トゲスギミドリイシ *Acropora intermedia* とスギノキミドリイシ *A. muricata* における LED 波長の繁殖への影響

Effects of light-emitting diode wavelengths on reproduction in *Acropora intermedia* and *A. muricata*

伊野波佳介¹⁾・Ee Suan Tan²⁾・和泉遼太郎²⁾・武方宏樹³⁾・竹村明洋⁴⁾・磯村尚子^{1),*}

¹⁾ 沖縄工業高等専門学校生物資源工学科. 〒905–2192 沖縄県名護市字辺野古 905 番地

²⁾ 琉球大学大学院理工学研究科. 〒903–0213 沖縄県中頭郡西原町千原 1 番地

³⁾ 琉球大学戦略的研究プロジェクトセンター. 〒903–0213 沖縄県中頭郡西原町千原 1 番地

⁴⁾ 琉球大学理学部海洋自然科学科. 〒903–0213 沖縄県中頭郡西原町千原 1 番地

Keisuke INOHA¹⁾, Ee Suan TAN²⁾, Ryotaro IZUMI²⁾, Hiroki TAKEKATA³⁾,
Akihiro TAKEMURA⁴⁾ and Naoko ISOMURA^{1),*}

¹⁾ Department of Bioresources Engineering, National Institute of Technology, Okinawa College, 905 Henoko, Nago, Okinawa 905–2192, Japan

²⁾ Graduate School of Engineering and Science, University of the Ryukyus, 1 Senbaru, Nishihara, Okinawa 903–0213, Japan

³⁾ Center for Strategic Research Project, University of the Ryukyus, 1 Senbaru, Nishihara, Okinawa 903–0213, Japan

⁴⁾ Department of Chemistry, Biology and Marine Science, Faculty of Science, University of the Ryukyus, 1 Senbaru, Nishihara, Okinawa 903–0213, Japan

Abstract: Corals are known to synchronously undergo gonadal development during a period of 1 year and release gametes simultaneously during the spawning season. Synchronization of reproduction may be caused by changes in the external environment; particularly, the effects of light on reproduction have been extensively reported. In this study, we specifically focused on the type of wavelength, with the intention to elucidate whether there are wavelengths that promote reproduction in two *Acropora*. We exposed coral colonies to four types of light-emitting diode conditions with wavelengths suitable for keeping coral: “Coral,” “Reef,” “Fresh,” and “Sunset,” and monitored gamete maturation every 3 months, as well as the number of released gametes during the spawning season. In *A. intermedia*, “Sunset” conditions promoted gamete maturation; however, there was no spawning observed. In contrast, in *A. muricata*, the same conditions promoted a series of processes ranging from gamete maturation to gamete release. In “Fresh” and “Coral” conditions, gamete maturation was also promoted. “Sunset” condition is characterized by longer wavelengths within the red-light visible spectrum, which is relatively predominant in the shallow waters where the two target species live. Therefore, this indicates that these longer wavelengths represent a light stimulus that promotes reproduction. By contrast, gamete maturation was promoted by even shorter wavelengths in *A. muricata*; therefore, further experiments considering different light sensitivities among species and growth promotion through the photosynthesis of zooxanthellae are recommended. It is also suggested that, in addition to wavelength type, spawning may be affected by water temperature increase after winter season.

Key Words: *Acropora*, gamete maturation, light-emitting diode wavelength

はじめに

多くの海洋生物は、一年をかけて同調的に生殖腺を発達させて産卵期に同時に配偶子を放出する。この同調性産卵は、性成熟した個体の遭遇および受精機会を増やして受精効率をあげる (Harrison & Wallace 1990)。また、捕食者か

らの配偶子の捕食圧を減らすなどの生態学的利点があると考えられている (Domeier & Colin 1997)。造礁サンゴ類においても、産卵後一年をかけて配偶子を発達させ、夏季に一斉産卵することが報告されている (Babcock et al. 1986, Hayashibara et al. 1993)。造礁サンゴ類の繁殖活動の同期は日長や月齢、水温や潮汐などの外環境の変化が要因であると考えられているが (Kruup 1983, Szmant et al. 1985, Brady et al. 2009, Sakai et al. 2020)、これらの環境要因が単独もしくは複合的に影響し、サンゴの体内でどのように作用しているのかの生理機構はほとんど明らかにされていない。

Received 16 March 2021 Accepted 17 August 2021

* Corresponding author

E-mail: iso@okinawa-ct.ac.jp

一方、刺胞動物を含む海洋生物において、環境要因の中でも光が生殖細胞形成や成熟に影響することが報告されている。魚類では、光周期が生殖腺の発達開始や終了に影響することが報告されている (Bromage et al. 2001, Pankhurst & Porter 2003)。波長の影響についても、例えばブルイズメダイ *Chrysiptera cyanea* を赤 (ピーク波長: 627 nm)、緑 (ピーク波長: 530 nm)、青 (ピーク波長: 455 nm)、白 (広範囲の波長) の LED および自然光のもとで飼育したとき、赤色 LED は他の LED よりも明らかに卵発達を促進させることが報告されている (Bapary et al. 2011)。シリキリスズメダイ *Chrysiptera parasema* では、短波長帯である緑色光を低光量で照射した際に生殖巣の成熟が促進されることが知られている (Shin et al. 2013)。またワカメ *Undaria pinnatifida* では、青色 LED (440~490 nm) と白色 LED (440~720 nm) の飼育下では雌性配偶体がそれぞれ高い卵形成率を示したが、赤色 LED (610~660 nm) では卵形成がみられなかった一方で、赤色 LED 照射下で 2 カ月以上成熟を抑制させた雌性配偶体を青色 LED 照射下に移すと、1 週間後には卵形成が始まり成熟率も高い値を示した (村瀬ら 2018)。さらに刺胞動物では、ヒドロ虫綱において明暗の遷移によって卵母細胞の成熟が引き起こされること (Amiel et al. 2010)、鉢虫綱のエチゼンクラゲ *Nemopilema nomurai* において、減数分裂前期で停止した卵母細胞は光曝露に応答して成熟を開始し産卵すること (Ohtsu et al. 2007) が報告されている。

造礁サンゴ類が光を認識する器官や分子・生理機構については、現在も多くの議論がなされている。光の認識はサンゴと共生している褐虫藻の両方が関わっている可能性があり、濁りによる光量の変動が褐虫藻については密度、色素濃度および光合成量、一方サンゴについては脂質の組成と濃度および成長量を変動させることが報告されている (Jones et al. 2020)。Levy et al. (2007) は、ハイマツミドリイシ *Acropora millepora* の幼生の外胚葉に青色光受容体であるクリプトクロム 2 (*cry2*) が局在し、ハイマツミドリイシのポリプ内の *cry2* 発現量が月光によって変動することで、同調産卵の調節を行っていることを示した。また、カリブ海に生息するミドリイシ属サンゴの一種 *Acropora palmata* のプラヌラ幼生が着底基質の選択に赤色を好んだことから、*A. palmata* はロドプシン類を介した視覚認識機構を持つ可能性があると考えられている (Mason et al. 2011)。ハイマツミドリイシ *A. millepora* の幼生は適した深度の基盤に定着するために、緑色光と赤色光の比率をレシオメトリックに検出できる複雑な光検出メカニズムを持つ可能性がある (Strader et al. 2015)。さらに、夜間に人工光を継続して照射することで、ミドリイシ属サンゴの配偶子形成と同調産卵を乱すことが報告されている (Ayalon et al. 2020)。以上から、サンゴにおいても光の周期や強度だけではなく波長を認識することができ、特異的な波長が生殖へ影響する可能性がある。

本研究では、造礁サンゴであるミドリイシ属サンゴ *Acropora* において繁殖を促進する波長が存在するかを明らかにすることを目的とした。さんご礁海域の礁池内にごく普通に生息がみられるトゲスギミドリイシ *Acropora intermedia* およびスギノキミドリイシ *A. muricata* (西平・Veron 1995) を対象とし、異なる 4 つの LED 波長を照射した水槽内で 2018 年 10 月から 2019 年 6 月まで飼育した。各群体から定期的に枝片を採取し組織学的観察を行うことで、LED 波長の違いにより配偶子形成やその発達に差がみられるかを検証した。さらに、各 LED 照射群体間で産卵時に放出された配偶子 (卵と精子) の数を比較することで、LED の波長による放出配偶子数への影響を検証した。ミドリイシ属 *Acropora* は、世界で約 110 種が確認されている造礁サンゴの中でも最大のグループである (Wallace 1999)。その種数と群体数の多さからさんご礁生態系において生産者として重要な役割を担っているが、近年頻発する白化現象によりその数を大幅に減少させている (例えば中村 2017)。得られた結果は、飼育下で配偶子を効率よく採取する際にも応用できると考えられる。

材料と方法

飼育条件と対象種

本研究でのサンゴの飼育実験は、沖縄県浦添市の沖縄開発株式会社水産養殖研究センター (以降、水産養殖研究センター) 内にある屋内水槽と屋外水槽にて行った。屋外・屋内共に、角形で底部が平らな水槽を用いた。屋内水槽は容量: 16,000 L、換水率: 6 回転/日、屋外水槽は容量: 1,000 L、換水率: 8.6 回転/日であり、海水はどちらも浦添市牧港漁港海岸 (N: 26.27, E: 127.72)、水深 3~5 m から採水した表層海水を用いた。水温は未調節であり、水質については Table ES1 に示した。水深約 60 cm の水槽内に、塩ビパイプに 3 cm 目合いのトリカルネットを張ったケージ縦 80 cm、横 50 cm、高さ 40 cm を屋内水槽に 4 つ、屋外水槽に 1 つ設置し、屋内水槽では水面より 60 cm の高さから波長の異なる 4 種の LED を各ケージに照射した (Fig. ES1)。この時、異なる条件の光が入ることを防ぐため、ケージとケージの間は 60 cm の空間を取った。実験に用いた光源はサンゴ飼育用 LED (Grassy LeDio RX122, 株式会社ボルクスジャパン, 加古川) であり、以下の 4 種類である: Coral (420~480 nm の波長を含み、520 nm より長い波長はほとんど含まれない)、Reef (400~480 nm の波長を多く含む)、Fresh (昼間の太陽光を再現、400~620 nm の広域の波長を含む)、Sunset (夕方の太陽光を再現、400~430 nm、660 nm 付近の波長を多く含む)。コントロールは自然光が照射する屋外水槽 (以下、“Outdoor” とする) とした。水面での光量は、ライトの中心付近で 100~120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、明期 16 時間: 暗期 8 時間に設定した。屋外水槽の光量は、実験期間中 1 時間に 1 回の間隔で

測定されており、日照時のみの平均光量は $382 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (暗期は含まない) であった。

実験対象種は枝状のミドリイシ属サンゴ2種、トゲスギミドリイシ *Acropora intermedia* とスギノキミドリイシ *A. muricata* とした。2018年10月、沖縄県本部町瀬底島南端の海域 (N: 26.62, E: 127.86, 水深 1.5~3 m) にて、各種について長径 60 cm, 短径 40 cm, 高さ 50 cm 以上の大きさである3群体を探索した。条件に適したトゲスギミドリイシの3群体をA, B, C, スギノキミドリイシの3群体をそれぞれa, b, cとし、2018年10月11日~21日に一部を残して群体を採集後、琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設の屋外水槽に運搬して養生した。その後、2018年10月25日に水槽内で養生していた群体からそれぞれ長径 15 cm 以上の枝片を5つずつ作成後、水産養殖研究センターに運搬し各光条件のケージ上の網に立てて配置した。枝片間で照射する光量のばらつきを極力防ぐため、実験期間中は約1週間に1度、ケージ上にある枝片の配置を換えた。

配偶子形成過程の組織学的観察

水産養殖研究センター搬入時に、採集したトゲスギミドリイシ3群体 (A, B, C), スギノキミドリイシ3群体 (a, b, c) から1片ずつ小片 (3~5 cm) を採取した。その後、1月25日及び4月25日には、各光条件下に設置した各枝片および瀬底海域中にある採集元の群体 (以下、“瀬底ドナー”とする) から3~5 cm の小片を採取した。すべての月において、採集した小片は10%海水ホルマリン溶液で固定後、10%ホルマリン溶液と10%酢酸溶液の混合液で脱灰した。脱灰後、組織切片作製まで80%エタノール中で保存した。脱灰した小片から、1群体につき3ポリプをピンセットで取り出し、脱水・透徹後、パラフィン (Histosec® ペレットタイプ DMSO なし, MERCK) で包埋した。マイクローム (RV240, 大和光機工業, 埼玉) で厚さ $7 \mu\text{m}$ の連続切片を作製し、組織が含まれている切片を回収し伸展させた。脱パラフィン後にヘマトキシリン・エオシン染色を行った。

光学顕微鏡 (CX21FS1, OLYMPUS) にて作製した切片を検鏡し、Szmant et al. (1985) と Vargas-Angel et al. (2006) に準拠して採集月における卵母細胞および精巢の発達ステージを Stage I から Stage IV までに区分した。区分後、それぞれのLED照射条件下において卵母細胞および精巢の各発達ステージが占める割合を算出した。

卵母細胞が確認された際には、1ポリプ当たりの卵母細胞数をカウントした。さらに、各卵母細胞の最大切断面積を示す切片を選出するために、候補となる複数切片における卵母細胞について Image J ver. 1.52a (National Institutes of Health) を用いて長径 (X) と短径 (Y) を測定し、面積を算出した (Abramoff et al. 2004)。各卵母細胞について最大切断面積を示す切片を確定後、卵母細胞は回転楕円体で

あると考え、以下の式で体積を算出した： $V=4/3 \pi (X/2)(Y/2)^2$ (X: 長径, Y: 短直径, 下池ら 1993, Okubo et al. 2010)。これらの測定値および計算値を用いて、卵母細胞における発達度合いの定量化を以下の3つの項目で行った：(1) 1ポリプあたりの平均卵母細胞数；(2) 1ポリプあたりの平均卵母細胞体積；(3) 1ポリプあたりの総卵母細胞体積 (ポリプあたりの繁殖価) (Okubo et al. 2010)。

産卵日時と放出された配偶子数の確認

2019年に産卵が予想される5月17日~6月10日 (満月: 5月19日, 新月: 6月3日) の期間、夜間観察を行った (Hayashibara et al. 1993)。対象2種を含む多くのミドリイシ属サンゴの予想産卵時刻は22:00付近であることが報告されていることから (Fukami et al. 2003)、毎日の産卵確認は20:30から22:30まで30分ごとに行なった。

卵と精子がパッキングされたバンドルがポリプの口に上がってきていることを確認した後、1群体ずつ別の容器に海水と共に移した。産卵が確認されたら、産卵開始時刻を記録後、パスツールピペットを用いてバンドルを採取し、海水の入ったプラスチックカップに移した。採取したバンドルがはじける前に、1枝片につき8~12個のバンドルを96ウェルマイクロプレート (GDMP-96F, 太洋株式会社) のウェルに1個ずつ入れ、10%海水ホルマリン溶液で固定した。ウェル内のバンドルをピペッティングして精子と卵に分けた後、実体顕微鏡 (三太2, マイクロネット) 下にて卵数を計測し、血球計算盤 (C-Chip, NanoEnTek) を用いて精子濃度 (cells/mL) を算出した。

統計解析

組織学的観察から得られた (1) 1ポリプあたりの平均卵母細胞数, (2) 1ポリプあたりの平均卵母細胞体積, (3) 1ポリプあたりの総卵母細胞体積 (ポリプあたりの繁殖価) のそれぞれについて、月ごとにLED照射条件によって異なるかどうかを一般化線形混合モデル (Generalized linear mixed effects model: GLMM) を用いて解析した。対象2種において、実験には3群体由来の枝片を使用しており、それらの群体差をランダム効果とするGLMMを適用した。目的変数は1ポリプあたりの平均卵母細胞数, 1ポリプあたりの平均卵母細胞体積, 1ポリプあたりの総卵母細胞体積 (ポリプあたりの繁殖価) であり、固定効果としての説明変数はLED照射条件とした。モデルの誤差構造とリンク関数は、1ポリプあたりの平均卵母細胞数では負の二項分布とlog, 1ポリプあたりの平均卵母細胞体積と1ポリプあたりの総卵母細胞体積 (ポリプあたりの繁殖価) では正規分布とlogとした。

また、産卵が確認された群体について、(1) 1バンドルあたりの平均卵数, (2) 精子濃度について、LED照射条件で異なるかを一般化線形モデル (Generalized linear model: GLM) で検証した。目的変数は平均卵数および精子濃

度であり，説明変数はLED照射条件とした．モデルの誤差構造とリンク関数は，(1) はポワソン分布と log，(2) では正規分布と identity とした．以上の解析は lme4 パッケージ（バージョン 1.1.25）をインストールした R ver. 4.0.3（R Development Core Team 2020）を用いた．

結 果

配偶子形成過程の組織学的観察

トゲスギミドリイシとスギノキミドリイシの卵母細胞と

Fig. 1. Changes in the developmental stage of oocytes and testis. (A–C) Oogonium and oocytes of *Acropora intermedia*. (D–E) Testis of *A. intermedia*. (F–G) Testis of *A. muricata*. A, Stage I oogonium and Stage II oocyte in October; B, Stage III oocytes in January; C, Stage III and IV oocytes in April; D, Stage I testes, produced by spermatogonium cells in January; E, Stage II testes consisting of spermatocytes and observed in January; F, Stage III testes consisting of a large number of spermatocytes and observed in April; G, Stage IV testes produced by spermatids. Values in parentheses represent stage of oocytes. Bars indicate 100 μ m in A–F, and bar indicates 20 μ m in G. og, oogonium; oo, oocyte; n, nucleus; nc, nucleolus; sg, spermatogonium; sc, spermatocyte; st, spermatid.

(a) *Acropora intermedia* (b) *A. muricata*

Fig. 2. Temporal variation in the relative abundance of oocyte developmental stages under each set of LED conditions. (a) *Acropora intermedia*. (b) *A. muricata*. Values in parentheses above bar plots represent the number of examined oocytes.

精巢の形成過程を3カ月ごとに追跡した。卵母細胞は、2018年10月ではStage I (Fig. 1A) と、Stage II (Fig. 1A) がみられた。2019年1月ではStage I, II と III (Fig. 1B), 2019年4月ではStage III と Stage IV (Fig. 1C) が多くみられた。

各光条件における卵母細胞の発達ステージの時間的推移を示した (Fig. 2)。トゲスギミドリイシでは実験開始時の10月では、確認できた卵母細胞の89%はStage IIであり、残りはStage Iであった (Fig. 2a)。1月では、コントロールの屋外水槽と瀬底ドナーでStage IIが多く、それぞれの割合が63%, 82%であったのに対し、FreshではStage IIが11%, Stage IIIが89%であり、この月では最も発達したステージの卵母細胞が確認された。4月では、Coral, Reef, Freshに卵母細胞がほとんどみられなくなったが、SunsetでStage IVが75%であり、最も発達したステージがみられた。

一方スギノキミドリイシでは、10月でStage Iが16%, Stage IIが84%であった (Fig. 2b)。1月ではCoral, Fresh, 瀬底ドナーでStage IIIがそれぞれ27%, 36%, 46%であり発達した卵母細胞がみられた。4月では、Coral, Fresh, 瀬底ドナーにおいてStage IVがそれぞれ97%, 88%, 94%であり、ほとんどが成熟した卵母細胞であった。

精巣については、10月では両対象種で精巣はみられなかった。1月ではStage I (Fig. 1D) と II (Fig. 1E), 4月ではStage III (Fig. 1F) と IV (Fig. 1G) がみられた。

各光条件における精巣の発達ステージの時間的推移を示した (Fig. 3)。トゲスギミドリイシでは、1月になると精原細胞および、精母細胞の形成が始まった。FreshとSunsetでStage IIがそれぞれ40%と33%となり、屋外水槽や瀬底ドナーの24%と5.9%よりも高い値となった。4月では卵母細胞と同様にCoral, Reef, Freshでは精巣はみられず、成熟したStage IVの精巣はSunset (46%)と瀬底ドナー (36%)で確認できた。スギノキミドリイシでは、1月の時点では、Coral, Fresh, 瀬底ドナーにおいて、わずかにStage IIの精巣がみられたものの、全体的に発達した精巣数が少なく精原細胞の形成が始まっていないポリプが多くみられた。4月になると、Stage IVの占める割合はCoral, Fresh, 瀬底ドナーでそれぞれ79%, 82%, 73%と高くなっていった。

また、トゲスギミドリイシとスギノキミドリイシ共に、各月において配偶子を持っているポリプ数および各ステージの配偶子数は、群体間でばらつきがみられた (Table ES2)。

組織観察により、各月における1ポリプあたりの卵母細胞

(a) *Acropora intermedia* (b) *A. muricata*

Fig. 3. Temporal variation in the relative abundance of testis developmental stages under each set of LED conditions. (a), *Acropora intermedia*; (b), *A. muricata*. Values in parentheses above bar plots represent the number of examined testes.

胞数をカウントした (Fig. 4). トゲスギミドリイシでは、10月の搬入時には最大12個の卵母細胞がみられた (Fig. 4a). 1月では、他条件に比較してFreshが最も大きい値であり、 10.6 ± 1.4 (平均卵母細胞数 $\pm$ 標準偏差) であった。4月では、全体的に卵母細胞をもたないポリプが多くみられ、Fresh, Reef, Coralでは対象にしたポリプでほとんど卵母細胞がみられなかった。卵母細胞が確認できたOutdoor, Sunsetおよび瀬底ドナーでも、平均値は4.6, 3.4, 2.7個であり、1月と比較して卵母細胞数は減少していた。スギノキミドリイシでは、10月に最大11個の卵母細胞がみられた (Fig. 4b). 1月では、Sunsetの 10.7 ± 3.3 (平均卵母細胞数 $\pm$ 標準偏差) が最も多く、Reefの 0.9 ± 1.7 が最も少なかった。その他の条件間に有意差はなかった (Table ES3)。4月ではトゲスギミドリイシと同様に全条件で卵母細胞を持たないポリプが多かったが、平均卵数は1.7 (Sunset)~4.6 (Coral) であり、条件間で卵数に差はみられなかった (Table ES3)。

次に、組織切片観察から1ポリプあたりの平均卵母細胞体積を算出した (Fig. 5)。トゲスギミドリイシでは、搬入時の2018年10月では1ポリプあたりの卵母細胞の平均体積が $1.06 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$ であった。1月では、他条件に比較

してFreshが最も大きい値であり、平均値は $3.21 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ であった。 (Fig. 5a)。また、FreshとSunsetは他条件よりも有意に大きい値を示した (Fresh, $z=7.09$, $p<0.001$; Sunset, $z=5.19$, $p<0.001$; Table ES4)。4月では、Fresh, Reef, Coralで卵母細胞を持つポリプ数が減少した。Sunsetの値が最も大きく平均値は $8.98 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ であり、Outdoorおよび瀬底ドナーに比べて大きかった。スギノキミドリイシでは、10月には卵母細胞の平均体積が $7.3 \times 10^{-5} \text{ mm}^3$ であった (Fig. 5b)。1月では瀬底ドナーが $9.10 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$ で最も大きい値を示していたが、4月では $5.08 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ (Sunset)~ $8.94 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ (Outdoor) であり (Fig. 5b), CoralとSunsetは他条件よりも有意に大きかった (Coral, $z=2.27$, $p=0.024$; Sunset, $z=-2.02$, $p=0.044$; Table ES4)。

さらに、1ポリプあたりの総卵母細胞体積 (ポリプあたりの繁殖価) を算出した (Fig. 6)。トゲスギミドリイシでは、10月には $1.06 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$ であり、1月ではFreshで $3.39 \times 10^{-2} \text{ mm}^3$ と最も大きい値を示した。しかし4月では、Sunsetが $9.28 \times 10^{-2} \text{ mm}^3$ と最も大きい値を示し (Fig. 6a), これはOutdoorと瀬底ドナーに比べて有意に大きかった ($z=2.80$, $p=0.05$; Table ES5)。スギノキミドリイシでは、10月には $5.12 \times 10^{-4} \text{ mm}^3$ であり、1月では瀬底

Fig. 4. Number of oocytes per polyp under each set of LED conditions in October 2018, January 2019, and April 2019. (a) *Acropora intermedia*, (b) *A. muricata*. Values in parentheses under each light condition type represent the number of examined polyps.

ドナーで $7.93 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ と最も大きい値を示した。4月では、Outdoor が $7.45 \times 10^{-2} \text{ mm}^3$ と最も大きい値を示し (Fig. 6b), Reef, Sunset, 瀬底ドナーに比べて有意に大きかった ($z = -2.82, p = 0.0049$; Table ES5)。

産卵日時と放出された配偶子数の確認

屋外水槽および波長の異なる4つのLEDを設置した屋内水槽で飼育したミドリイシ属サンゴの産卵を確認した (Table 1)。満月から3日後の2019年5月22日、屋外水槽で飼育していた全群体 (トゲスギミドリイシ群体 A, B, C

Fig. 5. Oocyte volume under each set of LED conditions in October 2018, January 2019, and April 2019. (a) *Acropora intermedia*, (b) *A. muricata*. Values in parentheses under each light condition type represent the number of examined polyps.

およびスギノキミドリイシ群体 a, b, c) の枝片で産卵が確認された。一方, LED 条件では, 新月から 3 日後の 2019 年 6 月 6 日にスギノキミドリイシの群体 b の Coral, Fresh, Sunset で飼育されていた枝片で産卵が確認された。

産卵が確認されたスギノキミドリイシ群体 b について, それぞれの光条件でバンドルを回収し, バンドル 1 個当たりの配偶子量を比較した (Fig. 7)。卵数は, Sunset で 10.9 ± 1.27 (平均卵数 $\pm$ 標準偏差) 個であり, 他の光条件下での卵数よりも多かった (Fig. 7a)。精子濃度は, Sunset で $(7.58 \pm 2.40) \times 10^7$ cells/mL, Fresh で $(6.79 \pm 2.53) \times 10^7$ cells/mL となり (Fig. 7b), どちらも Outdoor よりも有意に高い値となった (Fresh, $z=4.17$, $p<0.001$; Sunset, $z=4.95$,

$p<0.001$; Table ES6)。

考 察

Outdoor よりも配偶子成熟を促進した波長は, トゲスギミドリイシでは Sunset, スギノキミドリイシでは Coral, Reef, Fresh, Sunset であった (Figs. 2, 3)。この要因として, 第一に褐虫藻の光合成による成長促進と種による光波長の感受性の違いが考えられる。サンゴ内に共生している褐虫藻のクロロフィル a と c_2 は 450 nm と 650 nm 付近で極大吸収を示すことがわかっている (Levy 2003)。配偶子成熟の促進がみられた Sunset と Fresh では, 共通して 450 nm

Fig. 6. Total oocyte volume per polyp under each set of LED conditions in October 2018, January 2019, and April 2019 (a) *Acropora intermedia*, (b) *A. muricata*. Values in parentheses under each light condition type represent the number of examined polyps.

付近の短波長帯と 650 nm 付近の長波長帯を含んでおり、これらの波長の光をクロロフィルが集光し、光合成が促進された可能性がある。一方で、クロロフィル *a* ではこれら 2 つの波長での吸光度はどちらも 0.6 程度であるが、クロロフィル *c2* では 450 nm の吸光度は 650 nm の吸光度よりも約 8 倍高いことがわかっている (Levy 2003)。また、短波長である青色光はクロロフィル量や褐虫藻密度の増加を促進し、赤色光は反対に抑制にはたらくと考えられている (Kinzie et al. 1984, Wijgerde et al. 2014)。しかし、褐虫藻やクロロフィルを量的に変動させるだけでなく、Self-shading による空間的な位置を変動することでも波長に対する応答および適応を行っていると考えられる (Schutter

et al. 2012, Wijgerde et al. 2014)。以上より、褐虫藻やクロロフィルの貯蔵量や挙動は、種や時間で異なっている可能性が高い。スギノキミドリイシにおいて Coral と Reef 照射下で配偶子形成や成熟が促進された理由として、群体内の褐虫藻が有しているクロロフィルは *c2* が優占しており、短波長で光合成が促進された可能性がある。今後定期的に褐虫藻数やクロロフィル濃度およびその組成、ひいては群体自体の成長量を同時に測定し検証する必要がある。

第二に、波長そのものが宿主であるミドリイシの配偶子形成や成熟を直接促進した可能性がある。一般的に、海水中では赤色光は深度と共に吸収されるため、海産生物では短波長光が生殖を促進する報告が多い。魚類では、カラシ

Table 1. Spawning date and time of *Acropora intermedia* and *A. muricata* corals in 2019. Full moon was on 19 May and new moon was on 3 June. A, B and C represent colony IDs for *A. intermedia*, whereas a, b and c represent colony IDs for *A. muricata*.

Species	<i>Acropora intermedia</i>	<i>A. muricata</i>
Outdoor		
Date and spawning time	22 May 2019 22:00 (colony C) 22:10 (colonies A and B)	20 May 2019 22:10 (colony c) 22 May 2019 22:00 (colony c) 22:15 (colonies a and b)
Coral	—	6 June 2019
Date and spawning time		22:30 (colony b)
Reef	—	—
Fresh	—	6 June 2019
Date and spawning time		22:30 (colony b)
Sunset	—	6 June 2019
Date and spawning time		22:30 (colony b)

Fig. 7. Number of gametes per bundle spawned by colony b of *Acropora muricata* under each set of LED conditions. (a) Number of eggs. (b) Sperm concentration. Values in parentheses under each light condition type represent the number of examined bundles.

ン科の1種 *Brycon cephalus* において白色光よりも緑色光で飼育した方が産卵する雌個体数が多いこと (Volpato 2000), ナイルティラピア *Oreochromis niloticus* では青色光下で雄に特徴的な繁殖行動を示す雄個体数が増加したこと (Volpato et al. 2004) などが報告されている。刺胞動物でも、セイタカイソギンチャクの一種 *Aiptasia* sp. において月光を模した青色光照射により多数の配偶子が生産されることが示されている (Grawunder et al. 2015)。一方、長波長帯の赤色光による生殖促進の報告は非常に少ない。魚類のルリスズメダイ *Chrysiptera cyanea* では、赤色 LED 照射個体は青色および緑色 LED 照射個体よりも有意に多く卵形成がみとめられた (Bapary et al. 2011)。ルリスズメダイはさんご礁内の礁池のような透明度の高い浅瀬に生息しており、このような浅瀬では赤色光の減衰が少ないために (Vera et al. 2010) 赤色光が有効な光刺激になっていると考

えられる (Bapary et al. 2011)。本研究で対象にしたトゲスギミドリイシとスギノキミドリイシも、共に礁池などの比較的浅い場所に多く生息しており (西平・Veron 1995), ルリスズメダイと同様に赤色光が光刺激となっている可能性がある。一方で、ミドリイシ属をはじめサンゴの幼生は今まで考えられてきたよりも複雑な光検出メカニズムを持ち、周囲の光を深さの探知だけではなく表面構造の認識等に用いており、種間で応答する光が異なることがサンゴのニッチ分化において重要であると考えられている (Strader et al. 2015)。以上のことから、赤色光が直接的に生殖を促進しているかを検証するためには、赤色光を含め礁池の光条件を再現した実験下において、各対象種における光受容と生殖に関する遺伝子発現とそれらの関連性を分子生物学的な手法を用いて明らかにする必要がある。

トゲスギミドリイシ、スギノキミドリイシ共にポリブ内

の卵数は10月から4月に向けて減少していた (Fig. 4a, b). 一方, ポリプ内にある卵母細胞の平均体積は月が進むにつれて大きくなり (Fig. 5a, b), それに伴って繁殖価の値も大きくなった (Fig. 6a, b). 一般的に繁殖価 (fecundity) は配偶子数と体積の積で表され (Smith & Fretwell 1974), 両者はトレードオフの関係にある. グレートバリアリーフにおけるミドリイシ属サンゴ9種では, 配偶子形成初期から後期にわたって卵母細胞数は大きく変化しないことが報告されている (Wallace 1985). また, 阿嘉島のトゲスギミドリイシでは, 1バンドルあたりの卵数から換算した1ポリプあたりの平均卵母細胞数は5.6個であった (大矢・岩尾 1998). 本研究ではコントロールである Outdoor および野外状況を反映している瀬底ドナーにおいても卵母細胞数の減少がみられ, さらに4月ではトゲスギミドリイシとスギノキミドリイシどちらにおいても, 一番多い平均卵母細胞数は4.6個であった (Fig. 4a, b). これは, ドナー群体を複数の枝片に分割したことにより, スギノキミドリイシで報告されている成長, 再生, 生存および生殖間でのトレードオフ (Okubo 2008) が生じ, 卵母細胞数が減少したと考えられる. 一方で, どちらの種においても, 卵母細胞の体積は10月から1月にかけてどの光条件でも成熟のステージが進むにつれて増加していた (Fig. 5a, b). しかし, 4月では, スギノキミドリイシでは1月と比較してどの光条件でも同様に体積が増加していたのに対し, トゲスギミドリイシでは Sunset 照射群体の卵母細胞体積が有意に大きくなっていった (Fig. 5a, b). これら体積でみられた傾向は繁殖価でも同様であり, 4月ではトゲスギミドリイシの Sunset において有意に繁殖価が大きくなっていった (Fig. 6a, b). サンゴでは卵の数とサイズ間のトレードオフの関係は, 環境やストレスに応じて変化することが知られている (Foster and Gilmour 2020). 温度ストレスを受けたハイマツミドリイシ *Acropora millepora* では, 産卵数は減少したが卵サイズは維持されたこと (Jones and Berkemans 2011), ソフトコーラルの1種 *Lobophytum compactum* では白化の際に卵数とサイズの両方が減少する一方で, 卵数に割り当てられたエネルギーは成熟サイズに達するまでの卵の維持に使われたことが報告されている (Michalek-Wagner and Willis 2001). 本研究の結果は, ソフトコーラルでの研究結果と同様に群体が分割されたことにより卵母細胞数が減少したが, それらを成熟させるエネルギーは自然光と LED 光のどちらの光環境下でも得られたと考えられる. 但し, 4月にトゲスギミドリイシで光条件により卵体積と繁殖価に差がみられたことから (Fig. 5a, 6a), 卵の数とサイズのトレードオフに関係する光条件や環境は種によって異なると考えられる.

本研究で用いた両種ともコントロールである Outdoor ではすべての群体が産卵した (Table 1). 一方 LED 照射下では, トゲスギミドリイシはすべての LED 条件で産卵がみられず, スギノキミドリイシは実験に用いた3群体のうち

1群体で, Reef 以外の LED 条件で産卵が確認された (Table 1). スギノキミドリイシの移植に関する先行研究より, (1) 移植時のサイズ, (2) 移植時期すなわち配偶子形成のステージが異なる, という複数の条件でサンゴ片を移植した際, (1) 大きいサイズ (20 cm) の枝片は卵母細胞形成を続けるが, 小さいサイズ (5 cm) の枝片の卵母細胞は吸収される, (2) 配偶子形成後期の枝片では卵母細胞が発達するが, 形成初期の枝片では卵母細胞が吸収されることが示された (Okubo et al. 2005, 2007). また, スギノキミドリイシでは, 移植後の枝片の成長と再生はサイズに依存しないが, 成長, 再生, 生存および生殖の間にトレードオフがあることが報告されている (Okubo 2008). 本研究では, 15 cm 以上の枝片を使用して10月下旬に実験を開始したが, その時の卵母細胞は両種とも Stage I または II であった (Fig. 2). しかし, コントロールとした Outdoor ですべての群体由来の枝片が配偶子形成を継続し, 夏季に産卵した (Table 1). 以上から, 実験に使用したのは卵母細胞初期ステージの枝片であったが, その後配偶子形成を継続するのに十分なサイズであったといえる.

一方, 4月に卵母細胞の減少がみられた波長では, 対象群体は配偶子形成を続けながら成長および生存に用いるエネルギーを生産できず, 実験期間中に死亡がみられなかったこととあわせ, 配偶子を吸収することで生殖のエネルギーを生存に分配したと考えられる. また, このエネルギーの再分配は種によって異なると推測される. 4月に確認された卵母細胞と精巣について, トゲスギミドリイシでは Outdoor, 瀬底ドナー, Sunset 以外の LED 照射群体でみられた数が極端に少なかったのに対し, スギノキミドリイシではコントロールである Outdoor を含め Reef 以外の LED 照射群体でも卵母細胞や精巣の数は減少していなかった (Figs. 2, 3). サンゴ群体内には配偶子を形成しないポリプが存在し, 群体においてそれらが占める割合や場所は種や群体の形状によって異なっている (Wallace 1985, Álvarez-Noriega et al. 2016). トゲスギミドリイシは先端にある中軸ポリプから3~5 cmの部分にあるポリプは配偶子を生産せず, また主軸から2回以上分かれた枝では配偶子放出がみられない (Randall et al. 2021, 磯村私信). 加えて, トゲスギミドリイシはバンドルあたりの卵数および群体表面の単位面積あたりの卵体積が小さいことが報告されている (大矢・岩尾 1998). 以上から, トゲスギミドリイシでは成長や生存にエネルギーを多く分配する必要がある, それらを確保できない場合には生殖へ配分するエネルギーを成長や生存に再配分していると考えられる. 以上のことから, 今回の LED 照射条件ではトゲスギミドリイシは群体を維持しながら配偶子を成熟させ産卵するエネルギーを得ることができなかったと推察される. 一方, スギノキミドリイシについては, 配偶子形成がみられないポリプが存在する範囲を明らかにする必要があるが, トゲスギミドリイシよりも成長や生存に配分するエネルギーが多く

Fig. 8. Variation in the seawater temperature of indoor and outdoor aquariums throughout the experiment (mean $\pm$ S.D.).

ないために、同じ光条件下でも産卵する群体がみられたと考えられる。さらに産卵したスギノキミドリイシ（群体b）は、4月時点で他の2群体と比べて卵母細胞と精巢共にStage IVの個数と全ステージ合計個数が多くなっていた（Table ES2）。このことから、種内でもエネルギー分配の仕方に違いがあり、それが産卵をしたかしなかったかに関連した可能性がある。

スギノキミドリイシにおいて、Reef以外のLED照射群体は産卵予想日より遅れて産卵した（Table 1）。また、放出されたバンドルについて、光条件によって卵数に違いはみられなかったが、精子数には違いがみられた（Fig. 7）。Okubo et al. (2007) は、スギノキミドリイシについて、大きいサイズ（20 cm）の枝片を配偶子の発生ステージが進んだ時期に移植した際、移植1年目ではドナーよりも1か月早く産卵したことを報告している。本実験では、野外での産卵が予想される期間にOutdoorでは産卵がみられていることから（Table 1）、LED照射群体の産卵が遅れたのは飼育下での環境要因が関係したと考えられる。実験を行うにあたって、屋内外水槽の海水はすべて同じであったが、コントロールである屋外水槽は自然光が照射しており、光周期と光量は一定ではなかった（Table ES1）。また、実験対象群体を搬入した秋から冬にかけては屋外水槽の方が低い水温となっていたが、春になると水温は外気温の影響を受けて上昇し、4月以降は屋外水槽が屋内水槽よりも高い水温となっていた（Fig. 8）。さらに、産卵が確認された6月になると、平均水温は屋外水槽の方が屋内水槽よりも1.5°C高くなっていた（Fig. 8）。以上より、屋外水槽と屋内水槽では、波長以外に光周期・光量および水温の上昇の仕方が異なっていたといえる。光周期が海洋生物の産卵のタイミングに関与していることが知られており（Brady et al. 2009, Willis et al. 1985）、地中海に生息するソフトコーラルの1種 *Alcyonium acaule* は、日長と太陽高度の変化に伴う日射量の増加が卵黄形成の引き金となり、その後続く水温の上昇に伴い精子の成熟が始まることが報

告されている（Fiorillo et al. 2013）。これらのことから、屋内水槽のサンゴは野外とは異なる光周期および光量で飼育されていたため、野外群体とは異なる時期に産卵した可能性がある。また、アゲマキ *Sinonovacula constricta* において温度が低下した後上昇することが性成熟や産卵に関与しており（佃・神崎 2017）、スギノキミドリイシでも低温期を経験させた上で積算水温を考慮することにより性成熟をずらすことができることが報告されている（林ら 2017）。これらをふまえ、今後は光条件と併せ水温変化が性成熟や配偶子放出へ影響するかを詳しく調査する必要がある。

まとめ

本研究では、造礁サンゴであるミドリイシ属サンゴ2種（トゲスギミドリイシ、スギノキミドリイシ）において繁殖を促進する波長が存在するかを明らかにすることを目的とした。サンゴ飼育用LED4種（Coral, Reef, Fresh, Sunset）を照射し、配偶子成熟と放出された配偶子数に着目したところ、トゲスギミドリイシでは配偶子成熟を促進する波長はSunsetであったが、LED照射した群体での産卵はみられなかった。スギノキミドリイシでは配偶子成熟から配偶子放出までの一連の過程を促進する波長はSunsetであったが、CoralとFreshでも配偶子成熟が促進された。Sunsetは赤色である長波長帯を多く含んでおり、両種が生息しているさんご礁域の浅瀬では赤色光の減衰が少ないために赤色光が繁殖を促進する光刺激となった可能性がある。一方、スギノキミドリイシでは短波長帯を多く含む波長でも配偶子成熟が促進されたことから、褐虫藻の光合成による成長促進と種による光波長の感受性の違いを考慮した実験が今後必要である。また、産卵には波長以外に光周期と光量、水温が低下したのちに上昇することが影響していると考えられた。

謝辞：本研究は、沖縄県沖縄科学技術イノベーション共同研究促進補助金「人工光型大規模サンゴ育成システム及びIoT技術を活用した育成システム」（事業代表機関：沖電開発株式会社）の一環として実施されたものです。沖電開発株式会社水産養殖研究センターの皆様には水槽の管理から産卵実験において多大なご協力を賜りました。Rによる一般化線形混合モデルでの解析については、国立環境研究所の熊谷直喜博士にご教示いただきました。感謝申し上げます。また、本研究の一部は、科研費（17K07545）による援助を受けました。

Electronic supplementary material: The online version of this article (doi: 10.5179/benthos.76.59) contains supplementary material: Tables ES1–ES6, Fig. ES1.

引用文献

Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 36–42.

- Álvarez-Noriega M, Baird AH, Dornelas M, Madin JS, Cumbo VR, Connolly SR 2016. Fecundity and the demographic strategies of coral morphologies. *Ecology* 97: 3485–3493.
- Amiel A, Chang P, Momose T, Houlston E 2010. *Clytia hemisphaerica*: a cnidarian model for studying oogenesis. In: *Oogenesis: The Universal Process*, Verlhac MH, Villeneuve A (eds.), John Wiley & Sons, Chichester, pp. 81–102.
- Ayalon I, Rosenberg Y, Benichou JIC, Campos CLD, Sayco SLG, Nada MAL, Jake Ivan P, Baquiran JIP, Ligson CA, Avisar D, Conaco C, Kuechly HU, Kyba CCM, Cabaitan PC, Levy O 2020. Coral gametogenesis collapse under artificial light pollution. *Current Biology* 31: 413–419.
- Babcock RC, Bull GD, Harrison PL, Heyward AJ, Oliver JK, Wallace CC, Willis BL 1986. Synchronous spawning of 105 scleractinian coral species on the Great Barrier Reef. *Marine Biology* 90: 379–394.
- Bapary MAJ, Amin MN, Takeuchi Y, Takemura A 2011. The stimulatory effects of long wavelengths of light on the ovarian development in the tropical damselfish, *Chrysiptera cyanea*. *Aquaculture* 313: 188–192.
- Brady AK, Hilton JD, Vize PD 2009. Coral spawn timing is a direct response to solar light cycles and is not an entrained circadian response. *Coral Reefs* 28: 677–689.
- Bromage N, Porter M, Randall C 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 197: 63–98.
- Domeier ML, Colin PL 1997. Tropical reef fish spawning aggregations: Defined and reviewed. *Bulletin of Marine Science* 60: 698–726.
- Fiorillo I, Rossi S, Alva V, Gili JM, Lopez-Gonzalez PJ 2013. Seasonal cycle of sexual reproduction of the Mediterranean soft coral *Alcyonium acaule* (Anthozoa, Octocorallia). *Marine Biology* 160: 719–728.
- Foster T, Gilmour J 2020. Egg size and fecundity of biannually spawning corals at Scott Reef. *Scientific Reports* 10: 12313.
- Fukami H, Omori K, Shimoike T, Hayashibara T, Hatta M 2003. Ecological and genetic aspects of reproductive isolation by different spawning times in *Acropora* corals. *Marine Biology* 142: 679–684.
- Grawunder D, Hambleton EA, Bucher M, Wolfowicz I, Bechtoldt N, Guse A 2015. Induction of gametogenesis in the Cnidarian endosymbiosis model *Aiptasia* sp. *Scientific Reports* 5: 15677.
- Harrison PL, Wallace CC 1990. Reproduction, dispersal and recruitment of scleractinian corals. *Ecosystems of the world*, 25: 133–207.
- 林 正裕・渡邊祐介・山本雄三・諏訪僚太・鈴木 淳 2017. スギノキミドリイシを用いたサンゴの人為的産卵誘発技術の開発. 日本サンゴ礁学会第 20 回大会.
- Hayashibara T, Shimoike K, Kimura T, Hosaka S, Heyward A, Harrison P, Kudo K, Omori M 1993. Patterns of coral spawning at Akajima Island, Okinawa, Japan. *Marine Ecology Progress Series* 101: 253–262.
- Jones AM, Berkemans R 2011. Tradeoffs to thermal acclimation: energetics and reproduction of a reef coral with heat tolerant *Symbiodinium* type-D. *Journal of Marine Science* <https://doi.org/10.1155/2011/185890>
- Jones R, Giofre N, Luter HM, Neoh TL, Fisher R, Duckworth A 2020. Responses of corals to chronic turbidity. *Scientific Reports* 10: 4762.
- Kinzie RA, Jokiel P, York R 1984. Effects of light of altered spectral composition on coral zooxanthellae associations and on zooxanthellae in vitro. *Marine Biology* 78: 239–248.
- Krupp DA 1983. Sexual reproduction and early development of the solitary coral *Fungia scutaria* (Anthozoa: Scleractinia). *Coral Reefs* 2: 159–164.
- Levy O 2003. Photobehavior of stony corals: Responses to light spectra and intensity. *Journal of Experimental Biology* 206: 4041–4049.
- Levy O, Appelbaum L, Leggat W, Gothliff Y, Hayward DC, Miller DJ, Hoegh-Guldberg O 2007. Light-responsive cryptochromes from one of the simplest extant animals, the coral *Acropora millepora*. *Science* 318: 467–470.
- Mason B, Beard M, Miller MW 2011. Coral larvae settle at a higher frequency on red surfaces. *Coral Reefs* 30: 667–676.
- Michalek-Wagner K, Willis BL 2001. Impacts of bleaching on the soft coral *Lobophytum compactum*. I. fecundity, fertilization and offspring viability. *Coral Reefs* 19: 231–239.
- 村瀬 昇・阿部真比古・野田幹雄 2018. 光質が異なる LED 照射下でのワカメ配偶体の生長と成熟. 水産大学校研究報告 67: 91–97.
- 中村 崇 2017. 2016 年夏期に発生した石西礁湖での大規模白化. 日本サンゴ礁学会誌 19: 29–40.
- 西平守孝・Veron JEN 1995. 日本の造礁サンゴ類, 海游舎, 東京, 439 pp.
- Ohtsu K, Kawahara M, Ikeda H, Uye S 2007. Experimental induction of gonadal maturation and spawning in the giant jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae). *Marine Biology* 152: 667–676.
- Okubo N 2008. Size-independent investment allocation to regeneration and growth of the branching coral *Acropora muricata*. *Galaxea* 10: 1–5.
- Okubo N, Taniguchi H, Motokawa T 2005. Successful methods for transplanting fragments of *Acropora formosa* and *Acropora hyacinthus*. *Coral Reefs* 24: 333–342.
- Okubo N, Motokawa T, Omori M 2007. When fragmented coral spawn? Effect of size and timing on survivorship and fecundity of fragmentation in *Acropora formosa*. *Marine Biology* 151: 353–363.
- Okubo N, Yamamoto HH, Nakaya F, Okaji K 2010. Reproduction in cultured versus wild coral colonies: Fertilization, larval oxygen consumption, and survival. *Biological Bulletin* 218: 230–236.
- 大矢正樹・岩尾研二 1998. ミドリイシ属サンゴの卵放出量. みどりいし 9: 30–31.
- Pankhurst N, Porter M 2003. Cold and dark or warm and light: variations on the theme of environmental control of reproduction. *Fish Physiology and Biochemistry* 28: 385–389.
- R Core Team 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. Austria. <https://www.R-project.org/> (accessed on 1 December 2020)
- Randall CJ, Giuliano C, Page CA 2021. No bundles beyond this point: the coral sterile zone. *Bulletin of Marine Science* 97: 75–76.
- Sakai Y, Hatta M, Furukawa S, Kawata M, Ueno N, Maruyama S 2020. Environmental factors explain spawning day deviation from full moon in the scleractinian coral *Acropora*. *Biological Letters* 16: 20190760.
- Schutter M, van der Ven RM, Janse M, Verreth JAJ, Wijffels RH, Osinga, R 2012. Light intensity, photoperiod duration, daily light flux and coral growth of *Galaxea fascicularis* in an aquarium setting: a matter of photons? *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 92: 703–712.
- Shin HS, Kim AA, Choi YJ, Habibi HR, Jae Kim JW, Choi CY 2013. Light-emitting diode spectral sensitivity relationship with reproductive parameters and ovarian maturation in yellowtail damselfish, *Chrysiptera parasema*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 127: 108–113.
- 下池和幸・林原 毅・木村 匡・大森 信 1993. 阿嘉島におけるミドリイシサンゴの群体内分割産卵の観察. みどりいし 4: 16–18.
- Smith CC, Fretwell SD 1974. The optimal balance between size and number of offspring. *American Naturalist* 108: 499–506.
- Strader ME, Davies SW, Matz MV 2015. Differential responses of coral larvae to the colour of ambient light guide them to suitable settlement microhabitat. *Royal Society Open Science* 2: 150358.
- Szmant FA, Reutter M, Riggs L 1985. Sexual reproduction of *Favia fragum* (Esper): lunar patterns of gametogenesis, embryogenesis and planulation in Puerto Rico. *Bulletin of Marine Science* 37: 880–892.
- 佃 政則・神崎博幸 2017. 水温制御によるアゲマキの成熟・産卵

- の促進. 佐賀県有明水産振興センター研究報告 28: 25–28.
- Vargas–Angel B, Colley SB, Hoke SM, Thomas JD 2006. The reproductive seasonality and gametogenic cycle of *Acropora cervicornis* off Broward County, Florida, USA. *Coral Reefs* 25: 110–122.
- Vera LM, Davie A, Taylor JF, Migaud H 2010. Differential light intensity and spectral sensitivities of Atlantic salmon, European sea bass and Atlantic cod pineal glands *ex vivo*. *General and Comparative Endocrinology* 165: 25–33.
- Volpato GL 2000. Aggression among farmed fish. In: *Aqua 2000: Responsible Aquaculture in the New Millennium*: abstracts of contributions presented at the International Conference Aqua 2000, Nice, France (eds Flos R, Creswell L). *European Aquaculture Society Special Publication*, 28: 805.
- Volpato GL, Duarte CRA, Luchiari AC 2004. Environmental color affects *Nile tilapia* reproduction. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37: 479–483.
- Wallace CC 1985. Reproduction, recruitment and fragmentation in nine sympatric species of the coral genus *Acropora*. *Marine Biology* 88: 217–233.
- Wallace CC 1999. *Staghorn Corals of the World: A Revision of the Genus Acropora*. CRISTO publishing, Melbourne, 421 pp.
- Wijgerde T, van Melis A, Silva CIF, Leal MC, Vogels L, Mutter C, Osinga R 2014. Red light represses the photophysiology of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *PLoS ONE* 9: e92781.
- Willis BL, Babcock RC, Harrison PL, Oliver JK 1985. Patterns in the mass spawning of corals on the Great Barrier Reef from 1981 to 1984. *Proc 5th Int Coral Reef Congr* 4: 343–348.