A., Murakami, K. & Hamasaki, K. 2017. Reproductive potential of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824) (Decapoda: Palinuridae) male: implications for broodstock management techniques. *Journal of Crustacean Biology*, **37**: 458–464. (第2章第2節)
- 3) 神保忠雄, 水本 泰, 村上恵祐, 浜崎活幸. 2018. イセエビフィロゾーマ幼生の成長に伴う走光性の変化. 日本水産学会誌, 印刷中. (第3章第1節)
- 4) 神保 忠雄・浜崎活幸・芦立 昌一. 2005. ケガニ幼生の生残・発育および摂餌に及ぼすアルテミア給餌密度の影響, 日本水産学会誌, **71**: 563–570. (第3章第2節)
- 5) 神保 忠雄・浜崎活幸・芦立 昌一. 2007. ケガニ幼生の生残, 発育および摂餌に及ぼす水温の影響. 日本水産学会誌, **73**: 1081–1089. (第3章第3節)
- 6) 神保 忠雄・浜崎活幸・芦立 昌一. 2012. ケガニ幼生の生残, 発育および摂餌に及ぼす塩分の影響. 日本水産学会誌, **78**: 405–412. (第3章第4節)
- 7) Jinbo, T., Dan, S., Nakaya, M., Ashidate, M. & Hamasaki, K. 2013. Effects of n-3 highly unsaturated fatty acid content in *Artemia* on survival and development of laboratory-reared horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* larvae. *Fisheries Science*, **79**: 459–467. (第3章第5節)

## 文 献

- Abe, K. 1992. Important crab resources inhabiting Hokkaido waters. *Marine Behaviour and Physiology*, **21**: 153–183.
- 阿部晃治. 1999. ケガニの資源管理の問題. 北海道立水産試験場研究報告, **55**: 141–153.
- Anger, K. 2001. The Biology of Decapod Crustacean Larvae. *Crustacean Issues*, 14. AA Balkema, Rotterdam.
- Booth, J. D. & Philips, B. F. 1994. Early life history of spiny lobster. *Crustaceana*, **66**: 271–294.
- 出口吉昭. 1988. II. 交尾・産卵, 5. イセエビ. エビ・カニ類の種苗生産 (平野礼次郎編). 水産学シリーズ **71**, pp. 64–75. 恒星社厚生閣, 東京.
- Deguchi, Y., Sugita, H. & Kanemoto, F. 1991. Spawning control of the Japanese spiny lobster. *Memoirs of the Queensland Museum*, **31**: 449.
- Forward Jr., R. B. 1988. Diel vertical migration: zooplankton photobiology and behaviour. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, **26**: 361–393.
- 服部他助, 大石芳三. 1899. 龍蝦孵化試験第一回報告. 水産講習所試験報告, **1**: 76–131.
- Harada, E. 1957. Ecological observations on the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold), in its larval and adult life. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory*, **6**: 99–122.
- 北海道水産林務部. 2016. 2 魚種別生産高. 平成 27 年度北海道水産現勢, pp. 3. 北海道.
- 池原宏二, 小川泰樹. 1997. 全国の地方設定魚種の漁獲量, pp. 153–154. 水産

- 庁資源生産推進部整備課，東京。
- 井上正昭．1981．イセエビのフィロソーマ幼生の飼育に関する基礎的研究．神奈川県水産試験場論文集，**1**：1-91．
- Kittaka, J. & Kimura, K. 1989. Culture of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* from egg to juvenile stage. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**: 963-970.
- 倉田 博．1963．北海道産十脚目甲殻類の幼生期 1．クリガニ科 3 種．北海道立水産試験場研究報告，**27**：13-24．
- MacDiarmid, A. B. & Butler IV, M. J. 1999. Sperm economy and limitation in spiny lobsters. *Behavioral ecology and Sociobiology*, **46**: 14-24.
- 松田浩一．2006．イセエビ属 (*Panulirus*) 幼生の生物特性と飼育に関する研究．三重県科学技術振興センター水産研究部研究報告，**14**：1-116．
- Matsuda, H. & Takenouchi, H. 2006. Larval molting and growth of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* under laboratory conditions. *Fisheries Science*, **72**: 767-773.
- Matsuda, H., Takenouchi, H. & Goldstein, J. S. 2006. The Complete Larval Development of the Pronghorn Spiny Lobster *Panulirus penicillatus* (Decapoda: Palinuridae) in Culture. *Journal of Crustacean Biology*, **26**: 579-600.
- 三原栄次．2003．ケガニ．「新北のさかなたち」(上田吉幸，前田圭司，嶋田 宏，鷹見達也編)，pp. 380-385．北海道新聞社，北海道．
- 三原栄次，山口宏史，上田祐司，松石 隆．2005．北海道噴火湾におけるケガニの甲長に基づく資源評価と資源管理．日本水産学会誌，**71**：935-941．
- 水島敏博，山下幸悦．1986．I 甲殻類種苗培養技術開発試験 2．ケガニ．北海道立栽培漁業センター事業報告書昭和 60 年度，pp. 5-11．北海道立栽培漁業総合センター，北海道．
- 水島敏博，山下幸悦．1987．I 甲殻類種苗培養技術開発試験 2．ケガニ．北海

- 道立栽培漁業センター事業報告書昭和 61 年度, , pp. 3–9. 北海道立栽培漁業総合センター, 北海道.
- 三宅貞祥. 1983a. 3. イセエビ. 原色日本大型甲殻類図鑑 I, pp. 83. 保育社, 大阪.
- 三宅貞祥. 1983b. 3. ケガニ. 原色日本大型甲殻類図鑑 II, pp. 72. 保育社, 大阪.
- Miyake, Y., Kimura, S., Itoh, S., Chow, S., Murakami, K., Katayama, S., Takeshige, A. & Nakata, H. 2015. Roles of vertical behavior in the open-ocean migration of teleplanic larvae: a modeling approach to the larval transport of Japanese spiny lobster. *Marine ecology progress series*, **539**: 93–109.
- 宮古事業場. 1982. III 種苗生産技術開発の概要 3. 種苗生産技術の開発 G. その他の甲殻類 G-2 ケガニ. 日本栽培漁業協会事業年報昭和 56 年度, pp. 169–175 日本栽培漁業協会, 東京.
- 宮古事業場, 厚岸事業場. 1983. III 種苗生産技術開発の概要 3. 種苗生産技術の開発 H 新しい栽培種として期待される甲殻 H-1 ケガニ (2) 厚岸事業場. 日本栽培漁業協会事業年報昭和 57 年度, pp. 232–242. 日本栽培漁業協会, 東京.
- Murakami, K., Jinbo, T. & Hamasaki, K. 2007. Aspects of the technology of phyllosoma rearing and metamorphosis from phyllosoma to puerulus in the Japanese spiny lobster reared in the laboratory. *Bulletin of Fisheries Research Agency*, **20**: 59–67.
- 村上恵佑. 2011. イセエビの成長特性と飼育技術の向上に関する研究. 博士学位論文. 東京海洋大学.
- 永井 博. 1956. イセエビの交尾・産卵について. 水産増殖, **4**: 9–11.
- 中川雅弘, 熊谷厚志. 1996. III 種苗生産技術開発の概要 III-3 種苗生産技術の

- 開発 L 新しい栽培種として期待される甲殻類 L-5 ケガニ. 日本栽培漁業協会事業年報平成6年度, pp. 192-197. 日本栽培漁業協会, 東京.
- 中川雅弘, 熊谷厚志. 1997. III 種苗生産技術開発の概要 III-3 種苗生産技術の開発 L 新しい栽培種として期待される甲殻類 L-5 ケガニ. 日本栽培漁業協会事業年報平成7年度, pp. 209-214, 日本栽培漁業協会, 東京.
- 成生正彦, 鶴巻克己, 熊谷厚志. 1991. III 種苗生産技術開発の概要 III-3 種苗生産技術の開発 L 新しい栽培種として期待される甲殻類 L-8 ケガニ. 日本栽培漁業協会事業年報平成元年度, pp. 190-197. 日本栽培漁業協会, 東京.
- 日本栽培漁業協会. 1990. イセエビに関する国内文献目録抄. 協会研究資料 No.43, 日本栽培漁業協会, 東京.
- 日本栽培漁業協会. 1993. イセエビ種苗生産技術開発. 協会研究資料 No.55, 日本栽培漁業協会, 東京.
- 野中 忠. 1988. イセエビの漁獲量. 水産増殖, **36**: 213-220.
- 野中 忠, 大島泰雄, 平野礼次郎. 1958. イセエビのフィロゾーマの飼育とその脱皮について (予報). 水産増殖, **5**: 13-15.
- Nonaka, M., Fushimi, H. & Yamakawa, T. 2000. The spiny lobster fishery in Japan and restocking. In: *Spiny lobsters: fisheries and culture, Edn. 2.* (B.F. Phillips & J. Kittaka, eds.), pp. 221-242. Fishing News Books, Oxford.
- 農林水産省. 2015. 水産動物の種苗の生産及び放流並びに水産動物の育成に関する基本方針. [<http://www.jfa.maff.go.jp/j/press/gyosei/pdf/150331-01.pdf>]
- 尾身東美. 1971. IV 漁業開発振興調査, 1 カニ類養殖餌料開発試験, A ケガニ天然幼生の飼育. 北海道立釧路水産試験場事業報告書昭和45年度, pp. 131-135. 北海道立釧路水産試験場, 北海道.
- 尾身東美, 水島敏博. 1972. 2 かに類養殖飼料開発試験 1 水温. 北海道立釧路水産試験場報告書昭和46年度, pp. 178-181. 北海道立釧路水産試験場, 北

海道.

尾身東美, 山下幸悦. 1974. III 甲殻類種苗培養技術開発試験 2 ケガニ. 北海道立栽培漁業総合センター事業報告書昭和 48 年度, pp. 60–68. 北海道立栽培漁業総合センター, 北海道.

尾身東美, 山下幸悦. 1976. III 甲殻類種苗培養技術開発試験 3 ケガニ. 北海道立栽培漁業総合センター事業報告書昭和 50 年度, pp. 64–78. 北海道立栽培漁業総合センター, 北海道.

Phillips, B. F., Booth, J. D., Cobb, J. S., Jeffs, A. G. & MacWilliam, P. 2006. Larval and Postlarval Ecology. In: *Lobsters: Biology, Management, Aquaculture and Fisheries*. (B.F. Phillips, ed.), pp. 231–262. Blackwell, Oxford.

Phillips, B. F. & Sastry, N. A. 1980. Larval ecology. In: *The Biology and Management of Lobsters. Vo. II*. (J. S. Cobb & B.F. Phillips, eds.), pp. 11–57. Academic Press, New York.

Ritz, D. A. 1972. Behavioural response to light of the newly hatched phyllosoma larvae of *Panulirus longipes cygnus george* (Crustacea : Decapoda : Palinuridae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **10**: 105-114.

税所敏郎. 1966. フィロソーマ幼生に関する海洋生物学的研究. 鹿児島大学水産学部紀要, **15** : 177–239.

酒井 恒. 1976. ケガニ. 日本産蟹類, pp. 190–191. 講談社, 東京.

佐々木潤. 1999. 道東太平洋におけるケガニの生殖周期. 北海道立水産試験場研究報告, **55** : 1–27.

Sasaki, J. & Mihara, Y. 1993. Early Larval Stages of the Hair Crab *Erimacrus Isenbeckii* (Brandt) (Brachyura: Atelecyclidae), With Special Reference to Its Hatching Process. *Journal of Crustacean Biology*, **13**: 511–522.

佐々木潤, 栗原康裕. 1999. ケガニの齡期判別法と成長. 北海道立水産試験場

- 研究報告, **55** : 29–67.
- Sekiguchi, H. 1997. Larval recruitment processes of Japanese spiny lobsters: a hypothesis. *Bulletin of Marine Science*, **61**: 43–55.
- Sekiguchi, H & Inoue, N. 2002. Recent advances in larval recruitment processes of Scyllarid and Palinurid lobsters in Japanese waters. *Journal of Oceanography*, **58**: 747–757.
- Sekine, S., Shima, Y., Fushimi, F. & Nonaka, M. 2000. Larval period and molting in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* under laboratory conditions. *Fisheries Science*, **66**: 19–24.
- 山川 卓. 1997. イセエビの資源評価と漁業管理. 三重県水産技術センター研究報告, **7** : 1–96.
- Yamakawa, T., Nishimura, M., Matsuda, H., Tsujigadou, A. & Kamiya, N. 1989. Complete larval rearing of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**: 745.
- 吉村 拓. 2001. イセエビ *Panulirus japonicus* の水産生物学的研究. 総特集「甲殻類」, 月刊海洋, 号外 **26** : 230–236.
- 吉村 拓, 森永健司, 西内 耕, 伊藤 篤, 増田佳子. 2010. 天然フィロソーマの発育過程及び生息環境条件の解明. 農林水産省農林水産技術会議事務局プロジェクト研究成果シリーズ 480「ウナギ及びイセエビの種苗生産技術の開発」, pp. 47–55. 東京.
- Yoshimura, T., Morinaga, K., Oshimo, S., Konishi, Y. & Goto, T. 2009. Distribution and dispersal of the early larval stages of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* in the East China Sea. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **43**: 591–604.
- Yoshimura, T., Yamakawa, H. & Kozasa, E. 1999. Distribution of final stage

phyllosoma larvae and free-swimming pueruli of *Panulirus japonicus* around the Kuroshio Current off southern Kyusyu, Japan. *Marine Biology*, **133**: 293–306.

## 第 2 章

親養成技術開発のための基礎的研究：イセエビの繁殖生態

### 第 1 節

イセエビにおける体サイズが  
配偶行動および産卵に及ぼす影響

Effects of body size on mating behavior and spawning  
success of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*  
(von Siebold, 1824) (Decapoda: Palinuridae): implications  
for broodstock management techniques

## INTRODUCTION

The Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824) is mainly distributed around the temperate Pacific coast of Japan (Sekiguchi, 1997). This species is one of the most important crustacean fishery resources in Japan because of its high commercial value (Nonaka *et al.*, 2000). Therefore, *P. japonicus* fishing regulations, including a legal minimum size limit (usually > 42 mm carapace length (CL)) and a closed fishing season, have been employed by Japanese prefectural governments to conserve and manage the resource for sustainable utilization (Nonaka *et al.*, 2000). Larviculture for mass seed production has also been studied for aquaculture and stock enhancement of this lobster (Matsuda & Takenouchi, 2007; Murakami *et al.*, 2007; Murakami, 2011).

It is essential to obtain a large number of newly hatched, high-quality larvae to develop mass seed production technologies for marine organisms. Males and females are usually captured before the breeding season because landing ovigerous *P. japonicus* females is prohibited; they are then cultured in tanks to mate and spawn. Mating females with males is therefore a very important procedure for successful broodstock management of this species. Laboratory mating behavior of *P. japonicus* has been reported by Nagai (1956), Deguchi (1988), and Deguchi *et al.* (1991). Briefly, mating behavior begins with a pre-copulatory phase when the male chases the female for 0.5–3 h, which culminates in a frontal approach and pairing with the female. Copulation involves the male embracing the female belly to belly, and spermatophores are deposited on the posterior thoracic sterna of the female. Females spawn and oviposit their eggs into the abdominal chamber in a vertical position. Deguchi (1988) reported that males smaller than the female rarely succeed in mating,

suggesting that male and female body size affects mating success of this species. Details of the mating behavior and spawning success, however, have not been fully described for differently size *P. japonicus* pairs.

We investigated the effects of male and female body size on mating behavior and spawning success of *P. japonicus* under laboratory conditions to develop broodstock management techniques.

## MATERIAL AND METHODS

### *Test animals*

Test lobsters were captured by commercial gill net between 9 April and 5 May 2007, just before the beginning of the reproductive season in the fishing ground along the central Pacific coast off Minamiizu, Shizuoka Prefecture, Japan. A total of 72 intact lobsters (36 males and 36 females) were selected from the landings according to maximum CL (male, ~90 mm; female, ~70 mm) and minimum size at sexual maturity (~50 mm CL) (Minagawa & Higuchi, 1997). They were transferred to the Minamiizu Laboratory, National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency. Body weight and CL of each lobster were measured, and individuals of each sex were divided into three size groups (mean CL  $\pm$  standard deviation, range) of large-size (male,  $84.3 \pm 3.1$  mm, 79.6–90.1 mm,  $n = 12$ ; female,  $64.3 \pm 3.2$  mm, 61.1–72.3 mm,  $n = 12$ ), medium-size (male,  $70.8 \pm 4.6$  mm, 61.2–75.3 mm,  $n = 12$ ; female,  $57.5 \pm 1.2$  mm, 55.6–59.9 mm,  $n = 12$ ), and small-size (male,  $53.5 \pm 3.2$  mm, 49.9–58.8 mm,  $n = 12$ ; female,  $52.4 \pm 0.9$  mm, 51.0–54.0 mm,  $n = 12$ ) lobsters. There are no unfished populations of *P. japonicus* in Japan and the maximum CL values of the

lobsters are similar throughout the fishing areas (Harada, 1957; Inoue, 1981; Minagawa & Higuchi, 1997; Yamakawa, 1997). The sizes of the test animals used in the present study are therefore considered to represent the size range of *P. japonicus* populations in Japanese coastal areas.

All lobsters were tagged for identification using small numbered vinyl sheet tags according to the method of Matsuda *et al.* (2002). Males and females were held separately in two respective fiberglass-reinforced plastic tanks (100 cm wide × 200 cm length × 100 cm depth; actual water volume, 1.4 kl) in the laboratory. The tanks were filled with sand-filtered seawater as part of a flow-through system (24 l min<sup>-1</sup>) under natural seawater temperature (mean ± standard deviation, 18.2 ± 1.2 °C; range, 16.6–20.0 °C) and photoperiod conditions (14 light:10 dark). Each tank of lobsters was fed thawed krill *Euphausia superba* Dana, 1850 (10% of total lobster weight) three times per week.

### *Mating experiments*

We conducted mating experiments from 7 May to 30 June 2007 during the reproductive season (Deguchi *et al.*, 1991; Nonaka *et al.*, 2000) using 30 males and 28 females. Five transparent polycarbonate columnar tanks (500 l volume; actual water volume, 350 l) as part of a flow-through seawater system (2.8 l min<sup>-1</sup>) were used to observe mating behavior under natural seawater temperature and photoperiod conditions in the laboratory. A concrete block was laid at the center of each tank bottom to support the vertical posture of the female while laying eggs (Nagai, 1956; Deguchi, 1988; Deguchi *et al.*, 1991). Females that groomed their pleopods with the fifth pereopod were selected for mating experiments because such grooming behavior precedes egg-laying (Nagai, 1956; Deguchi, 1988; Deguchi *et al.*, 1991). In

contrast, males were chosen randomly from the three body size groups. A pair of selected male and female lobsters was transferred from their stock tanks to the observation tank at 1800 because *P. japonicus* is nocturnal, and mating occurs at night (Nagai, 1956; Deguchi, 1988; Deguchi *et al.*, 1991). The behavior of the paired lobsters was recorded using a video recording system with infrared cameras and infrared light sources (850 nm) installed over the observation tanks (MM Network System Co. Ltd., Yokohama, Japan) between 1800 and 700 for later mating behavior analyses.

We briefly checked the video recordings every morning, and paired lobsters that did not exhibit copulatory behavior after three days were returned to the stock tanks. These lobsters were reused in later mating behavior experiments, so that a total of 39 pairs using 30 males and 28 females were tested in nine combinations of large-, medium-, and small-size groups of each sex (Table 1). Pairs in which copulatory behavior was observed on the video recordings were held in the observation tank for three additional days after copulation, and signs of oviposition were checked occasionally every day. The mating experiment was terminated if a female laid eggs, and the male was removed from the tank. Each berried female was transferred and reared in another tank for 3–7 days, a small number of eggs was taken to measure fertilization rate, and the female with an egg mass was then humanly killed and stored at  $-20^{\circ}$  C for later estimation of the number of eggs attached to the pleopods. Dropped eggs were siphoned from the tank bottom and counted by the volumetric method. Lobsters that mated with partners were not used for further mating experiments.

Egg fertilization rates were determined according to the method of Rondeau & Sainte-Marie (2001). The eggs were fixed for 1 h in a solution of 97% glucamine-

acetate (GA) buffer, 2% formalin, and 1% Triton-X, and then rinsed in GA buffer. The eggs were stained for 1 h in a solution of 0.5 µg/ml Hoechst dye in GA buffer and were rinsed twice and preserved in GA buffer at 4 °C. About 200 eggs were observed under a fluorescence microscope (Nikon Co. Ltd., Tokyo, Japan) and the number of cleaved eggs with fluorescent nuclei was counted. Eggs attached to pleopods were carefully removed from each berried female using small forceps, and the number was estimated by dividing total egg dry weight by mean dry weight per egg calculated from three subsamples (~300 eggs). Dry egg weight was determined after drying for 48 h at 60 °C. Clutch size of each female was estimated by combining the number of eggs counted from the tank bottom and the number of eggs attached to the pleopods.

#### *Video analyses*

Video recordings were reviewed for describing the behavior of each lobster pair, and mating behavior was categorized into approach, upright posture, copulation, and separation phases (see Results). Approach behavior was initiated by either or both sexes. Four additional different routes were defined during the mating behavioral phases from contact to separation of the males from females by focusing on which sex initiated the upright posture and separation behaviors, as follows: route A, upright posture by both sexes and separation by the female; route B, upright posture by both sexes and separation by the male; route C, upright posture by the male and separation by the female; and route D, upright posture by the male and separation by the male. Furthermore, the total number of copulations, and the time that elapsed from the initiation to the end of successive mating phases (i.e., approach to upright posture, upright posture to copulation, and copulation to separation) were also

determined for the designated pairs. Egg-laying time was also determined for each female.

### *Statistical analysis*

All statistical analyses were performed using the R statistical software (R3.1.1; R Core Team, 2014) with a 5% significance level. To examine the effects of lobster body size on mating behavior and spawning, we applied a generalized linear model (GLM) (McCullagh & Nelder, 1989; Everitt & Hothorn, 2010) with the `glm` function implemented in the `stats` package (R Core Team, 2014). A generalized linear mixed-effects model (GLMM) was employed to analyze repeated measures from a paired male and female (Zuur *et al.*, 2009) using the `lmer` function implemented in the `lme4` package (Bates *et al.*, 2015). The CL values rather than the categorical body sizes (large-, medium-, and small-size) of the males and females were used as explanatory variables without considering the interaction effects of male and female body size because there were few copulation and spawning events in each combination among the three body size groups of the sexes. The following response variables were used in the GLM analyses, showing an error distribution and a link function that relates the mean of the response to the linear predictors in the model in parenthesis: 1) occurrence of mating in the tested pair (quasi-binomial distribution and logit link); 2) occurrence of each approach behavior by a male, female, or both sexes in the mated pair (quasi-binomial distribution and logit link); 3) occurrence of each of the four mating behavioral routes in the mated pair (quasi-binomial distribution and logit link); 4) total number of copulations by the mated pair (Poisson distribution and logarithmic link); 5) egg-laying by the mated pair (quasi-binomial distribution and logit link); 6) fertilization rate (quasi-binomial distribution and logit link); and 7)

clutch size (Gaussian distribution and identity link). The response variables in the GLMM analyses (Gaussian distribution and identity link) were time that elapsed from initiation to the end of successive mating phases, i.e., approach to upright posture, upright posture to copulation, and copulation to separation, while the identification number of the designated pair was included as a random intercept effect.

## RESULTS

### *Mating behavior*

All males among the 39 pairs used for the mating experiments chased females. Mating behavior was accomplished 66 times among 21 couples within 0–3 days of initiating the experiments (Table 1). The video recordings of seven cases were partially or entirely lost owing to errors when they were copied from the recording system to DVD media. Therefore, the following analyses were based on recordings of 59 cases of the entire mating behavior sequence of 20 pairs. Mating behavior was categorized into four phases: phase 1, approach; phase 2, upright posture; phase 3, copulation; and phase 4, separation (Fig. 1).

#### Phase 1: approach

Mating behavior was initiated by a frontal approach of a male (Fig. 1A, 39 cases), female (Fig. 1B, nine cases), or both sexes (Fig. 1C, 11 cases). The lobsters intermittently touched the partner with their antennules, antennae, or first and second pereiopods. Females occasionally escaped from an approaching male (Fig. 2A).

### Phase 2: upright posture

After the first approach, the male and female faced each other and embraced the other's carapace ventrally by entangling their first and second/third pereopods (Fig. 2B). This behavior was observed in all cases (Fig. 1D). Then, the male and female lobsters simultaneously (Fig. 1E, 14 cases; Fig. 2C), or only the male (Fig. 1F, 45 cases; Fig. 2D), stood upright while their body was supported by the fourth and fifth pereopods.

### Phase 3: copulation

Individuals subsequently embraced each other belly to belly in the upright posture (copulatory behavior) (Fig. 1G). The male lobster fell backward supported by his fifth pereopods and antennae while copulating after both the male and female lobsters were in an upright posture (Fig. 2E). A male in the upright posture lifted the female by her carapace and copulated with her positioned ventrally. The paired lobsters occasionally turned side-long while copulating (Fig. 2F).

### Phase 4: separation

Mating behavior was completed when the male (Fig. 1H, 33 cases) or female (Fig. 1I, 26 cases) separated. The male separated from the female by standing on his walking legs (Fig. 2G), whereas the female separated from the male by tail-flipping and jumping backward (Fig. 2H).

### *Effects of body size on mating behavior and spawning*

Among the 21 pairs in which the mating behavior sequence was completed, 17 females laid eggs (Table 1). The time of the oviposition could be determined for 11

females and egg-laying occurred 1–9 h after the last mating behavior, except a large-size male and small-size female pair that laid eggs after 34 h (Table 1). In addition to the 17 females that laid eggs, three females oviposited eggs in the observation tank without any signs of mating behavior on the video recordings, two of these had fertilized eggs (fertilization rate 97–100%) and one had all unfertilized eggs (Table 1). The two females with fertilized eggs should have copulated with males after the video recording period (see Discussion), so that they were included in the GLM analyses for occurrence of mating in the tested pair, egg-laying in the mated pair, fertilization rate and clutch size.

The effects of male and female body size on mating behavior and spawning are represented in Figs. 3–9 by summarizing the results of the three body size groups by sex. Additionally, the results of the GLM and GLMM analyses are summarized in Table 2; the plus (or minus) signs of the coefficient estimates for the explanatory variables indicate that mating behavior and spawning tended to occur in larger (or smaller) lobsters. The body sizes of both sexes did not significantly affect the occurrence of mating in the tested pair (Fig. 3, Table 2). Overall rates of mating occurrence (23 cases) in 30 males and 28 females were 77% and 82%, respectively. The body sizes of both sexes did not significantly affect the occurrence of any approach behavior by either or both sexes (Fig. 4, Table 2). Overall, approach behavior tended to be initiated by males. The body sizes of both sexes significantly affected the occurrence of mating behavioral routes A and D ( $P < 0.0001$ ), but not that of routes B and C (Fig. 5, Table 2); larger males and smaller females tended to use route A, whereas the smaller males and larger females tended to use route D. The total number of copulations was significantly affected ( $P < 0.0001$ ) by male body size but not by female body size (Fig. 6, Table 2) and was 1–4 times in the large- and

medium-size groups of males, but tended to increase (6–23 times) when small-size males mated with medium- and large-size females (Table 1). Elapsed time for the entire mating behavior process was 25–1,104 s. The time that elapsed from the approach to the upright posture increased significantly with increasing female body size ( $P = 0.011$ ) but was not associated with male body size (Fig. 7, Table 2). Male and female body size did not affect the time that elapsed from the upright posture to copulation. Duration of copulation was significantly longer in smaller males ( $P = 0.044$ ), regardless of female body size. Although the occurrence of egg-laying in the mated pairs was not significantly affected by male or female body size, females tended to spawn when they mated with larger males ( $P = 0.069$ ) (Fig. 8, Table 2). Fertilization rate was not affected by male or female body size (Table 2) and was generally high (90.0–100%; mean, 98.5%) (Table 1). A low fertilization rate (3.5%), however, was observed for a small-size male and medium-size female pair. Female clutch size was  $7.3\text{--}39.9 \times 10^4$  eggs and was significantly affected by female body size ( $P < 0.0001$ ), but not by male body size (Fig. 9, Table 2).

## DISCUSSION

We demonstrated that body sizes of paired males and females significantly affected mating behavior and spawning of *Panulirus japonicus* under laboratory conditions. Our analyses were based on 59 cases of the entire mating behavior sequence recorded for 20 pairs categorized into the approach, upright posture, copulation, and separation phases, and the behavior of lobsters during each phase was consistent with that reported previously for 1–4 pairs of captive *P. japonicus* (Nagai, 1956; Deguchi,

1988; Deguchi *et al.*, 1991). Mating behavior similar to that of *P. japonicus* has been reported in other palinurid lobsters, including *Panulirus argus* (Latreille, 1804) in their natural habitat (Lipcius *et al.*, 1983) and *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758) (Berry, 1970) and *Jasus edwardsii* (Hutton, 1875) (Mckoy, 1979) in captivity.

Our records of the mating behavior of males and females of different body sizes highlight the different behavioral approaches initiated by either or both sexes and the four routes that were followed during mating from contact to separation of the male from the female. Although the occurrence of each approach behavior by either or both sexes was not affected by either male or female body size, males tended to initiate the approach behavior. In all matings by large males, both partners initiated the vertical embrace and the female always initiated separation. In matings by small males, however, the male was required to pull all larger and medium size females into the mating embrace, while all smaller females engaged in the upright posture along with the small male. In most cases in matings by small males, the male initiated separation. In matings by medium-size males, the male was required to pull all large females and the majority of medium size females into the mating embrace, while all small females engaged in the upright posture along with the medium size male. Separation was usually initiated by the female rather than the medium-size male. The importance of the male engaging the female in the upright posture is underscored by the time from first approach to the upright posture increasing significantly with increasing female body size. Minagawa & Higuchi (1997) examined sexual dimorphism of the first and second pereiopods of *P. japonicus* by analyzing the relative growth between lengths of these pereiopods and body size (CL) using the allometric growth equation; they reported that the sexual dimorphism (i.e., longer pereiopods in males than those in females) became more distinct when body size was

> 52–54 mm CL and that allometric growth coefficients were larger in males (1.390–1.700) than those in females (1.033–1.036). Longer pereopods increase the success rate for capturing and embracing females during the upright posture and copulatory phases. Therefore, it might be difficult for small-size males (mean, 54 mm CL) to manipulate and hold medium-/large-size females (means, 58 and 64 mm CL, respectively), so smaller males might not be capable of involving females in the upright posture and initiate separation.

Our mating experiments also demonstrated the significant effects of different mate body sizes on copulation and spawning of *P. japonicus*. Medium- and large-size males participated in 1–4 copulations in the present study, as reported previously for this species in captivity (Deguchi, 1988; Deguchi *et al.*, 1991); however, the number of copulations increased to 6, 10, and 23 times in pairs of small-size males and medium- and large-size females (51.7 and 58.1 mm, 50.0 and 55.6 mm, and 50.1 and 63.6 mm CL), respectively. Moreover, the duration of the copulatory phase increased in these pairs. Additionally, one medium- (55.6 mm) and one large-size (63.6 mm) female of the four females that copulated with males but did not lay eggs copulated multiple times with small males (50.0 and 50.1 mm CL, respectively). Minagawa & Higuchi (1997) conducted a histological study of the testis and vas deferens of *P. japonicus* and all males examined ( $\geq 37$  mm CL) had sperm in the testis and vas deferens, but some  $< 53$  mm CL lacked sperm in the middle part of the vas deferens. They suggested that development of the middle vas deferens, the number of reserved sperm, the spermatophoric matrix, and sperm density were sufficient for mating at when males reached 52–54 mm CL. In the present study, females paired with some of the small-size males might have therefore copulated more frequently and for longer duration to increase the chance of obtaining spermatophores and fertilization success.

Multiple mating of a female before spawning, as evidenced by overlaying of viable spermatophores on the female posterior thoracic sterna, has been reported in palinurid lobsters such as *Panulirus argus* and *P. laevicauda* (Latreille, 1817); about 43% of oviposition events were multiple in *P. argus* and *P. laevicauda* and increased with female size, suggesting that the larger females seek multiple copulations because more sperm is required to ensure fertilization success of their eggs (Mota Alves & Paiva, 1976; Kittaka & MacDiarmid, 1994).

Nagai (1956) and Deguchi (1988) observed mating behavior in *P. japonicus* from the lateral view in a glass aquarium and confirmed that spermatophores were deposited on the posterior thoracic sterna of the female. Although our behavior recordings from the top of the observation tank did not allow us to see the underside of the female and confirm deposition of the spermatophores during copulation, small-size males (50.0–51.7 mm CL) might deposit no/few spermatophores on females because among three females two of three females (10 and 23 times) that copulated multiple times with small males did not lay eggs, and one female (six times) laid eggs with a low fertilization rate (3.5%). Our mating experiments confirm a suggestion by Minagawa & Higuchi (1997) that functional maturity of *P. japonicus* males occurs at 52–54 mm CL, which coincided with the size at which allometric growth of the pereiopods changes.

Three females in the present study spawned in the observation tank without any mating behavior detected on the video recordings; two produced fertilized eggs, and one produced all unfertilized eggs, which normally attach to the pleopods of the female. The two females with fertilized eggs should have copulated with males after the video recording period. Although we could not determine whether copulation occurred in the female with unfertilized eggs, this female might not have copulated

with a male, as females isolated from males during the breeding season lay unfertilized eggs that typically attach to the pleopods (Deguchi, 1988). A similar phenomenon has been reported by Berry (1970) for *P. homarus*.

Small males of *P. argus*, *P. guttatus* (Latreille, 1804), and *J. edwardsii* ejaculate less sperm than large males do, and clutches fertilized by small males are smaller than those fertilized by large males (MacDiarmid & Butler, 1999; MacDiarmid & Sainte-Marie, 2006; Magallón-Gayón *et al.*, 2011; Butler *et al.*, 2011, 2015).

Moreover, the size of the *P. argus* spermatophore deposited on the underside of females affects clutch weight more than female size does (MacDiarmid & Butler, 1999; Butler *et al.*, 2015). Butler *et al.* (2015) also reported that smaller spermatophores do not change the number of eggs spawned by females, but do reduce fertilization success, indicating that the smaller clutches produced by females mated with small males are not a result of reduced egg output but reflect a sperm limitation for fertilization success. The gonadosomatic index and sperm density in the middle part of the vas deferens reaches a plateau at > 54 mm CL in *P. japonicus* males (Minagawa & Higuchi, 1997; Minagawa, 1999), suggesting that large *P. japonicus* males produce more ejaculate than small males. Fertilization rates in the present study were 90–100% (mean, 98.5%), except for one small-size male and medium-size female (3.5%) pair, and clutch size depended on female but not male size, suggesting that *P. japonicus* males were depositing a sufficient number of sperm independent of female size.

Our mating experiments show that males are functionally mature at > 52 mm CL and that small-size males with shorter pereopods are at a disadvantage when manipulating and holding larger females during mating. The rate of spawning success tended to decrease when females mated with small-size males. Males > ~60 mm CL

should therefore be considered candidates for a *P. japonicus* hatchery broodstock. Our results, however, are based on pairing experiments conducted in a small isolated tank. This experimental condition might explain the reason why body sizes of males and females did not significantly affect the occurrence of mating in the tested pair; i.e., small-size males could copulate with larger females. Intrasexual and/or intersexual selection, i.e., male competition and female mate choice, which would be affected by sex ratio, should occur in a communal tank stocked with males and females (MacDiarmid, 1989; Kittaka & MacDiarmid, 1994; Debusse *et al.*, 1999, 2003; MacDiarmid & Butler, 1999; Gosselin *et al.*, 2003; Vijayakumaran *et al.*, 2005; Galeotti *et al.*, 2006; Magallón-Gayón *et al.*, 2011). Additionally, small tank environment might be one of the causes of non-mating in some males and females in the present mating experiments. Further studies examining mating behavior, spawning, and fertilization success in actual broodstock tanks stocked with male and female *P. japonicus* are needed to develop broodstock management technology.

## REFERENCES

- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. & Walker, S. 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, **67**: 1–48.
- Berry, P.F. 1970. Mating behavior, oviposition and fertilization in the spiny lobster *Panulirus homarus* (Linnaeus). *South African Association for Marine Biological Research, Oceanographic Research Institute, Investigational Report*, **24**: 1–16.
- Butler, M.J. IV, Heisig-Mitchell, J.S., MacDiarmid, A.B. & Swanson, R.J. 2011. The effect of male size and spermatophore characteristics on reproduction in the

- Caribbean spiny lobster *Panurilus argus*. *New Frontiers in Crustacean Biology*, **15**: 69–84.
- Butler, M.J. IV, MacDiarmid, A. & Gnanalingam, G. 2015. The effect of parental size on spermatophore production, egg quality, fertilization success, and larval characteristics in the Caribbean Spiny lobster, *Panulirus argus*. *ICES Journal of Marine Science*, **72** (Supplement 1): i115–i123.
- Dana, J.D. 1850. Synopsis generum crustaceorum ordinis “Schizopoda”. *American Journal of Science and Arts*, **9**: 129–133.
- Debuse, V.J., Addison, J.T. & Reynolds, J.D. 1999. The effects of sex ratio on sexual competition in the European lobster. *Animal Behaviour*, **58**: 973–981.
- Debuse, V.J., Addison, J.T. & Reynolds, J.D. 2003. Effects of breeding site density on competition and sexual selection in the European lobster. *Behavioral Ecology*, **14**: 396–402.
- Deguchi, Y. 1988. II. Copulation and Spawning, 5. Spiny lobster. In: *Seed production of decapod crustaceans* (R. Hirano, ed.), pp. 64–75. Kouseisha Kouseikaku, Tokyo. [in Japanese]
- Deguchi, Y., Sugita, H. & Kanemoto, F. 1991. Spawning control of the Japanese spiny lobster. *Memoirs of the Queensland Museum*, **31**: 449.
- Everitt, B.S. & Hothorn, T. 2010. *A handbook of statistical analyses using R*, Edn. 2. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Galeotti, P., Rubolini, D., Fea, G., Ghia, D., Nardi, P.A., Gherardi, F. & Fasola, M. 2006. Female freshwater crayfish adjust egg and clutch size in relation to multiple male traits. *Proceeding of the Royal Society B*, **273**: 1105–1110.

- Gosselin, T., Sainte-Marie, B. & Bernachetz, L. 2003. Patterns of sexual cohabitation and female ejaculate storage in the American lobster (*Homarus americanus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **55**: 151–160.
- Harada, E. 1957. Ecological observations on the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold), in its larval and adult life. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory*, **6**: 99–122.
- Hutton, F.W. 1875. Descriptions of two new species of Crustacea from New Zealand. *Transactions and Proceedings of the New Zealand Institute*, **7**: 279-280.
- Inoue, M. 1981. Studies on the cultured phyllosoma larvae of the Japanese spiny lobster, *Panulirus japonicus* (V. Siebold). *Special Report of the Kanagawa Prefectural Fishery Experimental station*, **1**: 1–91. [in Japanese with English abstract]
- Kittaka, J. & MacDiarmid, A.B. 1994. Breeding. In: *Spiny lobster management* (B.F. Phillips, J.S. Cobb & J. Kittaka, eds.), pp. 384–401. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Latreille, P.A. 1804. Des langoustes du Museum National d'Histoire Naturelle. *Annales du Muséum national d'Histoire naturelle*, (Paris), **3**: 388–395.
- Latreille, P.A. 1817. Langouste, Palinurus, Fab. *Nouveau Dictionnaire d'Histoire Naturelle*, Edn. 2, **17**: 291–295.
- Linnaeus, C. 1758. *Systema Naturae per Regna Tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis*, Vol. 1, Edn.10. Laurentii Salvii, Holmiae [= Stockholm].
- Lipcius, R.N., Edwards, M.L., Herrnkind, W.F. & Waterman, S.A. 1983. In situ mating behavior of the spiny lobster *Panulirus argus*. *Journal of Crustacean Biology*, **3**: 217–222.

- MacDiarmid, A.B. 1989. Size at onset of maturity and size-dependent reproductive output of female and male spiny lobsters *Jasus edwardsii* (Hutton) (Decapoda, Palinuridae) in northern New Zealand. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **127**: 229–243.
- MacDiarmid, A.B. & Butler, M.J. IV. 1999. Sperm economy and limitation in spiny lobsters. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **46**: 14–24.
- MacDiarmid, A.B. & Sainte-Marie, B. 2006. Reproduction. In: *Lobsters: biology, management, aquaculture, and fisheries* (B.F. Phillips, ed.), pp. 45–77. Blackwell Publishing, Oxford.
- Magallón-Gayón, E., Briones-Fourzán, P. & Lozano-Álvarez, E. 2011. Does size always matter? Mate choice and sperm allocation in *Panulirus guttatus*, a highly sedentary, habitat-specialist spiny lobster. *Behaviour*, **148**: 1333–1358.
- Matsuda, H. & Takenouchi, T. 2007. Development of technology for larval *Panulirus japonicus* culture in Japan: a review. *Bulletin of Fisheries Research Agency*, **20**: 77–84.
- Matsuda, H., Takenouchi, T. & Yamakawa, T. 2002. Effects of photoperiod and temperature on ovarian development and spawning of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Aquaculture*, **205**: 385–398.
- McCullagh, P. & Nelder, J.A. 1989. *Generalized linear models*. Edn. 2. Chapman & Hall, London.
- Mckoy, J.L. 1979. Mating behaviour and egg laying in captive rock lobster, *Jasus edwardsii* (Crustacea: Decapoda: Palinuridae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **13**: 407–296.

- Minagawa, M. 1999. Quantitative analysis of the seasonality of male reproduction in the spiny lobster *Panulirus japonicus* (Decapoda: Palinuridae). *Journal of Crustacean Biology*, **19**: 276–282.
- Minagawa, M. & Higuchi, S. 1997. Analysis of size, gonadal maturation, and functional maturity in the spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Journal of Crustacean Biology*, **17**: 70–80.
- Mota Alves, M.I. & Paiva, M.P. 1976. Frenquecia de acasalamentos em lagostas do genero *Panulirus* White (Decapoda, Palinuridae). *Arquivos de Ciências do Mar*, **16**: 61–63.
- Murakami, K. 2011. *Growth characteristics and improvement in rearing techniques of phyllosoma larvae in Japanese spiny lobster Panulirus japonicus*. Ph.D. thesis, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo. [in Japanese]
- Murakami, K., Jinbo, T. & Hamasaki, K. 2007. Aspects of the technology of phyllosoma rearing and metamorphosis from phyllosoma to puerulus in the Japanese spiny lobster reared in the laboratory. *Bulletin of Fisheries Research Agency*, **20**: 59–67.
- Nagai, H. 1956. Copulation and spawning of the Japanese spiny lobster. *Aquaculture Science*, **4**: 9–11. [in Japanese]
- Nonaka, M., Fushimi, H. & Yamakawa, T. 2000. The spiny lobster fishery in Japan and restocking. In: *Spiny lobsters: fisheries and culture*, Edn. 2. (B.F. Phillips & J. Kittaka, eds.), pp. 221–242. Fishing News Books, Oxford.
- R Core Team. 2014. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. [<http://www.R-project.org/>]
- Rondeau, A. & Sainte-Marie, B. 2001. Variable mate-guarding time and sperm allocation by male snow crabs (*Chionoecetes opilio*) in response to sexual

- competition, and their impact on the mating success of females. *Biological Bulletin*, **201**: 204–217.
- Sekiguchi, H. 1997. Larval recruitment processes of Japanese spiny lobsters: a hypothesis. *Bulletin of Marine Science*, **61**: 43–55.
- Von Siebold, P.F. 1824. *De Historiae Naturalis in Japonia statu, nec non de augmento emolumentisque in decursu perscrutationum exspectandis dissertatio, cui accedunt Spicilegia Faunae Japonicae, auctore G. T. de Siebold, med. doct. Complurium Societatum Membro*. Batavisch Genootschap van Kunsten en Wetenschappen, Batavia [= Jakarta].
- Vijayakumaran, M., Senthil Murugan, T., Remany, M. C., Mary Leema, T., Dilip Kumar, J., Santhankumar, J., Venkatesan, R. & Ravindran, M. 2005. Captive breeding of the spiny lobster, *Panulirus homarus*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **39**: 325–334.
- Yamakawa, T. 1997. Growth, age composition, and recruitment of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* estimated from multiple length frequency analysis. *Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Oceanography*, **61**: 23–32. [in Japanese with English abstract]
- Zuur, A.F., Ieno, E.N., Walker, N.J., Savaliev, A.A. & Smith, G.M. 2009. *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Springer, New York.

**Table 1** Mating, spawning, and condition of spawned Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* eggs for various body size combinations.

Pairing groups	Male		Female		Mating and spawning						Condition of spawned eggs		
	ID no.	CL (mm)	ID no.	CL (mm)	Date of pairing	Date of copulation	Number of copulation	Spawning (+ / -)	Date of spawning	Duration to spawning (h: m)	Number of eggs (10 <sup>4</sup> )	Number of dropped eggs (10 <sup>4</sup> )	Fertility (%)
LL	L5	89.7	L7	62.7	5/8	–	–	–	–	–	–	–	–
	L6	81.7	L7	62.7	5/12	5/12	1	+	5/13	6:17	29.0	3.3	100
	L1	86.4	L6	62.2	5/13	–	–	+	5/15	–	20.2	–	100
	L9	81.6	L5	63.1	5/21	–	–	–	–	–	–	–	–
	L8	79.6	L5	63.1	5/28	–	–	–	–	–	–	–	–
	L5	89.7	L5	63.1	5/31	5/31	1	+	5/31	4:20	28.4	–	100
LM	L3	82.9	M3	56.4	5/19	5/19	2	+	5/20	–	18.4	–	100
	L4	82.0	M5	59.9	5/23	–	–	–	–	–	–	–	–
	L7	84.1	M5	59.9	5/27	5/28	1	+	5/28	–	27.7	–	97.0
	L9	81.6	M10	56.0	6/9	6/11	1	+	6/11	–	10.8	–	100
LS	L2	84.7	S3	51.7	5/7	5/7	2	+	5/9	34:05	6.3	1.0	90.0
	L9	81.6	S6	53.1	5/28	–	–	–	–	–	–	–	–
	L4	82.0	S6	53.1	6/2	6/2	1	+	6/3	9:12	18.3	–	100
	L12	82.3	S1	51.6	6/6	–	–	–	–	–	–	–	–
ML	M8	70.8	L1	72.3	5/11	5/12	2	+	5/13	–	35.4	4.4	100
	M7	65.1	L2	65.3	5/13	5/13	2	+	5/14	1:07	18.9	1.7	98.0
	M1	73.8	L8	69.2	5/16	–	–	–	–	–	–	–	–
	M10	71.7	L8	69.2	5/21	5/21	1	+	5/21	2:05	32.3	–	97.5
MM	M9	74.0	M1	58.3	5/20	–	–	–	–	–	–	–	–
	M3	72.5	M9	57.5	5/22	–	–	+	5/24	–	21.9	–	0.0
	M2	63.4	M11	57.5	5/27	5/27	4	+	5/28	5:05	23.4	–	99.0
	M1	73.8	M1	58.3	6/6	6/6	2	+	6/7	1:45	14.3	–	98.5
MS	M6	75.3	S11	54.0	5/15	5/18	1	–	–	–	–	–	–
	M11	73.8	S8	52.5	5/26	5/29	1	+	5/29	–	16.0	–	99.5
	M9	74.0	S2	53.1	6/3	6/3	1	+	6/4	5:25	15.3	–	99.5
SL	S7	50.1	L4	63.6	5/12	5/12–13	23	–	–	–	–	–	–
	S4	56.9	L9	65.1	5/15	5/15	1	+	5/15	3:32	29.4	–	98.0
	S11	58.8	L10	62.4	5/26	–	–	–	–	–	–	–	–
	S10	56.9	L10	62.4	6/1	–	–	–	–	–	–	–	–

	S11	58.8	L3	62.1	6/7	–	–	–	–	–	–	–	–
	S3	50.4	M8	55.6	5/14	–	–	–	–	–	–	–	–
	S12	57.0	M8	55.6	5/18	–	–	–	–	–	–	–	–
SM	S1	53.3	M7	56.3	5/22	5/22	1	–	–	–	–	–	–
	S6	50.0	M8	55.6	5/24	5/24	10	–	–	–	–	–	–
	S8	51.7	M6	58.1	5/29	5/30–31	6	+	5/31	–	19.5	–	3.5
	S5	56.1	S12	53.5	5/13	5/13	2	+	5/13	4:47	17.0	–	98.5
SS	S2	49.9	S5	51.0	5/21	–	–	–	–	–	–	–	–
	S12	57.0	S10	53.2	6/2	–	–	+	6/3	–	16.6	–	97.0
	S3	50.4	S5	51.0	6/4	–	–	–	–	–	–	–	–

L, large; M, medium; S, small. Duration to spawning, elapsed time from the last copulation to spawning. Number of eggs indicates that attached to the pleopods of females.

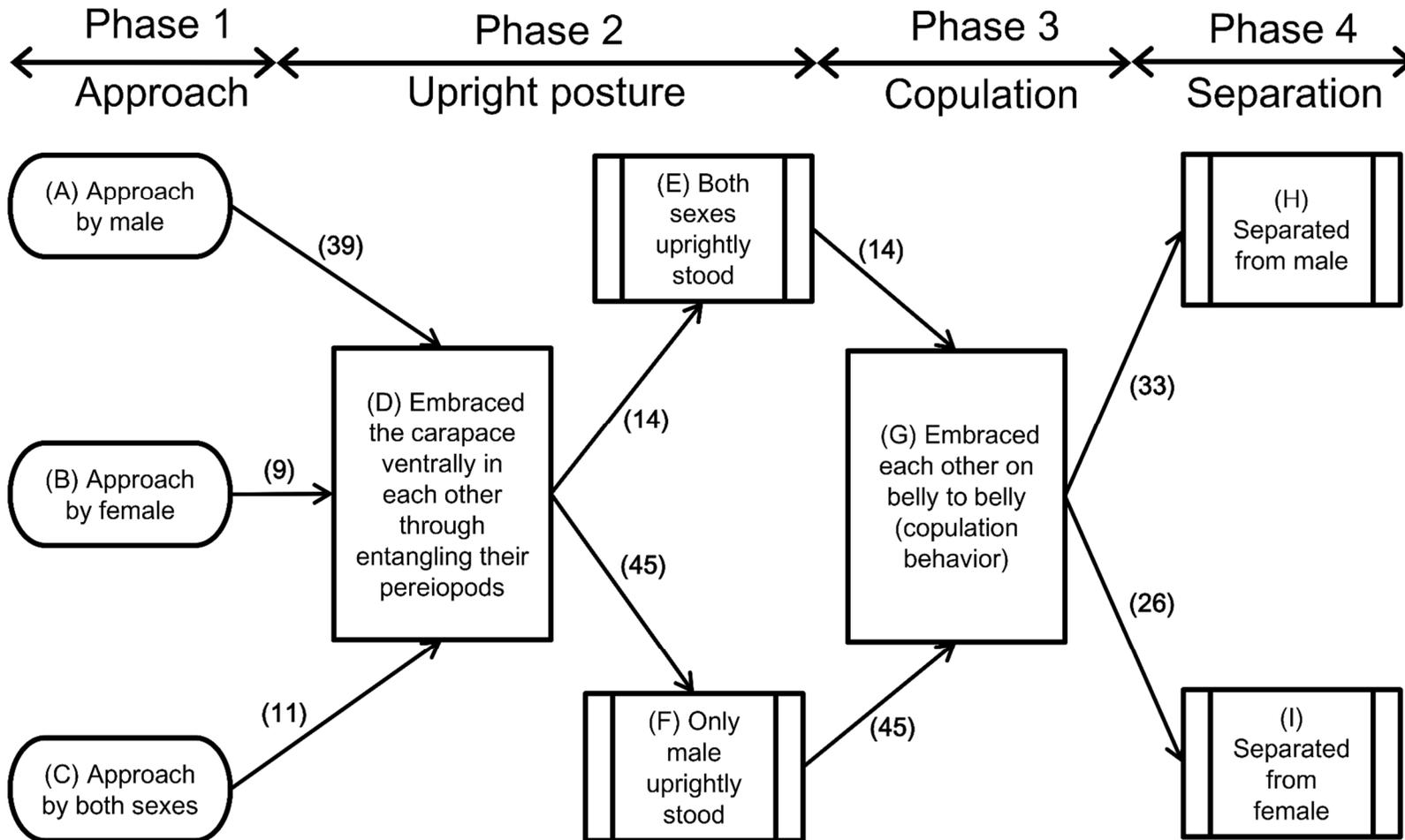
**Table 2** Evaluation of the effects of male (M) and female (F) body size (carapace length) on mating behavior and spawning of Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*.

Response variables	Explanatory variables (carapace length)	Coefficient estimate	Std. error	<i>t</i> or <i>z</i> value	<i>P</i>
Mating by tested pairs	M	0.0091	0.0263	0.346	0.731
	F	0.0025	0.0633	0.039	0.969
Approach behavior by male	M	0.0377	0.0292	1.293	0.213
	F	0.0402	0.0726	0.554	0.587
Approach behavior by female	M	-0.1430	0.0822	-1.740	0.100
	F	0.0005	0.0817	0.006	0.995
Approach behavior by both sexes	M	-0.0044	0.0319	-0.139	0.891
	F	-0.0498	0.0869	-0.574	0.574
Mating behavior route A	M	0.2377	0.0417	5.695	<b>2.63×10<sup>-5</sup></b>
	F	-0.4163	0.1497	-2.781	<b>0.013</b>
Mating behavior route B	M	-0.0378	0.0642	-0.589	0.563
	F	-0.3676	0.2975	-1.236	0.233
Mating behavior route C	M	0.0128	0.0281	0.454	0.655
	F	0.1056	0.0768	1.375	0.187
Mating behavior route D	M	-0.2546	0.0379	-6.722	<b>3.58×10<sup>-6</sup></b>
	F	0.1336	0.0459	2.911	<b>0.010</b>
Total number of copulations	M	-0.0759	0.0118	-6.459	<b>1.05×10<sup>-10</sup></b>
	F	0.0301	0.0235	1.281	0.200
Time elapsed from approach to upright posture (s)	M	2.1230	2.9330	0.724	0.469
	F	19.1540	7.5650	2.532	<b>0.011</b>
Time elapsed from upright posture to copulation (s)	M	0.0866	0.0577	1.501	0.133
	F	-0.1580	0.1307	-1.209	0.227
Time elapsed from copulation to separation (s)	M	-0.7709	0.3822	-2.017	<b>0.044</b>
	F	0.2385	0.9339	0.255	0.798
Egg-laying by mated pairs	M	0.1227	0.0639	1.920	0.069

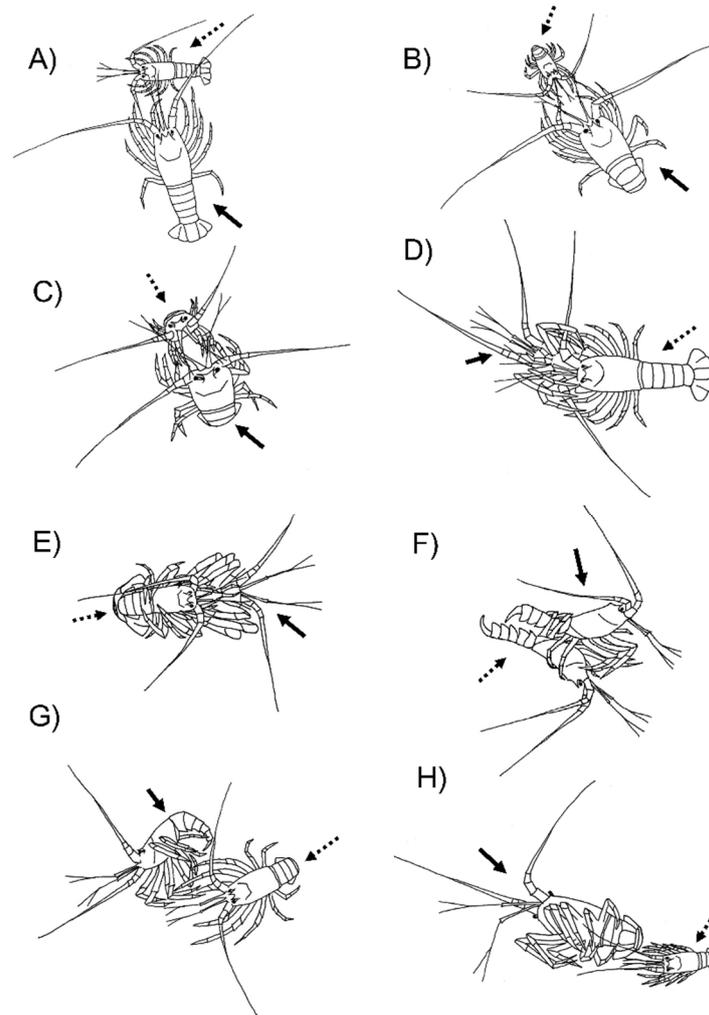
Clutch size	F	0.0835	0.1382	0.604	0.553
	M	-193.7	929.2	-0.208	0.837
Fertilization rate	F	11705.5	1813	6.457	<b>7.93×10<sup>-6</sup></b>
	M	0.1971	0.1494	1.319	0.206
	F	0.0118	0.1795	0.065	0.949

---

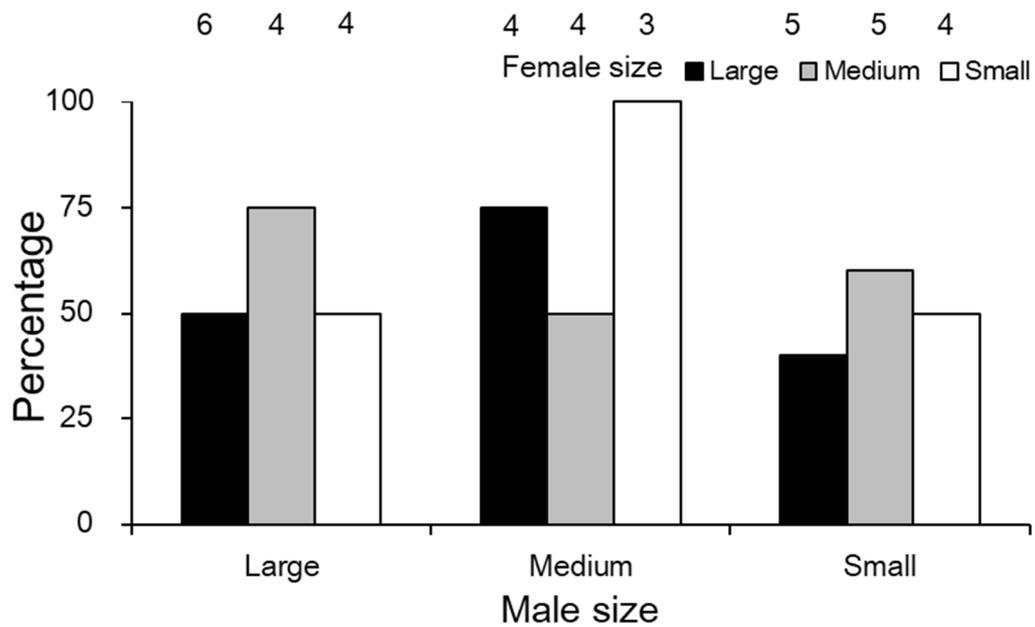
Data were analyzed using a generalized linear mixed-effects model for the time elapsed during the three mating behavior phases and a generalized linear model was used for the other behavioral aspects. Route A, upright posture by both sexes and separation by female; route B, upright posture by both sexes and separation by male; route C, upright posture by male and separation by female; route D, upright posture by male and separation by male. Statistical *z*-values are shown for total number of copulations and time engaged in the three mating behavior phases; *t*-values are provided for the other behavioral aspects.



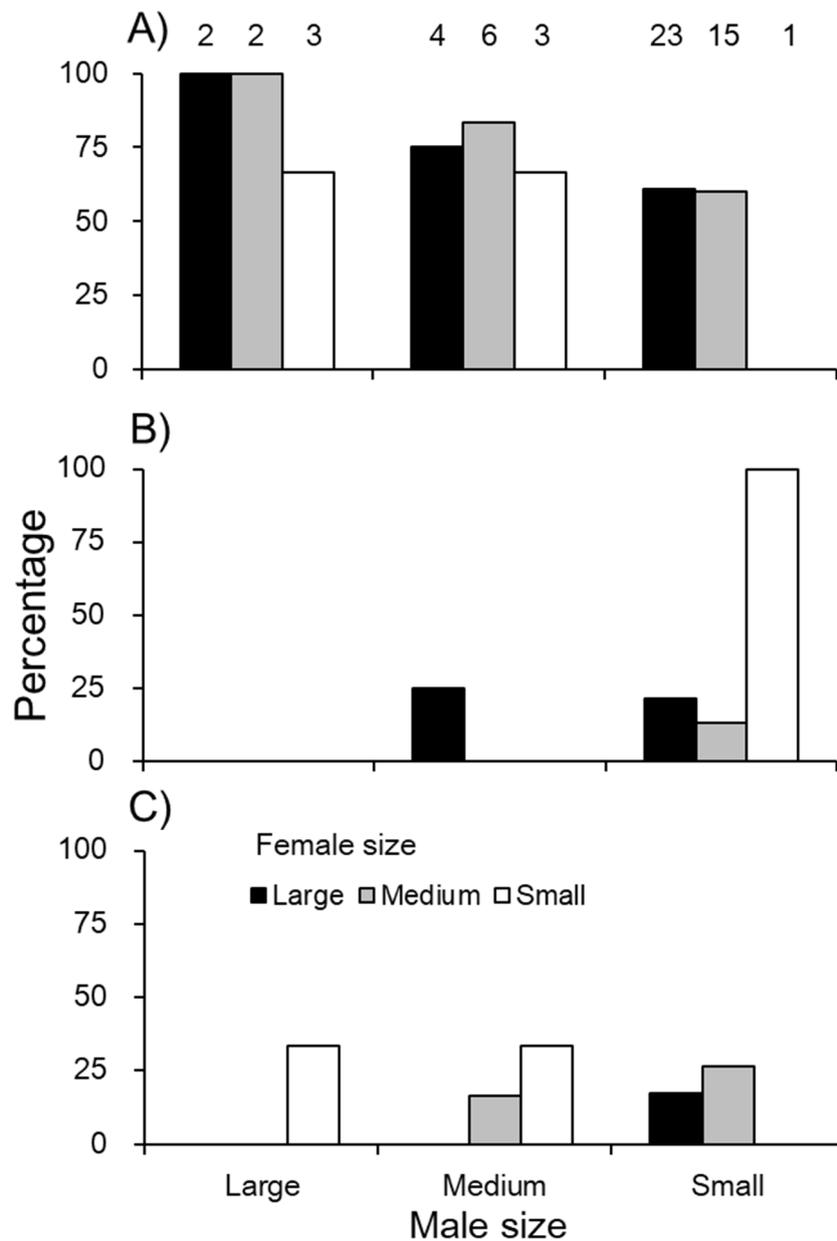
**Figure 1** Flowchart of the mating behavior sequence in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824). Mating behavior was categorized into: phase 1, approach; phase 2, upright posture; phase 3, copulation; and phase 4, separation. Numbers in parenthesis indicate the number of incidences observed after analyzing the video recordings.



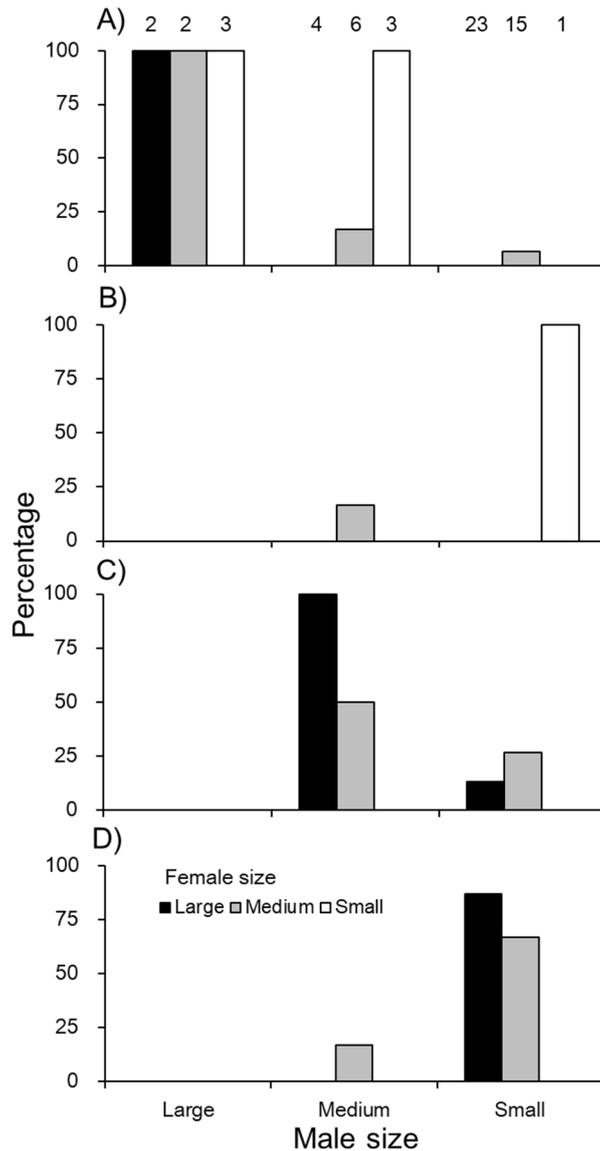
**Figure 2** Schematic line drawings of the primary mating behavior sequences in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824) from video photos: frontal approach by a male to a female with the antennules, antennae, or first and second pereiopods (**A**); male and female face each other and embrace carapaces with their first and second/third pereiopods (**B**); male and female stand upright (**C**); only the male stands upright (**D**); male and female embrace belly to belly (copulatory behavior, male below position) (**E**); male and female embrace belly to belly (copulatory behavior, male and female positioned side-long) (**F**); male separating from female by standing with his walking legs (**G**); and female separating from male by tail-flipping and jumping backward (**H**). Solid and dotted arrows indicate males and females, respectively.



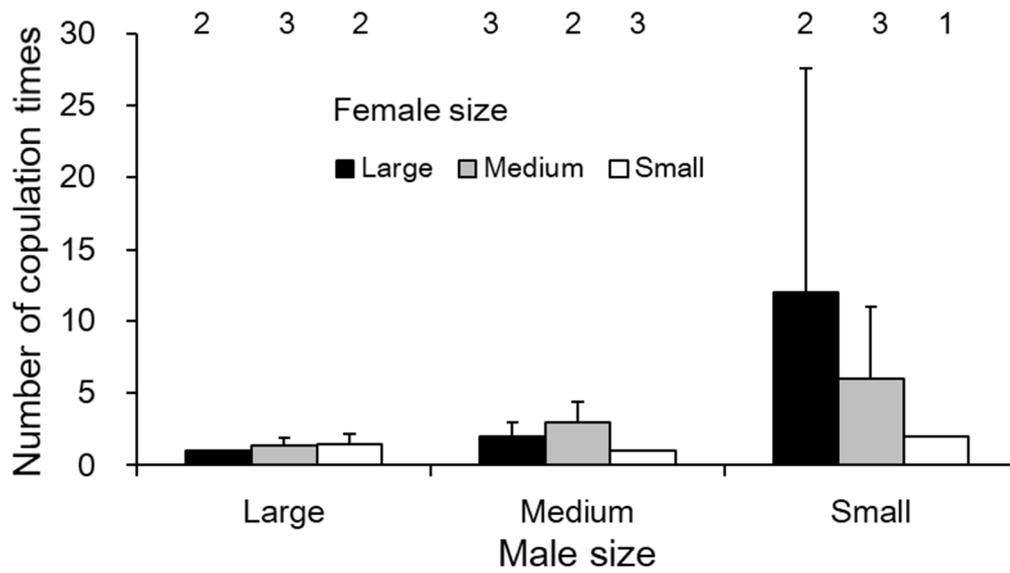
**Figure 3** Effects of male and female body size on the occurrence of mating in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824). The results for nine combinations between the three body size groups of each sex are summarized. Numbers above the top of the graph represent the number of tested pairs for each combination.



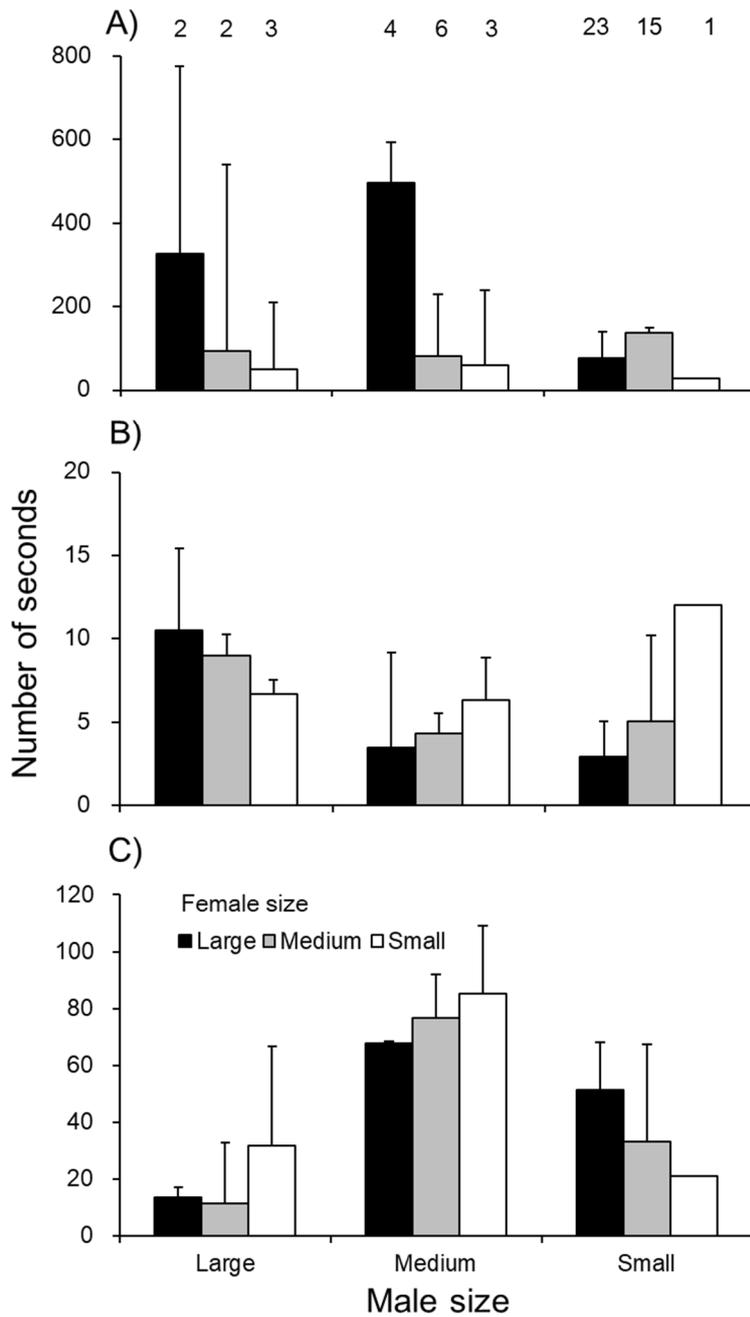
**Figure 4** Effects of male and female body size on the occurrence of approach behavior by either sex during mating behavior in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824). The results for nine combinations between the three body size groups of each sex are summarized. Data are shown for approach by male (A), approach by female (B), and approach by both sexes (C). Numbers above the top of the graph represent the number of cases of mating behavior observed for each combination.



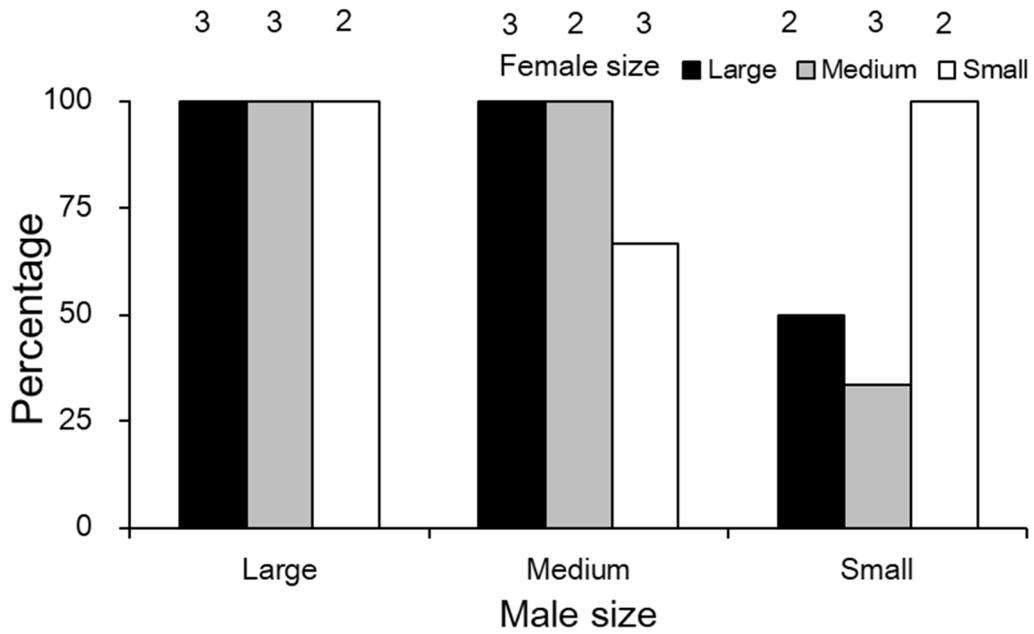
**Figure 5** Effects of male and female body size on the occurrence of the four mating behavior routes from contact to separation by male and female Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824). The results for nine combinations between the three body size groups of each sex are summarized. Data are shown for: route A, upright posture by both sexes and separation by female (A); route B, upright posture by both sexes and separation by male (B); route C, upright posture by male and separation by female (C); and route D, upright posture by male and separation by male (D). Numbers above the top of the graph represent the number of cases of mating behavior observed for each combination.



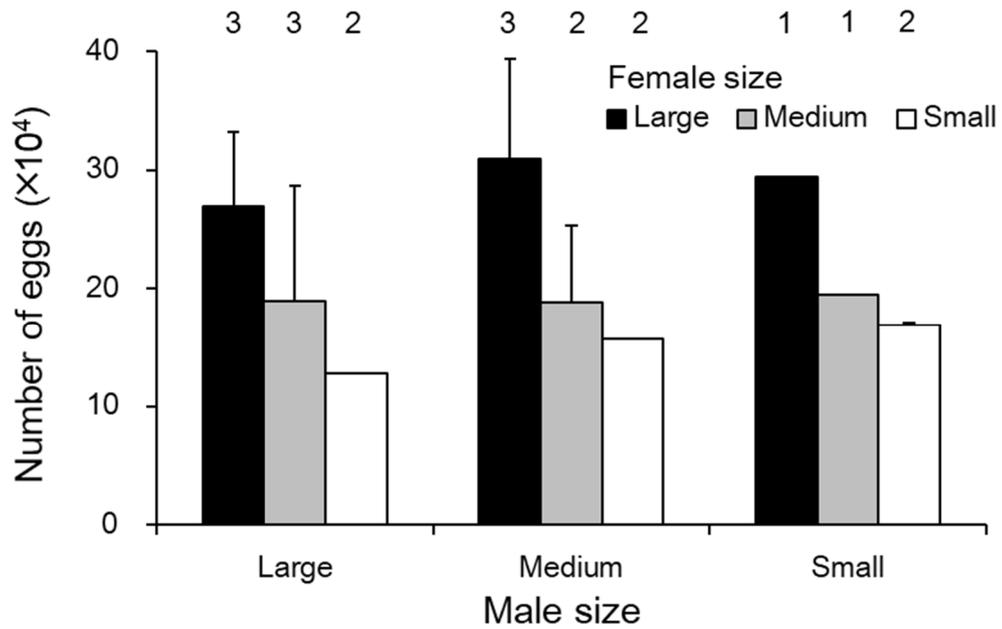
**Figure 6** Effects of male and female body size on the total number of copulations during mating in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824). The results for nine combinations between the three body size groups of each sex are summarized. Vertical bars indicate standard deviations. Numbers above the top of the graph represent the number of copulation pairs for each combination.



**Figure. 7** Effects of male and female body size on the time engaged in each mating behavior in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824). The results for nine combinations between the three body size groups of each sex are summarized. Data are shown for approach to upright posture (A), upright posture to copulation (B), and copulation to separation (C). Vertical bars indicate standard deviations. Numbers above the top of the graph represent the number of cases of mating behavior observed for each combination.



**Figure 8** Effects of male and female body size on the occurrence of egg-laying by female Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824). The results for nine combinations between the three body size groups of each sex are summarized. Numbers above the top of the graph represent the number of copulation pairs for each combination.



**Figure 9** Effects of male and female body size on female clutch size (number of spawned eggs) in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824). The results for nine combinations between the three body size groups of each sex are summarized. Vertical bars indicate standard deviations. Numbers above the top of the graph represent the number of females with fertilized eggs for each combination.

## 第 2 章

親養成技術開発のための基礎的研究：イセエビの繁殖生態

### 第 2 節

イセエビの雄親エビにおける繁殖能力の評価

Reproductive potential of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*  
(von Siebold, 1824) (Decapoda: Palinuridae) male: implications for  
broodstock management techniques

## INTRODUCTION

The Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824) is mainly distributed along the temperate Pacific coast of Japan (Sekiguchi, 1997). This species represents a commercially important fishery resource in Japan (Nonaka *et al.*, 2000). As a result, fishing regulations, including a legal minimum size limit, usually > 42 mm carapace length (CL), and a closed fishing season during the reproductive season have been employed for the populations of *P. japonicus* by the Japanese prefectural governments to conserve this resource and manage its sustainable utilization (Nonaka *et al.*, 2000).

Aquaculture and stock enhancement using artificially raised juveniles are additional tools to conserve the wild populations. Successful larviculture to produce juveniles has been demonstrated for this lobster using 40–50 l tanks (Matsuda & Takenouchi, 2007; Murakami *et al.*, 2007; Murakami, 2011), and release experiments using artificially-produced juveniles started in 2015 in Mie Prefecture, Japan (Seko *et al.*, 2017). A consistent generation of a large number of newly hatched high-quality larvae is essential for the development of mass seed production technologies for marine organisms. In the larviculture of *P. japonicus* males and females are usually captured before the breeding season because landing ovigerous females is prohibited; they are then cultured in tanks to mate and spawn. The successful mating of females with males is thus very important for successful broodstock management of this species.

The spawning season of *P. japonicus* extends from spring to summer along the Japanese coast (Deguchi *et al.*, 1991; Minagawa, 1997; Nonaka *et al.*, 2000). Mating behavior of *P. japonicus* has been studied under laboratory conditions but not in the

wild. Mating occurs between hard-shell males and females, and spermatophores are deposited on the posterior thorax of the females (Nagai, 1956; Deguchi, 1988; Deguchi *et al.*, 1991). Females spawn and oviposit their eggs into the abdominal chamber in a vertical position (Nagai, 1956; Deguchi, 1988; Deguchi *et al.*, 1991), generally within 10 h after copulation (Jinbo *et al.*, 2017). Single female produces one or two clutches per reproductive season (Ino, 1950; Inoue, 1981; Deguchi *et al.*, 1991; Nakamura, 1994; Minagawa, 1997; Nonaka *et al.*, 2000); female fecundity ranges ~100–800 thousands of eggs per clutch and it increases with increasing female body size (Ino, 1950; Nonaka, 1998).

We previously investigated the effects of male and female body size on mating behavior and spawning success of *P. japonicus* under laboratory conditions for the development of effective broodstock management techniques (Jinbo *et al.*, 2017). Lobsters of each sex were divided into three body-size groups based on the maximum sizes observed in landings and the minimum sizes at sexual maturity. Pairings for each of the nine combinations among the large-, medium-, and small-size groups of each sex were held in a tank, and mating behavior was observed in 21 pairs by video recording. This study showed that smaller males tended to have difficulty manipulating and holding larger females, and the total number of copulations per couple and the duration of a single copulation were higher with smaller males, suggesting that females require multiple matings to increase the probability of fertilization. Additionally, the spawning success rate tended to increase when females mated with larger males. Our previous mating experiments thus suggest that small-size males are disadvantageous for use as broodstock for larviculture.

In decapod crustaceans, including palinurid lobsters, larger males have long been known to have higher reproductive potential in terms of ejaculate size and mating

frequency (e.g., Powell *et al.*, 1974; Atema, 1986; MacDiarmid & Butler, 1999; Kendall *et al.*, 2001; MacDiarmid & Stewart, 2005; Sato *et al.*, 2005, 2008; Butler *et al.*, 2011, 2015; Magallón-Gayón *et al.*, 2011; Pugh *et al.*, 2015). Little is known about the reproductive potential of male *P. japonicus* during the reproductive season. To evaluate the reproductive potential of different sized *P. japonicus* males for use in the development of broodstock management techniques, we cultured a single male from large-, medium-, and small-size groups in tanks stocked with multiple females, and determined the female spawning success.

## MATERIAL AND METHODS

### *Test animals*

Test lobsters were captured using a commercial gill net between 6 and 15 April 2008, just before the beginning of the reproductive season in the same fishing ground along the Pacific coast off Minamiizu, Shizuoka Prefecture, Japan. Considering the maximum body size (~90 mm CL) (Jinbo *et al.*, 2017) and the minimum size at functional and sexual maturity (~54 mm CL) (Minagawa & Higuchi, 1997; Minagawa, 1999; Jinbo *et al.*, 2017), we selected nine intact males with all appendages from the landings. A total of 90 intact mature females were also selected from the dominant size class (~54–60 mm CL) in the landings. All lobsters were transferred to the Minamiizu Laboratory, National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research and Education Agency. Body weight and CL of individual lobsters were measured. Males were divided into three size groups (mean CL  $\pm$  standard deviation): large-size (89.6  $\pm$  1.0 mm, 88.6–90.6 mm,  $N = 3$ ), medium-size (70.8  $\pm$

1.3 mm, 69.3–71.9 mm,  $N = 3$ ), and small-size ( $57.2 \pm 0.9$  mm, 56.1–57.7 mm,  $N = 3$ ) lobsters. The CL of females was  $57.9 \pm 1.5$  mm (54.5–60.6 mm,  $N = 90$ ). There are no unfished *P. japonicus* populations in Japan and the maximum CL values of the lobsters are similar throughout the fishing areas (Harada, 1957; Inoue, 1981; Minagawa & Higuchi, 1997; Yamakawa, 1997). The sizes of the test males used in the present study are, therefore, considered to be representative of the size range of male *P. japonicus* populations in Japanese coastal areas.

### *Mating experiments*

We conducted mating experiments from 18 April to 15 June 2008 during the reproductive season (Deguchi *et al.*, 1991; Minagawa, 1997; Nonaka *et al.*, 2000). We used three circular fiberglass-reinforced plastic tanks (1.9 m diameter  $\times$  0.7 m depth; 2.0 kl volume; actual water volume, 1.7 kl) in a laboratory; each tank was equally divided into three compartments using plastic nets. The tanks were filled with sand-filtered seawater as part of a flow-through system ( $25 \text{ l min}^{-1}$ ) under natural seawater temperature ( $19.5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1.1 \text{ }^\circ\text{C}$ ; range, 17.3–21.7  $^\circ\text{C}$ ) and photoperiod conditions (14 h light:10 h dark). Large-, medium-, and small-size males were individually stocked in compartments of the same tank to maintain identical culture conditions across the respective body size groups. Ten females were included for each male in the test tank compartments, and the body size of females was similar in all compartments. Two concrete blocks were laid at the bottom of each compartment to support the vertical posture of the female while laying eggs (Nagai, 1956; Deguchi, 1988; Deguchi *et al.*, 1991). Body sizes of lobsters stocked in each compartment of the tanks are summarized in Table 1. Lobsters in each compartment were fed thawed krill, *Euphausia superba* (Dana, 1850) (10% of total lobster weight) three times per week.

We did not monitor the mating behavior of the lobsters. We did not check the presence/absence of the spermatophores on the posterior thorax of the females because the copulation of *P. japonicus* generally occurs from the evening through the nighttime periods and females generally lay eggs within 10 h after copulation (Jinbo *et al.*, 2017). We evaluated the reproductive potential of males by examining oviposition, egg fertilization rate, and clutch size for partner females. We checked female spawning by visual observation daily at 13:00. If a female had laid eggs, the female was removed from the tank and transferred to another transparent polycarbonate columnar tank (500 l volume; actual water volume, 350 l) as part of a flow-through seawater system ( $2.8 \text{ l min}^{-1}$ ) to be reared for three days. A small number of eggs were then taken from multiple locations within the clutch to measure fertilization rate, and each female with an egg mass was humanly sacrificed and stored at  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  to estimate the clutch size. Egg fertilization rates were determined according to the method of Rondeau & Sainte-Marie (2001). The eggs were fixed for 1 h in a solution of 97% glucamine-acetate (GA) buffer, 2% formalin, and 1% Triton-X, and then rinsed in GA buffer. The eggs were stained for 1 h in a solution of  $0.5 \text{ }\mu\text{g/ml}$  Hoechst dye in GA buffer and were then rinsed twice and preserved in GA buffer at  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . About 200 eggs were observed under a fluorescence microscope (Nikon Co. Ltd., Tokyo, Japan), and the number of cleaved eggs with fluorescent nuclei was counted. The clutch size of each female was represented by the dry weight of egg masses. Eggs attached to pleopods were carefully removed from each berried female using small forceps, and the weight of eggs was determined after drying for 36 h at  $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Females that had not laid any eggs by the end of experiments (15 June 2008) were dissected for observation and measurement of the gonad. The gonadosomatic index

(GSI) was calculated as  $GSI = (GW)/(CL^3) \times 10^5$ , where GW is gonad weight and CL is carapace length (Minagawa, 1997, 1999).

### *Statistical analysis*

All statistical analyses were performed using the R statistical software (R3.3.2; R Core Team, 2016) with a 5% significance level. To examine the effects of male body size on female spawning success, we applied a generalized linear mixed-effects model (GLMM) (Zuur *et al.*, 2009). The following response variables were used in the GLMM analyses, showing an error distribution and a link function that relates the mean of the response to the linear predictors in the model in parenthesis: 1) oviposition rate (binomial distribution and logit link); 2) body size (CL) of spawned females (Gaussian distribution and identity link); 3) number of elapsed days to oviposition from the onset of experiments (Poisson distribution and log link); 4) fertilization rate (binomial distribution and logit link); and 5) clutch size (Gaussian distribution and identity link). To avoid the errors attributed to zero data in the GLMM analyses with the binomial distribution, the medium size group showing a 100% oviposition rate was excluded from the analysis for oviposition rate. One berried female that had copulated with a large male in tank no. 1 was also excluded from the analysis for clutch size because a large portion of the egg mass was dislodged when she was removed from the tank. In the GLMM analyses, male body size (CL) was used as a continuous explanatory variable. Additional explanatory variables included in the analyses were the number of elapsed days until oviposition for evaluating fertilization rate, and female CL and fertilization rate for clutch size. The time between oviposition events was not included as an explanatory variable for evaluating fertilization rate because it was not determined for some females that laid

eggs on the same day in the same compartment. The identification numbers of test tanks and males were included as random intercept effects, taking into account the potential correlations of incidence in a shared tank and repeated measures from a single male (Zuur *et al.*, 2009). The parameters with standard errors ( $z$  or  $t$  values with probabilities) of the GLMM were estimated using the *glmer* (binomial and Poisson distributions) or *lmer* (Gaussian distribution) function implemented in the *lme4* package (Bates *et al.*, 2015).

## RESULTS

The results of the GLMM analyses are summarized in Table 2. The plus (or minus) signs of the coefficient estimates for the explanatory variables indicate that the positive (or negative) effects on the response variables. Male body size had a significant positive effect on the oviposition rate ( $P = 0.009$ ; the medium-size male group was excluded from the analysis) (Table 2); the oviposition rate varied between 30%–80% (mean 60.0%) in the small-size male group, whereas almost all females (90%–100%) laid eggs in the large- and medium-size male groups (means 96.7% and 100%, respectively) (Table 1). Gonads of unspawned females showed bright orange color and the GSI values ranged 0.94–6.19 at the end of experiments.

Male body size and the number of elapsed days until oviposition did not significantly affect the CL values of spawned females ( $P = 0.705$  and  $0.425$ , respectively) (Tables 1, 2). Egg-laying occurred between 17–53 days during the experiments (Table 1). The number of elapsed days until oviposition tended to

increase with increasing body size of males ( $P = 0.051$ ) (Table 2), but this is because some females did not spawn in the small-size male group.

Egg fertilization rates are shown in Figure 1 for each female stocked with respective males in three body size groups in accordance with the number of elapsed days until oviposition. Male body size and the number of days elapsed until oviposition showed significant positive and negative effects on egg fertilization rates, respectively (both  $P < 0.0001$ ) (Table 2). Mean fertilization rates were the highest in the large-size male group (93.5%–99.9%), followed by the medium-size male group (57.0%–99.5%), and the lowest in the small-size male group (27.9%–72.3%) (Table 1). Fertilization rates were generally high (above 95%) in the large-size male group except for a male of 88.6 mm CL (L2) that decreased the fertility of the 8<sup>th</sup>–10<sup>th</sup> spawned females to 73.5%–89.5%. Female fertilization rate decreased after the first few spawners in one medium-sized male treatment and all three small male treatments, leaving later-spawning females with fertilization rates from 0%–62%. There were several instances where multiple females laid eggs on the same day in the compartment of L2 male (3<sup>rd</sup>–5<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> spawners), L3 male (6<sup>th</sup>–8<sup>th</sup> spawners), M1 male (9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> spawners), M2 male (4<sup>th</sup>–5<sup>th</sup> spawners), M3 male (1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> spawners), and S2 male (2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> spawners). In these cases, fertilization rates were high (above 98%), except for 8<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> spawners showing 73.5%–82.5% fertility in the compartment of L2 male (Fig. 1).

Clutch size was not affected by male body size ( $P = 0.692$ ) (Table 2). The relationship between female body size and clutch size is shown in Figure 2. To visually infer the effect of egg fertilization rate on clutch size, data points are plotted by separating either  $> 50\%$  or  $< 50\%$  fertilization rates. Clutch size significantly

increased with increasing female body size ( $P < 0.0001$ ), but it significantly decreased with decreasing fertilization rate ( $P = 0.009$ ) (Table 2).

## DISCUSSION

We investigated the effects of body size on the reproductive potential of the males of the Japanese spiny lobster *P. japonicus* under laboratory conditions. In the large-size male group, nine to ten females spawned per male, and they showed high fertility of eggs ( $> 94.0\%$ ), except for the 8<sup>th</sup>–10<sup>th</sup> spawned females (73.5%–89.5%) stocked with one male. In the medium-size male group, all females (ten individuals) spawned per male, and they generally resulted in high fertility of eggs ( $> 82.5\%$ ), but the 6<sup>th</sup>–10<sup>th</sup> spawners stocked one male decreased the fertility to 0%–62.0%. In small-size male group, 3–7 females spawned per male, and a high fertility ( $> 92.0\%$ ) was observed for only the 1<sup>st</sup>–6<sup>th</sup> spawn, after which females reproduced almost all unfertilized eggs. Thus, the rate of spawning success greatly decreased when females were stocked with small-size males.

The females that had not spawned were dissected to investigate gonad condition at the end of the experiments. Their gonads appeared orange, suggesting an accumulation of yolk in the ovarian eggs (see Berry, 1971; Minagawa & Sano, 1997; Matsuda *et al.*, 2002). The GSI values of unspawned females (0.94–6.19) were, however, much lower than those of maturation-stage ovaries (11.33–12.43; see Minagawa & Sano, 1997). Females used in our work were collected at the same time from the same fishing ground. They were then stocked into the test compartments in order to be of the same body-size compositions, and almost all females spawned in

the compartments stocked with large- and middle-size males. Consequently, it is considered that females with undeveloped ovaries have also been tended to be assigned to small-size males. It is therefore suggested that unspawned females might reabsorb ripe eggs in the ovary as is known to occur in unmated female of the spiny rock lobster *Jasus edwardsii* (Hutton, 1875) (MacDiarmid & Butler, 1999). Lower oviposition rates of *P. japonicus* females were also observed in pairing experiments with small-size males in our previous study (Jinbo *et al.*, 2017), and fewer ovipositions of females cultured with a single small male have been reported for *J. edwardsii* (MacDiarmid & Butler, 1999).

Large-, medium-, and small-size males were individually stocked with ten females in the same tank, albeit separated by nets (3 males and 30 females in a tank and 11 lobsters in one compartment with an area of  $\sim 0.9 \text{ m}^2$ ) to maintain identical culture conditions across the respective body size groups. *Panulirus japonicus* is nocturnal and aggregates under and in crevices of rocky reefs (Nonaka, 1966). Although lobster densities in natural habitats are unknown, our stocking density (biomass) should not negatively affect lobsters because of the absence of animal mortality during the experiments and the high oviposition rates in large- and medium-size male groups. In the limited space of the compartment, however, there might be female-female competition for small-size males with low reproductive ability (see below), with the potential for females to interfere with mating and spawning of other females under sperm-limited conditions. The experimental design also might have affected male behavior and female mate choice as a result of chemical cues that could have passed throughout the tank. Allocation of male reproductive effort among ten females stocked in the same compartment might be affected from other 20 females in the same tank. Raethke *et al.* (2004) examined the role of olfaction during mating in *J.*

*edwardsii* and demonstrated that large females normally choose large males, but that the females did not make a clear choice of mate when the output of urine, which contains sex-specific pheromones, was switched between large and small catheterized males. *Panulirus japonicus* females might allow the small-size males to copulate with them as a result of being in contact with urine from large and medium-size males. Our mating experiments nevertheless demonstrated that small-size males (56–58 mm CL) of *P. japonicus* had low reproductive ability.

It has been demonstrated that large male palinurid lobsters, such as *Panulirus argus* (Latreille, 1804), *P. guttatus* (Latreille, 1804), and *J. edwardsii*, have heavier spermatophores containing more sperm cells (MacDiarmid & Butler, 1999; MacDiarmid & Sainte-Marie, 2006; Magallón-Gayón *et al.*, 2011; Butler, *et al.*, 2011, 2015; Robertson & Butler, 2013). The effects of male body size on the fertilization success of females have not been evaluated by measuring fertility of females as was done in the present study, although it has been previously demonstrated that clutches fertilized by small males are smaller than those fertilized by large males (MacDiarmid & Butler, 1999; MacDiarmid & Sainte-Marie, 2006; Robertson & Butler, 2013; Butler *et al.*, 2015). *Panulirus argus* males could allocate their reproductive effort among partners, scaling the amount of ejaculate deposited relative to female body size (MacDiarmid & Butler, 1999). Moreover, the size of the *P. argus* spermatophore deposited on the sternum of females affects clutch weight more than female size does (MacDiarmid & Butler, 1999; Butler *et al.*, 2015). In *P. argus*, unfertilized eggs failed to attach to the female's pleopods after spawning, and counts of the number of unattached eggs collected from the tank bottom and fertilized eggs incubated by females were used to evaluate the fertilization success (Butler *et al.*, 2015). Butler *et al.* (2015) reported that smaller spermatophores do not change the

number of eggs spawned by females, but do reduce fertilization success, indicating that the smaller clutches produced by females mated with small males are not a result of reduced egg output but reflect a sperm limitation for fertilization success.

Minagawa & Higuchi (1997) and Minagawa (1999) examined the relationship between body size (CL) and sexual maturity in *P. japonicus* males using a histological study of the testis and vas deferens. All males examined ( $\geq 37$  mm CL) had sperm in the testis and vas deferens, but some ( $< 53$  mm CL) lacked sperm in the middle part of the vas deferens. They suggested that development in the middle vas deferens, the number of reserved sperm, the spermatophoric matrix, and sperm density were sufficient for mating when males reached 52–54 mm CL. The GSI and sperm density in the middle part of the vas deferens also reaches a plateau above 54 mm CL and gonad weight increases with increasing male body size, suggesting that large *P. japonicus* males produce more ejaculate than small males do. It is therefore hypothesized that all small males and one medium male depleted their sperm reserves and deposited an insufficient amount of sperm after successive matings, resulting in low and/or no fertility of female partners. One large male might have decreased the fertility of females when on mating with the 8<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> partners within one day. We did not confirm the presence or absence of the spermatophores on the posterior thorax of the females. It was therefore difficult to interpret whether female mate choice might have prevented mating, and to indicate whether or not mating took place for those females with unfertilized clutches or who did not spawn. A methodology to measure the spermatophores deposited on the underside of females should be developed to further evaluate the male reproductive ability and female mate choice of *P. japonicus*,

Clutch size attached to the pleopods of *P. japonicus* females was significantly correlated with female body sizes as was previously established for this species (Nonaka, 1988; Jinbo *et al.*, 2017). Although the body size of *P. japonicus* males did not significantly affect the clutch size of partners, the egg fertilization rates, which were mediated by the male reproductive tract, significantly affected clutch size; lower fertility reduced the clutch size. We found unfertilized eggs typically attached to the pleopods as previously reported in *P. japonicus* (Deguchi, 1988) and in *P. homarus* (Linnaeus, 1758) (Berry, 1970). It has been also reported that all unfertilized eggs were, however, picked from the pleopods within 1–3 weeks in these lobsters (Berry, 1970; Deguchi, 1988). In the present study, some unfertilized eggs might have been lost before sacrificing berried females three days after egg-laying to measure their clutch sizes, resulting in smaller clutches that reflect a sperm limitation for fertilization success. It should be noted, however, that fertilization rates, excluding 0%, might be overestimated because unfertilized eggs would have dropped off and not been counted for, although it did not mask the phenomenon that lower fertility reduced the clutch size.

Both male and female body size generally affect mating behavior and reproductive success in spiny lobsters (Kittaka & MacDiarmid, 1994, MacDiarmid & Butler, 1999; MacDiarmid & Sainte-Marie, 2006; Robertson & Butler, 2013; Butler *et al.*, 2015; Jinbo *et al.*, 2017). Larger males have higher reproductive potential (MacDiarmid & Butler, 1999; MacDiarmid & Sainte-Marie, 2006; Magallón-Gayón *et al.*, 2011; Butler, *et al.*, 2011, 2015; Robertson & Butler, 2013); they dominate smaller males in mating with females (Berry, 1970; Lipcius, 1985; MacDiarmid, 1989; Robertson & Butler, 2013), and larger females seek multiple copulations or larger males because more sperm is required to ensure fertilization success of their eggs (Mota Alves &

Paiva, 1976; Kittaka & MacDiarmid, 1994; Magallón-Gayón et al., 2011; Robertson & Butler, 2013; Butler *et al.*, 2015). Our previous work (Jinbo *et al.*, 2017) demonstrated that small males of *P. japonicus* were disadvantageous in mating behavior with large females. Our mating experiments during the present study also highlighted the size-dependent reproductive potential of *P. japonicus* males. In some populations of commercially fished decapod crustaceans, size-selective harvesting of larger males with higher reproductive potential likely results in sperm limitation, leading to a decline in the reproductive output of the resources (Carver *et al.*, 2005; Sato & Goshima, 2006; Sato *et al.*, 2007, 2010). In *P. japonicus*, fishing regulations, including a legal minimum size limit (usually >42 mm CL), and a closed fishing season during the reproductive season, have been implemented to help preserve this resource. Size-selective harvesting of larger males has so far not been involved in *P. japonicus* fishing and few variations of the body size compositions have been observed in landings of the species (Yamakawa, 1997; Nonaka, 1998; Nonaka *et al.*, 2000). Populations of *Panulirus japonicus* might be at low risk of sperm limitation under current fishing practices.

Considering our present and previous results (Jinbo *et al.*, 2017), smaller males (less than ~60 mm CL) are not recommended for use as broodstock in larviculture of *P. japonicus*. Our results, however, are based on laboratory experiments using a single male with multiple females and single male and female pairs. Future studies are, therefore, needed to investigate details of mating systems and reproductive ecology in actual broodstock tanks stocked with multiple males and females because reproductive success is likely to be affected by intrasexual and/or intersexual selection, i.e., male competition, female mate choice, and sex ratio (MacDiarmid, 1989; Kittaka & MacDiarmid, 1994; Debuse *et al.*, 1999, 2003; MacDiarmid &

Butler, 1999; Gosselin *et al.*, 2003; Vijayakumaran *et al.*, 2005; Galeotti *et al.*, 2006, 2009; Magallón-Gayón *et al.*, 2011).

## REFERENCES

- Atema, J. 1986. Review of sexual selection and chemical communication in the lobster *Homarus americanus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **43**: 2283–2290.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. & Walker, S. 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, **67**: 1–48.
- Berry, P.F. 1970. Mating behavior, oviposition and fertilization in the spiny lobster *Panulirus homarus* (Linnaeus). *South African Association for Marine Biological Research, Oceanographic Research Institute, Investigational Report*, **24**: 1–16.
- Berry P. F. 1971. The biology of the spiny lobster *Panulirus homarus* (Linnaeus) off the East coast of Southern Africa. *South African Association for Marine Biological Research, Oceanographic Research Institute Investigational Report*, **28**: 1–75.
- Butler, M.J. IV, Heisig-Mitchell, J.S., MacDiarmid, A.B. & Swanson, R.J. 2011. The effect of male size and spermatophore characteristics on reproduction in the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus*. *New Frontiers in Crustacean Biology*, **15**: 69–84.
- Butler, M.J. IV, MacDiarmid, A. & Gnanalingam, G. 2015. The effect of parental size on spermatophore production, egg quality, fertilization success, and larval characteristics in the Caribbean Spiny lobster, *Panulirus argus*. *ICES Journal of Marine Science*, **72** (Supplement 1): i115–i123.

- Carver, A. M., Wolcott, T. G., Wolcott, D. L. & Hines, A. H. 2005. Unnatural selection: Effects of a male-focused size-selective fishery on reproductive potential of a blue crab population. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **319**: 29–41.
- Dana, J.D. 1850. Synopsis generum crustaceorum ordinis “Schizopoda”. *American Journal of Science and Arts*, **9**: 129–133.
- Debuse, V.J., Addison, J.T. & Reynolds, J.D. 1999. The effects of sex ratio on sexual competition in the European lobster. *Animal Behaviour*, **58**: 973–981.
- Debuse, V.J., Addison, J.T. & Reynolds, J.D. 2003. Effects of breeding site density on competition and sexual selection in the European lobster. *Behavioral Ecology*, **14**: 396–402.
- Deguchi, Y. 1988. II. Copulation and Spawning, 5. Spiny lobster. In: *Seed production of decapod crustaceans* (R. Hirano, ed.), pp. 64–75. Kouseisha Kouseikaku, Tokyo [in Japanese].
- Deguchi, Y., Sugita, H. & Kanemoto, F. 1991. Spawning control of the Japanese spiny lobster. *Memoirs of the Queensland Museum*, **31**: 449.
- Galeotti, P., Rubolini, D., Fea, G., Ghia, D., Nardi, P.A., Gherardi, F. & Fasola, M. 2006. Female freshwater crayfish adjust egg and clutch size in relation to multiple male traits. *Proceeding of the Royal Society B*, **273**: 1105–1110.
- Galeotti, P., Rubolini, D., Pupin, F., Sacchi R., Altobelli, E., Nardi, P. A. & Fasola, M. 2009. Presence of rivals reduces mating probability but does not affect ejaculate size in the freshwater crayfish *Austropotamobius italicus*. *Behaviour*, **146**: 45–68.

- Gosselin, T., Sainte-Marie, B. & Bernachetz, L. 2003. Patterns of sexual cohabitation and female ejaculate storage in the American lobster (*Homarus americanus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **55**: 151–160.
- Harada, E. 1957. Ecological observations on the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold), in its larval and adult life. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory*, **6**: 99–122.
- Hutton, F.W. 1875. Descriptions of two new species of Crustacea from New Zealand. *Transactions and Proceedings of the New Zealand Institute*, **7**: 279–280.
- Ino, T. 1950. Observation of the spawning cycle of Ise-ebi, (*Panulirus japonicus* (v. Siebold)). *Nippon Suisan Gakkaishi*, **15**: 725–727 [in Japanese].
- Inoue, M. 1981. Studies on the cultured phyllosoma larvae of the Japanese spiny lobster, *Panulirus japonicus* (V. Siebold). *Special Report of the Kanagawa Prefectural Fishery Experimental station*, **1**: 1–91 [in Japanese with English abstract].
- Jinbo, T., Sugiyama, A., Murakami, K. & Hamasaki, K. 2017. Effects of body size on mating behavior and spawning success of Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824) (Decapoda: Palinuridae): implications for broodstock management techniques. *Journal of Crustacean Biology*, **37**: 90–98.
- Kendall, M. S., Wolcott, D. L., Wolcott, T. G. & Hines, A. H. 2001. Reproductive potential of individual male blue crabs, *Callinectes sapidus*, in a fished population: depletion and recovery of sperm number and seminal fluid. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **58**: 1168–1177.
- Kittaka, J. & MacDiarmid, A.B. 1994. Breeding. In: *Spiny lobster management* (B.F. Phillips, J.S. Cobb & J. Kittaka, eds.), pp. 384–401. Blackwell, Oxford.

- Latreille, P.A. 1804. Des langoustes du Museum National d'Histoire Naturelle. *Annales du Muséum national d'Histoire naturelle* (Paris), **3**: 388–395.
- Linnaeus, C. 1758. *Systema Naturae per Regna Tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis*, **Vol. 1**, Edn.10. Laurentii Salvii, Holmiae [= Stockholm].
- Lipcius, R. N. 1985. Size-dependent reproduction and molting in spiny lobsters and other long-lived decapods. In: *Factors in adult growth* (A. M. Wenner, ed.). *Crustacean Issues*, **3**: 129–148. A. A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands.
- MacDiarmid, A.B. 1989. Size at onset of maturity and size-dependent reproductive output of female and male spiny lobsters *Jasus edwardsii* (Hutton) (Decapoda, Palinuridae) in northern New Zealand. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **127**: 229–243.
- MacDiarmid, A.B. & Butler, M.J. IV. 1999. Sperm economy and limitation in spiny lobsters. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **46**: 14–24.
- MacDiarmid, A.B. & Sainte-Marie, B. 2006. Reproduction. In: *Lobsters: biology, management, aquaculture, and fisheries* (B.F. Phillips, ed.), pp. 45–77. Blackwell, Oxford.
- MacDiarmid, A. & Stewart, R. 2005. Male mating capacity in the New Zealand red rock lobster. *The Lobster Newsletter*, **18**: 7.
- Magallón-Gayón, E., Briones-Fourzán, P. & Lozano-Álvarez, E. 2011. Does size always matter? Mate choice and sperm allocation in *Panulirus guttatus*, a highly sedentary, habitat-specialist spiny lobster. *Behaviour*, **148**: 1333–1358.
- Matsuda, H. & Takenouchi, T. 2007. Development of technology for larval *Panulirus japonicus* culture in Japan: a review. *Bulletin of Fisheries Research Agency*, **20**: 77–84.

- Matsuda, H., Takenouchi, T. & Yamakawa, T. 2002. Effects of photoperiod and temperature on ovarian development and spawning of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Aquaculture*, **205**: 385–398.
- Minagawa, M. 1997. Reproductive cycle and size-dependent spawning of female spiny lobsters (*Panulirus japonicus*) off Oshima Island, Tokyo, Japan. *Marine and Freshwater Research*, **48**: 869–874.
- Minagawa, M. 1999. Quantitative analysis of the seasonality of male reproduction in the spiny lobster *Panulirus japonicus* (Decapoda: Palinuridae). *Journal of Crustacean Biology*, **19**: 276–282.
- Minagawa, M. & Higuchi, S. 1997. Analysis of size, gonadal maturation, and functional maturity in the spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Journal of Crustacean Biology*, **17**: 70–80.
- Minagawa, M. & Sano, M. 1997. Oogenesis and ovarian development cycle of the spiny lobster *Panulirus japonicus* (Decapoda: Palinuridae). *Marine and Freshwater Research*, **48**: 875–888.
- Mota Alves, M.I. & Paiva, M.P. 1976. Frenquencia de acasalamentos em lagostas do genero *Panulirus* White (Decapoda, Palinuridae). *Arquivos de Ciências do Mar*, **16**: 61–63.
- Murakami, K. 2011. *Growth characteristics and improvement in rearing techniques of phyllosoma larvae in Japanese spiny lobster Panulirus japonicus*. Ph.D. thesis, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo [in Japanese].
- Murakami, K., Jinbo, T. & Hamasaki, K. 2007. Aspects of the technology of phyllosoma rearing and metamorphosis from phyllosoma to puerulus in the Japanese spiny lobster reared in the laboratory. *Bulletin of Fisheries Research Agency*, **20**: 59–67.

- Nagai, H. 1956. Copulation and spawning of the Japanese spiny lobster. *Aquaculture Science*, **4**: 9–11 [in Japanese].
- Nakamura, K. 1994. Maturation. In: *Spiny lobster management* (B. F. Phillips, J. S. Cobb & J. Kittaka, eds.), pp. 374–383. Blackwell, Cambridge, UK.
- Nonaka, M. 1966. Experiments on the habitat selection of the Japanese spiny lobster. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **32**: 630–638 [in Japanese].
- Nonaka, M. 1998. I. Ecology and Maturation, 2. Spiny lobster. In: *Seed production of decapod crustaceans* (R. Hirano, ed.), pp. 29–38. Kouseisha Kouseikaku, Tokyo [in Japanese].
- Nonaka, M., Fushimi, H. & Yamakawa, T. 2000. The spiny lobster fishery in Japan and restocking. In: *Spiny lobsters: fisheries and culture*, Edn. 2. (B.F. Phillips & J. Kittaka, eds.), pp. 221–242. Fishing News Books, Oxford.
- Powell, G. C., James, K. E. & Hurd, C. H. 1974. Ability of male king crab, *Paralithodes camtschatica*, to mate repeatedly, Kodiak, Alaska, 1973. *Fishery Bulletin*, **72**: 171–179.
- Pugh, T. L., Comeau, M., Benhalima, K. & Watson, W. H. 2015. Variation in the size and composition of ejaculates produced by male American lobsters, *Homarus americanus* H. Milne Edwards, 1837 (Decapoda: Nephropidae). *Journal of Crustacean Biology*, **35**: 593–604.
- R Core Team. 2016. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna [<http://www.R-project.org/>].
- Raethke, N., MacDiarmid, A. B. & Montgomery, J. C. 2004. The role of olfaction during mating in the southern temperate spiny lobster *Jasus edwardsii*. *Hormones and Behaviour*, **46**: 311–318.

- Robertson, D. N. & Butler, IV. M. J. 2013. Mate choice and sperm limitation in the spotted spiny lobster, *Panulirus guttatus*. *Marine Biology Research*, **9**: 69–76.
- Rondeau, A. & Sainte-Marie, B. 2001. Variable mate-guarding time and sperm allocation by male snow crabs (*Chionoecetes opilio*) in response to sexual competition, and their impact on the mating success of females. *Biological Bulletin*, **201**: 204–217.
- Sato, T. & Goshima, S. 2006. Impacts of male-only fishing and sperm limitation in manipulated populations of an unfished crab, *Hapalogaster dentata*. *Marine Ecology Progress Series*, **313**: 193–204.
- Sato, T., Ashidate, M., Wada, S. & Goshima, S. 2005. Effects of male mating frequency and male size on ejaculate size and reproductive success of female spiny king crab *Paralithodes brevipes*. *Marine Ecology Progress Series*, **296**: 251–262.
- Sato, T., Ashidate, M., Jinbo, T. & Goshima, S. 2007. Does male-only fishing influence reproductive success of the female spiny king crab, *Paralithodes brevipes*? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **64**: 735–742.
- Sato, T., Yoseda, K., Abe, O. & Shibuno, T. 2008. Male maturity, number of sperm, and spermatophore size relationships in the coconut crab *Birgus latro* on Hatoma island, southern Japan. *Journal of Crustacean Biology*, **28**: 663–668.
- Sato, T., Yoseda, K., Okuzawa, K. & Suzuki, N. 2010. Sperm limitation: possible impacts of large male-selective harvesting on reproduction of the coconut crab *Birgus latro*. *Aquatic Biology*, **10**: 23–32.
- Seko, S., Abe, F., Tsuchihashi, Y., Ichikawa, K., Arai, N. & Mitamura, H. 2017. Behavior and migration of artificial produced juveniles of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* tracked by biotelemetry method. In: *Program and*

- Abstract* (N. Kanno, ed.), p. 41. The Japanese Society of Fisheries Science, Spring Meeting 2017, Tokyo [in Japanese].
- Sekiguchi, H. 1997. Larval recruitment processes of Japanese spiny lobsters: a hypothesis. *Bulletin of Marine Science*, **61**: 43–55.
- von Siebold, P.F. 1824. *De Historiae Naturalis in Japonia statu, nec non de augmento emolumentisque in decursu perscrutationum exspectandis dissertatio, cui accedunt Spicilegia Faunae Japonicae, auctore G. T. de Siebold, med. doct. Complurium Societatum Membro*. Batavisch Genootschap van Kunsten en Wetenschappen, Batavia [= Jakarta].
- Vijayakumaran, M., Senthil Murugan, T., Remany, M. C., Mary Leema, T., Dilip Kumar, J., Santhankumar, J., Venkatesan, R. & Ravindran, M. 2005. Captive breeding of the spiny lobster, *Panulirus homarus*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **39**: 325–334.
- Yamakawa, T. 1997. Growth, age composition, and recruitment of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* estimated from multiple length frequency analysis. *Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Oceanography*, **61**: 23–32 [in Japanese with English abstract].
- Zuur, A.F., Ieno, E.N., Walker, N.J., Saveliev, A.A. & Smith, G.M. 2009. *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Springer, New York.

**Table 1** Carapace length (CL) and reproductive condition of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* in the mating experiments.

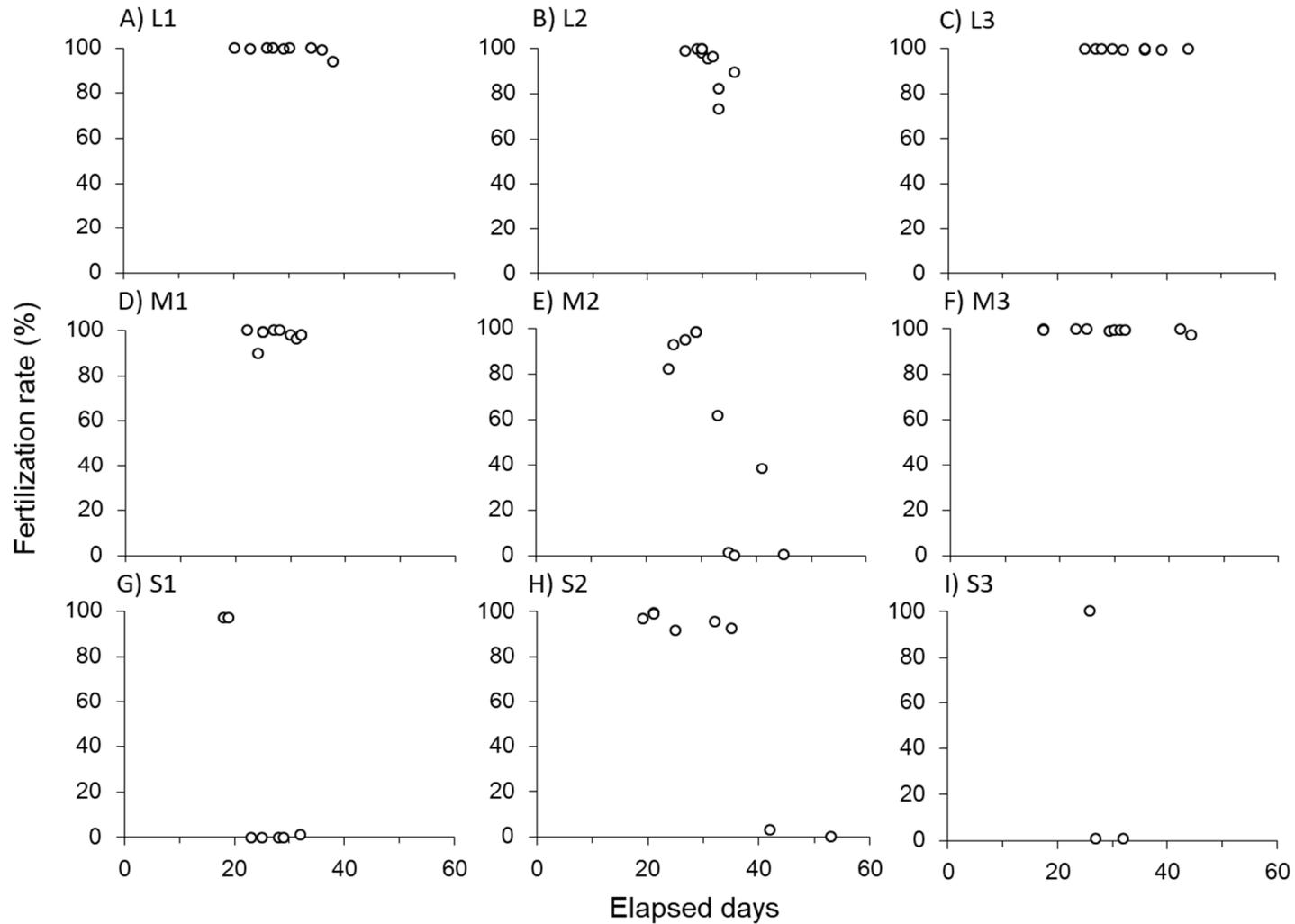
Group	Tank no.	Male		Female stocked		Female spawned			
		ID no.	CL (mm)	Number of lobsters	CL (mm)	Number of lobsters	CL (mm)	Days to spawn	Fertility (%)
Large	1	L1	89.5	10	58.2 (55.4–59.7)	9	58.4 (55.4–59.7)	29.2 (20–38)	99.1 (94.0–100)
	2	L2	88.6	10	58.2 (54.5–60.4)	10	58.2 (54.5–60.4)	31.1 (27–36)	93.5 (73.5–100)
	3	L3	90.6	10	57.2 (54.9–58.6)	10	57.2 (54.9–58.6)	33.3 (25–44)	99.9 (99.5–100)
Medium	1	M1	71.1	10	58.0 (55.9–60.2)	10	58.0 (55.9–60.2)	27.6 (22–32)	98.0 (90.0–100)
	2	M2	71.9	10	57.6 (54.8–59.7)	10	57.6 (54.8–59.7)	32.4 (24–45)	57.0 (0.0–98.5)
	3	M3	69.3	10	57.8 (54.7–59.9)	10	57.8 (54.7–59.9)	29.0 (17–44)	99.5 (97.5–100)
Small	1	S1	57.7	10	58.2 (55.2–60.6)	7	58.1 (55.2–60.6)	24.9 (18–32)	27.9 (0.0–97.0)
	2	S2	57.7	10	58.6 (55.9–60.3)	8	58.5 (55.9–60.3)	31.0 (19–53)	72.3 (0.0–99.5)
	3	S3	56.1	10	57.6 (55.2–59.4)	3	57.6 (56.4–58.4)	28.3 (26–32)	33.7 (0.5–100)

Data: mean (range).

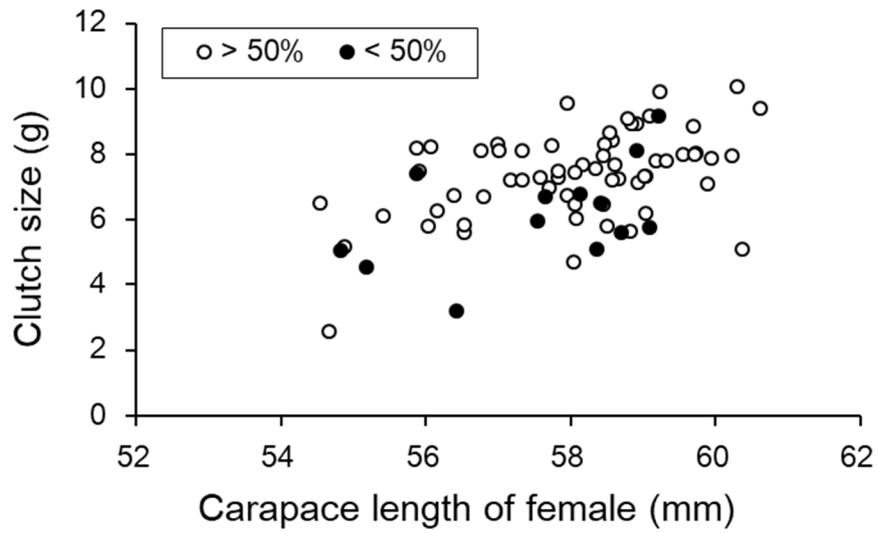
**Table 2** Evaluation of the effects of body sizes (carapace length, CL), number of elapsed days to oviposition from the onset of experiments, and fertilization rate of eggs on reproductive aspects of Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*.

Response variables	Explanatory variables	Coefficient estimate	Std. error	<i>t</i> or <i>z</i> value	<i>P</i>
Oviposition rate	Male CL	0.0980	0.0376	2.604	<b>0.009</b>
CL of spawned females	Male CL	-0.0051	0.0134	-0.379	0.705
	Elapsed days to oviposition	-0.0199	0.0250	-0.797	0.425
Elapsed days to oviposition	Male CL	0.0032	0.0017	1.956	0.051
Fertilization rate	Male CL	0.2247	0.0500	4.500	<b>6.91×10<sup>-6</sup></b>
	Elapsed days to oviposition	-0.4289	0.0116	-37.110	<b>2.20×10<sup>-16</sup></b>
Clutch size	Male CL	-0.0050	0.0127	-0.396	0.692
	Female CL	0.4410	0.0985	4.478	<b>7.53×10<sup>-6</sup></b>
	Fertilization rate of eggs	1.1634	0.4481	2.596	<b>0.009</b>

Data were analyzed using a generalized linear mixed-effects model. Statistical *t*-values are shown for CL of spawned females and clutch size; *z*-values are provided for the other reproductive aspects.



**Figure 1** Relationship between the number of elapsed days until females spawned from the onset of mating experiments and egg fertilization rates in large- (A, B, C), medium- (D, E, F), and small-size male groups (G, H, I) of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (see Table 1 for identity of males).



**Figure 2** Relationship between female carapace length and clutch size (dry weight of egg mass) of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. Data points are plotted by separating either > 50% or < 50% fertilization rates of eggs.

## 第 3 章

種苗生産技術開発のための基礎的研究：  
イセエビフィロソーマ幼生の走光性および  
ケガニ幼生の適正な飼育環境条件

### 第 1 節

イセエビフィロソーマ幼生の  
成長に伴う走光性の変化

Ontogeny of phototactic behavior in phyllosoma larvae of the Japanese  
spiny lobster *Panulirus japonicus* (Decapoda: Palinuridae)

## 緒 言

イセエビ *Panulirus japonicus* は、主に日本周辺の太平洋沿岸域に分布し (Harada, 1957)、水産上重要な大型甲殻類の一つである (Nonaka *et al.*, 2000)。本種は増養殖の対象種であり、種苗生産技術の確立を目指して小型水槽を用いた人工飼育技術の開発が進められている (井上, 1981 ; Kittaka & Kimura, 1989 ; Sekine *et al.*, 2000 ; 松田, 2006 ; Matsuda & Takenouchi, 2006 ; Murakami *et al.*, 2007 ; 村上, 2011)。イセエビの幼生飼育では、50 L 規模の水槽を用いた場合、フィロソーマ幼生が水槽底面へ沈降・蟻集して個体干渉による体部位の損傷や細菌性疾病が発生し、生残率が 5 L 以下の水槽を用いた事例に比較して半分以下まで低下する (村上, 2011)。したがって、フィロソーマ幼生の沈降・蟻集現象を防ぐことは、幼生飼育技術の向上に向けた重要な課題となっている (Murakami *et al.*, 2007 ; 村上, 2011)。

イセエビ類のフィロソーマ幼生は、透明で扁平な体と長い付属肢をもつ (Anger, 2001 ; Phillips *et al.*, 2006)。沿岸域でふ化したイセエビのフィロソーマ幼生は黒潮本流を抜けて外洋へと移動し、黒潮南側の再循環域で成長を続けた後、最終期フィロソーマが黒潮本流へ再突入し、プエルルス幼生へ変態する。プエルルス幼生は遊泳能力に優れ、沿岸岩礁域に来遊し、着底生活に移行すると考えられている (Yoshimura *et al.*, 1999, 2009 ; Sekiguchi & Inoue, 2002 ; 吉村ら, 2010 ; Miyake *et al.*, 2015)。

一般に、十脚甲殻類の幼生は、日周鉛直移動によって海流や潮汐を利用し、海洋で移動分散するとともに、接岸回帰することができるといわれている (Sulkin, 1984 ; Forward Jr, 1988, 2001 ; Anger, 2001 ; Miyake *et al.*, 2015)。幼生の行動は、光、水温、塩分、比重、粘度などの物理的環境、また餌料や捕食者などの生物的環境に影響を受けるが、光はその反応の強さゆえ、特に幼生の日周

鉛直移動や水平移動に大きな影響を与えているものと考えられている (Anger, 2001 ; Forward Jr, 1988)。フィロソーマ幼生についても、日周鉛直移動を示し (Rimmer & Phillips, 1979 ; Minami *et al.*, 2001 ; Bradford *et al.*, 2005 ; Phillips *et al.*, 2006 ; 吉村ら, 2010 ; Butler, 2011 ; Miyake *et al.*, 2015), 同時に、その特徴的な形態によって海流の影響を受けて移動分散と回帰・着底を行っているものと推察されている (Rimmer & Phillips, 1979 ; 吉村ら, 2010 ; Hamasaki *et al.*, 2012)。イセエビ類のフィロソーマ幼生の光に対する反応として、カリブイセエビ *Panulirus argus* およびシマイセエビ *Panulirus penicillatus* では、初期フィロソーマ幼生が正の走光性を示したことが報告されている (Ritz, 1972 ; Matsuda *et al.*, 2006)。また、Butler *et al.* (2011) は、カリブイセエビにおいて、フィロソーマ幼生の発育段階ごとに走光性を調査し、初期では正の走光性を示したが、中期以降の幼生は光に反応しなかったことを報告している。イセエビでは、ふ化および初期のフィロソーマ幼生が正の走光性を示したが、その後は徐々に示さなくなったことが報告されている (税所, 1966 ; Matsuda & Takenouchi, 2006)。

このように、イセエビのフィロソーマ幼生も走光性を有することから、それを利用することで水槽内の幼生の行動を制御し、その浮遊性を確保するなど飼育方法を改良できる可能性がある (市川ら, 2014a, 2014b)。また、イセエビのフィロソーマ幼生においては、走光性が天然海域における鉛直分布を決める一因になっているものと考えられており、鉛直行動が沿岸に回帰するためのメカニズムである可能性が指摘されている (Miyake *et al.*, 2015)。したがって、イセエビフィロソーマ幼生の走光性に関する知見は、幼生の輸送メカニズムを理解する上でも重要である。しかし、これまでフィロソーマ幼生期の飼育が非常に困難であり、活性の高い幼生の確保が不十分であったことから、フィロソーマ幼生の成長に伴う走光性の変化について、ふ化後からプエルルス変態前までの長期間にわたって調査した報告はない。そこで本研究では、イセエビフィロソ

ーマ幼生の行動制御に基づいた飼育方法を改良するため、また幼生の輸送メカニズムを理解する基礎として、フィロソーマ幼生をふ化から変態期まで飼育し、異なる光量と波長に対する走光性を調査した。

## 材料と方法

**親エビの養成とふ化** 実験に用いるフィロソーマ幼生を確保するために、国立研究開発法人水産研究・教育機構増養殖研究所南伊豆庁舎にて、*Hamasaki et al.* (2012) の方法に従い、2006年5月と8月に、それぞれ1尾の雌親エビから幼生をふ化させた。

**フィロソーマ幼生の飼育** フィロソーマ幼生は、半球状の50 L アクリル水槽 (*Sekine et al.*, 2000) を用いてプエルルスまで飼育し、ふ化からX期（最終齢）までの幼生を適宜実験に供した。イセエビフィロソーマ幼生はプエルルスへ変態するまでに22–29回脱皮し (*Kittaka & Kimura*, 1989 ; *Yamakawa et al.*, 1989 ; *Sekine et al.*, 2000 ; 松田, 2006 ; *Matsuda & Takenouchi*, 2006), その間の外部形態の変化により10段階の齢期 (I–X期) に分けられている。本研究でも、松田 (2006) の外部形態による齢期を発育段階の指標とした。飼育方法は、*Sekine et al.* (2000), 村上 (2011) および *Hamasaki et al.* (2012) の方法に準じた。すなわち、1水槽当たり300尾のふ化フィロソーマ幼生を収容し、0.2  $\mu\text{m}$  の中空糸膜でろ過後に紫外線照射した海水 (33–36 psu) を、毎分0.6–1.3 Lの範囲で成長に合わせて増加させながら注水した。飼育水温は、ふ化から150日齢 (約5カ月間) まで26°C, それ以降は24°Cとした。照明は、蛍光灯 (水槽水面で約200 lx) により明期12時間, 暗期12時間に調整した。幼生の成長に従い、飼育密度を下げるために飼育水槽を適宜増やした。餌料には、ふ化からIV期幼生まではアルテミア *Artemia* sp. の単独給餌とし、V期幼生以降はムラサキイガイ

*Mytilus galloprovincialis* の生殖腺の細片を加えた。アルテミアは、珪藻 *Phaeodactylum* sp. を餌料として 4–21 日間培養したものを使用した。給餌したアルテミアの体サイズは、1.5–7.0 mm で、フィロゾーマ幼生の成長に合わせて育成した。水槽は、細菌性疾病を防ぐため、抗生物質（アンピシリン）による薬浴を、ふ化から 150 日齢までは  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  の濃度で 15 時間を 5 日毎、それ以降は  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  の濃度で 15 時間を 1 週間毎に実施した。薬浴は、水槽を交換した翌日に行った。

**光量別実験** 6 段階の光量 ( $0.0031, 0.031, 0.31, 3.1, 31, 310 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) と暗黒下において、フィロゾーマ幼生の成長に伴う走光性の変化を調べた。全ての実験は、気温を  $24\text{--}26^\circ\text{C}$  に調整した暗室内で行った。実験方法は、Hamasaki *et al.* (2013) および市川ら (2014b) が、それぞれヤシガニ *Birgus latro* およびケガニ *Erimacrus isenbeckii* 幼生の走光性を調べた方法に準拠した。実験に用いた容器は、水平に設置した幅 13 cm、深さ 10 cm、長さ 120 cm の横長のアクリル製容器で、容器内部の側面は短側面の片側を除き全て反射光を抑えるために艶消しの黒色とし、水槽の中心から左右に 10 cm ずつ目盛りをふった。短側面の片側は、透明アクリル板とし、ここから人工光源を水平に照射した。光源装置には、太陽光の波長に近い波長組成を示す 180 W メタルハライドフーバー照明装置 (LA-180Me- R, 林時計工業) を用いた。また、容器の上面全体を黒色アクリル樹脂製の蓋で、短側面の透明アクリル板の外側を黒色アクリル板で、それぞれ遮光できる仕様とした。光量は、幼生を収容する容器中央での光量子束密度を水中光量子計 (LI-192 Underwater Quantum Sensor, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) で測定し、ND フィルター (Newport Corp., Irvine, CA, USA) を用いて所定の値に調整した。暗黒条件では、短側面側に遮光板を挿入するとともに、容器上部に蓋をした。実験は、まず海水だけを満たした水槽の中央部にアクリル製のパイプを入れ、その中に幼生を静置し、すぐに、実験水槽の透明な短側

面から光を水平に照射すると同時にアクリルパイプを外し、幼生の行動を観察した。幼生が光源に近づく方向をプラス、遠ざかる方向をマイナスとして、5分後に幼生の位置を確認し移動状況を調べた。幼生の位置を確認する際は、10 cm 間隔で水槽内を区切るような仕様とした櫛状の透明アクリル製遮断枠を静かに入れ、幼生が位置する区画を確認した。1 回の試行が終了する度に、容器中の海水は新しいものに入れ替えた。

実験には、5月にふ化した幼生群 1 (I-IV 期) と 8月にふ化した幼生群 2 (VI-X 期) の個体を水槽から無作為に抽出して用いた。幼生飼育期間中に適宜測定した各齢期の体長 (村上, 2011) を Table 1 に示す。実験は給餌後 3 時間以上経過してから開始し、幼生が十分に餌を摂取した状態で行った。測定頻度は、幼生群 1 では、ふ化から 7 日齢 (I 期) まで毎日とし、それ以降は 9-15 日齢 (II 期), 17-23 日齢と 26-32 日齢 (III 期), および 35-43 日齢 (IV 期) の間で 2 日に 1 度とした。幼生群 2 では、86 日齢と 91 日齢 (VI 期), 158 日齢 (VI-VII 期), 224-232 日齢の間 (VII-IX 期), および 251-308 日齢の間 (X 期) に実験を行った。1 回の試行で水槽内に収容する幼生数は 158 日齢までは最大 5 尾とし、各光量で合計 10 尾ずつ測定を行った。224-232 日齢の間には各光量とも 3 回実験を行い、1 回の試行で 2, 3 および 5 尾の幼生を用いて合計 10 尾になるようにした。なお、158 日齢 (VI-VII 期) と 224-232 日齢 (VII-IX 期) の実験では、幼生数に限りがあったことから、異なる齢期の個体を合わせて 10 尾を確保した。最終齢の X 期を用いた実験は、幼生の発育の変異によって 251-308 日齢と長期にわたったが、その間に各光量とも 10 回実験を行い、X 期と確認した幼生を 1 回の試行で 1 尾ずつ用いて合計 10 尾を確保した。なお、X 期の幼生数には限りがあったことから、合計 26 個体を用い、同一個体を異なる日齢の異なる光量条件下で繰り返し用いて実験を行った。

**波長別実験** 400–660 nm の間で 20 nm 間隔の 14 照射区および暗黒区の合計 15 区を設定した。実験方法，容器および人工光源については，光量別実験の方法に準拠した。ただし，各波長での実験に供した幼生数は，合計 5 尾とした。波長は，バンドパスフィルター（Newport Corp., Irvine, CA, USA）を用いて調整した。実験には，幼生群 2（I–X 期）の幼生を供した（Table 1）。光量は光量別実験においてフィロゾーマ幼生が正の走性を示すレベルとし，容器中央の幼生投入部で  $3.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  に調整した。ただし，400 nm 区のみ，最大限の照射でも光量を確保できなかったため， $1.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  とした。測定は，0 日齢と 4 日齢（I 期），9 日齢（II 期），17 日齢と 25 日齢（III 期），34 日齢（IV 期），88 日齢と 93 日齢（VI 期），160 日齢（VI–VII 期），229 日齢と 230 日齢（VII–IX 期），および 255–306 日齢の間（X 期）に行った。ただし，229 日齢と 230 日齢および 255–306 日齢では，幼生数に限りがあったことから，480，520，560 および 640 nm 区での測定は行わなかった。また，X 期を用いた実験では，光量別実験と同様の方法で合計 19 個体の幼生を供した。

**統計処理** 統計解析と検定には，統計解析ソフトウェア R (R Core Team, 2016) を使用し，有意水準を 5% に設定した。光量別および波長別実験の暗黒区では，幼生は収容した容器中央付近の光源側と反光源側のそれぞれ 3 区画，特に中央の 2 区画に集中して分布した (Fig. 1)。そこで，容器内の幼生の分布状況を 3 区画ごとに 4 つに分けて集計し，幼生数の分布の一様性検定を行ったところ，帰無仮説は棄却された（光量別実験， $\chi^2 = 262.97$ ， $df = 3$ ， $P < 0.0001$ ；波長別実験， $\chi^2 = 55.12$ ， $df = 3$ ， $P < 0.0001$ ）。そこで，本研究では，光源側に近い 3 区画に分布した幼生は正の走光性を，逆に光源側から遠い 3 区画に分布した幼生は負の走光性を示したものとし，それら幼生の割合に及ぼす光と齢期の影響を解析した。解析には，一般化線形混合効果モデル（generalized linear mixed effects model）を用い (Bolker *et al.*, 2008; McCullagh & Nelder, 1989; Zuur *et al.*, 2009)，

応答変数を正あるいは負の反応率（反応個体数，非反応個体数），説明変数を処理（光量あるいは波長）と齢期とし，誤差構造に二項分布を指定した。説明変数は，いずれもカテゴリカル変数として扱った。また，実験日ごとのコントロールできない影響を変量効果として考慮することとし，各実験日の通し番号をランダム切片に指定した (Zuur *et al.*, 2009)。解析には lme4 パッケージの glmer 関数 (Bates *et al.*, 2015) を用い，car パッケージの Anova 関数 (Fox & Weisberg, 2011) による Wald  $\chi^2$  -test を適用して説明変数の効果を検定した。

## 結 果

**光量別実験** フィロゾーマ幼生の各光量に対する正および負の反応率の推移を齢期別に整理して Fig. 2 に示す。正および負の反応率のいずれにも，光量および齢期が有意な影響を与えた (Table 2)。幼生期間全体を通してみると，光が強くなるほど正の反応率が高くなる傾向を示し，31 と 310  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  で最も高かった。0.0031 および 0.031  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の弱い光では，正の反応率は低く，逆に負の反応率が高くなる傾向がみられた。特に，VI 期幼生では，0.031  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  をピークに強い負の走光性を示した (Fig. 2e)。

**波長別実験** フィロゾーマ幼生の各波長および暗黒条件に対する正および負の反応率の推移を齢期別に整理して Fig. 3 に示す。波長および齢期とも，正および負の反応率に有意な影響を与えた (Table 2)。幼生期間全体を通してみると，I 齢幼生では概ね 400–620 nm で強い正の走光性を示し，II 齢から IV 齢にかけては正の反応率が大きくは 400 nm と 480–600 nm 前後で高くなる傾向がみられた。VI 期以降には，正の反応率は 500 nm 以上で弱く，400–420 nm では，最終齢幼生の前まで強い正の走光性を示した。一方，負の反応率は，幼生期間全体を通して正の反応率ほどの高い値は認められなかったが，全体的には，600–660 nm

の範囲で比較的高くなる傾向があった。また、VI期（88, 93日齢）とX期幼生では、420–660 nmの広い範囲で負の走光性を示し、特にVI期幼生の反応が強いのが特徴的であった。

## 考 察

本研究では、イセエビのフィロソーマ幼生をふ化から最終齢まで飼育し、走光性を調べた。その結果、走光性は異なる光量と波長に対して、また成長に伴い変化することが明らかとなった。このことは、飼育水槽内の光環境を調節することによって、フィロソーマ幼生の行動を制御できる可能性を示すものであり、さらには天然海域におけるフィロソーマ幼生の日周鉛直運動や輸送メカニズムの解明に向けて重要な知見を提供するものである。

海産甲殻類幼生は、一般に、強い光には正の走性、弱い光には負の走性を示すといわれているが (Forward Jr, 1974, 1977, 1987; Forward Jr & Costlow 1974; Shirley & Shirley, 1988), 種や成長段階、環境条件ならびに飢餓等の影響によって変化するため、その反応は多様と考えられる (Forward Jr & Costlow 1974 ; Shirley & Shirley, 1988 ; Adams & Paul, 1999 ; Anger, 2001 ; Epelbaum *et al.*, 2007 ; Hamasaki *et al.*, 2013 ; 市川ら, 2014b)。また、負の走光性については、反応の一部は、shadow response と称する上方に位置する捕食者からの逃避行動の一種であるとされてる (Sulkin, 1984; Forward Jr, 1976, 1986)。本研究におけるイセエビフィロソーマ幼生は、全体的に 31 および  $310 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の強い光に強い正の走性を示した。また、幼生は、全体的に 0.0031 および  $0.031 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の弱い光に対して強い負の走性を示したことから、この反応は shadow response である可能性が考えられる。このように、イセエビフィロソーマ幼生の走光性は、光量で変化することが明らかになった。

光波長は、光量と同様に甲殻類幼生の走光性に影響を与えるといわれている (Forward Jr & Costlow 1974 ; Forward Jr & Cronin 1979 ; Forward Jr, 1988, 2009 ; Anger, 2001 ; Cohen Forward Jr, 2002 ; Hamasaki *et al.*, 2013 ; ; 市川ら, 2014b)。本研究では、イセエビフィロソーマ幼生の走光性を波長別に調べたところ、比較的強い正の走光性がみられた波長範囲は、I 齢幼生では概ね 400–620 nm, II 齢から IV 齢にかけては 400 nm と 480–600 nm 前後, VI 期以降には 500 nm 未満, 特に 400–420 nm であった。一方、比較的強い負の走光性がみられた波長範囲は VI 期 (88, 93 日齢) と X 期以外では 600–660 nm, VI 期 (88, 93 日齢) と X 期では 420–660 nm であった。このように、イセエビフィロソーマ幼生の走光性は、波長と発育段階から大きな影響を受けることが明らかとなった。その他のイセエビ類では、オーストラリアイセエビのふ化フィロソーマ幼生が 470, 555 および 615 nm に対し高い感受性を示し (Ritz, 1972), カリブイセエビのフィロソーマ幼生は、400–600 nm の波長に対して、初期から正の走光性を示したが、100 日齢 (甲長 10–15 mm) 以降は示さなかったことが報告されており (Butler, 2011), 初期フィロソーマ幼生が幅広い波長に正の走光性を示す特性は本研究のイセエビと一致している。

動物プランクトンのスペクトル感度は、光子を最大限利用するために、生息環境中のスペクトル分布に一致すると考えられている (Forward Jr, 1988, 2009; Cohen & Forward Jr, 2002)。海水中における太陽光の分布は、海水の光学的性質により、鉛直および水平方向のいずれの方向においても減弱・吸収される (Jerlov, 1976)。また、海水は内湾では富栄養化し、沖合から外洋にかけては比較的貧栄養であることから、沿岸内湾では緑色から黄色 (550–600 nm), 沖合では青色から緑色 (500–550 nm), 外洋では青色 (470 nm 付近) の波長が良く透過するといわれている (Forward Jr, 1987, 1988; Cohen & Forward Jr, 2002; Jerlov, 1976)。イセエビのフィロソーマ幼生が正の走光性を示した波長は、IV 期まで

は沿岸から沖合域、VI期以降は外洋域のスペクトル分布に類似していた。イセエビのフィロソーマ幼生は沿岸でふ化し、VI期以降に黒潮本流を抜けて外洋へと移動分散して成長し（吉村ら, 2010）、その後再び黒潮本流へ再突入してプエルルス幼生へと変態することが報告されていることから（Yoshimura et al., 1999; Sekiguchi & Inoue, 2002; 吉村ら, 2010）、イセエビのフィロソーマ幼生のスペクトル感度は生息環境のスペクトル分布に対応しているものと推察される。今回、イセエビのフィロソーマ幼生はVI期とX期では420–660 nmの広い波長で負の反応率が強く、特に前者で強い負の走光性を示した。また、VI期では光量別実験でも比較的強い負の走光性を示した。これは、フィロソーマ幼生が生息水深を深くし、黒潮本流を移動しやすくする行動特性かもしれない。このことに関連し、イセエビフィロソーマ幼生の鉛直行動と輸送過程に関するシミュレーション研究を実施した Miyake et al. (2015) は、鉛直移動によって分布水深を深めることが、フィロソーマ幼生の強流帯からの離脱に役立つことを指摘している。なお、イセエビのフィロソーマ幼生は、発育段階に関わらず400–420 nmに高いスペクトル感度を有していた。イセエビのフィロソーマ幼生は天然海域において透明なゼラチン質の動物プランクトンを摂餌する（Anger, 2001; 張ら, 2010）。透明な動物プランクトンは紫外線の透過性が低く、紫外線下ではより不透明になることから（Johnsen & Widder, 2001; Job & Bellwood, 2007）、フィロソーマ幼生の400–420 nmでの高いスペクトル感度は透明なゼラチン状の体組織を持つ動物プランクトンを視認し、捕捉しやすくするための適応と推察される。

本研究では、イセエビのフィロソーマ幼生における走光性の成長に伴う変化を明らかにしたが、その反応性を応用することにより飼育水槽内のフィロソーマ幼生の行動を制御し、浮遊・分散させることができ、生残率の向上に貢献できる可能性がある（市川ら, 2014a, 2014b, Epelbaum et al., 2007）。例えば、水槽の上側から強い光や短波長を、下側からは長波長の光を照射することで幼生を

浮遊・分散させることができるかもしれない。今後は、実際の飼育試験で光量と波長がフィロソーマ幼生の生残と発育に及ぼす影響について検討する必要がある。

## 文 献

- Adams, C. F. & Paul, A. J. 1999. Phototaxis and geotaxis of light-adapted zoeae of the golden king crab *Lithodes aequispinus* (Anomura: Lithodidae) in the laboratory. *Journal of Crustacean Biology*, **19**: 106–110.
- Anger, K. 2001. *The biology of decapod crustacean larvae*. Crustacean issues 14. AA Balkema, Rotterdam.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. & Walker, S. 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, **67**: 1–48.
- Bolker, B. M., Brooks, M. E., Clark, C. J., Geange, S. W., Poulsen, JR., Stevens, H. H. & White, J. S. 2008. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, **24**: 127–135.
- Bradford, R. W., Bruce, B. D., Chiswell, S. M., Booth, J. D., Jeffs, A. & Wotherspoon, S. 2005. Vertical distribution and diurnal migration patterns of *Jasus edwardsii* phyllosomas off the east coast of the North Island, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **39**: 593–604.
- Butler, M. J. IV, Paris, C.B., Goldstein, J. S., Matsuda, H. & Cowen, R. K. 2011. Behavior constrains the dispersal of long-lived spiny lobster larvae. *Marine Ecology Progress Series*, **422**: 223–237.
- 張 成年, 竹山春子, 村上恵祐, 吉村 拓, 岡本浩明. 2010. フィロソーマの摂餌生態と天然餌料の解明. 農林水産省農林水産技術会議事務局プロジェクト

- ト研究成果シリーズ 480「ウナギ及びイセエビの種苗生産技術の開発」, pp. 11–18. 農林水産省農林水産技術会議事務局, 東京.
- Cohen, J. H. & Forward Jr, R. B. 2002. Spectral sensitivity of vertically migrating marine copepods. *Biological Bulletin*, **203**: 307–314.
- Epelbaum, A. B., Borisov, R. R. & Kovatcheva, N. P. 2007. Ontogeny of light response in the early life history of the red king crab *Paralithodes camtschaticus* (Anomura: Lithodidae). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, **40**: 35–44.
- Forward Jr, R. B. 1974. Negative phototaxis in crustacean larvae: possible functional significance. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **16**: 11–17.
- Forward Jr, R. B. 1976. A shadow response in a larval crustacean. *Biological Bulletin*, **151**: 126–140.
- Forward Jr, R. B. 1977. Occurrence of a shadow response among brachyuran larvae. *Marine Biology*, **39**: 331–341.
- Forward Jr, R. B. 1986. A reconsideration of the shadow response of a larval crustacean. *Marine Behaviour and Physiology*, **12**: 99–113.
- Forward Jr, R. B. 1987. Comparative study of crustacean larval photoresponses. *Marine Biology*, **94**: 589–595.
- Forward Jr, R. B. 1988. Diel vertical migration: zooplankton photobiology and behaviour. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 1988. **26**: 361–393.
- Forward Jr, R. B. 2009. Larval biology of the crab *Rhithropanopeus harrisi* (Gould): A synthesis. *Biological Bulletin*, **216**: 243–256.
- Forward Jr, R. B. & Costlow Jr, J. D. 1974. The ontogeny of phototaxis by larvae of the crab *Rhithropanopeus harrisi*. *Marine Biology*, **26**: 27–33.

- Forward Jr, R. B. & Cronin, T. W. 1979. Spectral sensitivity of larvae from intertidal crustaceans. *Journal of Comparative Physiology A*, **133**: 311–315.
- Forward Jr, R. B. & Tankersley, R. A. 2001. Selective tidal-stream transport of marine animals. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 2001; **39**: 305–353.
- Fox, J. & Weisberg, S. 2011. *An {R} companion to applied regression, second edition*. Sage Publications, Thousand Oaks, CA.
- Hamasaki, K., Mizumoto, Y., Jinbo, T. & Murakami, K. 2012. Ontogenetic change of body density and shape of the phyllosoma larvae of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Journal of Crustacean Biology*, **32**: 395–404.
- Hamasaki, K., Sugimoto, A., Sugizaki, M., Murakami, Y. & Kitada, S. 2013. Ontogeny of sinking velocity, body density, and phototactic behaviour in larvae of the coconut crab *Birgus latro*: Implications for larval dispersal and recruitment in the sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **442**: 58–65.
- Harada, E. 1957. Ecological observations on the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (von Siebold), in its larval and adult life. *Publications of Seto Marine Biological Laboratory*, **6**: 99–122.
- 市川 卓, 村上直人, 森岡泰三, 村上恵祐, 浜崎活幸. 2014a. ケガニ種苗生産における光環境が幼生の沈降と発育に及ぼす影響. *水産増殖*, **62**: 65–73.
- 市川 卓, 那波洋子, 浜崎活幸, 村上恵祐. 2014b. 飼育したケガニ幼生の走光性, 鉛直分布, 体密度と外部形態の発育に伴う変化. *日本水産学会誌*, **80**: 349–359.
- 井上正昭. 1981. イセエビのフィロソーマ幼生の飼育に関する基礎的研究. *神奈川県水産試験場論文集*, **1**: 1–91.
- Jerlov, NG. 1976. *Marine optics. Elsevier oceanography series, volume 14*, Elsevier, Amsterdam.

- Job, S. & Bellwood, D. R. 2007. Ultraviolet photosensitivity and feeding in larval and juvenile coral reef fishes. *Marine Biology*, **151**: 495–503.
- Johnsen, S. & Widder, E. A. 2001. Ultraviolet absorption in transparent zooplankton and its implications for depth distribution and visual predation. *Marine Biology*, **138**: 717–730.
- Kittaka, J. & Kimura, K. 1989. Culture of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* from egg to juvenile stage. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**: 963–970.
- 松田浩一. 2006. イセエビ属 (*Panulirus*) 幼生の生物特性と飼育に関する研究. 三重県科学技術振興センター水産研究部研究報告, **14**: 1–116.
- Matsuda, H. & Takenouchi, H. 2006. Larval molting and growth of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* under laboratory conditions. *Fisheries Science*, **72**: 767–773.
- Matsuda, H., Takenouchi, H. & Goldstein, J.S. 2006. The complete larval development of the pronghorn spiny lobster *Panulirus penicillatus* (Decapoda: Palinuridae) in culture. *Journal of Crustacean Biology*, **26**: 579–600.
- McCullagh, P. & Nelder, J. A. 1989. *Generalized linear models*. Edn. 2. Chapman & Hall, London.
- Minami, H., Inoue, N. & Sekiguchi, H. 2001. Vertical distribution of phyllosoma larvae of Palinurid and Scyllarid lobsters in the western north pacific. *Journal of Oceanography*, **57**: 743–748.
- Miyake, Y., Kimura, S., Itoh, S., Chow, S., Murakami, K., Katayama, S., Takeshige, A. & Nakata, H. 2015. Roles of vertical behavior in the open-ocean migration of teleplanic larvae: a modeling approach to the larval transport of Japanese spiny lobster. *Marine Ecology Progress Series*, **539**: 93–109.

- 村上恵祐. 2011. イセエビの成長特性と飼育技術の向上に関する研究. 博士学位論文, 東京海洋大学, 東京.
- Murakami, K., Jinbo, T. & Hamasaki, K. 2007. Aspects of the technology of phyllosoma rearing and metamorphosis from phyllosoma to puerulus in the Japanese spiny lobster reared in the laboratory. *Bulletin of Fisheries Research Agency*, **20**: 59–67.
- Nonaka, M., Fushimi, H. & Yamakawa, T. 2000. The spiny lobster fishery in Japan and restocking. In: Phillips BF, Kittaka J (eds). *Spiny lobsters: fisheries and culture*, Edn. 2. pp. 221–242. Fishing News Books, Oxford.
- Phillips, B. F., Booth, J. D., Cobb, J. S., Jeffs, A. G. & MacWilliam, P. 2006. Larval and postlarval ecology. In: Phillips BF (ed). *Lobsters: biology, management, aquaculture and fisheries*. pp. 231–262. Blackwell, Oxford.
- R Core Team. 2016. R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. [<http://www.R-project.org/>].
- Rimmer, D. W. & Phillips, B. F. 1979. Diurnal migration and vertical distribution of phyllosoma larvae of the western rock lobster *Panulirus cygnus*. *Marine Biology*, **54**: 109–124.
- Ritz, D.A. 1972. Behavioural response to light of the newly hatched phyllosoma larvae of *Panulirus longipes cygnus* George (Crustacea : Decapoda : Palinuridae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **10**: 105-114.
- 税所敏郎. 1966. フィロゾマ幼生に関する海洋生物学的研究. 鹿児島大学水産学部紀要, **15**: 177–239.
- Sekiguchi, H. & Inoue, N. 2002. Recent advances in larval recruitment processes of Scyllarid and Palinurid lobsters in Japanese waters. *Journal of Oceanography*, **58**: 747–757.

- Sekine, S., Shima, Y., Fushimi, F. & Nonaka, M. 2000. Larval period and molting in the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* under laboratory conditions. *Fisheries Science*, **66**: 19–24.
- Shirley, S. M. & Shirley, T. C. 1988. Behavior of red king crab larvae: Phototaxis, geotaxis and rheotaxis. *Marine Behaviour and Physiology*, **13**: 369–388.
- Sulkin, S. D. 1984. Behavioral basis of depth regulation in the larvae of brachyuran crabs. *Marine Ecology Progress Series*, **15**: 181–205.
- Yamakawa, T., Nishimura, M., Matsuda, H., Tsujigadou, A. & Kamiya, N. 1989. Complete larval rearing of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**: 745.
- 吉村 拓, 森永健司, 西内 耕, 伊藤 篤, 増田佳子. 2010. 天然フィロソーマの発育過程及び生息環境条件の解明. 農林水産省農林水産技術会議事務局プロジェクト研究成果シリーズ 480「ウナギ及びイセエビの種苗生産技術の開発」, pp. 47–55. 農林水産省農林水産技術会議事務局, 東京.
- Yoshimura, T., Morinaga, K., Oshimo, S., Konishi, Y. & Goto, T. 2009. Distribution and dispersal of the early larval stages of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* in the East China Sea. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **43**: 591–604.
- Yoshimura, T., Yamakawa, H. & Kozasa, E. 1999. Distribution of final stage phyllosoma larvae and free-swimming pueruli of *Panulirus japonicus* around the Kuroshio Current off southern Kyusyu, Japan. *Marine Biology*, **133**: 293–306.
- Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N. J., Savaliev, A. A. & Smith, G. M. 2009. *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Springer, New York.

**Table 1** The body sizes of phyllosoma larvae of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* in two hatching groups used for the phototaxis experiment

Group	Stage	<i>N</i>	Body length (mm)
1	I	30	1.58 ± 0.03
	II	9	1.92 ± 0.09
	III	59	2.72 ± 0.30
	IV	30	3.35 ± 0.10
2	I	24	1.56 ± 0.05
	II	24	2.07 ± 0.06
	III	24	2.73 ± 0.26
	IV	12	3.45 ± 0.18
	VI	26	8.15 ± 0.74
	VI, VII	12	13.85 ± 1.39
	VII - IX	12	18.23 ± 3.10
	X	17	31.05 ± 2.02

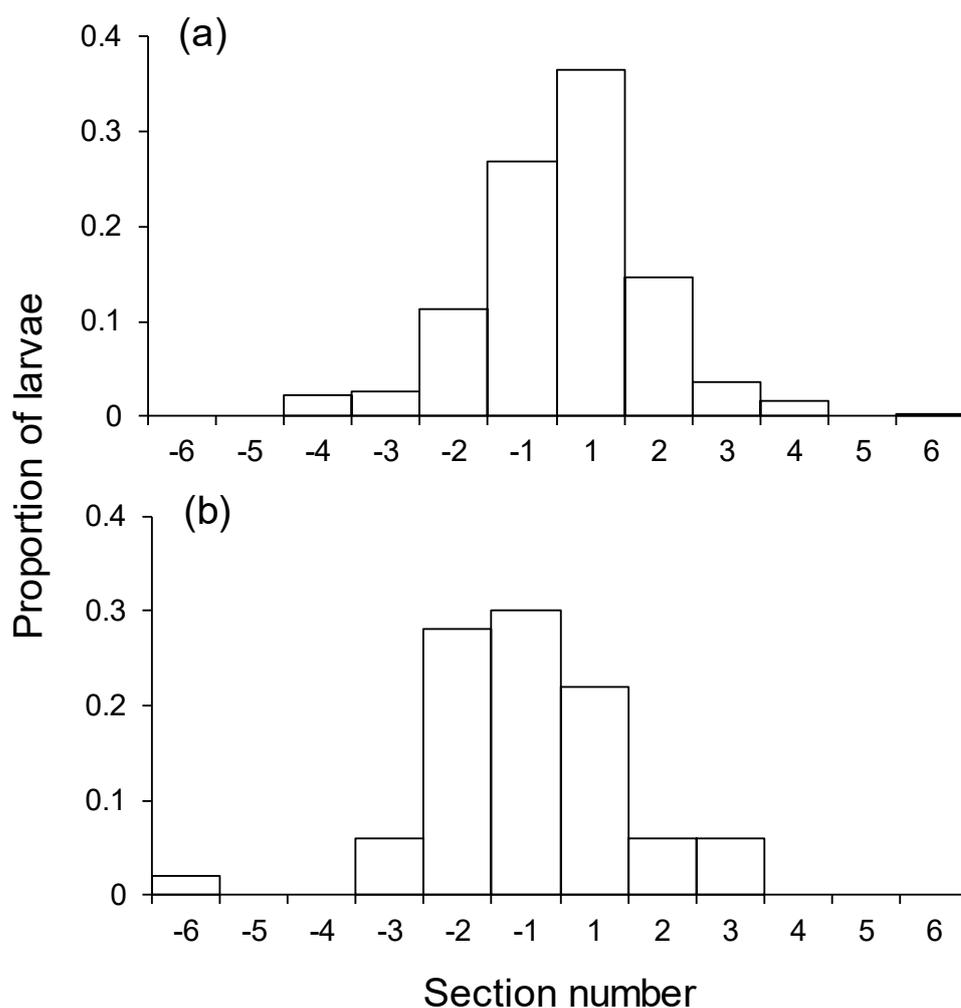
Data: mean ± standard deviation.

The staging of phyllosoma larvae was based on Matsuda (2006). Larvae from group 1 (stages I–IV) and group 2 (stages VI–X) were used for light intensity experiment, and larvae from group 2 (stages I–X) were used for light wavelength experiment.

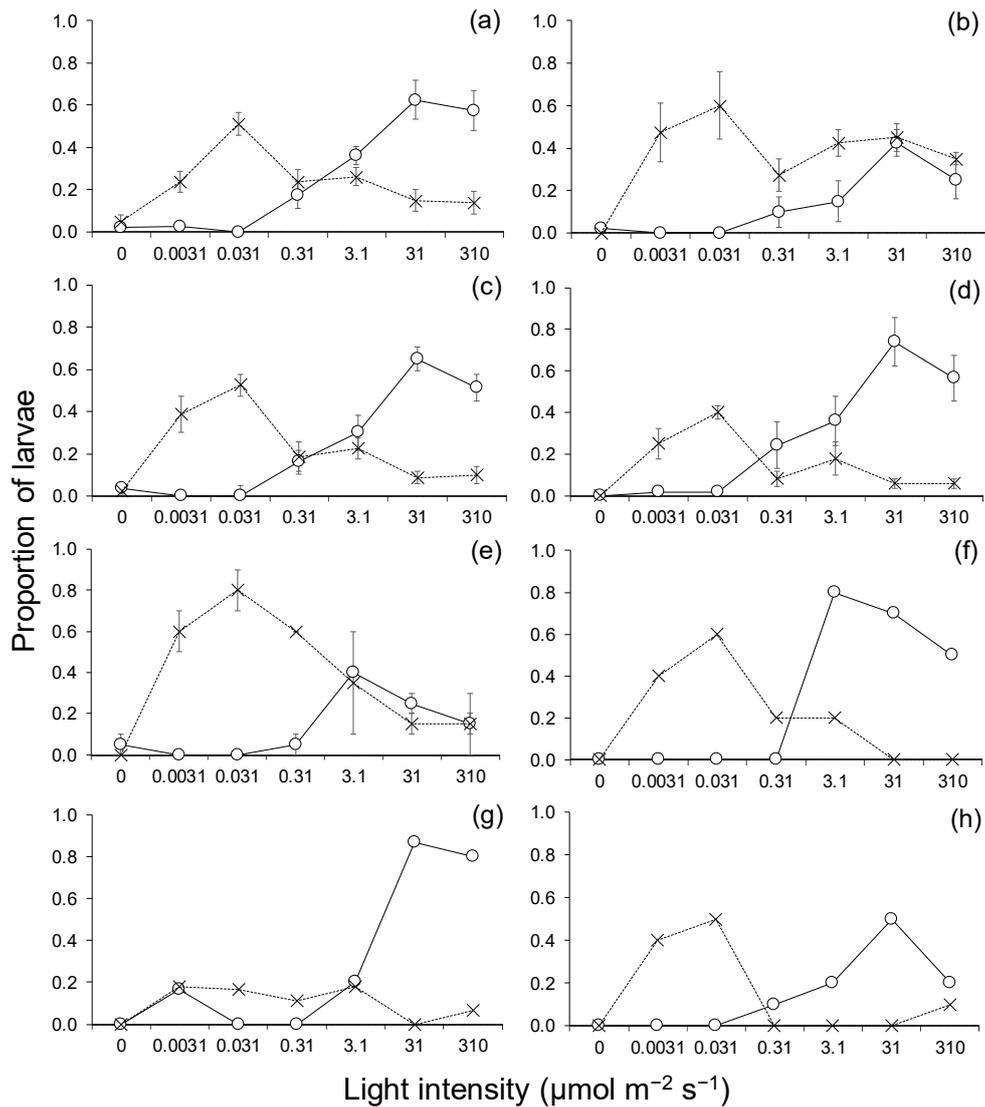
**Table 2** Analysis of deviance table by Wald  $\chi^2$  test (type II) to evaluate the effects of explanatory variables (light treatment and stage of phyllosoma larvae) on response variables (positive and negative phototactic behavior) of phyllosoma larvae of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* in the light intensity or light wavelength experiments

Experiment	Response variables	Explanatory variables	$\chi^2$	<i>df</i>	<i>P</i> ( $> \chi^2$ )
Light intensity	Positive behavior	Light treatment	293.6	6	$< 2.00 \times 10^{-16}$
		Stage	20.57	7	<b>0.0045</b>
	Negative behavior	Light treatment	203.3	6	$< 2.20 \times 10^{-16}$
		Stage	41.42	7	$6.72 \times 10^{-7}$
Light wavelength	Positive behavior	Light treatment	91.51	13	$7.17 \times 10^{-14}$
		Stage	63.64	7	$2.82 \times 10^{-11}$
	Negative behavior	Light treatment	57.25	13	$1.62 \times 10^{-7}$
		Stage	138.2	7	$< 2.20 \times 10^{-16}$

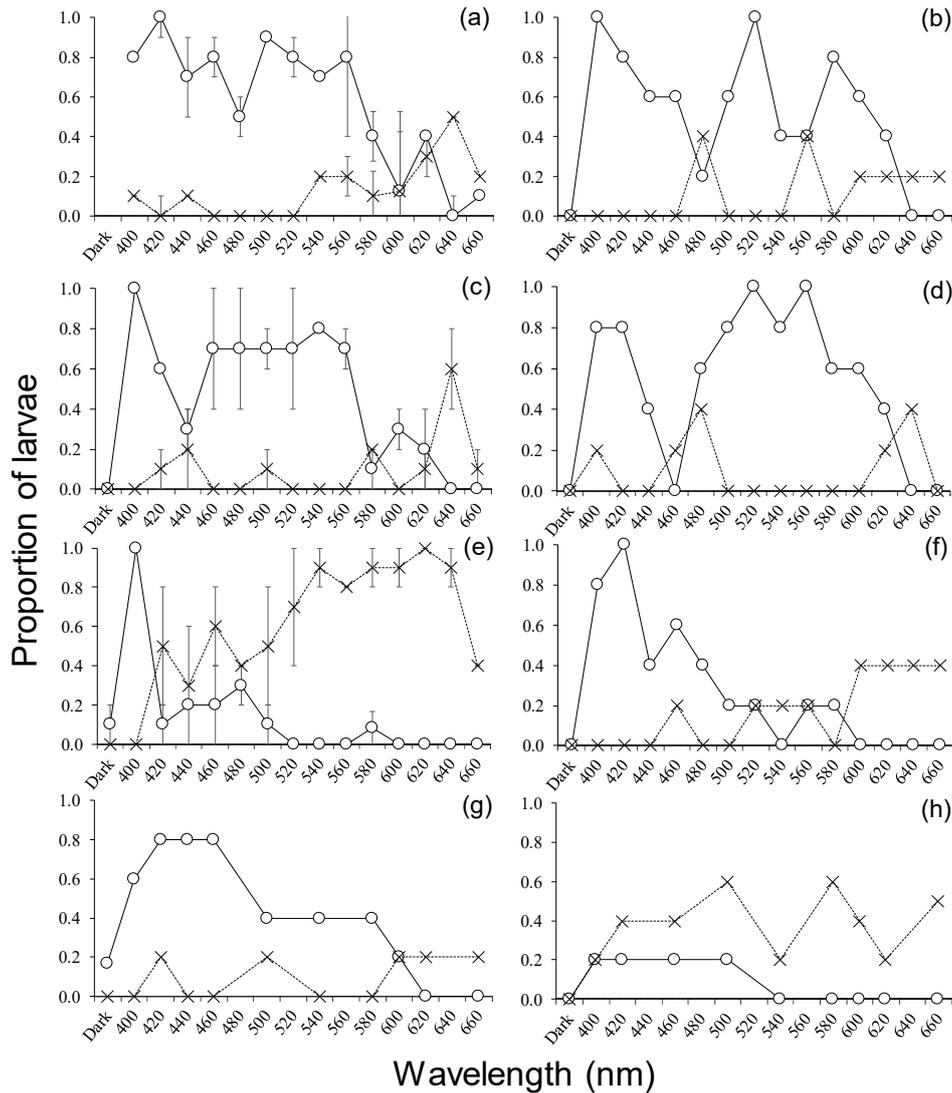
Data were analyzed using a generalized linear mixed-effects model.



**Figure 1** Proportion of phyllosoma larvae of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* observed within the respective sections of the horizontal test chamber under the dark condition in the light intensity experiment (a) and the light wavelength experiment (b). The test chamber was marked with a 10-cm interval on the bottom and the sections were numbered as nos.1–6 and –1 to –6 from the center of the chamber where the larvae were first installed. Light was directed from the side of section no. 6 under the light condition. The proportion larvae were calculated using the overall data from all the larval stages. The equation of the calculation is as follows: (number of larvae found in the designated section) / (number of larvae used for all experiments).



**Figure 2** Ontogeny of the behavioral response to light intensities by phyllosoma larvae of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* ( $\circ$ , larvae found in the three sections near the light source;  $\times$ , larvae found in the three sections far from the light source): (a), stage I (0–7 days after hatching; DAH); (b), stage II (every two days from 9–15 DAH); (c), stage III (every two days from 17–23 DAH and 26–32 DAH); (d), stage IV (every two days from 35–43 DAH); (e), stage VI (86 and 91 DAH); (f), stage VI and VII (158 DAH); (g), stage VII–IX (224–232 DAH); (h), stage X (251–308 DAH). Ten larvae were used for each light intensity test. Until stage VI (86 and 91 DAH), tests were repeated for 2–8 days in each stage. Symbols and vertical bars in graphs (a)–(e) indicate means and standard errors of replicates, respectively.



**Figure 3** Ontogeny of the behavioral response to different wavelengths and the dark by phyllosoma larvae of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (○, larvae found in the three sections near the light source; ×, larvae found in the three sections far from the light source): (a), stage I (0 and 4 days after hatching; DAH); (b), stage II (9 DAH); (c), stage III (17 and 25 DAH); (d), stage IV (34 DAH); (e), stage VI (88 and 93 DAH); (f), stage VI and VII (160 DAH); (g), stage VII–IX (229 and 230 DAH); (h), stage X (255–306 DAH). Five larvae were used for each light wavelength test. Tests were repeated for two days at stages I, III and VI. Symbols and vertical bars in graphs (a), (c), and (e) indicate means and standard errors of replicates, respectively.

## 第 3 章

種苗生産技術開発のための基礎的研究：  
イセエビフィロソーマ幼生の走光性および  
ケガニ幼生の適正な飼育環境条件

### 第 2 節

ケガニ幼生の生残，発育および摂餌に及ぼす  
アルテミア給餌密度の影響

Effects of *Artemia* nauplii density on survival, development and  
feeding of larvae of the horsehair crab *Erimacrus isenbeckii*  
(Crustacea, Decapoda, Brachyura) reared in the laboratory

## 緒 言

ケガニ *Erimacrus isenbeckii* は、十脚目クリガニ科に属し、アラスカ、ベーリング海から、南サハリンを経て、日本では北海道沿岸域から太平洋側は宮城、福島まで、日本海側は福井、鳥取、島根から韓国沿岸まで広く分布している（酒井, 1976）。本種は、本邦では主に北海道沿岸域、特にオホーツク海域と東部太平洋海域に多く分布し、美味で価格も高いために重要な漁業対象種となっており（三原, 2003）、許容漁獲量を設定して資源管理が行われてきた。しかし、その漁獲量は低水準で推移していることから（池原, 1997；三原, 2003）、種苗放流による積極的な資源増殖が望まれている。このような背景から、これまでにいくつかの機関において、本種の種苗生産技術開発が実施されてきたが（尾身・山下, 1978；宮古事業場, 1982, 1985, 1991, 1992；厚岸事業場, 1983, 1986, 1992）、適正な飼育環境や餌料等の基礎的飼育条件に関する知見はほとんどなく、また幼生の生残率は不安定で（宮古事業場, 1991, 1992；厚岸事業場, 1992）、種苗生産技術が確立したとは言い難い。

十脚類幼生の飼育においては、餌料密度が幼生の生残、発育および摂餌活動に大きな影響を及ぼすことが報告されている（八塚, 1960；井上, 1965；Gopalakrishnan, 1976；Omori, 1979；Paul *et al.*, 1979；Emmerson, 1980；林田・松清, 1982；Yúfera *et al.*, 1984；Yúfera & Rodríguez, 1985；Chu & Shing, 1986；Loya-Javellana, 1989；Minagawa & Murano, 1993；深山, 1997；Tong *et al.*, 1997；Anger, 2001；Suprayudi *et al.*, 2002）。ケガニの種苗生産では、餌料としてアルテミアおよび珪藻 *Thalassiosira* sp. が使用されてきたが（宮古事業場, 1982, 1985, 1991, 1992；厚岸事業場, 1983, 1986, 1992）、適正な給餌密度については明らかにされていない。そこで、本研究では、アルテミアの給餌密度がケガニ幼生の生残、発育および摂餌量に及ぼす影響を明らかにする目的で飼育実験を実施

した。

## 試料および方法

**抱卵雌** 2001と2002年の2～3月にかけて、ふ化直前の抱卵雌198個体（甲長の平均値±標準偏差， $68.0 \pm 5.8$  mm）を北海道釧路沖から特別採捕許可によって入手した。抱卵雌は日本栽培漁業協会厚岸事業場（現，国立研究開発法人水産研究・教育機構北海道区水産研究所厚岸庁舎）の0.5 m<sup>3</sup>水槽に個別に，あるいは4 m<sup>3</sup>水槽に45～69個体を収容し，砂ろ過海水を使用して流水（10回転 / 日）で飼育し，ふ化させた。餌料はチカ，アサリおよびオキアミの切り身を用い，週2回の頻度で残餌が出るように与えた。飼育期間中の水温は0.5～2.9°Cで推移した。

**実験区の設定と餌料** 実験区として，ゾエア期（第1～5齢）におけるアルテミアのノープリウス幼生（以下，アルテミア）の給餌密度を，0.25，0.5，1，2，4個体 / mLとした5区と無給餌区の合計6区を設けた。なお，メガロパ期の給餌密度は，各区とも4個体 / mLに統一した。アルテミアは北米産（日清ファインケミカル社製）で，13 Lバケツを用いて26°C，24時間でふ化させた。ふ化したアルテミアは，回収して13 Lバケツに密度が100個体 / mLとなるように再収容し，市販の栄養（エイコサペンタエン酸）強化剤（マリンアルファ，日清サイエンス社製）を20 mL / Lの割合で添加し，水温22°Cで18～23時間栄養強化した。

**幼生の飼育方法** 飼育には，2 Lの白色ポリエチレンビーカーを各区3個用い，0.5 m<sup>3</sup>水槽で飼育していた抱卵雌1個体から2001年3月10日にふ化した幼生を，各ビーカーに50個体ずつ収容した。3個のビーカーのうち，2個は生残率と各齢期へ脱皮するまでの所要日数を求め，1個は各齢期の成長を測定するために供した。

飼育に用いた海水は、砂ろ過後に 50  $\mu\text{m}$  と 5  $\mu\text{m}$  のカートリッジフィルター（ポリプロピレンwindカートリッジフィルター, アドバンテック東洋社製）でろ過したもので、約 1 日十分に曝気して使用した。飼育水温はウォーターバス方式で調温し、ふ化幼生の収容時には 2°C, 翌日に °C, 翌々日に 12°C まで上昇させ、以後  $12.2 \pm 0.3^\circ\text{C}$  を維持した。通気は、各ビーカーに対してパステールピペット 1 本を用いて微量（約 70 mL/min）に行った。日長は、水面から約 1 m の箇所に設置した 2 本の蛍光灯（40 W）を 7 時から 19 時まで点灯して調整した。照度は、ビーカーの水面上で 600~700 lx であった。

幼生は、毎日午前中に、新しい海水を入れたビーカーに 10 mL 容の駒込ピペット（先を切断した広口のもの）で移し替えた。その際に、幼生の齢期を肉眼で観察し、生存個体数を計数した。また、死亡個体は取り除き、検鏡して齢期を確認した。メガロパが出現した場合、共食いの頻度を下げるために、第 5 齢ゾエア、脱皮当日のメガロパおよび脱皮翌日のメガロパを分けてそれぞれ別のビーカーで飼育した。各齢期までの生残個体数は、各齢期へ脱皮した幼生数で表した。各齢期の成長測定用のビーカーでは、メガロパまでの齢期ごとに最初に脱皮した 5 個体を、5%ホルマリンで 1 日固定後、70%エタノールで保存し、後述の測定に供した。給餌は、幼生を移槽後に行い、前述のアルテミアを所定の密度になるようにビーカーに添加した。また、飼育水には、幼生への糸状細菌の付着を防ぐためにアンピシリンナトリウム（シグマ社製）を 10 ppm の濃度で添加した。実験は、飼育した幼生が全滅するか、全ての幼生が第 1 齢稚ガニへ脱皮した日まで行った。

**幼生標本の測定方法** 幼生標本の測定項目は、頭胸甲長、第 2 顎脚外肢長と遊泳毛数、鋏長、鋏脚長ならびに第 3 腹節腹肢長とした (Fig. 1)。測定は、実体顕微鏡（倍率 25~75 倍）および生物顕微鏡（100 倍）下で接眼マイクロメーターを用いて行った。ただし、鋏長および鋏脚長については第 4、第 5 齢ゾエア

のみで測定し、メガロパでは甲長のみを測定した。第2顎脚外肢長、鉗長、鉗脚長ならびに第3腹節腹肢長については、頭胸甲長に対する比（各付属肢長×10<sup>2</sup>/頭胸甲長，%）を算出した。

**摂餌量** 給餌密度（0.25, 0.5, 1, 2, 4 個体 / mL）が幼生の摂餌量に及ぼす影響を調べた。実験は、2002年に実施し、第1, 3および5齢ゾエアを供した。第1齢ゾエアはふ化1日後、第3齢および第5齢ゾエアは、脱皮2日後の幼生であり、実験に供するまで前述の方法で飼育した。なお、第1齢ゾエアの飼育水温は、ふ化水温（2°C）から約15時間かけて12°Cまで上昇させた。第1齢および第3齢ゾエアを用いた実験の0.25個体/mL区では300 mLのガラス製ビーカー、0.5および1.0個体/mL区では同100 mL、2個体/mL区では同50 mL、4個体/mL区では20 mLのガラス製標本瓶を各区5個使用し、幼生を1個体ずつ収容した。水量は、それぞれ200 mL, 100 mL, 50 mL, 25 mL, 12.5 mLとし、前述のアルテミアを50個体ずつ給餌して所定の密度を設定した。第5齢ゾエアでは同様に、0.25個体/mL区では500 mLのガラス製ビーカー、0.5個体/mL区では同300 mL、1および2個体/mL区では同100 mL、4個体/mL区では50 mLのガラス標本製瓶を各区5個使用した。水量は、それぞれ400 mL, 200 mL, 100 mL, 50 mL, 25 mLとし、アルテミアを100個体ずつ給餌した。実験中は、飼育水温をウォーターバス方式により11.9~12.1°Cで維持し、無通気で静置した。日長および光条件は、幼生の飼育方法における設定と同様とした。実験は午前11時に開始し、24時間後にホルマリンを5~10%になるように飼育水に添加してゾエアとアルテミアを固定した。ケガニのゾエア幼生は1個体のアルテミアを完全に摂餌したので、ゾエアの摂餌量は実験前後のアルテミアの個体数から求めた。

**統計処理** 生残率、各齢期までの所要日数、成長に関する各測定項目の区間差ならびにアルテミア摂餌量は、分散分析後にTukeyの方法による多重比較を行

い、有意水準 5%で検定した。ただし、生残率については、平均と分散を独立にするために逆正弦変換した値を用いた。また、アルテミアの給餌密度とゾエアのアルテミア摂餌数の関係には片対数式を適用した。

## 結 果

**各齢期までの生残と所要日数** 各実験区とも、供試した 2 個のビーカーの生残と発育状況は同様な傾向を示した (Fig. 2)。無給餌区では、飼育 8 日目から死亡個体が見られ始め、第 2 齢ゾエアへ脱皮した個体は認められず、12 日目で全滅した (Fig. 2)。一方、給餌した区では、次齢期への脱皮が認められ、生残率はアルテミアの給餌密度にしたがって高くなる傾向を示し、0.25 個体 / mL 区、0.5~1 個体 / mL 区、2~4 個体 / mL 区の 3 群間に有意差が認められる傾向があった (Table 1)。また、0.5~1 個体 / mL 区では、第 5 齢ゾエアからメガロパへの変態期の減耗率が高かった。第 1 齢稚ガニまでの生残率は、2 および 4 個体 / mL 区でそれぞれ 64.0%と 69.0%の高い値を示した。なお、給餌したすべての区において、メガロパ変態期に死亡個体が認められずに生残個体数が減少 (2~9 個体/ビーカー) する現象、すなわち共食いによると推測される生残個体の減少が見られたが、給餌密度との関係は認められなかったことから ( $P>0.05$ )、ここではすべて死亡個体として処理した。

各齢期までの所要日数は、給餌密度にしたがって短くなる傾向を示し、0.25 個体 / mL 区、0.5 個体 / mL 区、1 個体 / mL 区、2~4 個体 / mL の 4 群間で有意差が認められる傾向があった (Table 2)。また、各齢期までの所要日数の変動係数は、給餌密度にしたがって小さくなる (Table 2)、すなわち脱皮時期が同調する傾向を示した (Fig. 2)。例えば、1 個体 / mL 区では第 5 齢ゾエアがメガロパへの変態を完了するまでに 14~15 日を要したが、2~4 個体 / mL 区では、お

よそ 6 日に短縮された (Fig. 2)。

**成長** 各齢期の頭胸甲長，頭胸甲長に対する第 2 顎脚外肢長，鋏長，鋏脚長ならびに第 3 腹節腹肢長の比および第 2 顎脚外肢の遊泳毛数を Table 3 に示した。頭胸甲長は，給餌密度にしたがって大きくなる傾向を示し，メガロパでは 2~4 個体 / mL 区が 0~0.5 個体 / mL 区に対して有意に大きい値を示した。一方，その他測定値の頭胸甲長に対する比および遊泳毛数は給餌密度の影響を受けなかったが，齢期にともない変化した。頭胸甲長に対する各付属肢長の比は，第 2 顎脚外肢長では齢期にともない減少する傾向が認められたが，鋏長，鋏脚長ならびに第 3 腹節腹肢長では，齢期にともない増加する傾向が認められた。第 2 顎脚外肢の遊泳毛数は，第 1 齢ゾエアでは 4 本で，第 2 齢ゾエアで 12 本へ急激に増加したが，その後は脱皮ごとに数本が増加したにすぎなかった。

**摂餌量** 第 1，第 3，第 5 齢ゾエアにおけるアルテミア給餌密度と 1 日 1 個体あたりの摂餌数の関係を Fig. 3 に示した。各区の摂餌数には，第 1 齢ゾエアでは 4 個体 / mL 区とそれ以外の区で，第 5 齢ゾエアでは 0.25，0.5 ならびに 1 個体 / mL 区と 2 個体 / mL 区でそれぞれ有意差が認められ ( $P < 0.05$ )，第 3 齢ゾエアでは有意差が認められなかった ( $P > 0.05$ )。摂餌数は，第 3 齢と第 5 齢ゾエアでバラツキが大きいものの，給餌密度にしたがって増加し，2 個体 / mL 以上では飽和する傾向が認められた。また，齢期にともない摂餌数は多くなり，4 個体 / mL の基準で給餌したときの摂餌数を Fig. 3 の関係式から求めると，第 1 齢ゾエアでは 8.8 個体，第 3 齢ゾエアでは 22.2 個体，第 5 齢ゾエアでは 42.4 個体であった。

## 考 察

**生残と発育速度** アルテミアの給餌密度はケガニ幼生の生残率と発育速度に

大きな影響を及ぼし、2~4 個体 / mL 区で有意に高い生残率と短い脱皮所要日数を示した。したがって、生残率と発育速度から判断したアルテミアの適正給餌密度は 2 個体 / mL 程度であると考えられる。今回と同様の現象は、アミメノコギリガザミ *Scylla serrata* (Suprayudi *et al.*, 2002), アサニガニ *Ranina ranina* (Minagawa & Murano, 1993) およびテラオクルマエビ *Penaeus marginatus* (Gopalakrishnan, 1976) などでも報告されている。ただし、テラオクルマエビでは、給餌密度が低い場合に共食いが発生したことが報告されている (Gopalakrishnan, 1976)。また、ガザミ類の種苗生産においては、メガロパへの脱皮の同調性が低下した場合、先に脱皮したメガロパがゾエアを捕食する現象、すなわち共食いによって生残率が大きく低下することが知られている (浜崎, 1997 ; Hamasaki *et al.*, 2002)。本実験では、メガロパとゾエアを別々に飼育したことから、給餌密度と共食いに起因すると推察された死亡個体数の間に関連は認められなかった。しかし、大型水槽を用いた種苗生産では、ゾエアとメガロパを別々に飼育することは困難であり、本種でも脱皮の同調性が低下した場合、共食いによって生残率が大きく低下することが予想される。今回、給餌密度の増加によって各齢期までの所要日数の変動係数が小さくなる、すなわち脱皮の同調性が高くなったことから、種苗生産における給餌密度の増加によって、共食い頻度の低下による生残率の向上も見込めるものと考えられる。

**成長** 幼生の体サイズは、給餌密度にしたがって大きくなる傾向を示し、メガロパの頭胸甲長は 2~4 個体 / mL 区で有意に大きい値を示した。したがって、成長から判断したアルテミアの適正給餌密度は 2 個体 / mL 程度であると考えられる。インドクルマエビ *Penaeus indicus* (Emmerson, 1980) やミナミイセエビ *Jasus edwardsii* (Tong *et al.*, 1997) の幼生では給餌密度が高いほど全長が大きくなる傾向を示し、アサヒガニ幼生では、給餌密度が高いほど甲長等の成長が促進されるが、各付属肢の遊泳毛数に与える影響はないと報告されている

(Minagawa & Murano, 1993)。一方、アミメノコギリガザミでは、高い給餌密度でゾエアを飼育した場合、ゾエアの形態形成が過剰に進行し、メガロパへ正常に変態できない現象が報告されている (Hamasaki *et al.*, 2002 ; Suprayudi *et al.*, 2002)。本実験では、頭胸甲長に対する鋏長などの比や顎脚遊泳毛数と給餌密度の間には関連は認められず、アミメノコギリガザミのような過剰な形態形成による脱皮不全は観察されなかったことから、給餌密度は幼生の形態形成には影響を与えず、大きさのみに影響を与えるものと考えられる。

**摂餌量** ケガニのゾエアは、2 個体 / mL 以上のアルテミア給餌密度で飽食する傾向を示した。したがって、2 個体 / mL 以上で飽食に達することが、ゾエアの高い生残率、発育速度および成長の促進を実現しているものと推察される。今回と同様な給餌密度と摂餌量の関係は、アサヒガニ (Minagawa & Murano, 1993), インドクルマエビ (Emmerson, 1980), タイワンガザミ *Portunus pelagicus* (八塚, 1960), イセエビ *Panulirus japonicus* (井上, 1965), ヨシエビ *Metapenaeus ensis* (Chu & Shing, 1986)ならびにウシエビ *Penaeus monodon* (Loya-Javellana, 1989) 等の幼生でも報告されている。

本実験では、第3 齢と第5 齢ゾエアの摂餌量のバラツキが大きかった。この原因として、実験中は無通気としたため、実験容器内におけるアルテミアの分布が不均一であった可能性が考えられる。また、ガザミ *Portunus trituberculatus* では、ゾエアの摂餌量は齢期にともない餌料密度に依存しなくなる、すなわち増大した遊泳力により積極的に摂餌を行うと推察されており (深山, 1997), ホッコクアカエビ *Pandalus eous* では、ゾエアの遊泳行動が齢期にともない受動的から能動的に変化することが報告されている (有瀧ら, 2003)。本実験のケガニにおいても、齢期の進行にともないゾエアの遊泳力が増大し、摂餌が給餌密度の影響を受けにくくなったとも考えられる。今後この考えを証明するには、各齢期のゾエアおよびメガロパを材料に用い、今回よりも広い給餌密度範囲を

設定し、通気による餌料密度の均一化に配慮して給餌密度と摂餌量の関係を調査する必要がある。

**種苗生産への応用** 本研究によって、アルテミアの給餌密度がケガニ幼生の生残、発育および摂餌に影響を与えることが明らかになり、生残率、発育速度および成長から判断した適正給餌密度は2個体/mL程度であると結論付けられる。ケガニ幼生は珪藻の一種 *Thalassiosira* sp.を給餌して第3齢ゾエアまで成長させることが可能であることから(市川 卓, 私信), 数十トン規模の大型水槽によるケガニの種苗生産では, *Thalassiosira* sp.とアルテミアが併用給餌され, 給餌密度は前者がゾエア期間を通じて1000~5000細胞/mLに設定し, 後者が0.1~0.6個体/mLで齢期に応じて増加させている。厚岸栽培漁業センターでは, このような餌料系列を採用し, メガロパで38.8%の生残率を得た事例が報告されている(厚岸事業場, 1986)。しかし, 生残率は0.0~38.8%の範囲で変動し, 安定して高い生残率が得られているとはいえず(宮古事業場, 1991, 1992; 厚岸事業場, 1992), *Thalassiosira* sp.の培養不調による餌不足の場合, ゾエアが大量に死亡した事例も認められている(宮古事業場, 1991, 1992)。したがって, これまでの種苗生産で生残率が安定しなかったのは, アルテミアの給餌密度が低く, *Thalassiosira* sp.に依存した餌料体系であったことに大きく起因するものと推察され, この状況を改善するにはアルテミアの給餌密度の増加が必須であると考えられる。ただし, 大型水槽を使用した種苗生産の飼育環境を, 本実験で用いたビーカーのように制御することは困難であることから, 大型水槽における給餌密度の増加は飼育環境の悪化を招く可能性がある。今後は, 本研究で実際に明らかにしたアルテミアの適正給餌密度を大型水槽による種苗生産に適用し, その効果を評価する必要がある。

## 文 献

- 有滝真人, 浜崎活幸, 早乙女浩一. 2003. 飼育環境下におけるホッコクアカエビ幼生の相対成長. 日本水産学会誌, **69**: 65–71.
- Anger, K. 2001. The quantity of food uptake. In: Vonk R (ed). *Crustacean issues 14, The biology of decapod crustacean larvae*. pp.127–137. A.A. Balkema, The Netherlands.
- 厚岸事業場. 1983. 種苗生産技術の開発の概要, ケガニ. 日本栽培漁業協会事業年報昭和 57 年度, pp. 239–242. 日本栽培漁業協会, 東京.
- 厚岸事業場. 1986. 種苗生産技術の開発の概要, ケガニ. 日本栽培漁業協会事業年報昭和 60 年度, pp. 228–230. 日本栽培漁業協会, 東京.
- 厚岸事業場. 1992. 種苗生産技術の開発の概要, ケガニ. 日本栽培漁業協会事業年報平成 9 年度, pp. 229–231. 日本栽培漁業協会, 東京.
- Chu, K. H. & Shing, C. K. 1986. Feeding behavior of the shrimp, *Metapenaeus ensis*, on *Artemia* nauplii. *Aquaculture*, **58**: 175–184.
- Emmerson, W. D. 1980. Ingestion, growth and development of *Penaeus indicus* larvae as a function of *Thalassiosira weissflogii* cell concentration. *Marine Biology*, **58**: 65–73.
- 深山義文. 1997. 幼生の摂餌と栄養要求. 「栽培漁業技術シリーズ No.3 ガザミ種苗生産技術の理論と実践」(ガザミ種苗生産研究会編), pp. 88–102. 日本栽培漁業協会, 東京.
- Gopalakrishnan, K. 1976. Larval rearing of red shrimp *Penaeus marginatus* (Crustacea). *Aquaculture*, **9**: 145–154.
- 浜崎活幸. 1997. 幼生の生残. 「栽培漁業技術シリーズ No.3 ガザミ種苗生産技術の理論と実践」(ガザミ種苗生産研究会編), pp. 111–115. 日本栽培漁業協会, 東京.

- Hamasaki, K., Suprayudi, M. A. & Takeuchi, T. 2002. Mass mortality during metamorphosis to megalops in the seed production of mud crab *Scylla serrata* (Crustacea, Decapoda, Portunidae). *Fisheries Science*, **68**: 1226–1232.
- 林田豪介, 松清恵一. 1982. ガザミ種苗生産における適正給餌率. 長崎県水産試験場研究報告, **8**: 153–162.
- 池原宏二, 小川泰樹. 1997. 全国の地方設定魚種の漁獲量. pp. 153–154. 水産庁資源生産推進部整備課, 東京.
- 井上正昭. 1965. イセエビの初期フィロゾーマの捕食数について. 日本水産学会誌, **31**: 902–906.
- Loya-Javellana, G. N. 1989. Ingestion saturation and growth response of *Penaeus monodon* larvae to food density. *Aquaculture*, **81**: 329–336.
- 三原栄次. 2003. ケガニ. 「新北のさかなたち」(上田吉幸, 前田圭司, 嶋田 宏, 鷹見達也編), pp. 380–385. 北海道新聞社, 北海道.
- Minagawa, M. & Murano, M. 1993. Effect of prey density on survival, feeding rate and development of zoeas of the red frog crab, *Ranina ranina* (Crustacea, Decapoda, Raninidae) under laboratory conditions. *Aquaculture*, **113**: 91–100.
- 宮古事業場. 1982. 種苗生産技術の開発の概要, ケガニ. 日本栽培漁業協会事業年報昭和 56 年度, pp. 169–175. 日本栽培漁業協会, 東京.
- 宮古事業場. 1985. 種苗生産技術の開発の概要, ケガニ. 日本栽培漁業協会事業年報昭和 59 年度, pp. 222–230. 日本栽培漁業協会, 東京.
- 宮古事業場. 1991. 種苗生産技術の開発の概要, ケガニ. 日本栽培漁業協会事業年報平成 2 年度, pp. 254–256. 日本栽培漁業協会, 東京.
- 宮古事業場. 1992. 種苗生産技術の開発の概要, ケガニ. 日本栽培漁業協会事業年報平成 3 年度, pp. 224–227. 日本栽培漁業協会, 東京.
- 尾身東美, 山下幸悦. 1978. ケガニに関する試験. 昭和 52 年度北海道立栽培漁

業センター事業報告書, pp. 54–62. 北海道.

Omori, M. 1979. Growth, feeding, and mortality of larval and early postlarval stages of the oceanic shrimp *Sergestes similes* Hansen. *Limnology and Oceanography*, **24**: 273–278.

酒井 恒. 1976. ケガニ. 日本産蟹類, pp. 190–191. 講談社, 東京.

Paul, A.J., Paul, J. M., Shoemaker, P. A. & Feder, H. M. 1979. Prey concentrations and feeding response in laboratory-reared stage-one zoeae of king crab, snow crab, and pink shrimp. *Transactions of the American Fisheries Society*, **108**: 440–443.

Suprayudi, M. A., Takeuchi, T., Hamasaki, K. & Hirokawa, J. 2002. Effect of *Artemia* feeding schedule and density on the survival and development of larval mud crab *Scylla serrata*. *Fisheries Science*, **68**: 1295–1303.

Tong, L. J., Moss, G. A., Paewai, M. M. & Pickering, T. D. 1997. Effect of brine-shrimp numbers on growth and survival of early-stage phyllosoma larvae of the rock lobster *Jasus edwardsii*. *Marine and Freshwater Research*, **48**: 935–940.

八塚 剛. 1960. タイワンガザミ zoea 幼生の飼育 I 餌料密度と捕食量. 水産増殖, **7**: 37–42.

Yúfera, M., Rodríguez, A. & Lubián, L. M. 1984. Zooplankton ingestion and feeding behavior of *Penaeus kerathurus* larvae reared in the laboratory. *Aquaculture*, **42**: 217–224.

Yúfera, M. & Rodríguez, A. 1985. Effect of prey density on feeding rates during larval rearing of *Palaemon serratus* Pennant (Crustacea: Palaemonidae). *Aquaculture*, **50**: 31–38.

**Table 1** Mean survival rate (n=2) required to reach each larval stage of *Erimacrus isenbeckii* reared at six prey density levels

Prey density (nauplii /mL)	Survival rate (%) to each stage* <sup>1</sup>					
	Z2	Z3	Z4	Z5	MG	C1
0	0 (0.0) <sup>*2,a</sup>	0 (0.0) <sup>a*3</sup>	0 (0.0) <sup>a</sup>	0 (0.0) <sup>a</sup>	0 (0.0) <sup>a</sup>	0 (0.0) <sup>a</sup>
0.25	92.0 (2.8) <sup>b</sup>	84.0 (2.8) <sup>b</sup>	65.0 (12.7) <sup>b</sup>	38.0 (0.0) <sup>b</sup>	14.0 (2.8) <sup>b</sup>	4.0 (2.8) <sup>ab</sup>
0.5	100.0 (0.0) <sup>c</sup>	92.0 (5.7) <sup>bc</sup>	89.0 (4.2) <sup>bc</sup>	71.0 (1.4) <sup>c</sup>	38.0 (2.8) <sup>c</sup>	23.0 (4.2) <sup>bc</sup>
1	99.0 (1.4) <sup>bc</sup>	96.0 (0.0) <sup>bc</sup>	92.0 (5.7) <sup>bc</sup>	86.0 (2.8) <sup>cd</sup>	44.0 (11.3) <sup>c</sup>	29.0 (21.2) <sup>bcd</sup>
2	99.0 (1.4) <sup>bc</sup>	98.0 (2.8) <sup>c</sup>	97.0 (1.4) <sup>c</sup>	97.0 (1.4) <sup>d</sup>	71.0 (4.2) <sup>d</sup>	64.0 (0.0) <sup>cd</sup>
4	100.0 (0.0) <sup>c</sup>	100.0 (0.0) <sup>c</sup>	97.0 (4.2) <sup>c</sup>	94.0 (5.7) <sup>d</sup>	84.0 (2.8) <sup>d</sup>	69.0 (9.9) <sup>d</sup>

\*<sup>1</sup> Z2-Z5, second to fifth zoal stage; MG, megalopal stage; C1, first crab stage.

\*<sup>2</sup> Mean (SD).

\*<sup>3</sup> Significant differences were found between groups with different superscripts in the same column ( $P < 0.05$ ).

**Table 2** Developmental period (days) from hatching required to reach each larval stage of *Erimacrus isenbeckii* reared at five prey density levels

Prey density <sup>*1</sup> (nauplii /mL)	Days to each stage <sup>*2</sup>					
	Z2	Z3	Z4	Z5	MG	C1
0.25	8.6 (23.5) <sup>*3,a</sup>	18.5 (19.0) <sup>a*4</sup>	27.2 (15.2) <sup>a</sup>	36.8 (15.7) <sup>a</sup>	50.9 (14.0) <sup>a</sup>	70.3 (5.7) <sup>a</sup>
0.5	7.4 (13.7) <sup>b</sup>	14.8 (16.8) <sup>b</sup>	22.7 (13.1) <sup>b</sup>	31.1 (15.0) <sup>b</sup>	45.0 (15.1) <sup>b</sup>	67.3 (8.6) <sup>a</sup>
1	6.6 (9.6) <sup>c</sup>	12.8 (9.1) <sup>c</sup>	18.9 (10.1) <sup>c</sup>	24.9 (9.6) <sup>c</sup>	34.0 (8.2) <sup>c</sup>	60.8 (7.5) <sup>b</sup>
2	6.1 (4.5) <sup>d</sup>	11.4 (5.5) <sup>d</sup>	16.8 (5.5) <sup>d</sup>	22.7 (5.2) <sup>d</sup>	30.5 (4.2) <sup>d</sup>	55.1 (4.5) <sup>c</sup>
4	6.0 (2.3) <sup>d</sup>	10.9 (3.5) <sup>d</sup>	15.6 (4.4) <sup>e</sup>	21.4 (4.0) <sup>e</sup>	29.0 (3.6) <sup>d</sup>	54.3 (6.5) <sup>c</sup>

<sup>\*1</sup> No larvae survived to second zoeal stage (Z2) at 0 nauplius /mL.

<sup>\*2</sup> Z2-Z5, second to fifth zoeal stage; MG, megalopal stage; C1, first crab stage.

<sup>\*3</sup> Mean (coefficient of variation). *N* equals the number of larvae which successfully molted from the previous stage in both beakers 1 and 2 (see Fig. 2).

<sup>\*4</sup> Significant differences were found between groups with different superscripts in the same column ( $P < 0.05$ ).

**Table 3** Variation of carapace length, percent ratio of lengths of several appendages to carapace length and number of setae of exopods of the second maxilliped of *Erimacrus isenbeckii* larvae ( $n = 5$ ) at five prey density levels

Stage* <sup>1</sup>	Prey density* <sup>2</sup> (nauplii /mL)	Length (mm)* <sup>3</sup>	Ratio to carapace length (%)* <sup>3</sup>				Number of setae
		CL	MA	CH	CP	P	
Z1	-	1.11 (0.05)* <sup>4</sup>	47.1 (2.6)* <sup>5</sup>	-	-	2.3 (0.5)	4.0 (0.0)
	0.25	1.34 (0.09) <sup>a</sup>	42.4 (1.9) <sup>a</sup>	-	-	5.8 (0.3) <sup>a</sup>	12.0 (0.0) <sup>a</sup>
	0.5	1.40 (0.07) <sup>a</sup>	41.7 (1.6) <sup>a</sup>	-	-	5.3 (0.5) <sup>a</sup>	12.0 (0.0) <sup>a</sup>
Z2	1	1.38 (0.05) <sup>a</sup>	44.1(2.0) <sup>a</sup>	-	-	5.4 (0.3) <sup>a</sup>	12.0 (0.0) <sup>a</sup>
	2	1.37 (0.08) <sup>a</sup>	43.4 (2.3) <sup>a</sup>	-	-	5.4 (0.8) <sup>a</sup>	12.0 (0.0) <sup>a</sup>
	4	1.46 (0.02) <sup>a</sup>	40.9 (1.5) <sup>a</sup>	-	-	5.1 (0.3) <sup>a</sup>	12.0 (0.0) <sup>a</sup>
	0.25	1.58 (0.07) <sup>a</sup>	41.3 (1.6) <sup>ab</sup>	-	-	8.8 (0.7) <sup>a</sup>	14.0 (0.0) <sup>a</sup>
	0.5	1.67 (0.03) <sup>ab</sup>	39.5 (1.2) <sup>a</sup>	-	-	8.7 (0.3) <sup>a</sup>	14.2 (0.4) <sup>a</sup>
Z3	1	1.71 (0.05) <sup>b</sup>	40.4 (1.9) <sup>a</sup>	-	-	9.5 (1.1) <sup>ab</sup>	14.0 (0.0) <sup>a</sup>
	2	1.70 (0.04) <sup>b</sup>	40.5 (0.6) <sup>a</sup>	-	-	9.3 (1.4) <sup>a</sup>	14.0 (0.0) <sup>a</sup>
	4	1.63 (0.07) <sup>b</sup>	44.4 (2.8) <sup>b</sup>	-	-	11.2 (0.6) <sup>b</sup>	14.0 (0.0) <sup>a</sup>
	0.25	1.87 (0.07) <sup>a</sup>	36.3 (1.8) <sup>a</sup>	22.3 (0.7) <sup>ab</sup>	27.3 (1.0)	16.7 (0.8) <sup>a</sup>	17.6 (0.5) <sup>a</sup>
	0.5	1.90 (0.12) <sup>ab</sup>	38.4 (3.0) <sup>a</sup>	22.5 (1.2) <sup>ab</sup>	28.1 (1.7)	17.3 (2.2) <sup>a</sup>	17.6 (0.5) <sup>a</sup>
Z4	1	1.99 (0.14) <sup>ab</sup>	39.6 (2.7) <sup>a</sup>	22.3 (2.2) <sup>ab</sup>	27.4 (2.3)	17.8 (1.5) <sup>a</sup>	18.0 (0.0) <sup>a</sup>
	2	2.05 (0.03) <sup>ab</sup>	38.1 (1.1) <sup>a</sup>	23.0 (0.9) <sup>a</sup>	28.5 (0.8) <sup>*6</sup>	19.0 (0.7) <sup>a</sup>	17.8 (0.4) <sup>a</sup>
	4	2.07 (0.08) <sup>b</sup>	38.8 (1.3) <sup>a</sup>	20.1 (0.9) <sup>b</sup>	28.1 (0.1) <sup>*7</sup>	18.0 (1.6) <sup>a</sup>	18.0 (0.0) <sup>a</sup>
	0.25	2.15 (0.05) <sup>a</sup>	35.7 (1.8) <sup>a</sup>	30.3 (1.6) <sup>a</sup>	35.6 (2.1) <sup>ab</sup>	24.4 (2.0) <sup>a</sup>	19.4 (0.5) <sup>a</sup>
Z5	0.5	2.30 (0.18) <sup>ab</sup>	34.4 (1.6) <sup>a</sup>	27.1 (2.8) <sup>ab</sup>	33.2 (2.3) <sup>a</sup>	31.8 (3.9) <sup>b</sup>	19.2 (1.3) <sup>a</sup>
	1	2.47 (0.08) <sup>bc</sup>	35.3 (1.4) <sup>a</sup>	27.7 (1.5) <sup>ab</sup>	35.5 (1.5) <sup>ab</sup>	26.6 (1.3) <sup>a</sup>	20.0 (0.0) <sup>a</sup>

	2	2.59 (0.09) <sup>bc</sup>	35.0 (1.7) <sup>a</sup>	25.6 (1.5) <sup>b</sup>	32.9 (2.9) <sup>a</sup>	27.7 (1.9) <sup>ab</sup>	20.4 (0.5) <sup>a</sup>
	4	2.54 (0.18) <sup>bc</sup>	36.4 (1.7) <sup>a</sup>	30.5 (2.8) <sup>a</sup>	39.0 (2.6) <sup>b</sup>	28.6 (2.4) <sup>ab</sup>	20.2 (0.4) <sup>a</sup>
	0.25	2.98 (0.15) <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
	0.5	3.10 (0.16) <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
MG	1	3.53 (0.21) <sup>b</sup>	-	-	-	-	-
	2	3.62 (0.09) <sup>bc</sup>	-	-	-	-	-
	4	3.93 (0.20) <sup>c</sup>	-	-	-	-	-

\*<sup>1</sup> Z1-Z5, first to fifth zoeal stage; MG, megalopal stage.

\*<sup>2</sup> No larvae survived to second zoeal stage (Z2) at 0 nauplius /mL.

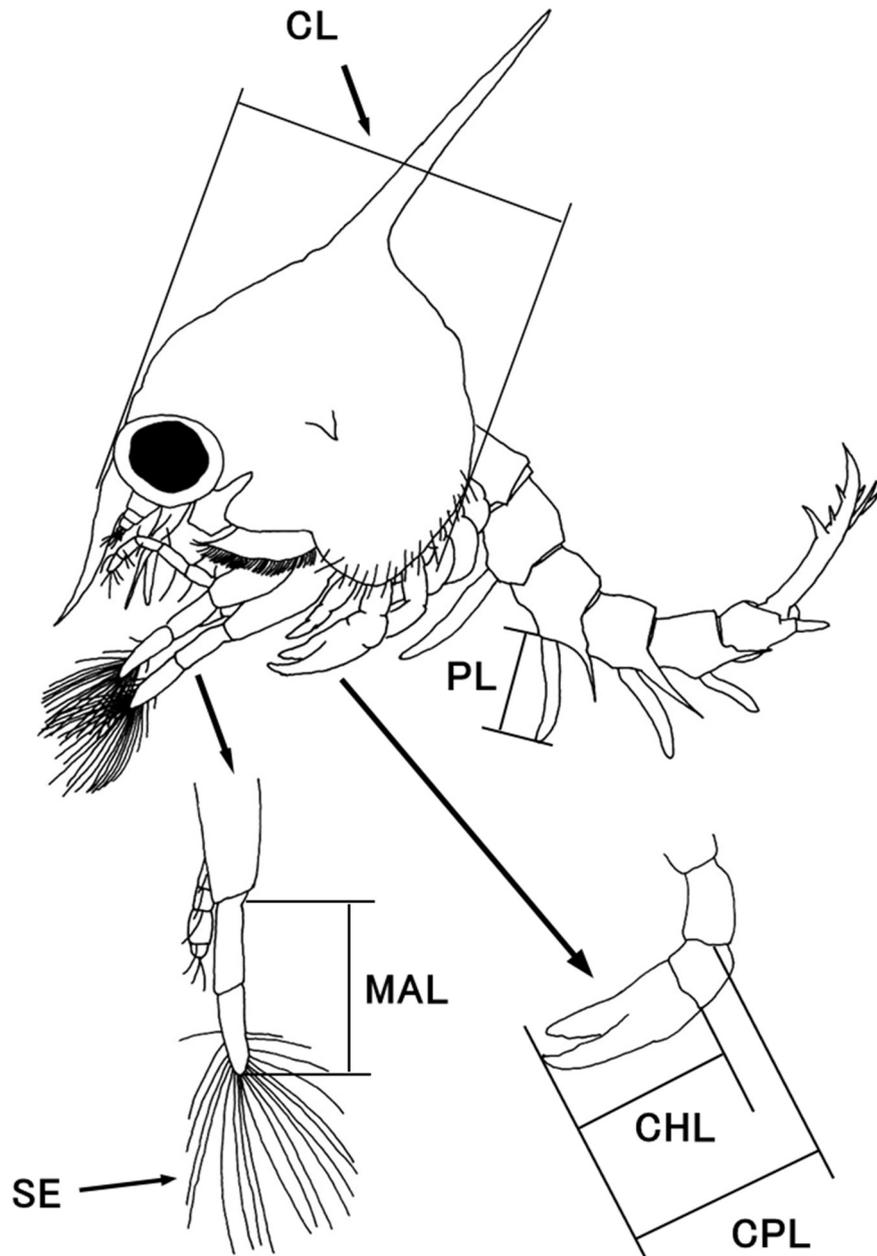
\*<sup>3</sup> CL, carapace length; MA, percent ratio of exopod length of the second maxilliped to carapace length; CH, percent ratio of chela length to carapace length; CP, percent ratio of cheliped length to carapace length; P, percent ratio of third pleopod length to carapace length.

\*<sup>4</sup> Mean (SD).

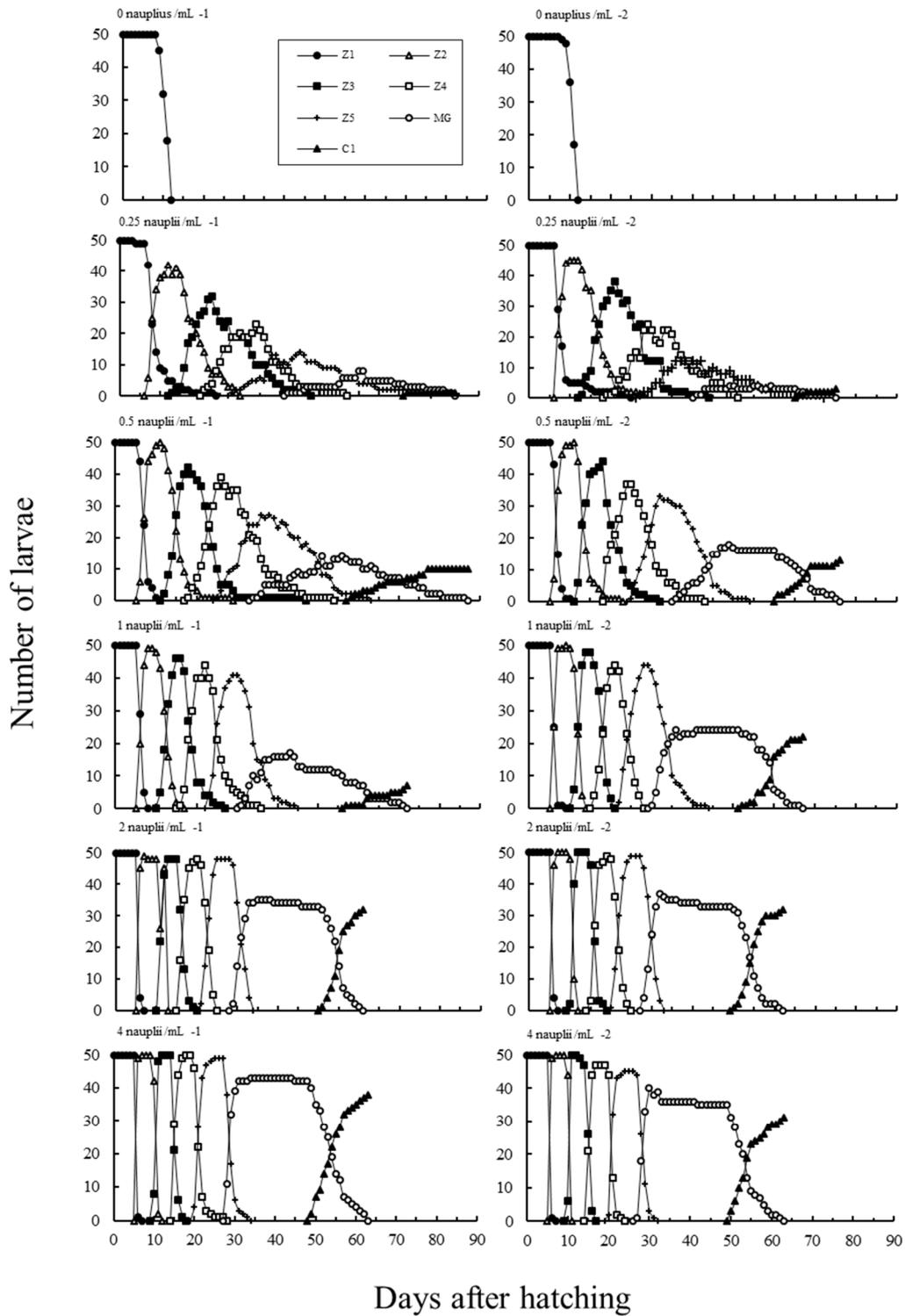
\*<sup>5</sup> Significant differences were found between groups with different superscripts in the same column ( $P < 0.05$ ).

\*<sup>6</sup>  $n = 3$

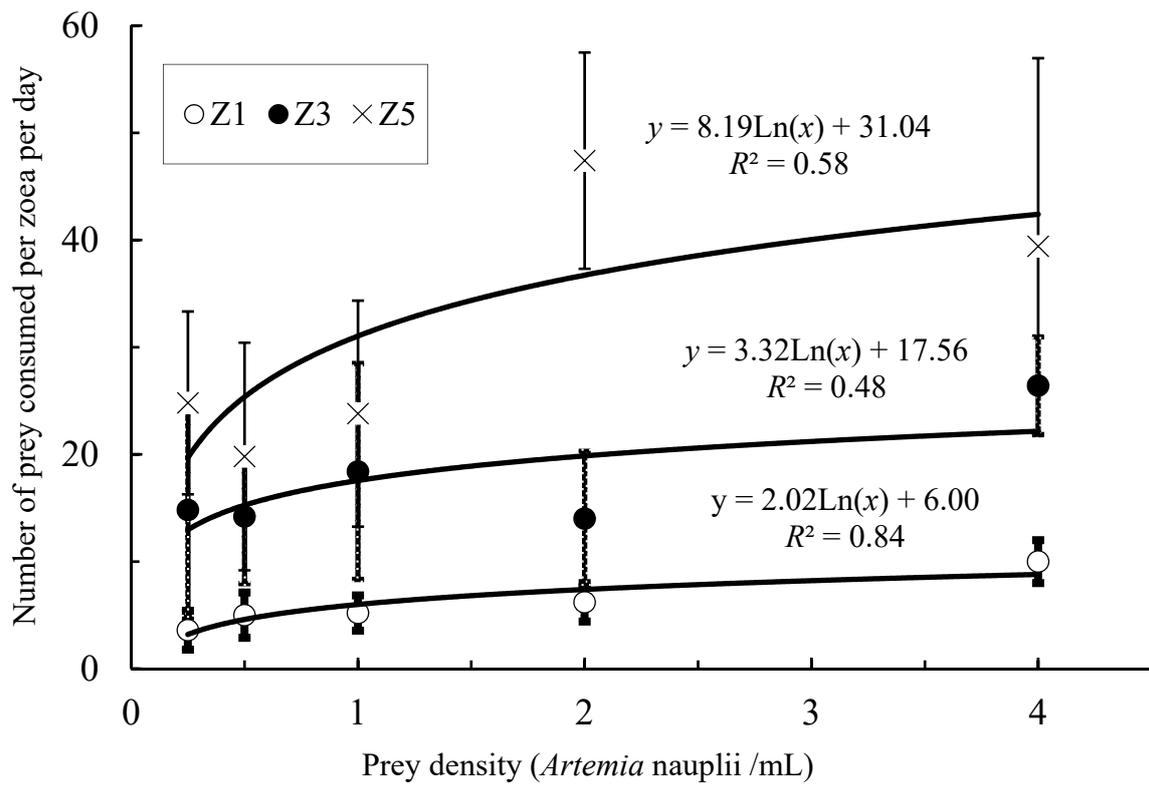
\*<sup>7</sup>  $n = 2$



**Figure 1** Diagram showing measurement of body parts for zoeal stages of *Erimacrus isenbeckii*. Body parts are illustrated using a fifth stage zoea of preserved specimens in the experiment. CL, carapace length; CPL, cheliped length; CHL, chela length; MAL; exopod length of second maxilliped; PL, third pleopod length; SE, setae.



**Figure 2** Number of larvae in each larval stage with time after hatching of *Erimacrus isenbeckii* reared at six prey density levels. Symbols indicate the larval stages: Z1–Z5, first to fifth zoeal stage; MG, megalopal stage; C1, first crab stage.



**Figure 3** Number of prey consumed by horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* larvae reared at five prey density levels for one day. Vertical bars indicate standard deviation. Z1–Z5, first to fifth zoeal stage.

## 第 3 章

種苗生産技術開発のための基礎的研究：  
イセエビフィロソーマ幼生の走光性および  
ケガニ幼生の適正な飼育環境条件

### 第 3 節

ケガニ幼生の生残，発育および摂餌に及ぼす  
水温の影響

Effects of water temperature on survival, development and feeding of  
larvae of the horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* (Crustacea, Decapoda,  
Brachyura) reared in the laboratory

## 緒 言

ケガニ *Erimacrus isenbeckii* は、十脚目クリガニ科に属し、本邦では主に北海道沿岸域、特にオホーツク海域と太平洋海域に多く分布し、美味で価格も高いために重要な漁業対象種となっている（酒井，1976；三原，2003）。しかし、その漁獲量は低水準で推移していることから（佐々木，2003）、種苗放流による積極的な資源増殖が望まれているが、種苗生産技術は確立されていない（厚岸事業場，1992）。著者らは、ケガニの種苗生産技術を確立する一環として、前報（神保ら，2005）において、ケガニ幼生の生残、発育および摂餌に及ぼすアルテミア給餌密度の影響について検討し、適正な給餌密度を明らかにした。十脚甲殻類幼生の飼育において、水温は外部環境要因の中で幼生の生残、発育および摂餌活動に大きな影響を与える要因の1つであり（倉田，1960；井上，1965；尾身・永島，1971；尾身・山下，1973a, 1973b；Gopalakrishnan, 1976；Johns, 1981；Nakanishi, 1981；Cockcroft & Emmerson, 1984；Yúfera & Rodriguez, 1985；中西，1987；MacKenzie, 1988；Minagawa, 1990；Okamoto, 1993；浜崎，1996；Matsuda & Yamakawa, 1997；Tong *et al.*, 2000；Anger, 2001；Anger *et al.*, 2003, 2004；Hamasaki, 2003；Liddy *et al.*, 2004；小金ら，2005）、種苗生産技術においても基礎的かつ重要な飼育条件の1つである。ケガニ幼生の飼育水温については、これまでに複数の機関で検討されているが（尾身・永島，1971；尾身・山下，1973b）、いずれも生残率が安定しなかったことから適正な飼育水温の解明には至っていない。そこで、本研究では、ケガニ幼生を水温 6～21°C の範囲で飼育し、その生残と発育および摂餌に及ぼす影響について調べた。

## 材料および方法

**抱卵雌** 2002年の2～3月にかけて、ふ化直前の抱卵雌145個体（頭胸甲長の平均値±標準偏差， $67.7 \pm 5.3$  mm）を北海道釧路沖から特別採捕許可によって入手した。そのうちの抱卵雌5個体を、日本栽培漁業協会厚岸事業場（現，国立研究開発法人水産研究・教育機構北海道区水産研究所厚岸庁舎）の $0.5 \text{ m}^3$ 水槽に個別に収容し、砂ろ過海水を使用して流水（10回転 / 日）で飼育し、ふ化させた。餌料はチカ，アサリおよびオキアミの切り身を用い，残餌が出る程度の量を週2回の頻度で給餌した。飼育期間中の水温は $-0.1 \sim 2.8^\circ\text{C}$ で推移した。

**幼生の生残と発育に及ぼす水温の影響** 実験区として，飼育水温を，6，9，12，15，18， $21^\circ\text{C}$ とした合計6区を設けた。飼育には，2Lの白色ポリエチレンビーカーを各区3個用い，水量は2Lとした。 $0.5 \text{ m}^3$ 水槽で飼育していた抱卵雌1個体から2002年3月17日にふ化した幼生を，各ビーカーに50個体ずつ収容した。3個のビーカーのうち，2個は生残率と各齢期へ脱皮するまでの所要日数を求め，1個は齢期ごとに幼生の体サイズを測定するために供した。飼育に用いた海水は，砂ろ過後に $50 \mu\text{m}$ と $5 \mu\text{m}$ のカートリッジフィルター（ポリプロピレンウインドカートリッジフィルター，アドバンテック社製）でろ過したもので，約1日充分に曝気して使用した。飼育水温はウォーターバス方式で調温し，ふ化幼生の収容時には $2^\circ\text{C}$ ，翌日に $6^\circ\text{C}$ ，その後は各区の設定温度まで $3^\circ\text{C}$  / 日で上昇させ，以後各設定水温に対して $\pm 1.0^\circ\text{C}$ を維持した。通気は，各ビーカーに対してパスツールピペット1本を用いて微量（約 $70 \text{ mL} / \text{min}$ ）に行った。日長は，水面から約1mの箇所に設置した2本の蛍光灯（40W）を7時から19時まで点灯して調整した。照度は，ビーカーの水面上で $600 \sim 700 \text{ lx}$ であった。餌料には北米産のアルテミア（日清ファインケミカル社製）を用い，13Lバケツを用いて $26^\circ\text{C}$ ，24時間でふ化させた。ふ化したアルテミアは，回収して13

L バケツに密度が 100 個体 / mL となるように再収容し，市販の栄養（エイコサペンタエン酸）強化剤（マリンアルファ，日清サイエンス社製）を 20 mL/L の割合で添加し，水温 22°C で 18～23 時間栄養強化した。給餌密度は，前報（神保ら，2005）の結果に基づき，各水温区とも 4 個体 / mL に統一した。

幼生は，毎日午前中に，前日から新しい海水を入れてあらかじめ調温しておいたビーカーに 10 mL 容の駒込ピペット（先を切断した広口のもの）を用いて移し替えた。その際に，幼生を肉眼で観察し，体全体の大きさにより齢期を判別し，生残個体数を計数した。また，死亡個体は取り除き，体の一部が破損している場合が多かったので，検鏡して齢期を確認した。メガロパが出現した場合，共食いの頻度を下げするために，第 5 齢ゾエア，脱皮当日のメガロパおよび脱皮翌日のメガロパを分けてそれぞれ別のビーカーで飼育した。各齢期までの生残個体数は，各齢期へ脱皮した幼生数で表した。給餌は，幼生を移槽後に行い，前述のアルテミアを所定の密度になるようにビーカーに添加した。飼育水には，幼生への糸状細菌の付着を防ぐためにアンピシリンナトリウム（シグマ社製）を 10 ppm の濃度で添加した。実験は，飼育した幼生が全滅するか，全ての幼生が第 1 齢稚ガニへ脱皮した日まで行った。

各齢期の体サイズ測定用のビーカーでは，メガロパまでの齢期ごとに最初に脱皮した 5 個体を，5%中性ホルマリンで 1 日固定後，70%エタノールで保存し，測定に供した。測定項目は前報<sup>5)</sup>と同様に，頭胸甲長，第 2 顎脚外肢長と遊泳毛数，鋏長，鋏脚長ならびに第 3 腹節腹肢長とした。測定は，実体顕微鏡（倍率 25～75 倍）および生物顕微鏡（100 倍）下で接眼マイクロメーターを用いて行った。ただし，鋏長および鋏脚長については第 4，第 5 齢ゾエアのみで測定し，メガロパでは頭胸甲長のみを測定した。第 2 顎脚外肢長，鋏長，鋏脚長ならびに第 3 腹節腹肢長については，頭胸甲長に対する割合（各付属肢長×10<sup>2</sup>/頭胸甲長，%）を算出した。

**幼生の摂餌に及ぼす水温の影響** 飼育水温（6, 9, 12, 15, 18, 21°C）が幼生の摂餌数に及ぼす影響を調べた。実験は、2002年に実施し、第1, 3および5齢ゾエアを供した。第1齢ゾエアはふ化1日後、第3齢および第5齢ゾエアは脱皮2日後の幼生であり、実験に供するまで前述の方法により12°Cで飼育した。ただし、第1齢ゾエアはふ化水温（2°C）のまま飼育した。各実験区では、20 mLガラス製標本瓶を各区5個使用し、幼生を1個体ずつ収容した。水量は20 mLとし、前述のアルテミアを第1齢および第3齢ゾエアでは40個体、第5齢ゾエアでは100個体ずつ給餌した。幼生と餌を入れたガラス瓶は、上述の幼生飼育実験と同一のウォーターバス内（各設定水温  $\pm 0.3^\circ\text{C}$ ）に直接収容し、無通気で静置した。日長および光条件は、幼生の飼育方法における設定と同様とした。実験は午前11時に開始し、24時間後にホルマリンを5~10%になるように飼育水に添加してゾエアとアルテミアを固定した。ケガニのゾエア幼生は1個体のアルテミアを完全に摂餌したので、ゾエアの摂餌数は実験前後のアルテミアの個体数から求めた。

**統計処理** 生残率、各齢期までの所要日数、体サイズに関する各測定項目の区間差ならびにアルテミア摂餌数の違いは、一元配置分散分析後に Tukey-Kramer の方法による多重比較を行い、有意水準 5%で検定した。ただし、生残率については、平均値と分散を独立にするために逆正弦変換した値を用いた。

平均飼育水温 ( $T$ ) とふ化から各齢期までの所要日数 ( $D$ ) の関係については、多くの十脚甲殻類（倉田, 1960 ; Johns, 1981 ; Nakanishi, 1981 ; 中西, 1987 ; Minagawa, 1990 ; Okamoto, 1993 ; Matsuda & Yamakawa, 1997 ; Anger, 2001 ; Anger *et al.*, 2003, 2004 ; Hamasaki, 2003 ; 小金ら, 2005 ; 浜崎, 1996）に適用されてきた以下に示す3つの非線形モデル式を用いて解析した。なお、18°C区では生残が低下し、脱皮までの日数が延びる傾向にあったことから、解析には6~15°C区で得られた全生残個体のデータを用いた。

$$\text{べき乗式} : D = aT^b \quad (1)$$

$$\text{Bělehrádek の式} : D = a(T - \alpha)^b \quad (2)$$

$$\text{積算温度則の式} : D = a/(T - \alpha) \quad (3)$$

ここで Bělehrádek の式と積算温度則の式におけるパラメータ  $\alpha$  は、それぞれ生物学的零度と発育臨界温度と呼ばれ、発育がその温度以下で停止する理論的閾値である。式 (2) において、 $\alpha = 0$  の場合、式 (1) と式 (2) は一致し、また式 (2) において  $b = -1$  の場合、式 (2) と式 (3) は一致する関係にある。各モデル式のパラメータの推定は、統計ソフト *R* を用い (R Development Core Team, 2005)、非線形最小自乗法で行った。また、同様に *R* を用い、推定した各モデル式について赤池情報量基準 (AIC) を計算し (北田, 2001)、AIC が最小値の式をデータに対して最節約的なモデルと判断した。

## 結 果

**飼育水温** 各区における飼育水温の推移を Fig. 1 に示した。9°C区では 2 日目に、12°C区では 3 日目に、15°C区では 4 日目に、18°C区では 5 日目に、21°C区では 6 日目にそれぞれ設定値まで昇温した。その後の各区の平均水温 (標準偏差) は、6.1°C (0.1)、9.2°C (0.4)、12.2°C (0.3)、15.3°C (0.3)、18.1°C (0.3) および 20.9°C (0.2) であり、設定値を維持できた。

**各齢期までの生残** 各実験区とも、供試した 2 個のビーカーの生残と発育状況は同様な傾向を示した (Fig. 2)。すべての区で第 2 齢ゾエアへの脱皮が認められたが、21°C区では第 2 齢から第 3 齢ゾエアへの脱皮期に大きく減耗し、第 4 齢ゾエアへ脱皮した個体は認められずに 16 および 21 日目で全滅した。18°C区では次齢期に脱皮するごとに減耗が認められ、特にメガロパへの変態期から第 1 齢稚ガニにかけて大量に死亡した。また、15°C区では第 5 齢ゾエアからメガ

ロパにかけて、6°C区ではメガロパから第1齢稚ガニにかけて、9~12°C区に比較して大きな減耗が認められた。生残率は、6~15°C区と18~21°C区の間で有意差が認められる傾向があり、第1齢稚ガニまでの生残率は、9°Cおよび12°C区でそれぞれ82.0%と72.0%で高い値を示した(Table 1)。なお、全区において、メガロパから第1齢稚ガニにかけて死亡個体が認められずに生残個体数が減少(0~4個体/ビーカー)する現象、すなわち共食いによると推測される生残個体の減少が見られたが、飼育水温との関係は認められなかったことから( $P>0.05$ )、ここではすべて通常の死亡個体として処理した。

**各齢期までの所要日数** 各齢期までの所要日数は、水温の上昇にしたがって短くなる傾向を示し、6°C、9°C、12°C、および15~18°C区の4群間で有意差が認められる傾向があったが、18°C区以上では逆に長くなる傾向を示した(Table 2)。脱皮時期のバラツキの指標として、各齢期までの所要日数の変動係数を計算してTable 2に示した。変動係数は、第2齢ゾエアでは12°C区が最も小さく、15°C区が最も大きかった。第3齢ゾエアからメガロパにかけての変動係数は、6~15°Cの範囲では水温にしたがってわずかに大きくなるものの、脱皮時期の大きなバラツキは見られなかった(Table 2)。しかし、18~21°C区では第3齢ゾエアで、18°C区ではメガロパで、また15°C区では第1齢稚ガニでの変動係数が上昇し、脱皮時期のバラツキが大きくなる傾向を示した(Table 2)。

飼育水温と各齢期までの所要日数の関係を表した3つのモデル式のパラメータの推定値をTable 3に示した。ふ化からメガロパまでの期間では、Bělehrádekの式が最小のAICを示し、データへの適合度が最も良かった。一方、ふ化から第1齢稚ガニまでの期間では、べき乗式が最小のAICを示したものの、3式ともほぼ同程度の値であった。

**成長** 各齢期の頭胸甲長、頭胸甲長に対する第2顎脚外肢長、鋏長、鋏脚長ならびに第3腹節腹肢長の割合および第2顎脚外肢の遊泳毛数をTable 4に示し

た。頭胸甲長は、第3齢ゾエア以降において水温が高くなるにともない小さくなる傾向を示し、第5齢ゾエアでは12~18℃区が6~9℃区に対して有意に小さく、メガロパでは18℃区が6~15℃区に対して有意に小さい値を示した。

一方、その他測定値の頭胸甲長に対する割合および遊泳毛数は水温の影響を受けなかったが、前報（神保ら、2005）と同様に齢期にともない変化した。頭胸甲長に対する各付属肢長の割合は、第2顎脚外肢長では齢期にともない減少する傾向が認められたが、鋏長、鋏脚長ならびに第3腹節腹肢長では、齢期にともない増加する傾向が認められた。第2顎脚外肢の遊泳毛数は、第1齢ゾエアでは4本で、第2齢ゾエアで12本へ急激に増加したが、その後は脱皮ごとに数本が増加したにすぎなかった。

**摂餌数** 各水温における第1、第3、第5齢ゾエアの1日1個体あたりのアルテミア摂餌数をTable 5に示した。ただし、実験期間中に、第1齢ゾエアの18℃で1個体、21℃で3個体、第5齢ゾエアの18℃で1個体が死亡したので、それらのデータは除外して示した。ゾエアのアルテミア摂餌数は、バラツキが大きいものの各齢期とも6℃、18℃および21℃で減少する傾向が認められた。特に、第3齢ゾエアの摂餌数は、21℃が9~15℃に対して有意に減少した。

## 考 察

**生残** これまでにケガニ幼生の飼育水温について検討した研究事例はあるが（尾身・永島、1971；尾身・山下、1973b）、全体的に幼生の生残が安定しなかったために、適正な飼育水温は明らかになっていなかった。本実験において、飼育水温はケガニ幼生の生残に大きな影響を及ぼすことが明らかになり、6~15℃区、特に9~12℃区で高い生残率を示した。21℃区では、第3齢から第4齢ゾエアにかけて全滅し、18℃区では、第5齢ゾエアからメガロパへの変態期に

大量減耗が見られていることから、水温が 18°C以上になると高水温による生残への影響が生じるものと考えられる。また、ケガニ幼生が高い生残率を示す水温範囲は、特に高水温側において齢期が進行するとともに狭くなる傾向が見られた。これと同様の現象は、タラバガニ *Paralithodes camtschaticus* (倉田, 1960; 中西, 1987), ハナサキガニ *Paralithodes brevipes* (Nakanishi, 1981), タカアシガニ *Macrocheira kaempferi* (Okamoto, 1993), アサヒガニ *Ranina ranina* (Minagawa, 1990), ズワイガニ *Chionoecetes opilio* (小金ら, 1990), イバラガニ属の一種 *Lithodes santolla* (Anger et al., 2004), パタゴニアエゾイバラガニ *Paralomis granulosa* (Anger et al., 2003), トヤマエビ *Pandalus hypsinotus* (尾身・山下, 1973a), テラオクルマエビ *Melicertus marginatus* (Gopalakrishnan, 1976), ならびにアメリカウミザリガニ *Homarus americanus* (MacKenzie, 1988) 等で報告されており、十脚甲殻類幼生一般に認められる現象と考えられる。

**発育日数と臨界温度** 本研究では、ケガニ幼生の各齢期までの所要日数は飼育水温が高くなるにともない有意に短くなったが、逆に 18°Cを超えると長くなる傾向を示した。このような現象はアサヒガニ (Minagawa, 1990) およびトヤマエビ (尾身・山下, 1973a) でも知られている。今回、ケガニゾエア幼生の摂餌数は、18°Cを超えると比較的大きく低下する傾向があった (Table 5)。カニ類幼生の代謝 (酸素消費量) は水温の上昇にともない高くなることが知られている (Nakanishi, 1981; 中西, 1987; Anger, 2001)。したがって、18°C以上では、ケガニ幼生の摂餌と代謝のバランスが崩れたために発育日数が延長されたと考えられることができる。以上のことから、ケガニ幼生が正常に発育できる高温側の臨界温度は 15°C程度であると推察される。なお、本研究における摂餌実験では、ゾエアを入れたガラス瓶 (水温は第 1 齢ゾエアが 2°C, 第 3 齢および第 5 齢ゾエアが 12°C) を実験水温に設定したウォーターバスに直接収容したことから、急激な温度変化も結果に影響を与えている可能性がある。特に、第 1 齢ゾエア

の 21°C区では供試した 5 個体のうち 3 個体が死亡していたことから、温度変化の影響が大きかったものと推察される。水温がケガニ幼生の摂餌に及ぼす影響については、水温馴致の期間を設けるなどして今後さらに検討する必要がある。

飼育水温と各齢期までの所要日数の関係を表したモデル式において、ふ化からメガロパまでの期間では、Bělehrádek の式が最節約的なモデル式と判断された。Bělehrádek の式におけるパラメータ  $\alpha$  (生物学的零度) は、第 5 齢ゾエアまでは 3°C前後の値を示し、メガロパまでは 2°C程度に低下した。また、第 1 齢稚ガニまでの期間では、3 つのモデル式の適合度は同等と判断されたが、これは生物学的零度が 0°Cであることを示す。したがって、ケガニ幼生の生物学的零度は、ゾエアからメガロパおよび稚ガニにかけて低下するものと考えられ、このことはケガニ幼生の低温側の温度耐性が成長にともない強化されることを示すものである。この現象は、天然海域における幼生の分布が表層および中層から次第に深くなり、メガロパから第 1 齢稚ガニにかけて水深 20~50 m 付近で着底する(阿部, 1977) ことに関連した生理的な変化と捉えることができる。同じ海域に分布するタラバガニ(倉田, 1960) およびハナサキガニ(Nakanishi, 1981) の生物学的零度はそれぞれ 0°Cおよび-1.8~3°Cに近いと推定されており、ケガニとほぼ同程度の温度を示している。

**成長** ケガニ幼生の体サイズは、水温が低くなるにしたがって大きくなる傾向を示し、第 5 齢ゾエアおよびメガロパの頭胸甲長は、6 および 9°C区で有意に大きい値を示した。また、18°C区では、メガロパの頭胸甲長において特に成長が劣っていた (Table 4)。これは先述したように、ケガニ幼生の摂餌と代謝のバランスに起因するのであろう。Anger (2001) は、多くの十殻甲殻類幼生において、その種あるいは齢期ごとに成長に最適な飼育水温があり、その範囲を逸脱すると逆に成長が劣るとしている。飼育水温と幼生の体サイズの関係については、イチョウガニ属の一種 *Cancer irroratus* (Johns, 1981), テラオクルマエビ

(Gopalakrishnan, 1976), アメリカウミザリガニ (MacKenzie, 1988), クルマエビ科の一種 *Macropetasma africanus* (Cockcroft & Emmerson, 1984) 等で報告されており, いずれも体サイズが大きいと生残も高くなる傾向を示している。ケガニ幼生では, 9°C区において最も高い生残と良好な成長を示しており, これらの結果と同様の傾向を示した。また, *Cancer irroratus* 幼生では, 水温は体サイズに影響するものの, 第1, 2顎脚の剛毛数および尾節棘等の観察結果から, 形態には影響しないと報告されているが (Johns, 1981), アサヒガニでは, 水温が高いあるいは低い場合, 頭胸甲長等の成長が抑制されると同時に各付属肢の遊泳毛数も減少することが報告されている (Minagawa, 1990)。本実験では, 頭胸甲長に対する缺長などの割合や顎脚遊泳毛数と水温の間には関連は認められなかったことから, 水温はケガニ幼生の形態形成には影響を与えず, 体サイズのみに影響を与えるものと考えられる。

**種苗生産への応用** 本研究によって, 飼育水温がケガニ幼生の生残, 成長および摂餌に影響を与えることが明らかになった。生残率は 6~15°Cでは有意差が認められなかったが, 18°Cと 21°Cでは有意に低下し, 加えて成長の不良ならびに摂餌数の減少が見られた。したがって, 18°C以上の水温はケガニ幼生の飼育には不適であると判断される。アミメノコギリガザミ *Scylla serrata* の種苗生産では, ゴエアからメガロパ変態期の脱皮同調率が低下すると, メガロパがゴエアを捕食する共食いによって大きく減耗する場合があることから, 脱皮が同調する水温が適正飼育水温であると指摘されている (Hamasaki, 2003)。本実験においては, 共食いによる減耗を防ぐために, メガロパとゴエアを別のビーカーで飼育したものの, 共食いによると推察される若干の減耗が生じた。大型の種苗生産水槽ではメガロパとゴエアを別水槽で飼育することは困難であり, 共食いの頻度を下げるには, 脱皮日のバラツキを小さくする必要がある。今回, 第1齢稚ガニまでの所要日数の変動係数は 15°C以上で大きかった。以上の生残,

成長，摂餌および脱皮同調に加え，飼育期間の短縮による飼育作業の軽減効果を考慮すると，ケガニ種苗生産における適正飼育水温は 9～12℃と結論付けられる。

## 文 献

- 阿部晃治. 1977. 道東近海におけるケガニの初期生活. 水産海洋研究会報, **31**: 14–19.
- 厚岸事業場. 1992. 種苗生産技術の開発の概要 ケガニ. 日本栽培漁業協会事業年報平成9年度, pp. 229–231. 日本栽培漁業協会, 東京.
- Anger, K. 2001. The quantity of food uptake. In: Vonk R (ed). *Crustacean issues 14, The biology of decapod crustacean larvae*. A.A. Balkema, The Netherlands.
- Anger, K., Lovrich, G. A., Thatje, S. & Calcagno, J. A. 2004. Larval and early juvenile development of *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda: Anomura: Lithodidae) reared at different temperatures in the laboratory. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **306**: 217–230.
- Anger, K., Thatje, S., Lovrich, G. & Calcagno, J. 2003. Larval and early juvenile development of *Paralomis granulosa* reared at different temperatures: tolerance of cold and food limitation in a lithodid crab from high latitudes. *Marine Ecology Progress Series*, **253**: 243–251.
- Cockcroft, A. C. & Emmerson, A. C. 1984. The effect of temperature on the growth, development and survival of *Macropetasma africanus* (Balss) (Penaeoidea: Penaeidae) larvae reared in the laboratory. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **84**: 203–210.

- Gopalakrishnan, K. 1976. Larval rearing of red shrimp *Penaeus marginatus* (Crustacea). *Aquaculture*, **9**: 145–154.
- 浜崎活幸. 1996. ガザミの生殖と発育に関する研究. 日本栽培漁業協会特別研究報告 8 号, 日本栽培漁業協会, 東京.
- Hamasaki, K. 2003. Effect of temperature on the egg incubation period, survival and developmental period of larvae the mud crab *Scylla serrata* (Forskål) (Brachyura: Portunidae) reared in the laboratory. *Aquaculture*, **219**: 561–572.
- 井上正昭. 1965. イセエビの初期フィロゾーマの捕食数について. 日本水産学会誌, **31**: 902–906.
- 神保忠雄, 浜崎活幸, 芦立昌一. 2005. ケガニ幼生の生残, 発育および摂餌に及ぼすアルテミア給餌密度の影響. 日本水産学会誌, **71**: 563–570.
- Johns, D. M. 1981. Physiological studies on *Cancer irroratus* larvae. I. Effects of temperature and salinity on survival, development rate and size. *Marine Ecology Progress Series*, **5**: 75–83.
- 北田修一. 2001. 初期死亡過程の分析, マダイの放流実験. 「栽培漁業と統計モデル分析」, pp. 118–134, 共立出版, 東京.
- 小金隆之, 浜崎活幸, 野上欣也. 2005. ズワイガニ幼生の生残と発育日数に及ぼす水温の影響. 日本水産学会誌, **71**: 161–164.
- 倉田 博. 1960. タラバガニの幼生と稚ガニに関する研究 III 幼生の生き残りと発育速度とにおよぼす水温と塩分濃度の影響. 北海道区水産研究所研究報告, **21**: 9–14.
- Liddy, G. C., Phillips, B. F. & Maguire, G. B. 2004. Effects of temperature and food density on the survival and growth of early stage phyllosoma of the western rock lobster, *Panulirus Cygnus*. *Aquaculture*; **242**: 207–215.

- MacKenzie, B. R. 1988. Assessment of temperature effects on interrelationships between stage durations, mortality and growth in laboratory-reared *Homarus americanus* Milne Edwards larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **116**: 87–98.
- Matsuda, H. & Yamakawa, T. 1997. Effects of temperature on growth of Japanese spiny lobster, *Panulirus japonicus* (V. Siebold) phyllosomas under laboratory conditions. *Marine and Freshwater Research*, **48**: 791–796.
- 三原栄次. 2003. ケガニ. 「新北のさかなたち」(上田吉幸, 前田圭司, 嶋田 宏, 鷹見達也編), pp. 380–385, 北海道新聞社, 北海道.
- Minagawa, M. 1990. Influence of temperature on survival, feeding and development of larvae of the red frog crab, *Ranina ranina* (Crustacea, Decapoda, Raninidae). *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**: 755–760.
- Nakanishi, T. 1981. The effect of temperature on growth, survival and oxygen consumption of larvae and post-larvae of *Paralithodes brevipes* (Decapoda: Anomura). *Bulletin of Japanese Sea Regional Fisheries Research Laboratory*, **32**: 49–56.
- 中西 孝. 1987. タラバガニの飼育条件に関する研究. 日本海区水産研究所研究報告, **7**: 57–161.
- Okamoto, K. 1993. Influence of temperature on survival and growth of larvae of the giant spider crab *Macrocheira kaempferi* (Crustacea, Decapoda, Majidae). *Nippon Suisan Gakkaihi*, **59**: 419–424.
- 尾身東美, 水島敏博. 1971. かに類養殖飼料開発試験 1.水温. 昭和46年度北海道立釧路水産試験場報告書, pp. 178–180, 北海道.
- 尾身東美, 山下幸悦. 1973. 甲殻類種苗培養技術開発試験, トヤマエビ. 昭和48年度北海道立栽培漁業センター事業報告書, pp. 41–60, 北海道.

- 尾身東美, 山下幸悦. 1973. 甲殻類種苗培養技術開発試験 ケガニ. 昭和 48 年度北海道立栽培漁業センター事業報告書, pp. 60–64, 北海道.
- R Development Core Team. 2005. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- 酒井 恒. 1976. ケガニ. 日本産蟹類, pp. 190–191, 講談社, 東京.
- 佐々木潤. 2003. 北海道周辺のケガニ. 「エビ・カニ類資源の多様性」(大富 潤, 渡邊清一編), pp. 31–44, 恒星社厚生閣, 東京.
- Tong, L. J., Moss, G. A., Paewai, M. P. & Pickering, T. D. 2000. Effect of temperature and feeding rate on the growth and survival of early and mid-stage phyllosomas of the spiny lobster *Jasus edwardsii*. *Marine and Freshwater Research*, **51**: 235–241.
- Yúfera, M. & Rodriguez, A. 1985. Effect of prey density on feeding rates during larval rearing of *Palaemon serratus* Pennant (Crustacea: Palaemonidae). *Aquaculture*, **50**: 31–38.

**Table 1** Mean survival rates of horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* larvae reared to each larval stage in two 2-L beakers (50 per beaker) at six water temperatures

Water temperature (°C)	Mean survival rate (%) to each stage					
	Zoea II	Zoea III	Zoea IV	Zoea V	Megalopa	First crab
6	99.0 (1.4) <sup>a</sup>	99.0 (1.4) <sup>a</sup>	98.0 (2.8) <sup>a</sup>	95.0 (4.2) <sup>ab</sup>	91.0 (9.9) <sup>a</sup>	53.0 (18.4) <sup>a</sup>
9	100.0 (0.0) <sup>a</sup>	100.0 (0.0) <sup>a</sup>	99.0 (1.4) <sup>a</sup>	98.0 (0.0) <sup>a</sup>	95.0 (1.4) <sup>a</sup>	82.0 (2.8) <sup>a</sup>
12	100.0 (0.0) <sup>a</sup>	99.0 (1.4) <sup>a</sup>	98.0 (0.0) <sup>a</sup>	97.0 (1.4) <sup>ab</sup>	87.0 (9.9) <sup>a</sup>	72.0 (14.1) <sup>a</sup>
15	100.0 (0.0) <sup>a</sup>	99.0 (1.4) <sup>a</sup>	99.0 (1.4) <sup>a</sup>	97.0 (4.2) <sup>a</sup>	77.0 (4.2) <sup>a</sup>	63.0 (4.2) <sup>a</sup>
18	98.0 (2.8) <sup>a</sup>	93.0 (1.4) <sup>a</sup>	86.0 (0.0) <sup>a</sup>	77.0 (4.2) <sup>b</sup>	31.0 (4.2) <sup>b</sup>	2.0 (2.8) <sup>b</sup>
21	99.0 (1.4) <sup>a</sup>	12.0 (0.0) <sup>b</sup>	0.0 (0.0) <sup>b</sup>	0.0 (0.0) <sup>c</sup>	0.0 (0.0) <sup>c</sup>	0.0 (0.0) <sup>b</sup>

Values in parentheses are standard deviations.

Different superscripts in the same column indicate significant differences between water temperature groups ( $P < 0.05$ ).

**Table 2** Mean number of days from hatching to each larval stage in horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* larvae reared in 2-L beakers (50 per beaker) at six water temperatures

Water temperature (°C)	Mean number of days to each stage					
	Zoea II	Zoea III	Zoea IV	Zoea V	Megalopa	First crab
6	10.5 (4.8) <sup>a</sup>	19.8 (3.3) <sup>a</sup>	29.5 (2.0) <sup>a</sup>	40.4 (3.0) <sup>a</sup>	56.6 (1.7) <sup>a</sup>	100.4 (3.8) <sup>a</sup>
9	7.1 (4.7) <sup>b</sup>	13.1 (3.2) <sup>b</sup>	19.6 (3.1) <sup>b</sup>	26.9 (2.8) <sup>b</sup>	37.7 (2.1) <sup>b</sup>	68.7 (4.3) <sup>b</sup>
12	6.0 (1.7) <sup>c</sup>	10.5 (5.0) <sup>c</sup>	15.2 (3.7) <sup>c</sup>	20.6 (3.3) <sup>c</sup>	27.9 (2.7) <sup>c</sup>	51.0 (5.5) <sup>c</sup>
15	5.2 (8.2) <sup>d</sup>	9.5 (5.8) <sup>d</sup>	13.6 (4.9) <sup>d</sup>	18.3 (4.2) <sup>d</sup>	24.7 (4.0) <sup>d</sup>	43.8 (7.1) <sup>d</sup>
18	5.0 (4.8) <sup>e</sup>	9.9 (7.9) <sup>e</sup>	14.2 (5.6) <sup>e</sup>	18.8 (5.3) <sup>e</sup>	26.2 (16.1) <sup>d</sup>	41.5 (3.6) <sup>d</sup>
21	5.0 (2.0) <sup>e</sup>	10.8 (12.7) <sup>c</sup>	–	–	–	–

Mean values were calculated by using data for all larvae that successfully molted from the previous stage in both beaker 1 and beaker 2 (see Fig. 2).

Values in parentheses are coefficients of variation (%).

Different superscripts in the same column indicate significant differences between water temperature groups ( $P < 0.05$ ).

**Table 3** Parameters estimated by non-linear least-squares method for power function (P,  $D = aT^b$ ), Bělehrádek's equation (B,  $D = a(T-\alpha)^b$ ) and an equation from heat summation theory (H,  $D = a/(T-\alpha)$ ) between number of days ( $D$ ) from hatching to each larval stage and mean water temperature ( $T$ ) in horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* larvae reared at 6 to 15 °C

Period	Equation	$n$	$A$	$b$	$\alpha$	Akaike Information Criterion
Zoea II	P	399	85.59 ( 2.03)*	-1.15 ( 0.01)*	-	429.1
	B	399	28.54 (6.42)*	-0.77 (0.08)*	2.58 ( 0.56)*	420.3
	H	399	54.64 (0.59)*	-	1.03 (0.07)*	423.4
Zoea III	P	397	125.81 (2.34)*	-1.03 (0.01)*	-	836.5
	B	397	31.44 (2.48)*	-0.54 (0.03)*	3.76 (0.23)*	754.5
	H	397	115.04 (1.11)*	-	0.27 (0.07)*	830.9
Zoea IV	P	393	184.72 (2.60)*	-1.02 (0.01)*	-	945.9
	B	393	60.32 (4.79)*	-0.64 (0.03)*	3.04 (0.23)*	871.8
	H	393	174.15 (1.30)*	-	0.18 (0.05)*	941.0
Zoea V	P	390	246.75 (3.38)*	-1.00 (0.01)*	-	1171.9
	B	390	84.71 (6.45)*	-0.65 (0.03)*	2.96 (0.22)*	1096.3
	H	390	242.58 (1.79)*	-	0.08 (0.05) <sup>NS</sup>	1170.2
Megalopa	P	352	361.23 (4.08)*	-1.03 (0.01)*	-	1124.0
	B	352	159.07 (13.11)*	-0.76 (0.03)*	2.19 (0.23)*	1073.2
	H	352	330.50 (2.00)*	-	0.25 (0.04)*	1116.0
First crab	P	268	569.65 (11.20)*	-0.96 (0.01)*	-	1369.1
	B	268	527.47 (123.49)*	-0.94 (0.07)*	0.22 (0.66) <sup>NS</sup>	1371.0
	H	268	642.48 (86.75)*	-	-0.33 (0.08)*	1369.7

Parameter  $\alpha$  is known as “biological zero” in Bělehrádek's equation and as the “threshold temperature” for development in the equation from heat summation theory.

\*  $P < 0.05$ ; <sup>NS</sup>  $P > 0.05$ . Standard errors of each estimated parameter are shown in parentheses.

**Table 4** Mean values of carapace length, lengths of several appendages as ratios to carapace length, and number of setae on exopod of the second maxilliped in horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* larvae reared at six water temperatures

Stage	Water temperature (°C)	Carapace length (mm)	Ratio to carapace length (%)				Number of setae
			Exopod of 2nd maxilliped	Chela	Cheliped	3rd pleopod	
Zoea I	–	1.29 (0.03)	42.9 (2.3)	–	–	2.3 (0.2)	4.0 (0.0)
Zoea II	6	1.55 (0.12) <sup>a</sup>	43.8 (4.0) <sup>a</sup>	–	–	6.0 (0.7) <sup>a</sup>	12.0 (0.0) <sup>a</sup>
	9	1.62 (0.06) <sup>a</sup>	42.1 (2.0) <sup>a</sup>	–	–	5.0 (0.5) <sup>a</sup>	12.0 (0.0) <sup>a</sup>
	12	1.54 (0.03) <sup>a</sup>	43.1 (1.3) <sup>a</sup>	–	–	5.3 (0.8) <sup>a</sup>	12.0 (0.0) <sup>a</sup>
	15	1.53 (0.05) <sup>a</sup>	42.4 (0.5) <sup>a</sup>	–	–	6.0 (0.6) <sup>a</sup>	11.8 (0.4) <sup>a</sup>
	18	1.52 (0.03) <sup>a</sup>	43.3 (1.5) <sup>a</sup>	–	–	5.8 (0.6) <sup>a</sup>	12.0 (0.7) <sup>a</sup>
	21	1.50 (0.03) <sup>a</sup>	43.5 (1.0) <sup>a</sup>	–	–	5.6 (0.5) <sup>a</sup>	12.0 (0.0) <sup>a</sup>
Zoea III	6	1.95 (0.08) <sup>a</sup>	41.7 (1.3) <sup>a</sup>	–	–	12.9 (2.1) <sup>a</sup>	14.0 (0.0) <sup>a</sup>
	9	1.95 (0.08) <sup>a</sup>	40.1 (1.9) <sup>a</sup>	–	–	10.8 (2.1) <sup>a</sup>	14.6 (0.5) <sup>a</sup>
	12	1.85 (0.06) <sup>a</sup>	42.3 (1.4) <sup>a</sup>	–	–	12.5 (1.4) <sup>a</sup>	14.0 (0.7) <sup>a</sup>
	15	1.83 (0.04) <sup>a</sup>	41.7 (1.7) <sup>a</sup>	–	–	10.5 (1.4) <sup>a</sup>	14.8 (0.8) <sup>a</sup>
	18	1.87 (0.08) <sup>a</sup>	38.9 (2.3) <sup>a</sup>	–	–	11.8 (1.3) <sup>a</sup>	15.0 (1.0) <sup>a</sup>
	21	1.84 (0.04) <sup>a</sup>	39.0 (2.4) <sup>a</sup>	–	–	10.7 (0.6) <sup>a</sup>	16.0 (1.0) <sup>a</sup>
Zoea IV	6	2.33 (0.08) <sup>a</sup>	39.6 (1.1) <sup>ab</sup>	22.9 (0.7) <sup>a</sup>	27.8 (1.3) <sup>a</sup>	21.3 (1.1) <sup>a</sup>	18.6 (0.5) <sup>a</sup>
	9	2.25 (0.10) <sup>a</sup>	40.4 (1.7) <sup>a</sup>	21.9 (2.0) <sup>a</sup>	28.1 (2.8) <sup>a</sup>	22.2 (1.4) <sup>a</sup>	18.8 (0.8) <sup>a</sup>
	12	2.28 (0.12) <sup>a</sup>	39.4 (1.0) <sup>ab</sup>	23.5 (2.5) <sup>a</sup>	29.7 (3.3) <sup>a</sup>	21.0 (1.9) <sup>a</sup>	17.8 (0.4) <sup>a</sup>
	15	2.21 (0.05) <sup>a</sup>	37.7 (1.7) <sup>b</sup>	22.0 (1.3) <sup>a</sup>	27.9 (1.9) <sup>a</sup>	20.5 (1.2) <sup>a</sup>	17.8 (1.1) <sup>a</sup>
	18	2.14 (0.05) <sup>a</sup>	39.7 (0.6) <sup>ab</sup>	22.3 (2.2) <sup>a</sup>	28.1 (1.2) <sup>a</sup>	21.8 (2.0) <sup>a</sup>	17.8 (0.4) <sup>a</sup>
	21	–	–	–	–	–	–
Zoea V	6	2.88 (0.14) <sup>a</sup>	37.7 (2.2) <sup>a</sup>	26.7 (2.5) <sup>a</sup>	33.3 (1.8) <sup>a</sup>	29.9 (2.0) <sup>a</sup>	20.8 (0.8) <sup>a</sup>
	9	2.82 (0.09) <sup>a</sup>	37.2 (1.5) <sup>a</sup>	26.7 (1.1) <sup>a</sup>	33.7 (1.4) <sup>a</sup>	30.3 (2.0) <sup>a</sup>	20.8 (0.4) <sup>a</sup>
	12	2.64 (0.04) <sup>b</sup>	37.3 (1.8) <sup>a</sup>	28.0 (2.2) <sup>a</sup>	36.0 (1.4) <sup>a</sup>	32.3 (0.9) <sup>a</sup>	19.2 (0.8) <sup>a</sup>
	15	2.68 (0.05) <sup>b</sup>	36.2 (1.4) <sup>a</sup>	27.5 (0.6) <sup>a</sup>	35.5 (1.1) <sup>a</sup>	29.6 (1.2) <sup>a</sup>	20.2 (0.4) <sup>a</sup>
	18	2.55 (0.07) <sup>b</sup>	36.7 (2.4) <sup>a</sup>	28.7 (2.2) <sup>a</sup>	36.2 (2.1) <sup>a</sup>	29.8 (1.5) <sup>a</sup>	19.6 (0.9) <sup>a</sup>
	21	–	–	–	–	–	–

Megalopa	6	4.16 (0.09) <sup>abc</sup>	—	—	—	—	—
	9	4.28 (0.09) <sup>b</sup>	—	—	—	—	—
	12	4.00 (0.11) <sup>c</sup>	—	—	—	—	—
	15	3.81 (0.14) <sup>c</sup>	—	—	—	—	—
	18	3.40 (0.11) <sup>d</sup>	—	—	—	—	—
	21	—	—	—	—	—	—

Number of samples was five for each group, except for the 21 °C group of the third zoeal stage, in which only three larvae could be measured. Values in parentheses are standard deviations.

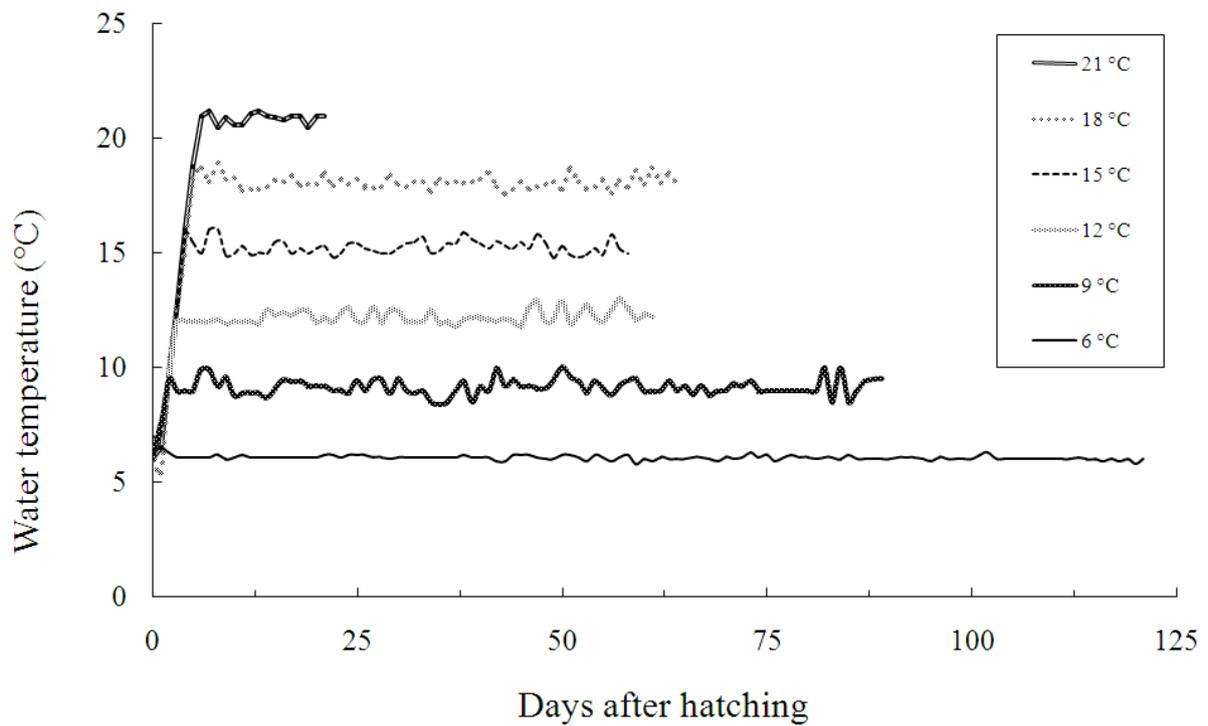
Different superscripts in the same column at each larval stage indicate significant differences between water temperature groups ( $P < 0.05$ ).

**Table 5** Mean number of prey (*Artemia* nauplii) consumed by horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* larvae reared at six water temperatures

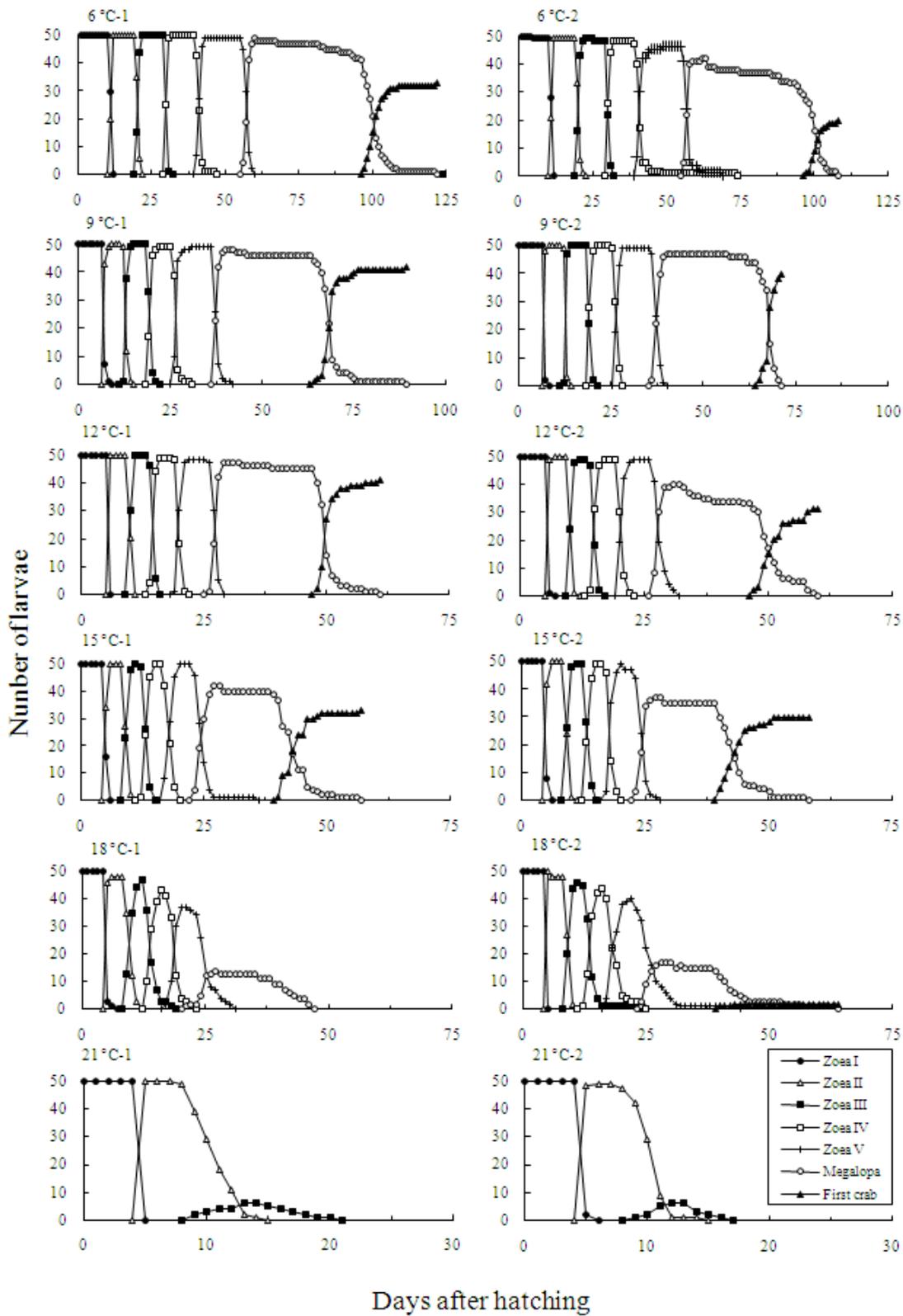
Stage	Water temperature (°C)					
	6	9	12	15	18	21
Zoea I	6.4 (1.8) <sup>a</sup>	7.4 (3.7) <sup>a</sup>	5.6 (3.7) <sup>a</sup>	6.6 (1.1) <sup>a</sup>	3.5 (3.9) <sup>a</sup>	0.5 (0.7) <sup>a</sup>
Zoea III	17.4 (3.5) <sup>ab</sup>	23.0 (6.0) <sup>b</sup>	24.8 (5.3) <sup>b</sup>	23.8 (2.4) <sup>b</sup>	17.0 (2.9) <sup>ab</sup>	12.0 (4.6) <sup>a</sup>
Zoea V	47.4 (13.4) <sup>a</sup>	60.6 (8.7) <sup>a</sup>	59.8 (13.6) <sup>a</sup>	61.4 (12.8) <sup>a</sup>	60.3 (16.0) <sup>a</sup>	42.2 (11.8) <sup>a</sup>

Larvae at the first zoeal stage reared at 2 °C for 1 day after hatching were individually stocked in 20-mL seawater bottles with the designated number of *Artemia* nauplii and were exposed to the test temperature for 24 h; five larvae were used per temperature. The numbers of *Artemia* nauplii remaining in the bottles were then counted. Larvae at the third and fifth zoeal stages reared at 12 °C for 2 days after molting were treated similarly to those at the first zoeal stage. Because of larval deaths during the experiment, only four values were used to calculate the mean number of prey consumed by larvae in the 18 °C groups at the first zoeal and fifth zoeal stages, and only two values were used for the 21 °C group at the first zoeal stage. Values in parentheses are standard deviations.

Different superscripts in the same row indicate significant differences between water temperature groups ( $P < 0.05$ ).



**Figure 1** Changes in daily water temperature in rearing beakers of horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* larvae. Temperature was increased from the hatching temperature of 2 °C to 6 °C one day after hatching and then increased to each designated temperature at a rate of 3 °C per day; it was then controlled at each temperature  $\pm 1.0$  °C.



**Figure 2** Changes in numbers of each larval stage of the horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* reared in 2-L beakers 1 and 2 for each temperature, each initially containing 50 larvae at six water temperatures.

### 第 3 章

種苗生産技術開発のための基礎的研究：  
イセエビフィロソーマ幼生の走光性および  
ケガニ幼生の適正な飼育環境条件

#### 第 4 節

ケガニ幼生の生残，発育および摂餌に及ぼす  
塩分の影響

Effect of salinity on survival, development and feeding of larvae of the  
horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* reared in the laboratory

## 緒 言

ケガニ *Erimacrus isenbeckii* は、十脚目クリガニ科に属し、本邦では主に北海道沿岸域、特にオホーツク海域と東部太平洋海域に多く分布し、美味で価格も高いために重要な漁業対象種となっている（酒井, 1976; 三原, 2003）。しかし、その漁獲量は低水準で推移していることから（佐々木, 2003）、種苗放流による積極的な資源増殖が望まれているが、種苗生産技術は確立されていない（厚岸事業場, 1992）。著者らは、ケガニの種苗生産技術を確立する一環として、前々報（神保ら, 2005）および前報（神保ら, 2007）において、ケガニ幼生の生残、発育および摂餌に及ぼすアルテミア給餌密度ならびに水温の影響について検討し、適正な給餌密度および飼育水温を明らかにした。

一般に、十脚甲殻類幼生の飼育において、塩分は水温等と同様に幼生の生残、発育および摂餌活動に大きな影響を与える環境要因の一つであり（Costlow *et al.*, 1960; 倉田, 1960; 今, 1973; Gopalakrishnan, 1976; Johns, 1981; Rabalalis & Cameron, 1985; Minagawa, 1992; 井上, 1998; Anger, 1991, 1996, 2001, 2003; Anger & Charmantier, 2000; 松田, 2006; Dan & Hamasaki, 2011）、種苗生産技術においても基礎的かつ重要な飼育条件である。しかし、これまでにケガニ幼生の適正な飼育塩分は明らかにされていない。そこで、本研究では、ケガニ幼生を塩分 10~45 psu の範囲で飼育し、その生残、発育および摂餌に及ぼす影響について調べた。

## 材料および方法

**抱卵雌** 2003年の1~2月にかけて、ふ化直前の抱卵雌8個体（甲長の平均値±標準偏差, 63.1 ± 4.5 mm）を北海道釧路沖から特別採捕許可によって入手し

た。抱卵雌は日本栽培漁業協会厚岸事業場（現、国立研究開発法人水産研究・教育機構北海道区水産研究所厚岸庁舎）の 0.1 m<sup>3</sup> 水槽に個別に収容し、砂ろ過海水を使用して流水（10 回転 / 日）で飼育し、ふ化させた。餌料はチカ、アサリおよびオキアミの切り身を用い、残餌が出る程度の量を週 2 回の頻度で給餌した。飼育期間中の水温は-1.2~2.4°Cで推移した。

**実験区の設定と幼生の飼育方法** 実験区として、塩分を、10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 psu とした合計 8 区を設けた。飼育には、2 L の白色ポリエチレンビーカーを各区 3 個ずつ用い、0.1 m<sup>3</sup> 水槽で飼育していた抱卵雌 1 個体から 2003 年 3 月 25 日にふ化した幼生を、各ビーカーに 50 個体ずつ収容した。3 個のビーカーのうち、2 個は生残率と各齢期へ脱皮するまでの所要日数を求め、1 個は各齢期の成長を測定するために供した。飼育に用いた海水は、砂ろ過後に 50 μm と 5 μm のカートリッジフィルター（ポリプロピレンワインドカートリッジフィルター、アドバンテック社製）でろ過し、約 1 日十分に曝気して使用した。塩分の調整は、蒸留水と人工海水作成用粉末（マリンソート、ロート製薬製）を使用して調整した。塩分の測定には導電率計（モデル 135A, Orion Research Inc. 製）および海水濃度屈折計（サリニティ S/Mill-E, アタゴ製）を使用した。飼育水温はウォーターバス方式で調温し、ふ化幼生の収容時には 2°C、翌日に 7 , その翌日に適正飼育水温（神保ら, 2007）である 12°Cまで上昇させ、以後 12.3 ± 0.4°Cを維持した。通気は、各ビーカーに対してパスツールピペット 1 本を通気管に用いて微量（約 70 mL / 分）で行った。日長は、水面から約 1 m 上に設置した 2 本の蛍光灯（40 W）を 7 時から 19 時まで点灯して調整した。照度は、ビーカーの水面上で 600~700 lx であった。餌料には北米産のアルテミア *Artemia* sp.（日清ファインケミカル社製）を用い、13 L バケツを用いて 26°C - 24 時間でふ化させた。ふ化したアルテミアは、回収後 13 L バケツに 100 個体 / mL となるように再収容し、市販の栄養（エイコサペンタエン酸）強化剤

(マリンアルファ, 日清サイエンス社製) を 20 mL / L の割合で添加し, 水温 22°C で 18~23 時間栄養強化した。給餌密度は, 前々報 (神保ら, 2005) の結果に基づき, 各区とも 4 個体 / mL に統一した。幼生は, 毎日午前中に, 前日から塩分調整した新しい海水を入れることにより調温したビーカーに, 10 mL 容の駒込ピペット (先を切断した広口のもの) を用いて移し替えた。その際に, 幼生を肉眼で観察し, 体全体の大きさにより齢期を判別し, 生残個体を計数した。また, 死亡個体は取り除き, 検鏡して齢期を確認した。メガロパが出現した場合, 共食いの頻度を下げるために, 第 5 齢までのゾエア, 脱皮当日のメガロパおよび脱皮翌日のメガロパを分けてそれぞれ別のビーカーで飼育した。各齢期までの生残個体数は, 各齢期へ脱皮した幼生数で表した。給餌は, 幼生を移槽した後に行い, 前述のアルテミアを所定の密度になるようにビーカーに添加した。また, 飼育水には, 幼生への糸状細菌の付着を防ぐためにアンピシリンナトリウム (シグマ社製) を 10 ppm で添加した。実験は, 飼育した幼生が全滅するか, 全ての幼生が第 1 齢稚ガニへ脱皮した日まで行った。

各齢期の体サイズ測定用のビーカーでは, メガロパまでの齢期ごとに最初に脱皮した 5 個体を 5% 中性ホルマリンで 1 日固定後, 70% エタノールで保存し, 測定に供した。測定項目は前々報 (神保ら, 2005) および前報 (神保ら, 2007) と同様に, 頭胸甲長, 第 2 顎脚外肢長と遊泳毛数, 鋏長, 鋏脚長ならびに第 3 腹節腹肢長とした。測定は, 実体顕微鏡 (倍率 25~75 倍) および生物顕微鏡 (100 倍) 下で接眼マイクロメーターを用いて行った。ただし, 鋏長および鋏脚長については第 4, 第 5 齢ゾエアのみで測定し, メガロパでは頭胸甲長のみを測定した。第 2 顎脚外肢長, 鋏長, 鋏脚長ならびに第 3 腹節腹肢長については, 頭胸甲長に対する割合 (各付属肢長  $\times 10^2$  / 頭胸甲長, %) を算出した。

**幼生の摂餌に及ぼす塩分の影響** 塩分 (15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 psu) が幼生の摂餌数に及ぼす影響を調べた。実験には第 1~3 齢ゾエアを供した。第 1 齢

ゾエアは、ふ化日から各塩分に調整した飼育水で上述の方法で飼育し、翌日にかけて 12°Cまで飼育水温を上昇させたものを供した。第 2 齢ゾエアで供試した個体は、ふ化日からろ過海水（塩分 32 psu）を用いて上述の方法で飼育した。第 2 齢ゾエアに脱皮した翌日の実験開始 3 時間前に、各塩分の海水を入れたガラス製ビーカー（100 mL）に 5 個体ずつ直接収容し、各塩分に馴致させた。第 3 齢ゾエアでは、各塩分区の成長測定用ビーカーで飼育していたものを供試した。ただし、45 psu 区では第 3 齢ゾエアに脱皮しなかったため、実験を行わなかった。摂餌数を調べた実験容器は 20 mL ガラス製標本瓶で、各塩分で 5 個を使用した。各塩分の海水を標本瓶に 20 mL 入れ、アルテミアを 40 個体ずつ給餌した後、ウォーターバス中（ $12.3 \pm 0.4^\circ\text{C}$ ）に 30 分間静置した。その後、幼生を 1 個体ずつ収容して無通気の状態です蓋を閉めて静置し、実験を開始した。日長および光条件は、上記の飼育方法における設定と同様とした。実験は午前 11 時に開始し、24 時間後にホルマリンを 5~10%になるように飼育水に添加してゾエアとアルテミアを固定した。各ゾエア幼生は 1 個体のアルテミアを完全に摂餌したことから、その摂餌数は実験前後のアルテミアの個体数の差から求めた。

**統計処理** 生残率、各齢期までの所要日数、成長に関する各測定項目の区間差ならびにアルテミア摂餌数は、一元配置分散分析後に Tukey-Kramer の方法による多重比較を行い、有意水準 5%で検定した。ただし、生残率については、逆正弦変換した値を用いた。

## 結 果

**各齢期までの生残** 各実験区とも、供試した 2 個のビーカーにおける生残と発育状況は同様に推移した（Fig. 1）。10 psu 区では、第 1 齢ゾエアは収容した翌日に大きく減耗し、翌々日には全滅した。15 psu 区では、齢期が進むにつれて

脱皮時期に減耗し、第 4 齢ゾエアまで認められたものの 25 日目で全滅した。45 psu 区では、第 1 齢ゾエアの 4~7 日目および第 1 齢ゾエアから第 2 齢ゾエアへの脱皮期にかけて大きく減耗し、ビーカー1 が第 2 齢ゾエアのまま 42 日目で、ビーカー2 が第 4 齢ゾエアまで認められたものの 45 日目に全滅した。20~35 psu 区では、第 5 齢ゾエアまで高い生残が認められた。しかし、20 psu 区では、第 5 齢ゾエアからメガロパへの変態期に大きく減耗し、変態したメガロパは脱皮せずに 34 および 35 日目で全滅した。25 psu および 40 psu 区では、第 5 齢ゾエアからメガロパおよびメガロパから第 1 齢稚ガニにかけて、それぞれ 30 psu および 35 psu 区に比較して大きな減耗が認められた。第 1 齢稚ガニでの生残率は、30, 35, 25 および 40 psu の順に高く、それぞれ 72.0, 63.0, 53.0 および 13.0%を示し、区間毎に有意差が認められた (Table 1)。なお、25~40 psu 区において、メガロパから第 1 齢稚ガニにかけて、死亡個体が認められない共食いによると推測される減耗 (0~7 個体 / ビーカー) が見られたが、塩分との関係は認められなかったことから ( $P > 0.05$ )、ここではすべて死亡個体として処理した。

**各齢期までの所要日数** 各齢期までの所要日数は、25 psu 区において最も短く、それより低く、あるいは高くなるに伴い長くなる傾向を示した (Table 2)。第 3 齢ゾエアからメガロパにかけては、25 psu 区が他の区に対して有意に短く、20 および 30 psu 区が 15 および 35~45 psu 区に対して有意に短かった。しかし、第 1 齢稚ガニでは 25~30 psu の区間で有意差は認められなかった。脱皮同調性の指標となる各齢期までの所要日数の変動係数は、25 psu 区において小さく、それより低く、あるいは高くなるに伴い大きくなる傾向を示した (Table 2)。しかし、第 1 齢稚ガニでは、25 psu 区の変動係数が上昇し、他の区に対して有意に大きかった。

**成長** 各齢期の頭胸甲長，頭胸甲長に対する第 2 顎脚外肢長，鋏長，鋏脚長ならびに第 3 腹節腹肢長の比および第 2 顎脚外肢の遊泳毛数を Table 3 に示した。頭胸甲長は，第 2～5 齢ゾエアでは 40 psu 区が他の区に対して有意に小さい値を示した。また，メガロパでは 20 psu および 40 psu 区が他の区に対して小さくなる傾向を示した。一方，頭胸甲長に対する各付属肢長の比は，鋏長，鋏脚長ならびに第 3 腹節腹肢長では，齢期に伴い増加する傾向が認められたが，塩分の影響は認められなかった。第 2 顎脚外肢長では，相対値は齢期に伴い減少する傾向が認められたが，第 2～5 齢期において塩分が高くなるに伴い大きくなる傾向を示し，35 psu または 40 psu 区が 15～25 psu 区に対して有意に大きい値を示した。第 2 顎脚外肢の遊泳毛数では，第 1 齢ゾエアでは 4 本で，第 2 齢ゾエアで 12 本へ急激に増加し，その後は脱皮ごとに数本が増加した。また，第 3 齢ゾエアで 35 psu 区が他の区に対して有意に少ない値を示したが，他の齢期では有意差は認められなかった。

**摂餌数** 各区における第 1～3 齢ゾエアの 1 日あたりのアルテミア摂餌数を Table 4 に示した。ただし，実験期間中に，第 2 齢ゾエアの 15 psu 区で 5 個体全て，第 3 齢ゾエアの 15 psu 区で 2 個体死亡したので，それらのデータは除外して示した。摂餌数については，バラツキが大きいものの，齢期に伴い多くなる傾向を示したが，各齢期とも 15 psu および 45 psu 区で減少する傾向が見られた。特に，第 1 および第 2 齢ゾエアにおいては，45 psu 区が他区に対して有意に減少した。

## 考 察

**生残** 阿部（1968，1977）は，道東海域におけるケガニの資源調査において，幼生の天然生息海域における塩分は 29.0～32.3 ‰であったことから，幼生は高

好塩性であるとしている。しかし、これまでにケガニの幼生飼育における適正塩分について検討した研究事例はなく、本実験において初めて幼生の生残に大きな影響を及ぼすことが明らかになった。ケガニ幼生は、25~40 psu 区において第1齢稚ガニまで生残が可能であり、特に30 psu および35 psu 区で高い生残率を示し、天然生息海域における塩分（阿部，1968，1977）とほぼ一致した。10 psu 区では第1齢ゾエアで全滅し、15 psu および45 psu 区では齢期の進行に伴い生残率が低下し、それぞれ第4齢ゾエアで全滅した。このように、適正な塩分を外れて飼育した場合に齢期の進行とともに生残が低下する現象は、アサヒガニ *Ranina ranina* (Minagawa, 1992), ズワイガニ *Chionoecetes opilio* (今, 1973), タラバガニ *Paralithodes camtschaticus* (倉田, 1960), イセエビ *Panulirus japonicus* (井上, 1988 ; 松田, 2006), イワガニ上科の一種 *Sesarma curacaoense* (Anger & Charmantier, 2000), シオマネキ属の一種 *Uca subcylindrica* (Rabalalis & Cameron, 1985), イワガニ上科の一種 *Armases miersii* (Anger, 1996), テラオクルマエビ *Melicertus marginatus* (Gopalakrishnan, 1976), アミメノコギリガザミ *Scylla serrata* (Dan & Hamasaki, 2011) などの多くの十脚甲殻類幼生でも報告されており、一般的な現象と考えられる。また、20 psu および40 psu 区では第5齢ゾエアからメガロパへの変態期に大量減耗が認められた。その原因として、Anger (2001, 2003) は、メガロパ期で塩分耐性の範囲が狭くなるのは、浮遊期から着底への行動生態的な変化に対応してより塩分変動の少ない海底での生活への適応だと指摘していることから、ケガニにおいても、同様の行動生態的な変化（阿部，1968，1977）に付随して起こる塩分耐性の低下に起因するものと考えられる。このような変態期前後における塩分耐性の低下に伴う生残率の低下は、アミメノコギリガザミでも報告されている (Dan & Hamasaki, 2011)。

**発育日数と摂餌** ケガニ幼生のメガロパまでの所要日数は25 psu 区で最も短く、25 psu より低くあるいは高くなるに伴い有意に長くなった。このように、

適正な塩分から外れて飼育した場合に幼生の発育日数が延長する現象は、アサヒガニ(Minagawa, 1992), ズワイガニ(今, 1973), イセエビ(松田, 2006), *Sesarma curacaoense* (Anger & Charmantier, 2000), アミメノコギリガザミ (Dan & Hamasaki, 2011) 等でも報告されている。ただし、今回の第 1 齢稚ガニでは 25 psu 区と 30 psu 区で有意な差は見られず、25 psu 区では変動係数が大きくなり生残率も低下した。この結果は、ゾエアとメガロパよりも第 1 齢稚ガニの方が塩分に対する適応範囲が狭くなっていることを示すものである。一方、摂餌量については 15 psu および 45 psu 区で比較的大きく低下する傾向が見られたが、20~40 psu 区では大きな変動は見られなかった。15 psu および 45 psu 区ではそれぞれ第 4 齢ゾエアで全滅していることから、この塩分では十分に摂餌することができなかつたことが全滅の一因と考えられる。また、一般に十脚甲殻類幼生では、適正な塩分を外れた低塩分では摂餌量が減少することが知られており (Minagawa, 1992; Anger, 2001, 2003), アサヒガニ (Minagawa, 1992) においても高および低塩分では摂餌量が減少したことから、摂餌数の低下が齢期期間を延長させる原因と考えられる。

**成長** ケガニ幼生の体サイズは、ゾエア期においては高塩分になるにしたがって小さくなる傾向を示したが、これは、ゾエア期では齢期の進行に伴って塩分の適応範囲は狭くなるものの、高塩分と比較して低塩分に対する耐性のほうが高いためと考えられる。アサニガニ (Minagawa, 1992) では、塩分が適正值より高いあるいは低い場合、頭胸甲長等の成長が抑制されると同時に各付属肢の遊泳毛数も減少することが、またイセエビ(井上, 1988; 松田, 2006) では低塩分において体長の成長が抑制されたことが報告されている。一方、メガロパの頭胸甲長においては、20 および 40 psu 区で小さい値を示したが、これは、メガロパ期でさらに塩分の適応範囲が狭くなったためと考えられ、同時期の生残の急激な低下と一致している。第 2 顎脚外肢はゾエア期には遊泳のために機能す

るが、メガロパ期には口器の一部として機能する（浜崎，1997）。ケガニ幼生の第2顎脚外肢の頭胸甲長に対する比は、既報（神保ら，2005，2007）および本研究でもゾエア齢期の進行に伴い小さくなっていることから、この相対値の変化はメガロパへの変態に向けた形態形成が進行していることを示している。その相対値は、本研究では低塩分で小さくなる傾向がみられたことから、低塩分が形態形成を阻害しているものと考えられる。このように、本研究から、塩分がケガニ幼生の体サイズおよび形態形成に影響を与えることが明らかとなった。

**種苗生産への応用** 本研究によって、塩分がケガニ幼生の生残、発育および摂餌に影響を与えることが明らかになった。第1齢稚ガニでの生残率は30，35，25，40 psuの順で有意に高かったが、40 psu区ではメガロパ期に大量減耗が認められた。成長については、40 psu区でメガロパにおける成長の不良が認められ、さらに塩分が低くなるほど形態形成に及ぼす影響が大きくなる傾向が認められた。また、発育日数については25 psuおよび30 psuで第1齢稚ガニまでの所要日数が最も少なかったが、25 psuおよび40 psuでは第1齢稚ガニまでの所要日数の変動係数が大きくなったことから、脱皮のバラツキが大きく共食いが起こりやすいと考えられる。したがって、共食いによる減耗（神保ら，2005，2007）を未然に防ぐためにもこれらの塩分はケガニ幼生の飼育には不適と考えられる。一方で、十脚甲殻類幼生の塩分耐性は飼育水温の影響を強く受けることが知られているが（Costlow *et al.*, 1960 ; Johns, 1981 ; Anger, 1991），本研究はケガニ幼生の適正な飼育水温（神保ら，2007）で実施したことから、ここで得られた結果を種苗生産における適正塩分として捉えることができる。したがって、生残、成長および脱皮同調に加え、飼育期間の短縮による作業の軽減効果を考慮すると、ケガニ種苗生産における適正飼育塩分は30～35 psuと結論付けられる。厚岸庁舎のろ過海水の塩分は約32 psuであることから、ケガニ幼生の飼育においては、通常のろ過海水を使用すれば生残や発育に影響を与えること

はない。ただし、ヨシエビ *Metapenaeus ensis* では、飼育水を低塩分（2/3 海水）に調整することにより真菌症を防御する方法が検討されていることから（近藤ら，1996；池田・高見，1997，1999），今後，ケガニの種苗生産においても，真菌症等の疾病が発生した場合への対処方法の一つとして，適正飼育塩分範囲の中で低塩分による飼育の効果を検討できるであろう。

## 文 献

- 阿部晃治．1968．道東太平洋沿岸における各種幼稚仔類．北水試月報，**864**: 14–30．
- 阿部晃治．1977．道東近海におけるケガニの初期生活．水産海洋研究会報，**31**: 14–19．
- 厚岸事業場．1992．種苗生産技術の開発の概要 ケガニ．日本栽培漁業協会事業年報平成9年度，pp. 229–231．日本栽培漁業協会，東京．
- Anger, K. 1991. Effect of temperature and salinity on the larval development of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (Decapoda: Grapsidae). *Marine. Ecology. Progress. Series*, **72**: 103–110.
- Anger, K. 1996. Salinity tolerance of the larvae and first juveniles of a semiterrestrial grapsid crab, *Armases miersii* (Rathbum). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **202**: 205–223.
- Anger, K. 2001. The Biology of Decapod Crustacean. *Crustacean issues 14*, A.A. Balkema, The Netherlands.
- Anger, K. 2003. Salinity as a key parameter in the larval biology of decapod crustaceans. *Invertebrate Reproduction & Development*, **43**: 29–45.

- Anger, K. & Charmantier, G. 2000. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in a mangrove crab, *Sesarma curacaoense* (Decapoda: Grapsidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **251**: 265–274.
- Costlow, Jr. D. C., Bookhout, C. G. & Monroe, R. 1960. The effect of salinity and temperature on larval development of *Sesarma Cinereum* (Bosc) reared in the laboratory. *Biological Bulletin*, **118**: 183–202.
- 井上正昭. 1998. イセエビ. 「水産学シリーズ 71 エビ・カニ類の種苗生産」(平野礼次郎編), pp. 119–133. 恒星社厚生閣, 東京.
- Dan, S. & Hamasaki, K. 2011. Effect of salinity and dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on the survival, development, and morphogenesis of the larvae of laboratory-reared mud crab *Scylla serrata* (Decapoda, Portunidae). *Aquaculture International*, **19**: 323–338.
- Gopalakrishnan, K. 1976. Larval rearing of red shrimp *Penaeus Marginatus* (Crustacea). *Aquaculture*, **9**: 145–154.
- 浜崎活幸. 1997. 幼生の発育. 「栽培漁業技術シリーズ No. 3 ガザミ種苗生産技術の理論と実践」(ガザミ種苗生産研究会編), pp. 38–45. 社団法人日本栽培漁業協会, 東京.
- 池田善平, 高見純一. 1997. 希釈海水飼育によるヨシエビ真菌症の防御. 岡山県水産試験場報告, **12**: 12–14.
- 池田善平, 高見純一. 1999. 希釈海水での飼育期間がヨシエビ真菌症の発生に及ぼす影響. 岡山県水産試験場報告, **14**: 61–63.
- 神保忠雄, 浜崎活幸, 芦立昌一. 2005. ケガニ幼生の生残, 発育および摂餌に及ぼすアルテミア給餌密度の影響. 日本水産学会誌, **71**: 563–570.
- 神保忠雄, 浜崎活幸, 芦立昌一. 2007. ケガニ幼生の生残, 発育および摂餌に及ぼす水温の影響. 日本水産学会誌, **73**: 1081–1089.

- Johns, D. M. 1981. Physiological studies on *Cancer irroratus* larvae. I. Effects of temperature and salinity on survival, development rate and size. *Marine Ecology Progress Series*, **5**: 75–83.
- 今 攸. 1973. ズワイガニに関する漁業生物学的研究－V 浮遊期幼生に及ぼす塩分濃度の影響. 日本水産学会誌, **39**: 945–950.
- 近藤正美, 杉野博之, 池田善平. 1996. 希釈海水によるヨシエビの種苗生産. 岡山県水産試験場報告, **11**: 115–116.
- 倉田 博. 1960. タラバガニの幼生と稚ガニに関する研究 III 幼生の生き残り と発育速度とにおよぼす水温と塩分濃度の影響. 北海道区水産研究所研究報告, **21**: 9–14.
- 松田浩一. 2006. イセエビ属 (*Panulirus*) 幼生の生物特性と飼育に関する研究. 三重県科学技術振興センター水産研究部研究報告, **14**: 47–51.
- 三原栄次. 2003. ケガニ. 「新北のさかなたち」(上田吉幸, 前田圭司, 嶋田 宏, 鷹見達也編), pp. 380–385. 北海道新聞社, 北海道.
- Minagawa, M. 1992. Effect of salinity on survival, feeding and development of larvae of the red frog crab, *Ranina ranina* (Crustacea, Decapoda, Raninidae). *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**: 1855–1860.
- Rabalalis, N. N. & Cameron, J. N. 1985. The effects of factors important in semi-arid environments on the early development of *Uca subcylindrica*. *Biological Bulletin*, **168**: 147–160.
- 酒井 恒. 1976. ケガニ. 日本産蟹類. pp. 190–191. 講談社, 東京.
- 佐々木潤. 2003. 北海道周辺のケガニ. 「エビ・カニ類資源の多様性」(大富 潤, 渡邊精一編), pp. 31–44. 恒星社厚生閣, 東京.

**Table 1** Mean survival rates of horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* larvae reared to each larval stage in two 2-L beakers (50 per beaker) at eight salinity levels

Salinity (psu)	Mean survival rate (%) to each stage					
	Zoea II	Zoea III	Zoea IV	Zoea V	Megalopa	Crab I
10	0.0 (0.0) <sup>a</sup>	0.0 (0.0) <sup>a</sup>	0.0 (0.0) <sup>a</sup>	0.0 (0.0) <sup>a</sup>	0.0 (0.0) <sup>a</sup>	0.0 (0.0) <sup>a</sup>
15	77.0 (24.0) <sup>b</sup>	50.0 (14.1) <sup>b</sup>	2.0 (2.8) <sup>a</sup>	0.0 (0.0) <sup>a</sup>	0.0 (0.0) <sup>a</sup>	0.0 (0.0) <sup>a</sup>
20	99.0 (1.4) <sup>b</sup>	97.0 (1.4) <sup>c</sup>	96.0 (0.0) <sup>b</sup>	91.0 (1.4) <sup>bc</sup>	20.0 (2.8) <sup>b</sup>	0.0 (0.0) <sup>a</sup>
25	97.0 (1.4) <sup>b</sup>	97.0 (1.4) <sup>c</sup>	93.0 (1.4) <sup>b</sup>	91.0 (1.4) <sup>bc</sup>	77.0 (1.4) <sup>c</sup>	53.0 (4.2) <sup>b</sup>
30	98.0 (2.8) <sup>b</sup>	97.0 (1.4) <sup>c</sup>	96.0 (2.8) <sup>b</sup>	95.0 (1.4) <sup>c</sup>	87.0 (4.2) <sup>c</sup>	72.0 (0.0) <sup>c</sup>
35	99.0 (1.4) <sup>b</sup>	98.0 (2.8) <sup>c</sup>	96.0 (0.0) <sup>b</sup>	96.0 (0.0) <sup>c</sup>	83.0 (4.2) <sup>c</sup>	63.0 (4.2) <sup>d</sup>
40	93.0 (4.2) <sup>b</sup>	87.0 (7.1) <sup>bc</sup>	86.0 (5.7) <sup>b</sup>	85.0 (7.1) <sup>b</sup>	56.0 (8.5) <sup>d</sup>	13.0 (1.4) <sup>e</sup>
45	18.0 (8.5) <sup>a</sup>	7.0 (9.9) <sup>a</sup>	2.0 (2.8) <sup>a</sup>	0.0 (0.0) <sup>a</sup>	0.0 (0.0) <sup>a</sup>	0.0 (0.0) <sup>a</sup>

Values in parentheses are standard deviations.

Different superscripts in the same column indicate significant differences between salinity groups ( $P < 0.05$ ).

**Table 2** Mean number of days from hatching to each larval stage in horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* larvae reared in 2-L beakers (50 per beaker) at seven salinity levels

Salinity (psu)	Mean number of days to each stage											
	Zoea II		Zoea III		Zoea IV		Zoea V		Megalopa		Crab I	
	Mean (SD) <sup>*1</sup>	CV <sup>*2</sup> (SD)	Mean (SD)	CV (SD)	Mean (SD)	CV (SD)	Mean (SD)	CV (SD)	Mean (SD)	CV (SD)	Mean (SD)	CV (SD)
15	7.5 (0.4) <sup>a</sup>	8.1 (1.8) <sup>a</sup>	14.7 (0.0) <sup>a</sup>	4.1 (1.3) <sup>a</sup>	22.0 <sup>*3a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-
20	5.2 (0.1) <sup>b</sup>	7.9 (0.6) <sup>a</sup>	9.9 (0.1) <sup>b</sup>	5.4 (0.8) <sup>ab</sup>	14.8 (0.3) <sup>b</sup>	6.0 (0.6) <sup>b</sup>	20.4 (0.2) <sup>a</sup>	4.3 (1.4) <sup>ab</sup>	27.7 (0.2) <sup>a</sup>	3.2 (0.1) <sup>a</sup>	-	-
25	5.0 (0.0) <sup>b</sup>	3.9 (0.0) <sup>a</sup>	9.2 (0.1) <sup>c</sup>	4.5 (1.3) <sup>a</sup>	13.8 (0.1) <sup>c</sup>	3.6 (0.2) <sup>c</sup>	19.2 (0.2) <sup>b</sup>	2.7 (0.0) <sup>a</sup>	26.5 (0.0) <sup>b</sup>	2.7 (0.6) <sup>a</sup>	50.3 (0.0) <sup>a</sup>	11.3 (0.2) <sup>a</sup>
30	5.3 (0.0) <sup>b</sup>	8.3 (0.3) <sup>a</sup>	9.8 (0.0) <sup>b</sup>	5.1 (0.1) <sup>a</sup>	14.5 (0.1) <sup>b</sup>	3.8 (0.2) <sup>cdc</sup>	20.0 (0.0) <sup>a</sup>	3.6 (0.6) <sup>ab</sup>	27.6 (0.2) <sup>a</sup>	3.3 (0.4) <sup>a</sup>	51.3 (0.4) <sup>a</sup>	7.0 (0.7) <sup>b</sup>
35	6.1 (0.0) <sup>c</sup>	6.0 (0.1) <sup>a</sup>	11.0 (0.1) <sup>d</sup>	7.4 (2.6) <sup>ab</sup>	15.8 (0.0) <sup>d</sup>	5.2 (0.0) <sup>bc</sup>	21.8 (0.0) <sup>c</sup>	3.8 (0.2) <sup>ab</sup>	29.8 (0.1) <sup>c</sup>	3.0 (3.2) <sup>a</sup>	57.4 (0.9) <sup>a</sup>	7.4 (1.6) <sup>b</sup>
40	7.7 (0.1) <sup>a</sup>	6.6 (0.9) <sup>a</sup>	13.9 (0.0) <sup>c</sup>	5.5 (0.8) <sup>ab</sup>	19.9 (0.1) <sup>c</sup>	5.6 (1.0) <sup>b</sup>	26.6 (0.1) <sup>d</sup>	6.4 (0.3) <sup>b</sup>	35.8 (0.5) <sup>d</sup>	5.1 (1.6) <sup>a</sup>	72.6 (3.4) <sup>b</sup>	8.5 (0.6) <sup>ab</sup>
45	10.8 (0.1) <sup>d</sup>	8.4 (5.6) <sup>a</sup>	20.1 <sup>*3f</sup>	10.1 <sup>b</sup>	37.0 <sup>*3f</sup>	0.0 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-

Mean values were calculated by using mean number of days from hatching to each larval stage in both beaker 1 and beaker 2 ( $n = 2$ , see Fig. 1).

No larvae survived to the second zoeal stage (Zoea II) at 10 psu.

Different superscripts in the same column indicate significant differences between salinity groups ( $P < 0.05$ ).

<sup>\*1</sup> SD: standard deviation.

<sup>\*2</sup> CV: coefficients of variation (%).

<sup>\*3</sup>  $n = 1$ .

**Table 3** Mean values of carapace length, lengths of several appendages as ratios of carapace length, and number of setae on exopod of the second maxilliped in horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* larvae reared at seven salinity levels

Stage	Salinity (psu)	Carapace length (mm)	Ratio to carapace length (%)				Number of setae
			Exopod of 2nd maxilliped	Chela	Cheliped	3rd pleopod	
Zoea I	–	1.28 (0.04)	42.9 (2.3)	–	–	2.3 (0.2)	4.0 (0.0)
Zoea II	15	1.59 (0.09) <sup>a</sup>	40.8 (1.5) <sup>a</sup>	–	–	5.3 (0.4) <sup>ab</sup>	12.0 (0.0) <sup>a</sup>
	20	1.55 (0.04) <sup>ab</sup>	42.8 (1.6) <sup>a</sup>	–	–	5.0 (0.5) <sup>ac</sup>	12.4 (0.9) <sup>a</sup>
	25	1.54 (0.03) <sup>ab</sup>	43.8 (0.2) <sup>ab</sup>	–	–	5.0 (0.8) <sup>a</sup>	12.8 (0.5) <sup>a</sup>
	30	1.57 (0.08) <sup>ab</sup>	43.4 (2.2) <sup>a</sup>	–	–	5.8 (0.7) <sup>ab</sup>	12.2 (0.5) <sup>a</sup>
	35	1.52 (0.06) <sup>ab</sup>	43.2 (1.9) <sup>a</sup>	–	–	5.1 (0.5) <sup>ab</sup>	12.2 (0.5) <sup>a</sup>
	40	1.47 (0.05) <sup>b</sup>	46.6 (2.3) <sup>b</sup>	–	–	6.1 (0.5) <sup>b</sup>	12.4 (0.6) <sup>a</sup>
	45	1.51 (0.03) <sup>ab</sup>	43.1 (0.5) <sup>a</sup>	–	–	6.1 (0.4) <sup>b</sup>	12.2 (0.5) <sup>a</sup>
Zoea III	15	1.84 (0.09) <sup>ab</sup>	37.7 (0.4) <sup>a</sup>	–	–	8.9 (2.7) <sup>a</sup>	15.0 (0.0) <sup>ab</sup>
	20	1.90 (0.09) <sup>a</sup>	39.6 (1.8) <sup>a</sup>	–	–	10.1 (1.3) <sup>a</sup>	15.2 (0.5) <sup>ab</sup>
	25	1.84 (0.06) <sup>ab</sup>	40.5 (1.7) <sup>ab</sup>	–	–	11.3 (1.1) <sup>a</sup>	15.6 (0.9) <sup>a</sup>
	30	1.91 (0.04) <sup>a</sup>	39.3 (1.8) <sup>a</sup>	–	–	11.6 (1.1) <sup>a</sup>	15.6 (0.6) <sup>a</sup>
	35	1.86 (0.05) <sup>ab</sup>	41.1 (1.4) <sup>ab</sup>	–	–	11.8 (1.2) <sup>a</sup>	14.2 (0.8) <sup>b</sup>
	40	1.76 (0.06) <sup>b</sup>	43.1 (1.4) <sup>b</sup>	–	–	11.2 (0.8) <sup>a</sup>	15.0 (0.7) <sup>ab</sup>
	45	–	–	–	–	–	–
Zoea IV	15	–	–	–	–	–	–
	20	2.26 (0.06) <sup>a</sup>	35.0 (1.9) <sup>a</sup>	22.5 (1.5) <sup>a</sup>	28.4 (1.5) <sup>a</sup>	19.4 (2.2) <sup>a</sup>	18.2 (0.5) <sup>a</sup>
	25	2.23 (0.04) <sup>ab</sup>	37.0 (1.0) <sup>ab</sup>	21.7 (1.4) <sup>a</sup>	27.7 (2.5) <sup>a</sup>	19.9 (1.8) <sup>a</sup>	18.8 (0.8) <sup>a</sup>

	30	2.20 (0.05) <sup>ab</sup>	37.7 (1.8) <sup>ab</sup>	21.7 (1.0) <sup>a</sup>	28.0 (0.8) <sup>a</sup>	22.2 (1.4) <sup>a</sup>	18.4 (0.9) <sup>a</sup>
	35	2.15 (0.09) <sup>ab</sup>	39.5 (1.8) <sup>b</sup>	23.3 (1.0) <sup>a</sup>	29.1 (0.7) <sup>a</sup>	21.6 (2.3) <sup>a</sup>	18.2 (0.8) <sup>a</sup>
	40	2.13 (0.09) <sup>b</sup>	39.3 (2.1) <sup>b</sup>	22.4 (1.4) <sup>a</sup>	28.2 (1.4) <sup>a</sup>	22.6 (1.1) <sup>a</sup>	18.2 (1.3) <sup>a</sup>
	45	–	–	–	–	–	–
	15	–	–	–	–	–	–
	20	2.68 (0.06) <sup>a</sup>	33.6 (0.5) <sup>a</sup>	27.8 (4.6) <sup>a</sup>	35.8 (5.2) <sup>a</sup>	28.6 (1.8) <sup>a</sup>	21.2 (0.8) <sup>a</sup>
	25	2.66 (0.04) <sup>a</sup>	34.1 (2.1) <sup>a</sup>	27.3 (0.9) <sup>a</sup>	34.1 (2.5) <sup>a</sup>	28.8 (2.8) <sup>a</sup>	20.8 (0.8) <sup>a</sup>
Zoea V	30	2.62 (0.05) <sup>a</sup>	35.5 (1.2) <sup>ab</sup>	29.2 (3.4) <sup>a</sup>	37.8 (4.8) <sup>a</sup>	31.0 (2.9) <sup>a</sup>	21.4 (0.9) <sup>a</sup>
	35	2.65 (0.07) <sup>a</sup>	36.3 (1.1) <sup>ab</sup>	27.5 (1.5) <sup>a</sup>	34.5 (2.1) <sup>a</sup>	31.3 (2.6) <sup>a</sup>	22.2 (1.5) <sup>a</sup>
	40	2.31 (0.27) <sup>b</sup>	38.3 (2.9) <sup>b</sup>	28.1 (2.1) <sup>a</sup>	35.6 (1.2) <sup>a</sup>	29.7 (2.1) <sup>a</sup>	20.8 (1.6) <sup>a</sup>
	45	–	–	–	–	–	–
	15	–	–	–	–	–	–
	20	3.11 (0.29) <sup>a</sup>	–	–	–	–	–
	25	3.74 (0.17) <sup>b</sup>	–	–	–	–	–
Megalopa	30	3.77 (0.14) <sup>b</sup>	–	–	–	–	–
	35	3.67 (0.20) <sup>b</sup>	–	–	–	–	–
	40	3.49 (0.16) <sup>b</sup>	–	–	–	–	–
	45	–	–	–	–	–	–

Number of samples was five for each group, except for the 15 psu group of the third zoeal stage, in which only three larvae could be measured for the ratio of carapace length (%) for the exopod of 2nd maxilliped and 3rd pleopod and the number of setae. Values in parentheses are standard deviations.

No larvae survived to the second zoeal stage (Zoea II) in the 10 psu group.

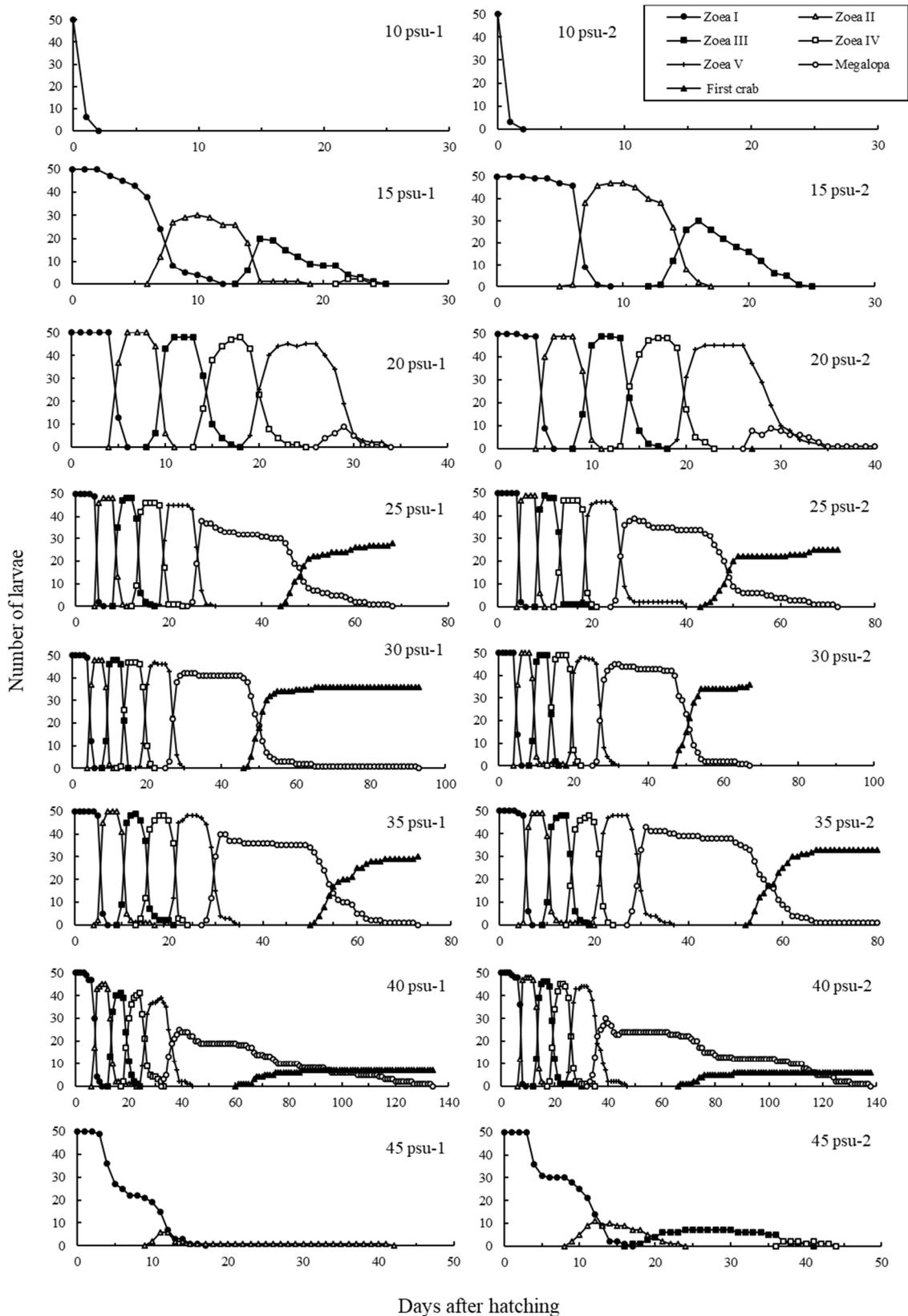
Different superscripts in the same column at each larval stage indicate significant differences between salinity groups ( $P < 0.05$ ).

**Table 4** Mean number of prey (*Artemia nauplii*) consumed by horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* larvae reared at seven salinity levels

Stage	Salinity (psu)						
	15	20	25	30	35	40	45
Zoea I	3.6 (2.6) <sup>ab</sup>	5.4 (3.0) <sup>a</sup>	5.2 (1.9) <sup>a</sup>	5.6 (1.5) <sup>a</sup>	3.2 (4.1) <sup>ab</sup>	1.2 (0.4) <sup>ab</sup>	0.4 (0.5) <sup>b</sup>
Zoea II	-	7.6 (5.9) <sup>ad</sup>	16.2 (3.3) <sup>bc</sup>	15.6 (1.5) <sup>bc</sup>	13.0 (4.8) <sup>ac</sup>	11.4 (2.7) <sup>ac</sup>	3.8 (2.2) <sup>d</sup>
Zoea III	5.7 (3.2) <sup>a</sup>	12.2 (4.9) <sup>a</sup>	9.6 (2.6) <sup>a</sup>	12.6 (7.2) <sup>a</sup>	8.4 (2.1) <sup>a</sup>	9.6 (2.6) <sup>a</sup>	-

Values in parentheses are standard deviations.

Different superscripts in the same row indicate significant differences between salinity groups ( $P < 0.05$ ).



**Figure 1** Changes in number of each larval stage of the horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* reared in 2-L beakers 1 and 2 for each salinity level, each initially containing 50 larvae at eight salinity levels.

### 第 3 章

種苗生産技術開発のための基礎的研究：  
イセエビフィロソーマ幼生の走光性および  
ケガニ幼生の適正な飼育環境条件

#### 第 5 節

ケガニ幼生の生残および発育に及ぼす  
n-3 高度不飽和脂肪酸の影響

Effects of n-3 highly unsaturated fatty acid content in *Artemia*  
on survival and development of laboratory-reared  
horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* larvae

## INTRODUCTION

The horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* is distributed widely throughout the North Pacific, near Japan, mainly along the Hokkaido coast (Abe, 1992; Sasaki, 2003). The stock of this species, which is an important fishery resource because of its high commercial value and its tastiness, has been declining significantly for several decades (Abe, 1992; Sasaki, 2003). These circumstances have spurred efforts to preserve and manage them as a resource for sustainable utilization. Stock enhancement through the release of artificially produced juveniles into the natural habitat is an attractive option for horsehair crab stock management. Nevertheless, the technical skill required for the mass seed production of this species has not yet been established. Several studies have been conducted to investigate larval culture technologies of the horsehair crab larvae. Jinbo *et al.* (2005, 2007, 2012) conducted larval rearing experiments on horsehair crab and reported suitable environmental conditions, such as prey density (Jinbo *et al.*, 2005), water temperature (Jinbo *et al.*, 2007), and salinity (Jinbo *et al.*, 2012). Even although larval mass cultures to produce horsehair crab juveniles were conducted under these appropriate environmental conditions, mass mortality occasionally occurred from the zoeal to megalopal stages (Jinbo, 2001). Moreover, the causes of larval mass mortality remain unknown.

It has been documented that n-3 highly unsaturated fatty acids (n-3 HUFA) are necessary for the growth and survival of crustacean larvae (Jones *et al.*, 1979; Hamasaki *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 1998a, 1999, 2000; Sulkin & Mckeen, 1999; Anger, 2001; Suprayudi *et al.*, 2002, 2004a, 2004b; Kogane *et al.*, 2007, 2009; Sui *et al.*, 2007). *Artemia* are used as live food for horsehair crab larvae (Jinbo *et al.*, 2005, 2007, 2012), but they have low n-3 HUFA contents, particularly of docosahexaenoic

(DHA) and eicosapentaenoic (EPA) acids (Watanabe *et al.*, 1978). The benefits of dietary enrichment of *Artemia* fed on crustacean larvae have been demonstrated. In swimming crab *Portunus trituberculatus* and mud crab *Scylla paramamosain* larvae, dietary EPA was effective at maintaining the survival rate; DHA accelerated the developmental period and improved carapace growth (Takeuchi *et al.*, 1998b; Kobayashi *et al.*, 2000, 2002). Ichikawa *et al.* (2013) examined the effects of feeding *Artemia* enriched with n-3 HUFA and adding diatoms (*Thalassiosira* sp.) to rearing water on the survival and developmental period of zoeae of the horsehair crab. Their results demonstrated that larval survival and developmental period were significantly influenced by the diatom supplementation, not the n-3 HUFA enrichment. However, in their rearing experiments, the feeding density of *Artemia* (0.3–0.5 ind. / ml) was lower than the optimal density (4 ind. / ml) for rearing horsehair crabs (Jinbo *et al.*, 2005). Therefore, to clarify the demand of horsehair crab larvae for n-3 HUFA under appropriate feeding conditions, this study was conducted to examine the survival, developmental period, growth, and morphogenesis of horsehair crab larvae fed on *Artemia* enriched with materials of different kinds that have various contents of n-3 HUFA.

## MATERIALS AND METHODS

### *Broodstock and larvae*

Five berried female crabs were collected from the northern Pacific off Kushiro, Hokkaido, Japan during January–March 2004. They were transferred to the Akkeshi Station of the Hokkaido National Fisheries Research Institute, Fisheries Research

Agency, Hokkaido, Japan, and individually held in five 30 l polycarbonate tanks. Sand-filtered seawater was supplied to the tank with a flow-through water system. The mean water temperature was  $1.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$  (mean  $\pm$  SD) during the culture period. Larvae hatched from one female (78.0 mm carapace length) on March 31, 2004 were used in the larval culture experiment.

*Experimental design and preparation of Artemia as a diet for culturing larvae*

*Artemia* sp. (North American Strain; The Nisshin OilliO Group Ltd., Yokohama, Japan) was used as a prey organism. *Artemia* cysts were incubated in a 13 l bucket with sand-filtered seawater ( $26^{\circ}\text{C}$ ) for 24 h. After hatching, *Artemia* nauplii were stocked in 13 l buckets ( $22^{\circ}\text{C}$ ) at a density of 100 ind. / ml and reared for 18–23 h according to the experimental design (see below).

Seven treatment groups were prepared for *Artemia* enrichment (Table 1). In treatment 1 (T1), *Artemia* were not enriched. In other treatments, *Artemia* were enriched with the following materials: treatment 2 (T2), a commercially available condensed phytoplankton *Nannochloropsis* sp. (Marine  $\alpha$ , Marine Tech Co., Aichi, Japan) at a level of 2 ml / l; treatment 3 (T3), ethyl oleate (EO; Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) at a level of 100  $\mu\text{l}$  / l; treatments 4 and 5 (T4, T5), EPA28G oil (containing 28.7% EPA and 12.7% DHA; Nippon Kagaku Shiryo Co., Ltd., Hakodate, Japan) at the two levels of 35  $\mu\text{l}$  / l (T4) and 100  $\mu\text{l}$  / l (T5); and treatments 6 and 7 (T6, T7), DHA70G oil (containing 4.6% EPA and 70.9% DHA; Nippon Kagaku Shiryo Co., Ltd., Hakodate, Japan) at the two levels of 25  $\mu\text{l}$  / l (T6) and 75  $\mu\text{l}$  / l (T7). In groups T4, T6, and T7, the total amount of oil used for *Artemia* enrichment was adjusted to 100  $\mu\text{l}$  / l by adding EO (Table 1). In the groups T4 and T5 as well as T6 and T7, the calculated DHA/EPA ratios were, respectively, 0.4 and

15.4. In groups T3–T7, 500 µl of oil with 100 µl of raw hen egg yolk and 100 ml of distilled water were emulsified for 5 min. The resulting mixture was then added directly to the *Artemia* culture medium.

#### *Larval rearing and biological measurements*

Newly hatched first-stage zoeae (Z1) were introduced into 2-l polyethylene white beakers placed in shallow water baths. The stocking density of Z1 was 50 ind. / beaker. Three beakers were prepared in each treatment group, in which two beakers were used to determine the survival rate (the ratio of the number of larvae that had molted to the next stage to the initial number of larvae) and the mean number of days from hatching to reach each larval stage. One beaker was used to measure larval growth and morphogenesis in each stage. Seawater (31.2%) filtered through sand and 50–5 µm cartridge filters (Advantec Toyo Kaisha Ltd., Tokyo, Japan) were used to rear larvae. The water temperature of the shallow water baths was increased gradually from 2 to 7°C from the first to the second day of Z1; then it was maintained at the optimum temperature for culturing horsehair crab larvae ( $12.3 \pm 0.3^\circ\text{C}$ ) (Jinbo *et al.*, 2007) using heaters connected to thermostats. Slight aeration (70 ml / min) was employed in each beaker to provide oxygen saturation and to prevent the *Artemia* from settling. The photoperiod was regulated at 12 h from 0700 to 1900 hours using two fluorescent lights (40 W) that were held 1 m above the surfaces of the rearing beakers. The intensity of surface illumination was 600–700 lx. The larvae were fed *Artemia* prepared for each treatment group at the optimal density of 4 ind. / ml (Jinbo *et al.*, 2005) for feeding horsehair crab larvae.

The larvae were observed daily and transferred into new beakers with new culture media using a large-mouthed (8 mm) pipette (10 ml) in the morning. During the

larval transfer, the larvae were counted and their respective developmental stages were noted. Dead larvae were removed and observed for their respective stages. When a newly metamorphosed megalopa (MG) was observed, fifthstage zoea (Z5), newly metamorphosed MG, and older-aged MG were temporarily placed in separate beakers to reduce cannibalism. After the larvae had been transferred, ampicillin sodium (Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan) was added to the rearing water at a concentration of 10 mg / l to prevent bacterial proliferation. Larval rearing was terminated when all larvae had molted to the first-stage crab (C1).

In each treatment group, five larvae were sampled from one rearing beaker at each stage until MG. The larvae were fixed with 5% neutral formalin for 1 day and then preserved in 70% ethanol solution. The lengths of the carapace and appendages (exopod of second maxilliped, chela, cheliped and third pleopod) were measured, and the setae of the exopod of the second maxilliped were counted under a microscope. Chela and cheliped lengths were measured for Z4 and Z5. Only the carapace length was measured for MG. The percentage ratio of each measurement to the carapace length (relative length) was calculated, as in our previous studies (Jinbo *et al.*, 2005, 2007, 2012).

#### *Lipid and fatty acid analysis*

*Artemia* were sampled from each treatment group once every 5 days to analyze their total lipid contents and fatty acid compositions. They were washed with fresh water and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis ( $n = 2$  for each treatment group). Total lipid contents were determined using the chloroform–methanol (2:1, v / v) method according to Folch *et al.* (1957). To analyze the fatty acid compositions, the total lipids were saponified with 1 ml of 50% KOH in 15 ml of ethanol. The saponifiable

matter was then esterified with BF<sub>3</sub>–methanol. The fatty acid methyl esters were diluted in *n*-hexane and subsequently analyzed with a gas–liquid chromatograph (GC-17A; Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) equipped with a silica capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness; Supelco, Bellefonte, PA, USA). Helium was used as the carrier gas, with pressure adjusted to 80 kPa. The injection port and detector temperature were, respectively, 250 and 270°C. The column temperature was initially held at 175°C and then increased at a rate of 1°C / min to a final temperature of 225°C. The individual fatty acids were identified by comparison with commercial standards (Supelco 37 Component FAME Mix; Supelco) and quantified with a C-R8A Chromatopac data processor (Shimadzu Corp.).

#### *Statistical analysis*

Differences in the mean values for the total lipid contents and fatty acid compositions of *Artemia*, larval survival rates, number of days required to reach each larval stage, and larval growth and morphogenesis measurements were compared among treatment groups with Tukey–Kramer’s multiple range test at the 5% significance level.

Arcsinetransformed data of the total lipid contents and fatty acid compositions of *Artemia*, survival rates, and the relative ratio of each appendage length to carapace length were used for the comparison.

## **RESULTS**

### *Lipid contents and fatty acid profiles of Artemia*

Total lipid contents and fatty acid compositions of the T1–T7 *Artemia* are presented in Table 2. Lipid contents of the *Artemia* did not differ significantly among groups. No significant difference was found in the fatty acid profiles of the T1–T3 *Artemia* except for myristic acid (14:0). However, the concentrations of EPA (20:5n-3) and n-3 HUFA tended to be higher in the T2 *Artemia* enriched with *Nannochloropsis*, followed by T1 *Artemia* without enrichment, and T3 *Artemia* enriched with EO. In the T4–T7 *Artemia* enriched with EPA28G and DHA70G oil, the concentrations of n-3 HUFA were significantly higher than in the T1 and T3 *Artemia*. The T4–T7 *Artemia* showed fatty acid profiles that depended on the enrichment materials and their amounts. The proportions of n-3 HUFA in the T4 and T6 *Artemia*, and those in the T5 and T7 *Artemia*, were similar, but those of the latter groups were higher than those of the former groups. The DHA / EPA ratios tended to increase from T4 to T7 *Artemia*.

### *Survival, developmental period, growth, and morphogenesis of larvae*

The mean survival rates for the respective larval stages are shown in Table 3. Although no significant difference was found in the survival rates among the treatment groups, larvae fed the T3 *Artemia* tended to show higher mortality (19%) during the metamorphosis to MG by Z5 (Figs. 1, 2a), and showed significantly higher mortalities than the other treatment groups during molting to C1 by MG (Figs. 1, 2b,  $P < 0.05$ ).

The mean numbers of days from hatching to each larval stage are presented in Table 4. Larvae fed with the T5 *Artemia* tended to show a higher velocity of development to reach Z5 and MG. In addition, the mean number of days needed to reach C1 was significantly less for the T5 group than for the T3 group.

The mean values for carapace length, several appendage lengths as ratios of carapace length, and the number of setae on the exopod of the second maxilliped are shown in Table 5. No significant difference was found for them among treatment groups.

The vitality of megalopae appeared to differ between the T1–T3 and the T4–T7 groups; megalopae actively moved on the bottom of the T4–T7 beakers.

## DISCUSSION

The amount of n-3 HUFA in live prey is known to affect the survival rates of larvae of several crustacean species. Larvae fed prey organisms with lower n-3 HUFA contents showed lower survival rates in four cancrid *Cancer* species (Sulkin & Mckeen, 1999), swimming crab (Hamasaki *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 1998a, 1999), the mud crabs *Scylla paramamosain* (Takeuchi *et al.*, 2000) and *S. serrata* (Suprayudi *et al.*, 2002, 2004a, 2004b), snow crab *Chionoecetes opilio* (Kogane *et al.*, 2007, 2009), and Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (Sui *et al.*, 2007). In this study, fatty acid profiles of *Artemia* also were influenced by the enrichment treatments. We prepared *Artemia* containing DHA (T4–T7) or no DHA (T1–T3). Although the enrichment treatments of *Artemia* did not affect the larval survival rates significantly, the megalopae mortality was significantly higher when larvae were fed EO-enriched *Artemia* (T3) with the lowest n-3 HUFA content. However, larvae fed unenriched *Artemia* (T1) showed a mean survival rate of C1 (67%), which was similar to those found in our previous studies conducted under suitable environmental conditions (69–82%) (Jinbo *et al.*, 2005, 2007, 2012). The n-3 HUFA content in T1

*Artemia*, which was calculated as approximately 0.6 % by multiplying the total lipid content by the area percent of n-3 HUFA in the fatty acid composition, might be regarded as a minimum level needed to sustain the high survival rate of the horsehair crab larvae until C1. The n-3 HUFA content of *Artemia* in the rearing experiments of horsehair crab larvae performed by Ichikawa *et al.* (2013) was reported as 1.0–2.5%, satisfying the minimum level of dietary n-3 HUFA requirement of the horsehair crab larvae inferred in the present study. This suggests that the low survival rates to MG (3–8%) in the treatment groups in which *Thalassiosira* sp. were not supplemented in their experiments can be attributed to lower feeding densities of *Artemia* (0.3–0.5 ind. / ml) than the optimal density (4 ind. / ml) (Jinbo *et al.*, 2005) for rearing horsehair crabs. Furthermore, higher n-3 HUFA contents (3.1%) of *Thalassiosira* sp. may have contributed to the high survival rates until MG (45–65%) in the treatment groups with supplementation of *Thalassiosira* sp. The level of dietary n-3 HUFA required by horsehair crab larvae for survival is lower than that required by swimming crab (0.9–1.7%) (Takeuchi *et al.*, 1999), mud crab (0.8%) (Suprayudi *et al.*, 2002), snow crab (2.3%) (Kogane *et al.*, 2009), and Chinese mitten crab (1.7–1.8%) larvae (Sui *et al.*, 2007). Furthermore, our results suggest that DHA did not play an important role in aiding the survival of horsehair crab larvae, as has also been found for mud crab larvae (Kobayashi *et al.*, 2000, 2001; Takeuchi *et al.*, 2000). In addition, EPA is known to be superior to DHA for maintaining high survival rates of swimming crab larvae (Takeuchi *et al.*, 1998b).

The rate of development of brachyuran larvae is influenced by the level of dietary n-3 HUFA. Mud crab larvae fed *Artemia* containing low (0.41–0.45% EPA and trace DHA) or high (1.36 and 0.95% EPA and 0.16 and 1.38% DHA) amounts of EPA and DHA showed delayed development (Suprayudi *et al.*, 2004b). In swimming crabs, a

high content of DHA in *Artemia* engendered rapid development of larvae (Takeuchi *et al.*, 1998b). Furthermore, in snow crabs, high dietary n-3 HUFA in the rotifer *Brachionus plicatilis* sp. complex induced rapid development of larvae (Kogane *et al.*, 2009). Fatty acid profiles of the *Artemia* affected the larval development rate of the horsehair crab larvae, showing a higher velocity of development to reach Z5 and MG in the T5 group and a significantly greater number of days from hatching to C1 in the T3 group than in the T5 group, which suggests that the high content of EPA in *Artemia* accelerates the larval development of horsehair crab larvae, but that DHA does not affect it. Consequently, the effects of DHA content in *Artemia* on the larval developmental velocity of the horsehair crab differed from those of portunid crabs.

In swimming crabs, a high content of DHA in *Artemia* reportedly promotes carapace length development of the first-stage crab (Takeuchi *et al.*, 1998b). Although the growth of larval mud crabs is improved by feeding them live foods with high contents of n-3 HUFA (Kobayashi *et al.*, 2000, 2001; Takeuchi *et al.*, 2000; Suprayudi *et al.*, 2004a, 2004b), the higher dietary n-3 HUFA (especially DHA) accelerated the morphogenesis of last-stage zoeae with large chelipeds, similarly to megalopae, which led to mass mortality because these last-stage zoeae failed to metamorphose to MG (Hamasaki *et al.*, 2002a, 2002b; Dan & Hamasaki, 2011). No such phenomenon occurred in horsehair crabs. The enrichment treatment for *Artemia* did not affect the larval growth or morphogenesis, so similar measurements to those we have reported previously were obtained (Jinbo *et al.*, 2005, 2007, 2012).

In conclusion, although the amount of n-3 HUFA in an unenriched North American strain of *Artemia* might meet the demands of horsehair crab larvae for their survival, growth, and morphogenesis, it is recommended that the *Artemia* should be enriched according to the fatty acid profile in the treatment T5, as it improves the larval

development rate. Furthermore, DHA in enriched *Artemia* could stimulate the vitality of megalopae, as observed in this study, which may keep the larvae from sinking to the bottom of a mass seed production tank, where they could be infected with pathogenic bacteria that propagate in the organic debris originating from dead larvae, food organisms, and their feces (Hamasaki *et al.*, 2011). This may improve the larval survival rate of the horsehair crab.

## REFERENCES

- Abe, K. 1992. Important crab resources inhabiting Hokkaido waters. *Marine Behaviour and Physiology*, **21**: 153–183.
- Anger, K. 2001. The quantity of food uptake. In: *Crustacean issues 14, The biology of decapod crustacean larvae*. (R. Vonk, ed.), pp. 127–137. A.A. Balkema, The Netherlands.
- Dan, S. & Hamasaki, K. 2011. Effect of salinity and dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on the survival, development, and morphogenesis of the larvae of laboratory-reared mud crab *Scylla serrata* (Decapoda, Portunidae). *Aquaculture International*, **19**: 323–338.
- Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **226**: 497–509.
- Hamasaki, K., Obata, Y., Dan, S. & Kitada, S. 2011. A review of seed production and stock enhancement for commercially important portunid crabs in Japan. *Aquaculture International*, **19**: 217–235.

- Hamasaki, K., Suprayudi, M. A. & Takeuchi, T. 2002a. Effect of Dietary n-3 HUFA on larval morphogenesis and metamorphosis to megalops in the seed production of the mud crab *Scylla serrata* (Brachyura: Portunidae). *Aquaculture Science*, **50**: 333–340.
- Hamasaki, K., Suprayudi, M. A. & Takeuchi, T. 2002b. Mass mortality during metamorphosis to megalops in the seed production of the mud crab *Scylla serrata* (Crustacea, Decapoda, Portunidae). *Fisheries Science*, **68**: 1226–1232.
- Hamasaki, K., Takeuchi, T. & Sekiya, S. 1998. Dietary value for larval swimming crab *Portunus trituberculatus* of marine rotifer *Brachionus rotundiformis* cultured with several feeds. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **64**: 841–846. [in Japanese with English abstract]
- Ichikawa, T., Iwamoto, A., Tsuzaki, T., Ohta, K., Hamasaki, K. & Takeuchi, T. 2013. Effects of supplementation of rearing water with diatom *Thalassiosira* sp. and dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on the survival and developmental period of horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* zoeae. *Aquaculture Science*, **61**: 293–302.
- Jinbo, T. 2001. Horsehair crab. In: Furusawa T (ed) *Annual report of Japan Sea-Farming Association 2001*. pp 21–24. Japan Sea-Farming Association, Tokyo. [in Japanese]
- Jinbo, T., Hamasaki, K. & Ashidate, M. 2005. Effect of *Artemia* nauplii density on survival, development and feeding of larvae of the horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* (Crustacea, Decapoda, Brachyura) reared in the laboratory. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **61**: 563–570. [in Japanese with English abstract]
- Jinbo, T., Hamasaki, K. & Ashidate, M. 2007. Effect of water temperature on survival, development and feeding of larvae of the horsehair crab *Erimacrus*

- isenbeckii* (Crustacea, Decapoda, Brachyura) reared in the laboratory. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **73**: 1081–1089. [in Japanese with English abstract]
- Jinbo, T., Hamasaki, K. & Ashidate, M. 2012. Effect of salinity on survival, development and feeding of larvae of the horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* reared in the laboratory. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **78**: 405–412. [in Japanese with English abstract]
- Jones, D. A., Kanazawa, A. & Ono, K. 1979. Studies on the nutritional requirements of the larval stages of *Penaeus japonicus* using microencapsulated diets. *Marine Biology*, **54**: 261–267.
- Kobayashi, T., Takeuchi, T., Arai, D. & Sekiya, S. 2000. Suitable dietary levels of EPA and DHA for larval mud crab during *Artemia* feeding period. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **66**: 1006–1013. [in Japanese with English abstract]
- Kobayashi, T., Takeuchi, T., Shimizu, T., Arai, D., Sekiya, S. & Maruyama, K. 2001. The effect of EPA-enriched *Artemia* on survival and development of larval mud crab. *Aquaculture Science*, **49**: 363–368. [in Japanese with English abstract]
- Kogane, T., Dan, S. & Hamasaki, K. 2007. Improvement of larval rearing technique for mass seed production of snow crab *Chionoecetes opilio*. *Fisheries Science*, **73**: 851–861.
- Kogane, T., Dan, S. & Hamasaki, K. 2009. Effect of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on survival, molting and growth of larval snow crab *Chionoecetes opilio* reared in the laboratory. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **75**: 1004–1010. [in Japanese with English abstract]
- Sasaki, J. 2003. Horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* in the waters around Hokkaido. In: *Crustacean resources and their diversity*. (O. Jun & S. Watanabe, eds), pp. 31–44. Kouseisha kouseikaku, Tokyo. [in Japanese]

- Sui, L., Wille, M., Cheng, Y. & Sorgeloos, P. 2007. The effect of n-3 HUFA levels and DHA/EPA ratios on growth, survival and osmotic stress tolerance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* larvae. *Aquaculture*, **273**: 139–150.
- Sulkin, S.D. & Mckeen, G. L. 1999. The significance of feeding history on the value of heterotrophic microzooplankton as prey for larval crabs. *Marine Ecology Progress Series*, **186**: 219–225.
- Suprayudi, M. A., Takeuchi, T. & Hamasaki, K. 2004a. Essential fatty acids for larval mud crab *Scylla serrata*: implications of lack of the ability to bioconvert C18 unsaturated fatty acids to highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture*, **231**: 403–416.
- Suprayudi, M. A., Takeuchi, T., Hamasaki, K. & Hirokawa, J. 2002. The effect of n-3 HUFA content in rotifers on the development and survival of mud crab, *Scylla serrata*, larvae. *Aquaculture Science*, **50**: 205–212.
- Suprayudi, M. A., Takeuchi, T., Hamasaki, K. & Hirokawa, J. 2004b. Effects of *Artemia* enriched with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on survival and occurrence of molting failure in megalop larvae of the mud crab *Scylla serrata*. *Fisheries Science*, **70**: 650–658.
- Takeuchi, T., Kobayashi, T., Shimizu, T. & Sekiya, S. 2000. The necessity and suitable feeding schedule of *Artemia* nauplii for larval mud crab. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **66**: 984–992. [in Japanese with English abstract]
- Takeuchi, T., Nakamoto, Y., Hamasaki, K., Sekiya, S. & Watanabe, T. 1999. Requirement of n-3 highly unsaturated fatty acids for larval swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **65**: 797–803. [in Japanese with English abstract]

- Takeuchi, T., Satoh, N., Sekiya, S., Shimizu, T. & Watanabe, T. 1998a. Influence of the different feeding schedule of food organisms for larval swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **65**: 804–809. [in Japanese with English abstract]
- Takeuchi, T., Satoh, N., Sekiya, S., Shimizu, T. & Watanabe, T. 1998b. The effect of dietary EPA and DHA on the molting rate of larval swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **65**: 998–1004. [in Japanese with English abstract]
- Watanabe, T., Oowa, F., Kitajima, C. & Fujita, S. 1978. Nutritional quality of brine shrimp, *Artemia salina*, as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **44**: 1115–1121. [in Japanese with English abstract]

**Table 1** Protocol for lipid enrichment of the *Artemia* used in the larval rearing experiment of the horsehair crab *Erimacrus isenbeckii*

Treatment group	Concentration of enrichment material in the <i>Artemia</i> sp. culture tank ( $\mu\text{l/l}$ )				Calculated amount of EPA and DHA ( $\mu\text{l/l}$ )			Calculated DHA/EPA ratio in enrichment material
	EPA28G <sup>a</sup>	DHA70G <sup>b</sup>	Ethyl oleate	Marine $\alpha^c$	EPA	DHA	EPA + DHA	
T1	0	0	0	0	0	0	0	–
T2	0	0	0	2000	0	0	0	–
T3	0	0	100	0	0	0	0	–
T4	35	0	65	0	10	4.4	14.4	0.4
T5	100	0	0	0	28.7	12.7	41.4	0.4
T6	0	25	75	0	1.2	17.7	18.9	15.4
T7	0	75	25	0	3.5	53.2	58.7	15.4

<sup>a</sup> EPA28G oil contains 28.7% eicosapentaenoic acid (EPA) and 12.7% docosahexaenoic acid (DHA) (Nippon Kagaku Shiryo Co., Ltd., Hakodate, Japan)

<sup>b</sup> DHA70G oil contains 4.6% EPA and 70.9% DHA (Nippon Kagaku Shiryo Co., Ltd., Hakodate, Japan)

<sup>c</sup> Commercially available condensed phytoplankton *Nannochloropsis* sp. (Marine Tech Co., Aichi, Japan)

**Table 2** Mean values of total lipid content and fatty acid composition of *Artemia* fed to each treatment group ( $n=2$ )

Analyzed items	Treatment group						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Total lipid (% dw)	18.35 ± 0.85	19.04 ± 0.07	20.74 ± 1.18	20.84 ± 0.31	22.07 ± 0.49	21.69 ± 1.23	21.33 ± 0.81
Fatty acid (area %)							
12:0	0.35 ± 0.09	0.30 ± 0.10	0.23 ± 0.00	0.19 ± 0.09	0.05 ± 0.05	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01
14:0	1.32 ± 0.27a	6.45 ± 0.05a	0.32 ± 0.01b	0.28 ± 0.04b	0.26 ± 0.02b	0.24 ± 0.00b	0.23 ± 0.00b
16:0	0.43 ± 0.05	0.38 ± 0.10	0.40 ± 0.06	0.34 ± 0.03	0.36 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.32 ± 0.00
16:1	6.61 ± 0.67	7.67 ± 0.09	6.55 ± 0.63	5.99 ± 0.28	6.43 ± 0.34	6.47 ± 0.08	6.35 ± 0.03
16:3n-6	2.60 ± 0.45	3.06 ± 0.17	2.70 ± 0.24	2.47 ± 0.19	2.48 ± 0.06	2.23 ± 0.05	2.28 ± 0.01
18:0	3.36 ± 0.22	3.25 ± 0.05	3.12 ± 0.16	3.20 ± 0.14	3.34 ± 0.05	3.49 ± 0.02	3.56 ± 0.02
18:01	31.87 ± 1.46ab	29.77 ± 0.80a	36.25 ± 2.13ab	36.42 ± 2.66ab	31.18 ± 0.47a	39.45 ± 0.85b	34.68 ± 0.22ab
18:2n-6	4.06 ± 0.15ab	3.84 ± 0.04a	4.20 ± 0.05ab	4.20 ± 0.09ab	4.03 ± 0.08ab	4.33 ± 0.02b	4.16 ± 0.05ab
18:3n-3	18.99 ± 0.49	17.63 ± 0.18	17.06 ± 0.02	16.85 ± 1.05	16.44 ± 0.58	16.41 ± 0.43	17.21 ± 0.33
18:4n-3	3.94 ± 0.07a	3.87 ± 0.14a	3.59 ± 0.02a	3.48 ± 0.55a	3.42 ± 0.05a	2.84 ± 0.09a	2.99 ± 0.08a
20:01	0.44 ± 0.07ab	0.37 ± 0.00a	0.38 ± 0.06a	0.52 ± 0.09ab	0.61 ± 0.08ab	0.70 ± 0.01ab	0.72 ± 0.01b
20:4n-6	0.89 ± 0.12ab	0.95 ± 0.02ab	0.77 ± 0.09a	0.89 ± 0.02ab	1.06 ± 0.01ab	0.99 ± 0.00ab	1.23 ± 0.02b
20:3n-3	0.12 ± 0.03	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.00	0.15 ± 0.01
20:4n-3	0.23 ± 0.05a	0.18 ± 0.01a	0.20 ± 0.03a	0.27 ± 0.01ab	0.38 ± 0.01b	0.23 ± 0.01ab	0.26 ± 0.01ab
20:5n-3	2.93 ± 0.35a	3.34 ± 0.20ab	2.48 ± 0.25a	4.13 ± 0.05b	6.90 ± 0.38c	3.01 ± 0.01ab	3.61 ± 0.04b
22:6n-3	–	–	–	0.51 ± 0.10a	1.45 ± 0.13ab	1.66 ± 0.27b	4.24 ± 0.48c
Σ saturated	5.46 ± 0.19a	10.38 ± 0.10a	4.07 ± 0.10b	4.01 ± 0.03b	4.01 ± 0.06b	4.13 ± 0.04b	4.19 ± 0.01b
Σ monoene	38.91 ± 0.87a	37.82 ± 0.72a	43.18 ± 1.57ab	42.94 ± 2.48ab	38.22 ± 0.20a	46.62 ± 0.76b	41.75 ± 0.20a
Σ n-3 HUFA	3.28 ± 0.43a	3.61 ± 0.21ab	2.78 ± 0.30a	5.03 ± 0.16bc	8.86 ± 0.50d	5.04 ± 0.27bc	8.25 ± 0.50d
Σ n-6	7.54 ± 0.17	7.85 ± 0.15	7.67 ± 0.10	7.56 ± 0.07	7.58 ± 0.03	7.55 ± 0.08	7.68 ± 0.02
Σ n-3	26.21 ± 0.85abc	25.1 ± 0.54abc	23.43 ± 0.26a	25.36 ± 1.44abc	28.72 ± 0.12bc	24.29 ± 0.24a	28.44 ± 0.09c
DHA / EPA	–	–	–	0.12 ± 0.02a	0.21 ± 0.01a	0.55 ± 0.09a	1.17 ± 0.12b

Values are the mean ± standard error of the mean. Significant differences were found between the treatment groups with different letters in the same row ( $P<0.05$ ). See Table 1 for treatment groups and *Artemia* enrichment conditions

**Table 3** Mean survival rates of horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* larvae reared to each larval stage in two 2-l beakers (50 per beaker) in the treatment groups

Treatment group	Mean survival rate (%) to each stage					
	Z2 <sup>a</sup>	Z3 <sup>a</sup>	Z4 <sup>a</sup>	Z5 <sup>a</sup>	MG <sup>b</sup>	C1 <sup>c</sup>
T1	96.0 (0.0)	96.0 (0.0)	96.0 (0.0)	94.0 (2.0)	83.0 (3.0)	67.0 (3.0)
T2	97.0 (1.0)	96.0 (2.0)	96.0 (2.0)	94.0 (2.0)	87.0 (3.0)	71.0 (1.0)
T3	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	99.0 (1.0)	80.0 (14.0)	49.0 (9.0)
T4	99.0 (1.0)	97.0 (1.0)	97.0 (1.0)	96.0 (0.0)	82.0 (4.0)	73.0 (7.0)
T5	99.0 (1.0)	97.0 (3.0)	96.0 (2.0)	96.0 (2.0)	83.0 (3.0)	75.0 (1.0)
T6	97.0 (1.0)	97.0 (1.0)	96.0 (2.0)	95.0 (1.0)	77.0 (3.0)	68.0 (2.0)
T7	98.0 (0.0)	98.0 (0.0)	97.0 (1.0)	97.0 (1.0)	79.0 (5.0)	66.0 (6.0)

Values in parentheses are standard error of the mean. No significant difference was found among the rearing groups ( $P > 0.05$ )

<sup>a</sup> Second to fifth zoea

<sup>b</sup> Megalopa

<sup>c</sup> First-stage crab

**Table 4** Mean number of days taken from hatching to reach each larval stage in horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* larvae reared in two 2-l beakers (50 per beaker) in treatment groups

Treatment group	Mean number of days to reach each stage											
	Z2 <sup>a</sup>		Z3 <sup>a</sup>		Z4 <sup>a</sup>		Z5 <sup>a</sup>		MG <sup>b</sup>		C1 <sup>c</sup>	
	Mean	CV <sup>d</sup>	Mean	CV								
T1	5.5 (0.0)a	9.0 (0.1)	10.0 (0.0)	0.7 (0.7)	14.7 (0.1)	3.7 (0.2)	20.4 (0.1)ab	3.7 (0.1)	28.0 (0.3)ab	2.8 (0.2)	52.5 (0.1)ab	7.3 (1.1)
T2	5.5 (0.1)ab	9.1 (0.0)	10.0 (0.0)	0.7 (0.7)	14.9 (0.0)	3.3 (0.1)	20.5 (0.1)ab	3.0 (0.2)	28.3 (0.0)a	2.8 (0.2)	52.5 (0.6)ab	5.2 (1.3)
T3	5.2 (0.1)ab	8.1 (0.4)	10.1 (0.0)	2.2 (0.2)	14.9 (0.1)	3.3 (0.1)	20.6 (0.1)a	3.9 (0.4)	28.2 (0.0)a	3.0 (0.1)	54.2 (0.4)a	7.3 (0.6)
T4	5.3 (0.1)ab	8.1 (1.0)	10.1 (0.1)	1.6 (1.6)	14.8 (0.1)	4.2 (0.3)	20.6 (0.1)ab	4.0 (0.6)	28.3 (0.2)a	3.3 (0.2)	52.5 (0.2)ab	4.0 (0.1)
T5	5.1 (0.0)b	6.4 (1.0)	10.0 (0.0)	3.4 (0.3)	14.5 (0.2)	4.3 (1.2)	20.1 (0.0)b	4.5 (0.6)	27.4 (0.0)b	3.2 (0.3)	50.7 (0.6)b	4.0 (0.6)
T6	5.2 (0.1)b	6.9 (0.9)	10.1 (0.0)	2.1 (0.7)	15.1 (0.0)	3.9 (0.0)	20.8 (0.1)a	3.9 (0.5)	28.4 (0.0)a	3.1 (0.2)	52.2 (0.2)ab	3.6 (0.4)
T7	5.3 (0.1)ab	8.2 (0.8)	10.1 (0.1)	1.8 (1.8)	15.0 (0.1)	5.0 (0.2)	20.8 (0.1)ab	4.3 (0.5)	28.3 (0.2)a	3.3 (0.3)	52.6 (0.3)ab	4.3 (0.4)

Mean values were calculated using the mean number of days taken from hatching to reach each larval stage in both beaker 1 and beaker 2 ( $n=2$ ). Different letters in the same column indicate significant differences between treatment groups ( $P < 0.05$ ). Values in parentheses are standard errors of the mean

<sup>a</sup> Second to fifth zoea

<sup>b</sup> Megalopa

<sup>c</sup> First-stage crab

<sup>d</sup> Coefficients of variation (%)

**Table 5** Mean values of carapace length, lengths of several appendages as ratios of carapace length, and number of setae on the exopod of the second maxilliped in horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* larvae reared in the treatment groups ( $n=5$ )

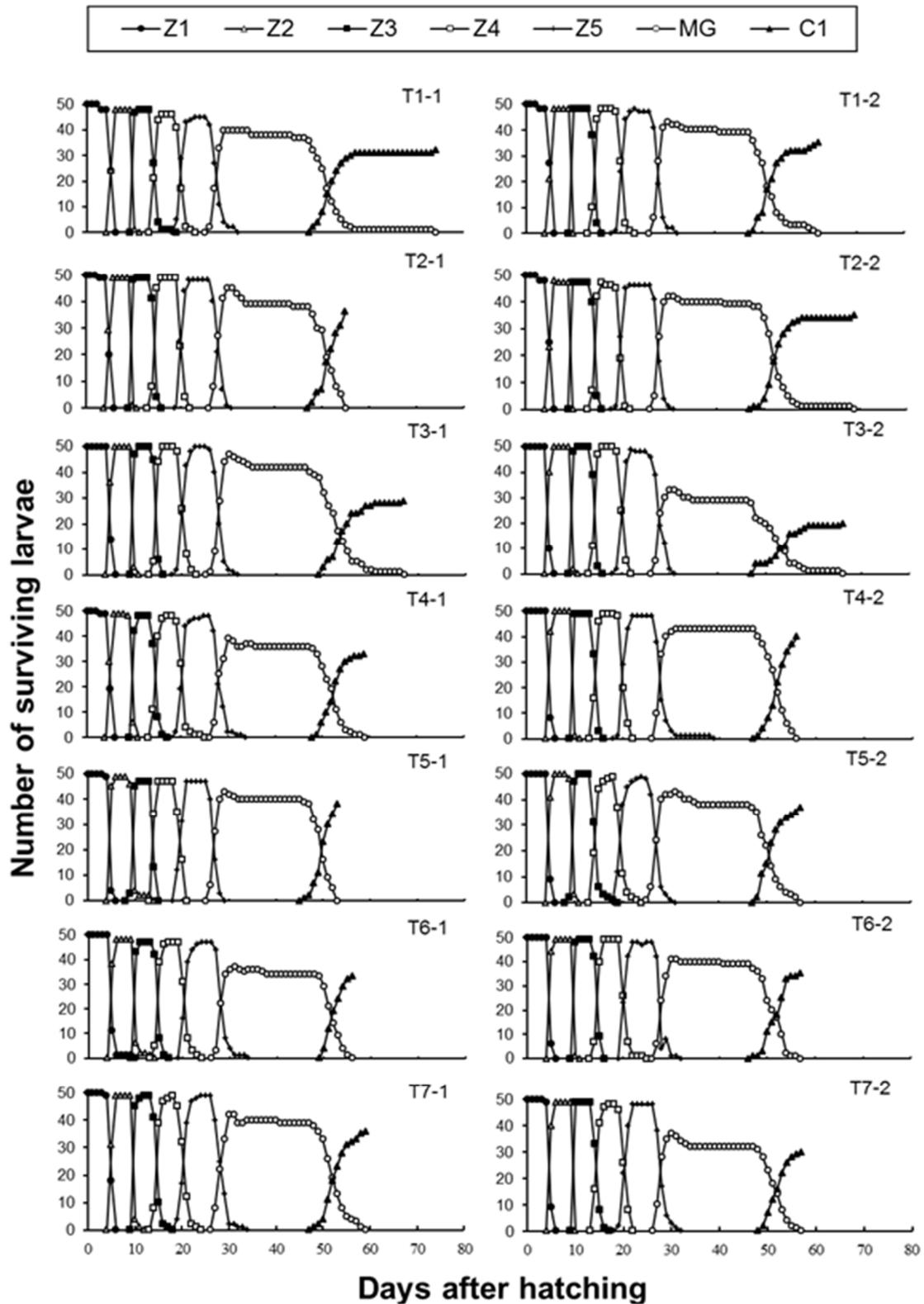
Stage	Treatment group	Carapace length (mm)	Ratio to carapace length (%)				Number of setae
			Exopod of 2nd maxilliped	Chela	Cheliped	Third pleopod	
Z1 <sup>a</sup>	–	1.32 (0.01)	43.8 (0.3)	–	–	2.2 (0.1)	4.0 (0.0)
	T1	1.62 (0.01)	40.9 (0.5)	–	–	6.4 (0.2)	12.0 (0.0)
	T2	1.61 (0.02)	42.1 (0.4)	–	–	6.1 (0.1)	12.0 (0.0)
	T3	1.61 (0.03)	40.5 (0.5)	–	–	6.2 (0.4)	12.2 (0.2)
Z2 <sup>a</sup>	T4	1.60 (0.02)	41.8 (0.6)	–	–	6.4 (0.2)	12.4 (0.4)
	T5	1.60 (0.03)	41.3 (0.8)	–	–	6.2 (0.3)	12.2 (0.2)
	T6	1.60 (0.02)	41.3 (0.5)	–	–	5.9 (0.2)	12.2 (0.2)
	T7	1.61 (0.03)	41.3 (0.9)	–	–	6.3 (0.1)	12.4 (0.2)
	T1	1.88 (0.01)	40.3 (0.5)	–	–	11.8 (0.3)	14.6 (0.5)
	T2	1.85 (0.01)	41.4 (0.6)	–	–	12.2 (0.2)	14.4 (0.2)
	T3	1.87 (0.01)	40.7 (0.1)	–	–	12.0 (0.4)	15.0 (0.3)
Z3 <sup>a</sup>	T4	1.83 (0.02)	42.1 (0.5)	–	–	11.8 (0.3)	15.2 (0.5)
	T5	1.82 (0.01)	41.7 (0.3)	–	–	11.4 (0.5)	15.0 (0.0)
	T6	1.85 (0.02)	41.1 (0.6)	–	–	12.8 (0.2)	15.0 (0.3)
	T7	1.85 (0.01)	40.9 (0.2)	–	–	12.0 (0.3)	15.0 (0.3)
Z4 <sup>a</sup>	T1	2.30 (0.02)	37.7 (0.4)	22.1 (0.1)	27.4 (0.2)	21.3 (0.5)	18.4 (0.2)
	T2	2.23 (0.02)	38.6 (0.1)	22.1 (0.5)	28.1 (0.3)	22.2 (0.4)	18.2 (0.4)

	T3	2.27 (0.02)	38.4 (0.7)	22.6 (0.5)	27.4 (0.7)	23.0 (0.7)	18.6 (0.4)
	T4	2.29 (0.05)	38.3 (0.6)	21.8 (0.7)	26.8 (0.6)	21.7 (0.7)	18.2 (0.3)
	T5	2.25 (0.01)	38.0 (0.4)	22.4 (0.5)	27.6 (0.5)	21.2 (0.4)	18.8 (0.3)
	T6	2.30 (0.04)	38.1 (0.5)	22.0 (0.5)	27.1 (0.5)	22.4 (0.7)	19.0 (0.4)
	T7	2.29 (0.02)	38.7 (0.6)	22.0 (0.3)	27.4 (0.2)	20.8 (0.5)	19.0 (0.3)
	T1	2.72 (0.03)	35.5 (0.6)	27.7 (1.3)	34.9 (1.1)	29.5 (0.6)	21.4 (0.4)
	T2	2.71 (0.04)	37.7 (0.5)	27.8 (0.3)	35.9 (0.4)	31.2 (0.7)	20.6 (0.5)
	T3	2.64 (0.04)	37.3 (0.5)	29.6 (0.6)	37.2 (0.9)	30.7 (0.7)	20.8 (0.7)
Z5 <sup>a</sup>	T4	2.66 (0.02)	37.4 (0.6)	27.2 (0.7)	34.7 (0.8)	30.5 (0.9)	21.2 (0.5)
	T5	2.61 (0.05)	37.0 (0.8)	26.9 (0.6)	35.0 (0.6)	30.5 (0.7)	21.4 (0.4)
	T6	2.72 (0.03)	35.7 (0.3)	27.2 (0.5)	34.3 (0.6)	29.0 (0.9)	21.6 (0.2)
	T7	2.69 (0.05)	36.6 (0.8)	26.5 (0.9)	34.7 (1.1)	30.1 (0.5)	21.6 (0.2)
	T1	3.91 (0.04)	–	–	–	–	–
	T2	3.91 (0.07)	–	–	–	–	–
	T3	3.86 (0.04)	–	–	–	–	–
MG <sup>b</sup>	T4	3.94 (0.03)	–	–	–	–	–
	T5	3.79 (0.07)	–	–	–	–	–
	T6	3.82 (0.07)	–	–	–	–	–
	T7	3.92 (0.06)	–	–	–	–	–

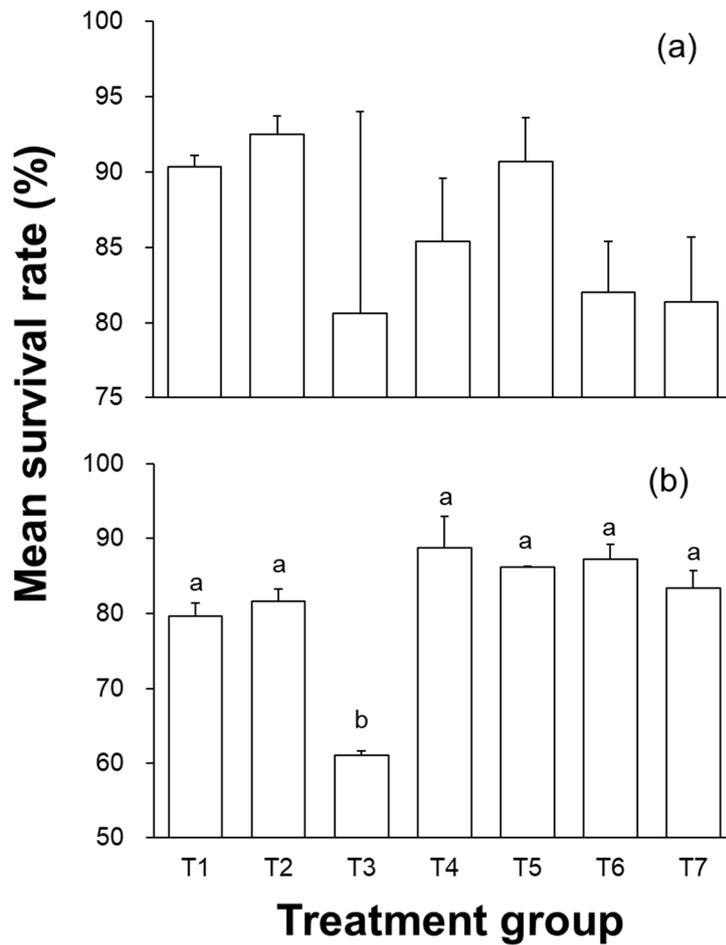
The number of samples was five for each group. Values in parentheses are standard error of the mean. No significant difference was found among the treatment groups ( $P > 0.05$ )

<sup>a</sup> First to fifth zoea

<sup>b</sup> Megalopa



**Figure 1** Number of each larval stage of horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* reared in two 2-l beakers for each treatment group, each of which initially contained 50 larvae. Z1–Z5 first to fifth zoea, MG megalopa, C1 first-stage crab.



**Figure 2** Mean survival rates from the fifth zoeal stage to the megalopal stage (a) and from the megalopal stage to the first crab stage (b) of horsehair crab *Erimacrus isenbeckii* reared in two 2-l beakers for each treatment group ( $n = 2$ ). Vertical bars indicate the standard error of the mean. Significant differences were found between treatment groups with different letters ( $P < 0.05$ ).

## 第 4 章

### 総 括

## 総 括

本研究では、我が国の水産上重要な大型甲殻類であるイセエビとケガニを対象種に、人工生産した種苗を用いた増養殖を推進する基礎として、人工繁殖技術の開発に取り組んだ。イセエビについては、良質のふ化幼生を安定的かつ大量に得るための親エビ養成技術を確立する基礎として、雌雄の体サイズと繁殖生態との関係について調査した（第2章1および2節）。また、イセエビの幼生飼育では、フィロソーマ幼生が水槽底に沈降して死亡する現象が飼育規模を阻害する要因となっている。そこで、フィロソーマ幼生の沈降現象を防ぐ飼育方法を開発する基礎として、ふ化から変態直前までのフィロソーマ幼生を供試し、走光性の成長に伴う変化を調査した（第3章1節）。ケガニについては、種苗生産技術の開発に資するための基礎的な知見として、幼生の適正な飼育条件、すなわち給餌密度、飼育水温、飼育塩分、並びに餌料栄養価を明らかにする飼育実験に取り組んだ（第3章2-5節）。

以下に、本研究で得られた成果の概要として、各章の節ごとにそれぞれ実施した研究について要約し、今後の課題と展開について述べた。

## 成果の概要

### 第2章第1節 イセエビにおける体サイズが配偶行動および産卵に及ぼす影響

イセエビにおける雌雄の体サイズが配偶行動および産卵に及ぼす影響について調べた。体サイズを雌雄とも大、中、小の3段階に設定し、全ての組み合わせで雌雄1個体ずつのペアを水槽に収容し、赤外線カメラを用いて夜間の配偶行動を観察した。抱卵した場合は、抱卵数および受精率を調べた。その結果、配偶行動には4つのパターンが確認され、雌雄の体サイズによってその頻度が変わり、雄の体サイズが小さくなるほど交接時間は長く、交接回数は増加した。

抱卵数は雌の体サイズが大きいほど増加したが、受精率は体サイズによる影響を受けなかった。また、頭胸甲長が 55 mm 以下の雄とペアリングした雌の産卵率が低い傾向を示したことから、小型雄は繁殖に不利であると考えられた。

## 第 2 章第 2 節 イセエビの雄親エビにおける繁殖能力の評価

雄親エビにおける体サイズが繁殖能力に与える影響について調査した。大、中、小の各体サイズの雄 1 尾に対して、体サイズを揃えた雌 10 尾と混合飼育し、雌の抱卵率、産卵数および受精率について調査した。その結果、雌の抱卵率と受精率は、雄の体サイズの影響を受けることが明らかになり、小型の雄では数回の配偶行動によって繁殖能力が低下した。また、一旦低下した繁殖能力は繁殖期間中には回復しないことが明らかになった。

## 第 3 章第 1 節 イセエビフィロゾーマ幼生の成長に伴う走光性の変化

イセエビの種苗生産において、フィロゾーマ幼生の水槽底への沈降・蟻集による死亡を防ぐ技術を開発する基礎として、光量別 ( $0\text{--}310 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) と波長別 (400–660 nm) に幼生の成長に伴う走光性の変化を調べた。幼生は強い光量では正の走光性を、弱い光量では負の走光性を示した。また、正の走光性を惹起する波長は初期幼生では 400–620 nm で広がったが、中期以降には 500 nm 未満の短波長側に変化した。加えて、VI 期幼生は 420–620 nm の広い波長で負の走光性を示すのが特徴的であった。

## 第 3 章第 2 節 ケガニ幼生の生残・発育及び摂餌に及ぼすアルテミア給餌密度の影響

アルテミアの給餌密度 (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 個体 / mL) がケガニ幼生の生残、各齢期へ脱皮するまでの所要日数、成長および摂餌量に及ぼす影響を調べた。生残率およびメガロパの甲長は、2–4 個体 / mL が 0–0.5 個体 / mL に対し有意に高く、各齢期までの所要日数は 2–4 個体 / mL が 0.25–1 個体 / mL に対し有意に短かった。また、摂餌量は給餌密度および齢期の進行にともなって増加

し、2 個体 / mL 以上で飽食する傾向を示した。以上の結果から、アルテミアの適正給餌密度は 2 個体 / mL 程度であると考えられた。

### **第 3 章第 3 節 ケガニ幼生の生残，発育および摂餌に及ぼす水温の影響**

ケガニ幼生の適正飼育水温を明らかにする目的で，ふ化幼生を 2 L ビーカーに収容し，水温 6–21°C (3°C 間隔) で飼育した。生残率は 6–15°C で高値を示し，21°C では第 3 齢から第 4 齢にかけて，18°C ではメガロパへの変態期から第 1 齢稚ガニにかけて大量に減耗した。各齢期までの所要日数は 15°C まで水温の上昇にともない減少し，第 1 齢稚ガニまでの所要日数の変動係数は 15°C 以上で大きかった。また，頭胸甲長は水温が低いほど大きく，摂餌数は 9–15°C で多かった。以上のことから，適正飼育水温は 9–12°C と結論付けた。

### **第 3 章第 4 節 ケガニ幼生の生残，発育および摂餌に及ぼす塩分の影響**

ケガニ幼生の飼育に適した塩分を明らかにする目的で，ふ化幼生を塩分 10–45 psu で飼育した。生残率は 30–35 psu で高値を示し，10 psu および 15，45 psu では第 1 および 4 齢で全滅し，20 psu ではメガロパへの変態期で大量に減耗した。各齢期までの所要日数は 25 psu で最小を示したが，第 1 齢稚ガニまでの所要日数の変動係数は 25 psu で高かった。頭胸甲長は 40 psu で小さく，摂餌数は 25–35 psu で多かった。以上の結果から，適正塩分は 30–35 psu と結論付けた。

### **第 3 章第 5 節 ケガニ幼生の生残および発育に及ぼす n-3 高度不飽和脂肪酸の影響**

ケガニ幼生を，各種の栄養強化剤 (無強化，ナンノクロロプシス，オレイン酸，高・低濃度の EPA および DHA) で強化したアルテミアを餌料として飼育した。生残率，体サイズおよび形態形成には，栄養強化による有意差は認められなかったが，DHA で強化した餌料でメガロパの活力が向上し，第 5 齢以降の各齢期までの所要日数は DHA を含む高濃度 EPA で強化した餌料で短くなった。以上

の結果から、本種の種苗生産では、この高濃度 EPA 強化餌料の脂肪酸組成を反映するようなアルテミアの栄養強化が有効であると結論付けた。

## 今後の課題と展開

イセエビにおける親エビの養成技術開発では、雌雄の体サイズが繁殖生態に与える影響について明らかにし、小型雄（甲長 60 mm 以下）は繁殖に不利であること、および大型の個体と比較して繁殖能力が劣ると考えられた。本研究で実施した繁殖生態の調査における設置では、雌雄 1 尾ずつのペアあるいは雄 1 尾に対して雌 10 尾としたため、繁殖環境において雄は単独であった。実際の飼育現場においては、使用できる施設は限られていることが多いことから、効率的に安定して大量のふ化幼生を得るためには、雌雄の集団での飼育管理方法の開発を検討する必要がある。現在のところ、飼育現場においては、繁殖期前に漁獲された雌雄を、基本的に雄 1 : 雌 2 の割合で水槽に同居させて飼育管理する方法が用いられている。他のイセエビ類では、水槽で雌雄を集団飼育した場合、同性および雌雄間の争いが発生しており、大型の雄が有意に繁殖に成功している事例が報告されている (MacDiarmid, 1989; Kittaka & MacDiarmid, 1994; MacDiarmid & Butler, 1999; Vijayakumaran *et al.*, 2005; Magallón-Gayón *et al.*, 2011)。しかし、イセエビの集団飼育下での配偶行動については不明であり、例えば水槽内の大型の雄 1 尾しか繁殖に関与していない等の、体サイズに由来する影響が発生している可能性がある。したがって、今後は、限られた施設で効率的にふ化幼生を得るために、集団飼育下における適正な性比や体サイズ組成を明らかにする必要がある。そのためには集団飼育下において雌雄の配偶行動や繁殖成功について調査する必要がある。

イセエビにおける種苗生産技術開発においては、フィロソーマ幼生におけるふ化から変態直前までの成長に伴う走光性の変化を調べた結果、幼生の走光性

は異なる光量および波長に対して、また成長に伴って変化することを明らかにした。イセエビの幼生飼育では、フィロゾーマ幼生が沈降して水槽底面へ沈降・蟻集し、その結果、個体干渉による体部位の損傷や細菌性疾病が発生して生残率が低下する問題が発生している (Murakami *et al.*, 2007, 村上, 2011)。この沈降・蟻集現象を防ぐことは、幼生飼育技術の向上に向けた重要な課題となっており、本研究で明らかにした走光性を利用することによって、飼育水槽内の幼生の行動を制御し、浮遊・分散させて個体干渉を防ぎ、生残率を向上させる可能性があると考えられた。具体的な方法として、例えば水槽の上側から強い光や短波長を、下側からは長波長の光を照射することによって、幼生を浮遊させることが可能かもしれない。また、今後は、実際の飼育試験で光量と波長がフィロゾーマ幼生の生残と発育に及ぼす影響等について検討する必要がある。一方で、本研究で明らかになったフィロゾーマ幼生の走光性の変化の展開としては、いまだ完全に解明されていない天然海域におけるフィロゾーマ幼生の初期生活史への研究、すなわち日周鉛直運動や輸送メカニズム (吉村ら, 2010; Miyake *et al.*, 2015) の解明等に向けて、重要な知見として提供・貢献できる可能性がある。

ケガニにおける種苗生産技術開発では、種苗生産技術開発のための基礎的な知見として、幼生の飼育環境条件であるアルテミア給餌密度、水温、塩分、アルテミアの栄養強化について、それぞれ適正な条件を明らかにした。一般に、カニ類の大型水槽を用いた種苗生産過程においては、しばしば残餌等による飼育環境の悪化が由来と考えられる大量死亡が発生しており、安定生産への妨げとなっている (浜崎ら, 2006; 浜崎, 2015)。対して、小型容器を用いた飼育では、毎日幼生を移し替えて新鮮な海水と餌料を与え、清浄な飼育環境を維持し、稚ガニまで比較的高い生残率得ることが可能であることから (浜崎, 2001, 2015; Hamasaki, 2003; 小金ら, 2009)、カニ類の幼生飼育試験において、詳細な条件

設定を必要とする場合には非常に有効な方法であると言える。本研究においても、小型容器を用いた飼育試験を実施したが、ケガニ幼生においてもこの小型容器を用いた飼育方法は、今後のさらなる飼育方法の改良に有効であると考えられる。また、本研究で得られた適正な飼育環境条件は、すでに市川ら (2014a, 2014b) による種苗生産試験にて応用されつつあり、さらに今後は種苗生産技術開発へと応用し、ケガニの人工繁殖技術の確立に取り組んでいく必要がある。

以上のように、本研究では、水産上重要な大型甲殻類であるイセエビとケガニの人工繁殖技術、すなわち親養成および種苗生産技術の確立に向けて、基礎的で重要な知見を得ることができた。近年、1960年代から始まった種苗放流事業を主体とする栽培漁業は転換期を迎え、その事業としての必要性や特性を考慮した対象種の絞り込み等が議論されている (浜崎, 2015; 北田, 2016)。その中で、人工繁殖技術は種苗放流のみならず、養殖産業や天然生息域における生態の解明および希少種の保護増殖等に活用の幅を広げていくことが提案されている (浜崎, 2015; 市川, 2014; 北田, 2016)。水産重要種の資源増殖を進める上で、半世紀にわたり培われてきた人工繁殖技術の開発は、今後も必要不可欠であり、益々その重要性が増していくものと考えられる。本研究で得られた成果を礎として、希少種も含めた十脚甲殻類の人工繁殖技術に関する研究開発がさらに進展することが期待される。

## 文 献

浜崎活幸. 2001. 種苗生産からみた甲殻類幼生の栄養要求—ガザミ類について.

栽培漁業技術体系化事業, 基礎理論コーステキスト集 XIV—魚介類幼生の栄養要求と餌料の栄養強化, pp. 1–21. 日本栽培漁業協会, 東京.

Hamasaki, K. 2003. Effects of temperature on the egg incubation period, survival and

- developmental period of larvae of the mud crab *Scylla serrata* (Forskål) (Brachyura: Portunidae) reared in the laboratory. *Aquaculture*, **219**: 561–572.
- 浜崎活幸. 2015. 海産魚介類の種苗量産技術の開発と資源増殖への応用に関する研究. 日本水産学会誌, **81**: 393–396.
- 浜崎活幸, 小金隆之, 神保忠雄, 團 重樹. 2006. カニ類の種苗生産技術: 大量死亡とその防除. 日本水産学会誌, **72**: 263–266.
- 市川 卓. 2014. ケガニの人工繁殖に関する基礎的研究. 博士学位論文, 東京海洋大学, 東京.
- 市川 卓, 村上直人, 森岡泰三, 村上恵祐, 浜崎活幸. 2014a. ケガニ種苗生産における光環境が幼生の沈降と発育に及ぼす影響. 水産増殖, **62**: 65–73.
- 市川 卓, 那波洋子, 浜崎活幸, 村上恵祐. 2014b. 飼育したケガニ幼生の走光性, 鉛直分布, 体密度と外部形態の発育に伴う変化. 日本水産学会誌, **80**: 349–359.
- 北田修一. 2016. 種苗放流の効果と野生集団への影響. 日本水産学会誌, **82**: 241–250.
- Kittaka, J. & MacDiarmid, A.B. 1994. Breeding. In: *Spiny lobster management* (B.F. Phillips, J.S. Cobb & J. Kittaka, eds.), pp. 384–401. Blackwell, Oxford.
- 小金隆之, 團 重樹, 浜崎活幸. 2009. ズワイガニ幼生の生残と脱皮・成長に及ぼす n-3 高度不飽和脂肪酸の影響. 日本水産学会誌, **75**: 1004–1010.
- MacDiarmid, A.B. 1989. Size at onset of maturity and size-dependent reproductive output of female and male spiny lobsters *Jasus edwardsii* (Hutton) (Decapoda, Palinuridae) in northern New Zealand. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **127**: 229–243.
- MacDiarmid, A.B. & Butler, M.J. IV. 1999. Sperm economy and limitation in spiny lobsters. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **46**: 14–24.

- Magallón-Gayón, E., Briones-Fourzán, P. & Lozano-Álvarez, E. 2011. Does size always matter? Mate choice and sperm allocation in *Panulirus guttatus*, a highly sedentary, habitat-specialist spiny lobster. *Behaviour*, **148**: 1333–1358.
- Miyake, Y., Kimura, S., Itoh, S., Chow, S., Murakami, K., Katayama, S., Takeshige, A. & Nakata, H. 2015. Roles of vertical behavior in the open-ocean migration of teleplanic larvae: a modeling approach to the larval transport of Japanese spiny lobster. *Marine Ecology Progress Serie*, **539**: 93–109.
- 村上恵祐. 2011. イセエビの成長特性と飼育技術の向上に関する研究. 博士学位論文, 東京海洋大学, 東京.
- Murakami, K., Jinbo, T. & Hamasaki, K. 2007. Aspects of the technology of phyllosoma rearing and metamorphosis from phyllosoma to puerulus in the Japanese spiny lobster reared in the laboratory. *Bulletin of Fisheries Research Agency*, **20**: 59–67.
- 吉村 拓, 森永健司, 西内 耕, 伊藤 篤, 増田佳子. 2010. 天然フィロゾーマの発育過程及び生息環境条件の解明. 農林水産省農林水産技術会議事務局プロジェクト研究成果シリーズ 480「ウナギ及びイセエビの種苗生産技術の開発」, pp. 47–55. 農林水産省農林水産技術会議事務局, 東京.
- Vijayakumaran, M., Senthil Murugan, T., Remany, M. C., Mary Leema, T., Dilip Kumar, J., Santhankumar, J., Venkatesan, R. & Ravindran, M. 2005. Captive breeding of the spiny lobster, *Panulirus homarus*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **39**: 325–334.

## 謝 辞

本論文は、著者が旧社団法人日本栽培漁業協会厚岸事業場（現国立研究開発法人水産研究・教育機構・北海道区水産研究所厚岸庁舎）および旧独立行政法人水産総合研究センター南伊豆栽培漁業センター（現国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所南伊豆庁舎）にて実施した研究の成果を纏めたものです。その研究を進めるにあたり、また本論文を纏めるにあたり、その機会を与えて頂いた指導教官である東京海洋大学の浜崎活幸教授には、終始親切丁寧なご指導とご校閲を賜りました。ここに深謝の意を表します。また、副査として、東京海洋大学のストルスマン・カルロス・アウグスト教授、須之部友基教授、横田賢史准教授には有益なご助言を賜ったことに深謝します。

ケガニの研究を実施した厚岸事業場（当時）では、飼育実験の基礎から日常業務においてもご指導を賜りました芦立昌一氏、福永恭平氏および中屋光祐博士をはじめとする当時の職員および契約職員の方々、また、水産総合研究センター栽培漁業センターの甲殻類種苗生産技術開発チームの方々、および当時北海道大学の博士課程学生であった佐藤 琢博士には多大なるご協力とご配慮を賜りました。また、抱卵雌ガニの確保には、当時の釧路市漁業協同組合の職員の方々と第38長栄丸・中本政光氏、そして当時の長万部漁業協同組合の職員の方々には、多大なるご尽力を頂きました。ここに深謝の意を表します。

イセエビの研究を実施した南伊豆栽培漁業センター（当時）では、フィロソーマ幼生という飼育さえ困難な研究対象に対して、飼育実験の基礎から日常業務においても親身になってご指導とご配慮を賜りました村上恵祐博士、そして栄 健次氏ならびに加治俊二氏をはじめとする当時の職員および契約職員の方々、当時東京海洋大学の学生だった田村大輔氏、水本 泰氏、川島功資氏、下川あゆみ氏、那波洋子氏、杉山 輝氏ならびに宍戸雄亮氏には多大なるご協

力とご配慮を賜りました。親エビの確保には、当時の伊豆漁業協同組合南伊豆支所の職員の方々および民宿八千代のイセエビ漁師平山敏郎氏には、多大なるご尽力を頂きました。ここに深謝の意を表します。また、本研究の一部は、農林水産技術会議からの委託事業「ウナギおよびイセエビの種苗生産技術の開発」を受けて実施させて頂きました。ここに記して感謝の意を表します。

また、志布志庁舎において本論文を纏めるにあたり、業務上多方面でご配慮を頂いた日向野純也業務推進部長、薄 浩則特任部長、山野恵祐ウナギ量産研究センター長、田中秀樹量産基盤グループ長ならびに同グループの職員の方々、博士後期課程を進めるにあたり、有益な助言などを頂いた市川 卓博士、團 重樹博士、山本岳男博士ならびに橋本 博博士をはじめとする増殖生態学研究室関係者の方々、そして文献整理等のご協力を頂いた桐原久子氏をはじめとする志布志庁舎の職員および契約職員の方々には、多大なるご協力とご配慮を賜りました。ここに深謝の意を表します。

最後に、在学中は社会人と学生の二足の草鞋になりましたが、叱咤激励してくれた家族に心から感謝します。