

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU

ODJEL ZA AKVAKULTURU

DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Ana Ljubičić

**Stimulacija mrješćenja brlavice *Venus verrucosa* (Linnaeus, 1758)
temperaturnim i osmotskim šokom**

DIPLOMSKI RAD

Mentor: doc. dr. sc. Jurica Jug Dujaković

Dubrovnik, 2010.

Ovaj diplomski rad izrađen je pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Jurice Jug-Dujakovića, u sklopu diplomskog studija Marikultura na Odjelu za akvakulturu Sveučilišta u Dubrovniku. Rad je izveden u prostorima Sveučilišta u Dubrovniku i Tehnološko i poslovno inovacijskog centra za marikulturu - MARIBIC, Bistrina, Ston.

Zahvaljujem svom mentoru, doc. dr. sc. Jurici Jug-Dujakoviću i centru MARIBIC na ostvarenju svih uvjeta potrebnih za izvedbu ovog diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem mr. sc. Ani Gavrilović na stručnim savjetima i pomoći pri izvođenju rada.

Veliko hvala obitelji Matković na redovitom pribavljanju uzoraka.

Ovaj rad je za Z i F.

SADRŽAJ:

1. UVOD	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2. BRBAVICA, <i>VENUS VERRUCOSA</i> (LINNAEUS, 1758).....	3
2.1. STANIŠTE I RASPROSTRANJENOST	3
2.2. OSNOVNE MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE	4
2.3. REPRODUKTIVNI SUSTAV I REPRODUKCIJA	5
2.4. KONTROLIRANA REPRODUKCIJA.....	8
2.6. OPLODNJA I UZGOJ LIČINKI	12
3.1. ORGANIZACIJA UZORKOVANJA U SVRHU PRAĆENJA PRIRODNOG REPRODUKTIVNOG CIKLUSA I ODABIRA MATIČNOG STOKA.....	15
3.2. PRAĆENJE REPRODUKTIVNOG CIKLUSA	16
3.2.1. <i>Izrada otiska tkiva gonada.....</i>	16
3.2.2. <i>Određivanje indeksa kondicije i gonadnog indeksa.....</i>	17
3.3. ODABIR MATIČNOG STOKA I STIMULACIJA MRJEŠĆENJA	18
4. REZULTATI.....	22
4.1. HIDROGRAFSKI PARAMETRI	22
4.2. PRAĆENJE REPRODUKTIVNOG CIKLUSA	24
4.2.1. <i>Otisci tkiva gonada.....</i>	24
4.2.2. <i>Indeks kondicije i gonadni indeks.....</i>	25
4.3. STIMULACIJA MRJEŠĆENJA	27
5. RASPRAVA	34
6. ZAKLJUČAK.....	40
LITERATURA.....	41

SAŽETAK

Stimulacija mrješćenja brbavice *Venus verrucosa* (Linnaeus, 1758) temperaturnim i osmotskim šokom

Brbavica *Venus verrucosa* (Linnaeus, 1758) komercijalno je značajna vrsta školjkaša i cijenjena delikatesa na području Mediterana. Usprkos visokoj cijeni i potražnji na tržištu, još uvijek nije uvedena u akvakulturnu proizvodnju. Naime, uspješna tehnologija kontrolirane reprodukcije još uvijek ne postoji. Kako bi se izradom otisaka tkiva i kvantitaivnim metodama (indeks kondicije i gonadni indeks) utvrdio najpogodniji trenutak za prikupljanje matičnog stoka i stimulaciju mrješćenja obavljeno je uzorkovanje jedinki iz prirodne populacije u razdoblju lipanj-rujan. Na osnovi navedenih rezultata matični stok za pokus prikupljen je u uvali Bistrina početkom rujna 2008. U ovom su radu ispitane tri različite tehnike stimulacije mrješćenja: temperaturni, hipoosmotski i hiperosmotski šokovi. Metoda temperaturnih šokova obavljana je naizmjeničnim izmjenama hladne (15°C) i tople morske vode (25 , 28 i 30°C), dok je stimulacija mrješćenja osmotskim šokovima provedena na dva načina (izmjenom ambijentalne i hiposaline sredine i izmjenom ambijentalne i hipersaline sredine). Do mrješćenja je došlo u sve tri tretirane skupine. Izmriještene su ukupno 33 jedinke, što predstavlja 36,6% od 90 ukupno tretiranih. Od toga su izmriještene 22 mužjaka, odnosno 24,4% od ukupno tretiranih jedinki i 11 ženki, odnosno 12,2% od ukupno tretiranih jedinki. Najbolji rezultati postignuti su primjenom temperaturnih šokova kada je izmriješteno 63,3% od ukupnog broja tretitanih jedinki te skupine, a najlošiji pri tretmanu hiperosmotskim šokovima pomoću kojih je izmriješteno 10% od ukupnog broja tretiranih jedinki te skupine. Zadovoljavajuće rezultate dala je metoda stimulacije hipoosmotskim šokovima kojom je izmriješteno 36,7% od ukupnog broja tretitanih jedinki te skupine. Rezultati Student t - testa pokazali su da između metoda temperaturnih i hipoosmotskih šokova ne postoji statistički značajna razlika ($p>0,05$), dok je usporedba obje navedene metode s

rezultatima hiperosmotskih šokova pokazala postojanje statistički značajnih razlika ($p<0,05$).

Ključne riječi: brlavica / *Venus verrucosa* / reprodukcija / stimulacija mrješćenja

ABSTRACT

Stimulation of spawning of warty venus, *Venus verrucosa*, (Linnaeus, 1758) by temperature and osmotic shock

The warty venus, *Venus verrucosa*, (Linnaeus, 1758) is known as a high market value clam species in the Mediterranean. In spite of its commercial value, this species has not been produced aquaculturally. Successful technology for artificial production, from induced spawning to spat production, still does not exist. In order to determine the best time for the collection of broodstock and stimulation of spawning, specimens from natural populations in the Bistrina Bay were sampled monthly from June to September. The gonadal development was determined by taking a tissue smear, and by calculating the condition and gonadal index. According to these results the broodstock was collected in the beginning of September 2008. This paper describes and compares three different techniques of spawning stimulation: thermal shock, and hypo and hyperosmotic shock. The method of thermal shock was applied by subsequent changes of cold (15°C) and warm (25, 28 i 30°C) sea water. Stimulation with osmotic shock was applied in two ways, by exchanging ambient and hyposaline environment, and ambient and hypersaline environment. Spawning was successfully obtained with all three described techniques. All together 33 spawners, or 36,6%, were counted from 90 treated specimens. From that number we counted 22 male spawners (24,4%), and 11 female spawners (12,2%). Spawning induced by temperature shock gave the best results with 63,3% of spawners from the total number specimens stimulated by this method. The lowest number of spawners, only 10%, was counted in the group stimulated by hyperosmotic shock. Satisfactory results were obtained in the group stimulated by hypoosmotic shock where 36,7% of spawners were counted from the total number of treated specimens in this group. By using Student t-test no statistically significant difference in the number of spawning individuals was found between groups treated with temperature shock and

hypoosmotic shock ($p>0,05$), but significant difference was found between the group treated with hyperosmotic shock and other two groups ($p<0,05$).

Key words: warty venus / *Venus verrucosa* / reproduction / induced spawning

1. UVOD

Uzgoj školjkaša važna je i brzo rastuća grana akvakulture, koja je u 2000. godini s 14 mil. tona predstavljala oko 20% ukupne proizvodnje ovog sektora (Helm i Bourne, 2004). Većina proizvodnje zasnovana je na osiguranju mlađi iz prirodnih populacija te se ubrzano približava ili je već prešla granicu održivog prinosa. Naime, obnova prirodnih naselja iz godine u godinu je sve neizvjesnija zbog prelova, izlovljavanja spolno nezrelih jedinki, devastacije staništa kao i populacija uporabom određenih ribolovnih alata (dredge i sl.) (Gaspar i sur., 2002; 2003). Rješenje problema rastuće potražnje poglavito za 'sjemenom' vrsta od visoke tržišne vrijednosti poput kućica, kamenica i kapica, jesu komercijalna mrijestilišta školjkaša. Razvoj mrijestilišta započeo je u Europi i SAD-u 60-ih godina prošlog stoljeća. Od tada do danas znanje o biološkim potrebama brojnih vrsta koje dominiraju svjetskom akvakulturom, kao i o tehnologiji potrebnoj za njihovu proizvodnju znatno je poraslo te se i dalje usavršava. Navedeno omogućava stalni porast proizvodnje ovih organizama i ujedno predstavlja osnovu za uvođenje novih vrsta u uzgoj (Helm i Bourne, 2004). Primjerice, svjetska je akvakulturna proizvodnja kućica u 2006. godini iznosila 4 310 488 tona s vrijednošću $4\ 054\ 145 \times 10^3$ US\$, dok je iste godine izlovljeno 738 845 tona (FAO, 2007a). U Europi se iz porodice Veneridae najviše uzgajaju europska kućica *Tapes decussatus* (Linnaeus, 1758) i filipinska kućica *Tapes philippinarum* (Adams i Reeve, 1850). Njihova je proizvodnja u 2007. godini na ovom kontinentu iznosila 70 703 tone, pri čemu je glavnina proizvedena u Italiji (61 829 tona). Pored navedene dvije vrste kućica, samo se u Španjolskoj od 2003. uzgaja i brbavica *Venus Verrucosa* (Linnaeus, 1758), čija proizvodnja iznosi svega jednu tonu godišnje (FAO, 2007b).

Meso brbavice je na tržištu vrlo cijenjeno obzirom da se zbog svoje kvalitete smatra izuzetnom delikatesom. Pored cijene, o tome svjedoči i talijanski naziv 'Tartuffo di mare' – morski tartuf (Turolla i Rossi, 2004).

Prema statistici FAO-a akvakulturna proizvodnja brbavice u Španjolskoj donosi 15 000 US\$ godišnje, odnosno 15 US\$/kg. U Hrvatskoj, gdje također predstavlja autohtonu vrstu, na tržnicama se prodaje za 70-80 kn, ali se u restoranima taj iznos zna i utrostručiti. Iako je s ekonomskog stajališta vrlo pogodan

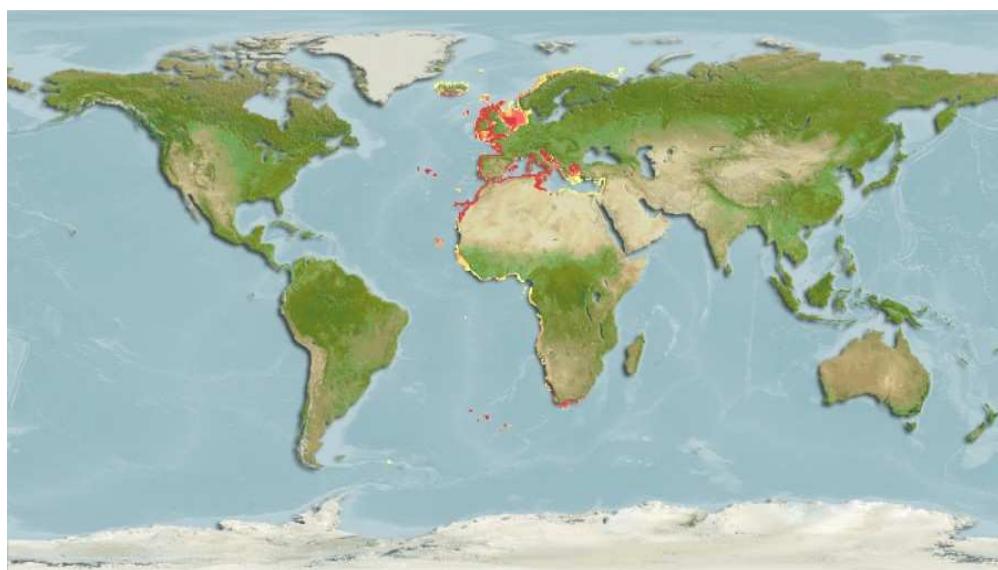
kandidat za marikulturu, do danas se na tom području postiglo vrlo malo uspjeha te standardizirana metoda kontrolirane proizvodnje još ne postoji (Barbin i sur., 2003; Siniscalchi i sur., 2004; Gavrilović i sur., 2009). Obzirom na potražnju i visoku tržišnu vrijednost, u Italiji (Rossi i sur., 1994; Turolla i Rossi, 2004), Španjolskoj (Roya i Gómez-Ramaldo, 2002) i Hrvatskoj provode se istraživanja na unapređenju tehnologija kontrolirane reprodukcije brbavice (Jug-Dujaković i sur., 2009; Gavrilović i sur., 2009; Gavrilović i sur., 2010).

Cilj je i ovog rada također doprinijeti spoznajama o metodama induciranih mrješćenja brbavice komparacijom uspješnosti dvije različite metode indukcije – temperaturnih i osmotskih šokova.

2. BRBAVICA, *Venus verrucosa* (Linnaeus, 1758)

2.1. Stanište i rasprostranjenost

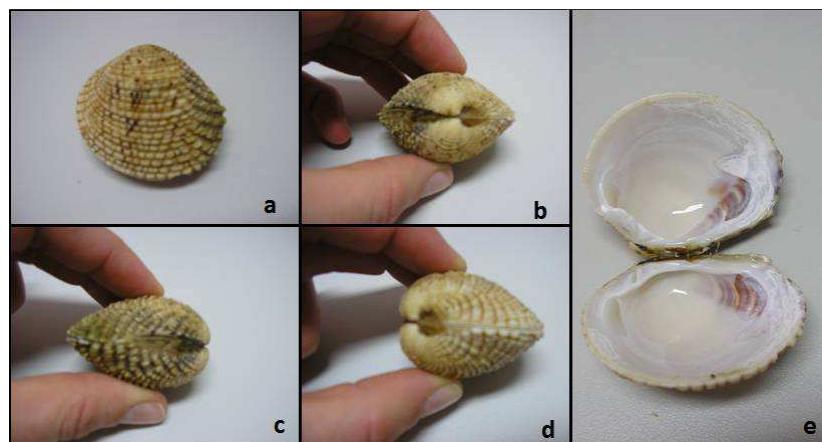
Brbavica ili prnjavica *V. verrucosa* je školjkaš iz porodice Veneridae (ladinke). Rasprostranjen je na suptropskim područjima duž atlantske obale od Norveške do Južnoafričke republike i čitavom Mediteranu (Slika 1). Nastanjuje gruba pješčana dna, ponekad rodolitna područja i prolaze između livada *Posidonia oceanica* do 30 m dubine (Arneri i sur., 1998; Tirado i sur., 2003). U Jadranu se redovito nalazi na područjima gdje stjenovita obala prodire u pješčano dno, ponekad i na šljunkovitom dnu, a najbrojnija je na područjima pod utjecajem slatkih voda. Živi ukopan u sedimentu (Grubišić, 1979; Zavodnik i Šimunović, 1997; Trigu i sur., 2005). Jestiv je i zato komercijalno značajna vrsta. Izlovljava se obično ručno - ronjenjem te povlačnim ribolovnim alatima (dređe). U Hrvatskoj se godišnje izlovi tri do četiri tone (Grubišić, 1979; Zavodnik i Šimunović, 1997).



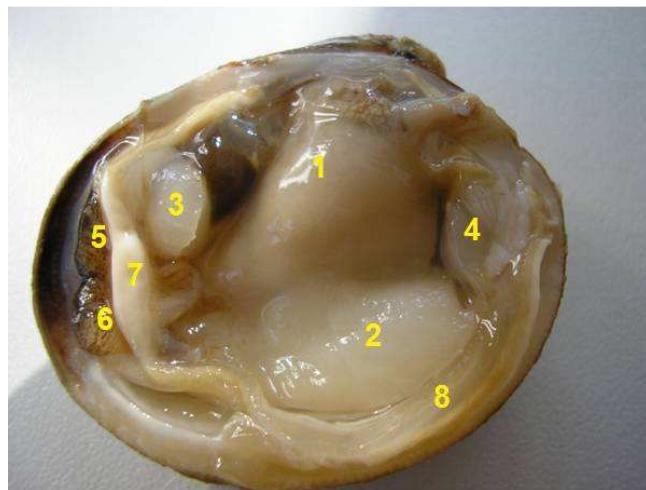
Slika 1. Rasprostranjenost brbavice (Izvor: <http://www.aquamaps.org>).

2.2. Osnovne morfološke karakteristike

Brbavica je okruglasto sročikog oblika, čvrste građe, asimetrična, prljavobijele do smeđe boje. Ljuštute su jednake sa stražnjim krajem blago izduženim (Slika 2a), umbo globoidan, izražen i zakriven prema naprijed (Slika 2b i d). Skulptura ljuštura sastoji se od jako izraženih koncentričnih nabora koji na leđnom dijelu i stražnjem rubu prelaze u bradavice (Slika 2a i c) po kojima je i dobila engleski naziv Warty venus – engl: wart – bradavica. Uz koncentrične nabora mogu se uočiti i radikalna rebra koja površinu ljuštute čine nazubljenom (Slika 2a). Unutrašnja strana je glatka i bijela, a područje oko stražnjeg mišića aduktora i duž palijalnog sinusa kod nekih je jedinki ljubičasto (Slika 2e). Brava obje ljuštute ima tri kardinalna zubića, dok se četvrti nalazi anteriorno samo na lijevoj. Unutrašnji rub ljuštute također je blago nazubljen (Zavodnik i Šimunović, 1997; Marguš, 1998; Turolla i Rossi, 2004). Najduža osovina rijetko prelazi 70 mm, prosječno 35 do 50 mm, (Turolla i Rossi, 2004). Tirado i sur. (2003) su u Španjolskoj pronašli jedinke veličine 76 mm. Hervat i sur. (2006) utvrdili su u sjevernom Jadranu kod Pule maksimalnu dužinu od 52 mm i procijenili starost na 11,5 godina. Istraživanjem provedenim na jugozapadnoj obali Jadrana i u Grčkoj Arneri i sur. (1998) utvrdili su pri dužini 50 mm starost približno 9 godina, a pronađene su i jedinke stare 15-16 godina.



Slika 2. Ljuštura brbavice, vanjska i unutarnja građa. (foto: Ana Ljubičić)



Slika 3. Unutarnja građa brlavice: 1- gonade ispod kojih je smještena probavna žlijezda; 2 - stopalo; 3 - stražnji mišić zatvarač; 4 - prednji mišić zatvarač; 5 - izlazni sifon; 6 - ulazni sifon; 7 - plašt; 8 – škrge (foto: Ana Ljubičić)

Kao i kod drugih ladičkih osnovne anatomske karakteristike brlavice su dobro razvijeno stopalo kojim se ukopava u sediment, te dva sifona – ulazni i izlazni kroz koje crpi vodu te se na taj način hrani i izbacuje ekskretorne produkte, pseudofeces i gamete. Ima dva jednaka mišića zatvarača (isomyaria), plašt je na vanjskom rubu zadebljao. Gonade su parne, smještene posteriorno na bazi stopala i obavijaju probavnu žlijezdu (Slika 3) (Ojea i sur., 2004; Turolla i Rossi, 2004).

2.3. Reproaktivni sustav i reprodukcija

Reproaktivni sustav svih školjkaša je vrlo jednostavne građe. Parne gonade sastoje se od razgranatih tubula koji formiraju kanaliće vodeći u kratki gonodukt koji se otvara u plaštanu šupljinu u blizini nefridiopora (Gosling, 2003). Kod brlavice, kao i kod većine školjkaša, spolni dimorfizam nije izražen. Obično se u populaciji nalazi jednak broj mužjaka i ženki. Budući da se spol ne može utvrditi prema vanjskim obilježjima, jedini način utvrđivanja bez žrtvovanja jedinke jest promatranje otpuštanja gameta (Gosling, 2003; Tirado i sur., 2003; Turolla i Rossi, 2004).

Gonade se kod školjkaša kontinuirano razvijaju kroz nekoliko faza (mirovanje, razvoj, zrele, djelomično izmriještene, izmriještene), a kada su zrele čine značajan dio tjelesne mase školjkaša. Gamete se, osim kod larviparnih vrsta, otpuštaju u vodenu sredinu kroz izlazni otvor plaštane šupljine odnosno sifon. Nakon ispuštanja gameta dolazi do oplodnje u vanjskoj sredini (Helm i Bourne, 2004). Svi školjkaši prolaze godišnji reproduktivni ciklus koji uključuje razdoblje gametogeneze nakon kojeg slijedi mrješćenje. Ovisno o vrsti, geografskom području i ambijentalnim uvjetima do tog procesa dolazi jednom ili više puta godišnje (Iglesias i sur., 1996; Avendano i Le Pennec, 1997). Nakon toga slijedi kratko razdoblje mirovanja i potom ponovno započinje gametogeneza. Cijeli proces je energetski vrlo zahtjevan. Tijekom godišnjeg ciklusa nutrijenti se skladište kada je hrana obilna i dostupna, a gonadna aktivnost minimalna. Glavna pričuvna tvar za gametogenezu je glikogen. Kod mužjaka se iz primarnih spermatogonija nizom mitotičkih dioba razvijaju sekundarne spermatogonije. Mejotičkom diobom iz njih nastaju spermatocite, a od njih spermiji (veličine 25-60 µm). Kod ženki iz primarnih oogonija nastaju sekundarne iz kojih će se mejotičkom diobom razviti oocite, no mejoza se zaustavlja u profazi I i nastaviti će se nakon oplodnje. Oocite rastu do 120 µm, ovisno o vrsti i prolaze fazu vitelogeneze tijekom koje se u njima akumuliraju hranjive tvari za embrionalni razvoj (Gosling, 2003).

Kod većine školjkaša spolno sazrijevanje ovisi više o veličini organizma, nego njegovoj starosti (Helm i Bourne, 2004), a veličina i vrijeme sazrijevanja o vrsti i geografskoj rasprostranjenosti (Chávez-Villalba i sur., 2002; Helm i Bourne, 2004). Prema Turolla i Rossi (2004) brlavice spolnu zrelost dostižu kod veličine 27,7 mm. Temperatura, količina i kvaliteta hrane glavni su okidači gametogeneze (Martínez i sur., 2000; Chávez-Villalba i sur., 2002; Helm i Bourne, 2004; Nevejan i sur., 2008; Pronker i sur., 2008; Matias i sur., 2009). Temperatura inicira gametogenezu, a dostupnost hrane utječe na fekunditet i kvalitetu jaja (Heasman i sur., 1996; Utting i Millican, 1997; Pronker i sur., 2008). Promjene slanosti i temperature, u fazi zrelih gonada, iniciraju mrješćenje (Turolla i Rossi, 2004; Rueda i sur., 2005). Jednom kad proces mrješćenja počne, prisutnost gameta u vodi potiče i druge jedinke da se mrijeste (Gosling, 2003). Utjecaj okolišnih promjena na godišnji reproduktivni ciklus i

njihova direktna veza s razvojem gonada razlikuje se od vrste do vrste i među različitim populacijama iste vrste, ovisno o geografskom položaju i eventualnim genetskim različitostima pa se jedinke iste vrste mogu mrijestiti u različitim periodima (Chávez-Villalba i sur., 2002, Turolla i Rossi, 2004; Magnesen i Christoffersen, 2008). S toga se podaci o vremenu mrješćenja brlavice u različitim dijelovima Europe razlikuju. Prema Marano i sur. (1982) brlavica se u talijanskom dijelu južnog Jadrana mrijesti od srpnja do listopada, dok Valli i sur., (1988) navode da u Tršćanskem zaljevu do toga dolazi u razdoblju od travnja do rujna. U Španjolskoj su Royo i Gómez Rambaldo (2002) utvrdili dva razdoblja mrješćenja – proljeće i jesen. Brlavica se u hrvatskom dijelu Jadrana prema Grubišiću (1979) mrijesti krajem proljeća i ljeti, dok su Gavrilović i sur. (2009) prateći stanje gonada u Malostonskom zaljevu tijekom ljeta utvrdili da se to događa krajem kolovoza i početkom rujna.

Nakon ispuštanja zrelih spolnih produkata u vanjsku sredinu odvija se oplodnja, nakon čega se završava mejotička dioba zaustavljena u profazi I tijekom gametogeneze. U prvom satu se, ukoliko je oplodnja uspješna, razvijaju dva polarna tijela te slijedi nekoliko brzih mitotičkih dioba (Gosling, 2003; Helm i Bourne, 2004; Turolla i Rossi, 2004). Kroz 24 sata oplođena jajna stanica prolazi stadije blastule i gastrule, formiraju se cilije i embrio počinje plivati. Nakon 24 do 36 sati razvija se ličinka trohofora veličine 60-80 µm, ovalnog oblika, a red cilija na središnjem dijelu i dugački apikalni bič omogućuju joj plivanje i samostalno održavanje u vodenom stupcu. Rani ličinački stadij naziva se Prodissoconch I ili D stadij zbog oblika ljušturice koja se tada razvija. Ličinke su u toj fazi veličine 80-100 µm (Helm i Bourne, 2004). Imaju razvijeni probavni sustav i velum (cilijarni organ koji služi za plivanje i hranjenje) te se još nazivaju i veliger ličinke. Tijekom otprilike tjedan dana, ovisno o uvjetima sredine, razvija se umbo (ispupčenje ljuštture blizu brave). Kako ličinke rastu umbo postaje sve izraženiji i taj se stadij naziva Prodissoconch II. Ove su ličinke različitih oblika po kojem je moguće razlikovati vrste školjkaša u planktonu (Helm i Bourne, 2004). Pred metamorfozu razvija se stopalo s cilijama i očne pjege, fotosenzibilan organ koji služi za orijentaciju (Gosling, 2003; Helm i Bourne, 2004; Turolla i Rossi, 2004). Taj stadij, u kojem je veličina ličinke obično 200-330 µm naziva se pediveliger (eyed pediveliger) (Helm i Bourne, 2004; Turolla i Rossi, 2004).

Pediveliger ličinke su negativno fototaksične te se postupno spuštaju kroz stupac vode prema dnu gdje aktivno istražuju supstrat, pužu i ispituju čestice koristeći stopalo. Kako još uvijek imaju velum ponekad ponovno otplivaju dalje i tako nekoliko puta dok ne nađu odgovarajuću podlogu na koju će sjesti. Ličinke mogu odgoditi prihvat i nekoliko tjedana ako im supstart ne odgovara. Sve vrste kućica sjedaju na zrnce pijeska ili drugi sličan supstrat pomoću tanke bisusne niti. Glavna je funkcija bisusne niti da drži jedinku u uspravnom položaju i sprječava kotrljanje. Kako rastu i dobivaju na težini kućice gube bisus, iako ga neke manje i lakše vrste mogu zadržati čitav život (Gosling, 2003).

Metamorfoza je kritična faza u životu školjkaša. Gubi se mogućnost pokretanja, luči se dissoconch ljuštura, a organi se reorganiziraju i razvijaju, te jedinke dobivaju morfološka i anatomska obilježja adultnih primjeraka svoje vrste. Ova faza traje nekoliko dana tijekom kojih se ličinka ne hrani, već koristi pričuvu prikupljenu tijekom planktonskog života. Metamorfozom završava planktonski i počinje bentoski (sedentarni) način života (Gosling, 2003).

2.4. Kontrolirana reprodukcija

Kontrolirana reprodukcija sve je više zastupljena u uzgoju školjkaša, jer se na taj način u mrijestilištu osigurava dostatna količina mlađi za komercijalnu proizvodnju. Na ovaj način moguće je također uzgojiti mlađi i izvan sezone prirodnog reproduktivnog ciklusa. Tehnike kontrolirane reprodukcije variraju ovisno o vrsti školjkaša, no potpuno kontrolirani proces generalno se sastoji od: selekcije i kondicioniranja matičnog stoka, stimulacije mrješćenja, oplodnje i inkubacije jaja te ličinačkog i postličinačkog uzgoja (Helm i Bourne, 2004; Turolla i Rossi, 2004).

Osnovni početni korak za uspješnost kontroliranog procesa mrješćenja školjkaša predstavlja izbor kvalitetnog matičnog stoka. Obzirom da je fekunditet veći kod većih jedinki, potrebno je odabrati što veće odrasle jedinke (Utting i Spencer, 1991). Vrlo je važno po izlovu smanjiti bilo kakav daljnji stres koji bi se mogao

negativno odraziti na fiziološko stanje odabranih organizama. Također je poželjno matice ostaviti 2-3 dana da se aklimatiziraju na laboratorijske uvjete, te da se uklone uginule jedinke i one lošije kondicije (Turolla i Rossi, 2004).

Ukoliko izlovljeni stok nije u sezoni mrješćenja, potrebno ga je kondicionirati u pogonu za kondicioniranje. Glavni čimbenici koji utječu na sazrijevanje gonada u kontroliranim uvjetima su kvalitetna hrana i povoljni uvjeti sredine. Manipulacijom ovim čimbenicima moguće je dobiti zreli stok prije nego gametogeneza u prirodi uopće počne. Primjenom takvog postupka moguće je u mrijestilištu uspostaviti proces mrješćenja tijekom cijele godine (Utting i Spencer, 1991; Turolla i Rossi, 2004; Jug -Dujaković i sur., 2009; Matias i sur., 2009).

Tijekom kondicioniranja prati se stanje gonada, kako bi se utvrdio najpovoljniji trenutak za induciranje mrješćenja. Postoji nekoliko metoda, pri čemu najpouzdaniju predstavlja izrada histoloških preparata gonada. Na ovaj se način može utvrditi točna razvojna faza, međutim to je skup i dugotrajan postupak. Izrada otisaka (razmazi) tkiva gonada i njihov mikroskopski pregled alternativna je metoda koja se najčešće koristi (Helm i Bourne, 2004). Pored navedenih kvalitativnih metoda, ponekad se koriste kvantitativne metode: određivanje gonadnog indeksa i indeksa kondicije. Gonadni indeks (gonadosomatski indeks) ukazuje na zrelost gonada budući da predstavlja odnos između mase gonada i mase ostalog tkiva (Helm i Bourne, 2004). Indeks kondicije je postotak količine mesa koje zauzima prostor između ljuštura školjkaša (Marguš, 1985). Također može biti pokazatelj zrelosti jer varira sezonski - tijekom pohrane hranjivih tvari i gametogeneze raste, a opada nakon mrijesta (Gosling, 2003).

Sve metode procjene imaju svoje prednosti i mane, stoga je dobro kombinirati bar jednu kvalitativnu i neku od kvantitativnih metoda (Gosling, 2003).

2.5. Stimulacija mrješćenja

Stimulacija mrješćenja je postupak kojim se u komercijalnim mrijestilištima kondicionirani ili izlovljeni zreli školjkaši potiču na otpuštanje gameta kao odgovor na

odgovarajući podražaj. To se čini zato što školjkaši uz iznimku kamenica vrste iz rodova *Ostrea* i *Tiostrea* ne mogu dati vijabilne gamete takozvanim cijeđenjem (engl.: stripping) gonada, već one moraju proći fazu sazrijevanja¹ tijekom prolaska kroz gonodukt da bi mogle biti uspješno oplođene (Utting i Spencer, 1991; Helm i Bourne, 2004).

Uobičajeni stimulansi koji se koriste mogu se podijeliti na:

- fizičke (temperaturni šok, osmotski šok, UV zračenje i dr.),
- kemijske (primjena serotonina, vodikova peroksida, kalijeva klorida i dr.),
- biološke (dodavanje gameta ili fitoplanktona u medij) i
- mehaničke (vibracije) (Turolla i Rossi, 2004).

Najuspješniji su oni tretmani kod kojih je stres minimalan i preživljavanje matica nakon mrijesta maksimalno. Najčešće se iz ekonomskih razloga i tehničke jednostavnosti koristi temperaturni šok. Induciranje se obavlja podizanjem temperature za nekoliko stupnjeva ili izmjenama tople i hladne vode u trajanju 30 min do 1 sat po ciklusu. Broj izmjena ovisi o zrelosti gameta i spremnosti jedinki na mrješćenje koje može početi i tijekom hladnog i tijekom toplog tretmana, a najčešće se prvi mrijeste mužjaci (Utting i Spencer, 1991; Helm i Bourne, 2004). Podaci o uspjehu pojedinih metoda induciranja mrijesta se u literaturi razlikuju čak i za istu vrstu školjkaša. Tako Utting i Spencer (1991) i Helm i Bourne (2004) navode da uporaba serotonina i drugih kemijskih stimulansa često daje manje vijabilna jaja od onih dobivenih toplinskim stresom. Za razliku od prethodno navedenih autora, Turolla i Rossi (2004) su primijenili nekoliko različitih metoda (temperaturni šok, kemijsku indukciju vodik peroksidom i kalij kloridom te injektiranje serotonina) za induciranje mrješćenja brlavice, pri čemu su uspjeh postigli jedino injektiranjem serotonina.

¹ GVBD - germinal vesicle breakdown – hormonski regulirano kod nekih vrsta školjkaša - mejoza se tijekom mrijesta nastavlja od profaze I do metafaze I, ponovno zaustavlja i završit će se po oplodnjci (Fong i sur., 1997, Osada, 1998; Hamida i sur., 2004).

Rossi i sur. (1994) u pokusu su indukcije mrijesta brlavice upotrijebili tri metode (gladovanje u trajanju 24, 48 i 62 sata; temperaturne šokove pri čemu su korištene izmjene temperature između 20°C i 30°C; te kombinaciju izmjene temperature i pH, pri čemu je raspon pH iznosio 6,8-9,2, a temperature kao i kod temperaturnih šokova), s tim da se samo metoda temperaturnih šokova pokazala uspješnom. Naime, izmrijestilo se ukupno 12,6% tretiranih jedinki. Royo i Gómez Rambaldo (2002) su za indukciju mrijesta kod ove vrste kućice u Španjolskoj koristili također tri metode: držanje jedinki na zraku 18-20 sati, temperaturne šokove i dodavanje sperme u otopinu. Pokusi su provođeni na kondicioniranim jedinkama tijekom cijele godine. Kao najuspješnija se pokazala metoda držanja jedinki na zraku, i to samo u razdoblju prirodnog mrješćenja brlavice na ovom prostoru (proljeće i jesen). Gavrilović i sur. (2009) i Gavrilović i sur. (2010) su kod malostonske brlavice primijenili dvije metode stimulacije mrješćenja: temperaturne šokove i injektiranje serotonina. Obje su se metode pokazale uspješnim. Postotak izmriještenih jedinki primjenom temperaturnih šokova bio je nešto veći (57% i 52%), ali se nije statistički značajno razlikovao od onog nastalog primjenom serotonina (47% i 48%).

Dužina trajanja induciranja ovisi o zrelosti gameta i spremnosti jedinke na mrijest. Prema Helm i Bourne (2004) matični stok svih školjkaša je potrebno vratiti na ponovno kondicioniranje ukoliko mrješćenje ne započne nakon trosatnog tretmana. Za razliku od prethodno rečenog, Utting i Spencer (1991) navode da je jedinke kućica potrebno vratiti na kondicioniranje još tjedan dana ukoliko do mrješćenja nije došlo nakon šest sati od početka tretmana. No tijekom pripreme matica za indukciju mrješćenja ili nakon njihovog povratka na ponovno kondicioniranje nakon neuspješnog procesa potrebno je voditi računa i o spontanom mrješćenju (Gavrilović i Jug-Dujaković, usmeno priopćenje). Naime, to je česta pojava kod izlova školjkaša spremnih za mrješćenje. Kao posljedica stresa pri izlovu, sortiranja, transporta, čišćenja i sl., školjkaši se izmrijeste po ponovnom uranjanju u vodu (Turolla i Rossi, 2004). Brojni autori navode porast temperature (obično iznad 20°C) kao poznati stimulans za mrješćenje školjkaša, a isto je utvrđeno i za pad slanosti morske vode (Jackson i Ogburn, 1999). To se može dogoditi odmah kroz nekoliko sati, ili čak idući dan i nije predvidivo. Oplodnju je u takvim slučajevima nemoguće kontrolirati te se

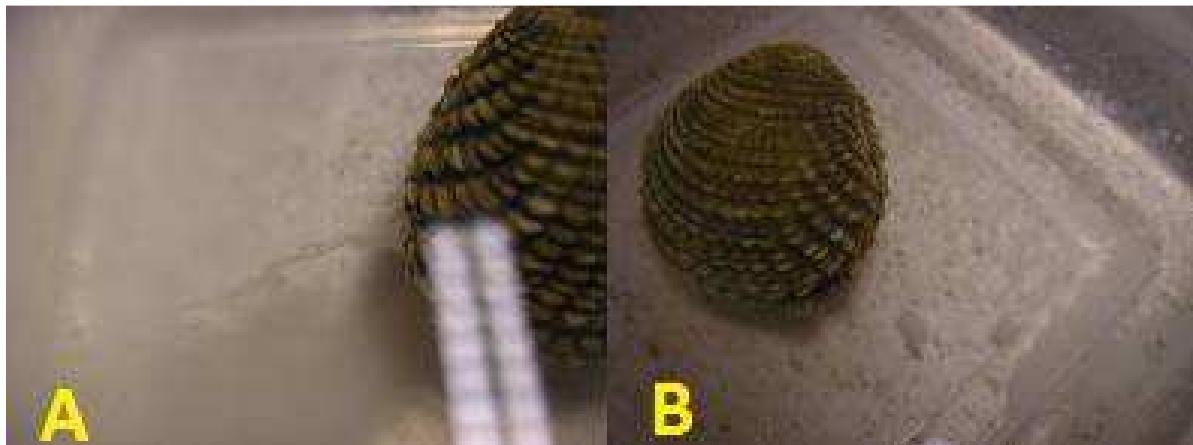
zbog velike koncentracije muških gameta i pojave polispermije razvijaju deformirane ličinke koje ne mogu metamorfozirati. Ovaj fenomen dosta je čest u proljetnim i ljetnim mjesecima u centrima za purifikaciju školjkaša (Turolla i Rossi, 2004). Kako bi se ova neželjena pojava sprječila Jackson i Ogburn (1999) predlažu kao mjeru opreza za depuracijske centre, uz strogu kontrolu temperature i povećanje saliniteta za 10-20%, što učinkovito inhibira mrješćenje školjkaša.

2.6. Oplodnja i uzgoj ličinki

Kad proces mrješćenja započne potrebno je odvajati jedinke u čiste zasebne posude kako ne bi došlo do prijevremene oplodnje i pojave polispermije. Na ovaj način je ujedno moguće mikroskopskim pregledom procijeniti kvalitetu jaja i sperme svakog individualnog školjkaša. Mužjake se može prepoznati po tankom mlijekočnom mlazu koji ispuštaju (Slika 4A) za razliku od ženki koje jaja ispuštaju u grudicama ili je mlaz granuliran (Slika 4B). Otpuštanje gameta pojedinog školjkaša varijabilno je, ali rijetko traje duže od 15 minuta (Utting i Spencer, 1991). Po završetku procesa mrješćenja, kvalitetna jaja svih ženki puliraju se te uz lagano miješanje oplode malom količinom sperme (2 ml na litru suspenzije jaja) prikupljene od nekoliko različitih mužjaka radi bolje genetičke raznolikosti (Utting i Spencer, 1991; Timmermans i sur., 1996; Helm i Bourne, 2004; da Costa i sur., 2008). Preporučljivo je koristiti spermu mužjaka koji su se posljednji mrijestili, jer sperma brzo stari i ako je starija od sat vremena može uzrokovati slabiju oplodnju (Utting i Spencer, 1991; O'Connor, 1995).

Nakon tridesetak minuta uspješnost oplodnje procjenjuje se mikroskopskim pregledom jaja. Ukoliko je oplodnja uspješna uočavaju se polarna tijela na rubovima, a nakon 60 do 90 minuta i prve diobe. Jaja se tada ispiru od ostatka sperme i eventualnih nečistoća, broje te naseljavaju u inkubacijske tankove u filtriranu morsku vodu i uz konstantnu aeraciju (Utting i Spencer, 1991; Helm i Bourne, 2004; Turolla i Rossi, 2004). Ovisno o vrsti školjkaša D-ličinke se razviju za jedan do nekoliko dana

(Helm i Bourne, 2004). D ličinke brbavice razviju se za 24 (Rossi i sur., 1994; Turolla i sur., 2004) do 48 sati (Royo i Gómez Rambaldo, 2002; Gavrilović i sur., 2009).



Slika 4. A) mrijest mužjaka, tanki mlaz sperme; B) mrijest ženke, oocite u hrpicama.
(foto:MARIBIC).

Ličinke se mogu uzgajati u različitim kapacitetima ovisno o broju. U prvim danima može se održavati dosta visoka gustoća nasada (10 ličinki/ml) te se postupno smanjivati kako se bliži metamorfoza (5 pediveliger ličinki/ml). Hrane se dva puta dnevno mješavinom mikroalgi i to sa minimalno dvije vrste od kojih je jedna kremenjašica a druga bičašica, iako je poželjno kombinirati više vrsta. Količina hrane ovisi o dnevnoj potrošnji, a optimalna koncentracija za sve školjkaše prema Helm i Bourne (2004) iznosi 100 stanica/ μl *Isochrysis* ekvivalenta. Prema Turolla i Rossi (2004) koji nisu računali *Isochrysis* ekvivalent, ukupna količina hrane ne bi smjela prelaziti 10-15 stanica/ μl za ličinke brbavice, a daje im se dva puta dnevno.

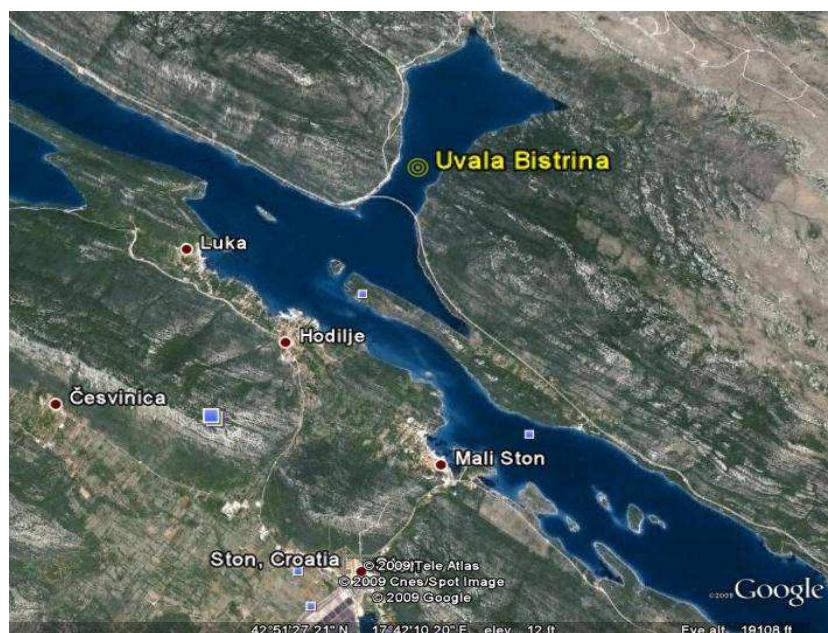
Pred metamorfozu razvijaju se očna pjega i stopalo, ličinke kućica se zadržavaju pri dnu tankova i tada ih je potrebno prebaciti u down-welling sustav. Kroz 5-7 dana 70-75% ličinki završi metamorfozu, dok ostatak ugiba (Utting i Spencer, 1991). Postličinački uzgoj brbavica su Turolla i Rossi (2004) nastavili prvih 45 dana u

down-welling sustavu, a potom su jedinke prebacili narednih 120 dana u up-welling sustav.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Organizacija uzorkovanja u svrhu praćenja prirodnog reproduktivnog ciklusa i odabira matičnog stoka

Uzorkovanje brlavica s ciljem praćenja prirodnog reproduktivnog ciklusa i odabira matičnog stoka koje će poslužiti za pokus stimulacije mrješćenja, obavljeno je od lipnja do rujna 2008. godine u uvali Bistrina (Slika 5). Bistrina je relativno plitka uvala (maksimalna dubina: 12m) s tipičnim obilježjima akvatorija Malostonskog zaljeva kojeg karakteriziraju jake morske struje, podvodni izvori slatke vode (vrulje) te obilna i konstantna sedimentacija koja utječe na formiranje pješčano-muljevitog dna (Šimunović, 1981). Zbog dotoka slatke vode velika je koncentracija nutrijenata te je cijeli zaljev umjereno eutroficiran sustav (Vukadin, 1981; Carić i sur., 1992).



Slika 5. Područje uzorkovanja – Uvala Bistrina 42°51'27.21" N; 17°42'10.20" E.

Izvor: Google Earth.

Krajem svakog mjeseca ronjenjem je izlovljeno 65 jedinki približno jednake veličine, od čega je po 30 korišteno za određivanje indeksa kondicije i gonadnog

indeksa, dok su se na pet primjeraka izrađivali otisci tkiva. Navedene analize su obavljene neposredno nakon uzorkovanja, kako bi se od zrelih primjeraka brbavice spremnih za proces mrješćenja blagovremeno moglo pristupiti prikupljanju i selekcioniranju matičnog stoka (100 jedinki). Na mjestu sakupljanja školjkaša mjereni su i osnovni hidrografski parametri u pridnenom sloju vodenog stupca. Uzorkovanje se obavljalo Niskin crpcem, a temperatura i slanost morske vode mjereni su prijenosnom sondom model WTW Cond 315i/SET. Količina otopljenog kisika (koncentracija i postotak zasićenosti) određivana prijenosnom sondom OxyGuard Handy Polaris model H01P.

3.2. Praćenje reproduktivnog ciklusa

3.2.1. Izrada otiska tkiva gonada

Jedinke su neposredno nakon uzorkovanja otvarane, potom su odvajani plašt i škrge te gonade na najdebljem dijelu zarezane skalpelom (Slika 6). Napravljen je razmaz gonadnog tkiva i pregledan svjetlosnim mikroskopom pri povećanju 10 i 40x. Mjerena je veličina oocita i promatran položaj jezgre.



Slika 6. Priprema otiska gonadnog tkiva; a) otvorena jedinka sa uklonjenim plaštom i škrngama radi dostupnosti gonade (g); b) gonada zarezana skalpelom i uzet uzorak gonadnog tkiva. (foto: MARIBIC).

3.2.2. Određivanje indeksa kondicije i gonadnog indeksa

Uzorci brlavica isprani su od pijeska i mulja te potom posušeni upijajućim papirom (staničevina). Jedinke su označene rednim brojem i svakoj su pomičnom mjerkom uzete osnovne biometrijske mjere dužine, visine i debljine. Na analitičkoj vagi izmjerena je mokra masa cijelog školjkaša. Primjeri brlavice su zatim otvoreni i tkivo u potpunosti odvojeno od ljuštura. Nakon cijeđenja na staničevini izvagane su mokra masa ljuštura i mokra masa tkiva.

Indeks kondicije

Za određivanje indeksa kondicije ljuštura i tkivo sušeni su u plastičnim vatrostalnim posudicama u sušioniku na 105°C do konstantne mase. Zatim je izvagana suha masa ljuštura i tkiva te izračunati:

- indeks kondicije (IC) po Mannu (1978) gdje je:

$$\mathbf{IC = masa suhog mesa / masa suhe ljuštura \times 1000}$$

- indeks kondicije prema Park i sur. (2006) gdje je:

$$\mathbf{IC = masa suhog mesa / dužina ljuštura (mm)^3 \times 10^3}$$

Gonadni indeks kondicije

Budući se gonada brlavice ne može u cjelini odvojiti od ostatka tkiva odnosno od probavne žljezde uzorci su obrađeni prema metodologiji Ojea i sur. (2004). Gonada je zajedno s probavnom žljezdom (gonado-visceralno tkivo - GV) odvojena od stopala i ostatka tkiva. Izmjerena je masa GV i masa preostalog tkiva. U vatrostalnim plastičnim posudicama tkivo je sušeno do konstantne suhe mase. Izmjerena je suha masa GV te masa ostatka tkiva i ljuštura. Gonadni indeks kondicije dobijen je iz formule:

$$\text{GIC} = \frac{\text{suhu masa GV}}{\text{masa suhe ljuštura}} \times 100$$

Pored navedene metode, gonadni indeks kondicije računat je i prema Darriba i sur. (2004) po formuli:

$$\text{GIC} = \frac{\text{masa mokre gonade (GV)}}{\text{masa suhe ljuštura}}$$

3.3. Odabir matičnog stoka i stimulacija mrješćenja

Početkom rujna od izlovljenih primjeraka brlavice formiran je matični stok, pri čemu je selektirano 100 većih, približno jednakih jedinki spremnih za stimulaciju mrješćenja. Jedinke su ostavljene u mreži na dubini od jednog metra, temperaturi 20°C i ambijentalnom salinitetu tijekom 24 sata, da se očiste od pijeska i zbog eventualnog mehaničkog stresa uzrokovanih mortaliteta. Zatim su očetkane, isprane slatkom vodom, podijeljene u 3 skupine po 30 komada (deset komada ostavljeno je za pričuvu, ukoliko se kod pojedinih životinja pojave znaci loše kondicije, ili dođe do eventualnih uginuća prije induciranja mrješćenja). Ovako pripremljen matični stok, ostavljen je preko noći u filtriranoj (filter promjera pet mikrometara) i UV steriliziranoj morskoj vodi u tankovima volumena 15 l uz blagu aeraciju na ambijentalnoj temperaturi i salinitetu. Pripremljena su četiri tamno obojena tanka volumena pet litara za stimulaciju mrješćenja metodom osmotskog stresa te jedan za stimulaciju metodom temperturnih šokova. Pored navedenoga, pripremljene su i očišćene prozirne posudice od 500 ml za odvajanje jedinki koje su započele proces mrješćenja. Neposredno prije tretmana jedinke su ostavljene na suhom da bi se potaknula filtracija po ponovnom uranjanju (Turolla i Rossi, 2004). Kod prvih znakova neugode (oko sat vremena na suhom), kao što je otvaranje ljuštura (škljocanje, pucketanje) podvrgnute su tretmanu.

Metoda temperturnih šokova obavljana je na način da je otprilike svakih sat vremena u tank sa školjkašima dodavana zagrijana, odnosno ohlađena filtrirana

morska voda. Jedinke su prvo stavljene u vodu temperature 15 °C, koja je nakon sat vremena zamijenjena morem temperature 25°C. Tijekom sljedećih izmjena, minimalna tempertura je i dalje bila 15°C, dok je temperatura tople vode povećana na 28, a potom na 30°C.

Metoda stimulacije mrješćenja osmotskim šokovima provedena je na dva načina:

- 1) izmjenom ambijentalne i hiposaline sredine
- 2) izmjenom ambijentalne i hipersaline sredine

U obje metode jedinke su premiještane iz tanka s morem ambijentalne slanosti u tank sa smanjenom ili povećanom slanosti i obratno. Slanost je povećavana dodavanjem otopine krupne morske soli, pri čemu se u početku koristila sredina sa slanosti većom od ambijentalne za 10%, a potom je ova razlika povećana na 20 i na kraju na 30%. Smanjenje slanosti postiglo se dodavanjem destilirane vode, pri čemu je u početku korištena 10% niža slanost, da bi u narednim ciklusima bila smanjena za 20, te potom 30%. Premještanje jedinki iz ambijentalne u hipo ili hipersalinu sredinu obavljano je svakih 60 do 90 minuta. Tretmani su ponavljani sve do pojave početka mrješćenja.

Jedinke koje su se počele mrijestiti odvajane su u zasebne prozirne posude (Slika 7). Potom su gamete mikroskopski pregledane, kako bi se utvrdila kvaliteta (sferičnost jaja i pokretljivost spermatozoa) i spol. Za svaku jedinku je zapisano vrijeme početka mrješćenja. Kvalitetna jaja svih ženki (iz svih tretiranih skupina) po završetku mrješćenja su pulirana i isprana svježom filtriranom morskom vodom (temperatura 21°C; ambijentalna slanost) kroz sito promjera pora 70 µm. Oplodnja je obavljena mješavinom kvalitetne sperme prikupljene od pet mužjaka koji su se posljednji mrijestili (do sat vremena pred oplodnjom), u posudi volumena 10 l s dva mililitra sperme u litri suspenzije jaja. Nakon 30 minuta pregledan je uzorak kako bi se utvrdila uspješnost oplodnje. Oplođene jajne stanice su potom isprane filtriranim

morskom vodom kroz sito promjera pora $20\text{ }\mu\text{m}$ da se uklone ostaci sperme podložne bakterijskoj razgradnji. Zigote su stavljenе na inkubaciju u posudu volumena 15 l uz blagu aeraciju pri temperaturi od 21°C .



Slika 7. Mrješćenje brbavice, jedinke su odvojene u zasebne posude radi procjene kvalitete gameta i da se izbjegne prijevremena oplodnja i polispermija. (foto: MARIBIC).

Matični stok odvojen je po skupinama (za svaki tretman posebno: izmriještene, neizmriještene, muške i ženske jedinke) u posude volumena 15 l uz blagu aeraciju. Voda je u posudama mijenjana dva puta dnevno. Prva dva dana nakon mrješćenja jedinke nisu hranjene, a potom im je jednom dnevno davana mješavina četiri vrste

mikroalgi. Promatrane su narednih 15 dana kako bi se utvrdili eventualni naknadno mrješćenje i/ili stresom uzrokovana smrtnost.

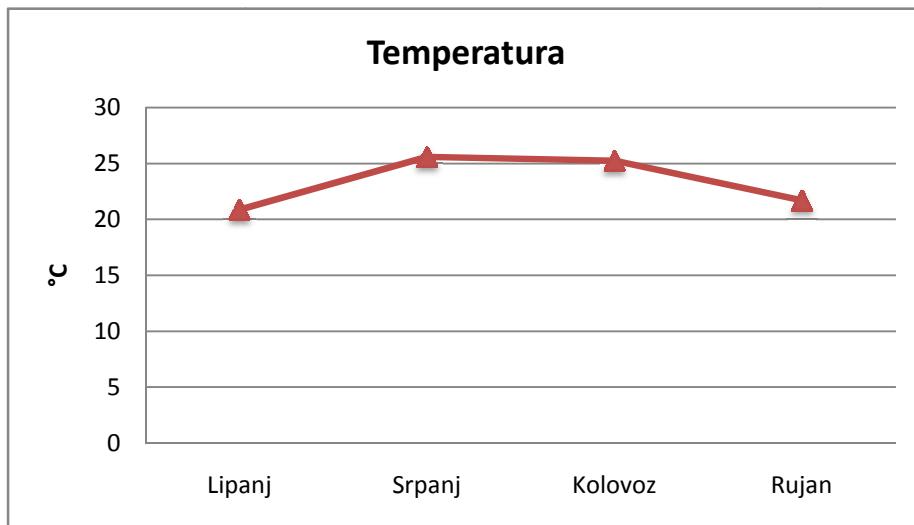
Ličinke (konc. 10 kom/ml) su uzgajane u stacionarnom sustavu volumena 500 l s potpunom izmjenom vode svaki drugi dan, na temperaturi $21\pm1^{\circ}\text{C}$ i ambijentalnom salinitetu do metamorfoze. Hranjene su dva puta dnevno mješavinom mikroalgi: *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros müller*, *Cylindrotheca closterium* i *Tetraselmis suecica* u koncentraciji 100 st/ μl *Isochrysis* ekvivalenta (Helm i Bourne, 2004).

Svi su podaci obrađeni u MSXL-u. Izračunata je Pearsonova korelacija između indeksa kondicije i gonadnog indeksa te hidrografskih parametara. Student t-testom utvrđene su razlike između pojedinih metoda stimulacije procesa mrješćenja.

4. REZULTATI

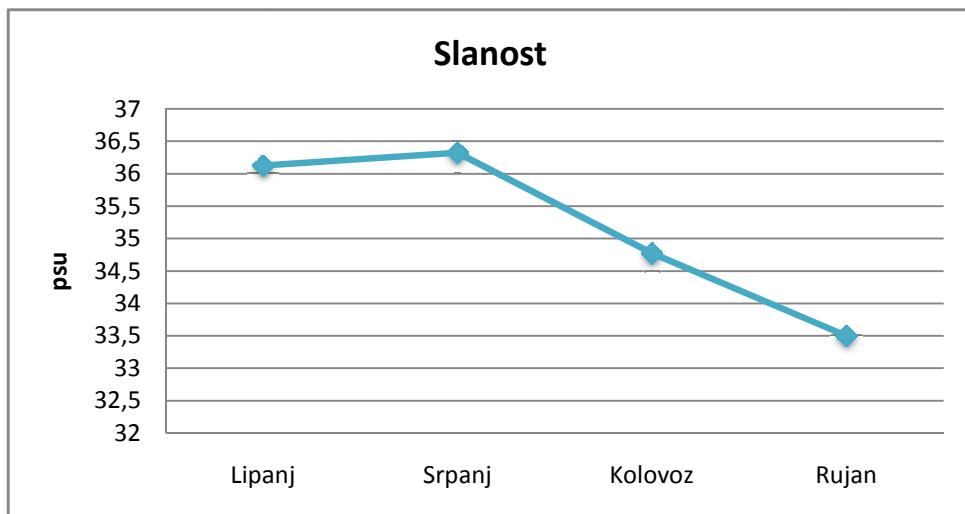
4.1. Hidrografski parametri

Mjesečne promjene temperature u pridnenom sloju vodenog stupca prikazane su na slici 8. Najniža temperatura ($20,8^{\circ}\text{C}$) zabilježena je u lipnju, a najviša ($25,6^{\circ}\text{C}$) u srpnju.



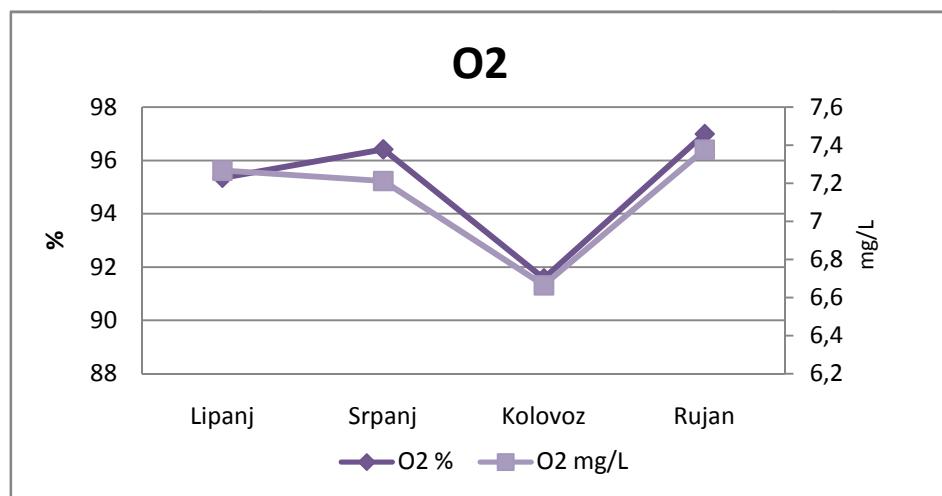
Slika 8. Mjesečne promjene temperature u pridnenom sloju u uvali Bistrina tijekom razdoblja lipanj – rujan 2008. god.

Mjesečne promjene slanosti u pridnenom sloju vodenog stupca prikazane su na slici 9. Najviša slanost 36,3 psu zabilježena je u srpnju, a najniža 33,5 psu u rujnu. Na slici je jasno vidljiv kontinuirani pad slanosti od srpnja do rujna.



Slika 9. Mjesečne promjene slanosti u pridnenom sloju u uvali Bistrina tijekom razdoblja lipanj – rujan 2008. god.

Mjesečne promjene količine kisika (postotak zasićenosti i koncentracija otopljenog kisika) u pridnenom sloju vodenog stupca prikazane su na slici 10. Nisu utvrđena značajnija kolebanja tijekom cijelog razdoblja uzorkovanja. Najniže vrijednosti oba parametra utvrđene su u kolovozu (postotak zasićenosti 91,57%, koncentracija otopljenog kisika 6,66 mg/l), a najviše u rujnu (97,05% i 7,37 mg/l)

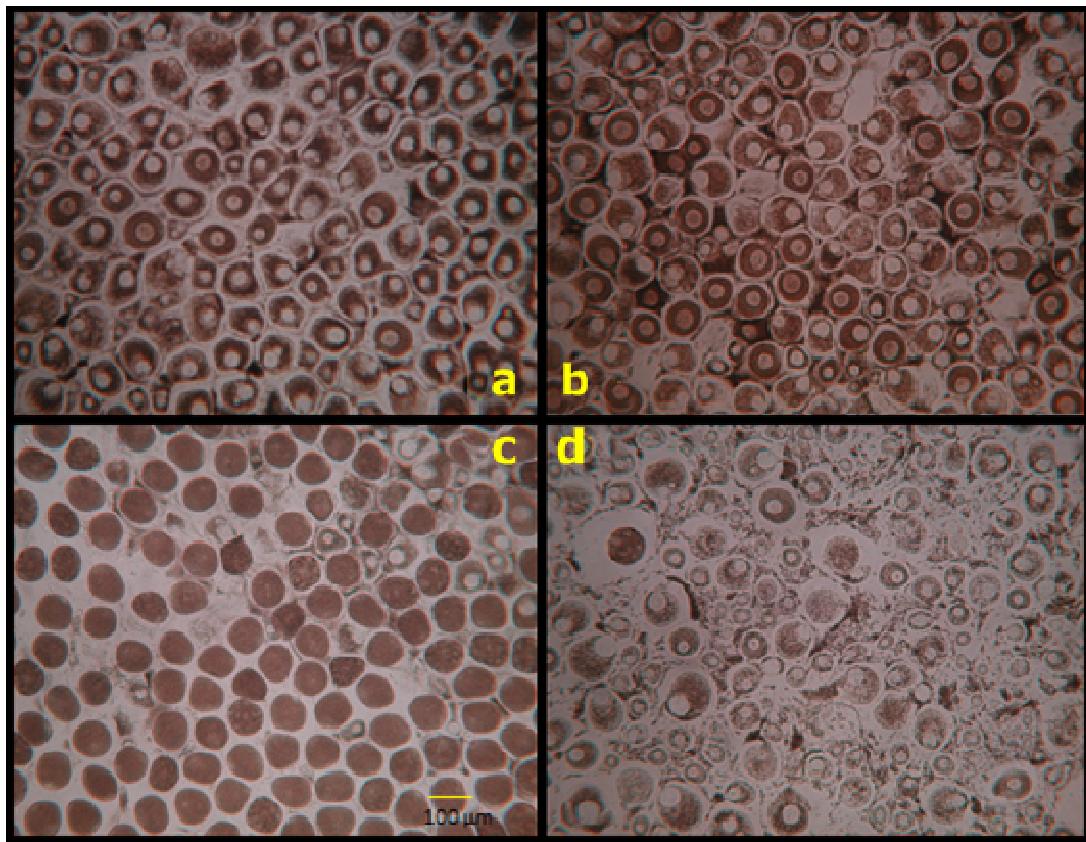


Slika 10. Mjesečne promjene količine kisika u pridnenom sloju u uvali Bistrina tijekom razdoblja lipanj – rujan 2008. god.

4.2. Praćenje reproduktivnog ciklusa

4.2.1. Otisci tkiva gonada

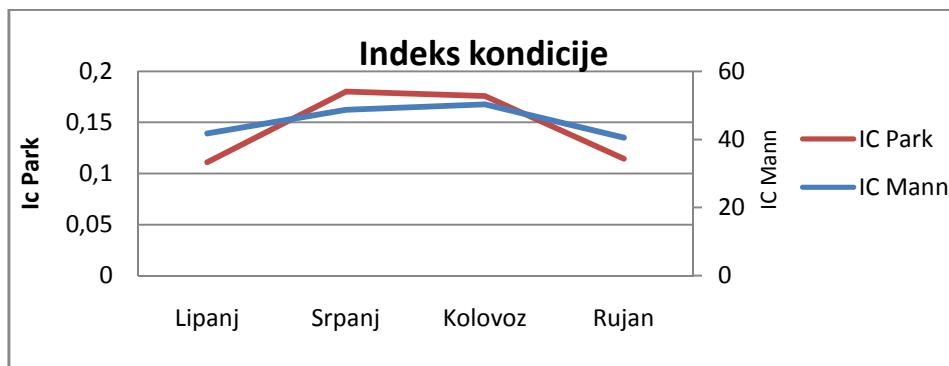
Tijekom lipnja i srpnja, mikroskopskim je pregledom otisaka tkiva gonada utvrđeno postupno napredovanje gametogeneze (Slika 11). Prosječna veličina oocita u lipnju iznosila je $78 \mu\text{m}$, a u srpnju $89 \mu\text{m}$. Krajem kolovoza utvrđena je prisutnost zrelih oocita, čija se veličina kretala od $90 - 100 \mu\text{m}$. Krajem rujna su sve pregledane jedinke bile izmriještene.



Slika 11. Otisci gonadnog tkiva: a i b) vitelogene oocite, c) zrele oocite veličine $90 - 100 \mu\text{m}$, prisutni i raniji razvojni stadiji, d) gonade neposredno nakon mrješćenja.

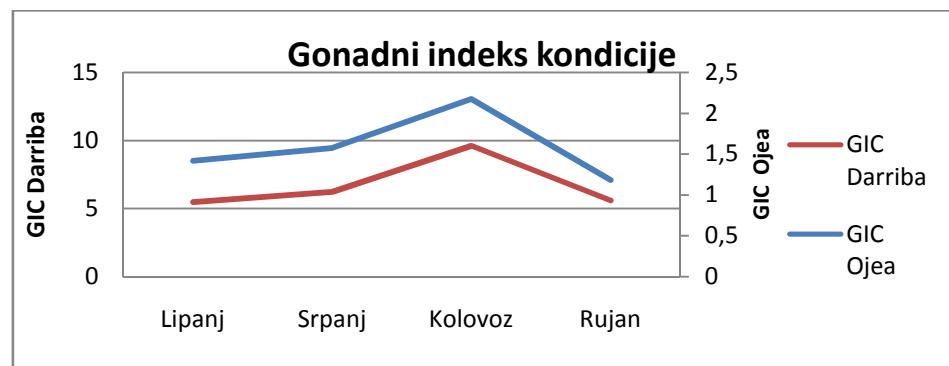
4.2.2. Indeks kondicije i gonadni indeks

Mjesečne promjene oba izračunavana indeksa kondicije brbavice prikazane su na slici 12. Najveći indeks kondicije po Mannu (1978) zabilježen je krajem kolovoza (50,1), a najniži krajem rujna (40,5). Prema Park i sur. (2006) najveći indeks kondicije iznosio je 0,18 krajem srpnja, a najmanji 0,11 krajem lipnja.



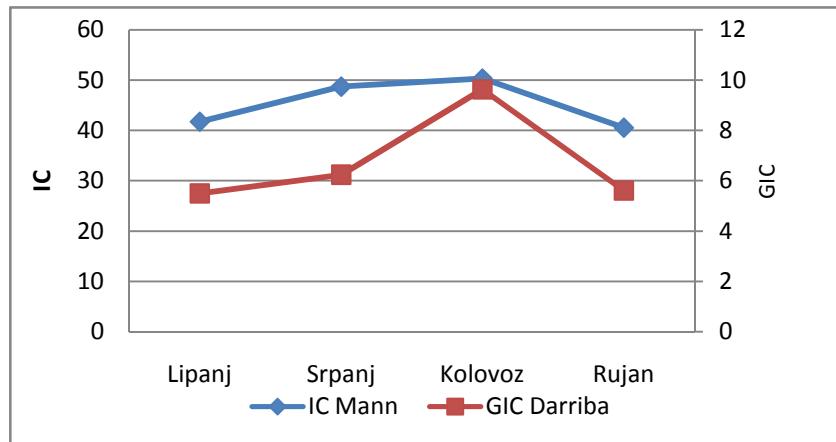
Slika 12. Mjesečne promjene srednjih vrijednosti izračunavanih indeksa kondicije *V. verrucosa* u uvali Bistrina tijekom razdoblja lipanj – rujan 2008. god.

Promjene gonadnog indeksa kondicije brbavice prikazane su na slici 13. Prema Ojea i sur. (2004) najveće vrijednosti zabilježene su krajem kolovoza (2,1), a namanje krajem rujna (1,1). Prema Darriba i sur. (2004) najveći gonadni indeks zabilježen je također krajem kolovoza (9,6), a najmanji krajem rujna (5,6).

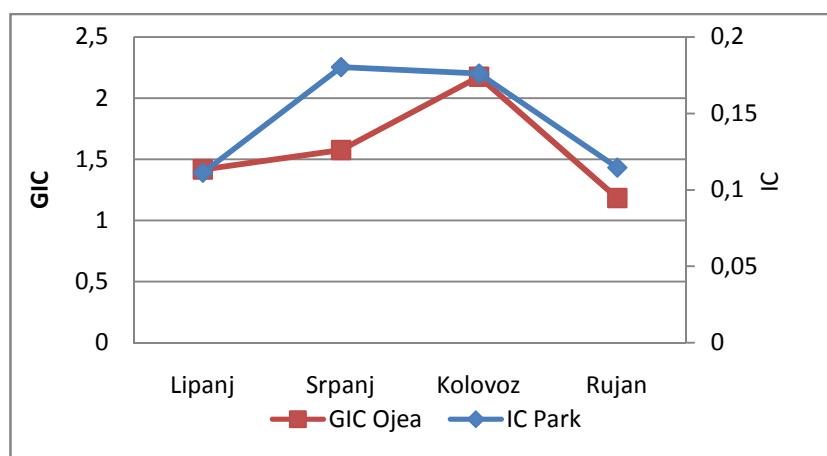


Slika 13. Mjesečne promjene srednjih vrijednosti izračunavanih gonadnih indeksa kondicije *V. verrucosa* u uvali Bistrina tijekom razdoblja lipanj – rujan 2008. god.

Na slikama 14 i 15 prikazane su mjesecne promjene izracunavanih indeksa kondicije i gonadnih indeksa. Krajem kolovoza kada su vrijednosti indeksa kondicije po Mannu (1978) najveće, najveće su i vrijednosti oba mjerena gonadna indeksa.



Slika 14. Mjesecne promjene srednjih vrijednosti indeksa kondicije i gonadnog indeksa brbavice (IC prema Mann (1978) i GIC prema Darriba i sur. (2004).



Slika 15. Mjesecne promjene srednjih vrijednosti indeksa kondicije i gonadnog indeksa brbavice (IC prema Park i sur. (2006) i GIC prema Ojea i sur. (2004)

Pearsonov koeficijent korelacije između srednjih mjesecnih vrijednosti izračunavanih indeksa kondicije / gonadnih indeksa i temperature i slanosti prikazan

je u tablici 1. Iz navedenih vrijednosti se vidi postojanje vrlo jake pozitivne korelacije između temperature i obje vrste IC, te jake između oba GIC i temperature. Korelacija između oba IC i slanosti je slabo pozitivna, dok je vrlo slaba između GIC i slanosti (pozitivna za GIC prema Dariba i sur. 2004; a negativna za GIC prema Ojea i sur. 2004).

Tablica 1. Pearsonov koeficijent korelacije između srednjih mjesecnih vrijednosti izračunavanih indeksa kondicije/ gonadnih indeksa i temperature i slanosti

VRSTA INDEKSA	PEARSONOV KOEFICIJENT (R)	
	TEMPERATURA	SLANOST
IC (PARK, 2006)	0,99	0,31
IC (MANN, 1978)	0,95	0,33
GIC (DARRIBA I SUR., 2004)	0,70	0,15
GIC (OJEA I SUR., 2004)	0,60	- 0,13

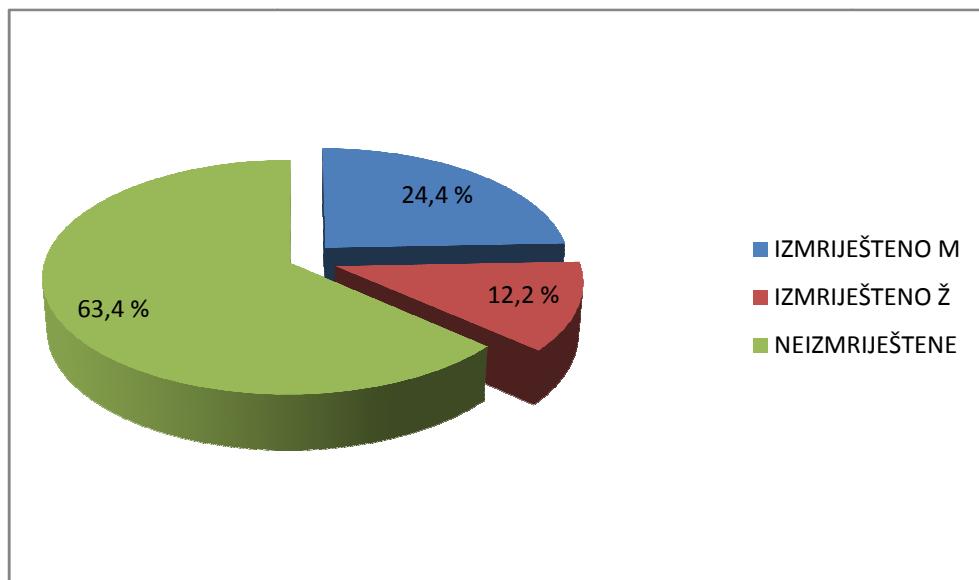
4.3. Stimulacija mrješćenja

U tablici 2 prikazani su rezultati stimulacije mriješta brlavice upotrebom temperaturnih šokova, te hiperosmotskih i hipohosmotskih šokova. Do mrješćenja je došlo u sve tri tretirane skupine. Izmrijesteno je ukupno 33 jedinke, što predstavlja

36,6% od 90 ukupno tretiranih. Od toga su izmriještena 22 mužjaka (24,4% od ukupno tretiranih jedinki) i 11 ženki (12,2 % od ukupno tretiranih jedinki) (Slika 16).

Tablica 2. Rezultati stimulacije mrješćenja brbavice uporabom tri različite metode (temperaturnih šokova, hiper i hipooomsotskih šokova)

	TEMPERATURNI ŠOKOVI		HIPEROOSMOTSKI ŠOKOVI		HIPOOSMOTSKI ŠOKOVI	
	BROJ	%	BROJ	%	BROJ	%
TRETIRANE JEDINKE	30	100	30	100	30	100
IZMRIJEŠTENI MUŽJACI	13	43,3	2	6,7	7	23,3
IZMRIJEŠTENE ŽENKE	6	20	1	3,3	4	13,3
IZMRIJEŠTENE JEDINKE PO TRETMANU	19	63,3	3	10	11	36,7
NEIZMRIJEŠTENE JEDINKE PO TRETMANU	11	36,7	27	90	19	63,3



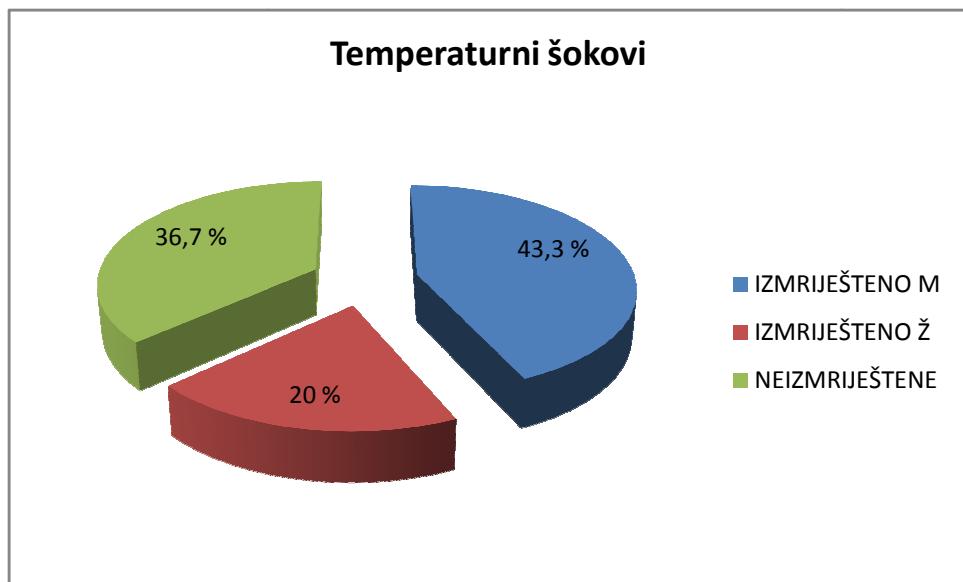
Slika 16 . Postotak izmriještenih mužjaka i ženki u svim tretmanima u odnosu na broj ukupno tretiranih.

Najbolji rezultati postignuti su primjenom temperturnih šokova kada je izmriješteno 63,3% od ukupnog broja tretitanih jedinki te skupine (Slika 17), a najlošiji pri tretmanu hiperosmotskim šokovima pomoću kojih je izmriješteno 10% od ukupnog broja tretitanih jedinki te skupine (Slika 18). Zadovoljavajuće rezultate dala je metoda stimulacije hiposmotskim šokovima kojom je izmriješteno 36,7% od ukupnog broja tretiranih jedinki te skupine (Slika 19).

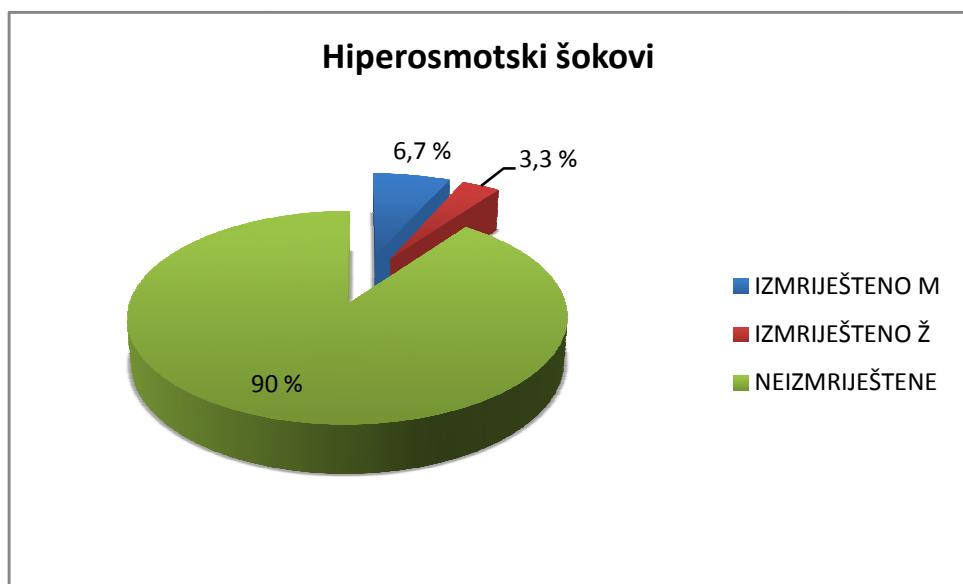
Kod jedinki tretiranih temperturnim šokovima do prvog mrješćenja došlo je nakon 8 sati i 30 minuta tijekom hladnog tretmana na 15°C, dok je kod jedinki tretiranih primjenom obje metode osmotskih šokova do mrješćenja došlo nakon 6 sati i 30 minuta. Kod obje skupine mrješćenje je počelo tijekom tretmana ambijentalnim morem slanosti 33,5 psu.

Razlike između primijenjenih metoda stimulacije mrješćenja utvrđene su Studentovim t testom. Rezultati ovog testa su pokazali da između metoda temperturnih i hipoosmotskih šokova ne postoji statistički značajne razlike ($p>0,05$),

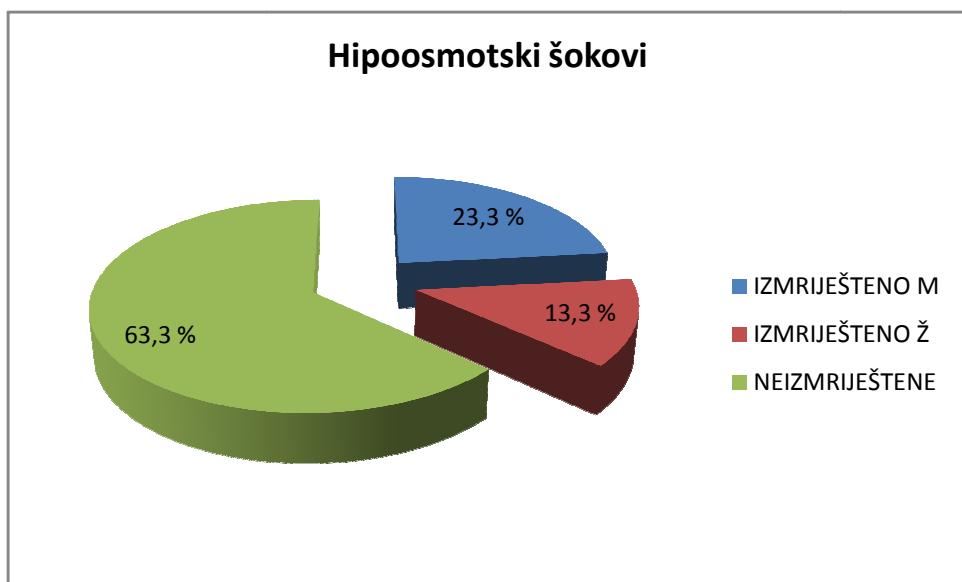
dok je usporedba obje navedene metode s rezultatima hiperosmotskih šokova pokazala postojanje statistički značajnih razlika ($p<0,05$).



Slika 17. Postotak izmriještenih mužjaka i ženki tretiranih temperaturnim šokovima u odnosu na broj ukupno tretiranih.



Slika 18. Postotak izmriještenih mužjaka i ženki tretiranih hipersmotskim šokovima u odnosu na broj ukupno tretiranih



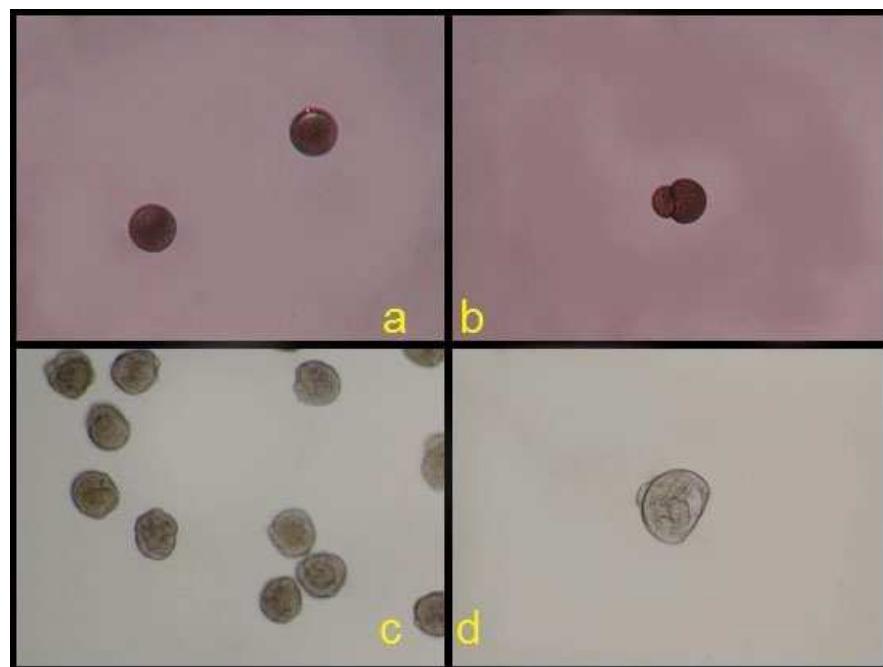
Slika 19. Postotak izmriještenih mužjaka i ženki tretiranih hipoosmotskim šokovima u odnosu na broj ukupno tretiranih.

Nakon uspješno obavljene oplodnje, još su se četiri jedinke izmrijestile kroz narednih 12 sati (iz skupina stimuliranih temperaturnim i hipoosmotskim šokovima). Do naknadnog mrješćenja više jedinki došlo je i kod skupine tretirane hiperosmotskim šokovima u narednih nekoliko dana, no zbog polispermije (Slika 20) ličinke se nisu razvile, ili su bile deformirane pa je taj nasad odbačen. Tijekom 15 dana promatranja matičnog stoka nakon mrješćenja nije zabilježena smrtnost niti u jednoj skupini jedinki.

Na slici 21 prikazan je embrionalni razvoj brbavice. Mikroskopskim pregledom pola sata nakon oplodnje uočeno je polarno tijelo (Slika 21a). Sat vremena nakon oplodnje počela je prva dioba stanica (Slika 21b). Kroz 24 sata embrio s razvijenim cilijama postaje pokretan (Slika 21c). Nakon 48 sati razvile su se prve D-ličinke (Slika 21d).



Slika 20. Polispermija. (foto: MARIBIC).



Slika 21. Embrionalni razvoj brlavice: a) otpuštanje polarnog tijela pola sata nakon oplodnje, b) prva dioba stanice 1 sat nakon oplodnje, c) embryo sa cilijama, d) razvijena D-ličinka 48 sati nakon oplodnje. (foto: MARIBIC).

Na temperaturi $21\pm1^{\circ}\text{C}$ uz ishranu s četiri vrste mikroalgi ličinke su prošle metamorfozu nakon 25 dana, pri čemu je njihova srednja veličina bila $210 \mu\text{m}$.

5. RASPRAVA

Pregledom otisaka gonadnog tkiva od kraja lipnja do kraja rujna 2008, u lipnju i srpnju nisu utvrđene zrele oocite. U pregledanim je stanicama utvrđeno prisustvo jezgrene vakuole, što prema Delgado i Camacho (2005) predstavlja jasan znak uznapredovale vitelogeneze. Zrele oocite su ovom metodom utvrđene krajem kolovoza, dok su krajem rujna sve pregledane jedinke bile već izmriještene. Rezultati pregleda otisaka tkiva također se slažu s rezultatima primjenjenih kvantitativnih metoda. Naime, najveće vrijednosti indeksa kondicije po Mannu (1978), kao i gonadnih indeksa izračunatih prema Darriba i sur. (2004) i Ojea i sur. (2004) zabilježene su također krajem kolovoza. Najniže vrijednosti svih spomenutih indeksa utvrđene su u rujnu. Prema Rueda i sur. (2005) povišene vrijednosti indeksa kondicije i gonadnog indeksa ukazuju na sazrijevanje gonada školjkaša. Pored toga ovi autori navode i da pad slanosti može inducirati proces mrješćenja. Iz dobijenih rezultata vidljivo je da je tijekom kolovoza i rujna došlo do pada slanosti u uvali Bistrina, što je vjerojatno dodatno stimuliralo mrješćenje. Najviša i najniža vrijednost indeksa kondicije izračunanog prema Park i sur. (2006), pokazale su odstupanja od rezultata svih prethodno navedenih metoda te se može zaključiti da ova metoda izračunavanja indeksa kondicije nije dobar pokazatelj reproduktivnog stanja brbavice.

Grubišić (1979) navodi da se u Jadranu brbavica mrijesti krajem proljeća i ljeti, a Zavodnik i Šimunović (1997) da do toga dolazi krajem zime i u proljeće. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se brbavica u uvali Bistrina mrijesti krajem kolovoza i početkom rujna. Do istih nalaza su došli i Gavrilović i sur. (2009; 2010). Obzirom da je u oba prethodno navedena istraživanja reproduktivni ciklus malostonske brbavice praćen tijekom ljeta, za pretpostaviti je da se na ovom prostoru mrješćenje odvija i krajem zime ili početkom proljeća. Utjecaj okolišnih promjena na godišnji reproduktivni ciklus i njihova direktna veza s razvojem gonada razlikuje se od vrste do vrste i među različitim populacijama iste vrste ovisno o geografskom položaju i eventualnim genetskim različitostima pa se čak i jedinke iste vrste mogu mrijestiti u

različitim periodima (Chávez-Villalba i sur. 2002, Turolla i Rossi, 2004; Magnesen i Christophersen, 2008). Zato se podaci o vremenu mrješćenja brbavice u različitim dijelovima Europe razlikuju. Prema Marano i sur. (1980) i Marano i sur. (1982), brbavica se u talijanskom dijelu južnog Jadrana mrijesti od srpnja do listopada, dok su Valli i sur. (1988) istražujući reproduktivni ciklus ove vrste u Tršćanskom zaljevu utvrdili da do mrješćenja dolazi u razdoblju od travnja do rujna. Slično prethodno navedenim autorima, dugačko razdoblje asinhronog mrješćenja opisali su i Arneri i sur. (1998) nakon preliminarnih histoloških analiza obavljenih u Jadranu i Egejskom moru. Royo i Gómez Rambaldo (2002) spominju proljetno i jesenje mrješćenje španjolske brbavice na ušću rijeke Piedras, dok su Tirado i sur. (2003) u južnom dijelu Španjolske (Málaga) utvrdili da se brbavica mrijesti tijekom cijele godine, pri čemu postoje dva izražena pika u ožujku i travnju te u razdoblju od svibnja do listopada.

Spolni dimorfizam brbavice tijekom ovog istraživanja nije utvrđen. Spomenute razlike nisu utvrdili niti Rossi i sur. (1994), dok Marano i sur. (1980) navode postojanje razlike u boji gonada mužjaka i ženki. Tijekom našeg istraživanja primijećene su razlike u teksturi tkiva samo u razdoblju kad su gonade već toliko zrele da pucaju pri otvaranju ljuštura. Mužjaci su imali gonade zrnate strukture, dok su gonade ženki bile finije, gotovo mlijekočne teksture. Isto su utvrdili i Darriba i sur. (2004) kod vrste *Ensis arcuatus*.

U pokusu su primijenjene tri različite metode stimulacije mrješćenja brbavice: temperaturni, hipoosmotski i hiperosmotski šokovi. Sve jedinke su prije primjene šokova držane na zraku sat vremena. Do mrješćenja je došlo u sve tri tretirane skupine. Izmriješteno je ukupno 33 jedinke, što predstavlja 36,6% od 90 ukupno tretiranih. Najbolji rezultati postignuti su primjenom temperaturnih šokova (izmriješteno 63,3% od ukupnog broja tretitanih jedinki te skupine), potom hipoosmotskih šokova (izmriješteno 36,7% iz skupine), a najlošiji pri tretmanu hiperosmotskim šokovima (izmriješteno 10% iz skupine). Nakon tretmana nije zabilježena smrtnost jedinki matičnog stoka. Gavrilović i sur. (2009; 2010) kod malostonske brbavice primijenili su dvije metode stimulacije mrješćenja:

temperaturne šokove i injektiranje serotoninina. Obje su se metode pokazale uspješnima, a najbolji rezultati također su postignuti primjenom temperturnih šokova. Postotak tako izmriještenih jedinki bio je nešto veći (57% i 52%), ali se nije statistički značajno razlikovao od primjene serotoninina (47% i 48%). Rossi i sur. (1994) u pokusu indukcije mrješćenja brlavice rabili su tri metode (gladovanje u trajanju 24, 48 i 62 sata; temperaturne šokove pri čemu su korištene izmjene temperature 20°C i 30°C; te kombinaciju izmjene temperature i pH, pri čemu je raspon pH iznosio 6,8 – 9,2, a temperature kao i kod temperturnih šokova), a samo se metoda temperturnih šokova pokazala uspješnom. Naime, izmrijestilo se ukupno 12, 6% tretiranih jedinki, a nakon mrješćenja zabilježena je značajna smrtnost primjeraka u matičnom stoku (do 80%), a postličinački uzgoj održao se samo do 25. tjedna. Royo i Gómez Rambaldo (2002) za indukciju mrješćenja kod ove vrste kućice u Španjolskoj koristili su također tri metode: držanje jedinki na zraku 18-20 sati, temperaturne šokove i dodavanje sperme u otopinu. Pokusi su provođeni na kondicioniranim jedinkama tijekom cijele godine. Kao najuspješnija se pokazala metoda držanja jedinki na zraku nakon koje su se one izmrijestile nakon uranjanja u more temperature 24°C, i to samo u razdoblju prirodnog mrijesta brlavice na tom prostoru (proljeće i jesen). Turolla i Rossi (2004) primijenili su nekoliko različitih metoda (temperaturni šok, kemijsku indukciju vodik peroksidom i kalij kloridom te injektiranje serotoninina) za induciranje mrješćenja brlavice, pri čemu su uspjeh postigli jedino injektiranjem serotoninina (izmrijestilo se 16,1% od ukupnog broja tretiranih jedinki). Temperaturni šokovi nisu se pokazali uspješnom metodom, što je u suprotnosti s rezultatima ovog pokusa, kao i pokusima Gavrilović i sur. (2009, 2010).

Za razliku od brlavice, kontrolirana reprodukcija velikog broja školjkaša u mrijestilištima već je standardizirana procedura i kamen temeljac ove industrije. Utting i Spencer već su 1991. godine izdali priručnik za kontroliranu reprodukciju kućica, kapica i kamenica. FAO 2004. god. izdaje vrlo sličan priručnik, a 2007. god. i usko specifični priručnik za uzgoj kapica. Brojni autori navode različite metode stimulacije procesa mrješćenja u laboratorijskim uvjetima, a najčešće se radi o temperaturnom šoku i to naglim podizanjem temperatupe za 10-ak °C i više. Timmermans i sur. (1996) stimulirali su mrješćenje kućice *Macoma baltica* postupnim

podizanjem temperature s 10 na 15°C (30 minuta), a potom i na 20°C, a čančicu *Cerastoderma edule* ostavili su na suhom na temperaturi 5°C preko noći te nakon toga uronili na 20°C. Honkoop i sur. (1998) također su izmrijestili kućicu *Cerastoderma edule* i *Macoma baltica* ostavljanjem preko noći na suhom na 4°C te potom uranjanjem u more temperature 12-15°C. Ovi su autori dagnju *Mytilus edulis* stimulirali na mrješćenje injektiranjem dva mililitra 0,5M otopine KCl u plaštanu šupljinu, držanjem na suhom kroz 30 minuta te uranjanjem na 15°C. Nakon 45-60 minuta došlo je do mrješćenja. Sve jedinke ponovno su preko noći čuvane na 4°C te tretirane svaki sljedeći dan do potpunog pražnjenja gonada. Većina matičnog stoka čančice kroz par dana je uginula. Stimulaciju mrješćenja izlaganjem zraku i promjenama temperature vode primijenili su Oh i sur. (2003, 2008) i Qtae i sur. (2007). Izmrijestili su kapicu *Patinopecten yessoensis* podizanjem temperature vode za 6°C. Autori ističu da su jedinke držali na suhom sat vremena prije tretmana, što je rađeno i s malostonskom brbavicom. Pronker i sur. (2008) izmrijestili su dagnju *Mytilus edulis* u laboratorijskim uvjetima podizanjem temperature sa 18 na 30°C u trajanju 20 minuta. Da Costa i Patiño (2008) probali su nekoliko metoda stimulacije mrješćenja kod šljanka *Solen marginatus*. Simulacijom plime i oseke, odnosno izmjenom suhih i uronjenih razdoblja temperature morske vode od 15°C, protokom UV tretirane vode i cijeđenjem gonada nisu bili uspješni. Kratke (svakih 30 minuta) temperaturne izmjene s 10-12 na 25-27°C kroz tri-četiri ciklusa nisu urodile plodom tijekom tretiranja, no ta se skupina izmrijestila sljedeći dan. Matias i sur. (2009) izmrijestili su kućicu *Ruditapes decussatus* brzim podizanjem temperature s 20 na 28°C u trajanju od šest sati. Hamida i sur. (2004) uspjeli su dodavanjem 20µm serotonina u vodu pri oplodnji oploditi oocite jedinki *R. decussatus* dobivene cijeđenjem.

U pokusu s malostonskom brbavicom 90 jedinki tretirano je dvjema jednostavnim i jeftinim metodama uz minimalan stres za matični stok, što je vidljivo iz 100% -tnog preživljavanja matičnog stoka. Najbolji rezultati su postignuti metodom temperaturnih izmjena. Obzirom da su u pridnenom sloju vode temperaturne promjene slabije izražene, ova metoda očito djeluje kao dobar stimulans. Iako statistički nema značajnih razlika između temperaturnog i hipoosmotskog šoka, čini

se da je brbavica bolje adaptirana na promjene slanosti čemu u prilog ide i područje uzorkovanja gdje je čest priljev slatke vode (Vukadin, 1981; Carić i sur., 1992). Helm i sur. (2004) i Sarkis i Lovatelli (2007) navode da ukoliko do mrješćenja ne dođe u razdoblju od tri do četiri sata, matični stok treba ponovno kondicionirati. Za razliku od navedenih autora, Utting i Spencer (1991) preporučuju ponovno sedmodnevno kondicioniranje kućica u slučaju kada do mrješćenja ne dođe šest sati nakon početka stimulacije. Obzirom na potpuno preživljavanje matičnog stoka i postignute rezultate ovog istraživanja i istraživanja Gavrilović i sur. (2009), za pretpostaviti je da kod ove vrste stimulacija procesa mrješćenja može trajati i do osam do devet sati. Sličnim metodama primjene temperaturnog stresa Matias i sur. (2009) izmrijestili su nakon šest sati kućicu *R. decussatus*. Da Costa i Patiño (2008) postigli su uispjeh sa šljankom tek naredni dan nakon tretmana, no takav način mrješćenja nije primjenjiv u uzgoju, budući da pri većoj količini sperme u malom volumenu dolazi do polispermije i posljedično deformacije ličinki te visoke stope smrtnosti. Navedeno je utvrđeno i u ovom pokusu s malostonskom brbavicom tijekom naknadnog mrješćenja skupine koja je prethodno bila podvrgnuta hiperosmotskim šokovima.

Proces mrješćenja školjkaša u centrima za purifikaciju problem je koji se javlja kod pada slanosti i rasta temperature iznad 20°C. Do ove pojave najčešće dolazi u ljetnim mjesecima. Obzirom da je izmriješteni školjkaš kao proizvod nepogodan za tržište, primjenjuju se metode inhibicije mrješćenja. Razni autori navode kako podizanje saliniteta za 10-20% uz strogu kontrolu temperature učinkovito inhibira mrješćenje zrelih školjkaša (Jackson i Ogburn, 1999). Iako je u eksperimentu s malostonskom brbavicom do mrješćenja došlo i pod povišenom slanošću, što nije bilo za očekivati, ta pojava nije statistički značajna. Treba ipak napomenuti da je i u tom slučaju mrješćenje počelo kod vraćanja školjkaša na nižu (ambijentalnu) slanost nakon jednosatnog izlaganja višim vrijednostima.

Royo i Gómez Rambaldo (2002) uzgajali su ličinke brbavice na 20°C uz ishranu dvjema vrstama algi (*Isochrysis galbana* i *Chaetoceros gracilis*) u koncentraciji ekvivalentnoj 50 stanica/µl *Isochrysis galbana*. Do metamorfoze je došlo nakon 19 dana, pri veličini 209 µm. Autori su uspjeli proizvesti oko 100 000 jedinki

veličine jednog milimetra za dva mjeseca te nastaviti uzgoj do druge godine. U ovom eksperimentu do metamorfoze je došlo pri veličini 210 µm, ali nakon 25 dana, na temperaturi $21\pm1^{\circ}\text{C}$ i ishrani s četiri vrste algi u koncentraciji ekvivalentnoj 100 stanica/µl *Isochrysis galbana*. Turolla i Rossi (2004) ističu da količina hrane za ličinke brlavice ne bi smjela prelaziti koncentraciju 10-15 stanica/µl. U njihovom je eksperimentu do metamorfoze došlo za 15-17 dana. Helm i sur. (2004) navode da kapice (*Pecten* sp.) najbolje rastu pri koncentraciji algi 5-18 stanica/µl. Moguće je stoga da manja količina hrane uz povoljnju temperaturu skraćuje vrijeme ličinačkog života, no upitno je kako utječe na metabolizam brlavice jer autori navode visoku smrtnost.

6. ZAKLJUČAK

Praćenjem reproduktivnog ciklusa brlavice *V. verrucosa* u razdoblju lipanj – rujan izradom otisaka tkiva i primjenom različitih kvantitativnih metoda (indeks kondicije i gonadni indeks) utvrđeno je da se ovaj školjkaš u uvali Bistrina mrijesti krajem kolovoza i početkom rujna.

Najveće vrijednosti indeksa kondicije po Mannu (1978) i gonadnih indeksa prema Darriba i sur. (2004) i Ojea i sur. (2004) zabilježene su krajem kolovoza, dok su najniže vrijednosti svih spomenutih indeksa utvrđene u rujnu. Najviša i najniža vrijednost indeksa kondicije izračunatog prema Parku i sur. (2006), pokazale su odstupanja od rezultata svih prethodno navedenih metoda te se može zaključiti da ova metoda izračunavanja indeksa kondicije nije dobar pokazatelj reproduktivnog stanja brlavice.

Najbolji rezultati stimulacije procesa mrješćenja brlavice postignuti su primjenom temperturnih šokova, dok je nešto manje uspješna bila metoda stimulacije hipoosmotskim šokovima. Pri tome je dokazano je da se brlatica može stimulirati na mrješćenje jednostavnim metodama izmjene temperature ili snižavanjem slanosti, bez uporabe kemijskih sredstava, oštećenja ljuštare ili žrtvovanja školjkaša, uz minimalan stres i stopostotno preživljavanje matičnog stoka.

LITERATURA

- Arneri E., Giannetti G., Antolini B., 1998. Age determination and growth of *Venus verrucosa* L. (Bivalvia: Veneridae) in the southern Adriatic and the Aegean Sea. *Fisheries Research.* 38: 193-198.
- Avendaño, M. and Le Pennec, M. 1997. Intraspecific variation in gametogenesis in two populations of the Chilean mollusc bivalve, *Argopecten purpuratus* (Lamarck). *Aquac. Res.* 28: 175-183.
- Carić, M., Jasprica N., Viličić D., 1992. Nutrient and chlorophylla concentrations in Gruz and Mali Ston Bays (Southern Adriatic). *Rapp. Comm. Int. Mer. Medit.* 33:367.
- Chávez-Villalba J., Pommier J., Andriamiseza J., Pouvreau S., Barret J., Cochard J., Le Pennec M., 2002. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* 214: 115–130.
- Da Costa F., Martínez-Patiño D., 2008. Culture potential of the razor clam *Solen marginatus* (Pennánt, 1777), *Aquaculture*, doi: 10.1016/j.aquaculture. 2008.11.001.
- Darriba S., San Juan F., Gerra A., 2004. Reproductive cycle of the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) in northwest Spain and its relation to environmental conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 311: 101-115.
- Delgado M., Pérez Camacho A., 2005. Histological study of the gonadal development of *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia) and its relationship with available food. *Sci. Mar.* 69 (1): 87-97.
- FAO., 2007a. Yearbook of Fishery Statistics Summary tables.
<http://www.fao.org/fishery/statistics/en>.

FAO., 2007b. Global Production Statistics 1950-2007.

<http://www.fao.org/fishery/statistics/en>.

Gaspar M. B., Leitão F., Santos M. N., Chícharo L., Dias M. D., Chícharo A., Monteiro C. C., 2003. A comparison of direct macrofaunal mortality using three types of clam dredges. *Journal of Marine Science*. 60: 733-742.

Gaspar M. B., Leitão F., Santos M. N., Sobral M., Chícharo L., Chícharo A., Monteiro C. C., 2002. Influence of mesh size and tooth spacing on the proportion of damaged organisms in the catches of the Portuguese clam dredge fishery. *Journal of Marine Science*. 59:1228-1236.

Gavrilović A., Jug Dujaković J., Ljubičić A., Conides A., 2010. BROODSTOCK CONDITIONING AND INDUCED SPAWNING OF THE WARTY VENUS *Venus verrucosa* UNDER FOUR DIFFERENT FEEDING REGIMES. Proceedings and plenary session, WAS conference: Profitable and sustainable aquaculture. San Diego, 1-5. March.

Gavrilović A., Ljubičić A., Jug-Dujaković J., 2009. RESPONSE OF WARTY VENUS *Venus verucossa* TO TWO DIFFERENT SPAWNING STIMULATION TECHNIQUES. World Aquaculture Society Conference, Mexico, 25-29. September.

Gavrilović, A., Jug-Dujaković J., Gjurčević E., Ljubičić A., 2008. Influence of the Condition Index and Polydora spp. Shell Infestation on the Quality of Oysters *Ostrea edulis* (Linneaus, 1758) in the Mali Ston Bay. 43th Croatian & 3th International Symposium on Agriculture. Proceedings and plenary session / Pospisil, Milan (ur.), Opatija, February.

Gosling E., 2003. Bivalve molluscs, Biology, Ecology and culture. Fishing News Books, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 443 pp.

Hamida L., Medhioub M.-N., Cochard J. C., Le Pennec M., 2004. Evaluation of the effects of serotonin (5-HT) on oocyte competence in *Ruditapes decussatus* (Bivalvia, Veneridae). *Aquaculture*. 239: 413-420.

- Heasman M. P., O'Connor W. A., Frazer A. W., 1996. Temperature and nutrition as factors in conditioning broodstock of the commercial scallop *Pecten fumatus* Reeve. Aquaculture. 143: 75-90.
- Helm M. M., Bourne N., 2004. Hatchery culture of bivalves, A practical manual, FAO Fisheries Technical paper no: 471. Rome, FAO, 177 pp.
- Hervat M., Kekez L., Peharda .M, Popović Z., Stagličić N., Vrgoč N., 2006. Starost i rast prnjavice *Venus verrucosa* L. (Bivalvia: Veneridae) u sjevernom Jadranu, Pula, Prirodoslovna istrazivanja Riječkog područja - II. znanstveni skup s međunarodnim sudjelovanjem, Prirodoslovni muzej Rijeka. 86-87.
- Honkoop P.J.C., van der Meer J., 1998. Experimentally induced effects of water temperature and immersion time on reproductive output of bivalves in the Wadden Sea. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 220: 227-246.
- Iglesias, J.I.P., Urrutia, M.B., Navarro, E., Alvarez-Jorna, P., Larretxea, X., Bougrier, S., Heral, M. 1996. Variability of feeding processes in the cockle *Cerastoderma edule* (L.) in response to changes in seston concentration and composition. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 197: 121– 143.
- Jackson K. L., Ogburn D. M., 1999. Review of Depuration and its Role in Shellfish Quality Assurance. FRDC Project No. 96/355: 45-48.
- Jug Dujaković J., Gavrilović A., Ljubičić A., Conides A., 2010. THE USE OF THE DIATOM *Cylindrotheca closterium* IN THE FEEDING OF *Ostrea edulis* LARVAE. Proceedings and plenary session, WAS conference: Profitable and sustainable aquaculture. San Diego, 1-5. March.
- Jug-Dujaković J., Gavrilović A., Ljubičić A., Skaramuca B., 2009. Upotreba fitoplanktonske vrste *Cylindrotheca closterium* izolirane iz Malostonskog zaljeva za kondicioniranje brlavice *Venus verrucosa*. 44. hrvatski i 4. međunarodni simpozij agronomija. Zbornik radova i plenarna sjednica / Pospišil, Milan (ur.). Opatija, veljača.

- Magnesen T., Christophersen G., 2008. Reproductive cycle and conditioning of translocated scallops (*Pecten maximus*) from five broodstock populations in Norway. Aquaculture. 285: 109–116.
- Mann R., 1978. A comparison of morphometric, biochemical and physiological indexes of condition in marine bivalve molluscs. Woods Hole Oceanographic Institution, Massachusetts. 484-497.
- Marano, G., Casavola, N., Saracino, C., Rizzi, E. 1982. Riproduzione e crescita di *Chamelea gallina* (L.) e *Venus verrucosa* (L.) (Bivalvia: Veneridae) nel basso Adriatico. Mem. Biol. Mar. Ocean. XII:93-110.
- Marano G., Casavola N., Saracino C., 1980. Indagine comparativa sulla riproduzione di *Chamelea gallina* (L.), *Venus verrucosa* (L.), *Rudicardium tuberculatum* (L.) nel basso Adriatico. Mem. Biol. Marina e Oceanogr. Suppl. X, 229-233.
- Marguš D., 1998. Školjkaši Ušća Rijeke Krke. Javna ustanova "Nacionalni Park Krka", Šibenik. 165: 116-117.
- Martínez G., Aguilera C., Mettifogo L., 2000. Interactive effects of diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. Aquaculture. 183: 149–159.
- Matias D., Joaquim S., Leitaõ A., Massapina C., 2009. Effect of geographic origin, temperature and timing of broodstock collection on conditioning, spawning success and larval viability of *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). Aquacult Int. 17:257–271.
- Nevezan N. M., Pronker A. E., Peene F., 2008. Hatchery broodstock conditioning of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758). Part II. New formulated feeds offer new perspectives to commercial hatcheries. Aquacult Int. 16:483–495.
- O'Connor W. A., Heasman M. P., 1995. Spawning induction and fertilisation in the dougboy scallop *Chlamys (Mimachlamys) asperimma*. Aquaculture. 136: 117-129.

- Oh, B.S., Lee, J.Y., Park, S.K., Lee, C., Yo, Q.T. 2008. A Study on the Production of Artificial Seed and Intermediate culture for Attached Spats of the Chinese Stock of Scallop, *Patinopecten yessoensis*. Korean J. Malacol. 24 (2): 153-159.
- Ojea J., Pazos A.J., Martínez D., Novoa S., Sánchez J.L., Abad M., 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. Aquaculture. 238: 451–468.
- Park K.-I., Figueras A., Choi K.-S., 2006. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the study of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia): II. Impacts of *Perkinsus olseni* on clam reproduction. Aquaculture. 251: 182– 191.
- Pronker A. E., Nevejan N. M., Peene F., Geijssen P., Sorgeloos P., 2008. Hatchery broodstock conditioning of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus 1758). Part I. Impact of different micro-algae mixtures on broodstock performance. Aquacult Int. 16:297–307.
- Qtae J., Chu L., Bong S. O., Jong D. B., Yoon K., Im G. J., Myoung-Mo A., 2007. Batch specific quality of the reproductive outputs and nursery acclimation in the seed production of *Patinopecten yessoensis* - case study on Korean coast of the East Sea. J. Aquaculture. 20(2): 81-84.
- Rossi R., Campioni D., Conte A.G., Paesanti F., Turolla E., 1994. Artifitial reproduction of Warty venus (*Venus verrucosa*): Preliminary results. Rivista Italiana Aquacoltura. 29 53/62.
- Royo A., Gómez Ramblado C., 2002. Primeros datos sobre el cultivo de *Venus verrucosa* Linnaeus, 1758 (Mollusca: Bivalvia) en estanque. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 18 (1-4): 343-348.
- Rueda J.L., Smaal A.C., Scholten H., 2005. A growth model of the cockle (*Cerastoderma edule* L.) tested in the Oosterschelde estuary (The Netherlands). Journal of Sea Research 54: 276–298

- Sarkis S., Lovatelli A., 2007. Installation and operation of a modular bivalve hatchery. FAO Fisheries Technical Paper no: 492, Rome, FAO. 173 pp.
- Siniscalchi A., Cavallini S., Sonetti D., Sbrenna G., Capuano S., Barbin L., Turolla E., Rossi R., 2004. Serotonergic neurotransmission in the bivalve *Venus verrucosa* (Veneridae): a neurochemical and immunohistochemical study of the visceral ganglion and gonads. *Marine Biology*. 144: 1205–1212.
- Šimunović, A. 1981. Biološko-ekološka istraživanja jestivih školjkaša Malostonskog zaljeva. In: J. Roglić & M. Meštrov, editors. *Zbornik radova savjetovanja "Malostonski zaljev prirodna podloga i društveno valoriziranje"*. Dubrovnik: JAZU, Znanstveni savjet za zaštitu prirode, pp. 252-267.
- Timmermans B.M.H., Hummel H., Bogaards R.H., 1996. The effect of polluted sediment on the gonadal development and embryogenesis of bivalves. *The Science of the Total Environment*. 187: 231-236.
- Tirado C., Salas C., Márquez I., 2003. Reproduction of *Venus verrucosa* L.,(Bivalvia: Veneridae) in the litoral of Málaga(southern Spain). *Fisheries Research*. 63: 437-445.
- Trigui E.-M. N., Guezzi Y., Le Pennec M., Boumaiza M., Le Pennec G., 2005. Infestation of the clam *Venus verrucosa* by Sipunculoidea and the lithophagus bivalve, *Gastrochaena dubia*. *Acta Adriatica*. 46(1): 83-90.
- Turolla E., Rossi R., 2004. Studi sulla riproduzione controllata dell’Tartufo di mare (*Venus verrucosa*). Istituto Delta Ecologia Applicata - Centro Ricerche sui Molluschi (C.Ri.M.), Università degli Studi di Ferrara-Dipartimento di Biologia. 30 pp.
- Utting S. D., Millican P.F., 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*. 155: 45-54.

- Utting S. D., Spencer B. E., 1991. The hatchery culture of bivalve molluscs larvae and juveniles. Lab. Leafl. MAFF Fish. Res. Lowestoft. (68): 31 pp.
- Valli, G., Nodari, P., Castanetto, D. 1988. Reproduction, biométrie et indices de condition chez *Venus Verrucosa* L. (Mollusca, Bivalvia) du Golfe de Trieste. Rapp. Comm. Int. Mer. Médit. 31 (2): 15.
- Vukadin, I. 1981. Hidrografska svojstva Malostonskog zaljeva i susjednog mora u periodu 1980-1981 godine. In: J. Roglić & M. Meštrov, editors. Zbornik radova savjetovanja "Malostonski zaljev prirodna podloga i društveno valoriziranje". Dubrovnik: JAZU, Znanstveni savjet za zaštitu prirode, pp. 52-65.
- Zavodnik D., Šimunović A., 1997. Beskralješnjaci morskog dna Jadrana. IP "Svetlost" D. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Sarajevo. 217: 99.