

海産ツボワムシ類2種の性フェロモン性状

小谷 知也¹⁾, 萩原 篤志²⁾Mate recognition pheromone of the marine rotifer *Brachionus plicatilis* and *B. rotundiformis*Tomonari KOTANI¹⁾, Atsushi HAGIWARA²⁾

Mating behavior of male marine rotifer *Brachionus* is regulated by a female's mate recognition pheromone (MRP). It has already been clarified by the experiment using MRP of *B. plicatilis* that differences of MRP molecular structure among rotifer species and strains cause reproductive isolation. In this study, we tried isolating the MRP of *B. rotundiformis* and *B. plicatilis*, and compared the reactivity of both MRP to male's receptor.

Using two kinds of lectin, MRPs of *B. rotundiformis* Koshiki strain and *B. plicatilis* Russian strain were isolated. Molecular weights of two-isolated MRP were determined with SDS-PAGE. To investigate the reactivity of MRP to male's receptor, four *B. rotundiformis* strains (Koshiki, Hamana, Thai, and Fiji) and three *B. plicatilis* strains were used.

Molecular weight of both MRPs was 26 kDa. Russian MRP bound intensely with *B. plicatilis* male's receptor but not with *B. rotundiformis*. The reactivity of Koshiki MRP to control (Koshiki strain) was the same as to other six strains. Therefore, it is suggested that molecular structure of *B. plicatilis* MRP is different from that of *B. rotundiformis* although their molecular weights are the same.

Key Words: *Brachionus plicatilis*, *B. rotundiformis*, mate recognition pheromone, molecular weight, male receptor, molecular structure

種苗生産で初期餌料として使われる海産ツボワムシ類（以下ワムシ）は、性フェロモンを介して交尾を行う。¹⁾ 動物世界では化学物質による情報伝達は、最も古い伝達方法であり、²⁾ 特に、動物プランクトンは化学物質に敏感で、化学物質に基づいて食料、同種の個体、共生者、捕食者などを認識するような機能をj得ている。³⁾ そのうち、同種個体、特に雌雄の化学物質（性フェロモン）を仲介した情報伝達は交尾による再生産に関係し、ワムシ性フェロモンの分子構造が種あるいは株間の生殖隔離の進行や種、株間の境界を定めるのに重要な役割を果たしている。⁴⁾

ワムシの性フェロモンは分子量が29kDaの糖タンパク質であり^{5,6)}、Rico-Martínez & Snell^{7,8)}は大型種の*B. plicatilis* ロシア株 (RUS) から分離した性フェロモン並びにその抗体を使って、地理的に異なる株の性フェロモン分子構造が異なることを明らかにした。しかし、Rico-Martínez & Snell^{7,8)}が用いた性フェロモンは*B. plicatilis* ロシア株に由来するもののみであり、小型種の*B. rotundiformis*の性フェロモンを使った研究の例は未だない。したがって本研究では、Snell et al.⁶⁾の方法に基づき、*B. rotundiformis* 性フェロモンの分離を試みた。ま

た、Rico-Martínez & Snell⁷⁾に基づいて、*B. plicatilis*と*B. rotundiformis*の複数株の雄リセプターに対して、分離した性フェロモンが示す反応度を調べることによって、ワムシ種間、株間の性フェロモン分子構造の違いについて検討を行った。同時に*B. plicatilis*の性フェロモンを使って同様のアッセイを行い、*B. rotundiformis*の結果と比較しながら、両種の性フェロモン分子構造の違いについて検討した。

材料と方法

材料 性フェロモンの抽出には、*B. rotundiformis*の甌島貝池産株（鹿児島県甌島より採取、以下甌島株）と、*B. plicatilis*のロシア産株（以下ロシア株、米国ジョージア工科大Terry W. Snell博士より譲渡された休眠卵を孵化）を用い、それぞれ30lポリカーボネート水槽で培養し、ワムシが約1000個体/mlに達したら、培養を終了し、底のゴミを取らないように注意しながら、メッシュサイズが45 μmのプランクトンネットで飼育海水を濾過し、ワムシのみをそれぞれ20g（湿重量）以上収穫した。ワムシ性フェロモンの反応度実験

1) 〒852-8131 長崎市文教町1-14 長崎大学大学院 海洋生産科学研究科

2) 〒852-8521 長崎市文教町1-14 長崎大学水産学部

には *B. rotundiformis* 甌島株, *B. plicatilis* ロシア株以外に, *B. rotundiformis* の浜名湖産株 (静岡県浜名湖より採取, 以下浜名湖株), タイ産株 (タイ国立沿岸養殖研究所近辺の汽水池で採取, 以下タイ株), フィジー産株 (以下フィジー株) と, *B. plicatilis* のドイツ産株 (以下ドイツ株, Schlei-Fjord 由来), 東京大学株 (三重県養鰻池より採取, 以下東京株) との計 8 株を用いた。

ワムシ性フェロモンの分離 性フェロモンの抽出は Snell et al.⁶⁾ の方法に基づいて行った。

予め凍結させておいた約 20g (湿重量) の *B. plicatilis* ロシア株と *B. rotundiformis* 甌島株のそれぞれに対し 7 ml の 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0, 200mM NaCl, 2mM CaCl₂, 0.001% Triton X-100 を含む), 及び 70 μ l の 100mM Phenylmethylsulfonyl fluoride エタノール溶液 (以下 PMSF 溶液) と 70 μ l のプロテアーゼ阻害剤混合液 (3.75mM Pepstatin, 3.75mM Leupeptin, 18.22mM EDTA) を加え, 50ml 容組織破砕機でホモジナイズした。ホモジナイズした試料液を 10,000rpm で 10 分間遠心分離した後, 上澄みを回収し, もう一度, 10,000rpm で 10 分間遠心分離した。上澄みを回収し, 上澄みを 100,000MW cut off membrane (YM100, Amicon 社) で濾過することによって, 100,000MW 以下の分子を回収した。約 20ml の試料液に上記の 100mM PMSF 溶液とプロテアーゼ阻害剤混合液を 20 μ l ずつ加え, さらにこの試料液を 6 ml の *Lens culinaris* lectin 結合アガロースビーズ溶液 (mannose/glucose 誘因, Liener et al., 1986; Sigma) の入った蓋付き試験管に加え, 一晩攪拌した。攪拌後, 試験管を水中に約 30 分間安置してビーズを沈殿させた。上澄みを取り除き, そこに 200 μ l の 100mM PMSF 溶液とプロテアーゼ阻害剤混合液を加えた 20ml の 25mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4, 52mM sodium dodecyl sulfate, 500mM methyl- α -D-mannopyranoside を含む) を加え, 30 分間攪拌した。攪拌終了後, 試験管を安置してビーズを沈殿させた。上澄みを回収し, 上澄みを 10,000MW cut off membrane (YM10, Amicon 社) で濾過した。膜上に残っている 10,000MW 以上のタンパク分子を 20 μ l の PMSF 溶液とプロテアーゼ阻害剤混合液を加えた前述の 20mM Tris-HCl 緩衝液 2 ml で洗って回収した。回収したタンパク溶液を 2 ml の *Tetragonolobus purpureas* lectin 結合アガロースビーズ溶液 (fucose 誘因; Sigma 社) の入った試験管に加え, 一晩攪拌した。攪拌後, 試験管を水中に約 30 分間安置してビーズを沈殿させた。沈殿後, 上澄みを取り除き, そこに 100 μ l の 100mM PMSF 溶液とプロテアーゼ阻害剤混合液を加えた 20ml の 25mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8, 52mM sodium dodecyl sulfate, 20mM α -D-fucose を含む) を加え, さらに 30 分間攪拌した。攪拌終了後, 試験管を静置してビーズを沈殿させた。上澄みを回収し, 上澄みを 10,000MW cut off membrane で濾過した。膜上に残っている 10,000MW 以上のタンパク分子を 1 ml の蒸留水で回収した。*B. plicatilis*, *B. rotundiformis* それぞれのタンパク抽出量を分光光度計で測定した。また, 一部は SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行い, 抽出物の純度と分子量を調べた。残りは -80°C で凍結保存し, その後の実験

に備えた。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 試料液 10 μ l に 10 μ l の試料調整液 (0.5M Tris-HCl, 2% Sodium dodecyl sulfate, 10% Glycerol, 5% (β -Mercaptoethanol) を加え, これを 100°C で 5 分間熱処理した。試料液 20 μ l と分子量マーカー (Sigma) をゲルに添加し, 電気泳動を行った。使用したアクリルアミドの濃度は 12.5% である。また, 泳動緩衝液として Tris-Glycine buffer (0.2M Glycine, 25mM Sodium dodecyl sulfate) を用いた。ゲル 1 枚当たり 20mA の定電流で泳動を行った。泳動終了後, ゲルを染色液 (3mM Coomassie brilliant blue R-250, 50% Methanol, 10% Acetic acid) に移し, 振盪しながら約 1 時間染色した。その後, 脱色液 (5% Methanol, 10% Acetic acid) で十分な脱色を行った。ゲルに現れたバンドを確認した後, 分子量マーカーを基に分子量の推定を行った。

雄性フェロモンリセプターに対する性フェロモン反応度 このアッセイでは各株雄のリセプターに対する *B. plicatilis* ロシア株及び *B. rotundiformis* 甌島株の性フェロモンの反応度を調べた。方法は Rico-Martínez & Snell⁷⁾ に基づいた。

分離した性フェロモンの *B. plicatilis* ロシア株については 20 μ g を, *B. rotundiformis* 甌島株については 35 μ g を, それぞれ 86 μ l の HMNK 緩衝液 (50mM HEPES, 36mM NaCl, 1mM HCl, 0.1mM MgSO₄, pH 7.4) に溶解し, これに 1mg のビオチン (Succinimidyl 6-(biotinamido) hexanoate (biotinamidocaproate, N-hydroxy succinimidylester, Molecular Probes 社) を溶解した DMSO 1ml を HMNK 緩衝液で 100 倍希釈したもの 14 μ l を加え, 150rpm で 90 分間攪拌して性フェロモンにビオチンを結合させた。結合していないビオチンを取り除くために, これを 10,000MW cut off filter (ウルトラフリー-C, Millipore 社) を用いて, 14,000rpm で 60 分間遠心濾過した。遠心後, フィルターに残っているペースト状のビオチン化された性フェロモンを 100 μ l の HMNK 緩衝液で回収した。これを性フェロモン-ビオチン溶液と呼ぶことにする。

次に, 各ワムシ株の培養槽から雄卵を持った雌ワムシを集め, *N. oculata* (7 \times 10⁶ 細胞/ml) を懸濁した HMNK 緩衝液 500 μ l に収容し, 順致した。4 ~ 6 時間後, 30 μ l の性フェロモン-ビオチンと 50 μ l HMNK 緩衝液との混合液中に, 新生の雄ワムシ 20 個体を入れ, 30 分間培養し, 主として繊毛部に分布する性フェロモンリセプターと反応を起こさせた。30 分後, HMNK 緩衝液で雄ワムシを二度洗浄し, 性フェロモン-ビオチン溶液を除去した。このワムシを蛍光ビーズで標識したアビジン (Avidin-labelled, 1 μ m fluorescein-containing latex beads Fluospheres, Molecular Probes 社) 2 \times 10⁹ 個を含んだ HMNK 緩衝液 550 μ l に入れ 30 分間培養し, 性フェロモンに結合しているビオチンにアビジンをさらに結合させた後, HMNK 緩衝液で雄ワムシを二度洗って結合していないアビジンを除去した。以上の処理を行った雄ワムシをスライドガラス上に移し, B 励起フィルター (約 490 nm) を用いて蛍光顕微鏡 (BH2-RFL, オリンパス社製, 100 倍) で観察した。この顕微鏡像をテレビカメラ (FCD-725,

オリンパス社) でコンピューター (Quadra 650, Apple社) に取り込み, NIH Image (ver 1.57) で蛍光量を測定した。絨毛部の蛍光量から背景の微量な蛍光量を差し引いたものを求め, 反応の指標とした。各株の測定値を一元配置分散分析と Fisher's LSD多重比較によって検定した。

結 果

ワムシ性フェロモンの分離 分離した *B. plicatilis* ロシア株並びに *B. rotundiformis* 甌島株の性フェロモンを使って, ポリアクリルアミド電気泳動を行ったところ, それぞれバンドを1つだけ得ることが出来た (Fig. 1)。また, 同時に用いた, 分子量マーカー (Sigma社) のバンドの泳動距離に基づいて, それぞれの分子量を調べたところ, *B. plicatilis* ロシア株および *B. rotundiformis* 甌島株の分子量は共に26kDaであった。また, 分光光度計でそれぞれの量を調べたところ, *B. plicatilis* ロシア株からは1175.9 μ g, *B. rotundiformis* 甌島株からは312.3 μ g, 抽出できたことが分かった。

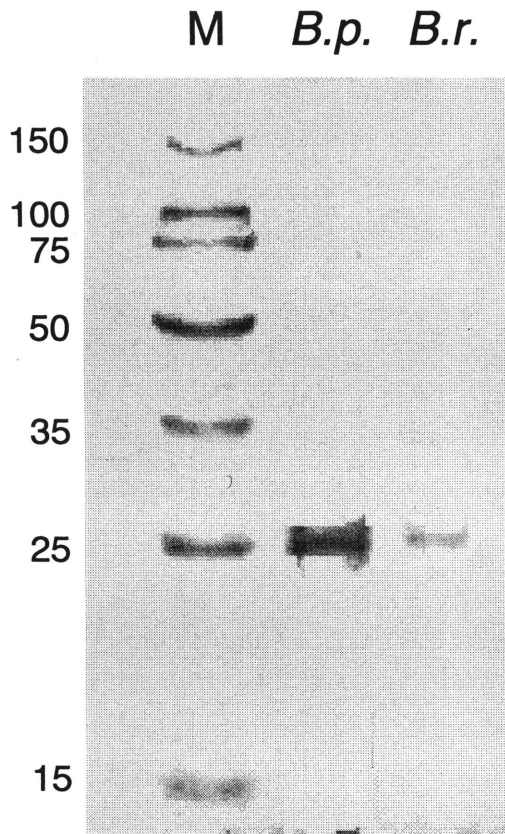


Fig. 1 Characterization of lectin-affinity purified glycoproteins from rotifers, *Brachionus plicatilis* Russian strain and *B. rotundiformis* Koshiki strain. Lanes: M. molecular weight standards; B.p. *B. plicatilis* Russian strain; B.r. *B. rotundiformis* Koshiki strain. Numbers on left side are molecular weight standards (kDa). SDS-PAGE gel was stained with Coomassie brilliant blue.

性フェロモンリセプターに対する性フェロモン反応度 Fig. 2に *B. plicatilis* ロシア株の性フェロモンを使った時, また Fig. 3に *B. rotundiformis* 甌島株の性フェロモンを使った時の各株の蛍光量の平均値とその母集団標準偏差を表した。また, Table 1と2には *B. plicatilis* ロシア株性フェロモン, *B. rotundiformis* 甌島株性フェロモンをそれぞれ用いた場合の一元配置分散分析の結果を示した。

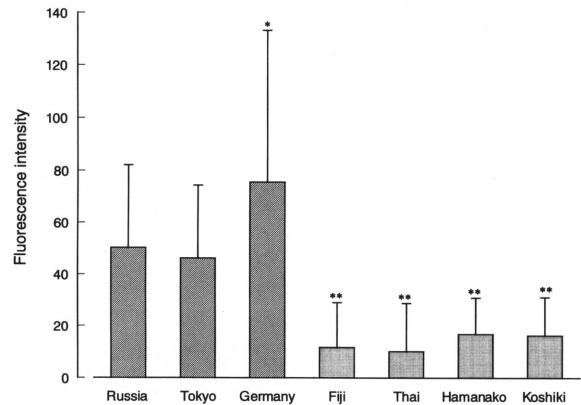


Fig. 2 Mate recognition pheromone (MRP) of *Brachionus plicatilis* Russian strain, binding to males of different strains. Diagonal bars represent coronal fluorescence in *B. plicatilis* strains. For *B. rotundiformis* strains, stipple bars indicate. Variation is represented by vertical bars indicating one standard deviation ($n=20$) for fluorescence at corona. Asterisks indicate MRP binding significantly less than Russian control (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$).

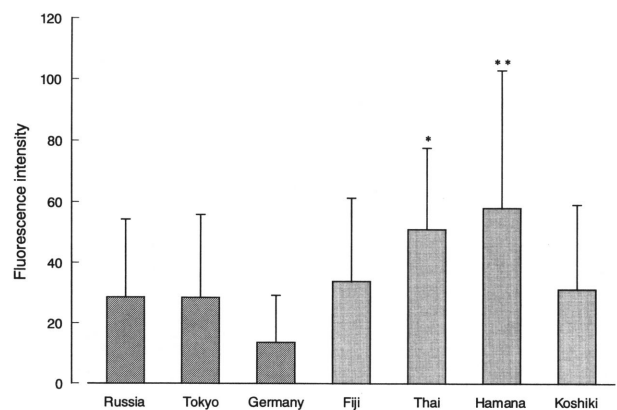


Fig. 3 Mate recognition pheromone (MRP) of *Brachionus rotundiformis* Koshiki strain, binding to males of different strains. Diagonal bars represent coronal fluorescence in *B. plicatilis* strains. For *B. rotundiformis* strains, stipple bars indicate. Variation is represented by vertical bars indicating one standard deviation ($n=20$) for fluorescence at corona. Asterisks indicate MRP binding significantly less than Koshiki control (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$).

Table 1. One-way ANOVA of the effect of rotifer strains on coronal binding of mate recognition pheromone of *Brachionus plicatilis* Russian strain.

Source	Degree of Freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	p value
Between groups	6	74302.1	12383.7	13.5	< 0.001
Within groups	132	120771.4	914.9		

Table 2. One-way ANOVA of the effect of rotifer strains on coronal binding of mate recognition pheromone of *Brachionus rotundiformis* Koshiki strain.

Source	Degree of Freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	p value
Between groups	6	25939.4	4323.2	4.9	< 0.001
Within groups	130	115265.5	886.7		

B. plicatilis ロシア株性フェロモンを使った場合、各株の雄リセプター上の蛍光量の間には有意差があることが分かった (Table 1)。この時、*B. plicatilis* ドイツ株の蛍光量が最も大きく (75.5 ± 57.7 , $n=20$)、ロシア株 (対照) と東京株の蛍光量には有意差が検出されなかった (各々 50.3 ± 31.8 , $n=20$; 46.2 ± 28.2 , $n=20$)。一方、*B. rotundiformis* に属する株 (浜名湖, 甌島, フィジー, タイ) の蛍光量はロシア株の値より少なかった (各々 16.7 ± 14.2 , $n=20$; 16.2 ± 14.8 , $n=20$; 11.6 ± 17.4 , $n=20$; 10.0 ± 18.7 , $n=20$, 各々 $p < 0.01$, Fisher's LSD 検定)。*B. rotundiformis* 株間では蛍光量に有意差がなかった。

B. rotundiformis 甌島株の性フェロモンを用いたアッセイでは、各株間の蛍光量に有意差がみられた (一元配置分散分析, Table 2)。甌島株の蛍光量は、浜名湖株とタイ株より低く (各々 31.3 ± 27.9 , $n=20$; 58.1 ± 44.9 , $n=20$; 51.0 ± 26.6 , $n=20$, $p < 0.05$, Fisher's LSD 検定), 同種のフィジー株や *B. plicatilis* ロシア, 東京, ドイツ株の蛍光量とは有意差がなかった (各々 33.9 ± 27.5 , $n=20$; 28.6 ± 25.7 , $n=20$; 28.5 ± 27.4 , $n=20$; 13.6 ± 15.7 , $n=20$)。

考 察

ワムシの交尾行動のきっかけとなる性フェロモンは、糖タ

ンパク質であることが既に明らかにされている。⁵⁾ 本研究では、Snell *et al.*⁵⁾ の方法に基づいて *B. plicatilis* ロシア株と *B. rotundiformis* 甌島株の持つ糖タンパクを分離し、これを性フェロモンとして用いた。本研究で使用した *B. plicatilis* ロシア株は、Snell *et al.*⁵⁾ の報告で用いた株と同じものである。*B. rotundiformis* 甌島株については Kotani *et al.* (未発表) が同じく *B. rotundiformis* 甌島株から Snell *et al.*⁵⁾ の方法に基づいて糖タンパクを分離し、それに対する抗体 (ポリクローナル) を作製している。Kotani *et al.* (未発表) は、この抗体を甌島株の雌に反応させ、それに対して雄 (甌島株) を組み合わせた場合、抗体を反応させていない雌に比べて有意に交尾頻度が有意に下がることを明らかにしている。以上の点から、今回 *B. rotundiformis* 甌島株から分離した糖タンパクはワムシ性フェロモンであると判断してよいと考える。

ワムシの種間、株間の生殖隔離機構を解明するには、雌の持つ性フェロモンの化学構造や雄のリセプターとの結合様式を明らかにすることが重要である。⁶⁾ 本研究では、Rico-Martínez & Snell⁷⁾ の方法に基づき、性フェロモンを用いたアッセイを採用した。雄リセプターに対する性フェロモン反応度を求める実験では、*B. plicatilis* ロシア株性フェロモンの各株雄に対する反応度は、*B. rotundiformis* に属する株群に比べて高い値を示したものの、*B. plicatilis* の中では東

京株とは差がなく、ドイツ株ではむしろロシア株より高い反応度を示した。一方、*B. rotundiformis* 甌島株性フェロモンの各株雄に対する反応度は浜名湖株とタイ株で反応度が高かった以外は、その他の株の間で差がなかった。以上のことから、*B. plicatilis* ロシア株の性フェロモンは *B. rotundiformis* の雄性フェロモンリセプターには反応しにくく、*B. rotundiformis* 甌島株の性フェロモンは、*B. plicatilis* を含め、どの株の雄リセプターに対しても一定水準以上の割合で反応するものと思われる。

B. plicatilis と *B. rotundiformis* の間では、交尾行動の傾向が異なり、*B. plicatilis* の雄は自株の雌に対して特に高い頻度で交尾を起こすのに対して、*B. rotundiformis* の雄は種や株に関わらず、どの株に対しても同様の頻度で交尾を起こす。⁹⁻¹¹ 本研究の結果から、*B. plicatilis* の性フェロモンリセプターは *B. plicatilis* の性フェロモンと特異的に反応しているといえるのに対し (Fig. 2), *B. rotundiformis* のリセプターは種や株の違いに対する特異性は小さいと判断できる (Fig. 3)。それぞれの種内でも、自株より高い反応度を示す株が存在したが、ロシア株の雌に対して各株の雄が特に高い

頻度で交尾を起こしているというわけではなく⁹、その傾向は甌島株の雌についても同様であった (Kotani *et al.*, 未発表)。したがって、各種内の交尾行動頻度の違いは雄リセプター-或いはその感受性よりも性フェロモン分子構造の方に原因があるのではないかと考えられる。

前述のように、*B. plicatilis* の雄は自株の雌に対し特に高い頻度で交尾を行い、*B. rotundiformis* の雌にはほとんど交尾を起こさないのに対し *B. rotundiformis* の雄はどの株に対しても、*B. plicatilis* の雌にでさえも交尾行動を起こす。⁹⁻¹¹ このように一方向からのみ交尾が起こる現象は、ウニ類の *Strongylocentrotus purpuratus* と *S. franciscanus* の間でも観察されている。¹² つまり、*S. purpuratus* 精子の先体タンパク (bindin) は同種の卵としか結合しないが、*S. franciscanus* の先体タンパクは *S. purpuratus*, *S. franciscanus* のどちらの卵とも結合するというものである。¹² Hofmann & Glabe¹² はこの現象について、*S. purpuratus* と *S. franciscanus* における精子先体タンパクと卵膜上にあるリセプターとの結合様式の違いに関する仮説を立て、そのモデルを構築した。そのモデルを、ワムシの場合に適用したモデル図を Fig. 4 に示した。

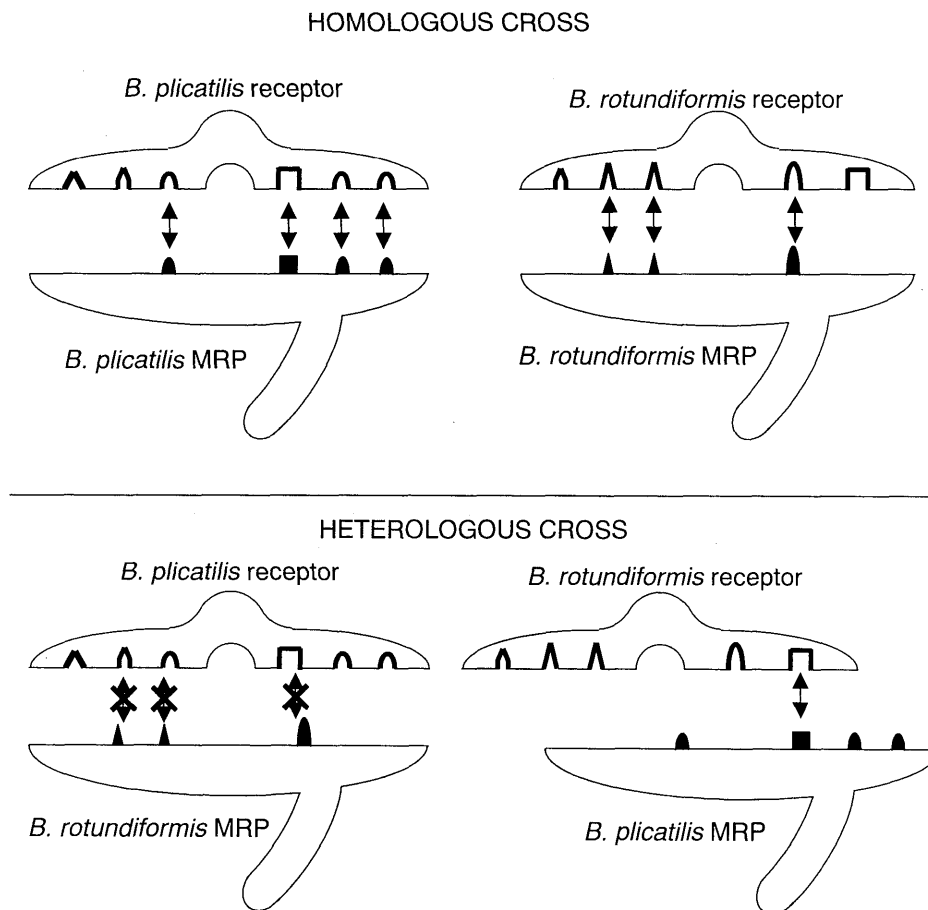


Fig. 4 Hypothetical model for interaction of mate recognition pheromone (MRP) with its receptor in the case of *B. plicatilis* and *B. rotundiformis*, based on Hofmann & Glabe (1994). Repeated elements are postulated to function as independent ligands within the receptor which interact with complementary specific sites on the MRP. *B. plicatilis* receptor can only recognize and bind to its own MRP, while *B. rotundiformis* receptor can bind to both its own MRP as well as that of *B. plicatilis*, due to its dual specificity in some of its repeated elements.

これは、性フェロモンとリセプターの関係、鍵と鍵型に例えるなら、*B. plicatilis* リセプターの鍵型は性フェロモンの山に対して種特異性を持つものばかりであるのに対し、*B. rotundiformis* リセプターの鍵型には*B. plicatilis*の鍵に対応する鍵型が存在し、そのために*B. rotundiformis*の雌は*B. plicatilis*の雌に対しても交尾を示すことが出来るというものである。

湿重量20gから分離できた性フェロモンの量が*B. plicatilis*ロシア株では*B. rotundiformis*甌島株の3.77倍だったことから、ワムシ1個体の性フェロモン分布密度は*B. plicatilis*より*B. rotundiformis*のほうが低いと推測できる。これと同様にリセプターの分布密度も、*B. plicatilis*のそれに比べて低いなら、*B. rotundiformis*の交尾頻度は低調になっても不自然ではない。すなわち、性フェロモンおよびそのリセプターの分布密度が*B. rotundiformis*では*B. plicatilis*より低いために、*B. rotundiformis*の交尾頻度が低調になる可能性がある。

一方、性フェロモンに関わる遺伝子座の遺伝子型がヘテロである可能性についても考えられる。性フェロモン遺伝子座がホモであれば、表現型として現れるタンパク質の分子構造は単一のものとなるが、ヘテロの場合は表現型が単一のものとはならず、そのため*B. rotundiformis*のような自株と他株の雌に対する交尾頻度が同程度のものになってしまう⁹⁻¹¹⁾、あるいは*B. plicatilis*ドイツ株のような、自株よりも他株の雌に対する交尾頻度が高くなるといった現象が起きるのではないかと考えられる。¹¹⁾ 今後は、cDNAを利用しての分子構造の解明や、ワムシ遺伝子の染色体地図の作製、また、さらなる性フェロモン抽出によるワムシ性フェロモン分布密度の推測などを行うことにより、ワムシの交尾行動に関する疑問を解明していくことが重要であろう。

謝 辞

ワムシ性フェロモン抽出の詳細を御指導いただいた米国ジョージア州立ジョージア工科大学生物学部 Terry W. Snell 教授に厚く御礼申し上げます。本研究の一部は、文部省科学研究費補助金「基礎研究 (C) (2)」(課題番号10660187)、および農林水産省受託研究 (ED-99-II-3-3) によって実施した。

参考文献

- 1) J. J. Gilbert: Contact chemoreception, mating behaviour, and sexual isolation in the rotifer genus *Brachionus*. *J. Exp. Biol.*, **40**, 625-641 (1963).
- 2) J. W. Bradbury & S. L. Vehrencamp: Principles of animal communication, Sinauer Associates, Inc., Canada, 1998, pp279-318.
- 3) P. Larsson & S. Dodson: Chemical communication in planktonic animals. *Arch. Hydrobiol.*, **129**, 129-155 (1993).
- 4) T. W. Snell: Systematics, reproductive isolation and species boundaries in monogonont rotifers. *Hydrobiol.*, **186/187**, 299-310 (1989).
- 5) T. W. Snell & M. A. Nacionales: Sex pheromone communication in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Comp. Biochem. Physiol.*, **97A**, 211-216 (1990).
- 6) T. W. Snell, R. Rico-Martinez, L. S. Kelly & T. E. Battle: Identification of a sex pheromone from a rotifer. *Mar. Biol.*, **123**, 347-353 (1995).
- 7) R. Rico-Martínez & T. W. Snell: Mating behavior and mate recognition pheromone blocking of male receptors in *Brachionus plicatilis* Muller (Rotifera) strains. *Hydrobiol.*, **313/314**, 105-110 (1995a).
- 8) R. Rico-Martínez & T. W. Snell: Comparative binding of an antibody to a mate recognition pheromone on female *Brachionus plicatilis* and *Brachionus rotundiformis*. *Hydrobiol.*, **358**, 71-76 (1997).
- 9) A. Hagiwara, T. Kotani, T. W. Snell, M. Assava-Aree & K. Hirayama: Morphology, genetics, and mating behavior of small tropical marine *Brachionus* strains (Rotifera). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **194**, 25-37 (1995).
- 10) R. Rico-Martínez & T. W. Snell: Male discrimination of female *Brachionus plicatilis* Müller and *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff (Rotifera). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **190**, 39-49 (1995b).
- 11) T. Kotani, A. Hagiwara & T. W. Snell: Genetic variation among marine *Brachionus* strains and function of mate recognition pheromone (MRP). *Hydrobiol.*, **358**, 105-112 (1997).
- 12) A. Hofmann & C. Glabe: Bindin, a multifunctional sperm ligand and the evolution of new species. *Developmental biology*, **5**, 233-242 (1994).