

**ΤΕΙ ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ
ΣΧΟΛΗ Σ.Τ.Ε.Γ.
ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ-ΑΛΙΕΙΑΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΕ ΤΙΤΛΟ**

**Η ΤΕΧΝΗΤΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΘΗΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΤΑ
ΤΗΝ ΕΚΤΡΟΦΗ ΤΩΝ ΜΑΡΓΑΡΙΤΟΦΟΡΩΝ ΣΤΡΕΙΔΙΩΝ ΤΩΝ
ΕΙΔΩΝ:**

**PINCTADA MARGARITIFERA
PINCTADA MAXIMA
PINCTADA FUCATA**



Τ.Ε.Ι. ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
Αριθμ. Εισαγωγής **579**

**ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΝΙΚΟΛΑΟΥ ΜΑΡΙΑ
ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ : ΤΣΙΑΜΠΑΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή

1.α. Γενικά

1.β. Δημιουργία, μορφές και ποιότητες μαργαριταριών (*Pinctada*).

1.γ. Εκτροφή μαργαριτοφόρων στρειδιών γενικά.

1.δ. Τυπική εκτροφή του Ιαπωνικού είδους στρειδιού *Pinctada fucata*

1.δ.1. Ανάπτυξη του μαργαριτοφόρου στρειδιού

1.δ.2. Τοποθέτηση του πυρήνα

1.δ.3. Καλλιέργεια - συγκομιδή.

1.δ.4. Επεξεργασία των μαργαριταριών.

1.ε. Μαργαριτάρια και χρωματισμός.

2. Τεχνητή αναπαραγωγή, εκτροφή προνυμφών και νεαρών μαργαριτοφόρων στρειδιών και Θνησιμότητα του *Pinctada margaritifera*.

2.α. Τεχνητή αναπαραγωγή και εκτροφή προνυμφών και νεαρών μαργαριτοφόρων στρειδιών.

2.α.1. Εισαγωγή.

2.α.2. Υλικά και μέθοδοι.

2.α.3. Αποτελέσματα

2.α.4. Συζήτηση - Συμπεράσματα

2.β. Θνησιμότητα του *Pinctada margaritifera*.

2.β.1. Εισαγωγή

2.β.2. Περιοχή της μελέτης

2.β.3. Υλικά και μέθοδοι.

2.β.4. Αποτελέσματα

2.β.4.1. Οργανισμοί που προκαλούν ρύπανση στην καλλιέργεια των στρειδιών.

2.β.4.2. Οι θηρευτές συμβιωτικοί οργανισμοί και παράσιτα.

2.β.4.3. Γενική εξωτερική εμφάνιση των νεκρών στρειδιών.

2.β.4.4. Έρευνα για τις πιθανές αιτίες της θνησιμότητας.

2.β.5. Συμπεράσματα

3. Τεχνητή αναπαραγωγή εκτροφή προνυμφών και νεαρών μαργαριτοφόρων στρειδιών και θνησιμότητα του *Pinctada maxima*.

3.α. Αναπαραγωγικός κύκλος στην Δυτική Αυστραλία του *Pinctada maxima*.

3.α.1. Εισαγωγή

3.α.2. Υλικά και μέθοδοι.

3.α.2.1. Συλλογή γονάδων.

3.α.2.2. Στάδια της ανάπτυξης των γονάδων.

3.α.2.3. Ποσοτική ανάλυση των ιστολογικών στοιχείων.

3.α.2.4. Γοναδική ανάπτυξη εκτρεφόμενων στρειδιών.

3.α.2.5. Εκκολαπτήρια και φυσικοί χώροι ωοτοκίας.

3.α.3. Αποτελέσματα

3.α.3.1. Φυλετικότητα.

3.α.3.2. Αναπαραγωγικός κύκλος.

3.α.4. Συζήτηση - Συμπεράσματα

3.α.4.1. Γαμετογένεση

3.α.4.2. Αναπαραγωγικός κύκλος.

3.β. Θνησιμότητα του *Pinctada maxima* στην Δυτική Αυστραλία.

3.β.1. Εισαγωγή

3.β.2. Τεχνικές διαχείρισης

3.β.3. Πειράματα πεδίου.

3.β.4. Διερεύνηση της νόσου.

3.β.5. Αναλυτικές μέθοδοι.

3.β.6. Αποτελέσματα

3.β.6.1. Περιβαντολογικοί παράγοντες.

3.β.6.2. Πειράματα πεδίου

3.β.6.3. Διερεύνηση της νόσου.

3.β.7. Συζήτηση - Συμπέρασμα.

4. Παραγωγή γόνου και εκτροφή προνυμφών του *Pinctada fucata*.

4.1. Εισαγωγή

4.2. Υλικά και μέθοδοι.

4.3. Αποτελέσματα.

4.4. Συζήτηση - Συμπέρασμα

Σαν ένα είδος καταγόμενο από τα νησιά και μ'ένα ευνοϊκό οικοσύστημα για την καλλιέργειά του, η ενδεχόμενη παραγωγή για μαύρα μαργαριτάρια έχει καταστεί ενδεδειγμένη. (Alagarswami 1983). Μία τέτοια παραγωγή θα είχε σαν αποτέλεσμα την ανύψωση των αποθεμάτων μέσω πρακτικών αγροτικής οικονομίας και την ανύψωση τεχνικών παραγωγής των μαργαριταριών, ειδικών για τα είδη *Pinctada margaritifera* όπου παράγει ένα από τα καλύτερα και πιο ακριβά μαργαριτάρια στην Γαλλική Πολυνησία (Ward 1985) και είναι το δεύτερο μεγαλύτερο εξαγόμενο προϊόν. (AQUACOP, 1982). Το *Pinctada fucata* ανατράφηκε νωρίτερα στην Ινδία (Alagarswami 1983) και ένα πειραματικό εκκολαπτήριο έχει δημιουργηθεί για μαζική παραγωγή του γόνου (Alagarswami 1987). Πειραματική επιτυχία έχει επιτευχθεί με τεχνητή αναπαραγωγή του μαργαριτοφόρου στρειδιού ασημένιου χείλους *Pinctada maxima* στην Αυστραλία (Tanaka και Kuneta 1981) αλλά αυτό ακόμα δεν είναι εμπορεύσιμο.

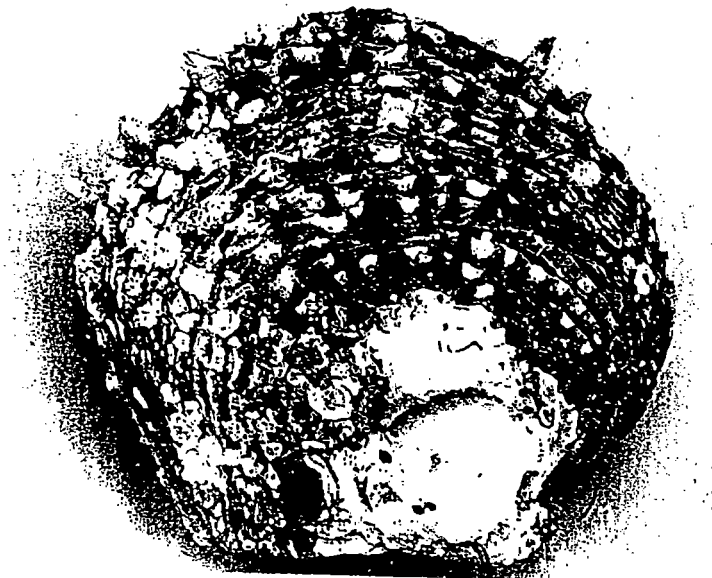
Παρόλες τις επαναλαμβανόμενες δοκιμές που έχουν γίνει στην Γαλλική Πολυνησία, η καλλιέργεια των προνυμφών του *Pinctada margaritifera* έχει αποτύχει (Coeroli 1984).

Τα επόμενα δεδομένα αφορούν την τεχνητή αναπαραγωγή του *Pinctada margaritifera* στο Tuticorin (πλάτος 8ο 47'N, μήκος 78ο 08 E) της Ινδίας.

2.α.2. Υλικά και μέθοδοι.

Τέσσερα άτομα των *Pinctada margaritifera* που συνελλέχθησαν από τα πεδία των μαργαριτοφόρων στρειδιών του κόλπου του Mannar, κατά την διάρκεια 1984-85, εξετράφησαν στη μονάδα των μαργαριτοφόρων στρειδιών στο Krusadaί και μεταφέρθηκαν στο εκκολαπτήριο οστράκων στο Tuticorin από ξηράς το Μάιο του 1986. Αυτά τα στρείδια ήταν 77 - 92 mm σε ύψος οστράκου (νωτοκοιλιακή μέτρηση) και 70 - 97 gr σε βάρος. Τοποθετήθηκαν σ'ένα διχτυωτό σάκο (κάλτσα) και κρεμάστηκαν στα 5mm βάθος από μια σχεδία στην πειραματική μονάδα μαργαριτοφόρων στρειδιών στον πυθμένα του λιμανιού στο Tuticorin.

Δύο από τα στρείδια πέθαναν αργότερα. Το ζευγάρι που έζησε, ένα αρσενικό και ένα θηλυκό (εικ. 1) γέννησαν μέ επιτυχία τον Δεκέμβριο 1986 και πέθαναν αργότερα.



ΕΙΚ. 1 *Pinctada margaritifera*(Linnaeus), το θηλυκό είχε ύψος οστράκου 85,6 mm και βάρος 88,0 gr.

Τα στρείδια γέννησαν αυθόρμητα κατά την διάρκεια μεταφοράς τους από το Krusadai στο Tuticorin. Ο γόνος πετάχτηκε. Κατά την τοποθέτησή τους σε μια δεξαμενή του εκκολαπτηρίου γέννησαν πάλι στις 15 Μαΐου 1986, παράγοντας βιώσιμες προνύμφες.

Τα άτομα αυτά όταν υποβλήθηκαν σε θερμική διέγερση (η θερμοκρασία ανυψώθηκε από 24,7 ως 30,5 °C) στις 30 Μαΐου 1986, γέννησαν ήπια, αλλά οι προνύμφες δεν ήταν βιώσιμες. Μετά την διατηρησή τους για 7 μήνες στην μονάδα το ζεύγος που έζησε μεταφέρθηκε στο εκκολαπτήριο στις 31 Δεκεμβρίου 1986 και γέννησε αυθόρμητα και άφθονα. Το αρσενικό ελευθέρωσε το σπέρμα σε 11,10 ώρες και το θηλυκό γέννησε σε 13,2 ώρες. Η γονιμοποίηση ήταν κανονική και οι προνύμφες ήταν βιώσιμες.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι σχετικά με την καλλιέργεια των προνυμφών αυτής της ομάδας.

Οι διαδικασίες για την καλλιέργεια των προνυμφών ήταν γενικά οι ίδιες όπως περιγράφηκαν για το *Pinctada fucata* από τον AlagarSwami (1983).

Για την καλλιέργεια των προνυμφών χρησιμοποιήθηκαν δεξαμενές από πλαστικό γυαλί (75x50x25 cm) χωρητικότητας 50l θαλασσινού νερού, φιλτραρισμένες μέσω αποστειρωμένης βαμβακερής τάπας.

Στο σύστημα στάσιμου νερού το θαλασσινό νερό αλλαζόταν κάθε δεύτερη μέρα και δεν αεριζόταν. Κατά την διάρκεια της καλλιέργειας των προνυμφών, η θερμοκρασία του νερού των δεξαμενών ήταν 26-30 °C, η αλατότητα 34,2 - 35 ‰ και το PH 7,87-8,07. Η αρχική πυκνότητα των προνυμφών ήταν 1/ ml.

Καθαρές καλλιέργειες των δύο μαστιγοφόρων *Isochrysis galbana* και *Pavlova lutheri*, χρησιμοποιήθηκαν ανεξάρτητα ως τροφή για την

προνύμφη σε συγκέντρωση των 5 κυττάρων /ml από την 2η ημέρα και 10 κύτταρα /ml από την 5η ημέρα μέχρι την μεταμόρφωση. Προμήθευσαν την τροφή μία φορά την ημέρα. Μετρήθηκαν στο μικροσκόπιο τριάντα προνύμφες που είχαν συλλεχθεί στην τύχη, για την μελέτη της αύξησης.

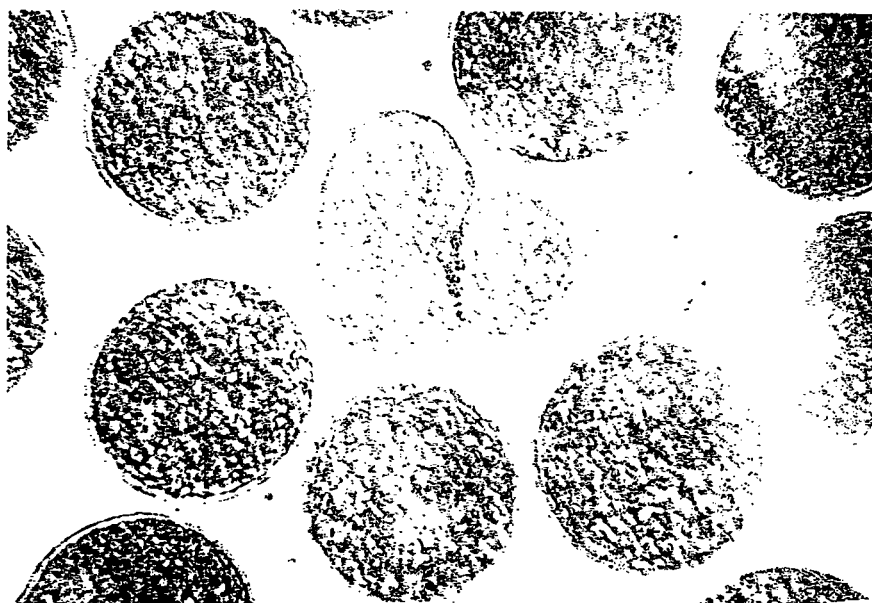
Η έκθεση που παρουσιάζεται παρακάτω σχετίζεται με την καλλιέργεια της προνύμφης με το είδος *I galbana* για τροφή.

Τα αυγά αυτά αφέθηκαν να καθίσουν στις πλευρές του πυθμένα των δεξαμενών της καλλιεργούμενης προνύμφης. Αργότερα αποσπίαστηκαν προσεχτικά μ' ένα κομμάτι αφρώδους καουτσούκ, πλύθηκαν και τοποθετήθηκαν σε ανανεωμένες δεξαμενές. Τα αυγά καλλιεργήθηκαν μέσα σε στάσιμο θαλασσινό νερό το οποίο αλλαζόταν καθημερινά και αεριζόταν. Τάϊζονταν με μικτά φύκια του *I galbana*, *Skeletonema* sp και *Nitzschia* sp.

Η αναλογία ήταν 25 κύτταρα/ml μέχρι μεγέθους αυγών του 1mm και από κει και πέρα διπλασιάστηκε. Το τάισμα γινόταν μία φορά την ημέρα. Στην μεταφορά στις μονάδες τα αυγά τοποθετήθηκαν σ' ένα πυραμιδικό δίκτυο έχοντας μια τριγωνική βάση με πλευρά 35cm, σκεπασμένο με ύφασμα κατάλληλου ματιού και κρεμάστηκε από την σχεδία σε βάθος 5m. Η μέση πυκνότητα ήταν 600 αυγά, /δίκτυο. Η ετήσια διακύμανση της επιφανειακής θερμοκρασίας ήταν από 25, 2oC το Δεκέμβριο έως και 31, 6 °C τον Μάιο και η αλατότητα ήταν από 30,5 ppt τον Δεκέμβριο ως 35, 75 ppt τον Σεπτέμβριο.

2.α.3. Αποτελέσματα

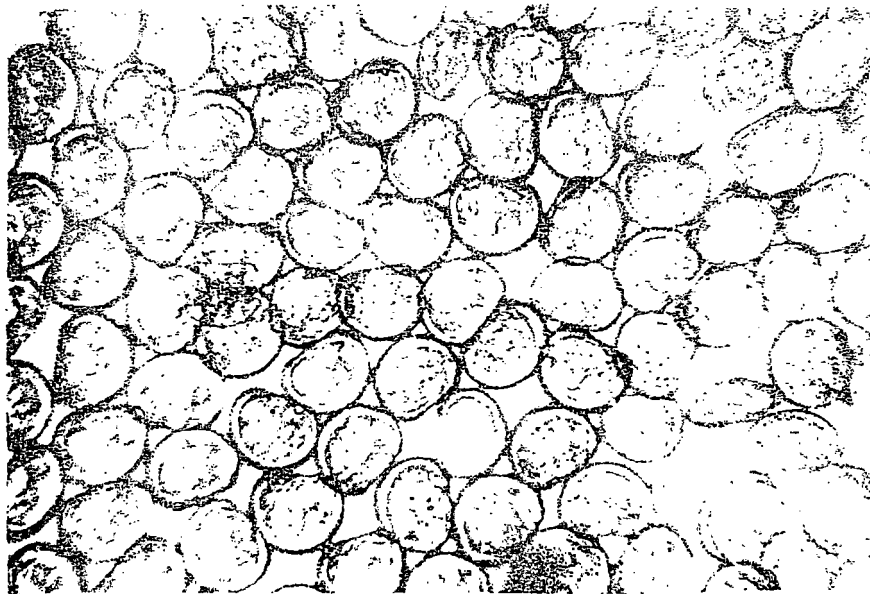
Τα περισσότερα από τα αυγά ήταν σφαιρικά και η διάμετρός τους κατά μέσο όρο μετρήθηκε στα 45m(εικ. 2)



ΕΙΚ. 2. Γονιμοποιημένα αυγά (μέσος όρος 45m διάμετρος) του *Pinctada margaritifera*. Το πρώτο άνισο σχίσσιμο φαίνεται στο κέντρο του αυγού.

Η πρώτη αυλάκωση φάνηκε 35 λεπτά αφού το πρώτο πολικό σώμα είχε ελευθερωθεί. Τα 4 κύτταρα, 8 κύτταρα, 16 κύτταρα και τα στάδια του μοριδίου του εμβρύου αυξήθηκαν αντιστοίχως σε 1 ώρα, 5 λεπτά, 1 ώρα 38 λεπτά, 2 ώρες 20 λεπτά και 4 ώρες από την γονιμοποίηση.

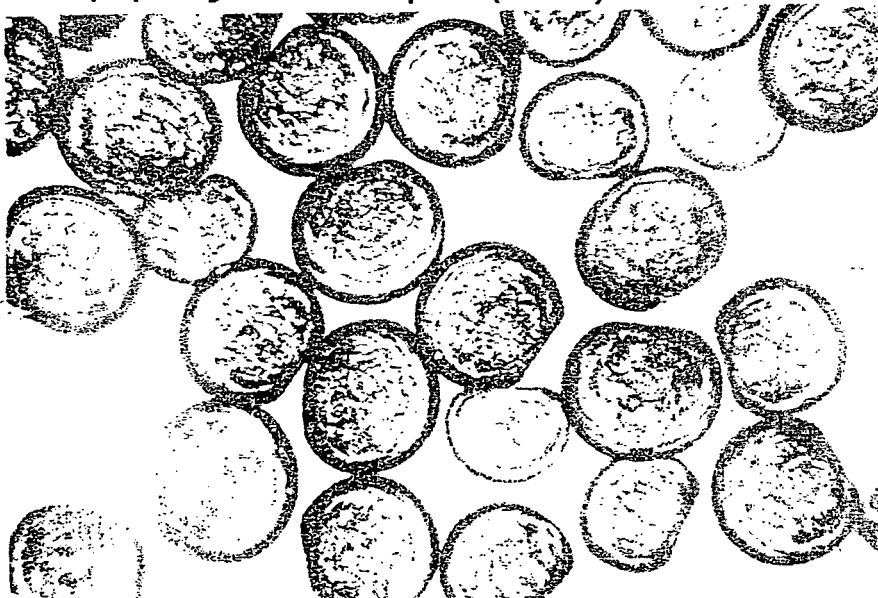
Η πρώιμη τροχοφόρος προνύμφη D σχηματισμού εμφανίστηκε σε 20 ώρες έδειξε τη πρόσθια μέτρηση (APM ή μήκος οστράκου 75μm και η νωτοκοιλιακή μέτρηση έδειξε (DVM ή ύψος του οστράκου) των 60 μm (εικ. 3)



ΕΙΚ. 3 Ευθύ κλείθρο της λάρβας με μέσο όρο μεγέθους 75X60 μm.

Υπερώα ανωμαλία φάνηκε σε μερικές προνύμφες με την υπερώα να προεξέχει από ένα μοναδικό σημείο σε σχήμα γλώσσας ή ραβδίου.

Ο σχηματισμός του παλαιού τμήματος του δίλοβου κελύφους άρχισε την 9η ημέρα σε μέγεθος 110 X 100 μm. (εικ. 4)



ΕΙΚ. 4. Οι τροχοφόρες προνύμφες γίνονται στρογγυλά και είναι σχεδόν έτοιμα να φτάσουν το στάδιο του παλαιού τμήματος του δίλοβου κελύφους.

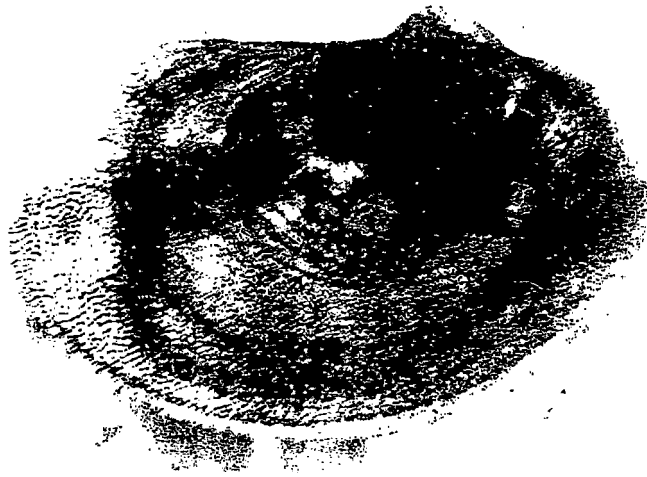
Η τυπική παλαιού τμήματος δίλοβου κελύφους προνύμφη την 12^η ημέρα μετρήθηκε 140 x 130 μm.

Η αύξηση του οστράκου από το πρώιμο στάδιο του παλαιού τμήματος του δίλοβου κελύφους χαρακτηρίστηκε επιπρόσθετα από ευκρινή, ομόκεντρες γραμμές ανάπτυξης στο περιθώριο. Το κοιλιακό περιθώριο του οστράκου διατηρήθηκε με μια ροζέ απόχρωση από το στάδιο του παλαιού τμήματος του δίλοβου κελύφους μέχρι την μεταμόρφωσή του. Η οφθαλμική κηλίδα άρχισε να εμφανίζεται την 16^η ημέρα στις προνύμφες μετρώντας 210 X 200 μm και περισσότερα.

Η ποδοτροχοφόρος προνύμφη (220 X 210μm) εμφανίστηκε την 20^η ημέρα. Η ραχιαία όψη της πατούσας βάφτηκε μαύρη με ακανόνιστα μπαλώματα θαμπού άσπρου, ενώ η έρπουσα γλώσσα ήταν πλήρως θαμπή και άσπρη.

Το plantigrade φάνηκε την 23^η ημέρα σε μέγεθος των 260 X 240 μm όταν αυτό μεταμορφώθηκε σε τυπικό γόνιο. Ο μικρότερος γόνος που παρατηρήθηκε μέσα στις δεξαμενές μετρήθηκε 350 x 300μm την 28^η ημέρα.

Δείχνει το προνυμφιακό όστρακο σε σχήμα του παλαιού τμήματος του δίθυρου κελύφους και το μοτίβο για τη μεταγενέστερη ανάπτυξη του οστράκου, θεωρώντας το τυπικό σχήμα του μαργαριτοφόρου στρειδιού *Pinctada margaritifera* των 1,9 mm μήκος του οστράκου απεικονίζεται στην εικ. 5



ΕΙΚ. 5 Ο γόνος του *Pinctada margaritifera* μήκους 1, 9mm. Το βέλος δείχνει το περιθώριο του προνυμφιακού οστράκου.

Το όστρακο είχε ένα σκούρο χρώμα το οποίο αργότερα έγινε ανοικτό μπρούτζινο. Μέχρι την 9^η ημέρα όλες οι προνύμφες ήταν στο στάδιο του ευρέως κλείθρου (hinge). Από κει και πέρα παρατηρήθηκαν διαφορές στο ρυθμό αύξησης και στα στάδια. Το στάδιο του παλαιού τμήματος

του δίλοβου κελύφους ήταν κυρίαρχο την 12^η ημέρα(73,3%) και την 16^η ημέρα (90%) και το στάδιο *pediveliger* ήταν κυρίαρχο την 23^η ημέρα. Την 28^η ημέρα το στάδιο του παλαιού τμήματος του δίλοβου κελύφους υπολογίστηκε για 26,7%, τα *pediveligers* υπολογίστηκαν και αυτά 26,7%, τα *plandigrades* για 16,7% και ο γόνος για 30%.

Η ωτοκία στις δεξαμενές μπορεί να συνεχιστεί μέχρι μια περίοδο οκτώ ημερών.

Εν όψει της παραπάνω ετεροζυγωτίας το επικρατούν μέγεθος του κυρίαρχου προνυμφιακού σταδίου λήφθηκε υπόψιν για τον υπολογισμό του ρυθμού αύξησης.

Τα επικρατούντα μεγέθη ήταν:

- 82,5 μm την 6^η ημέρα,
- 97,5 μm την 9^η ημέρα
- 112,5 μm την 12^η ημέρα,
- 182,5μm την 16^η ημέρα και
- 252 μm την 23^η ημέρα.

Ο μέσος όρος του ρυθμού ανάπτυξης του κυρίαρχου τμήματος του πληθυσμού της προνύμφης από την 0 ημέρα ως την 23^η ημέρα ήταν 10,98 μm/ημέρα.

Την 23^η ημέρα το ελάχιστο μέγεθος της προνύμφης ήταν 180 μm δείχνοντας μια αναλογία αύξησης των 7,83 μm/ημέρα, και το μεγαλύτερο ήταν 410μm. καταγράφοντας ένα ρυθμό αύξησης των 17,83 μm/ημέρα. Εξετάζοντας τις δύο δίαιτες από τα φύκη *I galbana* και το *P. lutheri* κάτω από παράλληλη καλλιέργεια φάνηκε ότι οι προνύμφες ταϊσμένες με *Igalbana* έδειξαν να έχουν μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης.

Την 23^η ημέρα, οι ταϊσμένες με *I galbana* προνύμφες είχαν φτάσει ένα μέσο ύψος οστράκου των 244,8μm, ενώ οι ταϊσμένες προνύμφες με *P. lutheri* ήταν μόλις 202,8μm. Ο αρχικός προνυμφιακός πληθυσμός σ'όλες τις δεξαμενές καλλιέργειας ήταν 7,75 χ 10 εις την 5^η ολικού όγκου των 775 l του θαλασσινού νερού.

Το συνολικό νούμερο των προνυμφών που μεταμορφώθηκαν σε γόνο ήταν 48800 δίνοντας ένα ρυθμό επιβίωσης 6,3% και ένα ρυθμό παραγωγής των 63 ατόμων/l.

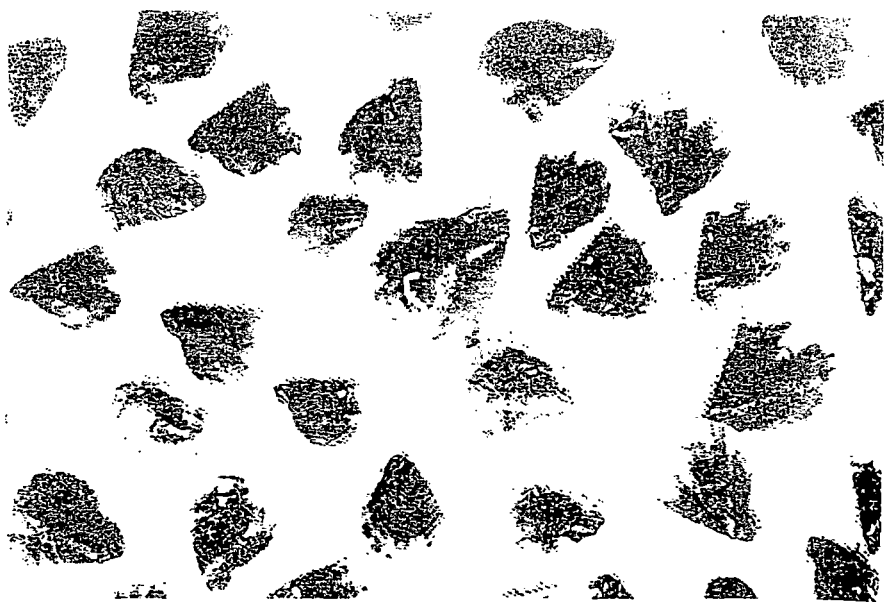
Η αύξηση του νεαρού οστράκου του *Pinctada margaritifera* είναι μια εναπόθεση υλικού του οστράκου σ'ένα διάφανο έλασμα από κηρήθρα (εικ. 5) το οποίο γίνεται θαμπό με περαιτέρω εναπόθεση κρυστάλλων ανθρακικού ασβεστίου πάνω σε όλο το περιθώριο. ΕΙΚ. 5

Μπαλώματα ενός φωτεινού κίτρινου χρώματος εμφανίζονται στο όστρακο όταν ο γόνος είναι σχεδόν 0,75 mm. Ταυτοχρόνως ο μανδύας εναποθέτει σκούρα χρώματα στην εσωτερική πλευρά του οστράκου.

Το όστρακο το οποίο εμφανίζεται σ' αυτό το στάδιο με σκούρο χρώμα γίνεται με περαιτέρω ανάπτυξη φωτεινό μπρούτζινο. Η πρώτη διαδικασία αύξησης εμφανίζεται στην πλατιά άκρη του πλάγιου

νωτοκοιλιακού άξονα ανερχόμενη από την χρωματισμένη κηλίδα πάνω στο διαφανές περιθώριο του οστράκου. Επιπρόσθετες διαδικασίες ανάπτυξης εμφανίζονται αργότερα παραπλευρώς του ίδιου δακτυλίου ανάπτυξης πάνω και στις δύο πλευρές του πρώτου.

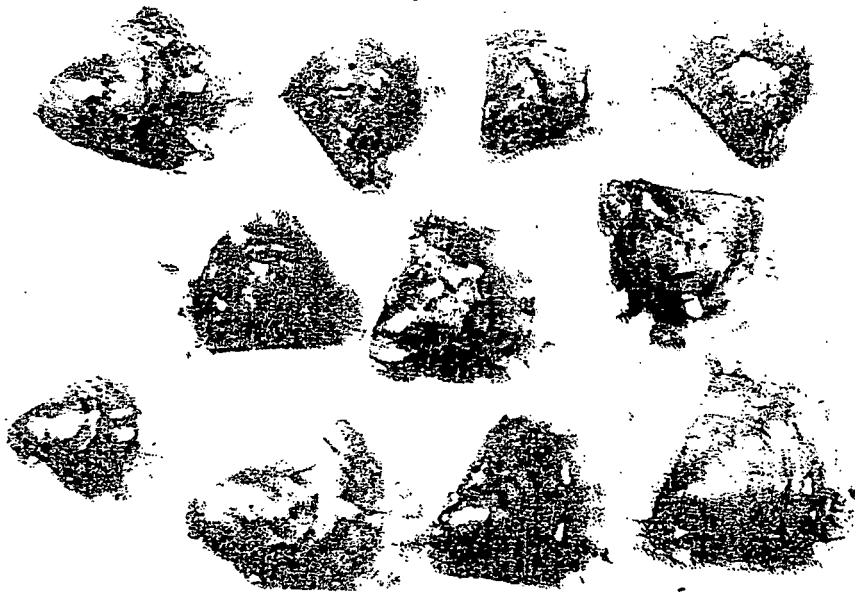
Δακτύλιοι ανάπτυξης είναι πολλοί και σχεδόν σκεπάζει ο ένας τον άλλο μέσα στην φύση. Η διαδικασία αυτή παρουσιάζεται κάτω από το δακτύλιο ανάπτυξης, το οποίο είναι επίπεδο τρυφερό, εύκαμπτο και θαμπό άσπρο στο χρώμα. Σ' ένα γόνιο με 17,8 mm ύψος οστράκου, η μεγαλύτερη διαδικασία αύξησης μετρήθηκε 4,8 mm σε μήκος και 3,3 mm σε πλάτος στην ελεύθερη άκρη στενεύοντας 2,5mm στη βάση. Στα εργαστηριακά καλλιεργούμενα νεαρά όστρακα καμία ανάπτυξη δεν έγινε ακόμη και στα 10mm ύψος οστράκου (εικ. 6), ενώ στα καλλιεργούμενα δείγματα αυτή ήταν ευδιάκριτη στα 4,5 mm.



ΕΙΚ. 6. Νεαρά μεγαλωμένα στο εργαστήριο τα οποία δεν ανέπτυξαν διαδικασίες ανάπτυξης. Το μεγαλύτερο στο κέντρο μετρήθηκε 10,6 mm.

Το νεαρό όστρακο έχει ένα ανοικτό μπρούτζινο χρώμα σαν βάση του χρωματισμού τους. Κατά μήκος των δακτυλίων ανάπτυξης μια συνεχής περιβαλλόμενη λεία ή κυματιστή καφετί λουρίδα είναι παρούσα.

Ακτινωτά με διακριτικές θαμπές, άσπρες ζώνες που δείχνουν , απεικονιζόμενες την ανάπτυξη στην εικ. 7.



ΕΙΚ. 7. Νεαρά του *Pinctada margaritifera* μεγαλωμένα στη μονάδα παρουσιάζοντας τυπικά χαρακτηριστικά οστράκου και χαρακτηριστικές διαδικασίες ανάπτυξης. Το μεγαλύτερο μετρήθηκε 21, 1mm σε ύψος οστράκου.

Ο οπίσθιος λοβός δείχνει καλά ανεπτυγμένες με μια byssal notch επάνω στη δεξιά βαλβίδα .

Ο πρόσθιος λοβός δεν ήταν ανεπτυγμένος στην εσωτερική όψη(εικ. 8)



ΕΙΚ. 8 Δυο ζευγάρια οστράκων των νεαρών στρειδιών *Pinctada margaritifera* όπου φαίνονται οι χαρακτηριστικές των μαργαριταρένιων και μη μαργαριταρένιων περιοχών. Το μεγαλύτερο από το ζευγάρι μετρήθηκε σε 18mm σε ύψος οστράκου.

Το οπίσθιο μαργαριταρένιο άκρο δεν προεξέχει πέρα από τον άξονα ενώ έχει κλίση προς τα πίσω. Το πρόσθιο μαργαριταρένιο άκρο έχει κλίση προς τα εμπρός. Το μαργαριτάρι είναι άσπρο και ιριδίζον με ή χωρίς ιδιαίτερη αλλαγή κατά μήκος του περιθωρίου. Το τμήμα που δεν έχει μαργαριτάρι έχει φωτεινό μπρούτζινο χρώμα με θαμπές άσπρες λουρίδες κατά μήκος των ακτινωτών γραμμών των διαδικασιών ανάπτυξης.

Καφετιά χρώση διακρίνει την ζώνη του διαχωρισμού των μαργαριταρένιων και μη μαργαριταρένιων περιοχών.

Στα νεαρά άτομα όστρακα μέχρι 21,1 mm μήκος άξονα (HL)

το DVM και APM είναι σχεδόν ίσα. Η αναλογία του DVM προς HL είναι 0,7 σε 3,8 mmHL ή αυξάνει στα 0,9 - 21,1 mmHL.

Το APM εμφανίζεται περισσότερο μεταβλητό συγκρινόμενο με το DVM και η αναλογία του APM προς το HL είναι εντός της κλίμακας του 0,7-0,9.

Στα νεαρά στρείδια των 2,8-19,5 mm DVM, το APM και HL είναι γραμμικά συνδεόμενα με το DVM, και οι εξισώσεις που περιγράφουν τις σχέσεις είναι:

$$Y_1 = 0,96783 + 0,94183X$$

$$Y_2 = 1,49061 + 1,01276X$$

Όπου $Y = \text{APM}$

$$Y_2 = \text{HL}$$

και $X = \text{DVM}$

με συσχέτιση @ τιμές των 0,982 και 0,996 αντιστοίχως.

Στο εργαστήριο η αύξηση των νεαρών οστράκων ήταν πολύ αργή.

Ανακαλύπτοντας εκείνα τα οποία έδειξαν τη μέγιστη ανάπτυξη, παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν 0,09 mm/ημέρα από την ημερομηνία του δεσίματος για μια περίοδο 3 μηνών. Όταν τα νεαρά άτομα μεταφέρθηκαν στην μονάδα στις 18 Μαρτίου, ο ρυθμός ανάπτυξης βελτιώθηκε σε 0,4 mm/ημέρα σε σύγκριση με το 0,15 mm/ημέρα των αυγών, τα οποία διατηρήθηκαν στο εργαστήριο για τους επόμενους ή και μισούς μήνες. Η ακόλουθη εξίσωση εφαρμόστηκε σε δεδομένη ημερομηνία αύξησης των νεαρών οστράκων:

$$Y = ae^{bt}$$

Όπου $Y = \text{DVM}$ σε mm και

$t = \text{χρόνο}$ σε ημέρες

Η εφαρμοσμένη εξίσωση για τις ανεπτυγμένες σε γόννο ήταν:

$$Y = 0,4313 \cdot e^{0,93345e}$$

με r τιμή = 0,997

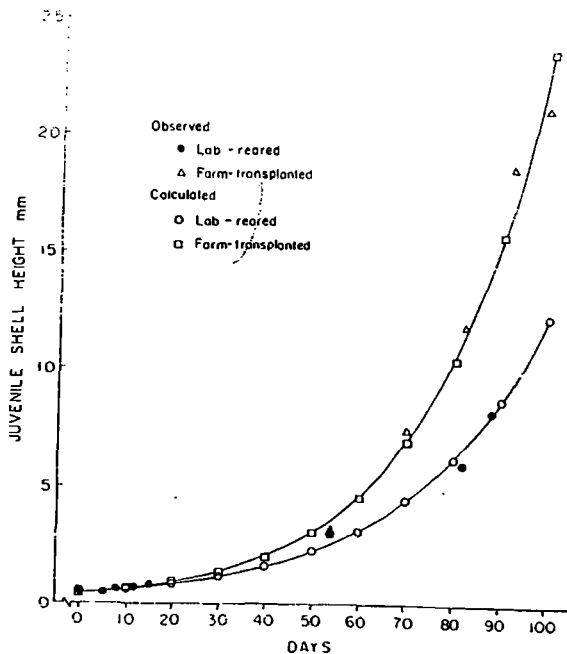
ενώ για το γόννο μεταφοράς ήταν :

$$Y = 0,3985 \cdot e$$

με $r = 0,998$

Είναι προφανές από τις παραπάνω εξισώσεις ότι ο γόννος που είχε μεταφερθεί σε μονάδα είχε ένα υψηλότερο στιγμιαίο ρυθμό ανάπτυξης (b).

Οι καμπύλες ανάπτυξης με παρατηρημένες και υπολογισμένες τιμές παρουσιάζονται στην εικ. 9



ΕΙΚ. 9. Καμπύλες ανάπτυξης του *Pinctada margaritifera* απεικονίζοντας τη μεγαλύτερη ανάπτυξη των εργαστηριακώς μεγαλωμένων και μεταφερμένων σε μονάδα νεαρών από τη μέρα του δεσίματος στην ημέρα 99.

Σε σύγκριση με τα αυγά του *Pinctada fucata* τα οποία ανατράφηκαν συγχρόνως στη μονάδα με τα αυγά του *Pinctada margaritifera* υπέστησαν υψηλότερη θνησιμότητα.

Ο ρυθμός επιβίωσης κυμάνθηκε από 15,16% σε 17,40% σε διαφορετικά δίκτυα στις 2 Μαΐου 1987.

Ο ρυθμός θνησιμότητας αυξήθηκε ξαφνικά και μέχρι τις 7 Μαΐου ήταν συνολικός εκτός μόνο από ένα αυγό. Μετά από 11 μήνες το επιζών όστρακο μετρήθηκε 38,8 mm σε ύψος οστράκου 33,2 mm σε μήκος άξονα και 6gr σε βάρος στις 29 Δεκεμβρίου 1987.

2.α.4. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Ο Grossland 1957 επιτυχώς ανέπτυξε μεθόδους για την συλλογή των αυγών και την καλλιέργεια του *Pinctada margaritifera* στο Dongonab Bay στην Ερυθρά Θάλασσα. Οι μέθοδοι βελτιώθηκαν περαιτέρω από

τον Reed ενώ μία από αυτές τις μεθόδους βασισμένη στην καλλιέργεια βιομηχανικού οστράκου καθιερώθηκε (FAO 1962, Rahma και New Kirk (1987).

Παρόμοια εμπορική καλλιέργεια φυσικών αποθεμάτων αυτών των ειδών από την ωτοκία εφαρμόζεται στην Γαλλική Πολυνησία (AQUACOP 1982) ενώ κάποια επιτυχία έχει επίσης σημειωθεί στην Ραϋα της Νέας Γουϊνέας (Lock 1982).

Στο απόθεμα αυτό των αυγών παρατηρήθηκε τεράστια θνησιμότητα το 1969, 1973 και 1978 (Nasr 1982, Gideiri 1983).

Στο *Pinctada maxima* έντονη φυσική θνησιμότητα έχει αναφερθεί από την Αυστραλία (Pass et al 1987). Ο περιβαντολλογικός υποβιβασμός εξαιτίας της επαναλαμβανόμενης χρήσης των καλλιεργούμενων περιοχών καθώς η μόλυνση και οι ασθένειες οδηγούν στην μεγάλη κλίμακα θνησιμότητας των μαργαριτοφόρων στρειδιών. Υπάρχει ωστόσο μια αυξανόμενη ζήτηση για φυσικά αποθέματα των καλλιεργούμενων μαργαριταριών. Ο Mizumoto (1979) ανέφερε ότι η ανάπτυξη μιας μεθόδου για τεχνητή παραγωγή γόνου θα μπορούσε να διευκολύνει την σταθερότερη παραγωγή των μαργαριταριών από το *Pinctada maxima* και το *Pinctada margaritifera*.

Μέσα σ'ένα πλαίσιο αναπτύσσονται οι τεχνικές του εκκολαπτηρίου για ελεγχόμενη παραγωγή του *Pinctada margaritifera*. Βασικά πειράματα στην αναπαραγωγή του *Pinctada margaritifera* πραγματοποιήθηκαν στην Ιαπωνία από τον Setoguchi (1964, 1966, Tanaka et al 1970). Διάφορες προσπάθειες στην παραγωγή γόνου του μαργαριτοφόρου στρειδιού *Pinctada margaritifera* έγιναν στην Γαλλική Πολυνησία, αλλά η προνυμφιακή καλλιέργεια ήταν ανεπιτυχής στο να συνεχιστεί η ανάπτυξη πέρα από την δέκατη ημέρα (Millus 1980, Coeroli et al 1984). Ακολουθώντας την προνυμφιακή καλλιέργεια και την παραγωγή αυγών του *Pinctada fucata* στην Ινδία (Alagarswami et al 1983) κατορθώθηκε επιτυχώς η αναπαραγωγή του *Pinctada margaritifera*.

Η εξέλιξη της προνυμφιακής ανάπτυξης του *Pinctada margaritifera* δεν διέφερε πολύ από εκείνη του *Pinctada maxima* (Tanaka και Kumeta 1981) και του *Pinctada fucata* (Alagarswami et al. 1983). Η παρουσία των ωρηγμένων αυγών σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης στο στομάχι και στο πεπτικό σύστημα του *Pinctada margaritifera* τα οποία είχαν προηγουμένως χωνευθεί από την προνύμφη, έδωσαν τη δυνατότητα στον Tranter 1958 να περιγράψει την εμβρυϊκή ανάπτυξη των ειδών. Τα δεδομένα για την προνυμφιακή ανάπτυξη του *Pinctada fucata* και του *Pinctada maxima* όπως παρατηρήθηκαν από τους εργάτες (Ota 1957, Minaur 1969, Tanaka και Kuneta 1981, Alagarswami 1983) και εκείνων του *Pinctada margaritifera* από την τωρινή μελέτη συγκρίνονται στον πίν. 1.

Stage	<i>P. fucata</i>				<i>P. maxima</i>				<i>P. margaritifera</i>	
	Alagarwami et al. (1983)		Ota (1957) and others		Minaur (1969)		Tanaka and Kumeta (1981)		Present study	
	Size	Time	Size	Time	Size	Time	Size	Time	Size	Time
Egg, spherical	47.5	-	-	-	59- 60	-	-	-	45	-
D-shape	67.5 × 52.5	20 h 40 m	72 × 60	20 h	-	-	75- 77	20 h	75 × 60	24 h
Early umbo	100 × 95	-	96 × 87	d 8	96 × 87	d 5	110-125	d 10	110 × 90	d 9
Umbo	135 × 130	d 10-12	-	-	125 × 112	d 12	-	-	140 × 130	d 12
Eye-spot	210 × 190	d 15	170 - 200	-	-	-	-	-	210 × 200	d 16
Pediveliger	230 × 200	d 20	209 × 195	d 25	180 × 160	d 14-20	234	d 19	220 × 210	d 20
Plantigrade	250 × 240	d 22	200-230	-	-	-	266	d 20	260 × 240	d 23

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Δεδομένα ανάπτυξης της σειράς του χρόνου για 3 είδη των μαργαριτοφόρων στρειδιών. Οι μετρήσεις της λάρβας είναι σε μμ. Οποδήποτε δύο μετρήσεις είναι δοσμένες με Χ σύμβολο. Το πρώτο είναι APM και το δεύτερο DVM. Ο χρόνος από την γονιμοποίηση δίνεται σε ώρες (h), σε λεπτά (min) ή σε ημέρες (d).

Έχει παρατηρηθεί ότι παρά τις διαφορές όσον αφορά τα είδη, τις περιοχές και τις διαφοροποιήσεις στις συνθήκες ανατροφής, οι σειρές των δεδομένων χρόνου - μεγέθους για τα διαφορετικά προνυμφικά στάδια δείχνουν κάποια

Η μεταμόρφωση των προνυμφών των τριών ειδών γίνεται γύρω στην 20η - 23η ημέρα και σε μέγεθος περίπου 230 - 266 μμ. Μικρές διαφορές σημειώθηκαν στην καλλιέργεια των προνυμφών του ίδιου είδους κ' στον ίδιο χρόνο και οι οποίες είναι οι εξής:

1) Η ιριδίζουσα απόχρωση στο περιθώριο του οστράκου των προνυμφών του *Pinctada margaritifera* η οποία είναι απών στο *Pinctada fucata*.

2) Η μαύρη ουσία στο πέλμα του πρώτου η οποία είναι απύουσα στο τελευταίο

3). Καθυστερημένος σχηματισμός της προνύμφης του πρώτου (παρατηρήθηκε μόνο από την 12η ημέρα) συγκρινόμενος στο τελευταίο.

Ο Hynd (1955) στην επανεξέταση των Αυστραλιανών μαργαριτοφόρων στρειδιών, περιέγραψε το *Pinctada margaritifera* μεγέθους όχι μεγαλύτερου των 2cm DVM (Alagarwami(1983) με τα *Pinctada margaritifera* δείγματα των 34,0mm DVM και παραπάνω από τα νησιά Andaman και Nicobar. Επειδή δεν υπάρχει διαθέσιμη περιγραφή των νεαρών οστράκων μικρότερων των 2cm στην βιβλιογραφία για τις λεπτομέρειες της ανάπτυξης του οστράκου και του χρωματισμού, γίνεται εδώ μια σύντομη περιγραφή.

Ο Coeroli et al (1984) ανέφερε ότι στο Takaroto η λιμνοθάλασσα είναι κλειστή στην δακτυλιοειδή κοραλλιογενή νήσο του Tuamotu αρχιπελάγους στην Γαλλική Πολυνησία τα νεαρά του *Pinctada margaritifera* μεγαλωμένα με συλλογή αυγών από τα φυσικά εδάφη έφτασαν τα 0,2 - 0,3 mm, 2,3mm, 8 - 10mm και 40 - 50mm σε 1,2,3 και 6 μήνες αντιστοίχως, και 70 - 80mm, 100 - 120 mm, 120 - 150 mm, 140 - 150 mm και 140 - 150 mm στο τέλος των 1,2,3,4 και 5 ετών αντιστοίχως.

Στην παρούσα μελέτη τα αυγά που μεταφέρθηκαν στη μονάδα έφθασαν το μέγιστο μέγεθος του 21,1mm (ελάχιστο 8,2 mm μέσος όρος 14,2mm) σε 99 ημέρες με αρχή μετρήσεως την ημερομηνία του δεσίματος των αυγών. Συγκρινόμενα με το μέγεθος 8 -10 mm που έφθασαν σε 3 μήνες στη λιμνοθάλασσα Takaroto, η αύξηση που πραγματοποιήθηκε από τα νεαρά του *Pinctada margaritifera* (8,2 - 21,1mm) για περίπου ίδια χρονική περίοδο στο Tuticorin είναι υψηλότερη.

Στην λιμνοθάλασσα Takaroto η διακύμανση της θερμοκρασίας του θαλασσινού νερού είναι από 26 - 27°C (Αύγουστος - Σεπτέμβριος) ως 29 - 30°C (Μάρτιος - Απρίλιος) και η αλατότητα από 37 ppt (Ιανουάριο - Αύγουστο) ως 39 ppt (Νοέμβριο - Δεκέμβριο) (Coeroli et al 1984).

Οι τιμές της αλατότητας είναι υψηλότερες στο Takaroto από το Tuticorin. Δεν είναι γνωστό αν αυτός ο συντελεστής είναι υπεύθυνος για τις διαφορές στο ρυθμό ανάπτυξης των νεαρών που παρατηρήθηκε στις δύο περιοχές, ενώ παρατηρήθηκε το φαινόμενο και στο εργαστήριο και στην καλλιέργεια η θνησιμότητα των αυγών ήταν υψηλή.

Η παραγωγή γόνου αυτή κάθε εαυτή ήταν χαμηλή 6,3% του αρχικού πληθυσμού της προνύμφης ενώ παρουσιάστηκε μεγάλη θνησιμότητα των νεαρών οστράκων μετά από 4 περίπου μήνες.

Προηγούμενα της ανατροφής που αναφέρεται εδώ, 50 αυγά του *Pinctada margaritifera* είχαν προκύψει από την ωοτοκία της 15ης Μαΐου 1986 και αυτά επέζησαν. Το είδος δεν υπάρχει στα παράκτια νερά της ηπειρωτικής Ινδίας, ενώ έχει μια φυσική κατανομή σε διάφορα κέντρα στα νησιά Andaman και Nicobar. Εξετάζεται αν τα νεαρά προηγούμενα σε εκκολαπτήριο θα έχουν μεγαλύτερη προοπτική επιβίωσης σε συνθήκες νησιού του ωκεανού.

2.β. Θνησιμότητα του *Pinctada margaritifera*.

2.β.1. Εισαγωγή

Εδώ αναφέρονται παρατηρήσεις για την θνησιμότητα των μαργαριτοφόρων στρειδιών *Pinctada margaritifera* στον κόλπο Dongonab στην Ερυθρά Θάλασσα. Το μαργαριτοφόρο στρείδι *Pinctada margaritifera* έχει μεγάλη οικονομική σημασία για την περιοχή της Ερυθράς Θάλασσας του Σουδάν. Η ιστορία του γυρίζει πίσω το 1904 όταν ο Grossland μελέτησε μερικές από τις βιολογικές του πλευρές στον κόλπο Dongonab (21°N) και απέδειξε ότι μπορούσε να καλλιεργηθεί σε εμπορική κλίμακα.

Το στρείδι συλλέχθηκε σαν αυγά αμέσως μετά την εποχή της ωοτοκίας (Ιούλιο - Αύγουστο), πάνω σε μεγάλες πλωτές σχεδίες, γνωστές σαν συλλέκτες αυγών. Τα αυγά αυτά έμειναν για 1 χρόνο σε δίσκους φυτώρια στο νησί Umm El Shekh, ενώ μετά μεταφέρθηκαν σε δίσκους ανάπτυξης

στην περιοχή του χωριού Dongonab και κρατήθηκαν για άλλα δύο χρόνια.

Οι δύο αυτοί τύποι του δίσκου φτιάχτηκαν με την υποστήριξη ενός μόνου στρώματος των 15 cm συρμάτινου διχτυού επάνω σε τσιμεντένια κομμάτια γύρω στα 40 cm επάνω από το βυθό της θάλασσας.

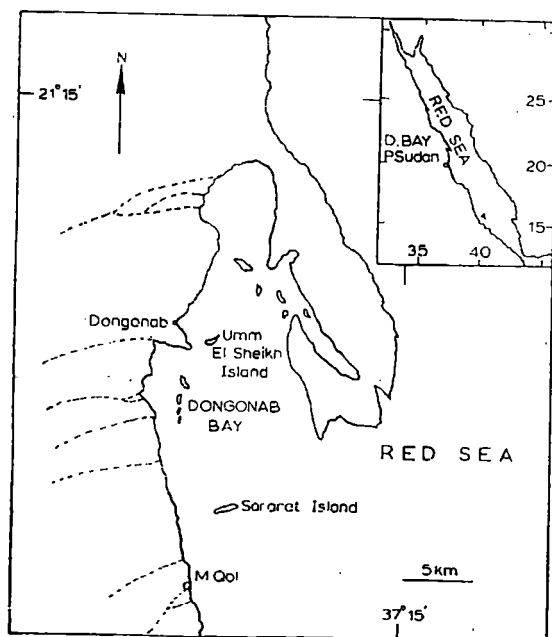
Το στρώμα ήταν καλυμμένο με άλλο λεπτό επίστρωμα φτιαγμένο με σύρμα διαστάσεως των 3,75 cm. Η καλλιέργεια των μαργαριτοφόρων στρειδιών είχε ανοδική επιτυχία μέχρι το 1969 όταν μια τεράστια θνησιμότητα σάρωσε τον κόλπο ακολουθούμενη από μια άλλη το 1973.

Η πραγματική αιτία της θνησιμότητας του 1969 δεν ήταν γνωστή, πιστεύτηκε όμως ότι ήταν εξαιτίας της υπερπλήρωσης των στρειδιών, η οποία κατέληξε στον ανταγωνισμό για την τροφή με συνέπεια τη λιμοκτονία. Η θνησιμότητα του 1973 περιορίστηκε στην περιοχή ανάπτυξης του χωριού Dongonab και τα στρείδια των περιοχών των μονάδων στο νησί Umm El Sheikh δεν επηρεάστηκαν.

2.β.2. Περιοχή της μελέτης

Ο κόλπος Dongonab (21°N) είναι ένας μεγάλος ρηχός κόλπος που απλώνεται σε μια άγονη περιοχή και ανοίγεται στα νότια (εικ. 1)

Η περιοχή ανάπτυξης στην τοποθεσία του χωριού Dongonab είναι τελείως προφυλαγμένη από μία σειρά απομονωμένων και συνεχιζόμενων κοραλλιογενών υφάλων.



ΕΙΚ.1. Χάρτης που δείχνει την περιοχή έρευνας στο κόλπο του Dongonab

2.β.3. Υλικά και μέθοδοι.

Περιβαντολλογικοί παράμετροι.

Οι ακόλουθες παράμετροι παρατηρήθηκαν χρησιμοποιώντας τις μεθόδους που ακολουθούν:

Διαφάνεια: από την Secchi Disk ορατότητα.

Αλατότητα: ογκομετρώντας διάλυμα νιτρικού άλατος του αργύρου (0,28N) έναντι 10ml θαλασσινού νερού, σύμφωνα με τις εξισώσεις του Knudsen's (Harvey 1963,p.125)

Διαλυμένο οξυγόνο νιτρικό άλας ,φωσφορικό άλας πυρίτιο και PH από το HACH Kit .

Πλαγκτόν: συλλεγμένα με το μάζεμα ενός απλού διχτυού για την σύλληψη ζωο-φυτοπλαγκτού στο πίσω μέρος μιας μικρής εξοπλισμένης βάρκας, με μια Seagull εξωλέμβια μηχανή σε μια ταχύτητα των 2,4 Km/h για μια περίοδο των 10 λεπτών κατά την διάρκεια τραβήγματος της βάρκας.

Πειράματα εργαστηρίου

Οι βασικές παρατηρήσεις συμπληρώθηκαν με μια σειρά πειραμάτων σε μια απόπειρα να μελετήσουν την επιρροή των ιζημάτων πάνω στα ζωντανά στρείδια χρησιμοποιώντας γυάλινα και πλαστικά ενυδρεία (54 X 34 X 30 cm).

Ανίχνευση των μετάλλων στο κρέας των στρειδιών

Το κρέας πέντε στρειδιών ομοιογενοποιήθηκε και η συγκέντρωση μετάλλων εκτιμήθηκε με φάσμα ατομικής απορρόφησης φασματοφωτομετρίας και προηγήθηκε το καθάρισμα του ομοιογενούς δείγματος χρησιμοποιώντας συμπυκνωμένο νιτρικό οξύ.

Μικροσκόπια φωτός.

Οι βιολογικοί ιστοί των στρειδιών παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του Gridley's για το είδος *Entamoeba histolytica*, ενώ το υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν σταθεροποιημένο σε διάλυμα του Bouin το οποίο περιβάλλονταν με παραφίνη και κεροειδής

Ανίχνευση μεταλλικής δηλητηρίασης.

Μερικά ανεπηρέαστα στρείδια διατηρήθηκαν σε διάλυμα Bouin's και αναλύθηκαν για ίχνη μετάλλων. Τα μέταλλα στο κρέας του στρειδιού ήταν ως ακολούθως: χαλκός 15ppm, ψευδάργυρος 45 ppm, κάδμιο 0,2 ppm, μόλυβδος μόλις 1 ppm, αρσενικό 2 ppm. Το *Ostrea edulis* από

το ποτάμι των Μαύρων νερών(U. K) αναλύθηκε με την ίδια μέθοδο περιείχε χαλκό και ψευδάργυρο σε συγκεντρώσεις διαλύματος των 58,7 και 297,5ppm αντιστοίχως. Αυτά που συλλέχθηκαν από το ποτάμι Roach Grouch περιείχαν 78,86 ppm χαλκό, 51,96 ppm ψευδάργυρο (J. E προσωπική επικοινωνία 1976).

Ασθένειες μικροβίων

Κατά την διάρκεια της θνησιμότητας του *Pinctada margaritifera* τον Μάιο του 1973 ποικίλοι βιολογικοί ιστοί των πεθαμένων στρειδιών, σταθεροποιήθηκαν στο διάλυμα Bouin's και εξετάστηκαν με φωτεινό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Κάτω από το φως του μικροσκοπίου πολυάριθμοι σωματιδιακοί συνυπολογισμοί φαίνονταν σαν κόκκινα μπαλώματα συγκεντρωμένα σε ορισμένες περιοχές ιδιαίτερα γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία (πιν. 3β). Πιθανά θα μπορούσαν να είναι μεταβολικά κοκκίδια και αιμοσφαίρια. Σε μεγάλους αριθμούς φάνηκαν επίσης στον πεπτικό αδένα ωοειδή και στρογγυλεμένα σωματίδια (5-7μm)(πιν. 3γ). Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξε ότι κάθε ένα από αυτά τα σωματίδια αποτελείται από 6-7 κυτταροπλασματικά κοκκίδια μ' ένα σωληνοειδή δίκτυο στο κυτταρικό τοίχωμα(πιν. 3δ).

Σύμφωνα με τον D. Alderman θα μπορούσαν τα κύτταρα που υπάρχουν σε μερικά φυσιολογικά μαλάκια να είναι καφέ V Sprague. Παράλληλα έχουν τραβήξει την προσοχή άλλα πολυάριθμα σφαιρικά σωματίδια, μεταξύ 2-3 μm μέσα στο επιθήλιο του πεπτικού αδένα. Wolf και Sprague (1978). Ενώ έχουν βρει επίσης όμοια σωματίδια συσχετισμένα με θνησιμότητα του *Pinctada maxima* στην Αυστραλία.

Στην επανεξέταση των αντικειμενοφόρων πλακών του μικροσκοπίου αυτά τα σφαιρικά σωματίδια θα μπορούσαν να διακριθούν καθώς ήταν ελάχιστα « βαμμένα » συγκρινόμενα με άλλες δομές (πιν. 3 ef). Το κάθε ένα αποτελείται από ένα δυσδιάκριτο wall και 1-4 στρογγυλεμένα σωματίδια εσωτερικά P. H. Wolf (προσωπική επικοινωνία 1981) έχει προσδιοριστεί ότι αυτά τα σφαιρικά σωματίδια ήταν τα ίδια που βρήκε στο *Pinctada maxima*.

Κατά αυτόν τον τρόπο είναι αρκετά πιθανό η παρουσία τέτοιων σωματιδίων στον πεπτικό αδένα του *Pinctada margaritifera* να μπορούσε να είναι η αιτία της θνησιμότητας.

2.β.4. Αποτελέσματα

Περιβαντολογικές προϋποθέσεις και οι καλλιεργούμενες περιοχές

Καθίζηση

Ο πυθμένας φυσικής καλλιέργειας στρειδιών στις περιοχές του μεγαλώματος αποτελείτο από μαύρη γκρι συνεκτική άμμο και ένα πολύ λεπτό στρώμα ιζήματος.

Η συνεκτική άμμος ήταν ένα μείγμα από άμμο, λάσπη, τεμαχίδια από κελύφη μαλακίων και σκελετούς τρηματοφόρων.

Ένα δείγμα από το επιφανειακό ίζημα που πάρθηκε από τον πυθμένα των στρειδιών περιείχε χοντρά και λεπτά ιζήματα.

Η ακτή του νησιού Umm El Sheikh - στην οποία βρισκόταν η περιοχή αποτελούνταν από λευκή άμμο, χαλικιώδη άμμο και τεμάχια κελύφων. Η καθίζηση της άσπρης άμμου του σκληρού πυθμένα του φυτώριου έγινε απότομα.

Κίνηση του νερού.

Οι βορειοανατολικοί και νοτιοδυτικοί άνεμοι βρέθηκαν να είναι ο κυριότερος παράγοντας που επηρεάζει τις κινήσεις του νερού. Επίσης επιπλέοντα αντικείμενα παρασύρονταν προς βόρεια και προς νότια με κατεύθυνση την ακτή. Εκτός από την ήρεμη κυκλοφορία του νερού δεν υπήρχαν θαλάσσια ρεύματα στον κόλπο. Το δυνατότερο θαλάσσιο ρεύμα που παρατηρήθηκε ποτέ από τον Grossland(1911) πέρασε από τους 3 κόμβους από την ακτή.

Φυσικοί και χημικοί παράμετροι του περιβάλλοντος νερού.

Σύγκριση μερικών επιλεγμένων παραμέτρων του νερού στην αναπτυσσόμενη περιοχή με εκείνης της μονάδας φαίνονται στον πίνακα 1. Οι παράμετροι παρουσιάζονται με μεγάλη ομοιότητα και στις δύο περιοχές με εξαίρεση την διαφάνεια.

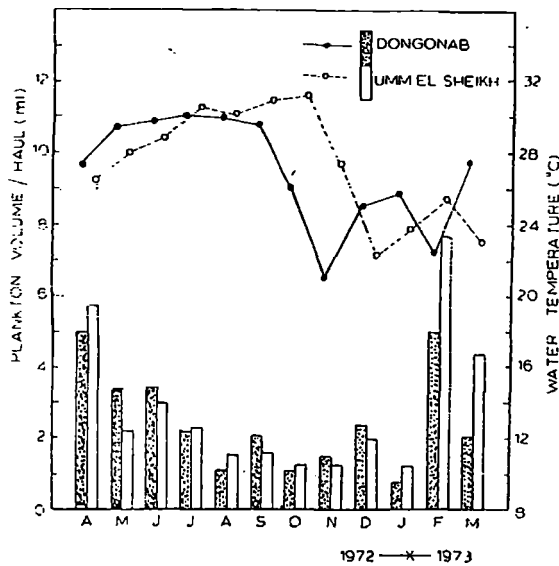
Parameters	Range	
	Dongonab	Umm El Sheikh
Water temperature (° C)	21.2 - 30.4	22.1 - 31.5
Transparency (M)	3 - 5.9	4 - 11.5
Salinity (‰)	42 - 42.7	42 - 42.7
Oxygen (ml/l)	4.9 - 7	4.9 - 7
Nitrite (μg at./l)	0.04 - 0.5	0.07 - 0.7
Phosphate (μg at./l)	0.06 - 0.8	0.06 - 0.4
Silicate (μg at./l)	7 - 21	7 - 24
pH	7.8 - 8.6	7.8 - 8.6

Πίνακας-1. Μερικές επιλεγμένες παράμετροι του περιβάλλοντος των Μαργαριτοφόρων στρειδιών στη περιοχή ανάπτυξης (Dongonab) και εκτροφής (Umm El Sheikh).

Τροφική διαθεσιμότητα

Εποχιακές αλλαγές του όγκου του πλαγκτού στις περιοχές ανάπτυξης της μονάδας φαίνονται στην εικ.2. Οι υψηλότερες τιμές φάνηκαν κατά την διάρκεια των κρύων μηνών και ο μικρότερος όγκος πλαγκτού πραγματοποιήθηκε κατά την διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών." Κόκκινη παλίρροια " δεν παρατηρήθηκε κατά την διάρκεια θνησιμότητας των στρειδιών. Παρόλα ταύτα τα πλαγκτονικά δείγματα συλλεγμένα στην αρχή της θνησιμότητας συμπεριλάμβαναν και τα δινομαστιγοφόρα είδη *Noctiluca* και *Eymnodinium*.

Τα δύο μαστιγοφόρα είδη εμφανίστηκαν στα πλαγκτονικά δείγματα που συλλέχθηκαν από την περιοχή σε μηνιαία διαστήματα. Η συγκέντρωσή τους κατά την διάρκεια της θνησιμότητας δεν ήταν ομαλή.



Εικ.2. Εποχιακή μεταβολή του όγκου του πλαγκτού ανά διαδρομή στις περιοχές ανάπτυξης(Dongonab) και εκτροφής (Umm El Sheikh).

2.β.4.1. Οργανισμοί που προκαλούν ρύπανση στην καλλιέργεια των στρειδιών.

Οι καλλιέργειες των στρειδιών περιλάμβαναν πολλούς φυτικούς και ζωϊκούς οργανισμούς που προκαλούν ρύπανση. Από διάφορες περιοχές του κόλπου υπήρχαν παρασυρόμενα φύκια και άλλα άλγη που περιοδικά αυξάνονταν στις καλλιέργειες των στρειδιών κατά την διάρκεια των θελλωδών μηνών.

Βρέθηκαν οι ακόλουθοι οργανισμοί ρύπανσης.

Φυτά:Καφέ φύκια *Padina* sp,πράσινα άλγη *Caulerpa* sp,ασβεστώδη άλγη *Halimeda* sp, και ποικίλα κόκκινα άλγη.

Κοιλεντερωτά: *Actinidae* και ποικίλα *Hydroids*

Annelids:Ποικίλα νηριής γένη θαλάσσιων σωλήνων *sabellid* και άλλα είδη σωλήνων γαιοσκωλήκων.

Οστρακόδερμα: *Alpheus* sp, *Phymodius unguatus* είναι ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα του είδους *Pinnotheridae*, *Liomera rugatus*, *Trapezia digitolis* *Retrolisthes lamarckii* *Actea hispidus*

Μαλάκια: *Fissurella* sp, *Trochus deutatus*, διάφορα *Cyprala* spp *Murex ramosus*, και ποικίλα κωνικά όστρακα ιδιαίτέρως *Conus avenatus*.

Εχινόδερμα: *Linckia multiloba*, *Ornithoxia* sp, *Holothuria atra*, *Himantopus*, *H. parvatus* *Synaptula reciproca* και *Ophiotrocha superba*.

Tunicates: *Ascidia nigra* και *Styela plicata*.

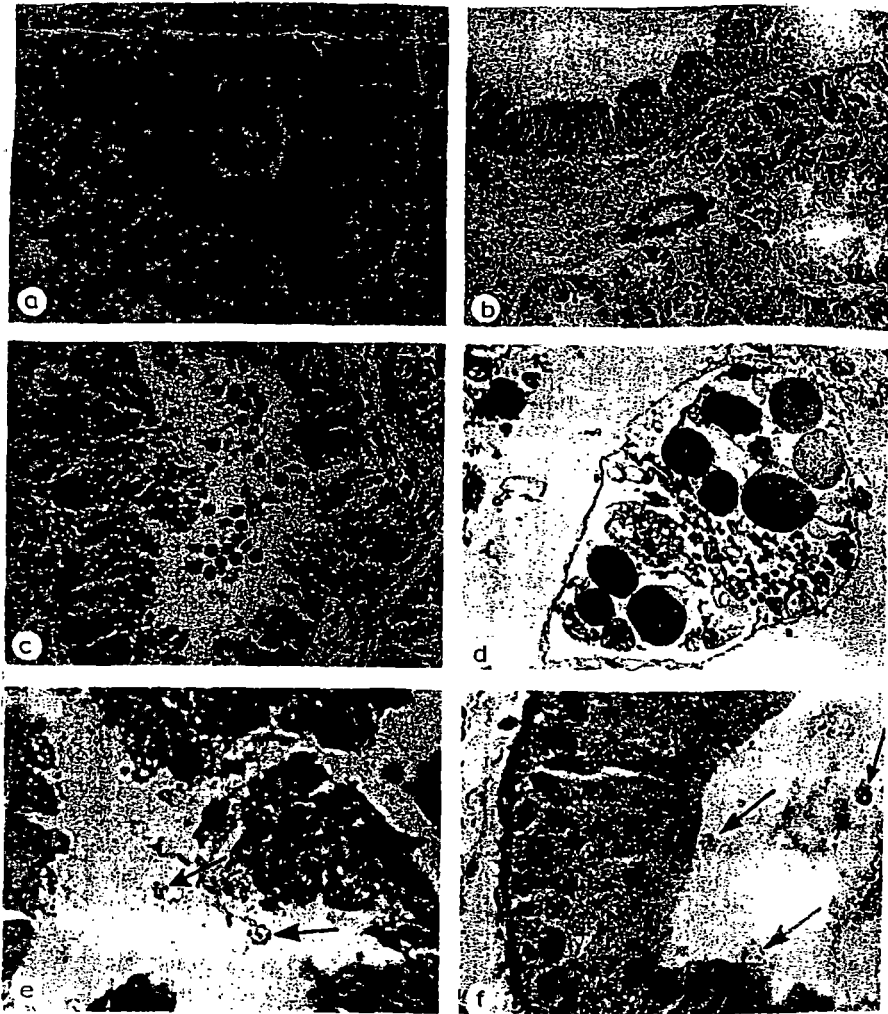
Οι περισσότεροι οργανισμοί ρύπανσης προσκολλήθηκαν σαν προνύμφη του γόνου στους συλλέκτες αυγών και στους δίσκους των στρειδιών (κοιλεντερωτά tunicates και sabellid σκώληκες) ενώ πιθανότατα συναγωνίστηκαν με τα στρείδια για την τροφή.

2.β.4.2. Οι θηρευτές συμβιωτικοί οργανισμοί και παράσιτα.

Ο μοναδικός θηρευτής που παρατηρήθηκε από τον συγγραφέα ήταν το σπειροειδές όστρακο γαστρόποδο μαλάκιο *Chicoreus ramosus*. Δεν παρατηρήθηκαν ψάρια άρπαγες των μαργαριτοφόρων στρειδιών. Ωστόσο διάφορα αρπακτικά είδη καταγράφηκαν από τον Grossland (1957), συμπεριλαμβάνονταν *Lethrinus nebulosus*, *Acanthopagrus bifasciatus*, *Balistoides viridescens* και *Pseudobalistes flavimarginatus*. Οι συμβιωτικοί οργανισμοί που παρατηρήθηκαν συμπεριλάμβαναν το καρκινοειδές καβούρι *Conchodytes meleaguræ*.

Τα παράσιτα ήταν ο λασποσκώληκας *Polydora* sp και οι κοινότυποι σπόγγοι *Cliona* sp. Οι ζημιές που προκλήθηκαν από τα δύο αυτά παράσιτα περιορίστηκαν στο όστρακο. Άλλο παράσιτο που παρατηρήθηκε ήταν ένα προνυμφιακό Cestode του γένους *Tylocephalum*.

Το παράσιτο βρέθηκε μέσα στο χώρο μεταγενέστερο των χειλικών κεραιών και ήταν θηλακωμένο εντός ενός ινώδους στρώματος με βαριά διήθηση της κάψουλας από τα λευκοκύτταρα του στρειδιού (Εικ.3α). Η θηλάκωση μπορεί να είναι ένας αμυντικός μηχανισμός κατά της εισβολής ξένων σωμάτων (Cheng 1967).



ΕΙΚ.3. (α) Το metacestode *Tylocephalum* που παρασιτεί στην περιοχή κοντά στο στόμα του *Pinctada margaritifera*.
 (β) Κηλίδες ωσειδών σωμάτων συγκεντρωμένες γύρω από ένα αιμοφόρο αγγείο στο *Pinctada margaritifera* (x100).
 (γ) καφέ κύτταρα στο πεπτικό diverticulum του *Pinctada margaritifera* (X250).
 (δ) Ηλεκτρομικρογράφημα ενός καφέ κυτάρου από το *Pinctada margaritifera* (X1500).
 (ε) & (φ) Απροσδιόριστα σώματα στον πεπτικό αδένα του *Pinctada margaritifera* (πετρέλαιο X625).

2.β.4.3. Γενική εξωτερική εμφάνιση των νεκρών στρειδιών.

Κατά την διάρκεια της θνησιμότητας στο έτος 1973 επηρεάστηκαν μόνο τα *P. margaritifera*.

Διαφορετικοί δίσκοι μεταφοράς επηρεάστηκαν στην ίδια τοποθεσία μ' ένα τυχαίο τρόπο. Τα περισσότερα στρείδια που πέθαναν στην έρευνα παρατηρήθηκε ότι έδειχναν κάποια βασικά χαρηκτηριστικά που δεν υπήρχαν στα υγιή στρείδια. Τα χαρακτηριστικά αυτά συμπεριλάμβαναν

έκκριση μεγάλων ποσοτήτων βλεννών η οποία κάλυπτε τελείως τα βράγχια στο σημείο που τα λεπτά νήματα των βραγχίων ήταν σχεδόν όμοια και δεν μπορούσαν να ξεχωρίσουν.

Αυτό το στάδιο ακολούθησε ένα απότομο κλείσιμο των βαλβίδων και μια έκκριση της βλέννας η οποία περιείχε μικρή ποσότητα από λεπτό ίζημα. Μερικές ώρες αργότερα το νωτιαίο και κοιλιακό άκρο άρχισε να καμπυλώνεται προς τα μέσα και τα αισθητήρια όργανα στο νωτιαίο και κοιλιακό άκρο άρχισαν να αποδυναμώνονται όπως έδειξαν με την πολύ αργή αντίδραση του επικαλούμενου μυ. Ένα τέτοιο στρείδι που απομακρύνθηκε από το νερό έδειξε ότι η κοιλότητά του ήταν φουσκωμένη και γεμάτη από αίμα, το ορθό έντερο ήταν πρησμένο, το κρυσταλλένιο στυλ απουσίαζε και το στομάχι περιείχε λίγη τροφή συγκρινόμενο με τους προηγούμενους μήνες.

2.β.4.4. Έρευνα για τις πιθανές αιτίες της θνησιμότητας.

Αναφορές των μαζικών θανάτων είναι παρόντες στις βιολογικές βιβλιογραφίες των στρειδιών. Σε πολλές περιπτώσεις ο αιτιολογικός παράγοντας θα μπορούσε να είναι συνδυασμός από διάφορους περιβαντολλογικούς παράγοντες μαζί με τις ασθένειες, προκαλούμενες από ποικίλους παθογόνους οργανισμούς.

(Galtsoft 1964: Sinderman και Rosenfield 1967). Η παρουσία των βακτηρίων των πρωτόζωων και των μυκήτων είναι πάντοτε πιθανή και είναι δείγματα έτοιμα να εισβάλλουν και να κατακτήσουν τα πιο αδύναμα δείγματα. (Walne 1961). Οι ακόλουθες έρευνες έγιναν αργότερα για να στηρίξουν την απόκλιση σε διάφορες αιτίες.

Ιζήματα και πληθώρα.

Δύο πειράματα διεκπεραιώθηκαν για να δείξουν την επίδραση του ιζήματος και του πληθυσμού των στρειδιών :

το πρώτο πείραμα έγινε στην μονάδα πριν την θνησιμότητα και το δεύτερο έγινε στο εργαστήριο μετά την θνησιμότητα. Από την μονάδα πήραν μια ομάδα στρειδιών ηλικίας 2 - 4 χρόνων τα οποία κρατήθηκαν σε κλουβιά από γαλβανισμένο σύρμα που κρέμονταν από φλωτέρ σε βάθος 60cm από την επιφάνεια σε αναπτυσσόμενους δίσκους (τον Οκτώβριο του 1972). Το βάθος του νερού στην περιοχή αυτή ποίκιλε από 3 - 4 μέτρα. Αντίθετα από τα στρείδια στους δίσκους, τα στρείδια στα κλουβιά δεν επηρεάστηκαν από την θνησιμότητα του 1973 και ήταν ελεύθερα από τα ιζήματα και τους μολυσμένους οργανισμούς. Στο εργαστήριο δύο σειρές πειραμάτων διεκπεραιώθηκαν χρησιμοποιώντας τέσσερα γυάλινα και τέσσερα πλαστικά ενυδρεία, που το κάθε ένα από αυτά περιλάμβανε

πέντε άγρια στρείδια (ηλικίας 3 - 4 χρόνων) σε 50l θαλασσινού νερού και σε θερμοκρασία δωματίου (26 - 28oC).

Προστέθηκε επιφανειακό ίζημα από τον πυθμένα της καλλιέργειας των στρειδιών σε κάθε ένα από τα τρία γυάλινα ενυδρεία σε συγκεντρώσεις διαλύματος των 3,2 1g/l (υγρού βάρους)αντιστοίχως.Παρόμοιες ποσότητες ιζήματος προστέθηκαν και στα τρία πλαστικά ενυδρεία.Τα δύο ενυδρεία που παρέμειναν κρατήθηκαν ελεύθερα από ίζημα σαν ρυθμιστές.Το νερό είχε συχνή ανάδευση και συνεχή αερισμό με μικρή άντληση αέρα.

2β5. Συμπεράσματα

Η θνησιμότητα του *Pinctada margaritifera* το 1973 συνέπεσε με την υπερπληθώρα των στρειδιών για πειραματικούς σκοπούς, σε σύγκριση με την ιζηματοποίηση του πυθμένα της θάλασσας. Και οι δύο παράγοντες ήταν ύποπτοι για την εξασθένηση των στρειδιών με το να παρεμποδίζουν την κανονική τροφική δραστηριότητα καθώς έδειξε η μελέτη που έγινε μικρή ποσότητα τροφής να βρισκόταν στα έντερα.

Ο Grossland (1957) επισήμανε ότι η ανάπτυξη των θαλάσσιων φυκών μερικές φορές προκαλούσε ασφυξία και μαζί με την υπερπληθώρα των στρειδιών είχε σαν αποτέλεσμα τον θάνατο μερικών από λιμοκτονία. Η υπερπληθώρα ερευνήθηκε και σαν αποτέλεσμα είχε τα στρείδια να στοιβάζονται σε πυθμενικούς δίσκους (20-50 όστρακα/m²). Το συμπέρασμα ήταν ότι το 90% των στρειδιών των δίσκων του βυθού είχαν σταθερά πεθάνει, όχι όμως εκείνα που μελετήθηκαν από τα παραπάνω κλουβιά. Ωστόσο επαναλαμβανόμενα εργαστηριακά πειράματα έγιναν σε φυσικά και καλλιεργούμενα αποθέματα και δεν έδειξαν καμία επίδραση του ιζήματος ή του υπερπληθυσμού πάνω στα στρείδια.

Η πιθανότητα τα στρείδια να ήταν κάτω από το στρεσάρισμα της ωτοκίας αποκλείεται επειδή η θνησιμότητα συνέβηκε το Μάιο πριν την εποχή της ωτοκίας, η οποία συνήθως άρχιζε τον Ιούλιο και συνεχιζόταν καθ' όλη την διάρκεια του Αυγούστου.

Ιχνος μεταλλικής δηλητηρίασης μπορεί επίσης να αποκλείστηκε εάν τα μέταλλα που μαζεύτηκαν από άλλα συγγενικά είδη συγκρίθηκαν.Για παράδειγμα *Grassostrea virginica* από μη μολυσμένα νερά του ακρωτηρίου God περιείχε από 8,2 ως 13,77mg χαλκού ανά 100gr ξηρού βάρους (Galtsoff 1964).

Ο Hunter και Harrison έδειξαν ότι τα στρείδια που επηρεάστηκαν από την βιομηχανική μόλυνση σε ορισμένες παράλιες περιοχές στο Connecticut, New York και New Jersey περιείχαν υπολείμματα από αρσενικό ποικίλων συγκεντρώσεων από 0,6 -3 mg/Kg(ppm).Ωστόσο οι

Portman και Wilson (1971) βρήκαν ότι 100 ppm χαλκού (CuSO₄) ήταν επαρκή για να σκοτώσουν το 50% των *Ostrea Edulis* χρησιμοποιώντας την μέθοδο LD50 κατά την οποία όταν αυτό δοθεί στον πληθυσμό η ποσότητα αυτή σε κάθε άτομο σκοτώνει τον μισό πληθυσμό.

Η θνησιμότητα αυτή συνέβηκε το Μαΐο ο οποίος είναι καλοκαιρινός μήνας και επηρεάστηκαν μόνο τα μαργαριτοφόρα στρείδια. Ο θάνατος ήταν ακανόνιστος, διαφορετικοί δίσκοι στην ίδια περιοχή επηρεάστηκαν με έναν τυχαίο τρόπο, ενώ ήταν έντονη έκκριση βλέννας που δεν είχε παρατηρηθεί πριν. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά έδειξαν ότι τέτοια θνησιμότητα ήταν εξαιτίας μιας ασθένειας (Mackin 1959). Το μάζεμα του μανδύα και η διακοπή του τσίσματος ήταν η πρώτη ένδειξη της μετάδοσης της παθογόνου λοίμωξης του *Pinctada maxima* στην Αυστραλία (Wolf 1977), όμοια εμφάνιση έδειξε και το *Pinctada margaritifera* στην Ερυθρά Θάλασσα.

Μόνο τα ώριμα στρείδια των φυσικών περιοχών επηρεάστηκαν και δεν επηρεάστηκε ο γόνος της καλλιεργούμενης περιοχής του νησιού Umm El Sheikh. Αυτό έγινε γιατί τα καλλιεργούμενα στρείδια είναι πιο ανθεκτικά στην μετάδοση της παθογόνου λοίμωξης (Mackin 1959).

Ωστόσο η παρουσία της άγνωστης ταυτότητας σφαιρικών σωματιδίων στα επιθήλια του πεπτικού αδένος των μαργαριτοφόρων στρειδιών που πέθαιναν μπορεί να είναι η αιτία για την θνησιμότητα.

3.Τεχνητή αναπαραγωγή εκτροφή προνυμφών και νεαρών μαργαριτοφόρων στρειδιών και θνησιμότητα του *Pinctada maxima*.

3.α.Αναπαραγωγικός κύκλος στην Δυτική Αυστραλία του *Pinctada maxima*.

3.α.1. Εισαγωγή

Στην Δυτική Αυστραλία η καλλιέργεια των στρειδιών βρίσκεται στην Τρίτη καλύτερη θέση της εμπορικής αλιείας μετά τους αστακούς και τις καραβίδες. Για την καλλιέργεια των μαργαριταριών η βιομηχανία βασίζεται σχεδόν ολοκληρωτικά στο φυσικό είδος των Τροπικών ειδών Indo-Pacific τα οποία είναι ασημόχειλα ή (χρυσόχειλα) μαργαριτοφόρα στρείδια *Pinctada maxima*(Jameson). Για το άγριο εμπόρευμα χρειαζόταν βιοοικονομικό ρίσκο, έτσι έπρεπε να επενδύσουν για την παραγωγή μαργαριταριών (Dybdahl και Rose 1986).

Η έκταση της μονάδας είναι σύνθετη εάν αλιεύονται περισσότερα άγρια είδη ή για να αυξάνει την παραγωγή, ή να δοκιμάσει υψηλά επίπεδα θνησιμότητας στα στρείδια μετά την συλλογή που συμβαίνει στη Δυτική Αυστραλία. (Pass et al 1987).

Το κόστος λειτουργίας σχετίζεται με την συλλογή και την μεταφορά των άγριων στρειδιών για την παραγωγή μαργαριταριών.

Η ποιοτική όψη της αναπαραγωγικής βιολογίας του *Pinctada maxima* που προηγουμένως περιγράφηκε από τους Wada (1942, 1953 α, β κ'γ) και Tranter (1958 α) δεν φαίνονταν να διαφέρουν σημαντικά από αυτή του *Pinctada margaritifera* και *Pinctada albina* (Tranter 1958, Β, Γ, Δ, Ε). Επιτόπιες παρατηρήσεις που έγιναν στα αλιευτικά πεδία της Βόρειας Αυστραλίας από τον Wada (1953α και 1953γ) έδειξαν ότι το *Pinctada maxima* παρουσίασε το φαινόμενο του πρωτανδρικού και ερμαφροδιτισμού, φτάνοντας η ωριμότητα του αρσενικού φύλλου στο πρώτο χρόνο ζωής (110 - 120 mm σε ύψος οστράκου, SH) με επίπτωση στην θηλυκή σεξουαλικότητα η οποία αυξάνει ή με την ηλικία ή με το μέγεθος. Η σχέση μεταξύ του ύψους των οστράκων και της φυλετικής αναλογίας έδειξε ότι τουλάχιστον 30 - 40 % των ατόμων που επιβιώνουν βρίσκεται σε μεγαλύτερο μέγεθος αλλάζοντας φύλο από αρσενικό σε θηλυκό. Τα στρείδια που συλλέχθηκαν από μη καλλιεργήσιμα πεδία είχαν μια φυλετική αναλογία που πλησίαζε το 1: 1 όταν όμως το ύψος του οστράκου ήταν περίπου ≥ 200 mm. Ομοίως ο Tranter (1958α) επιβεβαίωσε την παρουσία μιας σχέσης μεταξύ του φύλου καθώς και το μέγεθος / ηλικία των στρειδιών και διεξέγαγε προκαταρκτικές δοκιμές ωοτοκίας με στρείδια από το νησί Queensland. Για την καλύτερη γνώση της θαλάσσιας καλλιέργειας και της δυναμικής του πληθυσμού του άγριου

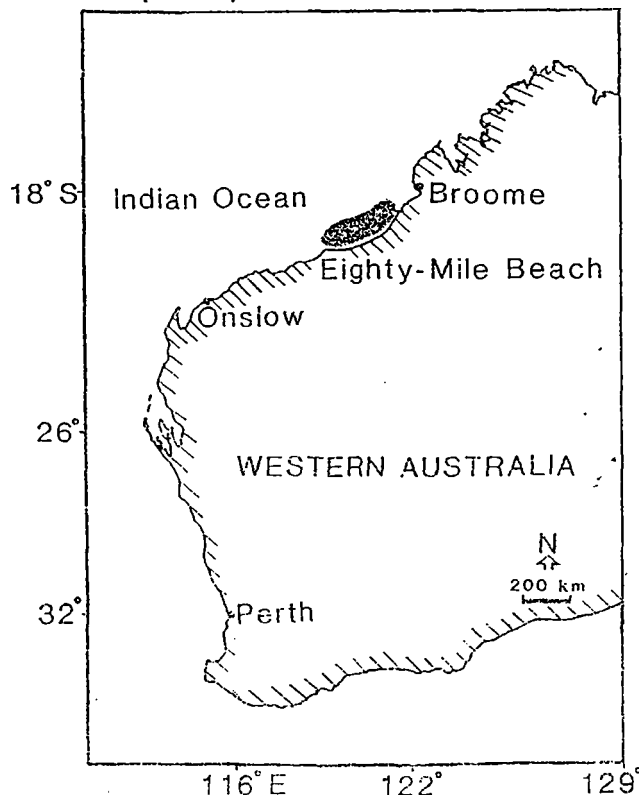
είδους, είναι βασικό να κατανοήσουμε τον αναπαραγωγικό κύκλο του *Pinctada maxima* της Δυτικής Αυστραλίας. Πριν από αυτή την μελέτη τα μόνα στοιχεία για τις περιόδους ωοτοκίας ήταν αυτή του Wada (1953α) ο οποίος σημείωσε ότι η παρουσία νεαρών στρειδιών στα πεδία αλιείας στο Torres Strait και στο Queensland συνέπεσε με μια έκδηλη μείωση στην ανάπτυξη μονάδων των μαργαριτοφόρων στρειδιών. Υπέθεσε ότι η περίοδος ωοτοκίας γι' αυτούς τους πληθυσμούς ήταν από τον Οκτώβριο / Νοέμβριο μέχρι τον Φεβρουάριο / Μάρτιο.

Η περιγραφή που γίνεται βασίζεται πάνω στον ετήσιο αναπαραγωγικό κύκλο των μαργαριτοφόρων στρειδιών και στηρίζεται σε πληθυσμούς πέρα από την Βορειοδυτική ακτή της Αυστραλίας σε μία περίοδο 6 ετών. Τα αποτελέσματα προσδιορίστηκαν από ιστολογικά τεμάχια των γονάδων.

3.α.2. Υλικά και μέθοδοι.

3.α.2.1. Συλλογή γονάδων.

Κατά την διάρκεια της περιόδου αλιείας από Μάρτιο μέχρι Νοέμβριο τα μαργαριτοφόρα στρείδια συλλέχθηκαν κυρίως από πεδία αλιείας πέρα από τα παράλια 80 μιλίων (μεταξύ Lat, 18° 30' S Long 120° 41' E και Lat 19° 50' S Long 120° 51' E) και συμπωματικά από πεδία κοντά στο Broome και Onslow (εικ. 1)



Εικόνα 1. Περιγραφικό διάγραμμα στη Δυτική Αυστραλία δείχνοντας την περιοχή συλλογής των μαργαριτοφόρων στρειδιών πέρα από την 80 μιλίων παραλία.

Κατά την διάρκεια της περιόδου των κυκλώνων (Δεκέμβριο - Φεβρουάριο) δεν ήταν δυνατή η συστηματική δειγματοληψία από τα πεδία αλιείας. Σ' αυτή την εποχή το δείγμα των γονάδων είχε ληφθεί από μεγάλα στρείδια τα οποία όμως δεν ήταν κατάλληλα για καλλιέργεια γιατί είχαν τουλάχιστον ένα χρόνο ζωής, σε τόπους εκμίσθωσης κοντά στη θέση Broome.

Το δείγμα των γονάδων συλλεγόταν σχεδόν 2 φορές το μήνα για περίπου 6 χρόνια (Σεπτέμβριος 1982 - Ιούνιο 1988). Ένα σύνολο 1, 328 *Pinctada maxima* (> 120 mmSH) εκτελέστηκε ιστολογικά για να προσδιοριστεί ο γαμετικός κύκλος και των δύο φύλων. Οι γονάδες των 12 μικρότερων στρειδιών κυμαίνονταν ανάμεσα σε 95 έως 115 mmsH ενώ για να επιβεβαιωθεί το μέγεθος στο οποίο γίνεται η ωρίμανση χωρίστηκαν σε τμήματα. Οι γονάδες του *Pinctada maxima* δεν είναι ευδιάκριτα όργανα. Τα αναπαραγωγικά θηλάκια ξεκινούν από την ουρογεννητική οπή πλησιέστερα στον ελκυστικό μυ και πολλαπλασιάζεται μέσα στον συνδετικό ιστό μεταξύ του επιθήλιου και του σπλάχνου.

Από διαφορετικές περιοχές έχουν παρθεί τεμάχια των γονάδων, τα οποία έδειξαν ότι η ανάπτυξη του γαμέτη μέσω των γονάδων είναι αμυντικά ομοιόμορφη. Ο ιστός των γονάδων κοντά στο άκρο του εντέρου πάρθηκε για να εξασφαλιστεί η μεγαλύτερη δυνατή τεμάχιση για ποσοτική εκτίμηση της γαμετογένεσης.

Δείγματα από αυτά τοποθετήθηκαν μέσα σε διάλυμα Davidson's και διατηρούνται σ' αυτό με 70% αλκοόλη, αφυδατωμένα με αραίωση της αλκοόλης, περιτυλιγμένα με παραφίνη, αφού είχαν τεμαχιστεί και βαφτεί με Harris αιματοξυλίνη και εωσίνη.

3. α. 2. 2 Στάδια της ανάπτυξης των γονάδων.

Αποκλείοντας το ερμαφροδιτικό στάδιο ο αναπαραγωγικός κύκλος του *Pinctada maxima* είχε απλοποιηθεί σε πέντε γενικά στάδια γαμετογένεσης, ακολουθώντας μια διάταξη που αναπτύχθηκε από τον Tranter (1958 Β και Γ) για το *Pinctada albina*.

Στάδιο 0: Ασαφής ή αδρανής. Δεν υπάρχει απόδειξη της ανάπτυξης των γονάδων, παρά άδεια θηλάκια και συνδετικοί ιστοί περιέχουν διαφορετικούς τύπους κοκκοκυττάρων και φαγοκυττάρων.

Στάδιο 1: Αρχική γαμετογένεση. Όστρακο: Το θηλάκιο στην αρχή είναι μικρό και επενδεδυμένο με στελεχικά κύτταρα και σπερματογενέσεις. Καθώς η σπερματογένεση προχωρεί τα πρωτεύοντα και δευτερεύοντα σπερματοκύτταρα πολλαπλασιάζονται ταχύτατα και γεμίζουν την οπή του θηλακίου.

Ωοθήκη: Τα θηλάκια στην αρχή είναι μικρά, κακοσχηματισμένα και άδεια και με τοιχώματα επενδεδυμένα με κύτταρα και αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα. (Πιν 3Α). Η πρώτη ωοτοκία και τα βασικά ωοκύτταρα έχουν λίγη ή καθόλου λέκιθο το καθένα από αυτή με ένα πυρήνα, μια μεγάλη

(μπλε κηλίδα) και βρίσκονται συχνά προσκολλημένα στο τοίχωμα του θηλακίου. Καθώς η ωογένεση προχωρεί η ωοτοκία και τα νεαρά κύτταρα πολλαπλασιάζονται κατά μήκος των εσωτερικών τοιχωμάτων και αρχίζουν να επιμηκύνονται τα λίγο μεγαλύτερα ωοκύτταρα.

Στάδιο 2: Η ανάπτυξη της σχεδόν ώριμης γαμετογένεσης. Όστρακο:

Τα θηλάκια μεγενθύνονται με σπερματογόνια και σπερματοκύτταρα πολλαπλασιαζόμενα κατά μήκος της οπής και πληρώνοντας τον κεντρικό χώρο με σπερματοβλάστες και σπερματοζωάρια. Η όξινη ουρά τους εμφανίζεται σε ροζ γραμμή ακτινοβολώντας από το κέντρο του κυττάρου (πιν. 2D). Τα σχεδόν ώριμα θηλάκια μεγενθύνονται σημαντικά με το αναπτυσσόμενο σπέρμα να εμφανίζεται σαν βαθύσκουρα λωρίδα (αρκετά κύτταρα βαθειά) γύρω από την περιφέρεια του θηλακικού τοιχώματος του οποίου είχε ελαττωθεί το πάχος (πιν. 2E) . Εξαιρώντας την απομόνωση του θήλακος των σπερματοκυττάρων και των σπερμάτων, το θηλάκιο των ενδοκυτταρικών χώρων του κυττάρου είναι με τα σπερματοζωάρια.

Ωοθήκη: Τα ωοκύτταρα που συνδέονται με το θηλακικό τοίχωμα έχουν αρχίσει να συσσωρεύουν λέκιθο και να διαστέλλονται μέσα στον ενδοκυτταρικό χώρο και να εμφανίζονται στο κέντρο μερικά ελεύθερα ωοκύτταρα (πιν. 3C). Τα σχεδόν ώριμα θηλάκια είναι πυκνά γεμισμένα με μεγάλα ωοκύτταρα (με μερικά να παρουσιάζουν και πυρήνα) τα οποία συνδέονται ακόμα με το θηλακικό τοίχωμα (πιν. 3D)

Στάδιο 3.

Ωριμη ωορηξία. Όστρακο:

Τα θηλάκια είναι σχεδόν εξ ολοκλήρου γεμάτα με σπερματοζωάρια. Τα σπερματοκύτταρα και τα σπέρματα περιορίζονται στο να επιστρώνουν τα θηλακικά τοιχώματα, τα οποία γίνονται όλο και λεπτότερα με την ωρίμανση (πιν. 2F).

Ωοθήκη:

Τα θηλάκια είναι γεμάτα με σχεδόν εξ ολοκλήρου ελεύθερα πολυγωνικά ωοκύτταρα και μέσα στον πυρήνα μπορούν και παρουσιάζουν νουκλεοτίδιο (πιν. 3E).

Στάδιο 4:

Μερικώς χρησιμοποιούμενη ωορηξία. Όστρακο:

Η γονάδα περικλείει το θηλάκιο μ' ένα κενό στον ενδοκυτταρικό χώρο. Αυτές όμως που είναι γεμάτες έχουν ένα άνοιγμα ανάμεσα στο θηλακικό τοίχωμα και στη μάζα των σπερματοζωαρίων που παραμένουν στον ενδοκυττάριο χώρο (πιν. 2G). Τα μερικώς παραγόμενα θηλάκια περιέχουν φαγοκύτταρα που βρίσκονται ανάμεσα στα σπερματοζωάρια. Τα χρησιμοποιούμενα θηλάκια είναι κενά, εκτός από μερικά κοιλώματα του σπέρματος και των φαγοκυττάρων που κατοικούν

στον ενδοκυτταρικό χώρο. Η αναδιόρθωση μπορεί να γίνει αντιληπτή κατά μήκος των τοιχωμάτων μερικών θηλακίων (πιν.2Η).

Ωοθήκη:

Τα θηλάκια είναι αρχικά άδεια με μικρές ποσότητες ύλης που υπάρχει στον χώρο ανάμεσα στα ελεύθερα ωκύτταρα τα οποία έχουν πάρει σχήμα στρογγυλό αχλαδιού, (πιν.3 F).

Τα θηλάκια τα οποία είναι σχεδόν πλήρως χρησιμοποιημένα παρουσιάζουν εκτεταμένη ανάπτυξη που συμβαίνει στο εσωτερικό θηλακικό τοίχωμα με μεγαλύτερη επαναπορρόφηση υλικών που περιβάλλουν τα ελεύθερα ωκύτταρα. Τα χρησιμοποιημένα θηλάκια είναι σχεδόν άδεια άδεια και χωρίς σημάδια γαμετογένεσης. Εξαιρώντας τα απομονωμένα ωκύτταρα που περιβάλλονται από ιστό με φαγοκύτταρα.

Ερμαφροδιτική φάση:

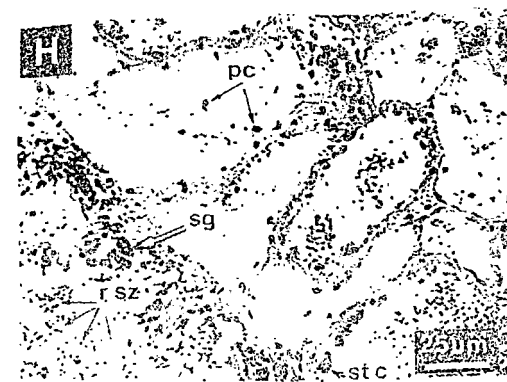
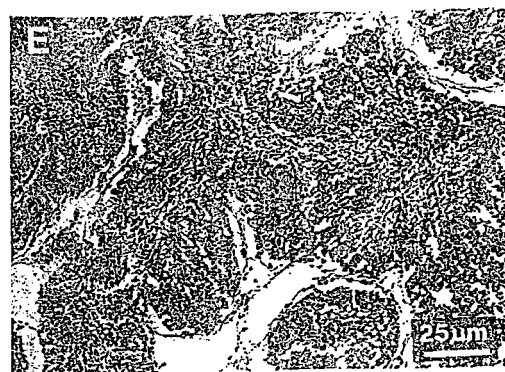
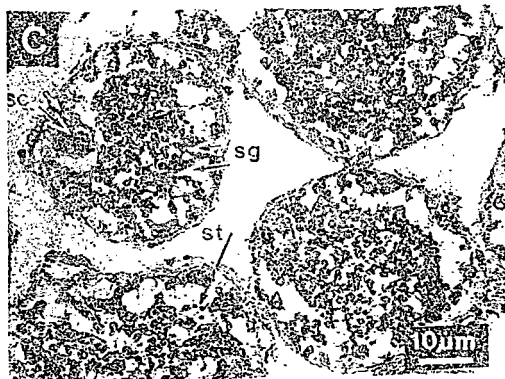
Αυτή η σεξουαλική κατάσταση σπανίως είχε παρατηρηθεί, είναι όμως δύο μορφές ερμαφροδιτισμού που ξεχωρίζουν:

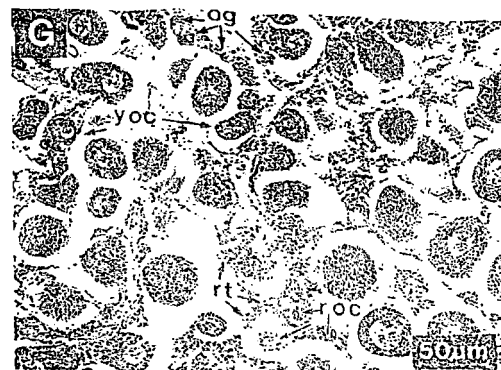
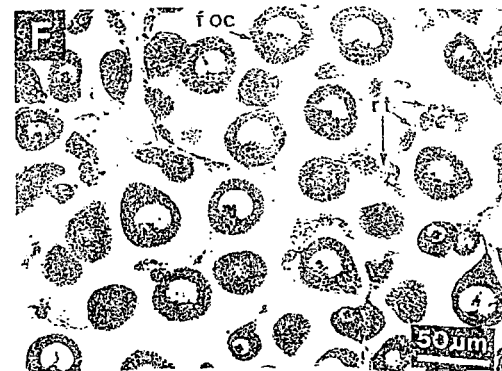
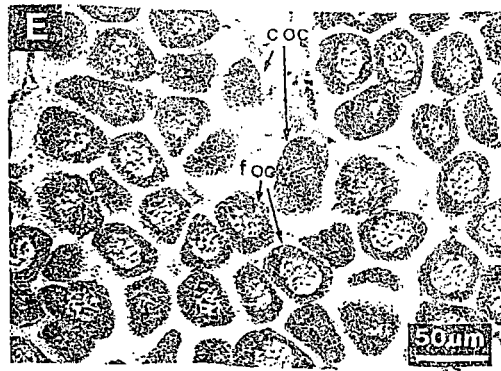
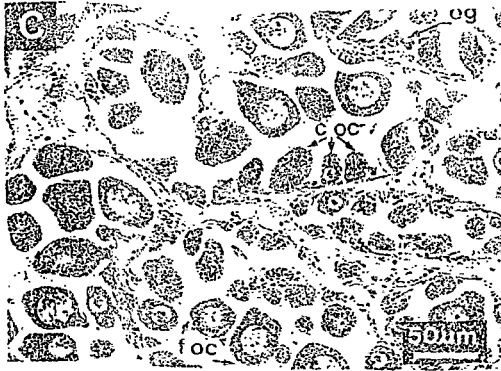
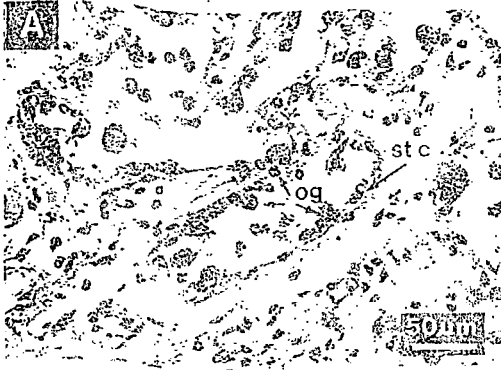
α) Στην πρώτη και λιγότερο συχνή τα δύο φύλλα συνυπάρχουν στο ίδιο θηλάκιο (πιν.4Α)

β) Στην δεύτερη μορφή παρουσιάστηκε η μια σεξουαλική φάση να συμπίπτει εν μέρει με την άλλη. Για παράδειγμα όταν η ωογένεση αρχίζει πριν το υπολειμματικό σπέρμα να έχει πλήρως απομακρυνθεί από το θηλακικό ενδοκυτταρικό χώρο. (πιν 4β). Η γαμετογένεση ήταν μια διαρκή διαδικασία ανάμεσα στα δύο άλλα φύλλα και η διάκριση δεν ήταν πάντα δυνατή με μερικά

στάδια να συμπίπτουν εν μέρει μέσα στις ίδιες γονάδες. Επομένως οι ενεργώς αναπτυσσόμενοι και ώριμοι γαμέτες συνδυάζονταν στο στάδιο 2 και οι μερικώς ωρηγμένοι και χρησιμοποιούμενοι γαμέτες στο στάδιο 4.

Αναπαραγωγικός κύκλος του *Pinctada maxima*





Εικόνα 2. Η ενδιάμεση σεξουαλική φάση και τα διάφορα στάδια γαμετογένεσης του αρσενικού *Pinctada maxima* (A) ενδιάμεση φάση (στάδιο 0).

(B) Έναρξη της γαμετογένεσης (στάδιο 1) με στελεχικά κύτταρα (stc) σπερματογονία (sg)πολλαπλασιαζόμενα κατά μήκος του εσωτερικού των τοιχωμάτων του θυλακίου.

(Γ). Προχωρημένο στάδιο πρώιμης γαμετογένεσης (στάδιο 1) με τον ενδοκυττάριο χώρο των θυλακίων γεμάτο με σπερματογονία (sc), σπερματοκύτταρα και λίγα σπερματίδια (st).

(Δ). Ενεργά αναπτυσσόμενος όρχις (στάδιο 2) που δείχνει τα στελεχικά κύτταρα σφηνωμένα στο εσωτερικό τοίχωμα των θυλακίων, σπερματογονία και σπερματοκύτταρα κατά μήκος της περιφέρειας του ενδοκυττάριου χώρου και σπερματίδια και σπερματοζώα (sz) στο κέντρο. Σημειώστε τις ουρές του σπέρματος (βέλη).

(Ε) Σχεδόν ώριμος όρχις (στάδιο 2) με αναπτυσσόμενο σπέρμα που εμφανίζεται σαν μια σκουρόχρωμη λωρίδα, κάμποσα κύτταρα φαρυδιά, κατά μήκος της περιφέρειας των θυλακίων, και με σπερματοζώα που καταλαμβάνουν τα κέντρα.

(Ζ) Ο έτοιμος για παραγωγή όρχις (στάδιο 3) με τα συμβάλλοντα θυλάκια σχεδόν εντελώς γεμάτα με σπερματοζώα

(Η)Μερικώς σχηματισμένος όρχις (στάδιο 4)

(Θ) Χρησιμοποιούμενος όρχις (στάδιο 4) που παρουσιάζει υπολειμματικά

, σπερματοζώα (rsz) φαγοκύτταρα (rc)και επανανάπτυξη συμβαίνουσακατά μήκος των τοιχωμάτων των θυλακίων (στάδιο 1).

Εικόνα 3. Τα διάφορα στάδια της γαμετογένεσης των θηλυκών του *Pinctada maxima*.

(Α)Η έναρξη της γαμετογένεσης (στάδιο 1) με τα στελεχικά κύτταρα (stc) και την ωογονία (og) να εμφανίζεται κατά μήκος του εσωτερικού τοιχώματος των θυλακίων.

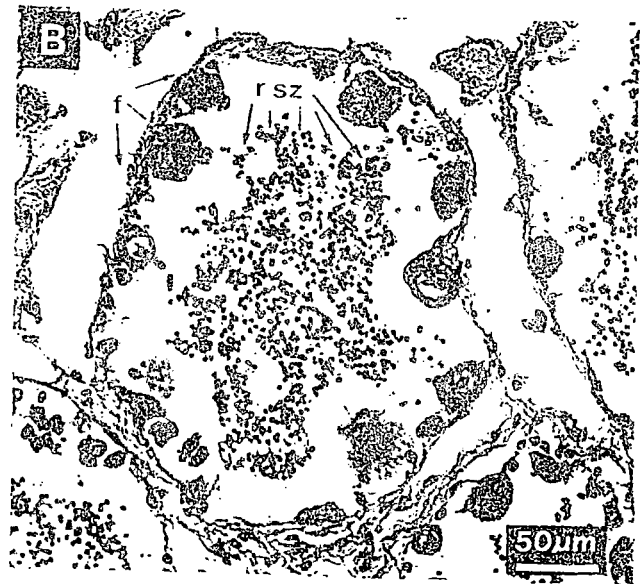
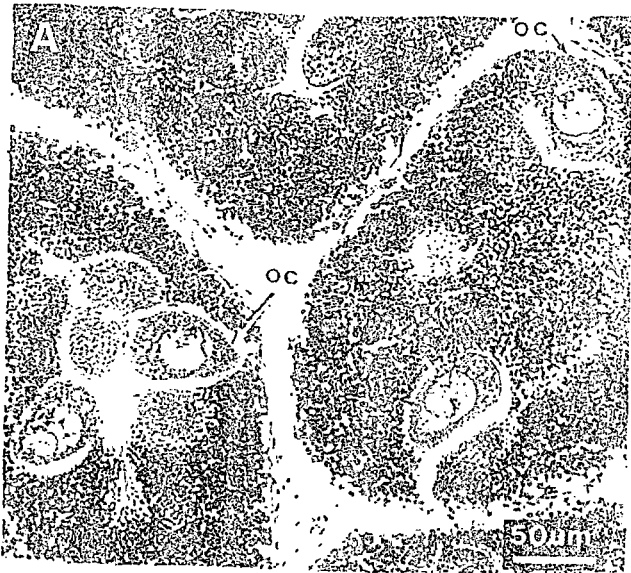
(Β)Προχωρημένο στάδιο της πρώιμης γαμετογένεσης (στάδιο 1) με θυλάκια που δείχνουν την ωογονία και τα νεαρά ωοκύτταρα (g oc) που πολλαπλασιάζονται κατά μήκος του εσωτερικού τοιχώματος και την παρουσία λίγων μεγαλύτερων στην ηλικία και μεγαλύτερων στο μέγεθος ωοκυττάρων (ooc).

(Γ). Δραστήρια αναπτυσσόμενη ωοθήκη (στάδιο 2) με τον ενδοκυττάριο χώρο των θυλακίων ν' αρχίζει να γεμίζει με συνδεδεμένα ωοκύτταρα.

(Δ) Η έτοιμη για ωορηξία ωοθήκη (στάδιο 3) με τα συμβάλλοντα θυλάκια σχεδόν εντελώς γεμάτα με ελεύθερα ωοκύτταρα.

(Ε) Η έχουσα υποστεί μερική ωορηξία ωοθήκη (στάδιο 4) με την εμφάνιση μικρού αριθμού επαναροφητικού ιστού (rt)μέσα στον ενδοκυττάριο χώρο του θυλακίου (G). Η έχουσα υποστεί μερική ωορηξία ωοθήκη(στάδιο 4)ελαφρώς περισσότερο ανεπτυγμένη με τον ενδοκυττάριο χώρο του θυλακίου κατειλημένο από υπολειμματικά ωοκύτταρα (ra) και περιβαλλόμενο από μεγάλο αριθμό επαναροφητικού ιστού και με την εκ νέου ανάπτυξη συμβαίνουσα κατά μήκος των εσωτερικών τοιχωμάτων (στάδιο 1).

(Ζ) Χρησιμοποιημένη ωοθήκη (στάδιο 4) που εμφανίζει μερικώς άδεια θυλάκια γεμάτα με επαναροφητικό ιστό και λίγα υπολειμματικά ελεύθερα ωοκύτταρα .



ΕΙΚ.4. Η ερμαφροδιτική φάση του *Pinctada maxima* (A) και τα δύο φύλα αναπτυσσόμενα δραστήρια στο ίδιο θυλάκιο (στάδιο 2) με τα ωκύτταρα περιβαλλόμενα από σπέρμα (OC). (B) Έναρξη γαμετογένεσης στην ωσθήκη με αναπομείναντα σπερματοζωάρια (rsz) να καταλαμβάνουν τον ενδοκυττάριο χώρο του β θυλακίου (f).

3.α.2.3. Ποσοτική ανάλυση των ιστολογικών στοιχείων.

Η διαδικασία της γαμετογένεσης περιγράφηκε σε μηνιαία βάση με την εξέταση των ιστολογικών τεμαχίων για κάθε δείγματος γονάδων μικρής μεγένθυσης

(40X και 200 X) για να τα ταξινομήσουμε σε αρσενικά και θηλυκά. Αυτά τα τεμάχια χαρακτηρίστηκαν σε 400 X μεγέθυνση μετρώντας διαφορετικούς τύπους γαμετών από τρεις θέσεις replicate που επιλέχτηκαν τυχαία από κάθε τεμάχιο. Η δειγματοληψία υπολογιζόταν δίνοντας το μέσο όρο αναλογίας για κάθε τύπου γαμετών που παρουσιάζονται ανά άτομο, ανά μήνα. Τρεις τύποι γαμετικών σταδίων ήταν εύκολα διακριτά για τα αρσενικά και τέσσερις τύποι για τα θηλυκά.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν από ένα δείγμα μεγέθους των

613 αρσενικών (X= 51 στρείδια / mo)

496 θηλυκών (X=42 στρείδια/ mo) και

219 ασαφή (χ=18 στρείδια/ mo)

Η σπερματογένεση προσδιορίστηκε με τον υπολογισμό του επί τοις εκατό ποσοστού των πρώιμων (ανώριμων, χωρίς ουρά) ελεύθερων

(ώριμων με ουρά) και των υπολλειμάτων (οπισθοδρομούντων ή χρησιμοποιούμενων) σπερμάτων σε 1cm^2 του θυλακίου.

Η ωγένεση μετρήθηκε υπολογίζοντας τον αριθμό των πρώιμων (ανώριμων) συνδεδεμένων (αναπτυσσόμενων σε σχεδόν ώριμα)ελεύθερων (γεννομένων ώριμων) και υπολλειματικών ωοκυττάρων. Μόνο οι γαμέτες υπολογίστηκαν εξ ολοκλήρου . Τα ελεύθερα ωοκύτταρα καθορίστηκαν με γαμέτες που καταλαμβάνουν τον ενδοκυττάριο χώρο και περιέχουν πυρήνα και νουκλετίδια.

Για τα θηλυκά που συλλέχτηκαν από τον Οκτώβρη 1982 έως Δεκέμβριο 1985 η διάμετρος των 30- 50 ελεύθερων ωοκυττάρων(ήταν περισσότερο ώριμων ωοκυττάρων που παρουσιάζονται μέσα εις το θηλάκιο) μετρήθηκε κατά μήκος του μεγαλύτερου άξονα.

Δοκιμάστηκε ένα σύνολο

216 στρειδιών ($X=7$ άτομα /μο)όπου υπήρχαν δείγματα αναμειγνύοντας 2125 ωοκύτταρα.

Υπολογίστηκε επίσης ένας μηνιαίος δείκτης (ή πίνακας) ωριμότητας (MI) για τα άτομα και των δύο φύλλων, με τη χρήση μιας εκδοχής για την φόρμουλα που αναπτύχθηκε από τον Seed (1969): όπου $MI=$ μέση αναλογία των γαμετών σ'ένα δεδομένο στάδιο εξέλιξης για τρεις αντιγραφές ανά άτομο .

$X=$ αριθμητική σειρά για τα στάδια.

Για τα αρσενικά : $MI=[$ μέση αναλογία για το υπολλειματικό σπέρμα $X 1]$ + [μέση αναλογία για πρώιμο σπέρμα $X 2]$ + [μέση αναλογία για το ελεύθερο σπέρμα $X 3]$

Για τα θηλυκά:

$MI = [$ μέση αναλογία για τα υπολλειματικά ωοκύτταρα $X 1]$ + [μέση αναλογία για τα πρώιμα ωοκύτταρα $X2]$ + [μέση αναλογία των συνδεδεμένων ωοκυττάρων $X 3]$ + [μέση αναλογία των ελεύθερων ωοκυττάρων $X 4]$.

Η ανάλυση του κοστολογικού πλεονεκτήματος των προκαταρκτικών αποτελεσμάτων έδειξε ότι για να αποκτήσουμε μια ακρίβεια γύρω στο 95%, χρειάστηκε να πάρουμε μετρήσεις ενός μηνιαίου μεγέθους από 15 δείγματα για κάθε φύλλο.

Εκτός των δύο από τα 6 χρόνια, δεν καταφέραμε να συλλέξουμε αυτόν τον αριθμό για κάθε είδος κατά τους μήνες των κυκλώνων(Δεκέμβριο με Φεβρουάριο).

Οι μηνιαίες διάμετροι των ωαρίων συγκρίθηκαν εδώ και τρία χρόνια χρησιμοποιώντας μια ανάλυση ενός συντελεστή (ANOVA). Οι μηνιαίες μέσες αναλογίες των διαφόρων σταδίων γαμετογένεσης για κάθε φύλλο συγκρίθηκαν πριν 6 χρόνια χρησιμοποιώντας ένα ANOVA με δύο συντελεστές.

3.α.2.4. Γοναδική ανάπτυξη εκτρεφόμενων στρειδιών.

Οι γονάδες των 2,588 στρειδιών (έχουν μεγάλο μέγεθος 150mmSH) που χρησιμοποιήθηκαν για την επώαση κάθε μήνα σ' ένα πρόγραμμα της θαλάσσιας καλλιέργειας για ανάπτυξη από Ιανουάριο του 1987 έως Απρίλιο 1989. Στα έξι χρόνια ερευνήθηκαν 10000 στρείδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για γόνο είτε για πειράματα της ωτοκίας είτε για πειράματα καθορισμού των γονάδων.

Η σεξουαλική ανάπτυξη των γονάδων των φυσικών αλλά και των καλλιεργούμενων μαργαριτοφόρων στρειδιών παρουσίασε τα ακόλουθα στάδια.

Στάδιο 0: Ο βιολογικός ιστός των γονάδων είναι χαλαρός ως και αόρατος, το φύλλο δεν ξεχωρίζει.

Στάδιο 1. Οι γονάδες είναι εμφανείς, αλλά ο πολλαπλασιασμός των εντέρων γινόταν πολύ ελαφριά. Οι γονάδες φαινότουσαν κοκκώδεις και ήταν δύσκολο να καθορισθεί το φύλλο από το χρώμα (αρσενικό - άσπρο και το θηλυκό - κίτρινο).

Στάδιο 2: Το φύλλο καθορίζεται εύκολα από το χρώμα, ο βιολογικός ιστός πολλαπλασιάζεται περιφερειακά κατά μήκος των παράπλευρων τοιχωμάτων των εντέρων, και φάνηκαν μισο-συμβάλλων (σ' αυτό το στάδιο η ωορηξία θα μπορούσε να συμβεί αλλά οι γαμέτες ήταν συνήθως ανώριμοι ή χωρίς βιωσιμότητα.

Στάδιο 3: Είχε σχηματιστεί ώριμη γονάδα και ήταν διογκωμένη. Ο βιολογικός ιστός της γονάδας ήταν εκτεταμένος στην επιφάνεια του στομάχου, την κουλούρα του εντέρου και του πεπτικού αδένου.

Κάθε στάδιο ανάπτυξης επιβεβαιώθηκε μικροσκοπικά από την λήψη δείγματος γαμετών και την εισαγωγή του μέσα στην μονάδα των ζωντανών αρσενικών και θηλυκών στρειδιών.

3.α.2.5. Εκκολαπτήρια και φυσικοί χώροι ωτοκίας.

Τα στρείδια των σταδίων 2 και 3 χρησιμοποιήθηκαν σε πάνω από 40 δοκιμασίες εκκόλαψης και ωτοκίας πάνω στις οποίες συμμετείχαν ένα ή και τα δύο φύλλα. Κατά την διάρκεια των δοκιμασιών στα στρείδια προκλήθηκε ωορηξία με την χρήση θερμοκρασίας, σε συνδυασμό με ένεση στροτονίνης του θαλασσινού νερού με υπεριώδη ακτινοβολία και ανάσχεση του σπέρματος (Rose et al 1986). Καταγράφηκαν επίσης τα στοιχεία των στρειδιών που γεννήθηκαν φυσιολογικά μέσα στις δεξαμενές που βρίσκονταν πάνω στα σκάφη μεταφοράς και στους χώρους εκμίσθωσης των μαργαριτοφόρων στρειδιών. Όταν μπορούσαν γινόταν συλλογή από τους γαμέτες τους.

Πιθανά εξωγενή αναπαραγωγικά ερεθίσματα ερευνήθηκαν κατά την διάρκεια αυτής της μελέτης καταγράφοντας τις ακόλουθες παραμέτρους:

θερμοκρασία νερού, περιεκτικότητα σε αλάτι, θολότητα και χλωροφύλλη ως μέτρο του ποσού φυτοπλαγκτού.

3.α.3. Αποτελέσματα

3.α.3.1. Φυλετικότητα.

Η ιστολογική και οπτική εξέταση των μικρών μαργαριτοφόρων στρειδιών έδειξε ότι το αρσενικό φύλο ωρίμανσε πρώτο και το μέγεθος του οστράκου ήταν 110mm SH. Το θηλυκό αναπτυσσόταν όταν τα όστρακα ήταν μεγαλύτερα από 135 mmSH. Ιστολογική εξέταση 395 στρειδιών (> 150 mm st) που συλλέχθηκαν στο ανοικτό πέλαγος στην παραλία Eighty-mile

κατά την διάρκεια του Οκτωβρίου και Νοεμβρίου του 1984, απεκάλυψε ότι το 49% ήταν αρσενικά και το 38% ήταν θηλυκά. Ο ερμαφροδιτισμός ήταν σπάνιος και οι πολυάριθμοι χώροι, καθώς και το εκκολαπτήριο ωρηξίας απέδειξαν ότι τα *P. maxima* δεν είχαν καθόλου λειτουργικό ερμαφροδιτισμό. Για την ανάπτυξη των γονάδων των μαργαριτοφόρων στρειδιών χρειάστηκαν τουλάχιστον πέντε εβδομάδες για να ωριμάσουν τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης στα στάδια ωοτοκίας - ωρίμανσης άσχετα του φύλλου. Σε συνθήκες εκκολαπτηρίου και τα δύο φύλα μπορούσαν και γεννούσαν πολλά αυγά

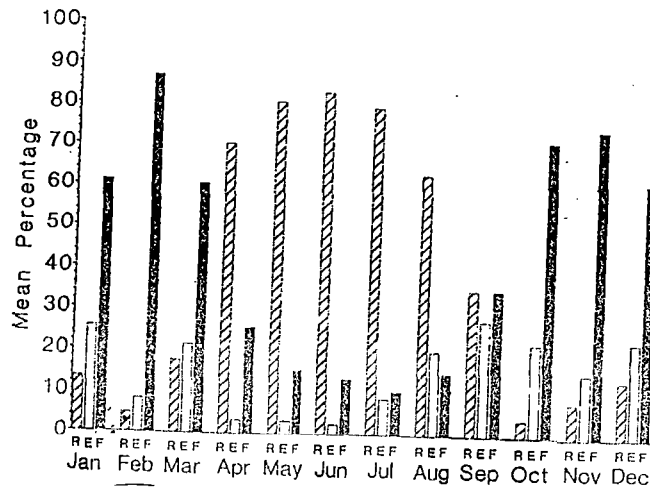
, τα θηλυκά γεννούσαν μεταξύ $0,5 \times 10^6$ και 12×10^6 κίτρινα ωάρια ανά άτομο. Σε έντονες συνθήκες η σεξουαλική φάση των αρσενικών ήταν συχνότερη και τα θηλυκά σπάνια αναπτύσσονταν στα σχεδόν ώριμα στάδια.

3.α.3.2. Αναπαραγωγικός κύκλος.

Η μέση αναλογία των ώριμων γαμετών και στα δύο φύλλα ήταν μεγαλύτερη κατά την διάρκεια της άνοιξης και του καλοκαιριού (Οκτώβρη - Φεβρουάριο/Μάρτιο), και μικρότερη κατά την διάρκεια του τέλους του φθινοπώρου και του χειμώνα (Μαΐο - Αύγουστο).

Κατά την διάρκεια των ψυχρών μηνών οι ασαφείς γονάδες ήταν περισσότερες και κατά την διάρκεια των θερμότερων μηνών ήταν λιγότερες. Οι διαφορές οφείλονταν στις φυσιολογικές αποκλίσεις και τη διάρκεια κάθε ετήσιας αναπαραγωγικής περιόδου.

Όταν τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε δεξαμενές η αναλογία των σπερματοζωαρίων (η άκρη των ελεύθερων σπερμάτων) σε μηνιαία δείγματα ήταν μεγαλύτερη κατά 60% από τον Οκτώβριο ως Μάρτιο και μικρότερη κατά 40% από τον Απρίλιο ως Σεπτέμβριο (Διαγρ. 5)



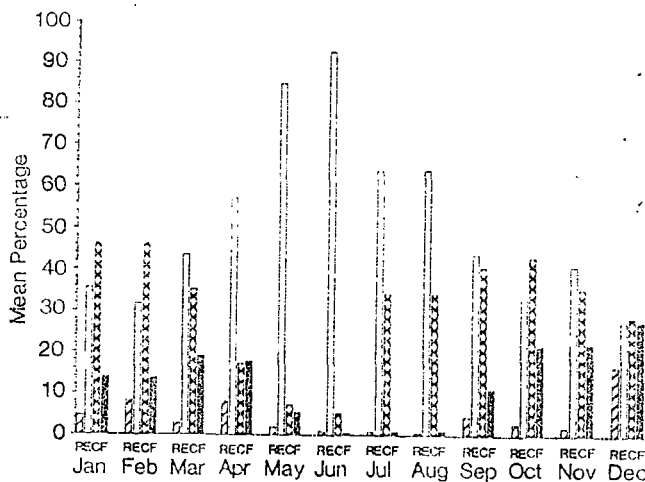
Διάγρ. 5. Ο ετήσιος σπερματογενετικός κύκλος του *P. maxima* παρουσιάζομενος ως το μέσο ποσοστό των εναπομεινάντων (ή υπολλειματικών) (R), πρώιμων (E) ελεύθερων (F) σπερμάτων που καταλαμβάνουν τα μηνιαία τμήματα γονάδων περιλαμβάνονται στα στρείδια που συνελέγησαν από τον Οκτώβριο του 1982 ως τον Ιούνιο του 1988. Τα αποτυπούμενα ποσοστά ελήφθησαν από μηνιαία δείγματα που σγκεντρώθηκαν σε έξι χρόνια ($\bar{X}=51$ στρείδια / μο).

Αντίθετα η αναλογία των υπολλειματικών σπερμάτων ήταν μεγαλύτερη από Απρίλιο ως Σεπτέμβριο και μικρότερη από Οκτώβριο ως Μάρτιο. Οι μηνιαίες αναλογίες των ανώριμου (πρώιμου) σπέρματος ακολούθησε ένα παρόμοιο πρότυπο, από εκείνο που παρατηρήθηκε στο ελεύθερο σπέρμα.

Το ανώριμο σπέρμα παρουσιάστηκε από Απρίλιο ως Ιούνιο κατά την διάρκεια άλλων εποχών του χρόνου (SNK, $P < 0, 05$).

Όπως η σπερματογένεση έτσι και η μέση αναλογία από τα τέσσερα ωογεννητικά στάδια σε μηνιαία γοναδικά τμήματα διέφερε σημαντικά στα έξι χρόνια (δύο συντελεστών ANOVA, $p < 0, 001$).

Όταν τα στοιχεία ενώθηκαν, η αναλογία των ελεύθερων ωοκυττάρων ήταν υψηλότερη από το Σεπτέμβριο ως το Μάρτιο και χαμηλότερη από Μάιο - Αύγουστο (Διαγρ. 6)

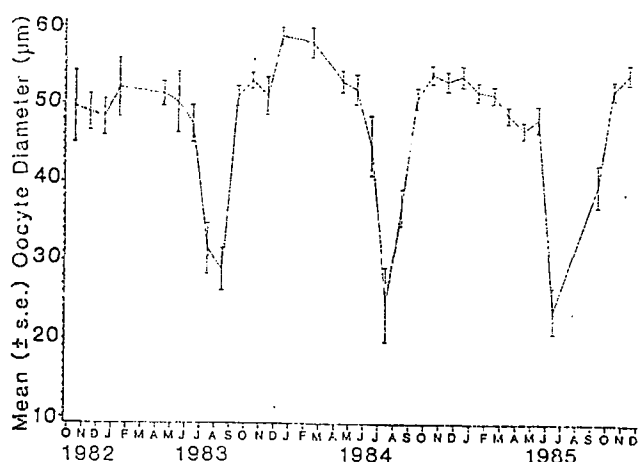


Διάγρ. 6 Ο ετήσιος ωογεννητικός κύκλος του *P. maxima* παρουσιάζομενος ως το μέσο ποσοστό εναπομεινάντων (ή υπολλειματικών) (R), πρώιμων (E), ελεύθερων (F) και συνδεδεμένων ωοκυττάρων, που υπολογίστηκαν σε μηνιαία τμήματα γονάδων περιλαμβάνοντα 496 στρείδια που συνελέγησαν από τον Οκτώβριο του 1982 ως τον Ιούνιο του 1988. Τα αποτυπούμενα ποσοστά ελήφθησαν από μηνιαία δείγματα ($\bar{X}= 42$ στρείδια / μο)

Η μηνιαία αναλογία των συνδεδεμένων ωοκυττάρων ακολούθησε ένα πρότυπο παρόμοιο με εκείνο που παρατηρήθηκε για τα ελεύθερα ωοκύτταρα όχι όμως κατά την διάρκεια Ιουλίου - Αυγούστου.

Ανώριμα(πρόωρα)ωοκύτταρα παρουσιάστηκαν συχνά από Απρίλιο ως Αύγουστο και λιγότερο πιά συχνά από Σεπτέμβριο - Μάρτιο (SNK, $P < 0,05$).

Η μέση διάμετρος των ωοκυττάρων έδωσε κάποια άλλη ένδειξη για τις θηλυκές γονάδες, οι οποίες δεν ήταν γεμάτες με ώριμους γαμέτες, κατά την διάρκεια του χειμώνα(Διάγρ. 7).

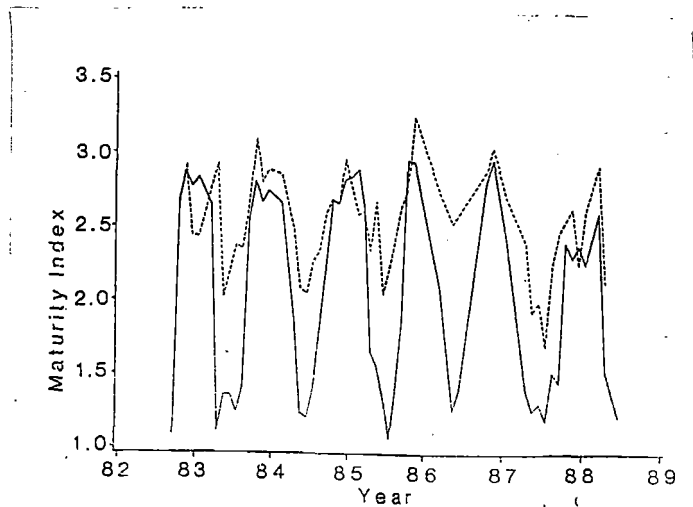


Διάγραμμα 7. Μέση διάμετρος ωοκυττάρων (+/- σύνθητες λάθος) από μηνιαία δείγματα γονάδων του *P. maxima* που συνελέγησαν από το 1982 ως το 1985 περιλαμβάνοντα 216 θηλυκά ($X = 7$ άτομα/μο) και 2, 125 ωοκύτταρα.

Η διάμετρος των ελεύθερων ή και των συνδεδεμένων ωοκυττάρων από τα μηνιαία δείγματα ήταν μικρότερη (λιγότερο ώριμη) κατά την διάρκεια Ιουλίου και Αυγούστου κ' ήταν μεγαλύτερη από Σεπτέμβριο ως Μάιο (ANOVA $P < 0,001$).

Η σχέση ανάμεσα στο μέγεθος των ωοκυττάρων και του χρόνου ή την σύμφωνη με την αλλαγή που παρατηρήθηκαν ιστολογικά μέσα στον ιστό της ωοθήκης.

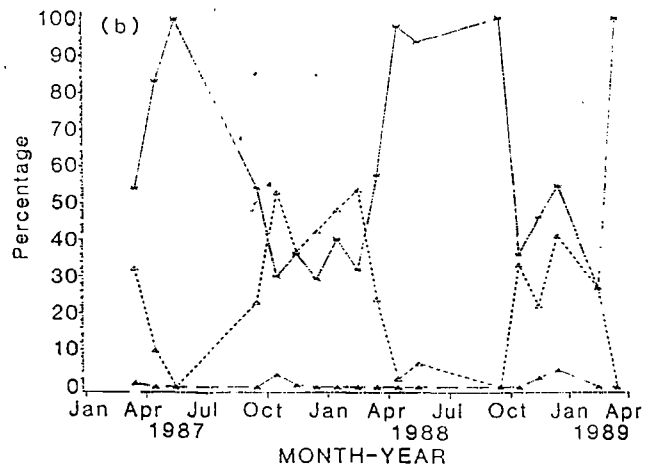
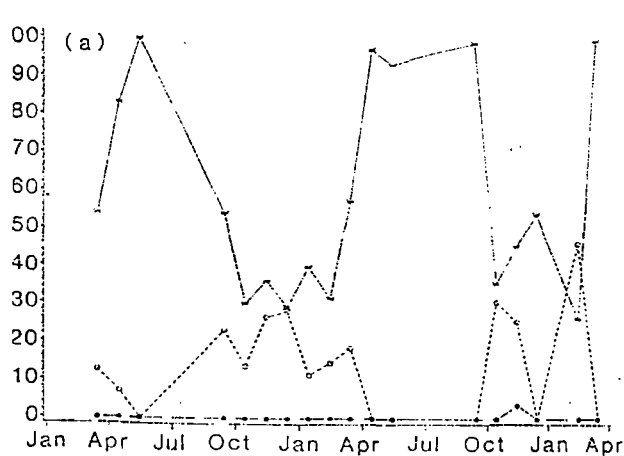
Οι δείκτες ωριμότητας που υπολογίστηκαν και για τα δύο φύλλα δείχνουν ότι και οι όρχεις και οι ωοθήκες ακολούθησαν παρόμοιους κυκλικούς τύπους, στους οποίους η ωριμότητα ήταν υψηλότερη κατά την διάρκεια των θερμών μηνών και χαμηλότερη κατά την διάρκεια των ψυχρότερων μηνών (Διάγρ. 8).



Διάγρ. 8 Πίνακας ωριμότητας των θηλυκών (διακεκομμένη γραμμή) και των αρσενικών (συμπαγής γραμμή) *P. maxima* από μηνιαία δείγματα συλλεγμένα από τον Οκτώβριο του 1982 ως τον Ιούνιο του 1988. Ο πίνακας βασίστηκε σε 496 θηλυκά και 613 αρσενικά.

Οι αποκλίσεις στις καμπύλες για κάθε φύλλο οφειλόταν σε διαφορετικές κλίμακες μετρήσεως για κάθε πίνακα (δηλαδή τρία στάδια ανάπτυξης για τους όρχεις και τέσσερα για ωοθήκες).

Η οπτική εξέταση των γονάδων για 2. 588 στρείδια από τον Ιανουάριο του 1987 ως τον Απρίλιο 1989 αποκάλυψε ότι οι συνδυασμένες αναλογίες των ασαφών (στάδιο 0) και πρόωρων αναπτυσσομένων ατόμων (στάδιο 1 και για τα δύο φύλα) ήταν μεγαλύτερη κατά την διάρκεια του φθινοπώρου και του χειμώνα και μικρότερη κατά την διάρκεια της άνοιξης και του καλοκαιριού (Διαγρ. 9αβ).

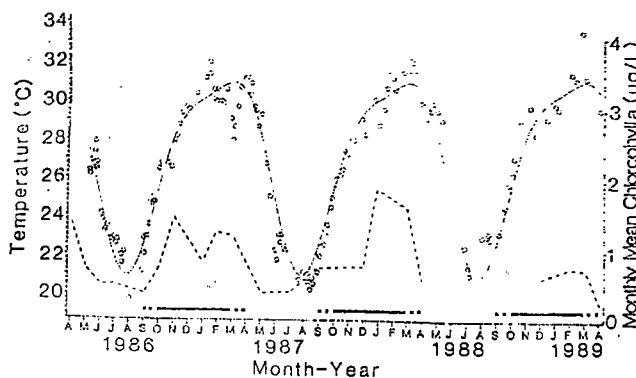


Διάγρ. 9α και β. Μηνιαία ανάπτυξη των γονάδων του broodstock του *P. maxima*

Αντιστρόφως τα ποσοστά των σχεδόν ώριμων στρειδιών (στάδιο 2 και για τα δύο φύλα) ήταν ελάχιστα κατά την διάρκεια των κρύων μηνών και μεγαλύτερα κατά την διάρκεια των θερμότερων μηνών.

Τα ώριμα για ωορηξία στρείδια (Στάδιο 3 και για τα δύο φύλα) αντιπροσώπευαν λιγότερο από το 8% των μηνιαίων δειγμάτων.

Εκτός από την θερμοκρασία και την χλωροφύλλη α, οι εξωγενείς παράγοντες που μετρήθηκαν έδωσαν μια εμφανή πρόβλεψη για την αρχή του αναπαραγωγικού κύκλου *Pinctada maxima*. Η αναπαραγωγική εποχή προήλθε από την καταγραφή των περιοχών και των εκκολαπτηρίων ωοτοκίας σχηματίστηκαν σε μια γραφική παράσταση από την θερμοκρασία του θαλασσινού νερού στην επιφάνεια (Διάγρ. 10).



Διάγραμμα 10. Η ετήσια περίοδος αναπαραγωγής του *P. maxima* που ελήφθη από ωορηξίες 6 ετών επί του εκκολαπτηρίου και επί τόπου (οριζόντιοι ράβδοι). Αποτυπώνονται επίσης οι θερμοκρασίες της επιφάνειας του θαλασσινού νερού (°C) (0-0) και τα επίπεδα χλωροφύλλης α (—) στο Broome jetty, Roebuck Bay από τον Απρίλιο του 1986 ως τον Απρίλιο του 1989. Η κυκλική καμπύλη θερμοκρασίας καθορίστηκε από την ακόλουθη εξίσωση:

$$T = 26,95 + 2,46 \sin \phi + 4,09 \cos \phi - 0,78 \sin (2\phi) - 0,96 \cos (2\phi)$$
 όταν $\phi = 2\pi \cdot (\text{ημέρα του χρόνου} / 365)$, $r^2 = 893$ και $n = 150$

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το *Pinctada maxima* αρχίζει την αναπαραγωγή του κατά την διάρκεια της ετήσιας αύξησης της θερμοκρασίας του νερού τον Σεπτέμβριο/Οκτώβριο και συνεχίζεται κατά τους καλοκαιρινούς μήνες.

Μία παρόμοια σχέση παρατηρήθηκε στα επίπεδα της χλωροφύλλης α, όταν όμως η εποχική τους κορύφωση δεν ήταν εμφανή κατά την διάρκεια της περιόδου των υψηλότερων θερμοκρασιών του νερού (πιν. 10).

Η εποχική μεταβλητικότητα στην παραγωγικότητα του φυτοπλαγκτού αμύνθηκε στην διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών κατά την διάρκειά τους στα νερά των τροπικών παραλίων πέρα από το Broome (πίνακας 1).

Location	Parameter						
	Water Temp (°C)	PO ₄ -P (μg/l)	Total-P (μg/l)	NH ₄ -N (μg/l)	NO ₂ + NO ₃ -N (μg/l)	Total-N (μg/l)	Chlorophyll-a (μg/l)
Broome Jetty							
Surface	26.9 ± 3.8 (21.0-32.3)	6.2 ± 5.5 (1-24)	16.2 ± 6.8 (2-35)	10.3 ± 9.3 (2-52)	2.8 ± 1.4 (1-6)	181.3 ± 72.4 (48-314)	0.7 ± 0.4 (0.01-1.78)
Bottom	26.8 ± 3.6 (19.8-32.1)	5.4 ± 4.1 (1-19)	16.9 ± 7.9 (4-43)	10.2 ± 8.2 (1-33)	2.8 ± 1.4 (1-7)	160.1 ± 58.7 (37-258)	0.9 ± 0.5 (0.19-2.13)
Collection Grounds							
Surface	24.0 ± 2.8 (20.0-26.8)	4.9 ± 1.3 (3-7)	30.4 ± 13.5 (17-62)	5.9 ± 4.8 (1-13)	3.7 ± 0.9 (3-6)	315.1 ± 211.6 (74-645)	0.3 ± 0.4 (0-1.35)
Bottom	23.8 ± 2.7 (20.0-26.7)	5.2 ± 0.8 (4-6)	26.9 ± 5.8 (19-35)	4.5 ± 3.0 (1-9)	4.1 ± 1.1 (3-6)	331.9 ± 179.7 (107-563)	0.3 ± 0.2 (0.1-0.6)

Πίν. 1. Η θερμοκρασία της επιφάνειας του νερού, τα θρεπτικά συστατικά του φυτοπλαγκτού και οι τιμές της χλωροφύλλης - α (μέσες ± κανονικές αποκλίσεις και κλίμακα) στην περιοχή Broome για την περίοδο Απριλίου 1986 έως τον Απρίλιο 1989.

3.α.4. Συζήτηση -Συμπεράσματα

3.α.4.1. Γαμετογένεση

Το συνολικό πρότυπο της γαμετογένεσης του *Pinctada maxima* είναι όμοιο μ' αυτό που περιγράφηκε για το *Pinctada albina* και το *Pinctada margaritifera*, από τον Torres Strait στο νησί Queensland (Tranter 1958 b κ' ε). Τα στοιχειώδη θυλάκια και τα κύτταρα του στελέχους σχηματίζονται με παρόμοιους τρόπους όπως γίνεται η εμφάνιση και η διανομή των σταδίων των γενετικών κυττάρων.

Ιστολογικά ίχνη έδειξαν ότι η ωοτοκία του *Pinctada maxima* δεν είναι πλήρης, ενώ συμπίπτει με μερικά πρόωρα ώριμα και εξαντλημένα στάδια όμοια με το *Pinctada albina*. Έχουν υποστεί ωοτοκία απόμων τα θυλάκια και των *Pinctada maxima* και των *Pinctada albina* ενώ έχουν και περισσότερα υπολειματικά προϊόντα και φαγοκύτταρα από ότι τα *Pinctada margaritifera*.

Και στα δύο είδη η ωοτοκία είναι ατελής πριν από την έναρξη του επόμενου κύκλου εξέλιξης. Τα συνδεδεμένα ή τα ελεύθερα ωοκύτταρα του *Pinctada maxima* έχουν ένα ή δύο λεκιθικούς πυρήνες με (διάμετρο 7-8 μm) σφηνωμένους στο κυτόπλασμα όπως αυτά του *Pinctada margaritifera* (Tranter 1958e).

Αυτές οι δομικές μονάδες του κυττάρου που εμφανίζονται ως κύκλος, δεν εμφανίζονται στα *P. albina* (Tranter 1958e).

Η εποχή αναπαραγωγής για κάθε ένα από αυτά τα είδη είναι διαφορετική. Το *Pinctada maxima* αναπαράγεται ετησίως μεταξύ Σεπτεμβρίου και Απριλίου, με την κορύφωση σε κάθε άκρο.

Το *Pinctada albina* αναπαράγεται συνεχώς με κορύφωση κατά την διάρκεια του Απριλίου και Μαΐου.

Το *Pinctada margaritifera* έχει δύο ευδιάκριτους κύκλους αναπαραγωγής από τον Μάρτιο ως Αύγουστο και από τον Σεπτέμβριο ως το Φεβρουάριο (Tranter 1958 και e).

Ο Wada (1953a) και ο Tranter (1958 a) υποστήριξαν ότι το *Pinctada maxima* έχει πρωτανδρικό ερμαφροδιτισμό. Η αρσενική και θηλυκή φάση χωρίζονται από τον χρόνο αλλά περιστασιακά συμβαίνουν στο ίδιο γοναδικό θυλάκιο όπως περιγράφηκε για το *Pinctada fucata martensii* (Ozima και Maeki 1955) και *Pinctada albina* (Tranter 1958d).

Από το εκκολαπτήριο κατά την ωοτοκία οι ενδείξεις δείχνουν ότι η ερμαφροδιτική φάση είναι λειτουργική και στο είδος *Pinctada maxima* και συμβαίνει περισσότερο συχνά όταν αρχίζει η νέα σεξουαλική φάση και λιγότερο συχνά όταν και τα δύο φύλα αναπτύσσονται συνεπακόλουθα.

Η ικανότητα του *Pinctada maxima* να αλλάζει φύλλο μετά από ένα ορισμένο μέγεθος φαίνεται να είναι τυπική για τα μέλη του γένους, για παράδειγμα: *Pinctada (fucata) martensii* (Ojima και Maeki 1955) *Pinctada albina* (Tranter 1958d) και *Pinctada margaritifera* (Tranter 1958 e). Αυτό το φαινόμενο που συμβαίνει στα *Ostreidae*, *Teredinidae* κ' *Pectinidae* (Tranter 1958 d) μπορεί να σχετίζεται μ'ένα ασθενή κληρονομικό μηχανισμό προσδιορισμού του φύλου για το *Pinctada albina* (Tranter 1958 b).

Ομοίως το *Pinctada maxima* ίσης κληρονομικής ικανότητας αναπτύσσει σεξουαλική φάση κάθε φύλο των στοιχειωδών κυττάρων το οποίο καθορίζεται με αποκλίσεις στα επίπεδα τροφικών αποθεμάτων του σώματος. Τα κύτταρα έτσι διαφοροποιούνται σε θηλυκούς γαμέτες όταν τα επίπεδα της τροφής είναι υψηλά και σε αρσενικούς γαμέτες όταν είναι χαμηλά.

Η φυσιολογική βάση για την έναρξη της γαμετογένεσης συσχετίζεται με την εναποθήκευση του γλυκογόνου στον πεπτικό αδένα της προεξοχής του γένους των διθύρων. *Aequipectin irradians* (Sastry και Blake 1971).

Ο μηχανισμός ώριμων αυγών του *Pinctada maxima* μοιάζει με το *Pinctada albina* (Tranter 1958 C), παρά μ' εκείνο του *Pinctada margaritifera* (Tranter 1958 e).

Η μίπτωση των ωοκυττάρων της ωοθήκης του *Pinctada maxima* κ' του *Pinctada albina* δεν εξελίσσεται πέρα από την πρώτη φάση όπως φαίνεται από παρουσία των ανέπαφων σπερματικών κυστιδίων). Η

επόμενη ωρίμανση των ελεύθερων ωοκυττάρων συμβαίνει έξω από το θυλάκιο στην αρχή της ωοτοκίας.

Αντίθετα, η εξαφάνιση των σπερματικών κυστιδίων και η συμπλήρωση της πρώτης μιτωτικής διαίρεσης των ελεύθερων ωοκυττάρων του *Pinctada margaritifera* συμβαίνει μέσα στην ωοθήκη πριν την έναρξη της ωορηξίας.

Σε χαμηλή συγκέντρωση υδροξειδίου του αμμωνίου (Wada 1942, 1953). Το σπερματικό κυστίδιο σπάζει και η γονιμοποίηση λαμβάνει χώρα. Παρομοίως τα σπερματοζωάρια αποκομμένα από τον όρχι μπορούν να δραστηριοποιηθούν μόνο με την παρουσία του αμμωνιακού θαλασσινού νερού όπως βρέθηκαν στο *Pinctada fucata* από την Ινδία. (Alagarswami et al 1983). Το *Pinctada maxima* εκτεθειμένο σε χαμηλές συγκεντρώσεις του υδροξειδίου του αμμωνίου παράγουν γαμέτες. Εκτός εάν οι γονάδες του *Pinctada maxima* είναι κατάλληλα ώριμες και οι γαμέτες που ελευθερώνονταν είναι σταθερά λιγότερο βιώσιμοι, τότε το ποσοστό γονιμοποίησης είναι χαμηλό (< 30%) και η ακόλουθη ανώμαλη ανάπτυξη της προνύμφης είναι υψηλή (> 85%).

3.α.4.2. Αναπαραγωγικός κύκλος.

Η ιστολογική εξέταση του ιστού της ωοθήκης και των όρχεων του *Pinctada maxima* της Δυτικής Αυστραλίας δείχνει ένα καθορισμένο ετήσιο αναπαραγωγικό κύκλο με μέγιστες και ελάχιστες αναπτυξιακές περιόδους σύμφωνα με τις υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες νερού (πιν. 8). Ο Wada (1953 a) βρήκε πως η ανάπτυξη των γονάδων του *Pinctada maxima* από την θάλασσα της Aratuna, βόρεια της Αυστραλίας ακολουθεί ένα όμοιο πρότυπο, αλλά τα ώριμα στρείδια μπορούν να παρατηρηθούν έξω από την κύρια αναπαραγωγική περίοδο, κατά την διάρκεια των ψυχρότερων μηνών.

Υπέθετε ότι το *Pinctada maxima* ήταν ικανό για ωοτοκία όλο το χρόνο. Τα ιστολογικά αποτελέσματα δείχνουν ότι οι γονάδες για κάθε φύλο που έχουν παρθεί από τους πληθυσμούς της Δυτικής Αυστραλίας είναι αντίθετες με τις επαρκείς ώριμες ωοτοκίες. Κατά την διάρκεια των νεκρών μηνών τα αρσενικά περιείχαν < 25% ελεύθερο σπέρμα (πιν. 5) και τα θηλυκά < 2% ελεύθερα ωοκύτταρα (πιν. 6).

Η παρουσία ώριμων γαμετών κατά την διάρκεια των κρύων μηνών δεν είναι απόδειξη για γονάδες ώριμες για ωοτοκία, αλλά μάλλον μια ένδειξη ότι τα ώριμα και τα ανώριμα στάδια ανάπτυξης συνέπιπταν.

Μηνιαίες παρακολουθήσεις και βιοψίες των άγριων στρειδιών δηλώνουν ότι οι ωορηξίες γίνονται αντίθετα κατά την διάρκεια των μηνών (πιν. 9αβ). Το *Pinctada maxima* δοκιμάζει μια ψυχρότερη (ελάχιστη 18°C) και ευρύτερη κλίμακα (18°C -32°C) θερμοκρασίας του νερού το οποίο μπορεί έντονα να προσδιορίσει την επίπτωση των ώριμων στρειδιών κατά την διάρκεια των κρύων μηνών.

Στον όρχι το υπολλειματικό σπέρμα είναι οι υπερισχύοντες γαμέτες ενώ στις ωοθήκες τα πρόωρα ωοκύτταρα υπερισχύουν. Αυτή η εμφανής διαφορά σειράς είναι πιθανόν να συσχετίζεται με το σχήμα ταξινόμησης της γαμετογένεσης που χρησιμοποιήθηκε.

(π. χ. τρία στάδια για τα αρσενικά και τέσσερα στάδια για τα θηλυκά. Τα ιστολογικά στοιχεία για το *Pinctada maxima* δεν αποκαλύπτουν κανένα εμφανή αναπαραγωγικό κύκλο με 2 τρόπους και τα εκκολαπτήρια ωορηξίας έδειξαν δύο πρωτεύουσες περιόδους ωοτοκίας, οι οποίες σχετίζονταν με άνοδο θερμοκρασίας του θαλασσινού νερού κατά την διάρκεια Οκτωβρίου - Δεκεμβρίου και μια δευτερεύουσα η οποία σχετίζεται με μια πτώση της θερμοκρασίας του θαλασσινού νερού κατά την διάρκεια Φεβρουαρίου - Απριλίου (πιν. 10).

Άλλοι παράγοντες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να εξηγήσουν την μειωμένη παρατηρούμενη ωορηξία ανάμεσα στις κύριες περιόδους ωορηξίας είναι (π. χ. ότι δεν υπήρχε αρκετός χρόνος και ενεργητική διέξοδος για τα στρείδια τα οποία εισάγονται σε περαιτέρω σεξουαλικές δραστηριότητες. Η διαφορά της παρατηρούμενης ωορηξίας μπορεί να σχετισθεί με τις υψηλές θερμοκρασίες του νερού κατά την διάρκεια Ιανουαρίου και Φεβρουαρίου. Μέσα σ' αυτήν την περίοδο οι ωορηξίες του εκκολαπτηρίου ήταν συχνά ασθενείς και παρήγαγαν μη βιώσιμους γαμέτες.

Οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν για την μίπτωση ήταν δύο ως τέσσερις βαθμούς πάνω από την κανονική θερμοκρασία του θαλασσινού νερού, η οποία ήταν κοντά στο υψηλότερο όριο που είχαν δοκιμάσει τα στρείδια (πιν. 10).

Καθώς η θερμοκρασία πέφτει είναι όλο και πιο ευνοϊκή, με το μεγαλύτερο απόθεμα των συνδεδεμένων κυττάρων παρόν στις γονάδες των θηλυκών (πιν. 6) να ωριμάζει γρήγορα και η ωοτοκία να συνεχίζεται. Τα στρείδια που δοκιμάστηκαν κατά την διάρκεια της μελέτης κατοικούσαν σε μια ευρεία κλίμακα (πιν. 1). Βασικές επί τόπου παρατηρήσεις της ανάπτυξης των γονάδων των στρειδιών από τον Torres Strait δείχνουν ότι η κύρια περίοδος της ωοτοκίας λαμβάνει χώρα μόλις πριν από την κυκλική εποχή κατά την διάρκεια Νοεμβρίου / Δεκεμβρίου (Wada 1953).

Προνύμφες οι οποίες μεγάλωναν στους αποικισμούς ήταν όλο και περισσότερο επιτυχείς κατά την διάρκεια Νοεμβρίου / Δεκεμβρίου όταν η κλίμακα της θερμοκρασίας του νερού στο περιβάλλον είναι ανάμεσα στους 26 και 30 °C (πιν. 10). Η καταγραφή της ωοτοκίας έδειξε ότι η ανάπτυξη στα γονίδια ποίκιλε τοπικά στα στρείδια από πληθυσμούς νότια της Ακτής Eighty - Mile κοντά στο Onslow, Wid και κοντά στα βόρεια του Broome (πιν. 1).

3.β. Θνησιμότητα του Pinctada maxima στην Δυτική Αυστραλία.

3.β.1. Εισαγωγή

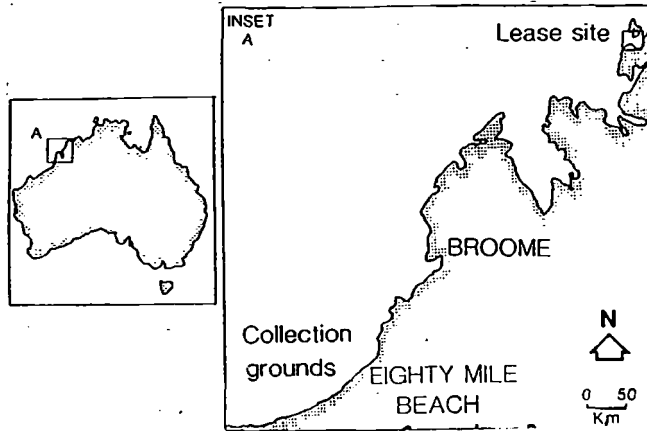
Η βιομηχανία μαργαριταριών της Δυτικής Αυστραλίας είναι η Τρίτη μεγαλύτερη και πολυτιμότερη αλιευτική βιομηχανία. Η παραγωγή μαργαριταριών βασίζεται στην χρησιμοποίηση φυσικών εκτρεφόμενων στρειδιών τα οποία απομακρύνονται από τις περιοχές συλλογής και μεταφέρονται σε καλλιεργούμενες περιοχές, όπου ο σχηματισμός των μαργαριταριών προκαλείται με τεχνητά μέσα. Μια υπερβολική θνησιμότητα των μαργαριτοφόρων στρειδιών έπεται μετά της απομάκρυνσής τους από τους τόπους συλλογής και έχει προκαλέσει σοβαρές συνέπειες στην βιομηχανία από το 1974. Οι απώλειες στις καλλιεργούμενες περιοχές μπορεί να φτάσουν στο 80% των συλλεγομένων οστράκων συγκρινόμενες με τις αναμενόμενες « φυσικές» απώλειες του 10 - 20%. Εκτός αυτού, τα προσβεβλημένα στρείδια αναπτύσσουν παραμορφωμένο μάργαρο και είναι άχρηστα για την παραγωγή ημιμαργαριταριών.

Η υψηλή θνησιμότητα έχει δύο επιπτώσεις στην βιομηχανία:

1) Μια άμεση οικονομική απώλεια για τους εκτροφείς που σχετίζονται με το κόστος συλλογής των φυσικών στρειδιών και την συνεπακόλουθη παραγωγή μαργαριταριών στις επόμενες περιόδους.

2) Οι εκτροφείς έτσι αναγκάζονται να απομακρύνουν περισσότερα στρείδια απ' όσα θα χρειάζονταν εάν η θνησιμότητα ήταν «φυσιολογική», πράγμα που προκαλεί αυξημένη πίεση στον φυσικό πληθυσμό. Ο σκοπός των ερευνών που αναφέρονται εδώ ήταν ο καθορισμός των παραγόντων και οι πιθανές αιτίες που προκαλούν την θνησιμότητα. Αυτή η εργασία έγινε το 1980-1983 σε κάποια εταιρία η οποία υπέστη την μεγαλύτερη και πλέον επίμονη μορφή θνησιμότητας. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν από την εταιρία αυτή ήταν οι εξής:

Τα μαργαριτάρια που συλλέγονταν από δύτες κατά την διάρκεια της ελάχιστης παλίρροιας από τον Απρίλιο - Οκτώβριο στα ανοιχτά της ακτής Eighty Mile (διάγρ. 1), χωρίζονταν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το μεγεθός τους, τοποθετημένα σε συρμάτινα καλάθια, στοιβαγμένα κάτω από το αμπάρι μεταφορικών πλοίων μέσα στις δεξαμενές.



Διάγρ.1. Διάγραμμα της Βόρειο-Δυτικής πλευράς της Δυτικής Αυστραλίας που δείχνει τις περιοχές συλλογής και τον χώρο εκμίσθωσης που αναφέρεται στο κείμενο.

Το θαλασσινό νερό κυκλοφορούσε μέσα στις δεξαμενές μόνο όταν το πλοίο βρισκόταν εν κινήσει, μέσω ενός συστήματος σωλήνων που μετέφερε το νερό από το κουφάρι του πλοίου στην επιφάνεια των δεξαμενών. Το νερό στράγγιζε στον πυθμένα των δεξαμενών μέσω οπών. Η μεταφορά στον χώρο καλλιέργειας ήταν 700 χιλιόμετρα προς βορρά και διηρκούσε 37 ώρες. (διάγραμμα 1). Ο μεγαλύτερος χρόνος παραμονής των στρειδιών στις δεξαμενές ήταν πέντε ημέρες.

Στην καλλιεργούμενη περιοχή 1000 καλάθια κρεμάστηκαν 70εκ. το ένα από το άλλο και κάτω από ξύλινες σχεδίες σε βάθος 5μ. Κατά την διάρκεια ενός έτους εγκλιματισμού πριν από την προσθήκη του πυρήνα, τα στρείδια σηκώνονταν, καθαρίζονταν και κάθε τρεις μήνες απομακρύνονταν τα νεκρά από αυτά. Παράλληλα διεξήχθησαν και οι έρευνες για τις αιτίες της ασθένειας και οι παράγοντες προδιάθεσης. Παθολογικές και μικροβιολογικές μελέτες διεξήχθησαν πάνω σε φυσιολογικά νοσούντα στρείδια και η πειραματική αναπαραγωγή της νόσου στο εργαστήριο απέδειξε την αλήθεια αυτών των ευρημάτων. Οι παράγοντες προδιάθεσης καθορίστηκαν από την έρευνα των περιβαλλοντικών παραγόντων και ιδιαίτερα της ποιότητας του νερού.

Περιβαλλοντικοί παράγοντες.

Κατά την διάρκεια της έρευνας έγιναν μετρήσεις στις περιοχές συλλογής και στις καλλιεργούμενες περιοχές. Για τα μαργαριτάρια οι μετρήσεις που έγιναν βασίστηκαν σ'ένα δεκαπενθήμερο, σε έξι καλλιεργούμενες τοποθεσίες από το 1976. Το θαλασσινό νερό μαζεύεται σε μια πλαστική φιάλη τύπου Niskin 5-1. Το δείγμα νερού που πήραμε εμείς ήταν σε 1μ βάθος πάνω από τον πυθμένα. Τα υπόλοιπα στοιχεία βασίστηκαν σε

δείγματα που πάρθηκαν από την επιφάνεια της θάλασσας και 1μ από τον πυθμένα. Το βάθος του νερού στο οποίο βρίσκονταν αγκυροβολημένες οι σχεδίες ήταν περίπου 15μ κατά την διάρκεια της ελάχιστης παλίρροιας.

Κατά την διάρκεια της έρευνας μετρήθηκαν οι ακόλουθοι παράμετροι: θερμοκρασία αέρα και νερού, περιεκτικότητα σε αλάτι, θολότητα, χλωροφύλλη α, ορθοφωσφάτη φωσφάτη (PO₄-P), πλήρης φώσφορος (Total P), αμμώνιο άζωτο (NH₂N), νιτρικό άλας και νιτρικό άζωτο (NO₂+NO₃-N) και πλήρες Kjeldahl άζωτο (Total N). Επίσης κ'στοιχεία σχετικά με την θερμοκρασία την περιεκτικότητα σε αλάτι το διαλυμένο οξυγόνο, την PO₄-P και το NO₂-N. Οι θερμοκρασίες μετρήθηκαν με υδραργυρικό θερμόμετρο (οC) η περιεκτικότητα σε αλάτι με υδρόμετρο (g/cm³) και η θολότητα σε ενδείξεις από τον δίσκο Secchi. Τα δείγματα του νερού για την ανάλυση των θρεπτικών ουσιών αδειάστηκαν σε σακούλες Whirlpak (Nasco), αποθηκεύτηκαν σε υγρό πάγο και καταψύχθηκαν. Τα δείγματα του νερού για την μέτρηση της χλωροφύλλης φιλτραρίστηκαν επί τόπου από φιάλες τύπου Niskin.

Τα επίπεδα του διαλυμένου οξυγόνου υπολογίστηκαν με μέτρο DO (Delta Scientific) σε τρεις περιπτώσεις κατά την διάρκεια του Μαΐου και του Ιουλίου του 1981. Οι μετρήσεις έγιναν από το νερό που κυκλοφορούσε γύρω από τα στρείδια μέσα στις δεξαμενές μεταφοράς πάνω στα πλοία, και αργότερα κάτω από τις σχεδίες που αιωρούντο τα στρείδια.

3.β.2. Τεχνικές διαχείρισης

Οι περιοχές καλλιέργειας επελέχθηκαν ανάλογα με το μέγεθος των στρειδιών, το βάθος στο οποίο αιωρούντο, το καθάρισμα πριν την μεταφορά, την πυκνότητα και την θερμοκρασία του νερού κατά τον χρόνο της μεταφοράς. Τα στρείδια διαλέχτηκαν στους χώρους συλλογής κ'ταξινομήθηκαν σύμφωνα με το μέγεθός τους, δηλ. μικρά (< 102 mm ραχιοκοιλιακά από την βάση ως την άκρη), μεσαία (102-104 mm) και μεγάλα (>140 mm) και τοποθετήθηκαν σε καλάθια. Στην καλλιέργεια τα καλάθια αιωρούντο από την σχεδία σε τυχαίες θέσεις μαζί με άλλα στρείδια αυτής της συλλογής.

3.β.3. Πειράματα πεδίου.

Εγινε ένα πείραμα για να προσδιοριστεί εάν η θνησιμότητα σχετιζόταν με το μέγεθος των στρειδιών, με τα διαφορετικά βάθη στα οποία αιωρούντο τα στρείδια από την σχεδία στο χώρο της καλλιέργειας ή με τις πρακτικές καθαρισμού. Ένα σύνολο 900 στρειδιών (90 καλάθια) χωρίστηκαν σε 18 θεραπείες (πέντε καλάθια η κάθε μία) στα οποία τοποθετήθηκαν τρία

είδη στρειδιών σε τρία βάθη (2,5 και 10 m από την επιφάνεια) ανάλογα με το εάν τα όστρακα είχαν καθαριστεί από μολυσμένους οργανισμούς ή είχαν μείνει ακαθάριστα κατά την διάρκεια της συλλογής.

Σένα άλλο πείραμα τα αποτελέσματα της πυκνότητας των στρειδιών μέσα στα μεμονωμένα καλάθια πάνω στην αρχική θνησιμότητα προσδιορίστηκαν με την χρησιμοποίηση τυχαίων συνόλων που αποτελούνταν από τρία μεγέθη στρειδιών (μικρά, μεσαία, μεγάλα) σε καλάθια 2, 4, 6, 8 και 10 στρείδια. Τα στρείδια σ'ένα συγκεκριμένο καλάθι τοποθετήθηκαν όσο ήταν πιο δυνατόν μακριά το ένα από το άλλο. Για κάθε μια κατηγορία των τριών μεγεθών ένα σύνολο από 192 στρείδια κατανεμήθηκαν σε 41 καλάθια ως εξής: 15 καλάθια με 2 μόνο στρείδια, 10 με 4 στρείδια, 7 καλάθια με 6 στρείδια, 5 καλάθια με 8 στρείδια και 4 καλάθια με 10 στρείδια. Αυτά αιωρούνται για 48 ημέρες κάτω από την σχεδία και έτσι υπολογίστηκε ο αριθμός των νεκρών στρειδιών κατά καλάθι και προσδιορίστηκε η ποσοστιαία θνησιμότητα.

Ο ρυθμός θνησιμότητας το 1981 ήταν μεγαλύτερος για τα στρείδια που μεταφέρθηκαν κατά την διάρκεια των χειμερινών μηνών (Ιούνιος - Αύγουστος). Η διαφορά θερμοκρασίας του νερού, ανάμεσα στους χώρους συλλογής και του τόπου καλλιέργειας ήταν περίπου 6 °C κατά την διάρκεια του χειμώνα, ενώ κατά την αρχή (Απρίλιος) και το τέλος (Νοέμβριος) της μαργαριτοφόρου περιόδου η διαφορά ήταν μόνο 1 ή 2 °C.

Η θνησιμότητα παρατηρήθηκε να είναι μικρότερη στα στρείδια που μεταφέρθηκαν σε υψηλή θερμοκρασία νερού, ενώ έγινε ένα πείραμα έτσι ώστε ένα δείγμα στρειδιών συλλεγμένο τον Ιούλιο να μπορούσε να κρατηθεί για μεταφορά στους τόπους συλλογής μέχρι τον Οκτώβριο. Επειδή το είδος της σχεδίας στον τόπο καλλιέργειας θα είχε καταστραφεί από τις άγριες θάλασσες της περιοχής, τα στρείδια θα αιωρούνταν από ένα μακρύ σχοινί που θα αντιστεκόταν στις θάλασσες. Τα στρείδια θα αιωρούντο επίσης από ένα σχοινί στο χώρο εκμίσθωσης. Τα σχοινιά που κατασκευάστηκαν από polyethylene monofilament είχαν μήκος 150 m και διάμετρο 2mm με φελλούς κάθε 3 m. Σε κάθε φελλό και στην μέση του διαστήματος μεταξύ φελλών και καλάθιων που αιωρούνταν στο συνηθισμένο βάθος 5 μέτρων, προσαρμόστηκαν κομμάτια σχοινού.

Στις 4 και 5 Ιουλίου του 1982 μαζεύτηκαν 2100 στρείδια. Στις 6 Ιουλίου κρεμάστηκαν από το σχοινί στον χώρο συλλογής 900 στρείδια. (300 από κάθε μέγεθος). Στις 7 Ιουλίου τα υπόλοιπα 1200 μεταφέρθηκαν στο χώρο της καλλιέργειας και 900 από αυτά τοποθετήθηκαν στο μακρύ σχοινί, ενώ 300 (100 από κάθε μέγεθος) τοποθετήθηκαν χαμηλότερα σε μια σχεδία με το συνηθισμένο τρόπο. 100 στρείδια από κάθε μέγεθος μεταφέρθηκαν από κάθε σχοινί στην σχεδία μετά από 42, 72 και 99 ημέρες. Ο τελικός υπολογισμός της θνησιμότητας έγινε στις 144 ημέρες και προσδιορίστηκε ο αριθμός των νεκρών στρειδιών και το ποσοστό θνησιμότητας.

3.β.4. Διερεύνηση της νόσου.

Θνησιμότητα.

Εξετάστηκαν στοιχεία για την θνησιμότητα των στρειδιών από το 1977 ως το 1982. Τα στοιχεία ήταν για το πλοίο μεταφοράς που χρησιμοποιήθηκε την ημέρα της λήψης, το συνολικό αριθμό των στρειδιών που ελήφθησαν και το μέγεθος και τη θέση πάνω στην σχεδία όπου θα τοποθετούντο τα στρείδια. Κάθε βδομάδα επιλέγονταν τυχαία και εξετάζονταν 100 στρείδια από κάθε μέγεθος. Ο υπολογισμός του ποσοστού θνησιμότητας για κάθε μέγεθος στρειδιών από το 1978 ως το 1982 έγινε από τον αριθμό των νεκρών στρειδιών κατά την ημερομηνία που παρατηρήθηκε ως η πλησιέστερη στις 40 ημέρες. Επιλέξαμε αυτήν την περίοδο των 40 ημερών γιατί είχε παρατηρηθεί ότι η θνησιμότητα έπεφτε μετά περίπου από 7 βδομάδες.

Εγινε ένα πείραμα στην περιοχή για να αποδειχθεί αν η διάδοση της θνησιμότητας οφείλεται σε κάποιον λοιμώδη παράγοντα που μεταδίδεται και στα γειτονικά στρείδια ή αν ήταν τυχαία. 900 μεγάλα στρείδια (90 καλάθια) αιωρούντο από εννέα συνεχείς στύλους σε βάθος 5-6 μέτρων. Εξετάστηκε η θνησιμότητα μεμονωμένων στρειδιών σε 10 περιπτώσεις για 81 ημέρες και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν από την ανάλυση linear logit.

Παθολογία.

Για την γενική εξέταση των μαλακών ιστών των στρειδιών ανοίξαμε και αφαιρέσαμε την πάνω βαλβίδα από 50 φυσιολογικά στρείδια στους χώρους συλλογής και 153 άρρωστα στρείδια στον τόπο της καλλιέργειας. Στερεώθηκαν στα fixative του Davidson's τμήματα του μανδύα, κτενίδιο, καρδιά, πεπτικό αδένος, μερικά τμήματα εντέρου, labial palps βύσσος και adductor fu. Οι ιστοί υπέστησαν την συνηθισμένη επεξεργασία σε παραφίνη και αυτά τα παρασκευάσματα χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη και oesin(H.E).

Βακτηριολογική εξέταση.

Για την βακτηριολογική εξέταση πάρθηκαν δείγματα (Hemolymph) από την περικαρδιακή κοιλότητα, κομμάτια πεπτικού αδένος και έντερο από 50 φυσιολογικά και από 53 άρρωστα στρείδια με αποστειρωμένα βαμβακερά επαλείψιμα εργαλεία. Τα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν nutrient agar (NA) και η επώαση έγινε σε ολική θερμοκρασία 25-30 °C. Επίσης έγινε test για την ευαισθησία στα αντιβιοτικά.

Πειραματική μεταφορά.

Η παθολογική και μικροβιολογική έρευνα των στρειδιών έδειξε ότι τα θαλάσσια βακτηρίδια *Vibrio* εμπλέκονται στη νόσο. Έγιναν πειράματα για να αποδειχθεί ότι εάν οι δύο isolates του *Vibrio* sp ήταν παθογενείς για τα ώριμα στρείδια και μπορεί να καθορισθεί εάν αυτή η παθογένεια διέφερε σε στρείδια που βρίσκονται σε 19 °C και 29 °C σε χειμερινές και θερινές θερμοκρασίες θαλάσσιου νερού στον πυθμένα του τόπου συλλογής.

Τα στρείδια μεταφέρθηκαν απότομα με βάρκες από τους τόπους συλλογής στο Broome και μετά από εκεί με αεροπλάνο στο Perth, συσκευασμένα το καθένα σε υγρές ασφράγιστες πλαστικές σακούλες. Κρατήθηκαν σε γυάλινα ενυδρεία 30X61cm ή 36X91cm που περιείχαν ένα σύστημα φιλτραρίσματος από χαλαζία και χαλίκι. Αυτά τα ενυδρεία αποθηκεύτηκαν σε δωμάτια με ελεγχόμενη θερμοκρασία. Οι μελέτες των πειραμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

Exp. no.	Bacterium	No. oysters/group	Inoculum Mean cfu/ml ($\times 10^8$)	Vol. (ml)	Method of inoculation			Water temp. (°C)		No. of inoculations	
					MC	EPS	Tank	19	29	Oyster	Tank
1	KB9/81	5	7.4	4	+	+	+	+	+	4	4
2	KB9/81	5	1.4	4	+				+	4	
3	KB9/81	5	1.8	4		+			+	4	
4	KB9/81	5	Not done	4		+			+	1	
5	KB9/81	5	1.7	2		+			+	4	
6	KB7/82	6	4.7	2		+	+	+	+	4	4
7	KB7/82	6	2.4	2		+	+	+	+	4	4
8	KB7/82	13	7.0	2		+	+	+	+	4	4

Πίν.1. Τα βακτηρίδια, ο αριθμός των εμβολιασμών, ο αριθμός των βακτηριδίων (cfu=μονάδες σχηματισμού της αποικίας/ml) και ο όγκος των εμβολίων και η μέθοδος των εμβολιασμών (MC=κοιλότητα μεμβράνης, EPS=extra pallial χώρος, νερό δεξαμενής) που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα για την αναπαραγωγή της ασθένειας στα στρείδια στους 19 °C ή στους 29 °C. Οι εμβολιασμοί έγιναν σε καθημερινά διαστήματα. Το υπόλοιπο του εμβολίου προστέθηκε στο νερό της δεξαμενής όπου υπάρχει ένδειξη.

Τα δύο στελέχη isolates του *Vibrio* sp (KB 9/81, KB7/82) που χρησιμοποιήθηκαν σαν εμβόλια είχαν απομονωθεί από το αίμα και την λέμφο των μολυσμένων στρειδιών από τους τόπους καλλιέργειας, στη συνέχεια όμως αποδείχτηκε ότι ήταν το *V. harveyi*.

Πριν από τον εμβολιασμό τα στρείδια απομακρύνθηκαν από το νερό και διατηρήθηκαν ανοιχτά. Το εμβόλιο μπορούμε να το τοποθετήσουμε μέσα στην κοιλότητα του μανδύα ή μπορούμε να το τοποθετήσουμε μέσα στην κοιλότητα του μανδύα ή μπορούμε να το τοποθετήσουμε ανάμεσα στον μανδύα και το όστρακο. Τα όστρακα που χρησιμοποιήθηκαν ως μέτρα σύγκρισης εμβολιάστηκαν με αποστειρωμένο αλατόνερο. Τον ίδιο αριθμό στρειδιών που χρησιμοποίησαν ως μέτρο σύγκρισης των στρειδιών που υπέστησαν δοκιμασία χρησιμοποίησαν και σε κάθε πείραμα εκτός από τα πειράματα 6 και 7, όπου όμως μια ομάδα στρειδιών χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο σύγκρισης και έτσι λειτούργησαν και για τα δύο. Για να παρατηρηθούν τα στρείδια καθημερινά επιστράφηκαν στο νερό, για να φανούν τα κλινικά σημεία της ασθένειας όπως χάσμα, ανάκληση του μανδύα και βραδύτητα κλεισίματος.

Αυτά τα στρείδια χαρακτηρίστηκαν «παθολογικά» και μ' αυτά προσδιορίστηκε το ποσοστό της νοσηρότητας και της θνησιμότητας για κάθε ομάδα στρειδιών που χρησιμοποιήθηκαν.

3.β.5. Αναλυτικές μέθοδοι.

Οι πειραματικοί παράγοντες που ενδεχομένως επέδρασαν στα ποσοστά των νεκρών στρειδιών μετά από μια ορισμένη χρονική περίοδο, εξετάστηκαν με την χρήση ενός μοντέλου linear logit. π. χ. το μέγεθος το βάθος και το καθάρισμα του πειράματος $\log [\pi (1-\pi)]$. αυτά σχετίστηκαν με το μέγεθος των στρειδιών, το βάθος, το καθάρισμα και τη θέση του καλάθιού πάνω στην σχεδία καθώς επίσης και οι αλληλεπιδράσεις τους. (CO X 1970). Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο για την ανάλυση των δεδομένων GENSTAT (Alvey et al 1977) που χρησιμοποιεί την μέγιστη πιθανότητα της μεθόδου Nelder και Wedderburn (1972). Η σπουδαιότητα των παραγόντων και οι αλληλεπιδράσεις τους στο μοντέλο για την επεξήγηση της μεταβλητικότητας στα ποσοστά των νεκρών στρειδιών, καθορίστηκε προσαρμόζοντας δύο μοντέλα, το ένα είναι με παράγοντα και το άλλο χωρίς.

Για τον καθορισμό της σπουδαιότητας του παράγοντα (Bishop et al 1975) χρησιμοποιήθηκε η διαφορά πιθανότητας σε μία αναλογία E2 των δύο μοντέλων. Η αναλογία του υπολογισμού της παραμέτρου ως προς το σύνθητες σφάλμα συγκρίθηκε με την κατανομή t , στην εξέταση της σπουδαιότητας των παραμέτρων στα μοντέλα. Όταν χρειάστηκε να υπολογισθούν οι παράμετροι των μοντέλων που δεν ταίριαζαν, ένας

άλλος παράγων της ετερογένειας (G2/d. f.) εφαρμόστηκε η διαφορά των παραμέτρων (Finney 1971).

Στην ανάλυση των πειραμάτων ελήφθη υπ' όψη ο συμπληρωματικός κρίκος log-log. Καθώς αυτοί οι μέθοδοι ληταν παρεμφερή με τον κρίκο logit.

3.β.6. Αποτελέσματα

3.β.6.1. Περιβαντολλογικοί παράγοντες.

Σε μερικά από τα περιβαντολλογικά δεδομένα όπως PH και το διαλυμένο οξυγόνο του θαλάσσιου ύδατος (Paxton και Allouse 1982). Δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές στις τιμές των παραμέτρων της ποιότητας του νερού (πίνακας 2).

Location	Parameter	Water temp. (°C)	PO ₄ -P (μg/l)	Total-P (μg/l)	NH ₄ -N (μg/l)	NO ₂ +NO ₃ -N (μg/l)	Total-N (μg/l)	Chlorophyll-a (μg/l)
Lease site								
Surface	28.0 ± 1.9 (24.4-31.8)	10.0 ± 3.7 (6-27)	35.0 ± 9.0 (19-53)	7.6 ± 4.4 (2-21)	2.8 ± 1.0 (1-6)	231.6 ± 170.4 (29-568)	0.42 ± 0.2 (0-1.1)	
Bottom	27.9 ± 1.9 (24.1-31.8)	10.2 ± 2.4 (6-19)	36.2 ± 10.1 (21-58)	9.1 ± 5.6 (1-27)	3.5 ± 2.9 (0-17)	214.0 ± 154.6 (17-534)	0.5 ± 0.3 (0-1.2)	
Collective grounds								
Surface	24.0 ± 2.8 (9) (20.0-26.8)	4.9 ± 1.3 (3-7)	30.4 ± 13.5 (17-62)	5.9 ± 4.8 (1-13)	3.7 ± 0.9 (3-6)	315.1 ± 211.6 (74-645)	0.3 ± 0.4 (0-1.35)	
Bottom	23.8 ± 2.7 (20.0-26.7)	5.2 ± 0.8 (4-6)	26.9 ± 5.8 (19-35)	4.5 ± 3.0 (1-9)	4.1 ± 1.1 (3-6)	331.9 ± 179.7 (107-563)	0.3 ± 0.2 (0.1-0.6)	

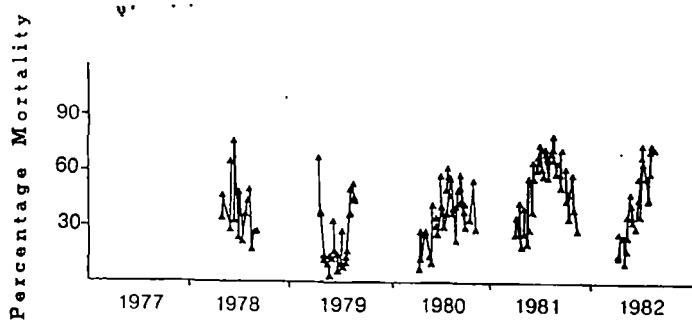
Πίν.2. Θερμοκρασία νερού, θρεπτικά συστατικά και οι τιμές χλωροφύλλης - a στους τόπους δειγμάτων. Οι τιμές της επιφάνειας και του πυθμένα δίνονται οι μέσες +- στάνταρντ αποκλίσεις και κλίμακα τιμών

Σόλους τους τόπους η περιεκτικότητα σε αλάτι κυμάνθηκε μεταξύ 1, 024g/cm (ισοδύναμο προς 32, 7‰ σε περιεκτικότητα αλατιού και 1, 0267 g/cm (35, 9‰). Ενώ οι εποχιακές διαφορές μεταξύ των χώρων συλλογής και του τόπου καλλιέργειας βρίσκεται ανάμεσα στις χαμηλότερες θερμοκρασίες θαλάσσιου ύδατος (πίνακας 2). μετά από αυτό δεν παρατηρήθηκαν άλλες σημαντικές διαφορές στις παραμέτρους της ποιότητας του νερού μεταξύ των δύο περιοχών.

Οι ενδείξεις στον δίσκο Secchi έδειξαν μια ευρεία κλίμακα τιμών θολότητας (2, 0 - 11, 5 m). Η θολότητα και στους τόπους καλλιέργειας και στους χώρους συλλογής επηρεάζεται πολύ από την μεγάλη παλιρροιακή κλίμακα στη βορειοδυτική πλευρά της Αυστραλίας.

Το χαμηλότερο επίπεδο διαλυμένου οξυγόνου που βρέθηκε στις γεμάτες με στρείδια δεξαμενές κατά την διάρκεια της μεταφοράς των, είτε κάτω από τις σχεδίες ήταν 5, 8ppm (ισοδύναμο με το 88% της ατμοσφαιρικής υγρασίας).

Έρευνες από το έτος 1978 - 1982 έδειξαν ότι το ποσοστό θνησιμότητας ήταν μεγαλύτερο στο μέσο της περιόδου που δημιουργόνταν τα μαργαριτάρια (διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2. Χρονολογική σειρά των καταγραφών της εταιρείας για το ποσοστό θνησιμότητας των μαργαριτοφόρων οστράκων για τα ξεχωριστά ταξείδια συλλογής στις περιόδους μαργαριτογένεσης μεταξύ 1978 και 1982.

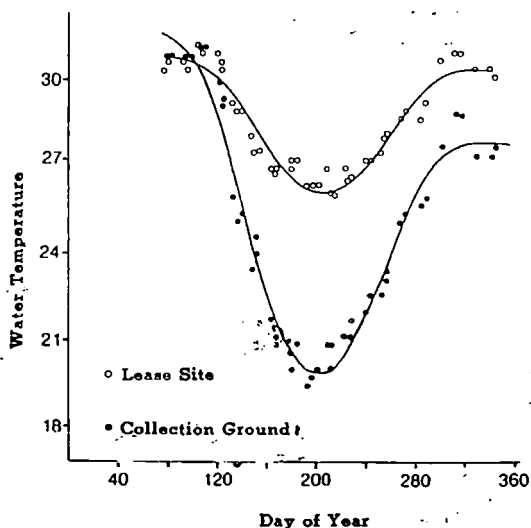
Μια πολλαπλή ανάλυση των περιβαλλοντικών παραμέτρων που έχει συσχετιστεί με την θνησιμότητα των στρειδιών στην πενταετή περίοδο απεκάλυψε ότι στο ποσοστό διαφοράς που δικαιολογείται από το μέγεθος των στρειδιών, χρόνο με το χρόνο οι διαφορές είναι 35, 0% ενώ όταν προσθέσουμε και την θερμοκρασία η διαφορά ήταν 55, 4%.

Η διαφορά αυτή όταν προστέθηκαν και οι υπόλοιπες περιβαλλοντικές παράμετροι μαζί με τις μέσες ατμοσφαιρικές θερμοκρασίες και το σύνολο των μηνιαίων βροχοπτώσεων στον τόπο της καλλιέργειας αυξήθηκε μόνο 56, 8%. Με βάση και τα παραπάνω η θερμοκρασία του νερού θεωρήθηκε

ο σημαντικότερος περιβαλλοντικός παράγοντας που σχετίζεται με την θνησιμότητα.

Οι καταγραφές της γραμμικής παλινδρόμησης της θερμοκρασίας του επιφανειακού νερού μεταξύ των τόπων συλλογής και του χώρου καλλιέργειας έδειξε μεγάλο συσχετισμό (0,944 0,94 και 0,97 για τα έτη 1979, 1980 κ' 1981 αντίστοιχα. Τα στοιχεία της θερμοκρασίας του νερού στον τόπο καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν για να εξετασθεί η σπουδαιότητα του παράγοντα της θερμοκρασίας για την θνησιμότητα των στρειδιών.

Το 1981 η εποχή της συλλογής επεκτάθηκε μέχρι τον Δεκέμβριο. Οι διαφορές της επιφανειακής θερμοκρασίας του νερού μεταξύ των χώρων καλλιέργειας και των χώρων συλλογής του χειμώνα του 1981 φαίνονται στο διάγραμμα 3.



Διάγραμμα-3. Θερμοκρασίες του νερού της επιφάνειας στον τόπο εκμίσθωσης (LS) και στους τόπους συλλογής (CG) κατά την περίοδο μαργαριτογέννησης του 1981. Εφαρμοσμένες κυκλικές καμπύλες όπου $\theta=2\pi$ (ημέρα του χρόνου)/365 έδωσαν τις εξισώσεις.

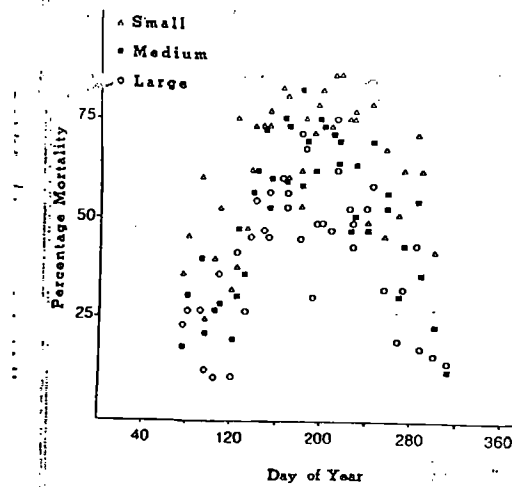
$$T_{LS}=29,9+0,85\sin(\theta) +1,69\cos(\theta)-0,65\sin(2\theta)-0,79\cos(2\theta)$$

με συσχέτιση $(r)=0,97$
μέγεθος δείγματος $(N)=155$ και

$$T_{CG}=26,15+2,74\sin(\theta)+3,85\cos(\theta)-0,63\sin(2\theta)-2,10\cos(2\theta)$$

με $r=0,98$ & $N=126$

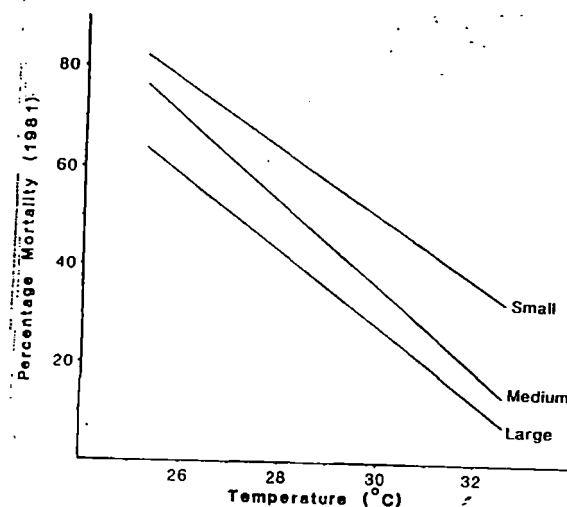
Η αύξηση της θνησιμότητας των στρειδιών που μεταφέρθηκαν κατά την διάρκεια του χειμώνα του 1981, συγκρινόμενη με την άνοιξη και το φθινόπωρο φαίνεται στο διάγραμμα 4.



Διάγραμμα 4. Ποσοστό θνησιμότητας των μαργαριτοφόρων οστράκων τριών μεγεθών από τις καταγραφές των ξεχωριστών στρειδιών συλλογής κατά την περίοδο μαργαριτογένεσης του 1981.

Το ποσοστό όμως θνησιμότητας ποίκιλε σημαντικά για τα στρείδια που συλλέχτηκαν κατά την διάρκεια των μέγιστων παλιρροιών. Μετά από αυτές περισσότερα μικρά παρά μεγαλύτερα στρείδια πέθαναν κατά την διάρκεια του έτους.

Το ποσοστό θνησιμότητας των στρειδιών, για κάθε μέγεθος κατά την διάρκεια του 1981, ήταν αντιστρόφως ανάλογο με την θερμοκρασία του νερού (διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5. Σχέση ανάμεσα στο ποσοστό θνησιμότητας των μαργαριτοφόρων στρειδιών των τριών μεγεθών, που ακολούθησε την μεταφορά στον τόπο εκμίσθωσης και την θερμοκρασία του νερού στον τόπο εκμίσθωσης όταν έφτασαν κατά το 1981. Οι γραμμές παλινδρόμησης προέρχονται από τα στοιχεία θερμοκρασίας και θνησιμότητας στα διαγράμματα 3 και 4.

Τα στοιχεία θνησιμότητας του 1981 εξετάστηκαν για τις εποχιακές διακυμάνσεις, συγκρίνοντας το πρώτο μισό της περιόδου συλλογής με το δεύτερο μισό.

Αφού ελήφθησαν όλα υπ' όψη όπως το μέγεθος των στρειδιών και η θερμοκρασία του νερού δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ των στρειδιών που μεταφέρθηκαν στην αρχή της εποχής, αλλά και στο δεύτερο μισό της εποχής ($F_{2, 105} = 1, 55$).

3.β.6.2. Πειράματα πεδίου

Η γραμμική logit ανάλυση της θνησιμότητας για το πείραμα σχεδιάστηκε για να εκτιμήσει το μέγεθος, το βάθος και την καθαριότητα. αυτό όμως δεν αποκάλυψε καμία σημαντική διαφορά που να οφείλεται στο βάθος ή στην καθαριότητα. Το μέγεθος των στρειδιών ήταν σημαντικό ($p < 0, 001$). Η θνησιμότητα ήταν αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθος (μικρά 72, 7μ, μεσαία 63,6% και μεγάλα 39,0%).

Στο πείραμα που έγινε για να εκτιμηθεί η πυκνότητα των στρειδιών μέσα στα καλάθια, καθώς και η θνησιμότητα των 10 στρειδιών στα καλάθια, σε σύγκριση με εκείνη των άλλων καλάθιων (2-8) ήταν σημαντική μεγαλύτερη ($p < 0, 01$) με G_2 των 7, 4 με 1 d. f. Για παράδειγμα η αναμενόμενη θνησιμότητα του μεσαίου μεγέθους στρειδιού σε καλάθια των 10 στρειδιών ήταν 48%, ενώ σε καλάθια με μικρότερο αριθμό στρειδιών ήταν 34%. Κανένα στρείδι οποιουδήποτε μεγέθους δεν πέθανε πάνω στο μακρύ σχοινί στο χώρο συλλογής. Πέθαναν όμως τα στρείδια που βρίσκονταν πάνω στο μακρύ σχοινί και στην σχεδία στο χώρο βέβαια της καλλιέργειας, αλλά η θνησιμότητα ήταν μικρότερη στο σχοινί παρά στην σχεδία (πίνακας 3).

Site	Size		
	Small % dead	Medium % dead	Large % dead
Collection ground			
Long-line	0	0	0
Lease sites			
Long-line	37	15	5
Lease site raft	60	56	37

Πίνακας 3. Το ποσοστό θνησιμότητας των μικρών (<102mm), μεσαίων (102 -104 mm) και των μεγάλων στρειδιών (>140mm) 42 ημέρες αφού τοποθετήθηκαν σ' ένα μακρύ σχοινί στους χώρους συλλογής και σ' ένα μακρύ σχοινί - σχεδία στο χώρο εκμίσθωσης.

Δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα στα στρείδια που μεταφέρθηκαν ύστερα από 99 μέρες από το μακρύ σχοινί στο χώρο συλλογής κ' στην σχεδία του τόπου καλλιέργειας κατά τον Οκτώβριο όταν η διαφορά ήταν ελάχιστη. Υπήρξε ωστόσο ένα ποσοστό θνησιμότητας 20-40% στα στρείδια που βρίσκονταν στο σχοινί στον τόπο καλλιέργειας και μεταφέρθηκαν στην σχεδία στην ίδια περίοδο (πιν. 4). Υπήρξε μια γενική μείωση της θνησιμότητας όσο τα στρείδια έμεναν περισσότερο στα μακριά σχοινιά.

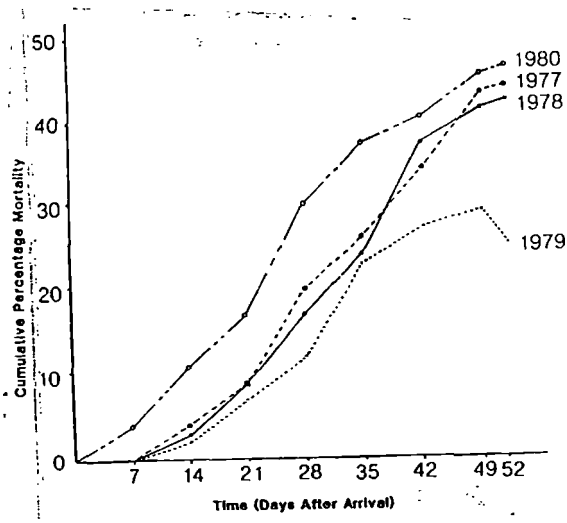
Month of transfer	Temp. differences (°C) between CG and LS	Days on long-line	Size								
			Small		Medium		Large				
			CG	LS	CG	LS	CG	LS			
July	4.2	0	—	84	—	—	85	—	—	59	—
August	2.5	42	69	—	72	72	—	56	50	—	17
September	1.6	72	73	—	64	46	—	50	19	—	20
October	1.4	99	0	—	40	0	—	37	0	—	20

Πίνακας 4. Η ποσοστιαία θνησιμότητα των μικρών (<102 mm), μεσαίων (102 -140 mm) και των μεγάλων (>140 mm) στρειδιών που τοποθετήθηκαν αμέσως στην σχεδία στον τόπο εκμίσθωσης συγκρινόμενα με τα στρείδια που είχαν μεταφερθεί από τα μακριά σχοινιά των τόπων συλλογής (CG) ή του τόπου εκμίσθωσης (LS) σε 42, 72 και 99 ημέρες μετά την συλλογή. Η θνησιμότητα προσδιορίστηκε 144 ημέρες μετά την συλλογή.

3.β.6.3. Διερεύνηση της νόσου.

Θνησιμότητα.

Δεν υπήρξαν στοιχεία για αυξημένη θνησιμότητα στρείδια που βρίσκονταν στο φυσικό τους περιβάλλον. Νοσηρότητα και μη θνησιμότητα παρατηρήθηκε μετά την άφιξη στους καλλιεργούμενους χώρους. Η συνολική θνησιμότητα κατά καιρούς μετά την άφιξη στους καλλιεργούμενους χώρους. Η συνολική θνησιμότητα κατά καιρούς μετά την άφιξη παρουσιάζεται στο διάγραμμα 6.



Διάγραμμα 6. Μέση συσσωρευτική ποσοστιαία θνησιμότητα των στρειδιών μετά την άφιξη στον τόπο εκμίσθωσης χρησιμοποιώντας τις καταγραφές του ταξιδιού συλλογής για κάθε περίοδο μαργαριτογένεσης για τα έτη 1977 - 1980.

Γενικά στις 7 πρώτες μέρες υπήρξε μικρή ή μηδενική θνησιμότητα, ενώ αργότερα ακολούθησε μια βαθμιαία αύξηση στις επόμενες 30-40 ημέρες. Στα 90 καλάθια που τοποθετήθηκαν για να εκτιμηθεί η εξάπλωση των θανάτων ο μέσος όρος των νεκρών στρειδιών κατά καλάθι ήταν 4, 92 στρείδια (με διαφορά δείγματος 3, 20). Τα νεκρά στρείδια μοιράστηκαν τυχαία (δεν υπήρξε δηλαδή).

Παθολογία.

Τα αρρωστημένα στρείδια παρουσίασαν κενό στις βαλβίδες, τραβηγμένο υμένα και ένα διάστημα με καφέ κηλίδες μάργαρο ανάμεσα στον τραβηγμένο υμένα και το χείλος του οστράκου. Ιστολογική εξέταση αποκάλυψε αλλοιώσεις στο 74% των εξετασθέντων στρειδιών. Ένα άλλο μικροσκοπικό εύρημα ήταν η ατροφία του επιθηλίου του πεπτικού αδένου και η διαστολή των σωληναρίων. Μακροσκοπικά δεν φάνηκαν αλλοιώσεις.

Βακτηριολογία

Στην λέμφο των φυσιολογικών στρειδιών στους τόπους συλλογής δεν υπήρχαν βακτηρίδια. Ωστόσο από τα 53 άρρωστα στρείδια καλλιεργήθηκαν βακτηρίδια από την λέμφο 40 (75%) και από αυτά βρέθηκαν το 90% να έχουν *Vibrio* sp. Σε καμία περίπτωση δεν πήραμε

καθαρές καλλιέργειες βακτηρίων. Το *Vibrio* sp απομονώθηκε σε μεγάλους αριθμούς από το έντερο των φυσιολογικών και των αρρωστημένων στρειδιών.

Βακτηρίδια στο νερό μεταφοράς.

Ο αριθμός των βακτηριδίων στην επιφάνεια του νερού αυξήθηκε κατά την διάρκεια της συλλεκτικής περιόδου καθώς τα στρείδια προστέθηκαν στις δεξαμενές (πιν. 5).

Day	Morning		Evening	
	Mean \pm SD	Tank:SW	Mean \pm SD	Tank:SW
Transport vessel A, July 1982; full load				
1	10 \pm 0.9	1.3	23 \pm 3.5	2.9
2	179 \pm —	22.9	500 \pm 192	64.1
3	960 \pm —	123.1	978 \pm 111	125.4
4	368 \pm 69	47.2		
5	46 \pm 14	5.9	1725 ^a \pm 357	221.2
			20 138 ^b \pm 6504	2581.8
Transport vessel B, July 1982; half-load				
1	3.4 \pm 1.5	0.6	6.3 \pm 3.2	1.1
2	59.4 \pm 18.2	10.4	453.9 \pm 237.1	79.6
3	182.5 \pm 87.8	32.0	408.6 \pm 67.9	71.7
4	29.3 \pm 19.7	5.1	172.5 \pm 48.4	30.3
5	85.0 \pm 21.9	14.9	5573.3 ^a \pm 232.9	977.8
			10 010.0 ^b \pm 2120.0	1757.9
Transport vessel B, April 1983; half-load				
1	195.0 \pm 92	1.7	674 \pm 81	5.9
2	6123.0 \pm 572	53.7	7683 \pm 1009	67.4
3	2193.0 \pm 302	19.2	363 \pm 107	3.2
4	198.0 \pm 44	1.7		
	1012 ^a \pm 116	8.9		
	19 093.0 ^b \pm 7196	167.5		

πίνακας 5. Μέση και κανονική απόκλιση (SD) των βακτηριδίων *Vibrio*/ml στο νερό της επιφάνειας στις δεξαμενές μεταφοράς και η αναλογία των βακτηριδίων *vibrio* στο νερό των δεξαμενών μεταφοράς προς εκείνη του θαλασσινού νερού. Το καθημερινό πρωινό δείγμα ελαμβάνετο πριν τα στρείδια τοποθετηθούν στην δεξαμενή

Το επίπεδο ήταν υψηλότερο την δεύτερη και τρίτη μέρα της συλλογής, καθώς ήταν εμφανή τα συμπτώματα της πτώσης. Την τέταρτη και Πέμπτη μέρα, καθώς το πλοίο προχωρούσε προς τον χώρο της καλλιέργειας. Η

μεγαλύτερη συγκέντρωση βακτηριδίων παρατηρήθηκε στο νερό των δεξαμενών μετά την απομάκρυνση των στρεϊδίων στον τόπο της καλλιέργειας.

Πειραματική μετάδοση.

Η απομόνωση KB9/81 αναπτύχθηκε ραγδαία στους 18ο C και στους 37ο C παρόλα που ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν αργότερα στους 18ο C. Στους 18ο C ο αριθμός των βακτηριδίων ήταν $5,0 \times 10^8$ και $5,3 \times 10^7$ cfu/ml στις 6 και 24 ώρες αντίστοιχα και στους 37οC ο αριθμός των βακτηριδίων ήταν $1,3 \times 10^8$ και $6,9 \times 10^7$ cfu/ml στις 6 και 24 ώρες αντίστοιχα.

Τα εμβολιασμένα στρείδια δεν εμφάνισαν εμφανή συμπτώματα της νόσου. Η πρώτη ένδειξη της νόσου ήταν 3 μέρες μετά τον εμβολιασμό, αλλά η όλη κλίμακα ήταν 3 - 32 μέρες. Στο τέλος του πειράματος στα στρείδια υπήρξε μια διαφορά στην κατάσταση του σώματος των στρεϊδίων που παρατηρήθηκαν κ' στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες. Οι ιστοί των στρεϊδίων στους 29ο ήταν πρησμένοι και γυαλιστεροί. Στους 19οC οι ιστοί ήταν πλαδαροί κ' θαμποί. Τα στοιχεία της νοσηρότητας / θνησιμότητας σ' όλα τα πειράματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.

Exp.	Infected with <i>Vibrio</i> sp.				Control			
	19°C		29°C		19°C		29°C	
	Morbidity	Mortality	Morbidity	Mortality	Morbidity	Mortality	Morbidity	Mortality
1	100	100			20	20		
2			100	0			40	0
3			80	0			0	40
4			20	0			0	0
5			40	0			20	0
6	83	67			17	17		
7	83	83						
3	85	31	8	0	54	23	0	0
Overall	87	57	39	0	36	20	9	0

Πίνακας 6. Το ποσοστό των στρεϊδίων που κρατήθηκαν σε θερμοκρασία 19οC ή 29οC και ανέπτυξαν κλινικές ενδείξεις της νόσου (νοσηρότης) και πέθαναν (θνησιμότης) σε πειράματα μετάδοσης της νόσου. Οι έλεγχοι που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα 7 ήσαν οι ίδιοι μ' εκείνους που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα 6.

Κατά την διάρκεια των πειραμάτων με την μέθοδο ανάλυσης linear-logit, η θνησιμότητα των στρεϊδίων ελέγχου ήταν μικρότερη από εκείνη των

στρειδιών που είχαν μολυνθεί με *V. harveyi* ($P < 0, 001$). Στην ίδια ανάλυση σημαντικά μικρότερη νοσηρότητα εμφανίστηκε στα στρείδια που κρατήθηκαν στους 29°C και συγκρίθηκαν με εκείνα που κρατήθηκαν στους 19°C ($P < 0, 001$). Το ποσοστό θνησιμότητας ήταν μικρότερο στα στρείδια ελέγχου απ' ό,τι στα μολυσμένα στρείδια ($P < 0, 05$) και στα στρείδια με τους 29°C συγκρίθηκαν μ' εκείνα που κρατήθηκαν στους 19°C ($P < 0, 001$).

3.β.7. Συζήτηση - Συμπέρασμα.

Η θνησιμότητα των στρειδιών συνέβη μετά την μεταφορά. Υπήρξε μια μικρή ως καθόλου θνησιμότητα την πρώτη εβδομάδα μετά την μεταφορά, αλλά αυξήθηκε μεταξύ της δεύτερης κ' της έκτης εβδομάδας και αργότερα έγινε η σταθεροποίηση.

Οι επί τόπου μεταθανάτιες μελέτες των ασθενών στρειδιών έδειξαν ότι η πλειονότητα έπασχε από βακτηριδιακή μόλυνση. Τα βακτηρίδια που βρέθηκαν ήταν τα θαλάσσια *Vibrio* sp και δύο από αυτά χαρακτηρίστηκαν ως *V. harveyi* (R. Sakazaki 1983). Η vibriosis των προνυμφών των οστρακοειδών είναι μια τεκμηριωμένη ασθένεια αλλά η vibriosis των ενήλικων οστράκων δύσκολα βρίσκεται. Ο Tubiash (1974) κατέληξε ότι το *Vibrio* sp ήταν ο πρωταρχικός παθογόνος παράγοντας στα ενήλικα στρείδια. Και τα *VV. anquillarum* και τα *Valginolyticus* αναφέρθηκαν ως παθογόνοι παράγοντες για τα ώριμα *C. gigas* και η θνησιμότητα ήταν μεγαλύτερη στα στρείδια με υψηλές (20°C) θερμοκρασίες (Grischkoowsky και Liston 1974).

Το *V. harveyi* δεν σχετίστηκε με την νόσο. Επειδή δεν βρέθηκαν άλλοι τυχαίοι παράγοντες είναι πιθανόν η μόλυνση με το θαλάσσιο *Vibrio* sp να συνέβαλε στα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας στις καλλιεργούμενες περιοχές.

Το *P. maxima* ήταν ευαίσθητο στη νόσο, με τις χαμηλές θερμοκρασίες, γιατί όλος ο ρυθμός νοσηρότητας και θνησιμότητας ήταν μεγαλύτερος στους 19°C παρά στους 29°C. Η κανονική θερμοκρασία για το *P. maxima* σ' αυτό το εκτροφείο κυμαίνεται μεταξύ 18°C - 32°C. Είναι πιθανόν στις χαμηλές θερμοκρασίες οι αμυντικοί μηχανισμοί του *P. maxima* να καταπιέζονται και τα στρείδια να υφίστανται stress. Σ' αυτές τις θερμοκρασίες τα θαλάσσια *Vibrio* sp πολλαπλασιάζονται καλά.

Έχει αποδειχτεί ότι τα περιπτώματα των ψαριών είναι πηγή μόλυνσης και ευνοούν την εξάπλωση των βακτηριδίων (Ruby και Movin 1979) και είναι πιθανόν κάτι ανάλογο και με τα περιπτώματα των μαλακίων. Η συσσώρευση περιπτώματων και άλλων οργανικών ουσιών στις δεξαμενές συντέλεσαν στο να δημιουργηθεί ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη βακτηριδίων.

Μια άλλη περίοδος που πιθανόν εμφανίζεται η μόλυνση είναι αυτή που τα στρείδια αιωρούνται στις σχεδίες στον τόπο της καλλιέργειας. Υπάρχει κάποια ένδειξη που στηρίζει την άποψη ότι η θνησιμότητα στα πειράματα που γίνονται επί τόπου σχετίζονται με την πυκνότητα των στρειδιών στις σχεδίες. Η θνησιμότητα των στρειδιών που είχαν τοποθετηθεί στα μακριά σχοινιά ήταν μικρότερη από εκείνη των στρειδιών στις σχεδίες. Αυτό ίσως έχει σχέση με την διάλυση των βακτηριδίων οφειλόμενη στην καλύτερη κυκλοφορία του νερού γύρω από τα στρείδια στα μακριά σχοινιά απ' ότι γύρω από τις πυκνοτοποθετημένες σχεδίες.

Πριν την έναρξη των πειραμάτων είχαν υπολογίσει πως τα βακτηρίδια απομακρύνονταν γρήγορα από την δεξαμενή με το σύστημα φιλτραρίσματος με χαλίκια. Για να αυξηθεί ο χρόνος έκθεσης κάθε στρειδιού στα βακτηρίδια, γινόταν εμβολιασμός μεταξύ του υμένα και του οστράκου (extra pullial διάστημα).

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας, έδειξαν ότι η μεγάλη θνησιμότητα των μαργαριτοφόρων στρειδιών στη βορειοδυτική πλευρά της Δυτικής Αυστραλίας είχε σχέση με τις χαμηλές θερμοκρασίες του νερού, τον συνωστισμό των στρειδιών κατά την διάρκεια της μεταφοράς και την ανεπαρκή κυκλοφορία του νερού στις δεξαμενές μεταφοράς. Συνέπεια αυτό ήταν η μόλυνση των στρειδιών με *Vibrio* sp. Αυτό το συμπέρασμα δεν αποκλείει την ανάμειξη άλλων μολυσματικών παραγόντων.

Ενα χρόνο μετά η μεταφορά των στρειδιών γίνεται με υδροπλάνα και έτσι οι απώλειες έχουν μειωθεί σημαντικά.

4. Παραγωγή γόνου και εκτροφή προνυμφών του *Pinctada fucata*.

4.1. Εισαγωγή

Η ωοτοκία του Ινδικού μαργαριτοφόρου στρειδιού *P. fucata* έγινε στο εργαστήριο και οι προνύμφες ανατράφηκαν επιτυχώς σε αυγά κάτω από τροπικές συνθήκες. Η προνύμφη αναπτύσσεται μέσα από τα στάδια *straight - hinge*, *umbo* της οφθαλμικής κηλίδας και του *pedivilliger* στην πελαγική φάση πριν μεταμορφωθεί σε φυτειοκρατία.

Ακολουθώντας την ανάπτυξη των τεχνικών για την καλλιέργεια των μαργαριτοφόρων στρειδιών *P. fucata* και την παραγωγή των καλλιεργούμενων μαργαριταριών αποδείχτηκε σημαντικό να αναπαράγονται τα είδη των στρειδιών τεχνητά καθώς οι πληθυσμοί σε φυσικούς χώρους έδειξαν δραστικές διακυμάνσεις. Η συλλογή των αυγών στις παράκτιες περιοχές και στους κόλπους αποδίδει μόνο μικρές ποσότητες οι οποίες περιλαμβάνουν διάφορα είδη μαργαριτοφόρων στρειδιών με ένα χαμηλό ποσοστό σε *P. fucata* (Alagaraswami 1977). Η

παρούσα εργασία επιχείρησης κυρίως να αναπτύξει τις βασικές τεχνικές της τεχνητής αναπαραγωγής τουλινδικού μαργαριτοφόρου στρειδιού κ'να διευκρινίσει τις αρχές κ'τα προβλήματα της ανατροφής τροπικών διθύρων.

4.2. Υλικά και μέθοδοι.

Ωοτοκία.

Πειράματα με τέσσερις ομάδες προνυμφιακής ανάπτυξης διεξάχθηκαν κατά την διάρκεια της περιόδου Αυγούστου 1981 - Ιανουαρίου 1982 στο εργαστήριο του Tuticoinh ωοτοκία των μαργαριτοφόρων στρειδιών *P. fucata*. Η ωοτοκία ώριμων μαργαριτοφόρων στρειδιών έγινε με την τοποθέτησή τους 50 σε γυάλινο σκεύος ή 200 σ' ένα δοχείο από πλαστικό γυαλί που περιείχε 6 lt και 90 lt θαλασσινό νερό αντίστοιχα. Στην ωοτοκία το νερό στα δοχεία έγινε γαλακτώδες επιβεβαιώνοντας ότι τα αυγά και σπέρμα ήταν παρόντα σε καλή συγκέντρωση ενώ οι γονείς των στρειδιών απομακρύνθηκαν. Η χρησιμοποίηση έγινε στο ίδιο μέσο και γονιμοποιημένα αυγά κατακάθησαν στον πυθμένα. Μετά το άδειασμα του νερού με το αιώρημα όπου περιείχε το σπέρμα, μη γονιμοποιημένα αυγά και υπολείμματα προστέθηκε φρέσκο θαλασσινό νερό και χύθηκε τέσσερις με πέντε φορές μέχρις ότου μόνο τα γονιμοποιημένα ωάρια απόμειναν στα δοχεία.

Εκτροφή των προνυμφών.

Όταν τα έμβρυα έφτασαν στο στάδιο του μοριδίου (περίπου 4 h από την γονιμοποίηση), αυτά άρχισαν να κολυμπούν στη στήλη του νερού και οδηγήθηκαν έξω. Για την έξοδό τους χρησιμοποιήθηκε ένας σωλήνας πολυαιθυλενίου μέσα σε δοχεία της προνυμφιακής εκτροφής των δέκα - λίτρων τα οποία ήταν γυάλινα και κυλινδρικά δοχεία και περιείχαν 9 lt θαλασσινού νερού σε ορθογώνιες από πλαστικό γυαλί δεξαμενές των 75 X 50 X 40 cm . οι δεξαμενές επίσης περιείχαν 90 lt θαλασσινού νερού οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σαν δοχεία προνυμφιακής εκτροφής.

Το θαλασσινό νερό αλλαζόταν καθημερινά και σε εναλλασσόμενες μέρες τα ίδια δοχεία αλλάζονταν. Πριν και κατά την διάρκεια της σταθεροποίησης των αυγών μόνο το νερό αλλαζόταν. Το θαλασσινό νερό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτροφή των λάβρων ήταν αντλούμενο από πηγάδι θαλασσινού νερού, το οποίο ήταν σκαμμένο στον κόλπο και πέρναγε δια μέσου δεξαμενών καθίζησης και ενός στρώματος φίλτρου (από άλλο) και αποθηκεύτηκε σε μια τσιμεντένια λεκάνη αποστράγγισης. Το νερό της λεκάνης αποστραγγίσεως αντλιόταν στο εργαστήριο και στο άκρο της διανομής ήταν κλεισμένο με φαρμακευτικό

βαμβάκι: Το νερό δεν φιλτραρόταν περισσότερο ενώ δεν γινόταν ούτε χρήση υπεριώδους βακτηριοκτόνου φωτός. Αντιβιοτικά δεν χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Τα δοχεία προνυμφιακής εκτροφής δεν αερίζονταν μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας ανάπτυξης των αυγών.

Οι λάβρες μετρήθηκαν πάνω σε δύο άξονες: τ μακρύτερο anteroposterior άξονα (APM) που μετράει το μήκος είναι του κελύφου, και τον κοντύτερο ραχιοκοιλιακό άξονα (DVM) που μετράει το ύψος του οστράκου. Επειδή ο άξονας ανάπτυξης του

ενηλίκου μαργαριτοφόρου στρειδιού είναι παράλληλος με το ραχιοκοιλιακό, η ανάπτυξη της προνύμφης συνάχθηκε από το DVM. Οι μέσες αξίες της λάρβας και του μεγέθους των αυγών αντλήθηκαν από 50 μετρήσεις για κάθε ένα.

Τέσσερις ομάδες προνυμφιακής εκτροφής έγιναν σε ατμοσφαιρική θερμοκρασία με κλίμακα θερμοκρασίας νερού 27,5 - 29,6 °C κατά την διάρκεια εκτροφής 1 (Αυγούστου - Σεπτεμβρίου 1981), 28,2 - 29,8 °C κατά την διάρκεια εκτροφής 2 (Σεπτεμβρίου - Οκτωβρίου 1981)

24,6 - 27,3 °C κατά την διάρκεια εκτροφής 3 (Νοεμβρίου - Δεκεμβρίου 1981) και

24,3 - 27,2, °C κατά την διάρκεια εκτροφής 4 (Δεκεμβρίου 1981 - Ιανουαρίου 1982). Η κλίμακα της αλατότητας ήταν

33,51 - 35,12‰ της εκτροφής 1,

32,98- 34. 00‰ της εκτροφής 2,

28,00 - 30.77 ‰ της εκτροφής 3 και

27,50 - 28,25 ‰ στην εκτροφή 4.

Σ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων η κλίμακα του PH ήταν περιορισμένη από 7,38 έως 7,90.

Καλλιέργεια φυκιών.

Το χρυσόφυτο κίτρινο - καφέ μαστιγοφόρο *Isochrysis galbana* που έχει διαστάσεις 7, 8μ m χρησιμοποιήθηκε σαν κανονική τροφή για τις λάβρες, και καλλιεργήθηκε στο μέσο εμπλουτισμό στους 24 °C (Walne, 1974). Φθορίζουσα φώτα χρησιμοποιήθηκαν προμηθεύοντας ποσότητα φωτισμού ανάμεσα στις ώρες 06:00 πμ και 18:00 μμ ημερησίως.

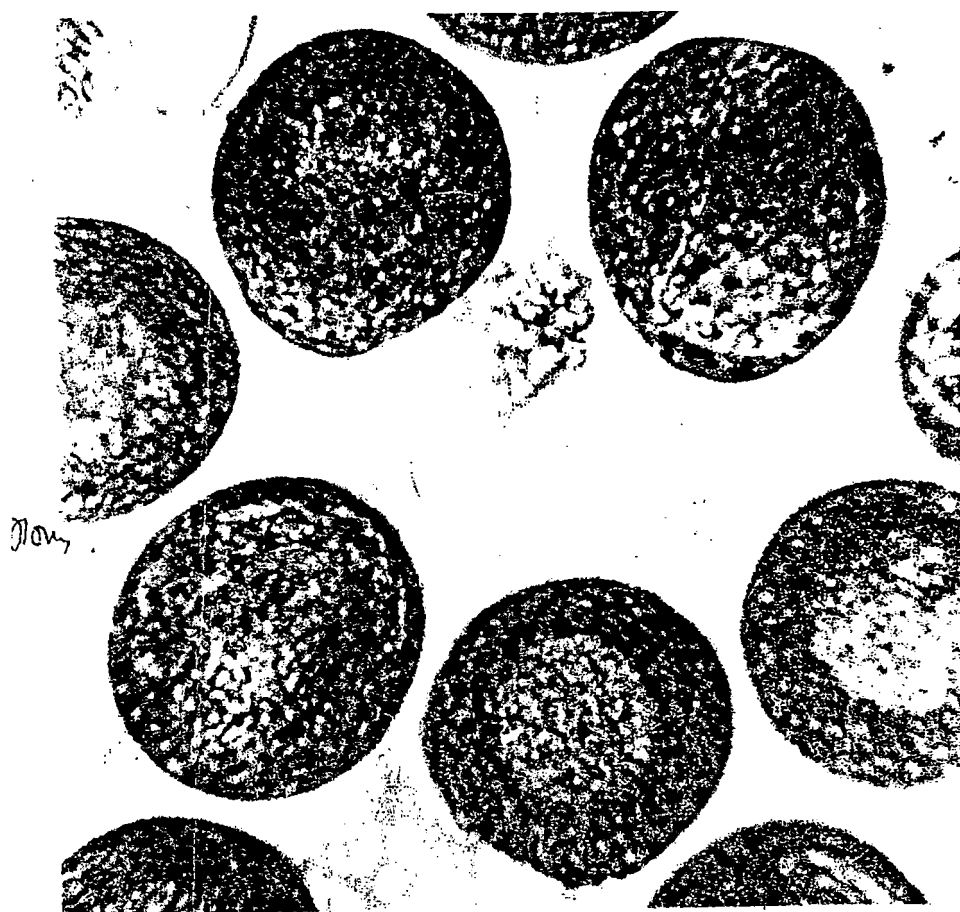
Έντονες αυξήσεις αποκομίστηκαν τη μέρα 3 από τον εμβολιασμό του αποθέματος της καλλιέργειας μέσα σε 20 lt γυάλινα Garboys. Τον γόνο των οστράκων τον τροφοδοτούσαν με αναμειγμένο ανθό από φυτοπλαγκτό, που περιείχε επίσης και το *I galbana*, που μαζευόταν από τα δοχεία πλαστικού γυαλιού στον εξωτερικό χώρο.

4.3. Αποτελέσματα.

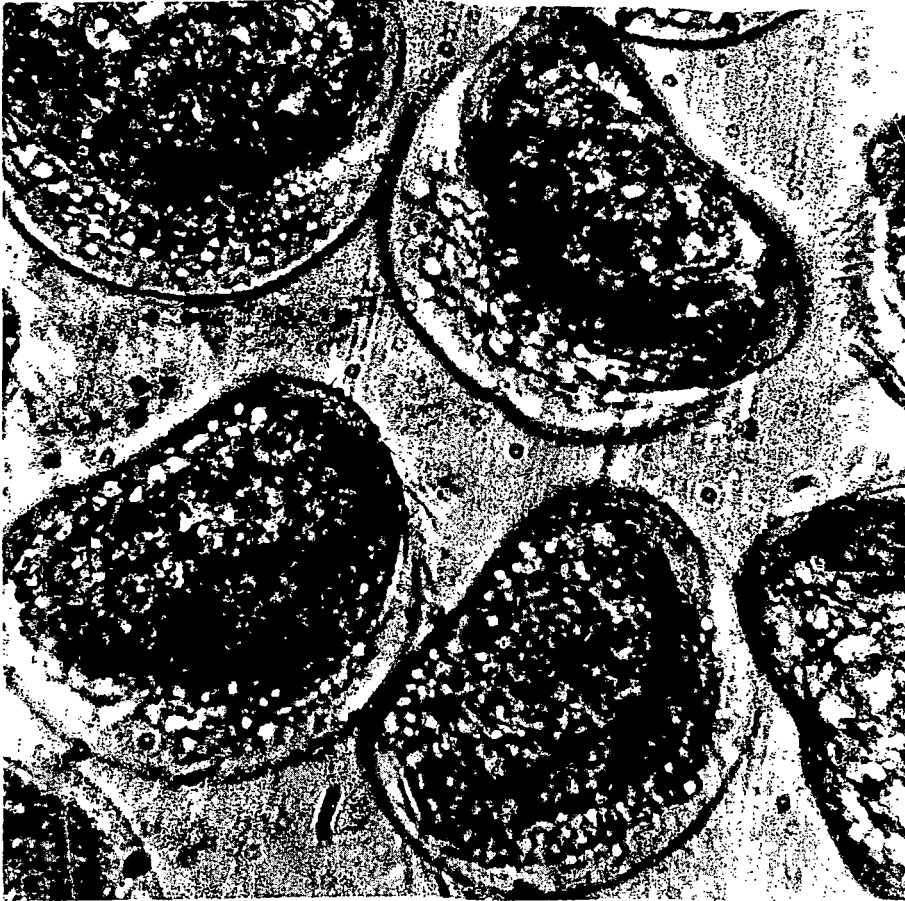
Εκτροφή της λάρβας.

Στάδιο του (ευθυ-κλείθρου).

Alagarswami et al (1908 B) έχουν περιγράψει την αύξηση της λάρβας *P. fucata* από αυγά (εικ. 1) τα οποία γονιμοποιήθηκαν στο εργαστήριο μέχρι το ευρύ κλείθρο των τροχοφόρων προνυμφών (εικ. 2)



Εικ-1. Αυγά του *Pinctada fucata* που η ωτοκία έγινε στο εργαστήριο. Η εμβρυική φούσκα φαίνεται στα περισσότερα από τα αυγά μεγέθους 47,5μm.



ΕΙΚ-2. Κάθετο-κλείθρο προνύμφης μέγεθος 72,5X57,5μm.

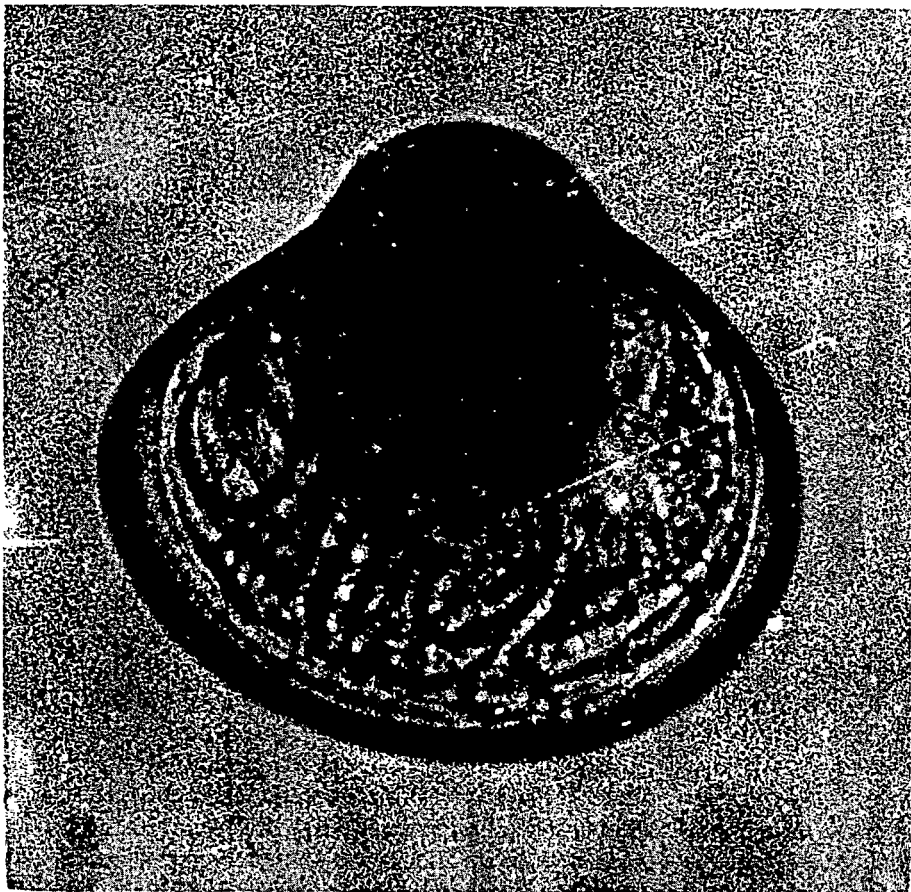
Το όστρακο σε σχήμα D των τροχοφόρων προνυμφών (κοχύλι I) είναι διάφανο με εμφανή κοκκίδια. Το υπερώϊον ιστίο και άλλα όργανα είναι βαρέως σφαιροποιημένα. Η πρόωρη προνύμφη του ευθέως κλείθρου μετρήθηκε και ο μέσος όρος ήταν 67, 5 X 52, 5μm . Μερικές από τις μεγαλύτερες προνύμφες μετρήθηκαν 72, 5 X 57, 5μm. Σ' αυτό το στάδιο φτάνει 20h 40 λεπτά μετά την γονιμοποίηση και παραμένει ως την 9η ημέρα αυξανόμενο μέχρι περίπου 100X 85μm.

Στάδιο των παλαιών τμημάτων των δίλοβων κελυφών.

Η μετάβαση από το στάδιο του ευθύ - κλείθρου στο στάδιο παλαιών τμημάτων των δίλοβων κελυφών είναι βαθμιαία και αρχίζει με το όστρακο να γίνεται στρογγυλό σε σχήμα. Όταν η λάβρα φτάνει 100 X 95 μm, μια ελαφρώς ανυψωμένη στο παλαιό τμήμα δίλοβων κελυφών περιοχή φαίνεται και το σώμα γίνεται σφαιρικό.

Το όστρακο αυξάνει με αμυδρή επιπρόσθεση στο χείλος χωρίς σημαντικές ακτινοειδείς ραβδώσεις, οι οποίες είναι χαρακτηριστικό του *prodissococh*. Το διαφανές όστρακο έχει τέσσερα δόντια και τα πεπτικά πυλωρικά τυφλά είναι κίτρινα. Το ευδιάκριτο ανυψωμένο παλαιό τμήμα των δίλοβων κελυφών (εικ. 3) φαίνεται μεταξύ των ημερών 10 και 12 όταν η λάβρα μετρήθηκε 135 X 130μm.

Μεταγενέστερα η λάβρα παραμένει σε σχήμα μυδιού με ίσιες τις δεξιές και αριστερές θυρίδες του μαλακίου ενώ γίνεται περισσότερο σφαιρική και αναπτυσσόμενη στις πτυχές του μανδύα.



ΕΙΚ-3. Στάδιο των παλαιών τμημάτων των δίλοβων κελύφων, μέγεθος 135X130μm.

Στάδιο της οφθαλμικής κηλίδας.

Την 15η ημέρα η λάβρα μετρήθηκε 210 X 190 μm και αναπτύσσει την οφθαλμική κηλίδα η οποία γίνεται βαθειά χρωματισμένη. Αυτή παραμένει ακόμα και μετά την μεταμόρφωση να είναι ορατή σε αυγά των 3, 9 mm. Η λάβρα αναπτύσσει ένα πρωτογενές πόδι και μεταγενέστερα την κτενοειδή κορυφογραμμή.

Στάδιο *pediveliger*.

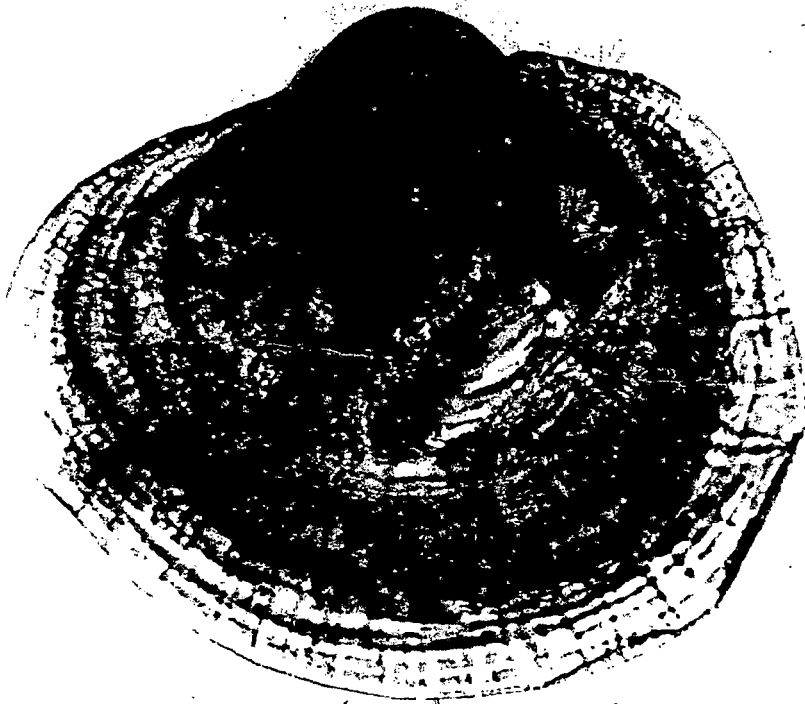
Η ανάπτυξη ενός λειτουργικού ποδιού φαίνεται την 20ή μέρα όταν η λάβρα είναι 230 X 200μm. Το υπερώϊον ιστίο σπρώχνεται στην προηγούμενη πλευρά και το υπερώϊο στέμμα αρχίζει να μαζεύει σε μέγεθος. Η λάβρα αποκτά δύο μοντέλα μετακίνησης, κολυμπώντας με βλεφαρική κίνηση του υπερώϊου ιστίου και με το να σύρεται με το πόδι. Αυτή η ευκολία κινεί την λάβρα στην εξερευνητική περιπλάνησή της κατά την διάρκεια της εγκατάστασης.

Τα νημάτια βράγχια αναπτύσσονται κατά την διάρκεια αυτού του σταδίου και σύμφωνα με το μέγεθος της λάβρας υπάρχουν 2-4 νημάτια τα οποία φαίνονται για κάθε μία πλευρά.

Plantigrade

Το *pediveliger* στην τελική του εγκατάσταση πάνω στο υπόστρωμα στο τέλος της περιπλανώμενης φάσης του μεταμορφώνεται σε μια *plantigrade* (Bayne 1976), η οποία αρχίζει να ζει μια εδραιωμένη ζωή την 22η ημέρα, όταν οι μετρήσεις είναι 250 X 240 μm . Το υπερώϊον ιστίο αποικοδομείται και εξαφανίζεται. Χειλικές κεραίες των καρκινοειδών εμφανίζονται και επιπρόσθετα νημάτια βραγχίων αναπτύσσονται. Η αύξηση του οστράκου δεν είναι με ομόκεντρες γραμμές ανάπτυξης αλλά με δημιουργία μιας πολύ λεπτής διαφανούς ομοιόμορφης μεμβράνης από αδιάλυτη ινώδη πρωτεϊνική ουσία γύρω από το σφαιρικό σε σχήμα μυδιού όστρακο εξαιρώντας την κορυφή του παλαιού τμήματος του δίλοβου κελύφους.

Το νέο όστρακο είναι τρισδιάστατο με ανώμαλες ορθογώνιες ή ωοειδείς κηλίδες. Αυτή είναι η αρχή του σχηματισμού του ενήλικου οστράκου ή το κέλυφος των τροχοφόρων προνυμφών (εικ. 4). Το έμβρυο διατηρείται σε κάθετη θέση ενώ μετακινείται. Όταν αναπτύσσεται προσκολλάται στο υπόστρωμα με το άκρο του ποδιού και δεν μπορεί εύκολα να εκτοπισθεί.



ΕΙΚ-4. Προνύμφη Μεταφοράς μεγέθους 250X240μm.

Αυγά των στρειδιών.

Η plantigrade αναπτύσσει το χαρακτηριστικό ενήλικο όστρακο και μεταμορφώνεται σ'ένα νέο αυγό των οστράκων. Η γραμμή του κλείθρου και ο βύσσος επαναλαμβάνουν το τυπικό σχήμα. Το σφαιρικό σχήμα χάνεται, με επιπλέον εναπόθεση υλικού του οστράκου το οποίο είναι λεπτό και επίπεδο. Η αριστερή θυρίδα είναι πιο κοίλη από την δεξιά θυρίδα. Τα αυγά των στρειδιών επισυνάπτονται στο υπόστρωμα με byssal νήματα και κείτονται στη μία πλευρά.

Το τυπικό αυγό *P. fucata* είναι αναγνωρισμένο με μέγεθος 330 X 300μm την 24η μέρα (εικ. 5). Τα μεγέθη και οι ημέρες που δίνονται για διαφορετικά προνυμφιακά στάδια παραπάνω είναι εκείνα τα οποία εμφανίζονται σε αρκετές καλές συγκεντρώσεις, στην εκτροφή 2 για την οποία συνεχείς παρατηρήσεις φτιάχτηκαν και οι οποίες έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα παραγωγής αυγών των οστράκων ανάμεσα στις 4 εκτροφές. Ωστόσο οι κλίμακες ήταν πλατιές. Το στάδιο των παλαιών τμημάτων των δίλοβων κελυφών φτάνει ανάμεσα στις 11 και 15 ημέρες και το στάδιο της οφθαλμικής κηλίδας ανάμεσα στις 15 και 24 ημέρες σε διαφορετικές εκτροφές. Η πιο αργή ανάπτυξη γράφηκε στο πείραμα 4.



Εικ-5. Ο νεώτερος γόνος του *Pinctada fucata* μεγέθους 330X300μm.

Προνυμφική πυκνότητα.

Η προνυμφική πυκνότητα ήταν ποικίλη στα δοχεία εκτροφής σε διαφορετικά πειράματα. Οι προνύμφες δειγματοποιήθηκαν πριν την εισαγωγή του σταδίου των ομοιόμορφων κλείθρων στα δοχεία και οι αριθμοί τους ανά ml του νερού προσδιορίστηκαν στα πειράματα 1 και 4. Στο πείραμα 1, η πυκνότητα της λάρβας ήταν 8ml σε κυλινδρικά δοχεία από γυαλί και 3 ml στις δεξαμενές από πλαστικό γυαλί και στο πείραμα 4, αυτό ήταν 10 ml και 28 ml αντιστοίχως. Μεταγενέστερες πυκνότητες δεν μπόρεσαν να υπολογιστούν.

Τροφοληψία.

Αρχίζοντας από την 1η ημέρα (24 h μετά την γονιμοποίηση), *Isochrysis galbana* δινόταν στη λάβρα καθημερινά την 15.00 h. Η μέτρηση του κυττάρου προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το αιμοσφαιριόμετρο. Σε ομαδική καλλιέργεια σε 20 lt γυάλινα Carboys, η κυτταρική πυκνότητα των ανθισμένων αλγών κυμαίνεται από $3,3 \times 10^6$ έως $7,1 \times 10^6$ κύτταρα / ml. Ικανοποιητικές ποσότητες (250 ml - 2l) προσθέτονταν στα δοχεία εκτροφής που περιείχαν τις λάβρες για να δώσουν μια ιδιαίτερη κυτταρική συγκέντρωση στα δοχεία εκτροφής. Στο πείραμα 1 η τροφική συγκέντρωση ήταν 100 κύτταρα / ml στα γυάλινα στρογγυλά δοχεία με δεδομένο ότι καταναλώνονται 12000 κύτταρα / λάβρα την ημέρα, και 80 κύτταρα / ml στις δεξαμενές από πλαστικό γυαλί δεδομένου ότι καταναλώνονται 25000 κύτταρα / λάβρα την ημέρα. Στο πείραμα 2 η συγκέντρωση ήταν 120 κύτταρα/ml στις δεξαμενές από πλαστικό γυαλί. Στο πείραμα 3 ήταν 350 κύτταρα / ml στα γυάλινα δοχεία και στο πείραμα 4 ήταν 200 κύτταρα/ml στα γυάλινα δοχεία. Σ' αυτά τα πειράματα η πραγματική κατανάλωση των φυκωδών κυττάρων δεν προσδιορίστηκε.

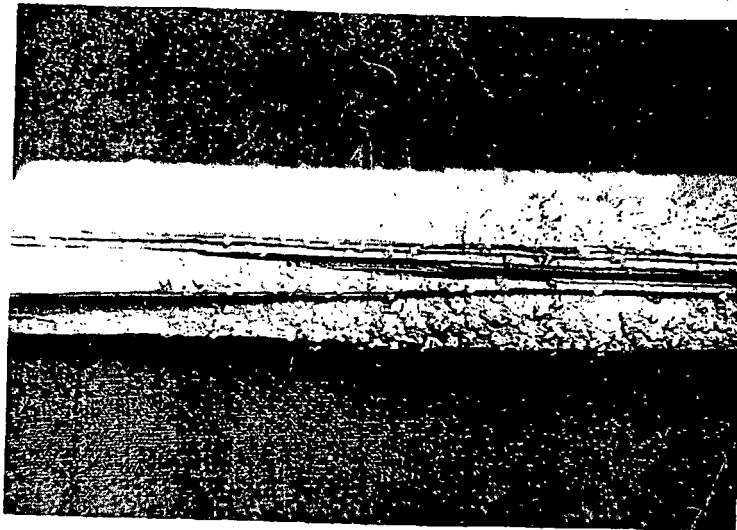
Η καθίζηση του γόνου των στρειδιών

Δοχεία από πλαστικό γυαλί κατεψυγμένα και απλοί γυάλινοι δίσκοι χρησιμοποιήθηκαν για τις συλλογές των αυγών, καθώς και ινώδη τεχνητά σχοινιά διαχωρισμένα σε ινδικό καλάμι και μίσχο φύλλου καρύδας.

Η πυκνή καθίζηση γόνου συνέβηκε στον πυθμένα της δεξαμενής από πλαστικό γυαλί και ο μέσος ρυθμός καθίζησης στις πέντε δεξαμενές στο πείραμα 1 ήταν $4,71$ γόνοι / cm^2 . Οι επάνω γωνίες της δεξαμενής επίσης έδειξαν πυκνή ωορηξία, αλλά οι πλευρές είχαν μόνο αραιές καθιζήσεις. Η ωορηξία ήταν φτωχή στον πυθμένα των δεξαμενών *perspex* και γυάλινων δοχείων με 0,75 και 0,50 αυγά/ cm αντιστοίχως. Ανάμεσα στους δίσκους το πλαστικό γυαλί δίνει τον υψηλότερο ρυθμό καθίζησης ($0,24$ cm^2) και πολύ κοντά ακολουθείται από το μπλε γυαλί ($0,23$ / cm^2)

Σε οριζόντιες κατασκευές η ανώτερη επιφάνεια των δίσκων είχε ελαφρώς υψηλότερη πυκνότητα ωοτοκίας από την χαμηλότερη επιφάνεια. Κατακόρυφες επιφάνειες έδειξαν επίσης καλή καθίζηση των αυγών.

Στην περίπτωση του διαχωρισμένου μπαμπού, η πυκνότητα ήταν μεγαλύτερη στην χαμηλότερη κοίλη επιφάνεια απ' ό,τι στην κυρτή επιφάνεια. Ο μίσχος του φύλλου της καρύδας έδειξε πυκνό αποικισμό (εικ. 6). Τα συνθετικά σχοινιά που χρησιμοποιήθηκαν για την υποστήριξη των δίσκων έδωσαν επίσης ικανοποιητικά αποτελέσματα.



Εικ-6. Πυκνός αποικισμός του γόνου των στρειδιών σένα κομάτι μίσχου ή φύλλου καρύδας στην δεξαμενή εκτροφής.

Ανάπτυξη της Προνύμφης.

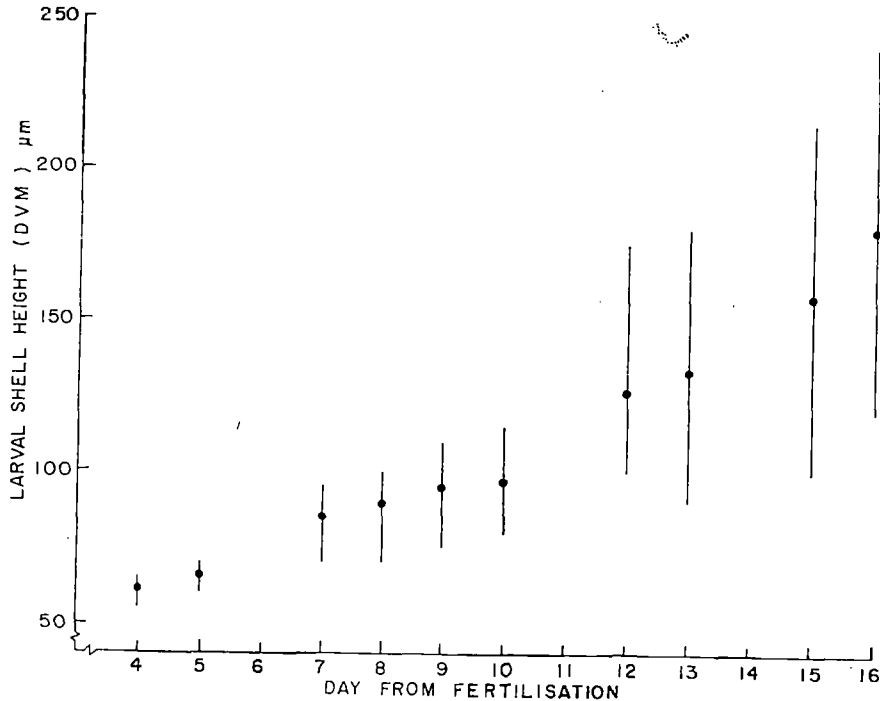
Η σχέση ανάμεσα στο μήκος του προνυμφικού οστράκου (APM) και ύψους του οστράκου (DVM) είναι γραμμική και περιγράφεται από την εξίσωση

$$y = 1.924 + 1,07x \text{ με } r = 0,976$$

όπου y συμβολίζει APM και το x το DVM σε μm εικ. 7, η οποία περιγράφει την αύξηση της λάρβας μέχρι την 16η ημέρα. Από το D όστρακο (ημέρα 1) το στάδιο των παλαιών τμημάτων των δίλοβων κελυφών (12η ημέρα), οι λάβρες αυξήθηκαν από το μέσο μέγεθος των 52,5 μm έως το 126,0 μm , με μέσο όρο αύξησης το 6,7 μm / ημέρα. Την 16η ημέρα το μέσο μέγεθος όλων των λάβρων ήταν 178,9 μm και η οφθαλμική προνύμφη ήταν 208,3 μm , η αύξηση ήταν 13,2 μm / ημέρα και 20,6 μm / ημέρα αντιστοίχως ανάμεσα στην 12η ημέρα και στην 16η ημέρα *pediveliger* σε 230 X 200 μm εμφανίστηκαν την 20ή μέρα *plantigrade* των 250 X 240 μm την 22η ημέρα και τα νέα αυγά των στρειδιών σε 330 X 300 μm την 24η μέρα.

Υπήρχε διαφορετική αύξηση της λάρβας για κάθε ομάδα. Για παράδειγμα την 24η ημέρα υπήρχε οφθαλμική προνύμφη (μέσος όρος DVM

200,0/μm), (pediveliger 217,5 μm), plantigrade (289,5μm) και αυγά των στρειδιών στην ίδια δεξαμενή.



EIK-7. Η αύξηση της *Pinctada fucata* προνύμφης μέχρι την 16η ημέρα απο την γονιμοποίηση. Η γραμμή αποικονίζει την κλίμακα του DVM και η κουκκίδα το μέσο μέγεθος. Τα στοιχεία είναι από το πείραμα 2 της σειράς.

Αύξηση του γόνου

Η καμπύλη της αύξησης φαίνεται στην εικ.8. Τα μέσα ύψη του οστράκου παραστάθηκαν γραφικά για 13 εβδομάδες αρχίζοντας από το μέγεθος 0,37 mm την 10η Οκτωβρίου 1981. Τα σχέδια έδειξαν ένα καμπυλόγραμμο σχήμα. Μετά τον λογαριθμικό μετασχηματισμό η γραμμική σχέση βρέθηκε να είναι:

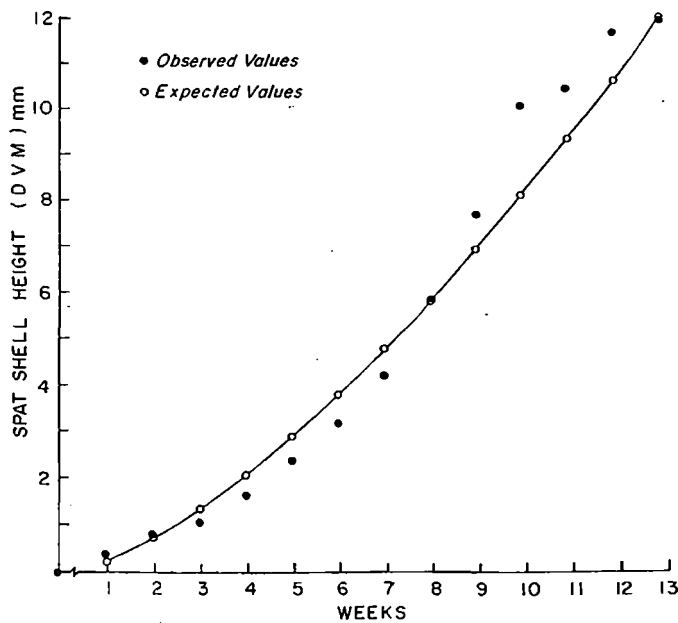
$$\log_e y = \log_e a + b \log_e x$$

όπου y συμβολίζει το ύψος του οστράκου σε mm και x συμβολίζει τις εβδομάδες. Αυτή η γραμμική σχέση είχε υψηλό συσχετισμό με $r=0,987$

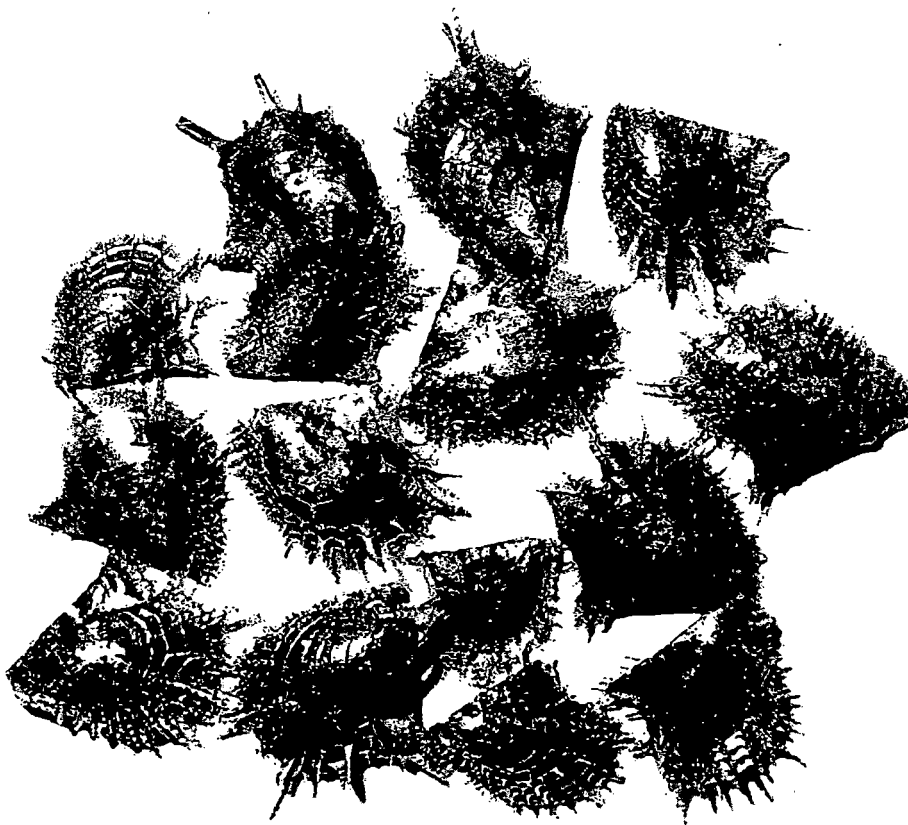
Μετασχηματίζοντας αυτό στην αρχική μορφή η προερχόμενη εξίσωση βρέθηκε να είναι

$$y = 0,26995 \times 1.47529^{(εκθέτης)}$$

Ο γόνος των στρειδιών γύρω στους 3 μήνες με εκτεταμένες διαδικασίες αύξησης του οστράκου και χαρακτηριστική φυσική χρωμάτωση φαίνεται στην εικόνα 9.



ΕΙΚ-8. Η αύξηση του γόνου του *Pinctada fucata* στο εργαστήριο για 13 εβδομάδες από τις 10 Οκτωβρίου 1981.



ΕΙΚ-9. Νεώτερο μαργαριτοφόρο στρείδι, 3-μήνες παλιό προηγούμενο με τεχνητή τροφή.

4.4. Συζήτηση - Συμπέρασμα

Οι προνύμφες πολλών εύκρατων και υποτροπικών ειδών των δίθυρων οστράκων έχουν επιτυχημένα εκτραφεί στο εργαστήριο. Ο Herdman (1903) μελέτησε την πρώιμη ιστορία της ζωής του *Pinctada fucata* μέχρι την 3η ημέρα και γεφύρωσε το στάδιο, με επιπλέον στάδια της προνύμφης στα οποία είχαν εξασφαλιστεί από το πλαγκτόν.

Ο Cahn (1949) εξασφάλισε ανεπαρκείς πληροφορίες για την ανάπτυξη της προνύμφης *Pinctada martensii* και *Pinctada maxima*.

Οι Ιαπωνικές εργασίες σχετίζονται με την εισαγωγή της ωορηξίας, την τεχνητή γονιμοποίηση και την πρόωρη ανάπτυξη (Kobayashi 1948, Wada 1953, Wada 1961). Η εκτροφή του *Pinctada maxima* αποπειράθηκε από τον Minnaur (1969). Η παρούσα περίπτωση εξασφάλισε λεπτομερή περιγραφή της επιτυχίας στην τεχνική εκτροφή του μαργαριτοφόρου στρειδιού *Pinctada fucata* στις τροπικές περιοχές. Οι Ιαπωνέζοι εργάτες διαίρεσαν τα στάδια των προνυμφών του *Pinctada fucata* σε πρώιμο σχήμα (72 X 60 mm), D σχήμα (76 X 65 mm), τμήμα των παλαιών δίλοβων κελυφών (84 X 73 mm), (96 X 87 mm) και το στάδιο της ώριμης πλήρης ανάπτυξης (209 X 195mm) και αυτά τα στάδια προσεγγίζονται αντιστοίχως σε 20 h την ημέρα 2, 5, 8 και 25.

Ο Ota (1957) παρατήρησε την χρωστική ουσία (οφθαλμική κηλίδα) στο τελευταίο στάδιο του παλαιού τμήματος του δίλοβου κελύφους όπου το μήκος του οστράκου ήταν 170 - 200 μm. Βρήκε επίσης την σύνδεση του γόνου των στρειδιών σε μήκος οστράκου 200 - 250 μm με μέσο όρο του οστράκου της κλίμακας 214, 52 - +1, 09 μm. Ο πιο πρώιμος γόνος των στρειδιών έχει μέγεθος 330 X 300 μm. Σύμφωνα με τον Minnaur (1969) το πρόωρο ευθύ κλείθρο, προνύμφη του *Pinctada maxima* μετρήθηκε περίπου 75 X 70 μm 5 ημερών, 96 X 87 μm 12 ημερών και τα παλαιά τμήματα του δίλοβου κελύφους 125 X 112 μm.

Το στάδιο *pediveliger* το έφτασαν μετά τις 14 - 20 ημέρες περίπου στο μέγεθος των 130 X 110 μm. Αυτός δεν παρατήρησε καμία οφθαλμική κηλίδα του *Pinctada maxima*. Παρόλα που οι προνύμφες του *Pinctada maxima* εκτράφηκαν πέρα από τις 30 μέρες με ποικίλα περιβαντολογικά υποστρώματα, τα *pediveliger* (180 X 160 μm) δεν ολοκλήρωσαν την μεταμόρφωση.

Συνήθως το θαλασσινό νερό είναι φιλτραρισμένο ειδικά για την απομάκρυνση μικρών μορίων των 3, 2 μm και επίσης γίνεται χρήση υπεριώδους φωτός και αντιβιοτικών για την εξόντωση των βακτηρίων.

Μεμονωμένοι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει διαφορετικές προνυμφικές πυκνότητες στα πειράματα εκτροφής. Ο Miskikawa (1971) χρησιμοποίησε μια πυκνότητα των 0,3 - 0,5 ml και ο Walne (1974) 1,3/ml. Ο Minnaur (1969) τάισε τις προνύμφες του *Pinctada maxima* με διάφορα φυκώδη είδη σε μια πυκνότητα των 100 κυττάρων / ml. Οι προνύμφες του

Pinctada fucata ταΐστηκαν με *Monochrysis lutheri*, *Chaetoceros calcitrans*, *Clorella* sp σε περίπου ίσους αριθμούς για κάθε είδος. Στην παρούσα περίπτωση το *I. galbana* δόθηκε στις straight hinge προνύμφες σε συγκέντρωση 80 - 120 κύτταρα / ml μολονότι η υψηλότερη συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκε σε ορισμένες ημέρες. Η συγκέντρωση αυτή με τις τροφικές συγκεντρώσεις που είναι σχεδόν ίσες που χρησιμοποιήθηκαν από τον Minnaur (1969) και τον Walne (1974) αλλά ήταν πολύ υψηλότερη από εκείνη που χρησιμοποιήθηκε από τον Wada(1973).

Παρόλα αυτά η κρίσιμη συγκέντρωση του κυττάρου παραμένει για να υπολογισθεί για τα διαφορετικά στάδια, όπως επίσης η χρήση ανάμεικτων ειδών από φύκη. Η επιβραδυνόμενη μεταμόρφωση των διθυρων προνυμφών είναι συνήθως συσχετισμένα με το πλήθος, την αναλογία και τη θερμοκρασία. Το μήκος της λάρβας συσχετίζεται με την περιβαντολογική θερμοκρασία και την αλατότητα. Η καθίζηση είναι και αυτή συσχετισμένη με την θερμοκρασία και την αλατότητα.

Αποδεικνύεται ότι μαζί με τις άλλες μεταβλητές η χαμηλότερη θερμοκρασία και η αλατότητα μπορεί να παρατείνει την προνυμφική φάση του *Pinctada fucata* και να προκαλέσει καθυστέρηση στην καθίζηση.-

BIBΛIOΓPAΦIA

K. ALAGARSWAMI, S. PHARMARAS, A. CHELLAM and T. S. VELAYUPHAN

"LARVAL and JUVENILE REARING OF BLACK - LIP PEARL OYSTER, PINCTADA MARGARITIFERA (LINNAEUS)"

AQUACULTURE 76 (1989) 43 - 56

DIRAR H. NASR

"OBSERVATIONS ON THE MORTALITY OF THE PEARL OYSTER, PINCTADA MARGARITIFERA, IN DONGONAB BAY, RED SEA"

AQUACULTURE 28 (1982) 271 -281

ΣΤΑΥΡΟΣ ΧΑΤΖΗΦΩΤΗΣ

"ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΜΑΡΓΑΡΙΤΑΡΙΩΝ"

ΑΛΕΥΤΙΚΑ ΝΕΑ - ΙΟΥΛΙΟΣ - ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 1995

R. A. ROSE R. E DYBDAHL AND HARDERS

"REPRODUCTIVE CYCLE OF THE WESTERN AUSTRALIAN SILVERPLIP PEARL OYSTER PINCTADA MAXIMA (JAMESON) (MOLLUSCA : PTERIIDAE)"

JOURNAL OF SHELLFISH RESEARCH VOL 9 No 2, 261 - 272 , 1990

D. A. PASS, R. DYBRAHL and M. M. MANNION

"INVESTIGATIOIS INTO THE CAUSES OF MORTALITY OF THE PEARL OYSTER PINCTADA MAXIMA (JAMESON) IN WESTERN AUSTRALIA"

AQUACULTURE GS (1987) 149 - 169.

K. ALAGARSWAMI, S. PHARMARAS, T. S. VELAYUPHAN, A CHELLAM, AC. C. VICTOR and A. D. GAHDNI

"LARVAL REARING AND PRODUCTION OF SPAT PEARL OYSTER PINCTADA FUCATA (GOULD)"

AQUACULTURE 34 (1983) 287 - 301

Τσιαμπάος Παναγιώτης 1997

"Σημειώσεις Υδατοκαλλιεργειών I Γενικά"

ΤΕΙ ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ

Τσιαμπάος Παναγιώτης 1997

"Σημειώσεις Υδατοκαλλιεργειών II Γενικά"

ΤΕΙ ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ

Τσιαμπάος Παναγιώτης 1997

"Σημειώσεις Υδατοκαλλιεργειών Ασπονδύλων "

ΤΕΙ ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ.