Cykl życia Acropora

Koralowo-żrąca płazińca (AEFW),

Prosthiostomum acroporae;

Wpływ temperatury i Wytyczne dotyczące zarządzania

Jonathan A. Barton1,2,3\*, Kate S. Hutson1,4, David G. Bourne1,2,3, Craig Humphrey2,

Cat Dybala5 i Kate A. Rawlinson6,7,8\*

1 Centrum Zrównoważonego Rybołówstwa Tropikalnego i Akwakultury, College of Science and Engineering, James Cook University, Townsville, QLD, Australia, 2 Australian Institute of Marine Science, Cape Cleveland, QLD, Australia, 3 AIMS@JCU, James

Cook University, Townsville, QLD, Australia, 4 Cawthron Institute, Nelson, Nowa Zelandia, 5 Niezależny badacz, Houston, TX, Stany Zjednoczone, 6 Wydział Zoologii, Uniwersytet w Cambridge, Cambridge, Wielka Brytania, 7 Wellcome Sanger Instytut, Hinxton, Zjednoczone Królestwo, 8 Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, Stany Zjednoczone Ameryki

Ponieważ akwakultura koralowców rozwija się na całym świecie w celu odtworzenia rafy i handlu nią, złagodzenie wpływu drapieżników, patogenów i pasożytów koralowców jest niezbędne dla ich optymalnego wzrostu. Żywiące się koralowcami Acropora (AEFW), Prosthiostomum acroporae (Platyhelminthes: Polycladida: Prosthiostomidae) żywią się dzikimi i uprawianymi gatunkami Acropora, a ich przypadkowe wprowadzenie do zbiorników rafowych może doprowadzić do szybkiej śmierci kolonii koralowców. Aby ukierunkować leczenie zarażonych koralowców zbadaliśmy parametry cyklu życiowego płazińca w zakresie temperatur, które występują w zbiornikach rafowych, obiektach akwakultury koralowej i sezonowych wahań w środowisku naturalnym. Wykorzystaliśmy P. acroporae z długotrwałej hodowli in vivo na gatunkach Acropora, aby zbadać wpływ temperatury (przyrosty co 3oC od 21 do 30oC) na okres embrionalny płazińca, powodzenie wylęgu, długość życia wylęgowego i czas do osiągnięcia dojrzałości płciowej.

Nasze wyniki wskazują, że cieplejsza woda morska skróciła czas generacji; w 27oC wylęganie jaj trwało średnio 11 dni, a osiągnięcie dojrzałości płciowej przez płazińce 35 dni, co daje minimalny czas generacji 38 dni, podczas gdy w 24oC czas generacji wynosił 64 dni. Cieplejsza woda morska (24-30oC) również zwiększyła powodzenie wylęgu jaj w porównaniu z chłodniejszymi warunkami (21oC). Wyniki te wskazują, że wyższe temperatury prowadzą do większego zagęszczenia populacji P. acroporae. Temperatura znacznie zwiększyła tempo wzrostu P. acroporae, przy czym osobniki osiągały większe rozmiary w dojrzałości płciowej w cieplejszych temperaturach, nie wpłynęła jednak na długość życia wylęgu. Młode, które potrafią zarówno pływać, jak i czołgać się, mogą przetrwać od 0,25 do 9 dni w przypadku braku Acropora, a zatem mogą rozproszyć się między koloniami koralowymi i akwenami połączonymi ze sobą. Wykorzystaliśmy nasze dane, aby przewidzieć czas trwania zarodka i czas do osiągnięcia dojrzałości płciowej przy 21-30oC oraz omówić, jak zoptymalizować obecne metody leczenia, aby zakłócić cykl życia płazińca w niewoli.

Słowa kluczowe: AEFW, Acropora, płazińce, odnowa rafy, akwakultura koralowa, zwalczanie szkodników

WPROWADZENIE

Handel żywymi koralowcami wzrasta o 10-50% rocznie od 1987 r. (Rhyne i in., 2009) i jest wyceniany na 200-330 mln USD rocznie (Wabnitz, 2003). Koralowce kamienne (Order: Scleractinia) z rodzaju Acropora są jednym z najpopularniejszych koralowców zbieranych dla światowego handlu z akewnów morskich ze względu na ich żywe kolory i różnorodność form wzrostu (Rhyne et al., 2014; Barton et al., 2017). Acropora spp. są odpowiednimi kandydatami do akwakultury in situ lub ex situ w obiektach lądowych i rozmnażane są w różnych regionach geograficznych i społeczno-gospodarczych, w tym na obszarze Indo- Pacyfiku, Karaibów i Wielkiej Rafy Koralowej. Hodowla koralowców akroporidowych w celu zapewnienia zrównoważonego handlu akwariami morskimi może zmniejszyć presję wywieraną na dzikie stada przez konwencjonalne strategie zbierania (Tlusty i in., 2013; Rhyne i in., 2014). Na przykład, ostatnie badania pokazują, że większość akroporidów eksportowanych przez Indonezję jest obecnie hodowana (Rhyne i in., 2012, 2014). Akwakultura koralowa stanowi również podstawę dla aktywnych programów odnowy raf denudowanych i łagodzenia skumulowanej presji na ekosystemy rafowe (np. sedymentacja, zmiany klimatu; Fabricius, 2005; Hoegh-Guldberg i in., 2007; Doney i in., 2009; De'ath i in., 2012; Hughes i in., 2017). Acropora spp. są wspólnym gatunkiem przeznaczonym do odnowy rafy z uwagi na ich szybki wzrost w porównaniu z innymi koralowcami z rodzaju scleractinian i ich wkład w złożoność strukturalną (Craggs i in., 2017; Pollock i in., 2017).

Wysiłki związane z rozmnażaniem koralowców mogą być zagrożone przez wprowadzenie lub naturalne występowanie koralowych drapieżników, patogenów i pasożytów. Płazińce zjadające Acropora, Amakusaplana acroporae (Rawlinson i in., 2011) [obecnie znany jako Prosthiostomum acroporae (Litvaitis i in., 2019)] od ponad dziesięciu lat są problematycznym szkodnikiem dla społeczności hobbystów koralowców na całym świecie (Nosratpour, 2008). Ich nieumyślne wprowadzenie do akwariów koralowych może doprowadzić do nieodwracalnego uszkodzenia tkanek i ostatecznie do śmierci całych kolonii Acropora (Delbeek i Sprung, 2005; Carl, 2008; Nosratpour, 2008; Rawlinson i in., 2011; Hume i in., 2014). Prosthiostomum acroporae jest płazińcem wielopostaciowym (Platyhelminthes: Polycladida) należącym do podrzędu Cotylea i rodziny Prosthiostomidae. Składa swoje klastry jaj na gołym szkielecie koralowca, a każdy klaster zawiera wiele kapsułek jajowych, w których rozwijają się liczne zarodki (Rawlinson i in., 2011). Podobnie jak inne poliklady cotylean, rozwój P. acroporae przebiega poprzez formę larwalną z płatami i paskami rzęskowymi do pływania i żerowania w słupie wody (Rawlinson, 2014), ale w odróżnieniu od innych cotylean, te cechy larwalne rozwijają się, a następnie są redukowane i tracone, gdy znajdują się jeszcze wewnątrz kapsuły jajowej, tzn. jest to larwa wewnątrzkapsułkowa, która przed wykluciem się jako młodociana ulega metamorfozie (Rawlinson i in., 2011). Konsekwencją tej strategii życiowej może być zwiększona retencja wylęgu na koralowcu naturalnym i ograniczony potencjał rozproszenia, które przyczyniają się do jego szybkiego rozprzestrzeniania się w systemach niewoli. Kolejnym czynnikiem sprzyjającym jej sukcesowi w systemach niewoli jest jej kamuflaż i skryty zwyczaj (Rawlinson i in., 2011; Hume i in., 2014). Długi łańcuch dostaw w handlu roślinami ozdobnymi (Wabnitz, 2003; Rubec i Cruz, 2005; Cohen i in., 2013; Fujita i in., 2014) nie tylko stwarza okazję do rozprzestrzeniania się płazińców między koralowcami w każdym miejscu hodowli, ale również stres związany z transportem może zwiększyć podatność kolonii Acropora na zarażenie. Pomimo długotrwałej niesławy wśród hobbystów koralowców, P. acroporae dopiero niedawno został zgłoszony w środowisku naturalnym z Wyspy Jaszczurki na Wielkiej Rafie Koralowej w Australii, a zasięg biogeograficzny i wpływ na dzikie akroporidy nie jest znany (Rawlinson i Stella, 2012).

Nie przeprowadzono żadnych badań empirycznych dotyczących zarządzania P. acroporae w niewoli lub w środowisku naturalnym. Skuteczne gospodarowanie tym gatunkiem wymaga kompleksowego zrozumienia jego cyklu życiowego, tak aby można było zidentyfikować i wyeliminować wrażliwe stadia rozwojowe poprzez odpowiednie leczenie. Tempo rozwoju zwierząt poikilotermicznych, w tym *polikladowych płazińców*, jest w dużym stopniu uzależnione od temperatury (Gammoudi i in., 2012), dlatego też ważne jest uwzględnienie rozwoju P. acroporae w zakresie temperatur istotnych dla sezonowych wahań w środowisku naturalnym oraz w zakresie temperatur koralowców utrzymywanych w akwariach. Celem tego badania było dostarczenie wiedzy, która pomoże sformułować sposoby zaburzające cykl życiowy P. acroporae poprzez zbadanie wpływu temperatury na okres embrionalny i powodzenie wylęgu, długość życia wylęgu oraz czas do osiągnięcia dojrzałości płciowej i rozmiary przy której jest ona osiągana (rysunek 1). Dodatkowo zaobserwowano zmienność morfologiczną u wylęgających się, przy czym niektóre z nich pojawiają się z płatami, a inne bez, co może wpływać na ich zdolność do rozprzestrzeniania się (tj. te z płatami mogą mieć większą zdolność do rozprzestrzeniania się). Chociaż trudno jest dokładnie określić zmienność morfologii wylęgania, to jednak w przypadku tych morfologii określono zdolność do przetrwania jako miarę ich potencjału rozprzestrzeniania się.

**MATERIAŁY I METODY**
Kultura Prosthiostomum acroporae
Prosthiostomum acroporae zostały zebrane z kolonii Acropora spp. (A. millepora, A. spathulata, A. loripes, A. tenuis, A. microclados, A. nasuta, A. microphthalma, A. rosaria) zebranych między majem 2016 r. a styczniem 2018 r. z różnych raf przybrzeżnych (Esk Reef 18° 46. 420' S 146° 31.372' E) oraz rafy śród-brzeżnych (Trunk Reef 18°23'20.4'' S 146°48'25.8'' E, Davies Reef 18°49'21.6'' S 147°39'12.5'' E oraz Rib Reef 18°28'47.1'' S 146°52'00.9'' E), które stanowią część środkowej Wielkiej Rafy Koralowej w Australii (zezwolenie GBRMPA nr G12/3236.1). Płazińce zostały usunięte z koralowców za pomocą strumienia przefiltrowanej wody morskiej (szczegóły na temat przesiewowych badań koralowców na obecność płazińców znajdują się w Metodach Uzupełniających). Ciągła hodowla P. acroporae została założona na mieszaninie pozyskanych gatunków Acropora (przede wszystkim A. millepora, A. spathulata, A. tenuis, A. loripes i A. nasuta) znajdujących się w National Sea Simulator (SeaSim) w Australian Institute of Marine Science (AIMS) w Queensland. Hodowla była utrzymywana w temperaturze 27°C w dwóch akwariach przepływowych o pojemności 250 L zaopatrywanych w świeżą, przefiltrowaną wodę morską o pojemności około 2 L min-1. W razie potrzeby dodawano fragmenty kolonii w celu zastąpienia martwych koralowców, a także regularnie przeprowadzano regulację gęstości zarażenia płazińcem (szczegóły na temat kultywacji płazińców i koralowców znajdują się w Materiałach uzupełniających).
Prosthiostomum acroporae składają jaja na gołym szkielecie koralowca (ryc. 1), co pozwala na utrudnione obserwacje mikroskopowe rozwoju zarodków i koralowców.
Następnie, za pomocą dwóch metod, zebrano stosowane w doświadczeniach klastry jaj złożone in vitro. Pierwsza metoda polegała na usunięciu osobników dorosłych P. acroporae z kolonii żywiciela Acropora za pomocą strumienia wody i umieszczeniu pojedynczych robaków w plastikowych torebkach (torebki plastikowe Sandvik® [127 mm x 200 mm]) zawierających filtrowaną wodę morską (godz. 13.00). Codziennie przeprowadzano oględziny klastrów jaj i 75-procentową wymianę wody, a klastri jaj zbierano w ciągu 24 godzin od momentu umieszczenia ich w oviposition jajniku. Metodę tę wykorzystano w doświadczeniu 1 do określenia wpływu temperatury na okres embrionalny i powodzenie wylęgu. Drugie podejście opracowano później w celu wzmocnienia kultur P. acroporae i zapewnienia większej ilości klastrów jajeczek do badań, a następnie wykorzystano w eksperymencie 2 (długowieczność i morfologia wylęgu) i 3 (czas do dojrzałości płciowej i wielkość w dojrzałości płciowej). W metodzie tej wykorzystano prostokąty z przezroczystego tworzywa sztucznego (2 cm x 5 cm) wycięte z czystych torebek plastikowych, spięte niemetalowymi kołkami ubraniowymi na zaatakowanych koloniach Acropora w pobliżu blizn żywieniowych (patrz Materiał uzupełniający). Podłoża plastikowe były codziennie monitorowane, tak aby klastry jajeczek mogły być zbierane w ciągu 24 godzin od momentu umieszczenia ich w jajniku. Klastra jaj zebrane drugą metodą stosowano tylko wtedy, gdy były one zamknięte w ciągłej warstwie "cementu" (Rysunek 2A), co wskazuje, że wszystkie jaja w klastrze były produktem jednego zdarzenia znoszenia jaj.
od samotnego rodzica. Usunięto obce kapsułki jajeczne (nie pokryte ciągłą warstwą cementu).

Doświadczenie 1 - Okres embrionalny i sukces wylęgania
W celu zbadania wpływu temperatury na okres embrionalny i powodzenie wylęgu, klastra jaj P. acroporae umieszczono w czterech oddzielnych komorach temperaturowych [21, 24, 27, lub 30° C (±0,2°C)]. Temperatury te reprezentują zakres, w którym Acropora spp. rosną wzdłuż Wielkiej Rafy Koralowej w Australii, według średniej miesięcznej temperatury wody w północnej (Wyspa Jaszczurki), środkowej (Davies Reef) i południowej (Heron Island) części rafy1. Wybrany zakres temperatur obejmuje również zakres temperatur, w których Acropora spp. są powszechnie trzymane w akwariach zamkniętych.

Trzydzieści sześć klastrów jaj P. acroporae umieszczono w poszczególnych komorach wylęgowych o pojemności 500 mL i rozłożono równomiernie w czterech komorach temperaturowych (w okresie od września do listopada 2016 roku). Dla każdej komory termicznej, dziewięć komór wylęgowych zostało rozdzielonych pomiędzy trzy zbiorniki inkubacyjne (tj. trzy komory wylęgowe na zbiornik; trzy zbiorniki łącznie), które były losowo umieszczone w pomieszczeniu eksperymentalnym. Komory wylęgowe zostały wyposażone w indywidualne dopływy wody i umieszczone w trzech egzemplarzach w celu zapewnienia stabilności temperatury w każdej z komór.

Zastosowano cykl 12:12 (światło:ciemność) z pierwszą i ostatnią godziną narastania do pożądanego natężenia 24 ± 2 umole m-2 s-1 zapewnianego przez 52 moduły LED AquaIllumination Hydra. To natężenie światła zostało dobrane na podstawie pomiaru natężenia światła (światłomierz LI-COR LI-250A i LI-190R Quantum Sensor) docierającego do kapsułek z jajami, które zostały złożone na spodniej stronie kolonii A. millepora.

Klastry jaj były badane codziennie pod mikroskopem stereoskopowym (Leica MZ16; 10-40x) w celu monitorowania rozwoju zarodków w każdej kapsułce z jajami. Obserwacja każdej grupy jajeczek trwała do momentu, gdy ostatni osobnik wylęgał się lub gdy stwierdzono, że dalsze zarodki nie były zdolne do życia. Okres zarodkowania każdego klastra jajeczek w danym klastrze (rysunki 2A,B) został zdefiniowany jako liczba dni po tarle do momentu wyłonienia się wszystkich zdolnych do życia osobników z kapsułki jajecznej przez operkulum. Sukces wylęgania wyrażony został jako proporcja kapsułek w obrębie danego klastra, które dały początek wylęganiu się z całkowitej liczby kapsułek w klastrze.

Doświadczenie 2 - Długowieczność wylęgania i zmiany morfologiczne

Zaobserwowaliśmy zmienność morfologii wylęgu P. acroporae, więc w celu zbadania, czy istniały różnice w obrębie i pomiędzy klastrami jaj, zebraliśmy wszystkie wylęgi z trzech klastrów hodowanych w 27° C, dokonaliśmy żywych obserwacji ich ruchów pływania/czołgania, a następnie utrwaliliśmy je w 4% paraformaldehydzie (PFA) w celu sortowania według zmienności morfologicznej. Aby ocenić potencjał rozproszenia, zmierzyliśmy, jak długo wylęgane P. acroporae mogą przetrwać w przypadku braku koralowca (długość życia wylęgu) i czy temperatura ma na to wpływ. Świeżo zniesione klastry jaj (przy użyciu opisanej powyżej metody pobierania jaj nr 2) były hodowane w pojedynczych płytkach Petriego z przefiltrowaną wodą morską (1 um) inkubowanych w zbiornikach w temperaturze 24, 27 lub 30°C (±0,2°C), z pięcioma powtórzeniami na jeden cykl termiczny. Cykl w temperaturze 21°C został wykluczony z powodu słabego powodzenia wylęgania w doświadczeniu 1. Młode były zbierane w momencie wyłaniania się z kapsułek jajowych i inkubowane w płytkach Petriego z przefiltrowanej wody morskiej w temperaturze, w której były hodowane. Każda płytka Petriego zawierała 10 wylęgów/młodych, które były zbierane w tym samym czasie, a następnie monitorowane co 6 godzin w celu oceny przeżycia. Młode uznawano za martwe, gdy nie wykazywały żadnych oznak ruchu i nie reagowały na delikatny strumień wody z plastikowej pipety lub gdy nie regulowały swojego położenia w słupie wody po delikatnym ruchu odśrodkowym płytki Petriego. Po stwierdzeniu, że nie żyją, były badane w kolejnym okresie monitorowania w celu potwierdzenia. Długowieczność każdego wylęgu wyrażano jako czas, jaki upłynął od wyłonienia się z kapsułek jajowych do ich śmierci.

Eksperyment 3 - Czas do dojrzałości płciowej i wielkość przy dojrzałości płciowej

Czas osiągnięcia dojrzałości płciowej przez P. acroporae został oceniony poprzez określenie czasu od momentu zarażenia koralowców wylęgami do momentu pierwszego pojawienia się jaj na szkielecie koralowca (ryc. 1). Niezainfekowane fragmenty koralowców do tego eksperymentu zostały przygotowane z kolonii A. millepora pobranej z rafy Davies (18°49,21,6" S 147°39,12,5" E; zezwolenie GBRMPA nr G12/3236.1) w listopadzie 2017 r., a eksperyment był prowadzony od lutego do kwietnia 2018 r. Klastry jajek (27 klastrów; dziewięć na jeden cykl) zebrano z hodowli na plastikowych paskach , inkubowano i monitorowano przy użyciu trzech cykli temperatur 24 ± 0,2, 27 ± 0,2 lub 30 ± 0,2°C. Stały dopływ (0,2 L/min) przefiltrowanej wody morskiej zapewniał stabilną temperaturę i jakość wody w komorach zarażenia 27,1,5 L PVC. W każdej komorze znajdował się jeden fragment A. millepora i jedno skupisko jaj P. acroporae. W celu utrzymania przepływu wody w każdej z komór zarażenia zapewniono napowietrzanie, które zostało zredukowane tylko podczas wylęgu, aby ułatwić zbieranie P. acroporae. Każdą komorę inwazyjną umieszczono w grupie trzech komór w kontrolowanych temperaturowo łaźniach wodnych, z replikacją uwzględniającą potencjalne działanie zbiornika (tj. trzy akwaria inkubacyjne na każdą temperaturę; trzy komory inwazyjne na każdą łaźnię wodną). Przed dodaniem klastrów jaj, fragmenty A. millepora były aklimatyzowane do przypisanego im cyklu w systemie doświadczalnym ze zmianą temperatury nie większą niż 0,8°C na tydzień. Codzienne monitorowanie klastrów jaj dawało informację o wystąpieniu wylęgu; w zarodku przebarwienie jelita i rozwój pięciu lub więcej plam oczu wskazywały na zbliżające się wyklucie. Część tkanki koralowej została usunięta za pomocą sprężonego powietrza (~4 mm) w celu odsłonięcia szkieletu koralowca i dostarczenia podłoża dla P. acroporae do złożenia jaj. Każda komora zarażenia została wyposażona w 60 ^m filtr siatkowy ‘banjo’ z siatką na wylocie z każdej komory, aby zapobiec utracie młodych w przypadku zbliżającego się wylęgu. Filtry te były czyszczone trzy do czterech razy dziennie w celu usunięcia porostów. Kapsułki z jajami były sprawdzane dwa razy dziennie (rano i wieczorem) pod kątem wylęgu. Pierwszy dzień wylęgu był uważany za dzień zero czasu na osiągnięcie dojrzałości płciowej. Nie badano dokładnej liczby świeżych młodych, ponieważ proces ten zakłócałby zbieranie P. acroporae do fragmentu Acropora millepora gospodarza. Codzienne kontrole koralowca przy użyciu soczewki powiększającej (SubSee +10 Dioptrii) miały na celu ocenę postępu zarażenia P. acroporae (np. blizny żywieniowe) i poszukiwanie następnej generacji kapsułek jajowych. Złożenie jaja na koralowcu żywicielu był stosowany jako zamiennik dla pierwszego osiągnięcia dojrzałości płciowej w każdej kohorcie. Po zaobserwowaniu jaj, dorosłe robaki były zbierane poprzez przetrzymywanie zaatakowanego korala nad miską 2 L Pyrex® i usuwanie go strumieniami wody z gruszki do odciągania. Każdy płaziniec została zmierzona przy użyciu linijki (z dokładnością do jednego milimetra) i aparatu Olympus Tough w celu określenia średniej wielkości w dojrzałości płciowej w każdej temperaturze.

Analiza statystyczna

Dane analizowano za pomocą RStudio (wersja 1.0.143) pod kątem wpływu temperatury na okres embrionalny, powodzenie wylęgu, czas do śmierci młodych, czas do osiągnięcia dojrzałości płciowej oraz wielkość przy dojrzałości płciowej P. acroporae. Normalność oceniano za pomocą testów QQplot i Shapiro-Wilk. Do badania wpływu temperatury na czas do osiągnięcia dojrzałości płciowej (Shapiro-Wilk; p > 0,05) zastosowano liniowy model efektów mieszanych [LME; R package "nmle" (Pinheiro i in., 2019)]. Ponieważ dane z okresu embrionalnego i eksperymentów z długowiecznością wylęgową nie spełniały założenia normalności i są eksperymentami czasowymi, zamiast tego wykonano półparametryczny model zagrożeń proporcjonalnych Cox [COXME; pakiet R "survival" (Therneau, 2015)]. Każdy z modeli uwzględniał efekt stałej temperatury, a klaster, do którego należała każda kapsułka z jajkiem, był efektem losowym, o poziomie istotności określonym na p < 0,05. Długość dorosłego osobnika została również uznana za efekt stały dla okresu embrionalnego i danych o powodzeniu wylęgu. Porównania par post hoc z korekcją Bonferroniego wykonano również dla analiz LME [pakiet R "emmeans" (Lenth, 2019)] i COXME (pakiet R "survival"), w celu zbadania różnic między cyklami termicznymi.

Ponieważ badanie to miało na celu dostarczenie prognoz dotyczących czasu trwania wyklucia się płazińca (embrionu) i osiągnięcia dojrzałości płciowej w różnych temperaturach, do oszacowania tych parametrów wykorzystano modele z temperatur 21-30°C. Do oszacowania czasu trwania okresu embrionalnego (95% CI) w temperaturze 21-30°C wykorzystano szacunki Kaplana-Meiera z modelu Coxa (pakiet R "survival" funkcji przetrwania). Podobnie, liniowy model efektów mieszanych wykorzystano do oszacowania czasu dojrzewania płciowego w temperaturze 21-30°C w oparciu o zależność między temperaturą a szybkością osiągania dojrzałości płciowej.

Przeprowadzono test Chi-kwadrat w celu zbadania wpływu temperatury na powodzenie wylęgu (temperatura leczenia vs. liczba Jj wyklutych i niewyklutych), a następnie dokonano niezależnych porównań pomiędzy poszczególnymi zabiegami z późniejszą korektą Bonferroniego, aby ocenić istotne różnice (p < 0,008) w powodzeniu wylęgu pomiędzy zabiegami termicznymi. Ze względu na nienormalny rozkład wielkości w dojrzałości płciowej (Shapiro-Wilk; p < 0,05), został użyty test Kruskala-Wallisa do zbadania wpływu temperatury na wielkość w dojrzałości płciowej, a test Dunna z korektą Bonferroniego badał różnice pomiędzy zabiegami termicznymi.

Czas generacji cyklu życiowego, czyli minimalny czas ponownego zarażania przez dojrzałe płciowo robaki, obliczono jako sumę czasu potrzebnego jajom na rozpoczęcie wylęgu i minimalnego czasu do osiągnięcia dojrzałości płciowej. Uznano, że wylęgane osobniki mogą zaraz po wylęgu zarażać koralowce.

WYNIKI

Doświadczenie 1 - Okres embrionalny i sukces wylęgania

Temperatura miała istotny wpływ na czas trwania okresu zarodkowania P. acroporae [p < 0,0001; 1,76 ± 0,16 (współczynnik ± SE); COXME; rysunek 2C]. Porównanie parami ujawnia istotne różnice pomiędzy wszystkimi zabiegami dotyczącymi temperatury (p < 0,0001). W temperaturze 21, 24, 27 i 30°C średni okres zarodkowania dla kapsułek jajowych P. acroporae wynosił odpowiednio 26, 15, 11 i 9 dni (ryc. 2C i tabela 1). Pierwszy i ostatni dzień wylęgu kapsułek we wszystkich skupiskach jaj w danej temperaturze pokazano na rycinie 2C i tabeli 1. Przewidywane krzywe prawdopodobieństwa wylęgu na podstawie danych o zarodku doświadczalnym (szacunki przeżycia Kaplana i Meiera) sugerują, że okres zarodkowy powinien trwać od 26 dni przy 21oc do 9 dni przy 30oC (tabela 2).

TABELA 1 | Tabela parametrów cyklu życia dla Prosthiostomum acroporae

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Temperatura(0C) | FH/LH (dni) (średnia ± SE) | HL(dni) | Smin(dni) | Smean(dni) | LC(dni) |
| 21 | 22/28(25.9 ± 0.22) Kapsułek n = 125, Skupiska n = 6 |  |  |  |  |
| 24 | 10/16(14.83 ± 0.11) Kapsułek n = 124, Skupiska n = 7 | 2.27 ± 0.26 | 54 | 56 ± 1.15 | 64 |
| 27 | 6/14(11.3 ± 0.10) Kapsułek n = 144, Skupiska n = 9 | 0.93 ± 0.06 | 32 | 34.5 ± 0.9 | 38 |
| 30 | 6/12(9.4 ± 0.12) Kapsułek n = 129, Skupiska n = 9 | 2.23 ± 0.29 | 30 | 32.5 ± 2.50 | 36 |

FH/LH - dni do pierwszego i ostatniego wylęgu kapsułek jajowych w skupiskach jaj (liczba kapsułek jajowych liczona powyżej 6-9 skupisk jaj w każdej temperaturze); HL - średnia długość wylęgu ± SE, Smn - minimalny czas do osiągnięcia dojrzałości płciowej; Smean - średni czas do osiągnięcia dojrzałości płciowej ± SE; LC - minimalny czas do zakończenia cyklu życia (FH + Smin).

TABELA 2 | Przewidywany czas zarodkowania z krzywych prawdopodobieństwa wylęgu na podstawie danych o zarodku doświadczalnym (szacunki przeżycia Kaplana-Meiera), oraz czas do osiągnięcia dojrzałości płciowej (model liniowych efektów mieszanych) w dniach.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Temperatura (0C) | Czas zarodkowania(mediana dni) | czas do osiągnięcia dojrzałości płciowej (dni) |
| 21 | 26 | 141 |
| 22 | 22 | 94 |
| 23 | 16 | 70 |
| 24 | 15 | 56 |
| 25 | 14 | 47 |
| 26 | 13 | 40 |
| 27 | 12 | 35 |
| 28 | 11 | 31 |
| 29 | 10 | 28 |
| 30 | 10 | 25 |

Temperatura miała również istotny wpływ na powodzenie wylęgu P. acroporae z ich kapsułek jajowych (p < 0,05, test Chi- kwadratowy; Rysunek 2C). Porównanie parami wykazało, że poziom sukcesu wylęgowego robaków z kapsułek jajowych w temperaturze 21°C [43 ± 4% (średnia ± SE)] był istotnie niższy (p < 0,008, test Chi- kwaśny) niż w pozostałych cyklach (24, 27, 30°C). Nie stwierdzono jednak istotnych różnic (p > 0,008) pomiędzy powodzeniem wylęgu w przypadku stosowania temperatury 24°C (80 ± 4%), 27°C (91 ± 2%) i 30°C (81 ± 3%) w dowolnej kombinacji.

Na ogólną liczbę 36 skupisk jaj badanych w tym eksperymencie, liczba kapsułek jaj składających się na skupisko była zmienna i wynosiła średnio 14 ± 1,3 kapsułek (średnia ± SE) a zakres od 3 do 36. Liczba zarodków w jednej kapsułce mieściła się w przedziale od 1 do 5. Nie wszystkie zarodki w każdym skupisku jaj wykluły się z powodzeniem przy wszystkich zmierzonych temperaturach. Zaobserwowaliśmy przypadki niekompletnego rozwoju zarodków, zbyt dużych rozmiarów zarodków (potencjalnie zbyt dużych, aby mogły wyjść przez kapsułę operkulum) lub ogólnej niezdolności zarodków do wyjścia z danej kapsuły. Uznaliśmy, że kapsułka jajeczna wykluła się z powodzeniem, gdy wszystkie zdolne do życia osobniki opuściły kapsułkę jajeczną przez operkulum.

Eksperyment 2 - Długowieczność i morfologia wylęgu

W trakcie embriogenezy P. acroporae wykształciły cechy larwalne typowe dla innych poliklad cotylean (tj. płatów z kępkami żółciowymi do pływania w fazie pelagicznej; ryc. 3A). Występowały różnice w morfologii wylęgu, od zredukowanych płatów do braku płatów (ryc. 3B), ale wszystkie osobniki były zdolne do pływania i czołgania się. To zróżnicowanie morfologiczne było subtelne i trudne do zaobserwowania u żywych osobników ze względu na plastyczność kształtu ich ciała. Umocowanie wylęgów umożliwiło zbadanie zróżnicowania morfologicznego w obrębie i pomiędzy skupiskami i wykazało, że osobniki, które ponownie wchłonęły płaty, nadal zachowały kępki żółciowe (Rysunek 3C). Okazało się również, że mogą występować różnice pomiędzy skupiskami jaj zniesionych przez różnych rodziców, ponieważ wszystkie wylęgane z jednego skupiska miały zredukowane płaty, podczas gdy wylęgane z drugiego całkowicie zaabsorbowały swoje płaty (Rysunek 1). Nawet u wylęgów stałych stopień resorpcji płatów był subtelny i ciągły, co było trudne do oceny. Dlatego też, ze względu na brak wyraźnego dimorfizmu, nie podjęto próby ilościowego określenia zmienności w morfologii wylęgu. Zamiast tego, ponieważ wszystkie młode mogły pływać, określiliśmy długość życia (lub przeżycie) młodych miarę ich potencjału rozpraszania. Przeżywalność lęgów wahała się od 0,25 do 9 dni w przypadku braku koralowców; średnia liczba dni (± SD) do śmierci wynosiła 2 (± 2,12), 1 (± 0,52) i 2 (± 2,27) odpowiednio w temperaturze 24, 27 i 30°C (tabela 1). Temperatura nie miała istotnego wpływu na długość życia wylęgu (p > 0,05; COXME; rys. 3A). Porównanie parami wykazało istotne różnice pomiędzy temperaturami w 24 i 27°C (p < 0,001), 27 i 30°C (p < 0,001), ale ich brak pomiędzy 24 i 30°C (p < 0,001). Długość życia wylęgu była zmienna pomiędzy osobnikami pochodzącymi z danego skupiska, a także pomiędzy skupiskami (rysunek 3D).

**Eksperyment 3 - Czas do dojrzałości płciowej i wielkość w dojrzałości płciowej**

Temperatura miała istotny wpływ na czas osiągnięcia dojrzałości płciowej przez nowo wyklute P. acroporae (p < 0,005, R2 = 0,7754, SE = 0,0126, LME; wykres 4A i tabela 1). Porównanie parami (emmeans) wskaźnika dojrzałości płciowej pomiędzy zabiegami termicznymi wykazało istotne różnice pomiędzy 24 i 27°C (p < 0,005), 24 i 30°C (p < 0,005), ale nie wykazało istotnych różnic pomiędzy 27 i 30°C (p > 0,005). Przewidywany czas do osiągnięcia dojrzałości płciowej wynosi do 141 dni w temperaturze 21°C i do 26 dni w temperaturze 30°C (tab. 2).

Jedna sztuka płazińca o temperaturze 27° C znajdowała się na niezdrowym koralowcu (wybielonym) i została uznana w zbiorze danych za odchyloną, osiągając dojrzałość płciową w wieku 58 dni w porównaniu z 39,4 ± 4,97 dnia A (średnia ± SE) i została usunięta z analizy. Wyniki były ograniczone liczbą replik, w których znajdowały się dojrzałe płciowo płazińce, szczególnie w cyklu 30° C, gdzie tylko dwie repliki miały osobniki, które osiągnęły dojrzałość płciową. Jedna z tych replik o temperaturze 30° C miała pięć płazińców w momencie składania jaj w pierwszym skupisku jaj (30 kapsułek jajowych), podczas gdy w drugim fragmencie znajdowała się tylko jedna płazińca w momencie rejestracji pierwszego skupiska jaj (dziewięć kapsułek jajowych).

Chociaż w naszym projekcie doświadczalnym nie ma możliwości zweryfikowania udanego początkowego osiedlania się wylęgów, wydaje się, że w leczeniu 30°C wystąpiło niskie osiadanie, przynajmniej to, które dało objawy zarażenia. Osiem z dziewięciu klastrów replikacyjnych (jeden nie wylęgał się po pojawieniu się pełnego rozwoju) wylęgło się z powodzeniem w 30°C, ale sześć z nich nie zaatakowało związanych z nimi fragmentów Acropora millepora. Po 25 dniach od wyprodukowania, z pozostałymi sześcioma replikami nie były powiązane żadne płazińce.

Temperatura miała istotny wpływ na całkowitą długość ciała P. acropora. Osobniki były większe w dojrzałości płciowej w cieplejszych temperaturach (Kruskal-Wallis, p < 0,001, F = 20,29; ryc. 4B). Porównanie parami wykazało istotne różnice pomiędzy temperaturami 24 i 27°C (test Dunna, p < 0,001), 24 i 30°C (p < 0,001), ale nie pomiędzy 27 i 30°C (p > 0,001). Konsekwencją tego było to, że płazińce osiągające dojrzałość płciową w cieplejszych temperaturach miały całkowitą długość ciała 5,81 ± 0,82 i 6,12 ± 0,37 mm (średnia ± SE) (odpowiednio 27 i 30°C) i były większe od płazińców w chłodniejszych warunkach (24°C) o długości ciała 4,00 ± 0,27 mm.

**DYSKUSJA**

Postępy w naszym rozumieniu cyklu życia Prosthiostomum acroporae

Polikladowy płaziniec P. acroporae stanowi poważny problem dla trzymanych w niewoli koralowców Acropora, wpływając na ich zdrowie zarówno w akwariach hobbystycznych, jak i w dużych zakładach akwakultury koralowej. Skuteczne zwalczanie tego robaka wymaga szczegółowego zrozumienia jego cyklu życiowego, a w niniejszym opracowaniu określiliśmy okres jego zarodkowania, powodzenie wylęgu, długość życia wylęgowego oraz czas dojrzewania płciowego w zakresie temperatur istotnych z punktu widzenia biologii (Berkelmans i Willis, 1999; Berkelmans i Van Oppen, 2006; Howells et al., 2013). Według naszej wiedzy, jest to pierwsze badanie, które pozwala na określenie linii czasu pełnego cyklu życia płazińca polikladowego. Dane empiryczne na temat parametrów cyklu życiowego Prosthiostomum montiporae pozwalają na obliczenie czasu trwania pokolenia od pozycji jajowej pokolenia rodzicielskiego do pozycji jajowej pierwszego pokolenia. W porównaniu z innymi płazińcami, cykl życiowy 38 dni dla P. acroporae (w temp. 27°C) jest długi w porównaniu do 10-13 dni dla Neobenedenia girellae (w temp. 26 i 28°C) (Brazenor i Hutson, 2015) i 2-3 tygodni dla Macrostomum lignano w temp. 20°C (Morris i in.), 2004; Wudarski i in., 2019), ale krótki w porównaniu do 80 dni dla płazińca trematodalnego Schistosoma mansoni w temperaturze 28°C (u żywiciela ślimaka i w wodzie słodkiej) i 37°C (u żywiciela ssaka) (Rawlinson, obserwacja osobista). Informacje te mają istotny wpływ na liczebność populacji P. acroporae, a wyniki te mogą być wykorzystane do określenia czasu rozpoczęcia leczenia w celu przerwania cyklu życiowego tego płazińca.

Co ciekawe, różnice w morfologii wylęgów zaobserwowano w przypadku niektórych wylęgów z płatami i kępkami żółciowymi, a w przypadku innych wylęgów bez płatów, ale z kępkami żółciowymi. Ponieważ zmienność ta była subtelna i ciągła, może być spowodowana zmiennością w czasie wylęgu, przy czym wylęganie odbywa się w różnych punktach czasowych podczas metamorfozy, podczas której płatki są ponownie wchłaniane, a kępki żółciowe są ostatecznie zrzucane (Kato, 1940; Ruppert, 1978). Nie wydaje się, aby był to przypadek wyraźnego dimorfizmu rozwojowego (lub poecilogonii) z wyraźnymi typami zarodków w obrębie skupiska, które rozwijają się albo w larwy długożyciowe o przymusowym okresie żerowania, albo w larwy krótko-żyjące, które mogą osiąść bez żerowania w planktonie (Krug, 2009). Nasze obserwacje dotyczące wylęgów stałych sugerują również, że mogą występować różnice pomiędzy skupiskami jaj, co wskazuje na efekt rodzicielski lub, bardziej odległe, przypadek gatunków kryptońskich. Ponieważ jednak oceniliśmy zmienność morfologii wylęgu tylko w trzech skupiskach i w jednej temperaturze (27°C), konieczne jest szersze zbadanie zmienności w obrębie i pomiędzy skupiskami, aby wyciągnąć wnioski na temat znaczenia tego ustalenia.

Zróżnicowanie morfologii wylęgu ma interesujące konsekwencje ekologiczne, rozwojowe i ewolucyjne, przy czym wylęgi, które zachowują płaty, są potencjalnie zdolne do pływania dalej i przez dłuższy czas niż te, które już wchłonęły swoje płaty. Wiele bentosowych bezkręgowców morskich, które mają rozproszone stadium larwalne, wytwarza kępki długich rzęsek do pływania w fazie pelagicznej, a ich umieszczenie na płatach zwiększa objętość wody przemieszczanej na jeden stroke suw pomocniczy w stosunku do umieszczenia rzęsek na płaskiej powierzchni (Emlet, 1991). P. acroporae zachował dominującą strategię życiową spotykaną w innych polikadach cotylean, tj. rozwój pośredni poprzez formę larwalną, ale opóźnia wylęganie do momentu, gdy metamorfoza jest prawie zakończona. Nasze wyniki sugerują, że ponieważ wylęgane osobniki są zdolne do pływania i mają kępki żółciowe (a niektóre mają płatki), istnieje możliwość rozproszenia się między koloniami koralowymi. Ponieważ jednak są one również zdolne do pełzania i mogą przetrwać do 9 dni (stosunkowo krótki czas w porównaniu z wylęgami innych gatunków koralowców, omówionymi w Rawlinson, 2014 r.) w przypadku braku koralowców, mogliby móc osiedlać się przy właściwych wskazówkach. Nasz rozwój technik chowu i pomiary parametrów cyklu życiowego stanowią podstawę do badania, czy jakiekolwiek czynniki genetyczne i/lub epigenetyczne mogą wpływać na czas wylęgu, a także na przetrwanie i rozproszenie wylęgu.,

**Wpływ temperatury na cykl życia i czas trwania traktowania**

Często zdarza się, że zwierzęta poikilotermiczne wykazują podwyższone wskaźniki rozwoju przy podwyższonych temperaturach (Howe, 1967; Hoegh-Guldberg i Pearse, 1995; Golizadeh i in., 2007; Wudarski i in., 2019). Zjawisko to było historycznie badane przez entomologów w celu ustalenia metodologii zwalczania szkodników w rolnictwie, a ostatnio w celu zwalczania chorób pasożytniczych w akwakulturze (Tubbs i in., 2005; Brazenor i Hutson, 2015) . Znajomość czasów występowania kluczowych etapów cyklu życiowego w różnych temperaturach dla P. acroporae zwiększy skuteczność schematów leczenia zaburzających jego cykl życiowy i pomoże w rozwoju praktyk hodowli koralowców. Obecnie do leczenia zakażeń P. acroporae w niewoli stosuje się różne "dipy - substancje zanurzeniowe" (takie jak roztwory Levamisole HCl (patrz Carl, 2008) i inne produkty komercyjne). W tym miejscu sugerujemy, aby po wstępnym traktowaniu P. acroporae, kolonia żywiciela została poddana ponownemu leczeniu, w celu wyselekcjonowania nowych wylęgów po ich wyjściu z ochronnych kapsułek jajowych. Druga obróbka powinna mieć miejsce zanim potomstwo osiągnie dojrzałość płciową (ryc. 5 i tabela 2). Na przykład, jaja P. acroporae w akwarium działającym w temperaturze około 28°C zakończyłyby proces embrionizacji w ciągu około 11 dni (tabela 2). Zakładając, że młode te znajdą podatnego żywiciela Acropora, osiągną dojrzałość płciową w przybliżeniu 31 dni w temperaturze 28°C (Tabela 2). Dlatego też ta kolonia Acropora powinna zostać poddana drugiemu zabiegowi w okresie od 13 (11 dni okresu embrionalnego plus 1 lub 2 dni do osiedlenia) do 31 dni (przybliżony czas do osiągnięcia dojrzałości płciowej) po pierwszym zabiegu (ryc. 5). W tym przypadku (28°C) i przy wszystkich temperaturach, zalecamy zastosowanie drugiego zabiegu w odstępie czasowym dłuższym niż czas trwania zarodka, ale krótszym niż szacowany czas do osiągnięcia dojrzałości płciowej. Co ważne, w niniejszym badaniu nie oceniono jednak skuteczności żadnego z zabiegów chemicznych mających na celu usunięcie osobników P. acroporae, w związku z czym proponowana strategia leczenia musi być rygorystycznie oceniona (zob. Carl, 2008). Skuteczność tych zabiegów może być zwiększona poprzez mechaniczne usuwanie kapsułek jajowych za pomocą skalpela lub żyletki. Jeśli więcej niż jedna kolonia koralowców w systemie akwariowym jest zaatakowana, prawdopodobne jest ponowne zarażenie, jeśli wszystkie zaatakowane korale nie są leczone jednocześnie. Chociaż większość wylęgów P. acroporae będzie głodować w ciągu 2 dni bez materiału żywiciela, najbardziej odporne przetrwają do 9 dni. Dlatego też zaleca się, aby leczone koralowce były trzymane w izolowanym zbiorniku na kwarantannie pomiędzy kolejnymi zabiegami, jeśli to możliwe, ponieważ taka praktyka daje wystarczająco dużo czasu na zagłodzenie wszystkich wylęgów P. acroporae pozostawionych w zaatakowanym systemie. P. acroporae mogą składać jaja na większości twardych substratów, co może sprzyjać ponownemu zarażeniu, jeżeli tkanka Acropora jest nadal obecna.

Oprócz optymalizacji zabiegów zanurzania korali w celu przerwania cyklu życia płazińca, nasze dane mogą być również wykorzystywane do minimalizacji liczby P. acroporae w całym łańcuchu pokarmowym oraz do informowania o czasie trwania okresów odłogowania "wolnych od Acropora" w systemie. Stosunkowo powolny rozwój i słaby sukces wylęgowy P. acroporae w traktowaniu w 21°C sugeruje, że populacja w niewoli będzie niższa w chłodniejszych wodach. Chociaż niższe temperatury mogą być potencjalnie wykorzystane do ograniczenia liczby P. acroporae (np. podczas transportu koralowców), dostosowanie temperatury powinno opierać się przede wszystkim na tolerancji termicznej kolonii Acropora. Połączenie wiedzy na temat niższej tolerancji termicznej gatunku Acropora z naszymi prognozami czasowymi dotyczącymi pokoleń w różnych temperaturach (tabela 2) mogłoby pozwolić na znalezienie temperatury kompromisowej, która zminimalizowałaby stres koralowców związany z płazińcem i stres termiczny. Nasze dane mogą również prowadzić do okresów "odłogu" w systemie niewoli; na przykład, zwiększając temperaturę systemu do 30°C i nie dostarczając żywej tkanki Acropora, przewidzielibyśmy, że wszystkie pozostałe kapsułki jaj wylęgną się w ciągu 12 dni, a wszystkie kolejne wylęgnięte osobniki będą zagłodzone, jeśli będą trzymane przez kolejne 9 dni, co odpowiada 21-dniowemu okresowi odłogu. Z drugiej strony, w 24 stopniach ten sam proces trwałby 25 dni (tj. kapsułki z jajami wylęgałyby się w ciągu 16 dni, a wylęganie 9 dni - w okresie głodu).

**Skutki dla liczby dzikich populacji Prosthiostomum acroporae**

Badanie cyklu życia P. acroporae w niewoli daje podstawy do zrozumienia, jak populacje mogą zmieniać się sezonowo w środowisku naturalnym. Na podstawie naszych ustaleń można przewidzieć, że krótsze cykle życiowe w cieplejszych miesiącach mogą prowadzić do większego zagęszczenia populacji P. acroporae. W przeciwieństwie do tego, wydaje się, że rozwój P. acroporae znacznie spowalnia w chłodniejszych temperaturach, co wskazuje, że liczba dzikich populacji może ulegać znacznym wahaniom w ciągu roku. Na przykład, na rafie Davies, średnia roczna temperatura wody waha się od 29°C w grudniu do 23°C w kwietniu.

Podwyższone temperatury powierzchni morza (SST), przypisywane zmianom klimatycznym, już prowadzą do stresu termicznego populacji Acropora (De'ath i in., 2012; Hughes i in., 2017). Stres termiczny może predysponować koralowce do wyższych wskaźników śmiertelności z powodu aktywności pokarmowej koralowców [np. Drupella gastropod (Shaver i in., 2018)]. Wzrost zagęszczenia populacji P. acroporae podczas długotrwałego stresu termicznego może w podobny sposób zaostrzyć konsekwencje dla kolonii żywicieli Acropora, jeśli populacje płazińców nie będą kontrolowane przez ich naturalne drapieżniki. Identyfikacja (i ochrona) naturalnych drapieżników P. acroporae mogłaby pomóc ograniczyć ich liczebność w niewoli i na wolności. Poza potencjalnymi zagrożeniami związanymi ze zmianami klimatycznymi, jakie może stwarzać P. acroporae, nasze dane wskazują na kompromis między wzrostem a rozmnażaniem w różnych temperaturach. W chłodniejszych temperaturach P. acroporae wydają się poświęcać rozmiar w celu osiągnięcia dojrzałości płciowej, inwestując ewentualnie energię w reprodukcję ponad rozmiar ciała. Podczas gdy nie są znane ekologiczne konsekwencje zmniejszenia rozmiaru, ta fenotypowa plastyczność może być korzystna dla przetrwania w gradiencie temperatury wzdłuż GBR (21-30oC2; Berkelmans i Willis, 1999; Berkelmans i Van Oppen, 2006; Howells i in., 2013).

PODSUMOWANIE

Wyższe temperatury wody prowadzą do szybszego tempa rozwoju (przed i po wylęgu), krótszego czasu generacji i większego sukcesu wylęgowego koralowcowego płazińca P. acroporae. Dane i modele przedstawione w niniejszym opracowaniu wyszczególniają ramy czasowe dla parametrów cyklu życiowego w zakresie temperatur istotnych biologicznie, informacji krytycznych dla akwarystów chcących zaburzyć cykl życiowy koralowcowych płazińców. W miarę rozwoju handlu koralowcami potrzebne są bardziej skuteczne narzędzia zarządzania w celu kontrolowania liczby P. acroporae w warunkach niewoli, co obejmuje nie tylko lepiej ukierunkowane zabiegi chemiczne, ale również identyfikację naturalnych drapieżników P. acroporae, które są również odpowiednie do warunków niewoli.

DOSTĘPNOŚĆ DANYCH

Zbiory danych wygenerowane dla tego badania są dostępne na żądanie odpowiedniego autora (Barton, 2019).

WKŁAD AUTORA

JB, KH, DB, CH, CD i KR wymyślili badania i zaprojektowali eksperymenty. Eksperymenty przeprowadziły JB, KR i CD. JB przeanalizował te dane. JB i KR opracowały manuskrypt. Wszyscy autorzy przeczytali, skomentowali i uzgodnili treść rękopisu.

FUNDUSZE

Badanie to zostało sfinansowane przez James Cook University Development Grant, "Parasite cultivation techniques: in vitro and in vivo culture methods for ecological and applied aquatic parasitology research", przyznany KH. Dodatkowe fundusze do KR i CD zostały zebrane poprzez crowdfunding na Experiment.com (https://doi. org/10.18258/1621) oraz darowiznę od Atlanta Reef Club, Duluth, GA, Stany Zjednoczone.

PODZIĘKOWANIA .

Zespół Krajowego Symulatora Morskiego (Australian Institute of Marine Science) oraz Laboratorium Parazytologii Morskiej Uniwersytetu Jamesa Cooka zapewnił wsparcie logistyczne mające kluczowe znaczenie dla powodzenia tych eksperymentów. Prof. Rhondda Jones i Sally Lau udzieliły wsparcia statystycznego. Brett Bolte, Philip Jones i Rachel Neil pomagali w utrzymaniu kultur płazińców. Jonathan Armitage zbudował pierwszy system przesiewowy dla płazińców. Dziękujemy Edenowi Cartwrightowi (Bird Circus) za grafikę.

MATERIAŁ UZUPEŁNIAJĄCY

Materiały uzupełniające do tego artykułu można znaleźć na stronie internetowej: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2019.

00524/full# suplementarny-materiał

RYSUNEK S1 | Zmiany w morfologii wylęgania Prosthiostomum acroporae pomiędzy dwoma skupiskami jaj w temperaturze 27°C. (A) Młodeęta mają zmniejszone płaty (groty strzałkowe); (B) młodeęta ponownie wchłonęły płaty (skala = 100 p.m.).

RYSUNEK S2 | Metoda przesiewowa Prosthiostomum acroporae. (A) Zdjęcie całego układu przesiewania [Nally bin, 300 mikronowa komora przesiewowa PVC (strzałka), oraz wiadro 20 L]. (B) Wewnątrz pojemnika Nally, strumień przefiltrowanej wody morskiej jest używany do fizycznego usunięcia Prosthiostomum acroporae z powierzchni kolonii Acropora. (C) 300 p.m. Komora przesiewowa z PCV pełna P acroporae; z zakreślonymi reprezentatywnymi próbkami. (D) >100 P. acroporae przeniesione do plastikowej zlewki do celów doświadczalnych.

RYSUNEK S3 | Aby utrzymać liczbę kultur Prosthiostomum acroporae, plastik został przymocowany do koralowców za pomocą plastikowych kołków w celu dostarczenia podłoża do składania jaj.