

## Effect of temperature on the culture of larvae of the bivalve *Mytilus chilensis* originated from broodstocks from different latitudes in a controlled environment

## Efecto de la temperatura en el cultivo de larvas del bivalvo *Mytilus chilensis* originadas por reproductores de distintas latitudes en ambiente controlado

L Lagos<sup>1,3+</sup>, I Uriarte<sup>2,3\*</sup>, G Yany<sup>4</sup>, M Astorga<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Hatchery de Invertebrados Marinos, Universidad Austral de Chile, Sede Puerto Montt, Chile.

<sup>2</sup> Instituto de Acuicultura, Universidad Austral de Chile, PO Box 1327, Puerto Montt, Chile.

<sup>3</sup> CIEN Austral, Los Pimientos 4369, Valle Volcanes, Puerto Montt, Chile.

<sup>4</sup> Escuela de Ciencias del Mar, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Avda. Altamirano 1505, Valparaíso, Chile.

<sup>+</sup> Programa Doctorado Acuicultura, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

\* Corresponding author. E-mail: iuriarte@spm.uach.cl

**ABSTRACT.** D-veliger larvae from *Mytilus chilensis* broodstocks from natural banks of Punta Arenas and Chiloé (Chile) were grown at  $9 \pm 0.5$  °C and  $15 \pm 0.5$  °C to compare results under two culture temperatures. During this experiment, larvae were fed *Isochrysis galbana* (clone T-ISO). The larvae were grouped into four groups depending on origin of broodstock and the culture temperature. The growth rate was statistically higher in the group from Punta Arenas at 15 °C, while settlement length was smaller in the group from Chiloé at 9 °C. In both cases, the remaining groups did not differ significantly. Settlement survival showed no significant differences between populations and temperatures. Both populations showed a better use of accumulated thermal units (°C day<sup>-1</sup>) during growth at 9 °C than at 15 °C. Despite the genetic differentiation of the Punta Arenas population, the productive outcome of *M. chilensis* larvae from broodstocks from different latitudes is similar.

**Key words:** mussels, larvae, survival, growth, temperature.

**RESUMEN.** Se obtuvieron larvas veliger D de reproductores de *Mytilus chilensis* procedentes de Punta Arenas y Chiloé (Chile), y se cultivaron a  $9 \pm 0.5$  °C y  $15 \pm 0.5$  °C para comparar los resultados del cultivo larvario de las dos poblaciones a dos temperaturas. Durante el experimento, las larvas fueron alimentadas con *Isochrysis galbana* (Clon T-ISO). Las larvas fueron cultivadas en cuatro grupos dependiendo del origen y la temperatura. La tasa de crecimiento fue estadísticamente mayor en el grupo de Punta Arenas a 15 °C, y el tamaño de fijación fue menor en el grupo de Chiloé a 9 °C. En ambos casos, los restantes grupos no presentaron diferencias significativas. La supervivencia hasta la fijación no presentó diferencias significativas entre poblaciones ni entre temperaturas. En ambas poblaciones se observó un mejor aprovechamiento de las unidades térmicas acumuladas (°C día<sup>-1</sup>) en el crecimiento a 9 °C que a 15 °C. El resultado productivo de larvas de *M. chilensis* generadas por reproductores de distintas latitudes es similar, pese a la diferenciación genética de la población de Punta Arenas.

**Palabras clave:** mitflidos, larvas, supervivencia, crecimiento, temperatura.

### INTRODUCTION

*Mytilus chilensis* (Hupé 1854) is an important aquaculture species in Chile, its production having increased from 3352 t in 1992 to 175,728 t in 2009 (FAO 2010). This increase is due to the greater number of maritime concessions and to the industrialization of the cultures (Ruiz *et al.* 2008, Toro *et al.* 2008). Larval development takes between 20 (Ruiz *et al.* 2008) and 45 days (Toro *et al.* 2006) and passes through several stages until settlement (D-veliger larva, umbonate veliger larva, pediveliger larva, and metamorphic larva). This species has a dispersal potential of hundreds of kilometers, and there is little genetic and morphological differentiation along 1900 km of coastline southwards from the Gulf of

### INTRODUCCIÓN

*Mytilus chilensis* (Hupé 1854) es un mitflido muy importante para la acuicultura en Chile; su producción ha incrementado de 3352 t en 1992 a 175,728 t en 2009 (FAO 2010). Este aumento ha sido posible debido al mayor número de concesiones marítimas y a la industrialización de los cultivos (Ruiz *et al.* 2008, Toro *et al.* 2008). El desarrollo larvario puede durar entre 20 (Ruiz *et al.* 2008) y 45 días (Toro *et al.* 2006) y pasa por varios estados hasta la fijación (larva véliger D, larva véliger umbonada, larva pedivéliger, larva metamórfica). Esta especie tiene un potencial de dispersión de cientos de kilómetros, y existe muy baja diferenciación genética y morfológica a lo largo de casi 1900 km de línea de

Arauco, only the Punta Arenas population showing a slight differentiation (Toro *et al.* 2004a, 2004b, 2006).

The latitudinal difference among populations implies different mean temperatures. While studies have shown that the growth of bivalve larvae is positively related to temperature (Lutz and Kennish 1992, Beaumont *et al.* 2004, Ruiz *et al.* 2008, Rico-Villa *et al.* 2009, Galley *et al.* 2010), the growth of larvae from natural populations separated by several degrees of latitude has not been compared. The objective of this study was to determine whether *M. chilensis* larvae originating from broodstocks from different latitudes (Chiloé and Punta Arenas), with slight genetic differentiation (Toro *et al.* 2004a, 2004b, 2006), exhibit differences in their growth and survival rates at the same culture temperatures. This comparison of the larval development of these two *M. chilensis* populations will help to determine their potential for hatchery seed production.

### MATERIAL AND METHODS

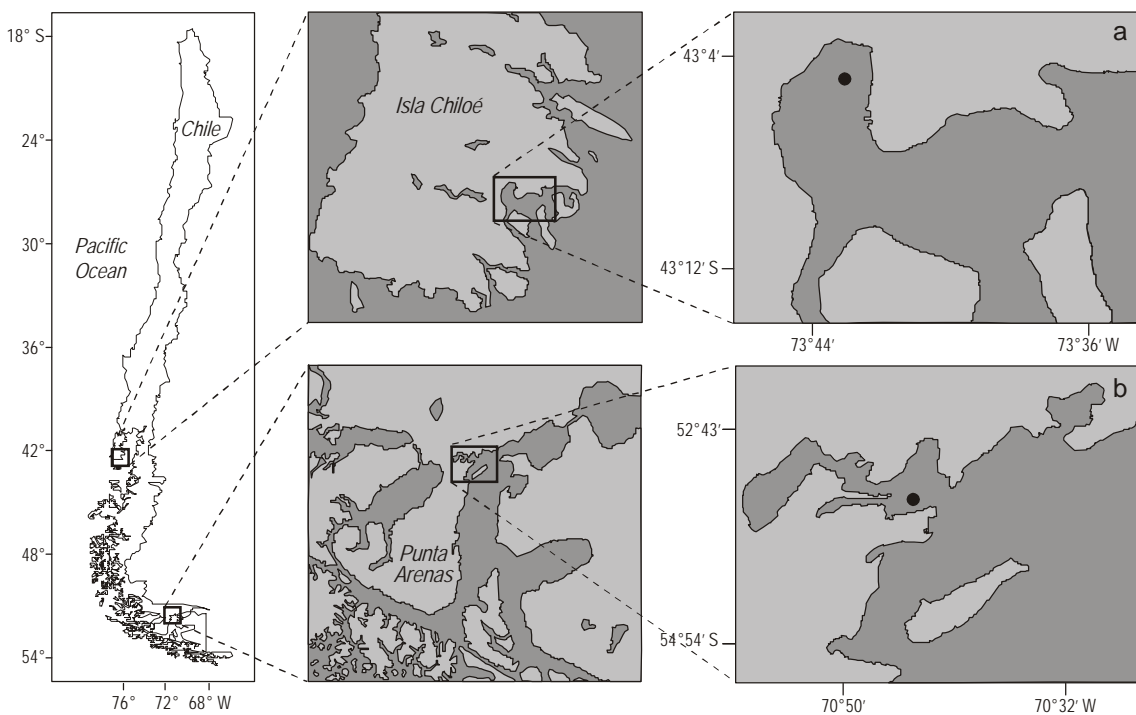
In winter 2010, specimens of the mussel *M. chilensis* were collected from natural banks at Punta Arenas (52°46' S, 70°47' W) and Chiloé (43°50' S, 73°30' W) (fig. 1); their mean lengths were  $79.6 \pm 4.9$  mm and  $71.8 \pm 7.1$  mm, respectively. Ninety-six specimens from each population were acclimated and conditioned at the Marine Invertebrate Hatchery of the Austral University of Chile (Universidad Austral de Chile) at Puerto Montt, at both  $9 \pm 0.5$  °C and  $15 \pm 0.5$  °C.

costa, desde el golfo de Arauco hacia el sur, salvo una leve diferenciación en la población de Punta Arenas (Toro *et al.* 2004a, 2004b, 2006).

La diferencia latitudinal entre poblaciones conlleva diferentes medias térmicas. Pese a que en la literatura se ha relacionado positivamente al crecimiento larvario de los bivalvos con la temperatura (Lutz y Kennish 1992, Beaumont *et al.* 2004, Ruiz *et al.* 2008, Rico-Villa *et al.* 2009, Galley *et al.* 2010), no se ha comparado el crecimiento de larvas provenientes de ejemplares de poblaciones naturales separadas entre sí por varios grados de latitud. El objetivo de este estudio fue determinar si las larvas de *M. chilensis* provenientes de reproductores de diferentes latitudes (Chiloé y Punta Arenas), con una leve diferenciación genética (Toro *et al.* 2004a, 2004b, 2006), presentan diferencias en la tasa de crecimiento y en el porcentaje de supervivencia a iguales temperaturas de cultivo. Esta comparación del desarrollo larvario de las dos poblaciones de *M. chilensis* ya mencionadas ayudará a determinar su potencial para la producción de semilla en criadero.

### MATERIALES Y MÉTODOS

En invierno de 2010 se recolectaron ejemplares de *M. chilensis* de bancos naturales en Punta Arenas (52°46' S, 70°47' O) y Chiloé (43°50' S, 73°30' O) (fig. 1); su longitud promedio fue de  $79.6 \pm 4.9$  mm y  $71.8 \pm 7.1$  mm, respectivamente. De cada población, 96 ejemplares fueron aclimatados



**Figure 1.** Collection sites of *Mytilus chilensis*: (a) Yaldad, Chiloé; (b) Zenteno Bay, Punta Arenas.

**Figura 1.** Localidades de recolección de ejemplares de *Mytilus chilensis* (a) Yaldad, Chiloé; (b) bahía Zenteno, Punta Arenas.

They were fed a mixed microalgal diet of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros neogracile* (1:1); a total daily ration of 400,000 cells mL<sup>-1</sup> was pulse-supplied during the day. After conditioning, D-veliger larvae of *M. chilensis* were obtained by inducing spawning through heat shock. To compare the different latitudes, expressed by the conditioning temperatures, the D-larvae obtained were cultured separately per population (Punta Arenas and Chiloé) and temperature (9 ± 0.5 °C and 15 ± 0.5 °C), forming four population-temperature groups. Each group was placed in 3-L containers (four replicates per group) and cultured until settlement. The initial density was 10 larvae mL<sup>-1</sup>. The seawater was filtered (1 µm) and sterilized by UV irradiation; 100% of the water was renewed every two days and constant aeration was supplied. Larvae were fed *I. galbana* (clone T-ISO) at a daily concentration of 50,000 cells mL<sup>-1</sup> per container. Temperature was measured daily until the end of the experiment, calculating the accumulated thermal units (ATU or °C day<sup>-1</sup>) since hatching.

The culture water was renewed every two days. Larvae were sieved and sampled using 10 aliquots (1 mL in total) that were observed and counted under a Zeiss optical microscope with 4× and 10× magnification. Photographs of the larvae were taken during each sampling using a Zeiss Stemi 2000-C stereo microscope and Canon G10 camera with 5× optical zoom. Maximum larval length was measured using the Zeiss AxioVision 4.0 software. Larval growth rate (µm day<sup>-1</sup>) and survival were calculated. The culture was maintained until 100% of the larvae had reached the pediveliger stage or were close to settlement and metamorphosis. For the statistical analysis of each result, after verifying the normal distribution of the data (Kolmogorov-Smirnov test) and assessing the homogeneity of variance (Levene test), a two-way analysis of variance (ANOVA) was performed. Tukey's multiple comparison test was then applied. In the analysis of the larval growth rate, in which the homogeneity of variance was not met, an ANOVA by ranks (Kruskal-Wallis test) was applied followed by a two-tailed multiple comparison test. All analyses were performed using Statistica 7.0 (StatSoft Inc.).

## RESULTS

The growth rate of the Chiloé population ranged from 2.12 to 3.92 µm day<sup>-1</sup> at 9 °C and from 2.89 to 5.90 µm day<sup>-1</sup> at 15 °C, while that of the Punta Arenas population varied between 2.98 and 4.62 µm day<sup>-1</sup> at 9 °C and between 4.07 and 4.76 µm day<sup>-1</sup> at 15 °C. The average total growth rate was lower (Kruskal-Wallis  $P < 0.05$ ) at 9 °C than at 15 °C for both populations and for the larvae originated from specimens from Chiloé relative to those from Punta Arenas, at both temperatures (Kruskal-Wallis  $P < 0.05$ ; table 1, fig. 2). In all the population-temperature groups, the period of higher growth was during the transition from umbonate to pediveliger larval stage (fig. 2). Final larval length for the Chiloé

y acondicionados en el Hatchery de Invertebrados Marinos de la Universidad Austral de Chile (Puerto Montt), tanto a 9 ± 0.5 °C como a 15 ± 0.5 °C. Los ejemplares fueron alimentados con las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros neogracile* (1:1); la ración total diaria fue de 400,000 cél mL<sup>-1</sup> y se suministró mediante pulsos durante el día. Concluidos los acondicionamientos, se originaron larvas veliger D de *M. chilensis* mediante el desove inducido por shock térmico. Para comparar las diferentes latitudes, expresadas por las temperaturas de acondicionamiento, las larvas veliger D obtenidas fueron cultivadas por separado por población (Punta Arenas y Chiloé) y temperatura (9 ± 0.5 °C y 15 ± 0.5 °C), formando cuatro grupos de población-temperatura. Cada grupo se dispuso en contenedores de 3 L de capacidad, con cuatro réplicas por grupo, y se cultivó hasta la fijación. La densidad inicial fue de 10 larvas mL<sup>-1</sup>. El agua de mar fue filtrada a 1 µm y esterilizada con luz UV; se hicieron recambios de agua completos cada dos días y se suministró aireación constante. Las larvas fueron alimentadas con *I. galbana* (Clon T-ISO) a una concentración diaria de 50,000 cél mL<sup>-1</sup> por contenedor. Diariamente y hasta el fin del experimento, se midió la temperatura, calculándose las unidades térmicas acumuladas (UTA ó °C día<sup>-1</sup>) transcurridas desde la eclosión.

Cada dos días se cambió el agua de cultivo. Las larvas se tamizaron y se muestrearon mediante 10 alícuotas (1 mL en total) que se observaron y contaron en microscopio óptico Zeiss con aumentos de 4× y 10×. También se tomaron fotografías de las larvas en cada muestreo con una cámara Canon G10 con aumento de 5× sobre una lupa Zeiss modelo Stemi 2000-C. Se midió la longitud máxima de las larvas con el programa Axio Vision 4.0 (Carl Zeiss). Se calcularon la supervivencia y la tasa de crecimiento larvaria (µm día<sup>-1</sup>). El cultivo se mantuvo hasta que el 100% de las larvas se encontraron en el estado de pediveliger y próximas a la fijación y metamorfosis. Para el análisis estadístico de cada resultado, después de la previa comprobación de la distribución normal de los datos (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y la determinación de la homogeneidad de varianza (prueba de Levene), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. Posteriormente, se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. En el análisis de la tasa de crecimiento larvario, en que no se cumplió el principio de homogeneidad de varianza, se utilizó un ANOVA por rangos (prueba de Kruskal-Wallis) seguido de una prueba de comparaciones múltiples de dos colas. Todos los análisis se realizaron con el software Statistica 7.0 (StatSoft Inc).

## RESULTADOS

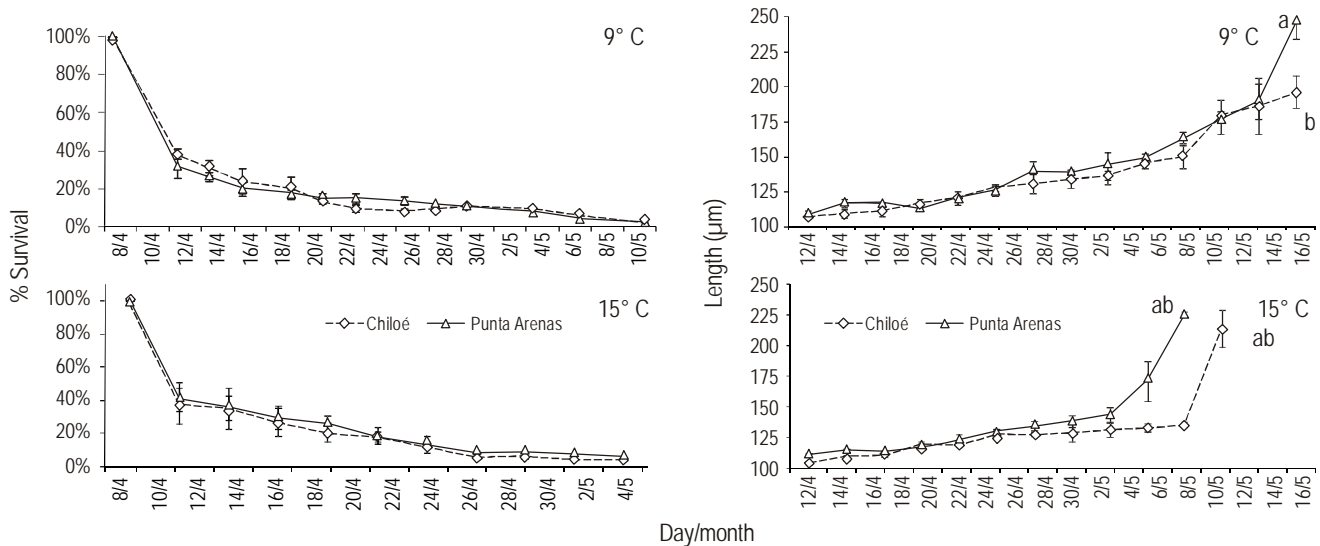
La tasa de crecimiento de la población de Chiloé varió entre 2.12 y 3.92 µm día<sup>-1</sup> a 9 °C y entre 2.89 y 5.90 µm día<sup>-1</sup> a 15 °C. Para la población de Punta Arenas, la fluctuación fue entre 2.98 y 4.62 µm día<sup>-1</sup> a 9 °C y entre 4.07 y 4.76 µm día<sup>-1</sup> a 15 °C. El promedio de la tasa de crecimiento total fue menor (Kruskal-Wallis  $P < 0.05$ ) a 9 °C que a 15 °C para

population ranged from 173.70 to 239.44  $\mu\text{m}$  at 9 °C and from 182.27 to 258.28  $\mu\text{m}$  at 15 °C, whereas for the Punta Arenas population it ranged from 200.08 to 264.05  $\mu\text{m}$  at 9 °C and from 218.49 to 231.56  $\mu\text{m}$  at 15 °C. On average, final larval length was significantly higher for the Punta Arenas group at 9 °C and lower for the Chiloé group at 9 °C (ANOVA  $P < 0.05$ ; table 1), while differences were not observed for the other population-temperature groups (ANOVA  $P > 0.05$ ).

In the Chiloé population, the D-veliger larval stage continued until day 13 (4% of total larvae) at 9 °C and until day 11 (10% of total larvae) at 15 °C, the umbonate stage extended from day 4 (42% of total larvae) to day 35 (11% of total larvae) at 9 °C and from day 6 (42% of total larvae) to day 29 (67% of total larvae) at 15 °C, and the pediveliger stage appeared on day 33 (14% of total larvae) at 9 °C and on day 29 (33% of total larvae) at 15 °C (fig. 3); the time of development until settlement for all the population was 39 days at 9 °C and 33 days at 15 °C. In the Punta Arenas population, the D-veliger larval stage lasted until day 8 (11% of total larvae) at 9 °C and until day 11 (11% of total larvae) at 15 °C, the umbonate stage extended from day 4 (37% of total larvae) to day 33 (20% of total larvae) at 9 °C and from day 4 (50% of total larvae) to day 26 (40% of total larvae) at 15 °C, and the pediveliger stage appeared on day 29 (60% of total larvae) at 9 °C and on day 26 (25% of total larvae) at 15 °C; the time of development until settlement for all the population was 29 days at 9 °C and 39 days at 15 °C (fig. 3). The

ambas poblaciones y para las larvas originadas por los ejemplares de la población de Chiloé con respecto a las de los ejemplares provenientes de Punta Arenas, para ambas temperaturas (Kruskal-Wallis  $P < 0.05$ ; tabla 1, fig. 2). En todos los grupos de población-temperatura el periodo de mayor crecimiento coincidió con la transición del estado de larva umbonada a larva pediveliger (fig. 2). La longitud larvaria final para la población de Chiloé varió entre 173.70 y 239.44  $\mu\text{m}$  a 9 °C y entre 182.27 y 258.28  $\mu\text{m}$  a 15 °C. Para la población de Punta Arenas, la fluctuación fue entre 200.08 y 264.05  $\mu\text{m}$  a 9 °C y entre 218.49 y 231.56  $\mu\text{m}$  a 15 °C. En promedio, la longitud larvaria final fue significativamente mayor para el grupo Punta Arenas a 9 °C y menor para el grupo Chiloé a 9 °C (ANOVA  $P < 0.05$ ; tabla 1), mientras que no se observaron diferencias en los otros grupos población-temperatura (ANOVA  $P > 0.05$ ).

En la población de Chiloé el estado de larva véliger D se mantuvo hasta el día 13 (4% del total de larvas) a 9 °C y al día 11 (10% del total de larvas) a 15 °C, el estado de larva véliger umbonada se extendió desde el día 4 (42% del total de larvas) hasta el día 35 (11% del total de larvas) a 9 °C y desde el día 6 (42% del total de larvas) hasta el día 29 (67% del total de larvas) a 15 °C y el estado de pediveliger apareció a los 33 días (14% del total de larvas) a 9 °C y a los 29 días (33% del total de larvas) a 15 °C (fig. 3); el tiempo de desarrollo hasta la fijación para el total de la población fue de 39 días a 9 °C y de 33 días a 15 °C. En las larvas de la población de Punta Arenas, el estado de larva véliger D se mantuvo



**Figure 2.** Survival (%) and mean length of larvae from two *Mytilus chilensis* broodstocks exposed to two different temperatures (9 and 15 °C). Superscript letters indicate significant differences: (a) higher mean length of Punta Arenas larvae at 9 °C, (b) lower mean length of Chiloé larvae at 9 °C, and (ab) mean lengths of Chiloé and Punta Arenas larvae at 15 °C, with no significant differences with (a) and (b).

**Figura 2.** Supervivencia (%) y longitud larvaria promedio de dos poblaciones de *Mytilus chilensis* sometidas a dos temperaturas distintas (9 y 15 °C). Las letras de los superíndices indican diferencias significativas: (a) mayor longitud promedio de larvas de Punta Arenas a 9 °C, (b) menor longitud promedio de larvas de Chiloé a 9 °C y (ab) longitudes promedio de larvas de Chiloé y Punta Arenas a 15 °C, sin diferencias significativas con (a) y (b).

larvae from both Chiloé and Punta Arenas needed fewer ATU for settlement at 9 °C than at 15 °C (table 1).

Larval survival until settlement in the Chiloé group ranged from 0.01% to 1.68% at 9 °C and from 0.01% to 2.0% at 15 °C, while in the Punta Arenas group it ranged from 0.01% to 1.67% at 9 °C and from 0.01% to 5.0% at 15 °C. There were no significant differences (ANOVA  $P > 0.05$ ) in mean larval survival either between populations or between temperatures, all groups showing similar survival (%) values (table 1) until the end of the pediveliger settlement stage and end of the experiment (fig. 2, table 1). The largest decrease in survival in all groups occurred in the first 4 days of larval culture.

## DISCUSSION

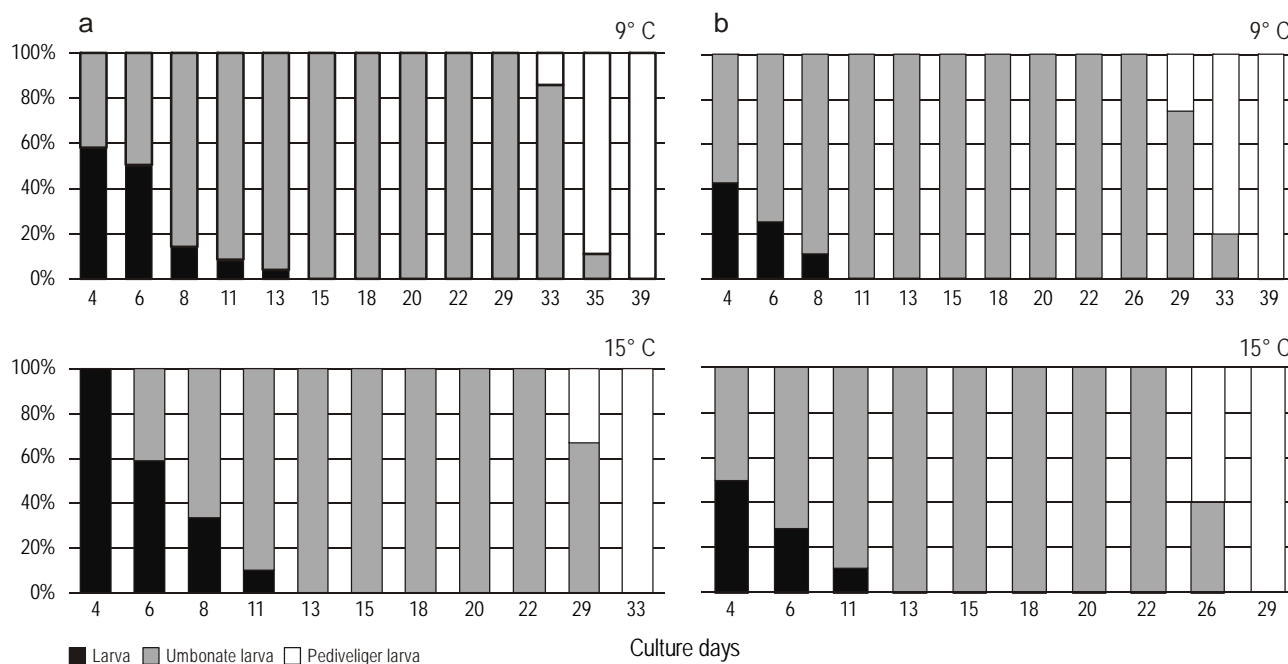
Our findings show that larval growth, regardless of the populations studied, is influenced by temperature, higher temperatures accelerating the metabolic processes (Sánchez-Lazo and Martínez-Pita 2011). This has been documented for similar species, though the growth rates reported herein are lower than those indicated by other authors (His *et al.* 1989, Pechenik *et al.* 1990, Lutz and Kennish 1992, Beaumont *et al.* 2004, Ruiz *et al.* 2008, Galley *et al.* 2010, Sánchez-Lazo and Martínez-Pita 2011). This lesser growth could be explained by differences in the culture system and in the amount and composition of the diet supplied in each case, our study using a closed culture system, batch cultures, and *I. galbana* (clone T-ISO) as food.

hasta el día 8 (11% del total de larvas) a 9 °C y el día 11 (11% del total de larvas) a 15 °C, el estado de larva véliger umbonada se extendió desde el día 4 (37% del total de larvas) al día 33 (20% del total de larvas) a 9 °C y desde el día 4 (50% del total) al día 26 (40% del total de larvas) a 15 °C y el estado de pediveliger apareció a los 29 días a 9 °C (60% del total de larvas) y a los 26 días a 15 °C (25% del total de larvas); el tiempo de desarrollo hasta la fijación para el total de la población fue de 29 días a 9 °C y de 39 días a 15 °C (fig. 3). Tanto las larvas de Chiloé como de Punta Arenas necesitaron menos UTA para la fijación a 9 °C que a 15 °C (tabla 1).

La supervivencia larvaria hasta la fijación de la población de Chiloé varió entre 0.01% y 1.68% a 9 °C y entre 0.01% y 2.0% a 15 °C. En la población de Punta Arenas, la fluctuación fue entre 0.01% y 1.67% a 9 °C y entre 0.01% y 5.0% a 15 °C. La supervivencia larvaria promedio de *M. chilensis* no mostró diferencias significativas (ANOVA  $P > 0.05$ ) ni entre poblaciones ni entre temperaturas; todos los grupos en estudio presentaron porcentajes similares de supervivencia (tabla 1) hasta el final del estado de fijación de pediveliger y fin del experimento (fig. 2, tabla 1). La mayor declinación de la supervivencia se dio en todos los grupos población-temperatura en los primeros 4 días del cultivo larvario.

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que el crecimiento larvario, independientemente de las poblaciones estudiadas, está influenciado por la temperatura, cuyo incremento



**Figure 3.** Larval growth stages of specimens originated from (a) Chiloé and (b) Punta Arenas broodstocks at two culture temperatures.

**Figura 3.** Estados larvarios de los especímenes originados de adultos de (a) Chiloé y (b) Punta Arenas a dos temperaturas de cultivo.

In our comparison of the two *M. chilensis* populations, reproductive conditioning was performed at both temperatures under the same conditions, thus eliminating the influence of the environmental conditions at the different collection areas. Therefore, the larval culture expresses the differences given by the reproductive potential of the broodstocks and the effect of temperature on the culture.

Larvae originated from the Punta Arenas specimens showed greater growth than those originated from the Chiloé specimens at both 9 °C and 15 °C. This difference can be attributed to the fact that the growth rate of the former larvae was higher than that of the latter in the final phase of the culture. Given their slight genetic differentiation, this situation could be explained by a greater capacity to adapt and better use of temperature during development (Toro *et al.* 2004a, 2004b, 2006). Finally, both groups of larvae had a settlement length within the range reported for other mytilids (Ruiz *et al.* 2008, Galley *et al.* 2010), the maximum length corresponding to the Punta Arenas larvae at both temperatures.

The Punta Arenas population showed greater growth at 15 °C, but the maximum final length was recorded for the group cultured at 9 °C. This coincides with that documented for similar species, which when exposed to lower temperatures have greater planktonic life and settlement length (Galley *et al.* 2010, Sánchez-Lazo and Martínez-Pita 2011). The Chiloé larvae, however, despite showing the same pattern, tended to have a greater length at 15 °C. This situation should be assessed in further studies.

At the lower temperature (9 °C), both populations required an equal amount of ATU until the pediveliger stage, and this value (382.2 ATU) was lower than that needed at 15 °C (table 1). Hence, during development, *M. chilensis* larvae make better use of temperature when it is lower. At the higher temperature (15 °C), the Punta Arenas population needed fewer ATU for settlement than the Chiloé population. Fearman and Moltschanskisky (2010) observed that gametogenesis in *M. galloprovincialis* is faster at low temperatures because of increased metabolic demands; this pattern is similar to that found here and could apply to larval growth.

The larvae originated from both broodstocks showed a delay in the change from one larval stage to another at 9 °C

acelera los procesos metabólicos (Sánchez-Lazo y Martínez-Pita 2011). Esto se ha registrado para especies similares, aunque las tasas de crecimiento del presente estudio son menores que las indicadas por otros autores (His *et al.* 1989, Pechenik *et al.* 1990, Lutz y Kennish 1992, Beaumont *et al.* 2004, Ruiz *et al.* 2008, Galley *et al.* 2010, Sánchez-Lazo y Martínez-Pita 2011). Dicho menor crecimiento podría explicarse por diferencias en el sistema de cultivo y en la cantidad y composición de la dieta suministrada en cada caso y por el hecho de que el presente estudio se basó en un sistema de cultivo cerrado y una alimentación con *I. galbana* (Clon T- ISO).

Al comparar las poblaciones estudiadas, se debe tener en cuenta que se realizó el acondicionamiento reproductivo a ambas temperaturas en iguales condiciones. Así, se elimina la influencia de las condiciones ambientales presentes en las distintas zonas de recolección y, por lo tanto, el cultivo larvario expresa las diferencias dadas por el potencial reproductivo de los reproductores y el efecto de la temperatura de cultivo.

Las larvas provenientes de ejemplares de Punta Arenas tuvieron mayor crecimiento que aquellas provenientes de ejemplares de Chiloé tanto a 9 °C como a 15 °C. La diferencia se genera debido a que la tasa de crecimiento de las larvas de los ejemplares de punta Arenas fue mayor que la de las larvas de los ejemplares de Chiloé en la fase final del cultivo. Esta situación podría explicarse por una mayor capacidad de adaptación y aprovechamiento de la temperatura durante el desarrollo, dada su leve diferenciación genética (Toro *et al.* 2004a, 2004b, 2006). Finalmente, en ambos grupos de larvas se observó una longitud de fijación larvaria dentro del intervalo citado para otros mitílidos (Ruiz *et al.* 2008, Galley *et al.* 2010), con la mayor longitud en las larvas de Punta Arenas a ambas temperaturas.

La población de Punta Arenas mostró mayor crecimiento a 15 °C, pero su mayor longitud final se encontró en el grupo cultivado a 9 °C. Esto coincide con lo documentado para especies similares, que al ser sometidas a menores temperaturas tienen mayor vida planctónica y longitud de fijación (Galley *et al.* 2010, Sánchez-Lazo y Martínez-Pita 2011). Las larvas de Chiloé, sin embargo, aunque siguen el mismo patrón, presentan una tendencia a mayor longitud a 15 °C.

**Table 1.** Growth rate, settlement length, settlement survival, and accumulated thermal units of *Mytilus chilensis* larvae from two populations exposed to two temperatures (mean values  $\pm$  standard deviation). Superscript letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 1.** Tasa de crecimiento, longitud de fijación, supervivencia hasta la fijación y unidades térmicas acumuladas de larvas de *Mytilus chilensis* de dos poblaciones sometidas a dos temperaturas (valores promedio  $\pm$  desviación estándar). Los superíndices indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Parameter	9 °C		15 °C	
	Chiloé	Punta Arenas	Chiloé	Punta Arenas
Growth rate ( $\mu\text{m day}^{-1}$ )	2.24 $\pm$ 0.51 <sup>c</sup>	3.49 $\pm$ 0.50 <sup>b</sup>	3.30 $\pm$ 0.91 <sup>b</sup>	3.97 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
Settlement length ( $\mu\text{m}$ )	196.78 $\pm$ 23.27 <sup>b</sup>	246.23 $\pm$ 23.00 <sup>a</sup>	213.92 $\pm$ 30.28 <sup>ab</sup>	225.80 $\pm$ 53.90 <sup>ab</sup>
Survival (%)	0.50 $\pm$ 1.66	0.50 $\pm$ 2.83	0.92 $\pm$ 1.57	1.67 $\pm$ 1.08
Accumulated thermal units	382.2	382.2	493.35	433.55

relative to 15 °C, as 6 days more were needed to produce 100% pediveliger larvae in the case of the Chiloé population and 10 days more in the case of the Punta Arenas population. This leads to a longer free-swimming period and concurs with that reported for other bivalves (Bayne 1983, Sánchez-Lazo and Martínez-Pita 2011). As the culture takes longer, larval survival decreases. Further experiments are necessary to establish the lower threshold for larval growth of *M. chilensis* as a function of temperature.

Larval survival observed in the present study is similar to that reported for other bivalves (Rico-Villa *et al.* 2009) and for larval cultures of the oyster *Pecten maximus* (Torkildsen and Magnesen 2004). Highest survival for both larval groups was obtained at 15 °C, coinciding with the highest growth rate. This indicates a positive relationship between culture time and larval mortality, as has been observed previously and documented for other bivalves (Velasco and Barros 2008, Liu *et al.* 2010). It is important to note that according to our results, the first 4 days of development are critical in terms of survival, concurring with that described by Satuito *et al.* (1994).

The present study indicates that despite the genetic differentiation of the Punta Arenas population (Toro *et al.* 2004a, 2004b, 2006), the productive outcome, in terms of the final amount of *M. chilensis* larvae generated by broodstocks from different latitudes, was similar at both temperatures assessed, though the growth and final size of larvae produced by the Punta Arenas population was greater.

As a larval production strategy, given our current findings, broodstocks from distant natural banks, with asynchronous spawning patterns, could be used to extend the larval production season without prior conditioning of the specimens. This would lead to an eventual decrease in the costs of the productive process. Future studies should aim to optimize larval culture survival of *M. chilensis* under controlled conditions.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Innova Project (CORFO 07CN13PPD-240, to the fourth author), CIEN Austral, Marine Invertebrate Hatchery of the Universidad Austral de Chile, and Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT, Chile).

English translation by Christine Harris.

## REFERENCES

- Bayne BL. 1983. Physiological ecology of marine molluscan larvae. In: Verdonk NH (ed.), *The Mollusca*. Vol. III. Academic Press, New York, pp. 299–343.
- Beaumont AR, Turner G, Wood AR, Skibinski DOF. 2004. Hybridisation between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* and performance of pure species and hybrid

Esta situación deberá ponerse a prueba en posteriores estudios.

A la temperatura inferior (9 °C), ambas poblaciones requirieron igual cantidad de UTA hasta el estado de pediveliger, y dicho valor (382.2 UTA) fue menor que el necesitado a 15 °C (tabla 1). Por ello, durante el desarrollo las larvas de *M. chilensis* presentarían un mejor aprovechamiento de la temperatura cuándo ésta es menor. A la temperatura superior (15 °C), la población de Punta Arenas necesitó menos UTA para la fijación que la de Chiloé. Al respecto, Fearman y Moltschanswisky (2010) indicaron que la gametogénesis en *M. galloprovincialis* es más rápida a baja temperatura debido a un incremento en las demandas metabólicas, lo que representa un patrón similar al aquí presentado y que podría aplicarse al crecimiento larvario.

Las larvas provenientes de ambas poblaciones retrasaron los cambios de estados larvarios a 9 °C respecto a 15 °C. El cultivo necesitó 6 días más para finalizar con el total de la población cómo pediveliger para el caso de las larvas de Chiloé y 10 días más para el caso de la población de Punta Arenas. Con ello aumenta el período de natación libre, lo que concuerda con lo citado para otros bivalvos (Bayne 1983, Sánchez-Lazo y Martínez-Pita 2011). Esto hace que el cultivo sea más extenso y disminuye la supervivencia larvaria. Posteriores experimentos son necesarios para establecer el umbral inferior de crecimiento larvario de *M. chilensis* en función de la temperatura.

La supervivencia larvaria observada en la presente investigación es similar a la citada para otros bivalvos (Rico-Villa *et al.* 2009) y se aproxima a los resultados encontrados por Torkildsen y Magnesen (2004) en cultivos larvarios del ostión *Pecten maximus*. La mayor supervivencia para ambos grupos de larvas fue a 15 °C, coincidiendo con la mayor tasa de crecimiento. Esto indica una relación positiva entre el tiempo de cultivo y la mortalidad larvaria, como se ha comentado anteriormente y según lo citado para otros bivalvos (Velasco y Barros 2008, Liu *et al.* 2010). Cabe hacer notar que, según nuestros resultados, los primeros 4 días de desarrollo son críticos en términos de supervivencia, lo que coincide con lo descrito por Satuito *et al.* (1994).

La presente investigación indica que pese a la diferenciación genética existente en la población de Punta Arenas (Toro *et al.* 2004a, 2004b, 2006), el resultado productivo, en términos de cantidad final de larvas de *M. chilensis* generadas por reproductores de distintas latitudes, fue similar a ambas temperaturas estudiadas, aunque el crecimiento y tamaño final de las larvas generadas por la población de Punta Arenas fue mayor.

Como estrategia de producción larvaria, dados los antecedentes aquí aportados, podrían utilizarse reproductores de bancos naturales distantes entre sí, con asincronía en su época de desove, para ampliar la época de producción de larvas sin necesidad de acondicionamiento de los ejemplares. Esto incidiría en una eventual disminución de los costos del proceso productivo. En posteriores estudios, se debe

- veliger larvae at different temperatures. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 302: 177–188.
- FAO. 2010. Fishery Information, Data and Statistics Unit, FISHSTAT Plus: Universal software for fishery statistical time series. Version 2.3. Dataset: Aquaculture production: quantities 1970–2008.
- Fearman J, Moltchanskiy NA. 2010. Warmer temperatures reduce rates of gametogenesis in temperate mussels, *Mytilus galloprovincialis*. Aquaculture 305:20–25.
- Galley TH, Batista FM, Braithwaite R, King J, Beaumont AR. 2010. Optimisation of larval culture of the mussel *Mytilus edulis* (L.). Aquacult. Int. 18: 315–325.
- His E, Robert R, Dinot A. 1989. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Biol. 100: 455–463.
- Liu W, Gurney-Smith H, Beerens A, Pearce CM. 2010. Effects of stocking density, algal density, and temperature on growth and survival of larvae of the basket cockle, *Clinocardium nuttallii*. Aquaculture 299: 99–105.
- Lutz R, Kennish M. 1992. Ecology and morphology of larval and early postlarval mussels. In: Gosling E (ed.), The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Vol. 25. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 53–85.
- Pechenik J, Eyster L, Widdows J, Bayne B. 1990. The influence of concentration and temperature on growth and morphological differentiation of blue mussel *Mytilus edulis* L. larvae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 136: 47–64.
- Rico-Villa B, Pouvreau S, Robert R. 2009. Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. Aquaculture 287: 395–401.
- Ruiz M, Tarifeño E, Llanos-Rivera A, Padgett C, Campos B. 2008. Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario y larval del mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819). Rev. Biol. Mar. Oceanogr. 43: 51–61.
- Sánchez-Lazo C, Martínez-Pita I. 2011. Effect of temperature on survival, growth and development of *Mytilus galloprovincialis* larvae. Aquacult. Res. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.02916.x.
- enfrentar la optimización de la supervivencia larvaria para lograr el desarrollo del cultivo de *M. chilensis* en condiciones controladas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento por parte del Proyecto Innova (CORFO 07CN13PPD-240), CIEN Austral, el Hatchery de Invertebrados Marinos de la Universidad Austral de Chile y la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT).

- 
- Satuito CG, Natoyama K, Yamazaki M, Fusetani N. 1994. Larval development of mussel *Mytilus edulis galloprovincialis* cultured under laboratory conditions. Fish. Sci. 60: 65–68.
- Torkildsen L, Magnesen T. 2004. Hatchery production of scallop larvae (*Pecten maximus*) survival in different rearing systems. Aquacult. Int. 12: 489–507.
- Toro JE, Ojeda JA, Vergara AM. 2004a. The genetic structure of *Mytilus chilensis* (Hupe 1854) populations along the Chilean coast based on RAPDs analysis. Aquacult. Res. 35: 1466–1471.
- Toro JE, Alcapán AC, Vergara AM, Ojeda JA. 2004b. Heritability estimates of larval and spat shell height in the Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis* Hupe 1854) produced under controlled laboratory conditions. Aquacult. Res. 35: 56–61.
- Toro JE, Castro GC, Ojeda JA. 2006. Allozymic variation and differentiation in the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis*, along its natural distribution. Genet. Mol. Biol. 29: 174–179.
- Toro JE, Alcapán AC, Stead RA. 2008. Cruzamientos inter-poblacionales en *Mytilus chilensis*, un bivalvo de importancia comercial y sus efectos sobre el crecimiento en longitud de la valva durante la etapa larval. Arch. Med. Vet. 40: 299–303.
- Velasco L, Barros J. 2008. Experimental larval culture of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. Aquacult. Res. 39: 603–618.

Received November 2011,  
received in revised form April 2012,  
accepted April 2012.