



## Larval growth and development of the smooth clam *Callista chione* (Mollusca: Bivalvia) under laboratory conditions

### Crecimiento y desarrollo larvario del almejón de sangre *Callista chione* (Mollusca: Bivalvia) en condiciones de laboratorio

J Pérez-Larruscain<sup>1</sup>, M Delgado<sup>2\*</sup>, J Ignasi Gairín<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Centre de Aquicultura, Carretera del Poble Nou, Km 5.5, E-43540 Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain.

<sup>2</sup> Centro Oceanográfico de Cádiz (Instituto Español de Oceanografía), Muelle de Levante s/n, P.O. Box 2609, E-11006 Cádiz, Spain.

\* Corresponding author. E-mail: [marina.delgado@cd.ieo.es](mailto:marina.delgado@cd.ieo.es)

**ABSTRACT.** This study describes the first data on larval development and growth of the smooth clam *Callista chione* under two different temperature regimes (19 and 23 °C). The mean diameter of the oocytes was  $89.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$ . After seven days, the mean length of D-shaped larvae was  $132.9 \pm 7.8 \mu\text{m}$  at 19 °C and  $148.38 \pm 12.74 \mu\text{m}$  at 23 °C. Metamorphosis took place between days 32 and 39. Differences in length associated with different culture temperatures were statistically significant on days 11, 13, and 20. At 23 °C, larvae reached a length of  $175.15 \mu\text{m}$  within 11 days, whilst during the same period they reached  $137.88 \mu\text{m}$  at 19 °C (a difference in growth of 39%); however, survival rate was higher at 19 °C (8%) than at 23 °C (2%).

*Key words:* *Callista chione*, development, growth, larvae, temperature.

**RESUMEN.** Este trabajo describe los primeros datos sobre el desarrollo y el crecimiento larvario del almejón de sangre *Callista chione* bajo dos regímenes diferentes de temperatura (19 y 23 °C). El diámetro medio de los ovocitos observado fue de  $89.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$ . Después de siete días, el tamaño medio de las larvas D fue de  $132.9 \pm 7.8 \mu\text{m}$  a 19 °C y  $148.38 \pm 12.74 \mu\text{m}$  a 23 °C. La metamorfosis se llevó a cabo entre los días 32 y 39. Las diferencias de longitud asociadas a las diferentes temperaturas de cultivo fueron estadísticamente significativas en los días 11, 13 y 20. A 23 °C las larvas alcanzaron una longitud de  $175.15 \mu\text{m}$  a los 11 días, mientras que durante el mismo periodo alcanzaron  $137.88 \mu\text{m}$  a 19 °C (una diferencia en el crecimiento de 39%); sin embargo, la tasa de supervivencia fue mayor a 19 °C (8%) que a 23 °C (2%).

*Palabras clave:* *Callista chione*, desarrollo, crecimiento, larvas, temperatura.

## INTRODUCTION

The smooth clam *Callista* (= *Cytherea*) *chione* (Linnaeus 1758) is a venerid bivalve that is found on sandy sea bottoms along the Mediterranean and European Atlantic coasts at depths up to 180 m (Vidal *et al.* 2006). This species is of great commercial interest throughout the Mediterranean area, with Spain, Portugal, France, and Italy leading its consumption and production (Valli *et al.* 1994, Charles *et al.* 1999, Gaspar *et al.* 2002, Vidal *et al.* 2006). In spite of its commercial interest, information on its biology is scarce. Most studies have so far focused on the analysis of its growth parameters (Forster 1981, Gaspar *et al.* 2002, Metaxatos 2004, Leontarakis and Richardson 2005, Moura *et al.* 2009) or the gametogenic cycle (Valli *et al.* 1994, Tirado *et al.* 2002, Moura *et al.* 2008) of natural populations. To date, there is no information about larval development or growth. This contrasts with the abundant information available for other venerid species of commercial interest, such as *Ruditapes philippinarum*, *R. decussatus*, and *Venerupis*

## INTRODUCCIÓN

El almejón de sangre *Callista* (= *Cytherea*) *chione* (Linnaeus 1758) es un bivalvo venérico que se encuentra en el mar en fondos de arena a lo largo del Mediterráneo y las costas europeas del Atlántico, a profundidades de hasta 180 m (Vidal *et al.* 2006). Esta especie es de gran interés comercial en toda el área mediterránea, y España, Portugal, Francia e Italia son líderes en su consumo y producción (Valli *et al.* 1994, Charles *et al.* 1999, Gaspar *et al.* 2002, Vidal *et al.* 2006). A pesar de su interés comercial, la información sobre su biología es escasa. Hasta ahora la mayoría de los estudios se han centrado en el análisis de los parámetros de crecimiento (Forster 1981, Gaspar *et al.* 2002, Metaxatos 2004, Leontarakis y Richardson 2005, Moura *et al.* 2009.) o el ciclo gametogénico de las poblaciones naturales (Valli *et al.* 1994, Tirado *et al.* 2002, Moura *et al.* 2008). Hasta la fecha, no hay información sobre el desarrollo o el crecimiento larvario. Esto contrasta con la información abundante que está disponible para otras especies de venéricos de

*pullastra* (Pérez-Camacho 1980, Robinson and Breese 1984, Devauchelle 1990, among others).

This study offers the first description of the development and growth of *C. chione* larvae under two different temperature regimes. A basic knowledge of *C. chione* larvae is necessary both to improve larval rearing in hatcheries and to identify plankton and benthos samples in coastal marine environment studies.

## MATERIAL AND METHODS

Specimens of *C. chione* (35–50 mm) were collected from the sea at Maresme, Spain (Catalan coast, NE Mediterranean Sea), at a depth of 10 m, in August 2009. The smooth clams were then kept for two months in 60-L plastic tanks. The tanks had a layer of sand at the bottom and were connected to an open flow-through circuit containing natural seawater filtered through a 1- $\mu$ m mesh (temperature 15–16 °C). A peristaltic pump was used to add food to the circuit. The food ration consisted of 0.5% dry weight of a mixed diet: *Isochrysis galbana* clone T-ISO (20%: 56,200 cells mL<sup>-1</sup>), *Tetraselmis suecica* (20%: 5,620 cells mL<sup>-1</sup>), *Chaetoceros calcitrans* (40%: 74,950 cells mL<sup>-1</sup>), and *Phaeodactylum tricorutum* (20%: 37,380 cells mL<sup>-1</sup>).

Clams were induced to spawn in the laboratory. Induction was by thermal shock (30 min cycles at 12/20 °C) and the injection of serotonin (serotonin creatinine sulphate complex [H4452-16] Sigma-Aldrich; 4 mM, 0.2 mL per clam [Gros *et al.* 1999]) into the foot of the clam. When individuals began to spawn they were transferred to individual collector containers for the release of sperm or eggs. Spermatozoa and oocytes were then mixed by gentle agitation, at a ratio of about 50 sperm per oocyte to avoid polyspermy. After fertilization, the eggs were sieved to eliminate excess sperm. The gametes were then transferred to 300-L culture tanks containing aerated water.

After 52 h, D-stage larvae were extracted and placed on 48-well cell culture plates (EIA plates) as in Shields *et al.* (1997). Three D-larvae were distributed to each well (300  $\mu$ L) using an Eppendorf micropipette (100–1000  $\mu$ L) (larval density: 10 larvae mL<sup>-1</sup>). Five EIA plates were used for each experimental condition (replicates). Each well was filled with 1- $\mu$ m filtered, UV-treated seawater and two water temperatures were tested (19 and 23 °C). The temperatures 19 and 23 °C were selected because the natural spawning season of *C. chione* occurs in spring and autumn (Vidal *et al.* 2006), and this is the natural temperature range of this species. The well water was changed every two days using a micropipette under a light microscope. The plates were kept in an isothermal room at the selected temperature and at a photoperiod of 16:8 (light:darkness). During the first week, the larvae were fed on *I. galbana* clone T-ISO. From the second week, they were fed a mixed diet: *I. galbana* clone T-ISO (20%), *T. suecica* (20%), *C. calcitrans* (40%), and *P. tricorutum* (20%). Microalgae were supplied at each seawater renewal

interés comercial, tales como *Ruditapes philippinarum*, *R. decussatus* y *Venerupis pullastra* (Pérez-Camacho 1980, Robinson y Breese 1984, Devauchelle 1990).

Este estudio ofrece la primera descripción del desarrollo y el crecimiento larvario de *C. chione* bajo dos regímenes de temperatura diferentes. Es necesario un conocimiento básico de las larvas de *C. chione* para mejorar el cultivo larvario en los criaderos, así como para identificar las muestras de plancton y bentos en los estudios medioambientales de la costa marina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los reproductores de *C. chione* (35–50 mm) se recolectaron en la zona del Maresme, España (litoral catalán, NE Mar Mediterráneo), a una profundidad de 10 m, en agosto de 2009. Las almejas se mantuvieron en tanques de plástico de 60 L durante dos meses. Los tanques contenían una capa de arena en el fondo y estaban conectados a un sistema de circuito abierto con agua de mar filtrada a través de una malla con abertura de 1  $\mu$ m (temperatura 15–16 °C). Se usó una bomba peristáltica para añadir el alimento al circuito. La ración de alimento consistió en el 0.5% del peso seco de una dieta mixta: *Isochrysis galbana* clon T-ISO (20%: 56,200 células mL<sup>-1</sup>), *Tetraselmis suecica* (20%: 5,620 células mL<sup>-1</sup>), *Chaetoceros calcitrans* (40%: 74,950 células mL<sup>-1</sup>) y *Phaeodactylum tricorutum* (20%: 37,380 células mL<sup>-1</sup>).

La inducción a la puesta se realizó en el laboratorio mediante choque térmico (ciclos de 30 min a 12/20 °C) y la inyección de serotonina (complejo serotonina sulfato de creatinina [H4452-16] de Sigma-Aldrich; 4 mM, 0.2 mL por almeja [Gros *et al.* 1999]) en el pie de la almeja. Cuando las almejas comenzaron a desovar, éstas fueron trasladadas a contenedores individuales para la liberación de los gametos. Los espermatozoides y ovocitos se mezclaron mediante agitación suave, a una proporción cercana a 50 espermatozoides por ovocito para evitar la polispermia. Después de la fertilización, los huevos se tamizaron para eliminar el exceso de espermatozoides. Los ovocitos fecundados se pasaron enseguida a tanques de cultivo de 300 L con agua y aireación suave.

Transcurridas 52 h, las larvas D se extrajeron y se colocaron en placas de cultivo celular de 48 celdas (placas EIA), como en el estudio de Shields *et al.* (1997). Se distribuyeron tres larvas D en cada celda (300  $\mu$ L) utilizando una micropipeta Eppendorf (100–1000  $\mu$ L) (densidad de larvas: 10 larvas mL<sup>-1</sup>). Se utilizaron cinco placas de EIA para cada condición experimental (réplicas). Cada celda se llenó con agua de mar filtrada a 1  $\mu$ m y por rayos UV, y se probaron dos temperaturas de agua (19 y 23 °C). Las temperaturas de 19 y 23 °C se seleccionaron dado que la temporada de desove natural de *C. chione* es en primavera y otoño (Vidal *et al.* 2006) y éste es el intervalo de temperatura natural de esta especie. El agua en las celdas se cambió cada dos días

(every two days) at a concentration of 100 cells  $\mu\text{L}^{-1}$ . After the pediveliger larvae appeared (at around day 25), one larvae per well was kept. The plates were checked approximately once every four days in order to monitor the development phases and obtain growth rates. Ten larvae per plate (50 in total) were randomly selected and measured for individual length (anterior-posterior axis) under a Leyca DMI 3000B light microscope fitted with an eyepiece graticule.

### Data analysis

In order to compare sizes associated with the different culture temperatures, we used Student's *t*-test at a minimum significance level of  $P < 0.05$  and Fisher's *F*-test to compare variances. The Mann Whitney *U*-test was used when the normality of the data or the homogeneity of the variances could not be ensured.

## RESULTS

The oocytes were round (fig. 1a) and had a mean diameter of  $89.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$ . After oocyte fertilization, we observed the expulsion of the first polar groups (fig. 1b), which was followed by the division of the macromeres and the subsequent surrounding of macromeres by micromeres. The gastrula stage appeared after 12 h (fig. 1c), while typical pyriform, trocophore larvae were observed after 23 h (fig. 1d). D-shaped larvae were first observed after 52 h. After seven days, the mean length of the D-shaped larvae was  $132.9 \pm 7.8 \mu\text{m}$  at 19 °C (100% D-larvae) and  $148.4 \pm 12.7 \mu\text{m}$  at 23 °C (fig. 2). In figure 1e we can observe the active velum, digestive gland, and prodisoconch I and II. On day 11, umbonate larvae were observed (note the clear formation of the umbo in fig. 1f). The mean length of the umbonate larvae after 20 days was  $192.04 \pm 6.84 \mu\text{m}$  at 19 °C and  $202.5 \pm 10.9 \mu\text{m}$  at 23 °C (100% umbonate larvae). The pediveliger larval stage was observed from day 26 onwards. On day 32 (100% pediveliger larvae), the mean length was  $208.8 \pm 7.2 \mu\text{m}$  at 19 °C and  $213.3 \pm 16.7 \mu\text{m}$  at 23 °C. Some individuals with characteristics of metamorphosis were observed on day 21 in the experiment at 23 °C; however, metamorphosis mostly took place between days 32 and 39 ( $215.0 \pm 7.3 \mu\text{m}$  at 19 °C and  $221.03 \pm 17.4 \mu\text{m}$  at 23 °C) in both experiments. Finally, after 50 days, 90% of the individuals had reached the post-metamorphosis stage in both experiments.

As can be seen, differences in length associated with different culture temperatures were statistically significant on days 11, 13, and 20; for example, at 23 °C the larvae reached a length of  $175.15 \mu\text{m}$  within 11 days, whilst during the same period they reached  $137.88 \mu\text{m}$  at 19 °C (a difference in growth of 39%) (table 1).

At the end of the study the final survival percentage was better at 19 °C (8%) than at 23 °C (2%).

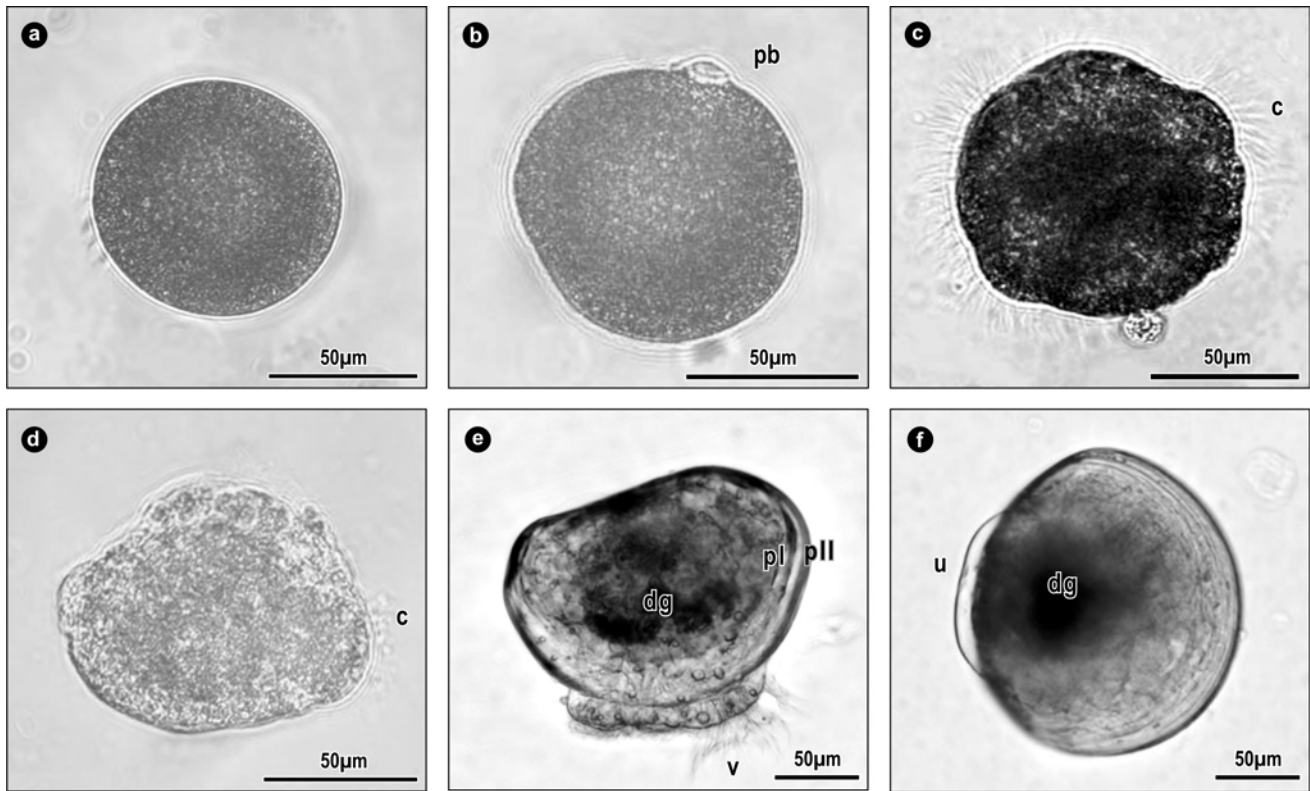
utilizando una micropipeta y bajo el microscopio. Las placas se mantuvieron en un cuarto isoterma a la temperatura seleccionada y con un fotoperiodo de 16:8 (luz:oscuridad). Durante la primera semana, las larvas fueron alimentadas con *I. galbana* clon T-ISO. A partir de la segunda semana, fueron alimentadas con una dieta mixta: *I. galbana* clon T-ISO (20%), *T. suecica* (20%), *C. calcitrans* (40%) y *P. tricorutum* (20%). Las microalgas fueron suministradas en cada renovación del agua de mar (cada dos días) a una concentración de 100 células  $\mu\text{L}^{-1}$ . Tras la aparición de la larva pediveliger (en torno al día 25), se mantuvo una larva por celda. Las placas se revisaron aproximadamente una vez cada cuatro días con el fin de supervisar las fases de desarrollo y obtener las tasas de crecimiento. Diez larvas por placa (50 en total) fueron seleccionados al azar y se midió su longitud individual (eje antero-posterior) bajo un microscopio Leyca DMI luz 3000B provisto de un micrómetro en el ocular.

### Análisis de los datos

Con el fin de comparar los tamaños asociados a las diferentes temperaturas de cultivo, se utilizó la prueba *t* de Student con un nivel mínimo de significación  $P < 0.05$  y la prueba *F* de Fisher para comparar las diferencias. La prueba *U* de Mann Whitney se utilizó cuando la normalidad de los datos o la homogeneidad de las varianzas no pudo garantizarse.

## RESULTADOS

Los ovocitos eran redondos (fig. 1a) y tenían un diámetro medio de  $89.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$ . Tras la fertilización, se observó la expulsión de los primeros grupos polares (fig. 1b), seguida por la división de los macrómeros, y posteriormente, los macrómeros en micrómeros. La fase de gástrula apareció después de 12 h (fig. 1c), mientras que las típicas larvas piriformes, las trocóforas, se observaron después de 23 h (fig. 1d). Las larvas en forma de D se observaron por primera vez a las 52 h. Después de siete días, la longitud media de la larva D fue de  $132.9 \pm 7.8 \mu\text{m}$  a 19 °C (100% de larva D) y de  $148.4 \pm 12.7 \mu\text{m}$  a 23 °C (fig. 2). En la figura 1e se puede observar el velo, la glándula digestiva, y la prodisoconcha I y II. Al día 11, se observaron larvas umbonadas (nótese la formación clara del umbo de la fig. 1f). La longitud media de las larvas umbonadas después de 20 días fue de  $192.04 \pm 6.84 \mu\text{m}$  a 19 °C y  $202.5 \pm 10.9 \mu\text{m}$  a 23 °C (100% de larvas umbonadas). La fase de larva pediveliger se observó del día 26 en adelante. En el día 32 (100% de pediveligeras) la longitud media fue de  $208.8 \pm 7.2 \mu\text{m}$  a 19 °C y  $213.3 \pm 16.7 \mu\text{m}$  a 23 °C. Se observaron los primeros individuos con características metamórficas el día 21 en el experimento a 23 °C; sin embargo, la metamorfosis, en gran medida, sucedió entre los días 32 y 39 ( $215.0 \pm 7.3 \mu\text{m}$  a 19 °C y  $221.03 \pm 17.4 \mu\text{m}$  a 23 °C) en ambos experimentos. Finalmente,



**Figure 1.** *Callista chione*. (a) Recently spawned oocyte. (b) Fertilized oocyte with polar body. (c) Ciliate gastrula. (d) Trocophore larva. (e) D-shaped larva. (f) Umbonate larva. Abbreviations: c, cilia; dg, digestive gland; pb, polar body; pI, prodisoconch I; pII, prodisoconch II; u, umbo formation; and v, ciliated velum.

**Figura 1.** *Callista chione*. (a) Ovocito recién expulsado. (b) Ovocito fertilizado con cuerpo polar. (c) Gástrula ciliada. (d) Larva trocófora. (e) Larva D. (f) Larva umbonada. Abreviaciones: c, cilio; dg, glándula digestiva; pb, cuerpo polar; pI, prodisoconcha I; pII, prodisoconcha II; u, formación de umbo; v, velo ciliado.

## DISCUSSION

With the exception of growth data for juveniles and adults from natural environments (Keller *et al.* 2002, Metaxatos 2004, Leontarakis and Richardson 2005, Moura *et al.* 2009), no background information was available about the biological aspects of the larvae of the smooth clam *C. chione*. This is the first study on the larval development and growth of this species. It is a first attempt to culture the larvae of *C. chione* and may also facilitate the recognition of *C. chione* in analyses of zooplankton. Positive larval identification can be verified by direct techniques like larval culture and the use of shell morphometrics, such as reference lengths and heights.

The size of the oocytes emitted from *C. chione* females ( $89.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$ ) was smaller than that reported by Metaxatos (2004) in histological observations of the same species. It should, however, be stressed that Metaxatos obtained the data by examining gonad smears. Oocytes of *C. chione* are similar in size to other venerid species such as *R. decussatus* (70  $\mu\text{m}$ ) or *V. pullastra* (70  $\mu\text{m}$ ) (Pérez-Camacho and Román-Cabello 1973), and smaller than in other venerid species such as *R. philippinarum* (100  $\mu\text{m}$ ) (Helm and Bourne 2004). The D-shaped larvae ( $132.8 \pm 7.8 \mu\text{m}$ ) and the umbonate larvae

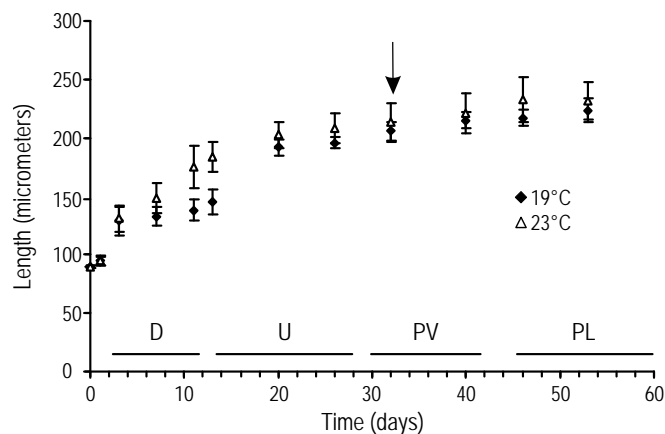
después de 50 días, el 90% de los individuos alcanzaron la fase postmetamórfica en ambos experimentos.

Como se puede observar, las diferencias de longitud asociadas a diferentes temperaturas de cultivo fueron estadísticamente significativas en los días 11, 13 y 20; por ejemplo, a 23 °C, las larvas alcanzaron una longitud de 175.15  $\mu\text{m}$  a los 11 días, mientras que durante el mismo periodo alcanzaron 137.88  $\mu\text{m}$  a 19 °C (una diferencia en el crecimiento del 39%).

Al final del estudio el porcentaje de supervivencia final fue mejor a 19 °C (8%) que a 23 °C (2%).

## DISCUSIÓN

A excepción de los datos de crecimiento de los jóvenes y adultos de poblaciones naturales (Keller *et al.* 2002, Metaxatos 2004, Leontarakis y Richardson 2005, Moura *et al.* 2009), no se dispone de información sobre los aspectos biológicos de las larvas del almejón de sangre *C. chione*. Éste es el primer estudio sobre el desarrollo y el crecimiento larvario de esta especie. Este trabajo es un primer acercamiento al cultivo de larvas de *C. chione* y también puede facilitar el reconocimiento de *C. chione* en los análisis de zooplankton.



**Figure 2.** Growth in length ( $\mu\text{m}$ ) of *Callista chione* larvae reared at 19 and 23 °C. Data plotted as mean  $\pm$  standard deviation. The black lines indicate the periods with  $>70\%$  presence of each larval phase at 19 °C: D, D-larvae; U, umbonate; PV, pediveliger; and PL, postlarvae. The arrow indicates the beginning of metamorphosis/settlement.

**Figura 2.** Crecimiento (longitud,  $\mu\text{m}$ ) de larvas de *Callista chione* cultivadas a 19 y 23 °C. Los datos se representan como media  $\pm$  desviación estándar. Las líneas negras indican los periodos con presencia  $>70\%$  de cada fase larvaria a 19 °C: D, larva D; U, umbonada; PV, pediveliger; PL, postlarva. La flecha indica el inicio de la metamorfosis/fijación.

( $192.0 \pm 6.8 \mu\text{m}$ ) of *C. chione* were also significantly longer than *R. decussatus* ( $110 \mu\text{m}$ ) (Pérez-Camacho and Román-Cabello 1973, Pérez-Camacho *et al.* 1977).

The temperatures 19 and 23 °C were tested because the natural spawning season of *C. chione* occurs in spring and autumn, and in this range of temperature according to Vidal *et al.* (2006). It is well known that increases in culture temperature shorten the larval period of many bivalves and this was also observed in our study. In fact, within the range of temperatures assayed in our experiments, growth was directly proportional to temperature and was lower at 19 °C than at 23 °C (table 1) during the first 20 days.

An increase in water temperature accelerates most physiological processes (clearance, ingestion, and respiration rates) in animals whose body temperatures fluctuate with

La identificación de larvas puede ser ejecutada por técnicas directas, como el cultivo larvario, y el uso de parámetros morfométricos, tales como longitud y altura.

El tamaño de los ovocitos que emiten las hembras de *C. chione* ( $89.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$ ) fue menor que el registrado por Metaxatos (2004) en las observaciones histológicas de la misma especie. Se debe tener en cuenta, sin embargo, que Metaxatos obtuvo sus datos mediante el examen de frotis gonadal. Los ovocitos de *C. chione* son similares en tamaño a otras especies de venéridos como *R. decussatus* ( $70 \mu\text{m}$ ) o *V. pullastra* ( $70 \mu\text{m}$ ) (Pérez-Camacho y Román Cabello 1973), y más pequeños que los de otras especies de venéridos como *R. philippinarum* ( $100 \mu\text{m}$ ) (Helm y Bourne 2004). Las larvas D ( $132.8 \pm 7.8 \mu\text{m}$ ) y las larvas umbonadas ( $192.0 \pm 6.8 \mu\text{m}$ ) de *C. chione* fueron también, significativamente, de mayor longitud que *R. decussatus* ( $110 \mu\text{m}$ ) (Pérez-Camacho y Román Cabello 1973, Pérez-Camacho *et al.* 1977).

Se probaron las temperaturas de 19 y 23 °C dado que la temporada de desove natural de *C. chione* es en primavera y otoño, y en este intervalo de temperatura de acuerdo con Vidal *et al.* (2006). Es bien sabido que el aumento de la temperatura de cultivo acorta el periodo larvario de los bivalvos, y esto también se observó en nuestro estudio. De hecho, dentro del intervalo de temperaturas ensayadas en nuestros experimentos, el crecimiento fue directamente proporcional a la temperatura y fue más lento a 19 °C que a 23 °C (tabla 1) durante los primeros 20 días.

Un aumento en la temperatura del agua acelera la mayoría de los procesos fisiológicos (filtración, ingestión y tasas de respiración) en los animales cuya temperatura corporal fluctúa con la temperatura externa, como es el caso de los bivalvos (Walne 1972). Por otro lado, Lucas *et al.* (1986) establecieron tres periodos diferentes de niveles tróficos para larvas de *Mytilus edulis* cultivadas a 17–20 °C: un periodo endotrófico inicial de dos días, cuando las necesidades energéticas son exclusivamente cubiertas por las reservas vitelinas del huevo; un periodo mixotrófico, que se distingue por la importancia cada vez mayor de la actividad alimentaria; y un periodo exotrófico posterior, que es completamente sostenido por el alimento, en este caso las algas. Según estos autores, la ausencia de diferencias en la longitud observada

**Table 1.** Comparison of larval size (19 °C vs 23 °C) on days 3, 11, 13, 20, 40, and 53 (mean  $\pm$  standard deviation).

**Tabla 1.** Comparación del tamaño larvario (19 °C vs 23 °C) en los días 3, 11, 13, 20, 40 y 53 (media  $\pm$  desviación estándar).

Day	Size		Test	P value	n	
	19 °C	23 °C			19 °C	23 °C
3	129.06 $\pm$ 12.33	131.26 $\pm$ 11.16	t-test	0.350	50	50
11	137.88 $\pm$ 8.96	175.15 $\pm$ 17.83	t-test	0.000	49	50
13	145.20 $\pm$ 10.48	183.79 $\pm$ 13.05	Mann-Whitney U-test	0.000	51	50
20	192.04 $\pm$ 6.85	202.46 $\pm$ 10.89	t-test	<0.001	50	50
40	215.01 $\pm$ 7.19	221.03 $\pm$ 17.40	Mann-Whitney U-test	0.386	50	43
53	223.44 $\pm$ 10.08	231.67 $\pm$ 16.31	Mann-Whitney U-test	0.121	50	42

external temperature, as is the case of bivalves (Walne 1972). On the other hand, Lucas *et al.* (1986) established three different trophic periods in *Mytilus edulis* larvae reared at 17–20 °C: an initial endotrophic period of two days, in which energy requirements are exclusively covered by egg vitelline reserves; a mixotrophic period, which is distinguished by the increasing importance of feeding activity; and a subsequent exotrophic period, which is completely sustained by algal food. According to these authors, the lack of differences in length observed in our study on day 3 would indicate that growth was exclusively sustained by egg reserves. Differences observed beyond day 11 would support the purported importance of feeding activity during the mixotrophic period and the positive influence of temperature on ingestion rates. When larvae underwent metamorphosis (about 210 µm; this phase is critical for bivalves), their increase in length displayed a sharp decline under both of our experimental conditions, so the differences observed between temperatures is minimal. On the other hand, survival rates were better for the lower temperature (19 °C). In conclusion, for tested temperatures, 19 °C is the most suitable temperature for culture of these phases if growth and survival data are pooled.

In any case, survival results were low in both experiments compared with the results obtained for other species with well-established culturing methods like *R. philippinarum*. Other parameters such as new diets (and their nutritional value), stocking density, light intensity, settlement triggering factors, or other environmental factors need to be studied in the future to advance in the knowledge of the species. Furthermore, the study of synergistic effects of the combination of several factors is recommended.

This study presents the first description of the larval development of *C. chione* in a hatchery system; however, research should continue to find the most appropriate nutritional and/or environmental conditions for the development of larval cultures of this species.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by the Junta Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR): “Cultivo de nuevas especies de moluscos bivalvos de interés en hatcheries” (Spanish Government). We would like to thank the staff at IRTA-Sant Carles de la Rapita for their technical assistance, in particular M Monllaó, M Matas, S Molas, and N Soler. We are also grateful to M Pulido and C Lletí (USM-IRTA) for providing the *C. chione* adults used in this study.

## REFERENCES

- Charles F, Amoroux JM, Grémare A. 1999. Comparative study of the utilization of bacteria and microalgae by the suspension-feeding bivalve *Callista chione*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 79: 377–384.
- Devauchelle N. 1990. Sexual development and maturity of *Tapes philippinarum*. In: ESAV (ed.), *Tapes philippinarum*. *Biologia e Sperimentazione*, Verone, pp. 47–62.

en el presente estudio el día 3 indicaría que el crecimiento se sostuvo exclusivamente por las reservas del huevo. Las diferencias observadas después del día 11 apoyarían la importancia de la supuesta actividad alimentaria durante el periodo mixotrófico y la influencia positiva de la temperatura sobre las tasas de ingestión. Cuando las larvas sufrieron la metamorfosis (alrededor de 210 µm; esta fase es crucial para los bivalvos), el incremento de la longitud mostró un fuerte descenso en las dos condiciones experimentales, de forma que las diferencias observadas entre temperaturas fue mínima. Por otra parte, las tasas de supervivencia fueron mejores para la temperatura más baja (19 °C). Como conclusión, si se agrupan los datos de crecimiento y supervivencia, 19 °C resulta ser la temperatura más apropiada para el cultivo de estas fases.

En cualquier caso, los resultados de supervivencia fueron bajos en ambos experimentos en comparación con los resultados obtenidos para otras especies con métodos de cultivo bien establecidos, como en el caso de *R. philippinarum*. Otros parámetros como las dietas nuevas (y su valor nutricional), la densidad de cultivo, intensidad de la luz, factores desencadenantes de la fijación u otros factores ambientales deben ser estudiados en el futuro para avanzar en el conocimiento de la especie. Además, se recomienda el estudio de los efectos sinérgicos de la combinación de varios factores.

Este trabajo presenta la primera descripción del desarrollo larvario de *C. chione* en un sistema de criadero. Sin embargo, se debe seguir investigando para encontrar la dieta nutricional más adecuada y/o condiciones ambientales para el desarrollo del cultivo larvario de esta especie.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por la Junta Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR): “Cultivo de nuevas especies de moluscos bivalvos de interés en hatcheries” (Gobierno español). Se agradece al personal que trabaja en el IRTA-Sant Carles de la Rápita su asistencia técnica, especialmente a M Monllaó, M Matas, S Molas y N Soler. También estamos agradecidos a M Pulido y C Lletí (USM-IRTA) por proporcionar los reproductores de *C. chione* utilizados en este estudio.

- Forster GR. 1981. The age and growth of *Callista chione*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 61: 881–883.
- Gaspar MB, Santos MN, Vasconcelos P, Montero CC. 2002. Shell morphometric relationships of the most common bivalve species (Mollusca: Bivalvia) of the Algarve coast (southern Portugal). *Hydrobiologia* 477: 73–80.
- Gros O, Duplessis MR, Felbeck H. 1999. Embryonic development and endosymbiont transmission mode in the symbiotic clam *Lucinoma aequizonata* (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebr. Reprod. Dev.* 36: 93–103.

- Helm MM, Bourne N. 2004. Hatchery culture of bivalves: A practical manual. FAO Fisheries Technical Paper No. 471, Publishing Management Services, FAO, Rome.
- Keller N, Del Piero D, Longinelli A. 2002. Isotopic composition, growth rates and biological behaviour of *Chamelea gallina* and *Callista chione* from the Gulf of Trieste (Italy). *Mar. Biol.* 140: 9–15.
- Leontarakis PK, Richardson CA. 2005. Growth of the smooth clam *Callista chione* (Linnaeus 1758) (Bivalvia: Veneridae) from the Thracian Sea, northeastern Mediterranean. *J. Molluscan Stud.* 71: 189–198.
- Lucas A, Chebab-Chalabi L, Aldana Aranda D. 1986. Transition from endotrophy of exotrophy in the larvae of *Mytilus edulis* L. *Oceanol. Acta* 9: 97–103.
- Metaxatos A. 2004. Population dynamics of the venerid bivalve *Callista chione* (L.) in a coastal area of the eastern Mediterranean. *J. Sea Res.* 52: 293–305.
- Moura P, Gaspar MB, Monteiro CC. 2008. Gametogenic cycle of the smooth clam *Callista chione* on the southwestern coast of Portugal. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 88: 161–167.
- Moura P, Gaspar MB, Monteiro CC. 2009. Age determination and growth rate of a *Callista chione* population from the southwestern coast of Portugal. *Aquat. Biol.* 5: 97–106.
- Pérez-Camacho A. 1980. Biología de *Venerupis pullastra* (Montagu 1803) y *Venerupis decussata* (Linne 1767) (Mollusca, Bivalvia), con especial referencia a los factores determinantes de la producción. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 281: 44–74.
- Pérez-Camacho A, Román-Cabello G. 1973. Desarrollo larvario de *Venerupis pullastra*. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 165: 1–36.
- Pérez-Camacho A, Román G, Torre M. 1977. Experiencias en cultivos de larvas de tres especies de moluscos bivalvos: *Venerupis pullastra* (Montagu), *Venerupis decussata* (Linnaeus) y *Ostrea edulis* (Linnaeus). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 235: 11–60.
- Robinson AM, Breese WP. 1984. Gonadal development and hatchery rearing techniques for the Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve). *J. Shellfish Res.* 4: 161–163.
- Shields RJ, Brown NP, Bromage NR. 1997. Blatomere morphology as a predictive measure of fish egg viability. *Aquaculture* 155: 1–12.
- Tirado C, Salas C, López JI. 2002. Reproduction of *Callista chione* L. 1758 (Bivalvia: Veneridae) in the littoral of Málaga (southern Spain). *J. Shellfish Res.* 21: 643–648.
- Valli G, Marsich N, Marsich MG. 1994. Riproduzione, biometria e contenuto di metalli in *Callista chione* (L.) (Mollusca: Bivalvia) del Golfo di Trieste nel corso di un ciclo annuale. *Boll. Soc. Adriat. Scien.* LXXV (II): 441–464.
- Vidal JR, Baeta M, Ramon M. 2006. Avaluació de l'estat del banc natural de la lluenta (*Callista chione*) del Maresme. *Ecoprogress-Direcció General de Pesca i Afers Marítics*. Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca (Generalitat de Catalunya), Barcelona.
- Walne PR. 1972. The influence of current speed, body size and water temperature on the filtration rate of five species of bivalves. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 52: 345–374.

*Received November 2010;  
accepted May 2011.*