ヒレジャコ *Tridacna squamosa* 種苗の初期生残を向上させる 褐虫藻の添加手法

山下 洋,^{1*} 南 洋一,^{2a} 近藤 忍,^{2a} 井上 顕,^{2b} 小池 一彦³

(2020年9月23日受付, 2020年12月1日受理, 2021年2月5日J-STAGE 早期公開)

¹(国研)水産研究・教育機構 水産技術研究所, ²沖縄県水産海洋技術センター石垣支所,
³広島大学大学院統合生命科学研究科

Symbiodiniacean cell supply method for improvement in survival of *Tridacna squamosa* seeds

HIROSHI YAMASHITA,^{1*} YOICHI MINAMI,^{2a} SHI-NOBU KONDO,^{2a}
KEN INOUE^{2b} AND KAZUHIKO KOIKE³

¹Fisheries Technology Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency, Fukai Ishigaki, Okinawa 907-0451, ²Ishigaki Branch, Okinawa Prefectural Fisheries Research and Extension Center, Kabira, Ishigaki, Okinawa, 907-0453, ³Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8528, Japan

Tridacnid giant clams are large bivalves found in coral reefs. Giant clams harbor symbiotic dinoflagellate, which is essential for their survival. Artificial seedling production is necessary because the natural stock of giant clams is declining, but this process usually results in low larval survival, likely caused by a failure to establish the symbiosis between clam larvae and symbiotic algae under artificial conditions. In the present study, experiments were conducted to determine how the origin of symbiont algae fed to larvae and the frequency of algal supply affect the survival rate of *Tridacna squamosa* larvae. Although the frequency of algal supply did not affect larval survival, enhanced larval growth was achieved in the bottle-scale experiment when algal cells were supplied once every 2 days. At the actual seedling production scale, a survival rate of 21.4 (20.9–21.7)% [average (minimum–maximum)%] was achieved in tanks supplied with algae extracted from several small *T. squamosa* individuals, which represented a two-fold increase as compared to the conventional method 9.4 (8.0–10.9)% of extracting algae from a single medium *T. squamosa* individual.

キーワード：褐虫藻, シャコガイ類, 種苗生産, ヒレジャコ

シャコガイ類は熱帯・亜熱帯の浅海域に生息する大型の食用二枚貝であり、サンゴ礁の重要な沿岸資源として長年利用されてきたが、天然の資源量は著しい減少傾向にある。^{1–3)} シャコガイ類は外套膜内に褐虫藻と呼ばれる Symbiodiniaceae 科の渦鞭毛藻を共生させ、栄養要求の多くを褐虫藻に依存すると言われている。^{4,5)} シャコガイ類の生存には褐虫藻との共生が必須であるが、発生直

後のシャコガイ幼生は褐虫藻を持たず、世代ごとに褐虫藻を環境中から獲得して共生関係を構築する必要がある。⁶⁾ この時、シャコガイ類は褐虫藻をまず胃に取り込み、その後胃から伸びる共生藻管と呼ばれる管状の器官⁷⁾に褐虫藻を移送する。さらに褐虫藻が外套膜に達したところで共生成立と見なしている。⁸⁾

Symbiodiniaceae 科の渦鞭毛藻は遺伝的に極めて多様

で、現在9つのcladeと呼ばれる大きなグループ (clade A-I)⁹⁾が知られ、近年それらグループのうちいくつかに属名が与えられた。^{10,11)} これまでの観察例から、シャコガイ類には Clade A = *Symbiodinium* 属, Clade C = *Cladocopium* 属, そして Clade D = *Durusdinium* 属の褐虫藻がそれぞれ単独あるいは複数同時に共生することが明らかとなっている。^{12,13)} これら褐虫藻の組成はシャコガイ類の生息する環境によって異なることが知られるが,¹⁴⁾ 環境以外の要因でも組成が異なることが報告されている。Ikeda *et al.*¹⁵⁾ は同じ場所で長期間飼育された様々なサイズのヒメジャコ *Tridacna crocea* とヒレジャコ *Tridacna squamosa* の褐虫藻組成を調べ、褐虫藻の組成はシャコガイ類の種やサイズによっても異なることを明らかにした。具体的には、1) ヒメジャコは *Symbiodinium* 属あるいは *Cladocopium* 属の褐虫藻を単独で有する 경우가多いが、2) ヒレジャコは複数グループの褐虫藻を同時に共生させる場合が多く、3) 特に殻長 11 cm 以下の小型のヒレジャコ個体には *Symbiodinium* 属と *Cladocopium* 属に加えて *Durusdinium* 属の褐虫藻も共生している場合がある、4) しかし殻長が大きくなるにつれて *Cladocopium* 属の比率が増える。¹⁵⁾

前述のようにシャコガイ類の天然資源量は著しい減少傾向にあるため、沖縄県では主に味の良いヒメジャコと、共生成立率が比較的高いヒレジャコ¹⁶⁾の種苗生産を実施して毎年漁業者へ配布している (沖縄県水産海洋技術センター事業報告書: <https://www.pref.okinawa.jp/fish/kenkyu/jigyohokoku.html>; 沖縄県栽培漁業センター事業報告書: <https://www.pref.okinawa.jp/site/norin/saibai/houkoku/jigyohoukokumoku.html>)。しかし、発生後のシャコガイ類に人工的に褐虫藻を添加しても共生成立率は 10% 程度である。シャコガイ類の生存には褐虫藻との共生が必須のため、共生不成立個体は死滅する。この著しい初期減耗の影響で効率のかつ安定的な種苗の供給には至っていない。沖縄県のシャコガイ類種苗生産現場では、過去に多くの担当者が様々な手法を取り入れて種苗の生産を実施してきた。詳しい飼育方法の変遷は沖縄県水産海洋技術センターの過去の資料で報告されているが (<https://www.pref.okinawa.jp/fish/kenkyu/index.html>)、昭和 50 年代から開始されたヒレジャコ種苗生産の手法を以下に簡単に説明する。まず、親貝の産卵を誘発して卵と精子を得る。シャコガイ類は雌雄同体であるため、自家受精も起こりうるが、¹⁷⁾ 他個体の精子と卵を用いて受精卵を得て、正常な発生を確認したうえで止水水槽へ収容する。その後褐虫藻培養株あるいは成体の外套膜から絞り出した褐虫藻を数回添加して幼生と褐虫藻との共生成立を促す。採卵から約 2 週間後、全幼生を回収して共生成立率を算出する。この段階で共生不成立個体はほとんど死滅しているため、シャ

コガイ類種苗生産においては共生成立率が初期生残率とほぼ同義となる。共生成立率 (生残率) は極めてばらつきが大きく、稀に 0% などの場合もあるが、近年はおおよそ 5–10% 程度で推移している。共生成立個体はその後、流水下で出荷サイズ (殻長約 15 mm 程度) まで飼育して配布する。

本研究では、種苗生産時のヒレジャコ幼生と褐虫藻との共生成立率 (生残率) を向上させることを目的に、褐虫藻の添加頻度と添加する褐虫藻の由来に着目して実験を行った。褐虫藻の添加頻度に関しては、シラナミ *Tridacna maxima* を用いた実験から、投与する褐虫藻の密度が高すぎると生残に悪影響を及ぼすことが明らかとなっている。¹⁸⁾ したがって、多すぎる添加頻度は結果として飼育環境中の褐虫藻密度を高めて悪影響を及ぼす可能性があると同時に、褐虫藻を与えなければ共生成立も起こらないため、最適な添加頻度が存在すると予想される。そこで、インキュベーター内での小規模なボトル実験で最適な褐虫藻添加頻度を探った。一方、添加する褐虫藻の由来の効果に関しては、実際の種苗生産規模での実験を実施した。従来のヒレジャコ種苗生産現場では大量の褐虫藻を得るため中・大型ヒレジャコ個体から褐虫藻を抽出して幼生に添加していた。しかし、前述のとおり殻長が大きなヒレジャコと小さなヒレジャコでは褐虫藻の組成が異なる場合が多い。¹⁵⁾ この差異が共生成立率に影響している可能性を考え、殻長 5 cm 程度の小型のヒレジャコ由来褐虫藻を添加する方法と、従来通り殻長 15 cm 程度の中型のヒレジャコ由来褐虫藻を添加する方法、それぞれの共生成立率 (生残率) を比較した。

材料と方法

ヒレジャコからの採卵と幼生の準備 2016 年 5 月 27 日に沖縄県水産海洋技術センター石垣支所において、天然のヒレジャコを母貝としてセロトニンを用いた人工採卵を実施し、^{19–21)} 2 個体のヒレジャコから採卵に成功した。翌 5 月 28 日の観察の結果、925 万個体の幼生 (ベリジャー幼生: D 型幼生) を得ることができたため、以下の実験に用いた。

褐虫藻添加頻度の効果 (インキュベーター内での小規模ボトル実験) 上記の採卵・受精から 1 日後 (5 月 28 日) のヒレジャコ幼生約 500 個体ずつを GF/C フィルター (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) を用いて濾過した海水 1.5 L を入れた 2 L 容、高さ 25 cm、直径 11 cm の円筒形の透明なプラスチックボトル 15 本に収容した。UV 処理やオートクレーブ処理、あるいは 0.2 μm フィルターを用いて滅菌した海水中ではシャコガイ類と褐虫藻の共生成立率が著しく低下することが知られる。²²⁾ しかし、飼育水中への予期せぬ褐虫藻や幼生を捕食するような大型の動物プランクトンの混入は排除する

必要があるため、粒子保持能 $1.2\ \mu\text{m}$ の GF/C フィルターで濾過した海水を使用した。ボトルは 3 本ずつ 5 つのグループに分け、以下のように褐虫藻を添加することとした。1) 毎日添加, 2) 2 日に 1 回添加, 3) 3 日に 1 回添加, 4) 1 週間に 1 回添加, 5) 添加なし。添加する褐虫藻は *Symbiodinium* 属, *Cladocopium* 属, *Durusdinium* 属の褐虫藻培養株で、それぞれを 10 cells/mL ずつ、トータルで褐虫藻密度が 30 cells/mL になるように添加した。これは、実際の種苗生産現場で最初に与える褐虫藻の密度と同じである。褐虫藻培養株のうち *Symbiodinium* 属 (TsIS-H4 株) 及び *Durusdinium* 属 (TsIS-G10 株) はそれぞれヒレジャコ稚貝から単離培養したもの、*Cladocopium* 属 (CCMP2466 株) は Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Algae and Microbiota (ME, USA) から購入した。褐虫藻を添加しないボトルには、褐虫藻培養に使用しているダイゴ IMK 培地 (日本製薬株式会社) を 3 日に 1 回褐虫藻添加区と同量添加した。ボトルは 27°C 、光量 $80\text{--}120\ \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$; 明 12 h : 暗 12 h に設定したインキュベーター内に置き、小型のエアーポンプから弱い通気をすることでボトル内の海水をわずかに流動させた。水替えはせずに 14 日齢時まで褐虫藻の添加を上記 1)–5) の間隔で繰り返し、15 日齢時にボトル内の幼生を目合い $20\ \mu\text{m}$ のフィルターを用いて回収した。回収した幼生はそれぞれのボトルごとに 50 個体以上を倒立顕微鏡下 (CKX41, Olympus) で観察し、A) 殻のみとなった死亡個体、B) 胃に褐虫藻を持つ生残個体、C) 褐虫藻を持たない生残個体、の数をそれぞれ記録した。褐虫藻の有無は、青色の励起光を用いて褐虫藻のクロロフィル自家蛍光を観察することで判断した。なお、褐虫藻が外套膜付近まで到達した「共生成立」の状態⁸⁾にある個体は観察されなかった。回収した幼生は顕微鏡用カメラ (DP73, Olympus) で写真撮影を行い、写真から死亡個体と生残個体それぞれの殻長を Image J (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2018.) を用いて計測した。

添加する褐虫藻の由来の効果 (種苗生産規模での試験)

上記の採卵で得られたヒレジャコ幼生を 5 月 28 日に 111 万個体ずつ、5 kL 水槽 6 基にそれぞれ収容した。なお水槽内には $10\ \mu\text{m}$ ろ過海水が 4 kL ずつ入っている。幼生と褐虫藻の共生を促すため、幼生を水槽に収容してから 2, 4, 6, 9, 11, 13 日後 (日付としては 5 月 30 日, 6 月 1 日, 3 日, 6 日, 8 日, 10 日) にそれぞれヒレジャコから褐虫藻を抽出して添加した。この時、水槽 3 基には従来通り中型 (殻長 15 cm 程度) ヒレジャコ由来の褐虫藻を、残り 3 基の水槽には小型 (殻長 5 cm 程度) ヒレジャコ由来の褐虫藻を添加した。最初の褐虫藻

添加時 (幼生収容 2 日後) には、水槽内の褐虫藻細胞密度が計算上 30 cells/mL になるよう、幼生収容 4 日後の褐虫藻添加時には 10 cells/mL になるよう、幼生収容 6 日後以降の褐虫藻添加時には 5 cells/mL になるように褐虫藻を添加した。褐虫藻の抽出には石垣支所で種苗生産され飼育中のヒレジャコのうち、中型 1 個体と複数の小型個体を用いた。褐虫藻懸濁液の調整は石垣支所で行われている方法を踏襲した。すなわち、800 mL のろ過海水とともに中型ヒレジャコの外套膜部分、あるいは小型ヒレジャコの軟体部全てをそれぞれ家庭用ミキサーにより十分に攪拌し、その液を $170\ \mu\text{m}$ のメッシュでろ過して夾雑物を取り除いた。得られた懸濁液をろ過海水で 1 L にメスアップし、褐虫藻の細胞数を顕微鏡下で計数して懸濁液中の褐虫藻密度を得た。初回の褐虫藻添加時には水槽内の褐虫藻密度を 30 cells/mL にするため、中型ヒレジャコ由来褐虫藻懸濁液は水槽当たり 37 mL、小型ヒレジャコ由来褐虫藻懸濁液は水槽当たり 91 mL を投入した。岩井ら²³⁾の種苗生産方法に従って通気を実施したが、本研究では水槽水の換水は行わずに上段で示したように褐虫藻をそれぞれ添加して飼育を行った。幼生収容から 16 日後に水槽内の幼生を全て回収した。回収した幼生は水槽ごとに 20 L にメスアップし、そのうち 5 mL 分取して生残個体を計数した。各水槽で計数を 3 回ずつ行い、水槽ごとの平均生残個体数を算出し、収容時個体数で割ることで生残率を見積もった。また一部の幼生は顕微鏡下で観察し、生残個体を撮影した写真から殻長を Image J により計測した。

種苗生産水槽内の残存褐虫藻細胞密度 上記種苗生産規模での試験では、各水槽には初回 (幼生収容 2 日後)、30 cells/mL の密度になるように中型・小型ヒレジャコ由来褐虫藻細胞を添加したが、これら褐虫藻が次の褐虫藻添加時 (幼生収容 4 日後) にどの程度残存しているのかを確かめるため、水槽内の褐虫藻細胞の計数を試みた。すなわち、幼生収容 4 日後の褐虫藻添加直前に、各水槽内の飼育水 950 mL を採水した。この時、ヒレジャコ幼生が混入しないように目合い $20\ \mu\text{m}$ のフィルターを用いて飼育水をろ過した。採水した飼育水はさらに目合い $5\ \mu\text{m}$ のフィルターを用いて 10 mL に濃縮し、このうち $10\ \mu\text{L}$ を顕微鏡下で観察して褐虫藻細胞を計数した。計数は各水槽につき 3 回実施し、平均細胞数を算出した後、観察容量と濃縮率を考慮して各水槽内の残存褐虫藻細胞密度を見積もった。

種苗生産規模での試験における褐虫藻の遺伝子型組成 種苗生産試験期間中、水槽には計 6 回褐虫藻を添加したが、それぞれの添加に用いた褐虫藻を一部冷凍保存した。また、種苗生産試験終了時 (幼生収容から 16 日後) に共生成立を顕微鏡下で確認しつつ各水槽 100 個体のヒレジャコ幼生を採取し冷凍保存した。後日各試料から

MightyPrep reagent for DNA (タカラバイオ株式会社)を使用してDNAを抽出した。得られたDNAは10 ng/μLに調整したうえで、*Symbiodinium* 属 (clade A), *Cladocopium* 属 (clade C), そして *Durisdinium* 属 (clade D) の褐虫藻にそれぞれ特異的なPCRプライマー²⁴⁾と TaKaRa EX Taq™ Hot start Version (タカラバイオ株式会社)を用いてPCRを行った。PCRは2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)で、94℃で5分の後、94℃で5秒・63℃で10秒・72℃で15秒を30回繰り返す、最後に72℃で5分の温度条件で実施した。PCR産物は3.5%のPrimeGel Agarose PCR-Sieve HRS (タカラバイオ株式会社)を用いて電気泳動し、増幅の有無から各サンプル中の褐虫藻遺伝子型組成を把握した。

統計解析 インキュベーター内での小規模ボトル実験における実験終了時の生残率及び胃に褐虫藻が認められる幼生の割合における検定はそれぞれ、ボトルごとの「生残個体と死亡個体」及び「褐虫藻を持つ個体と褐虫藻を持たない個体」の計数値を目的変数、褐虫藻の添加回数を比率変数型の説明変数として各ボトルのランダム効果を考慮した一般化線形混合モデル (GLMM) を構築することで行った。この際、確率分布は二項分布としてlink関数はlogitを使用した。構築したモデル (M1) の説明変数から添加回数を除いた節約モデル (M2) も用意し、両モデル間でF検定を実施することで添加回数の効果が有意かどうかを検討した。²⁵⁾ なお、胃に褐虫藻が認められる幼生の割合の解析においては、褐虫藻が存在し得ない褐虫藻非添加区のデータは除外した。F検定ではモデルM1とM2それぞれの逸脱度と自由度を用いて、 $[(M2 \text{ と } M1 \text{ の逸脱度の差}) / (M2 \text{ と } M1 \text{ の誤差自由度の差})] / (M1 \text{ の逸脱度} / M1 \text{ の誤差自由度})$ の式によりF比を計算した。生残個体の殻長と死亡個体の殻長に関しては、各褐虫藻添加区で生残率が異なったことから、各ボトルで計測できた個体数にばらつきがあった。そのため、それぞれ各ボトル内で平均した殻長を解析に用いた。ボトル毎の平均殻長を目的変数、褐虫藻の投与回数を比率型の説明変数として回帰モデルを構築した。このモデルは2次の項を含んだ二次曲線を想定した。種苗生産規模での試験においては、以下に述べる3つの目的変数がそれぞれ、水槽に添加した褐虫藻の由来 (中型ヒレジャコか小型ヒレジャコか) によって異なるかどうかを個別にWelchのt検定を用いて検討した。一つ目の目的変数は、幼生収容4日後の各水槽内の残存褐虫藻細胞密度を見積もるために計数した褐虫藻細胞数 (各水槽3回計数した合計数)、二つ目は生残率を算出するために計数した幼生の個体数 (3回計数した合計数)、三つ目が各水槽の生残個体の平均殻長である。水槽に添加した褐虫藻の遺伝子型組成については、計6回の添加のうち中型・小型ヒレジャコから *Symbio-*

dinium 属 (clade A), *Cladocopium* 属 (clade C), *Durisdinium* 属 (clade D) の褐虫藻がそれぞれ何回検出されたか (出現頻度) をフィッシャーの正確確率検定に供して、添加した褐虫藻の組成が異なるかどうかを検討した。同様に試験終了後の幼生においても、中型・小型ヒレジャコ由来褐虫藻を添加した3水槽ごとにそれぞれの褐虫藻の出現頻度をフィッシャーの正確確率検定に供して、褐虫藻の組成が異なるかどうかを検討した。全ての解析はR version 3.6.3²⁶⁾を用いて行い、GLMMはパッケージglmmML²⁷⁾により、線形回帰モデルとWelchのt検定およびフィッシャーの正確確率検定はそれぞれRの標準実装パッケージstatsにより実行した。すべての検定において有意水準を $p=0.05$ とした。

結 果

褐虫藻の添加頻度の効果 (インキュベーター内での小規模ボトル実験) 実験終了時 (15日齢時) の生残個体の割合と胃に褐虫藻が認められる幼生の割合をFig. 1(a)に示す。GLMMにより褐虫藻の添加頻度の効果を見積もった際、生残に対して褐虫藻の添加頻度は有意な影響を与えなかったが ($p=0.562$; $F=(1.48611/1)/(50.11478/12)=0.356$)、生残率 [平均値 (最小値-最大値) %] は褐虫藻を2日に1回与える区で最高の54.3 (25.0-69.4) % となり、1週間に1回与える区で最低の16.3 (6.4-24.7) % となった。毎日褐虫藻を与えた場合、生残率は35.6 (21.4-53.5) % となり、2日に1回与える区よりもわずかに低くなった。褐虫藻を与えていない区においては生残率が29.8 (24.7-36.6) % で、3日に1回与える区では20.3 (8.3-31.7) % であった。Fig. 1(b)のような胃の中に褐虫藻を持つ幼生の割合は、褐虫藻を2日に1回与える区で最高の46.8 (23.4-61.6) % となり、最低は1週間に1回与える区の8.3 (5.1-14.0) % であった。毎日褐虫藻を与えた場合は33.1 (20.0-50.5) % であり、2日に1回与える場合よりも低かったが、3日に1回与えた場合の17.7 (5.0-28.6) % よりも高かった。ただし、褐虫藻を与えていない区を除いたGLMMにより褐虫藻の添加頻度の効果を見積もったが、胃の中に褐虫藻を持つ幼生の割合に対して褐虫藻添加頻度の効果は認められなかった ($p=0.369$; $F=(3.867982/1)/(38.93291/9)=0.894$)。褐虫藻を与えない区では培地のみを添加していたが、その結果珪藻の増殖が確認された (Fig. 1c)。

実験終了時の生残個体と死亡個体の殻長をそれぞれ各褐虫藻添加回数でプールしたものをFig. 2に示す。生残個体の殻長は最大で2日に1回褐虫藻を与えた区の $184.4 \pm 9.4 \mu\text{m}$ ($n=88$, 平均 $\pm$ SD) で、最小は1週間に1回与えた区の $166.8 \pm 8.3 \mu\text{m}$ ($n=27$) であった。毎日与えた区では $175.5 \pm 9.9 \mu\text{m}$ ($n=58$)、3日に1回与

Fig. 1 (a) Percentages of surviving *Tridacna squamosa* larvae (gray bars) and larvae with symbiodiniacean cells (black bars) when larvae were supplied cultured symbiodiniacean cells. Error bars indicate standard deviations of three experimental bottles. (b) Fluorescence micrograph of larvae with symbiodiniacean cells. The red fluorescent dots show symbiodiniacean cells in the larval stomach. (c) Fluorescence micrograph of larvae in the bottle not supplied with symbiont cells. Unexpected unknown diatoms grew within the bottles. (b) and (c) were taken under blue light excitation. The transparent individuals seen in micrographs are dead larvae. All of the observations were conducted at a larval age of 15 days (at the end of the experiment).

Fig. 2 Shell lengths of surviving (a) and dead (b) *Tridacna squamosa* larvae. The numbers shown above each box-and-whisker plot indicate the number of measured individuals (a total of three experimental bottles per treatment). Shell lengths were measured at a larval age of 15 days (at the end of the experiment).

えた区では $176.8 \pm 7.9 \mu\text{m}$ ($n = 29$), 褐虫藻を与えなかった区では $172.5 \pm 9.0 \mu\text{m}$ ($n = 43$) であった。生残個体の殻長は上に凸の放物線の形状に見えるが、2次の項を含んだ回帰モデルでは回帰式に褐虫藻添加回数の2次の項は影響を与えなかった ($p = 0.0828$)。死亡個体の殻長は最大が2日に1回与えた区の $160.8 \pm 12.9 \mu\text{m}$ ($n = 56$), 最小が毎日与えた区の $150.8 \pm 9.2 \mu\text{m}$ ($n = 46$) であった。1週間に1回与えた区では $155.2 \pm 10.9 \mu\text{m}$ ($n = 81$), 3日に1回与えた区では $159.8 \pm 11.8 \mu\text{m}$ ($n = 44$), 褐虫藻を与えなかった区では $151.8 \pm 10.3 \mu\text{m}$ ($n = 56$) であった。2次の項を含んだ回帰モデルにより各ボトルの死亡個体の平均殻長に対する褐虫藻添加回数の効果を見積もったところ、回帰式に褐虫藻添加回数の2次の項が有意な影響を与えていた ($p = 0.00296$)。

添加する褐虫藻の由来の効果(種苗生産規模での試験)
幼生に添加する褐虫藻を抽出したヒレジャコの個体数・

殻長を Table 1 に示す。中型ヒレジャコは合計で6個体、小型ヒレジャコは44個体を使用し、それぞれの殻長の平均とSDは $16.7 \pm 1.8 \text{ cm}$, $4.1 \pm 0.4 \text{ cm}$ であった。幼生収容4日後の水槽内における残存褐虫藻細胞密度を中型ヒレジャコ由来褐虫藻添加区と小型ヒレジャコ由来褐虫藻添加区で計算したところ、前者の水槽1, 2, 3ではそれぞれ6.7, 7.4, 11.6 cells/mL, 後者の水槽1, 2, 3ではそれぞれ3.9, 3.5, 2.1 cells/mLであった (Fig. 3)。水槽内の残存褐虫藻細胞数は小型ヒレジャコ由来褐虫藻添加区のほうが少ないものの、統計的な有意差は認められなかった ($p = 0.05961$, $t = 3.3112$, $df = 2.4812$)。実験終了時の中型ヒレジャコ由来褐虫藻添加区と小型ヒレジャコ由来褐虫藻添加区のヒレジャコ幼生生存率を Fig. 4 に示す。従来通り中型ヒレジャコ由来褐虫藻を添加した3基の水槽の幼生の生存率〔平均値(最小値-最大値) %〕は9.4(8.0-10.9) % で、今回新た

Table 1 Shell lengths and Symbiodiniaceae genetic compositions of *Tridacna squamosa* used to extract algal cells which were supplied to larvae

Date of algal supply	Squeezed <i>Tridacna squamosa</i>		Sym. genetic comp.
	Number (indiv.)	Size (cm: AVE $\pm$ SD)	
30 th May	medium : 1	13.8	A, C, D
	small : 10	4.4 $\pm$ 0.2	A, C, D
1 st June	medium : 1	17.6	A, C
	small : 8	4.4 $\pm$ 0.1	A, C, D
3 rd June	medium : 1	16.6	A, C
	small : 7	4.0 $\pm$ 0.1	A, C, D
6 th June	medium : 1	19.2	C, D
	small : 7	3.7 $\pm$ 0.2	C, D
8 th June	medium : 1	17.7	A, C
	small : 6	3.8 $\pm$ 0.2	C, D
10 th June	medium : 1	15.3	A, C
	small : 6	4.4 $\pm$ 0.3	A, C, D

Sym. genetic comp. A = Clade A = genus *Symbiodinium*, C = Clade C = genus *Cladocopium*, and D = Clade D = genus *Durussdinium*.

Fig. 3 Symbiodiniaceae cell densities within the experimental tanks. Observations were made 2 days after the initial addition of symbiodiniacean cells to achieve a final density of 30 cells/mL in tanks.

に試した小型ヒレジャコ由来褐虫藻を添加した3基の生残率は21.4(20.9–21.7)%であった。各水槽の生残個体数の計数値を用いて Welch の *t* 検定を行った結果、生残個体数は小型ヒレジャコ由来の褐虫藻を与えた区で有意に高かった ($p=0.002665$, $t=-13.719$, $df=2.355$)。

回収した幼生を一部、蛍光顕微鏡下で観察して褐虫藻の共生状態を確認した (電子付録の Fig S1)。中型ヒレジャコ由来褐虫藻を添加した場合、小型ヒレジャコ由来褐虫藻を添加した場合、いずれの水槽においても100個体以上の生残幼生を観察した。その結果、小型ヒレジャコ褐虫藻を添加した水槽の1つで、縁辺部まで褐虫藻がわずかに到達していない個体が2個体だけ観察されたが、残りの幼生は全て縁辺部まで褐虫藻が到達する共生成立の状態であった。回収した生残個体の殻長の

Fig. 4 Percentages of surviving *Tridacna squamosa* larvae when supplied with symbiodiniacean cells extracted from medium or small-sized *T. squamosa*. Observation was conducted at 16 days after the start of the tank experiment. **Fig. 5** Shell lengths of surviving *Tridacna squamosa* larvae within each experimental tank at 16 days after the start of the tank experiment. The numbers shown above each box-and-whisker plot indicate the number of measured individuals.

平均値は、中型ヒレジャコ由来褐虫藻添加区で $320.2 \pm 47.6 \mu\text{m}$ (平均 $\pm$ SD, $n=237$)、小型ヒレジャコ由来褐虫藻添加区で $329.5 \pm 45.5 \mu\text{m}$ ($n=249$) であった (Fig. 5)。ただし、各水槽の平均殻長を用いて Welch の *t* 検定を行ったが、添加した褐虫藻の由来による有意な差は認められなかった ($p=0.8731$, $t=-0.17511$, $df=2.7533$)。

種苗生産規模での試験における褐虫藻の遺伝子型組成に添加した中型・小型ヒレジャコ由来褐虫藻及びそれらを添加して得られた共生成立個体 (水槽別) の褐虫藻の遺伝子型組成を Table 1, Table 2 および電子付録 Fig. S2 に示す。褐虫藻の添加は計6回実施し、中型ヒレジャコ由来褐虫藻からは *Symbiodinium* 属が5回、*Cladocopium* 属が6回、*Durussdinium* 属が2回検出され、小型ヒレジャコ由来褐虫藻からは *Symbiodinium* 属が4回、*Cladocopium* 属が6回、*Durussdinium* 属が6回検出された。中型ヒレジャコで *Durussdinium* 属の検出回数が少ないものの、各褐虫藻の検出頻度に中型・小型間で有意な差は認められなかった ($p=0.413$)。これらの褐虫藻

Table 2 Symbiodiniaceae genetic compositions within symbiosis-established larvae at 16 days after the start of the tank experiment

Origin of supplied sym. cells	Tank No.	Sym. genetic comp.
Medium clam	1	A, C, D
	2	A, C, D
	3	A, C, D
Small clam	1	A, C, D
	2	C, D
	3	D

Sym. genetic comp. A = Clade A = genus *Symbiodinium*, C = Clade C = genus *Cladocopium*, and D = Clade D = genus *Durusrdinium*.

を添加して得られた共生成立個体の遺伝子型組成は、中型ヒレジャコ由来褐虫藻添加区では全ての水槽で *Symbiodinium* 属、*Cladocopium* 属、*Durusrdinium* 属の褐虫藻がすべて検出された。一方、小型ヒレジャコ由来褐虫藻添加区では、すべての褐虫藻が検出された水槽は1水槽のみで、*Cladocopium* 属と *Durusrdinium* 属の褐虫藻だけが検出された水槽と *Durusrdinium* 属のみが検出された水槽がそれぞれ1つずつであった。検出頻度に言い換えると、*Symbiodinium* 属、*Cladocopium* 属、*Durusrdinium* 属が中型ヒレジャコ由来褐虫藻添加区ではそれぞれ3回ずつ、小型ヒレジャコ由来褐虫藻添加区ではそれぞれ1回、2回、3回であり、両実験区で検出頻度に統計的な有意差は認められなかった ($p = 0.820$)。

考 察

褐虫藻添加頻度の効果（インキュベーター内での小規模ボトル実験） 褐虫藻の添加頻度を変えてヒレジャコ幼生を飼育したところ、統計的な有意差はないものの、生残率と胃の中に褐虫藻を持つ幼生の割合は2日に1回の褐虫藻添加で最も高くなった。これらは共に毎日褐虫藻を添加すると低くなる傾向が見られた。シラナミにおいても褐虫藻添加密度が高いとかえって生残率が低くなることが明らかとなっている。¹⁸⁾ シャコガイ類の種苗生産時には幼生の周りに遊泳状態の褐虫藻が集まる現象がしばしば観察される。^{28,29)} 幼生が放出するアンモニア等の物質に褐虫藻が誘引されるためだと考えられるが、³⁰⁾ 過剰な褐虫藻を添加した場合には幼生の周りに大量の褐虫藻が集積してしまい、¹⁸⁾ 幼生にとってはストレスになるのかもしれない。回帰式の2次の項が有意でないため、生残個体の殻長を最大化する添加頻度は不明である。一方、死亡個体の殻長は2日に1回褐虫藻を与える区のほうが、1週間に1回褐虫藻を与える区、および全く褐虫藻を与えなかった区よりも大きかった。こ

れらは褐虫藻の添加頻度が多すぎても少なすぎても幼生は早い段階で死亡してしまう、あるいは成長が期待できないことを示唆している。今回の室内実験では、生残率、胃の中に褐虫藻を持つ幼生の割合、生残個体の殻長、死亡個体の殻長の最大値は全て2日に1回褐虫藻を与える区で記録されたため、適度な添加頻度が効果的である可能性が示唆されるが、反復数を増やしたより詳細な検討が必要である。

生残個体の殻長が最も大きかった2日に1回褐虫藻を与えた区であっても、褐虫藻が幼生の縁辺部まで達する「共生成立」の状態の幼生は確認されなかった。したがって、褐虫藻の光合成が幼生の成長に寄与した可能性は低い。シャコガイ類の成体は体内で増殖した褐虫藻を消化する可能性が示唆され、^{31,32)} 幼生時の透過型電子顕微鏡観察でも消化されたと思われる褐虫藻が胃の部分で観察されることから、⁸⁾ 幼生期であってもシャコガイ類は褐虫藻を直接消化して餌として利用していると考えられる。⁸⁾ 今回の観察においても、生残幼生の殻長と胃に褐虫藻を持つ幼生の割合の結果、そして褐虫藻以外に餌となる微細藻類を添加していないことを考慮すると、幼生は取り込んだ褐虫藻の一部を餌として利用して生存・成長していた可能性が考えられる。褐虫藻以外の餌となる微細藻類（例えば *Isochrysis* 等）の添加により初期生残や成長の向上が報告されているため、³³⁾ 幼生への餌微細藻類の添加を推奨する場合も多い。³⁴⁾ しかし、餌となる微細藻類の維持管理に大きな労力がかかることから、大城(私信)は餌となる微細藻類の培養・給餌をせずに、減耗を想定した上で採卵数を増やすことを試みた。沖縄県ではこの方法が現在も踏襲されている。実際、餌の添加は幼生と褐虫藻の共生成立率の向上に寄与しない場合もある。³⁵⁾ 今回の観察でも、褐虫藻を与えない区であっても幼生は生残しており、その際、混入した珪藻等の増殖が認められた。消化された珪藻等が幼生の胃から検出されていることから、⁸⁾ 幼生はこれらの微細藻類を餌として利用していた可能性が考えられる。沖縄県の過去のヒメジャコ種苗生産では受精後1週間程度は餌微細藻類のみで飼育をしていたが、その場合においても1週間後の生残率が50%程度であった。²⁹⁾ 初期の段階では褐虫藻との共生成立よりもむしろ餌を切らさず、飢餓状態を作り出さないことが重要であると考えられる。褐虫藻のみを添加する種苗生産法の場合、共生ソースであると同時に餌でもあると考えられる褐虫藻は頻繁に添加する必要があるが、与えすぎるとかえって生残や成長が悪くなる可能性があるため注意が必要である。

添加する褐虫藻の由来の効果（種苗生産規模での試験） 幼生収容2日後に30 cells/mLの密度になるように褐虫藻を添加したが、収容4日後の褐虫藻添加直前では、中型ヒレジャコ由来褐虫藻添加水槽の褐虫藻細胞密度は

平均 8.5 cells/mL, 小型ヒレジャコ由来褐虫藻添加水槽では 3.2 cells/mL と減少が見られた。水槽内での褐虫藻の自然死や水槽壁面への付着, 集積なども含まれると考えられるが, 幼生が褐虫藻を取り込んだと考えられる。統計的な有意差は認められなかったものの, 中型ヒレジャコ由来褐虫藻添加水槽よりも小型ヒレジャコ由来褐虫藻添加水槽のほうが残存褐虫藻数は少ない傾向にあった。小型ヒレジャコ由来褐虫藻は軟体部を全てすりつぶして添加しているため, ヒレジャコ体内の何らかの物質が幼生の褐虫藻取り込みを促進させたのかもしれない。実際, サンゴの幼生では褐虫藻と同時にアルテミアの抽出物を添加することでサンゴ幼生の捕食活動が刺激され, 褐虫藻の取り込みが促進される例が報告されている。³⁶⁾ 約 2 週間後の取り上げ時においては, 小型ヒレジャコ由来褐虫藻を添加することで, 従来の中型ヒレジャコ由来褐虫藻を添加した場合に比べて約 2 倍の生残率を得た。沖縄県のシャコガイ類種苗生産では共生成立時の平均生残率は 5% 程度であることを考えると,³⁷⁾ 本研究で得られた約 20% の生残率は極めて高い生残率であった。しかし, 今回はわずかに 3 つずつの水槽でのみ試験を行っているため, 今後規模を拡大したより詳細な試験が必要である。実験終了時の幼生を蛍光顕微鏡下で観察したところ, 2 個体のみ褐虫藻がわずかに縁辺部まで達していなかったものの, 他の生残個体 (約 900 個体) は全て共生成立状態であった。したがって, この時点での生残率はほぼ共生成立率と言い換えることができる。

ただし, 小型のヒレジャコに由来する褐虫藻を添加することが, 幼生の共生成立率 (生残率) 向上にとってどのような効果を持つのかは判然としない。今回, 水槽には中型ヒレジャコと小型ヒレジャコから抽出した褐虫藻をそれぞれ 6 回ずつ添加した。水槽に添加した褐虫藻は Ikeda *et al.*¹⁵⁾ と同様に小型ヒレジャコでは毎回 *Durusdinium* 属の褐虫藻が検出された。これは中型ヒレジャコからは 2 回のみ (5 月 30 日と 6 月 6 日) の検出であったが, 褐虫藻の組成に中型・小型間で統計的な差は認められなかった。一方, 統計的な差は認められなかったものの, 中型ヒレジャコ由来褐虫藻を添加した全ての水槽で共生成立した幼生から全ての褐虫藻が検出され, 小型ヒレジャコ由来褐虫藻添加区では全ての褐虫藻が幼生から検出できたのは 1 水槽のみであった。中型ヒレジャコ由来褐虫藻を添加する従来法の水槽の幼生の生残率は小型ヒレジャコ由来褐虫藻を添加する新法のそれより有意に低いため, 褐虫藻の多様性が幼生の生残率の向上に寄与するとは必ずしも言えない。実際, 小型ヒレジャコ由来褐虫藻添加区では, 全ての褐虫藻が検出された水槽 1 の幼生の生残率は 20.9% であり, *Durusdinium* 属の褐虫藻しか検出されていない水槽 3 の幼生

の生残率も 21.5% と遜色ない結果であった。一方, *Durusdinium* 属の褐虫藻に着目すると, すべての水槽の共生成立幼生から検出されていた。殻長の小さなヒレジャコから *Durusdinium* 属の褐虫藻が検出されるとした Ikeda *et al.*¹⁵⁾ の結果と, 今回の結果を合わせて考えると, ヒレジャコにおいては共生初期にこの褐虫藻が必要な時期があるのかもしれない。幼生や幼体と成体で共生する褐虫藻の組成が大きく異なる現象はサンゴでも見られる。³⁸⁾ 本研究により, 複数の小型ヒレジャコ由来褐虫藻を添加することでヒレジャコ幼生の共生成立率 (生残率) が向上される可能性が示唆された。しかし, そのメカニズムについてはまだ不明な点が多く残されている。カギとなる要因を効率よく検討するためには, インキュベーターなどを用いた小規模な室内実験が有効である。しかし, 本研究のように共生成立まで至らない場合も多いため, 小規模な室内実験であっても安定的に共生成立に至る実験方法の確立も重要である。また, 本研究では種苗生産規模の実験で添加する褐虫藻の由来のみを検討したが, シャコガイ幼生が褐虫藻を取り込むためには, 水槽内で褐虫藻と出会う必要がある。現状では幼生が沈降しないように, 飼育初期は強めの通気で飼育しているが,²³⁾ さらなる共生成立率の向上のためには褐虫藻と幼生の遭遇率を上げるような水槽水の攪拌方法等を含む, 飼育システム全般の見直しも必要であると考えられる。

謝 辞

沖縄県水産海洋技術センター石垣支所の呉屋秀夫 農林水産技能員には種苗生産試験を補助いただいた。水産研究・教育機構 水産技術研究所の栗原健夫博士には草稿について助言をいただいた。本研究は JSPS 科研費 JP 26660164 の助成を受けたものです。

文 献

- 1) 井上 顕. 石垣島における観光客のシャコガイ需要調査 (シャコガイ種苗生産事業). 沖縄県水産海洋技術センター事業報告書, 沖縄県. 2011; **72**: 74-77.
- 2) Neo ML, Wabnitz CCC, Braley RD, Heslinga GA, Fauvelot C, Van Wynsberge S, Andréfouët S, Waters C, Tan AS-H, Gomez ED, Costello MJ, Todd PA. Giant clams (Bivalvia: Cardiidae: Tridacninae): a comprehensive update of species and their distribution, current threats and conservation status. In: Hawkins SJ, Evans AJ, Dale AC, Firth LB, Hughes DJ, Smith IP (eds) *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 2017; **55**: 2-303.
- 3) Ramah S, Taleb-Hossenkan N, Todd PA, Neo ML, Bhagooli R. Drastic decline in giant clams (Bivalvia: Tridacninae) around Mauritius Island, Western Indian Ocean: implications for conservation and management. *Mar. Biodivers.* 2019; **49**: 815-823. <https://doi.org/10.1007/s12526-018-0858-9>
- 4) Trench RK, Wetthey DS, Porter JW. Observations on the

- symbiosis with zooxanthellae among the Tridacnidae (Mollusca, Bivalvia). *Biol. Bull.* 1981; **161**: 180–198.
- 5) Klumpp DW, Lucas JS. Nutritional ecology of the giant clams *Tridacna tevoroa* and *T. derasa* from Tonga: influence of light on filter-feeding and photosynthesis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1994; **107**: 147–156.
 - 6) Fitt WK, Trench RK. Spawning, development, and acquisition of zooxanthellae by *Tridacna squamosa* (Mollusca, Bivalvia). *Biol. Bull.* 1981; **161**: 213–235.
 - 7) Norton JH, Shepherd MA, Long HM, Fitt WK. The zooxanthellal tubular system in the giant clam. *Biol. Bull.* 1992; **183**: 503–506.
 - 8) Hirose E, Iwai K, Maruyama T. Establishment of the photosymbiosis in the early ontogeny of three giant clams. *Mar. Biol.* 2006; **148**: 551–558.
 - 9) Pochon X, Gates RD. A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawai'i. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2010; **56**: 492–497.
 - 10) LaJeunesse TC, Parkinson JE, Gabrielson PW, Jeong HJ, Reimer JD, Voolstra CR, Santos SR. Systematic revision of Symbiodiniaceae highlights the antiquity and diversity of coral endosymbionts. *Curr. Biol.* 2018; **28**: 2570–2580.
 - 11) Nitschke MR, Craveiro SC, Brandão C, Fidalgo C, Serôdio J, Calado AJ, Frommlet JC. Description of *Freudenthalidium* gen. nov. and *Halluxium* gen. nov. to formally recognize clades Fr3 and H as genera in the family Symbiodiniaceae (Dinophyceae). *J. Phycol.* 2020; **56**: 923–940. <https://doi.org/10.1111/jpy.12999>
 - 12) Baillie BK, Belda-Baillie CA, Maruyama T. Conspecificity and indo-pacific distribution of *Symbiodinium* genotypes (Dinophyceae) from giant clams. *J. Phycol.* 2000; **36**: 1153–1161.
 - 13) Lim SSQ, Huang D, Soong K, Noe NL. Diversity of endosymbiotic Symbiodiniaceae in giant clams at Dongsha Atoll, northern South China Sea. *Symbiosis.* 2019; **78**: 251–262. <https://doi.org/10.1007/s13199-019-00615-5>
 - 14) DeBoer TS, Baker AC, Erdmann MV, Ambariyanto, Jones PR, Barber PH. Patterns of Symbiodinium distribution in three giant clam species across the biodiverse Bird's head region of Indonesia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2012; **444**: 117–132. doi: 10.3354/meps09413
 - 15) Ikeda S, Yamashita H, Kondo SN, Inoue K, Morishima SY, Koike K. Zooxanthellal genetic varieties in giant clams are partially determined by species-intrinsic and growth-related characteristics. *PLoS ONE* 2017; **12**(2): e0172285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172285>
 - 16) 岩井憲司, 呉屋秀夫, 斉藤伸哉, 藤森 誠. シャコガイ増養殖技術開発事業 (種苗生産). 平成 13 年度沖縄県水産試験場事業報告書, 沖縄県. 2003: 162–168.
 - 17) Kurihara T, Fuseya R, Katoh M, Inoue K. Possibility of self-fertilization during hatchery culturing of giant clam, *Tridacna crocea*. *Plankton Benthos Res.* 2010; **5**: 11–16.
 - 18) 井上 顕, 岸本和雄. 共生藻密度と共生藻宿主貝の種類の違いがシラナミ幼生の生残に与える影響 (シラナミ種苗量産技術開発事業). 沖縄県水産海洋技術センター事業報告書, 沖縄県. 2009; **70**: 83–85.
 - 19) Braley RD. Serotonin-induced spawning in giant clams (Bivalvia: Tridacnidae). *Aquaculture* 1985; **47**: 321–325.
 - 20) 村越正慶, 宇佐美智恵子. 5. シャコガイの種苗生産に関する試験. 昭和 59 年度 保護水面管理事業報告書 (貝類・藻場), 沖縄県水産試験場八重山支場, 沖縄県. 1985; 14–18.
 - 21) 南 洋一. 水産海洋研究, 県単独事業 (セロトニン塩酸塩を使ったヒレジャコ産卵誘発技術開発). 沖縄県水産海洋技術センター事業報告書, 沖縄県. 2018; **78**: 12.
 - 22) Kurihara T, Yamada H, Inoue K, Iwai K, Hatta M. Impediment to symbiosis establishment between giant clams and *Symbiodinium* algae due to sterilization of seawater. *PLoS ONE* 2013; **8**(4): e61156. doi:10.1371/journal.pone.0061156
 - 23) 岩井憲司, 久保弘文, 呉屋秀夫, 竹内仙二, 高橋尚子. シャコガイ生産事業. 平成 14 年度沖縄県水産試験場事業報告書, 沖縄県. 2006; 185–195.
 - 24) Yamashita H, Suzuki G, Hayashibara T, Koike K. Do corals select zooxanthellae by alternative discharge? *Mar. Biol.* 2011; **158**: 87–100.
 - 25) Dobson AJ, Barnett AG. An introduction to generalized linear models. 3rd edn. 307 pp. CRC Press, New York, 2008.
 - 26) R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020; URL <https://www.R-project.org/>.
 - 27) Brostrom G. glmmML: Generalized linear models with clustering. R package version 1.1.0. 2019; <https://CRAN.R-project.org/package=glmmML>.
 - 28) Fitt WK. The role of chemosensory behavior of *Symbiodinium microadriaticum*, intermediate hosts, and host behavior in the infection of coelenterates and molluscs with zooxanthellae. *Mar. Biol.* 1984; **81**: 9–17.
 - 29) 村越正慶. シャコガイ類. 「サンゴ礁域の増養殖」(諸喜田茂充編著) 緑書房, 東京. 1988; 248–261.
 - 30) Fitt WK. Chemosensory responses of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 1985; **21**: 62–67.
 - 31) Fankboner PV. Intracellular digestion of symbiotic zooxanthellae by host amoebocytes in giant clams (Bivalvia: Tridacnidae), with a note on the nutritional role of the hypertrophied siphonal epidermis. *Biol. Bull.* 1971; **141**: 222–234.
 - 32) Maruyama T, Heslinga GA. Fecal discharge of zooxanthellae in the giant clam *Tridacna derasa*, with reference to their in situ growth rate. *Mar. Biol.* 1997; **127**: 473–477.
 - 33) Fitt WK, Fisher CR, Trench RK. Larval biology of tridacnid clams. *Aquaculture* 1984; **39**: 181–195.
 - 34) Mingoa-Licuanan SS, Gomez ED. Giant clam hatchery, ocean nursery and stock enhancement. Tigbauan, Iloilo, Philippines: SEAFDEC Aquaculture Department. Aquaculture extension manual no. 37. 2007.
 - 35) Kurihara T, Yamashita H, Yamada H, Inoue K, Iwai K, Koike K. Probability of symbiosis establishment by giant clams with fresh and cultured *Symbiodinium* isolated from various host animals. *J. Shellfish Res.* 2012; **31**: 977–987.
 - 36) Schwarz JA, Krupp DA, Weis VM. Late larval development and onset of symbiosis in the scleractinian coral *Fungia scutaria*. *Biol. Bull.* 1999; **196**: 70–79.
 - 37) Iwai K, Kiso K, Kubo H. Biology and status of aquaculture for giant clams (Tridacnidae) in the Ryukyu Islands, southern Japan. In: Primavera JH, Qunitio ET, Eguia MRR (eds). *Proceedings of the Regional Technical Consultation on Stock Enhancement for Threatened Species of International Concern*. Southeast Asian Fisheries Development Center Aquaculture Department, Philippines: 2006; 27–38.
 - 38) Yamashita H, Suzuki G, Hayashibara T, Koike K. *Acropora* recruits harbor “rare” *Symbiodinium* in the environmental pool. *Coral Reefs* 2013; **32**: 355–366.