

REGIONE VENETO  
ENTE DI SVILUPPO AGRICOLO

# TAPES PHILIPPINARUM

BIOLOGIA E SPERIMENTAZIONE



E.S.A.V.  
ENTE SVILUPPO AGRICOLO VENETO

1990

Capitolo 3 - Chapter 3

SVILUPPO SESSUALE E MATURITÀ DI  
*TAPES PHILIPPINARUM*

SEXUAL DEVELOPMENT AND MATURITY OF  
*TAPES PHILIPPINARUM*

N. Devauchelle\*

\* INFREMER, Centre de Brest, DVR/A, BP 70, 29280 Plouzané, France.

## Biologia della riproduzione

Le vongole sono rigorosamente gonocoriche e, benché siano stati segnalati alcuni casi di ermafroditismo, questi sono estremamente rari. Le gonadi maschili e femminili non sono presenti in pari numero. Esse sono rappresentate da un tessuto diffuso strettamente legato all'apparato digestivo. Quando arriva a maturazione, questo tessuto forma una massa biancastra omogenea e molle. Il tessuto riproduttivo deriva da una differenziazione del mesoderma. Sul piano anatomico, esso comprende un sistema di canalicoli o acini molto ramificati (foto 1); i canali si uniscono, formando dotti più grandi i quali, a loro volta,

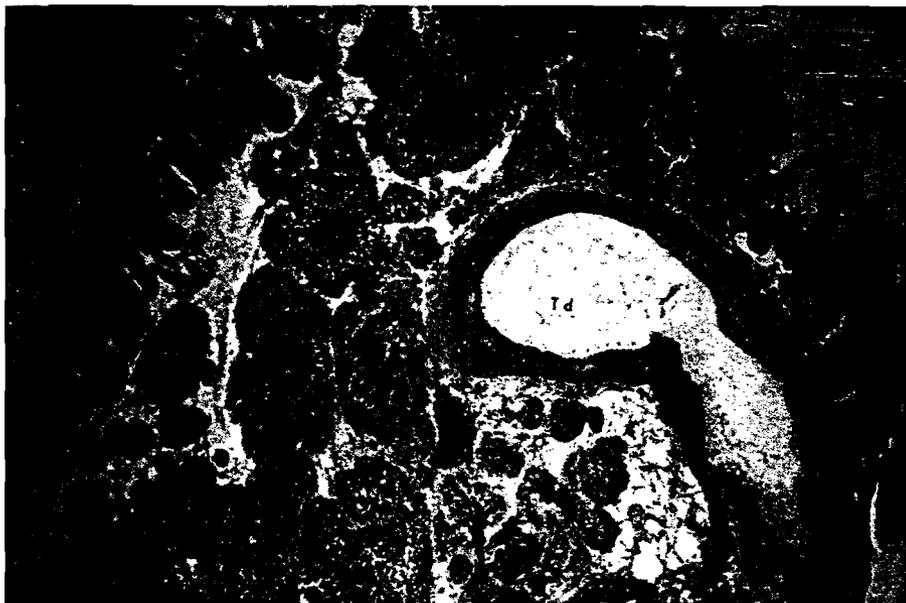


Foto 1

*Organizzazione della gonade maschile: spermatozoi (sp) raggruppati a rosetta al centro degli acini. Td = tubo digerente; A = acino.*

Structure of a male gonad: spermatozoids (sp) are grouped in rosettes in the centre of the acini. Td = digestive tract; A = acinus.

si uniscono in un unico dotto escretore ciliato collegato direttamente all'uretra. L'evacuazione dell'urina e dei gameti avviene perciò attraverso la stessa apertura. Gli acini, o canalicoli, sono formati da epitelio germinale sostenuto da tessuto connettivo che funge da protezione. Le cellule germinali maschili e femminili si differenziano all'interno del tessuto germinale. A ridosso della parete degli acini si trovano delle cellule nutritive, rare nei maschi, più numerose nelle femmine. L'insieme di queste cellule nutritive che circondano l'ovocità costituisce il follicolo. Il dotto escretore è una struttura semplice. Non essendo copulazione, la fecondazione è esterna. La vongola, come molti altri molluschi, pratica quindi il più aleatorio dei metodi di riproduzione.

La stagione riproduttiva della vongola giapponese varia a seconda delle zone geogra-

Tab. 1  
L'emissione di *Ruditapes philippinarum* in diverse zone geografiche.  
*Ruditapes philippinarum* spawning in different geographical areas.

Paese Country	Latitudine Latitude	Periodo di emissione Spawning period	Temperatura °C Temperature °C	Riferimenti bibliografici Bibliography
Francia France	45°N	Giugno-Settembre June-September	20-23	Ifremer, 1988 Medbioub e Lubet, 1988
Canada Canada Colombia Britannica British Columbia	38-50°N	Luglio-Settembre July-September	20	Quayle, 1964
Giappone Japan	25-45°N	Maggio e Ottobre/Novembre May and October/November	20-25	Tanaka, 1954 Ohba, 1959
Hawaii Hawaii	20°N	Gennaio-Febbraio = picco - tutto l'anno January-February = peak + all through the year	—	Yap, 1977

fiche (tab. 1). Tuttavia, è sempre caratterizzata da un riposo sessuale corrispondente al periodo di fine autunno e inizio inverno. Generalmente, la durata della gametogenesi varia da 2 a 5 mesi al termine della quale la vongola emette una prima volta. Una seconda emissione ha luogo 2-3 mesi dopo ed è seguita da una fase di recupero preinvernale in cui la vongola accumula riserve filtrando l'acqua ancora ricca di fitoplancton e di materie organiche disciolte. Qualsiasi sia la zona, le vongole sono sempre in riposo sessuale quando l'acqua è fredda, poco ricca di fitoplancton, il fotoperiodo è in fase calante e l'acqua presenta una salinità minore. La divisione gonadica avviene in concomitanza con i fotoperiodi ascendenti e con l'aumento della temperatura dell'acqua, mentre l'arricchimento del fitoplancton interviene in una fase successiva.

### Ovogenesi e spermatogenesi

Sul piano istologico, la gonade femminile attraversa diverse fasi caratteristiche: — Al momento del riposo sessuale non è evidenziabile alcun follicolo ovarico. Il tessuto connettivo di riserva può essere molto abbondante e il sesso può non essere determinabile (foto 2).

— L'inizio della gametogenesi è segnalato dalla comparsa di giovani ovogoni e ovociti nel tessuto connettivo. I giovani ovociti previtellogeni presentano un nucleolo chiaramente visibile all'interno di un nucleo più chiaro a causa della cromatina condensata. Si organizza una trama di follicoli con gli ovociti raggruppati alla periferia del follicolo. Il tessuto connettivo centrale tende a scomparire e gli ovociti diventano pedunculati (foto 3).

— Gli ovociti pedunculati raggiungono i 40-45  $\mu\text{m}$  e il peduncolo si fa molto sottile. Compare allora un'altra generazione di ovociti (foto 4).

— Poco prima dell'emissione, ovvero da quattro a cinque mesi dopo l'inizio delle mitosi gonadica, gli ovociti perdono il peduncolo ed invadono il lume degli acini (foto 5). La

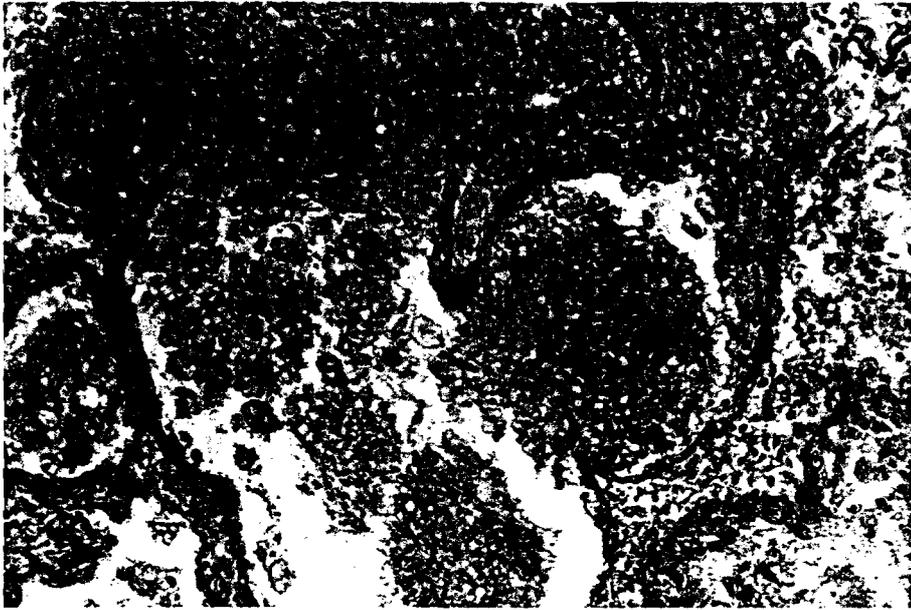


Foto 2  
*Aspetto della gonade durante il periodo di riposo sessuale.*  
Appearance of gonad during sexual rest.

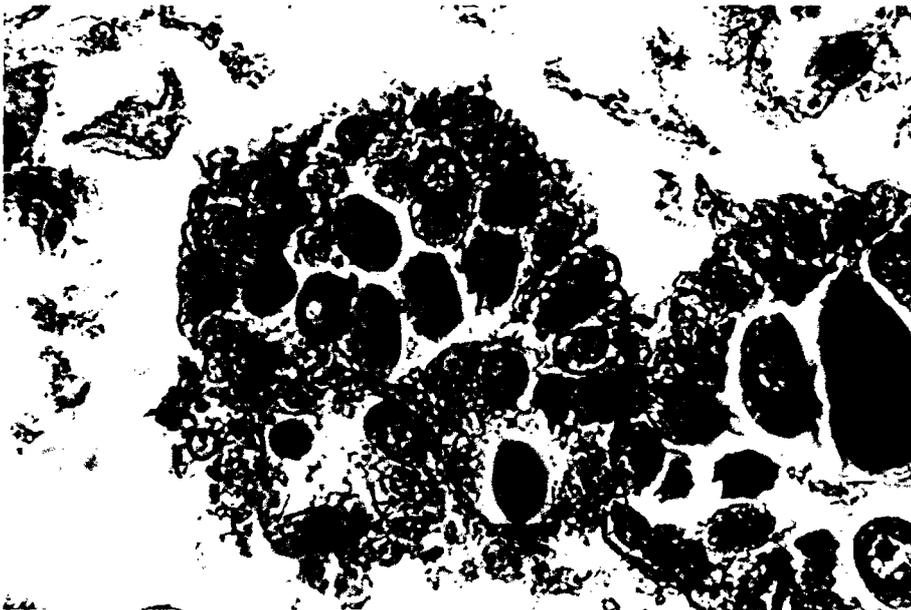


Foto 3  
*Il tessuto connettivo (tc) tende a scomparire e gli ovociti sono peduncolati.*  
The connective tissue (tc) tends to disappear and the ovocytes are pedunculated.

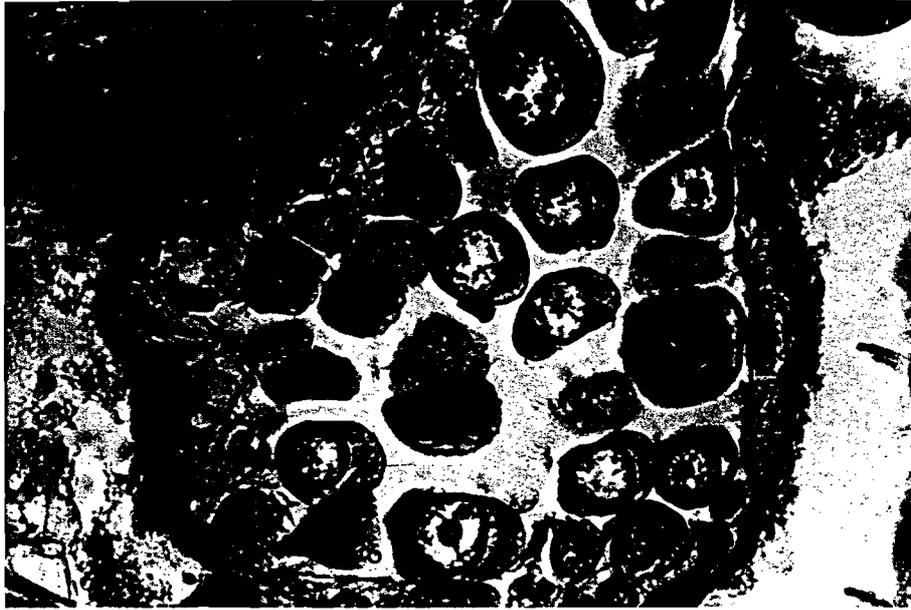


Foto 4  
*Ovociti pedunculati (op) di 40-45  $\mu$ m e 50  $\mu$ m.*  
Pedunculated ovocytes (op) 40-45  $\mu$ m and 50  $\mu$ m in size.

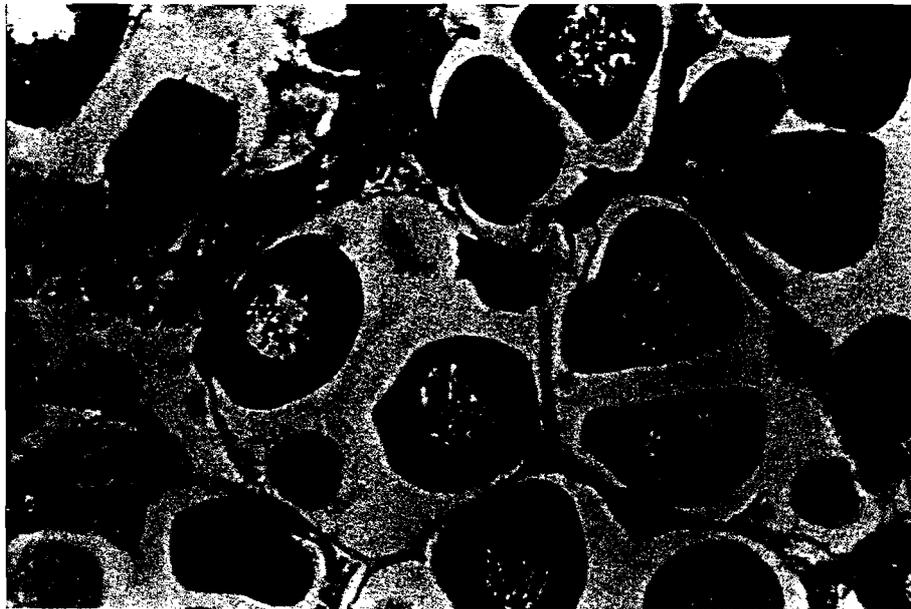


Foto 5  
*Ovociti non pedunculati nel lume dell'acino.*  
Ovocytes without peduncle in the lumen of the acinus.

prima emissione si avvicina, mentre crescono altre generazioni di ovociti. E' possibile osservare fino a quattro generazioni di ovociti in un unico acino. La maturazione degli ovociti, caratterizzata dalla ripresa della meiosi, avviene in fase tardiva. Essa ha luogo nella gonade prima dell'espulsione verso l'ambiente esterno. I globuli polari appaiono dopo la fecondazione.

L'evoluzione dei gameti nei diversi canalicoli di una gonade avviene simultaneamente mentre si osservano spesso differenze tra gli stadi di maturazione raggiunti dai diversi individui. E' possibile verificare la simultaneità dello sviluppo delle diverse popolazioni effettuando delle biopsie. Su una valva della conchiglia della vongola si pratica un forellino che permette di effettuare la biopsia in qualsiasi momento della stagione riproduttiva.

L'inizio della spermatogenesi coincide con l'inizio dell'ovogenesi. Tuttavia la prima generazione di spermatozoi appare prima di quella degli ovociti maturi, due mesi dopo le prime mitosi. La spermatogenesi e la spermiogenesi seguono uno schema centripeto (foto 6); gli spermatozoi si raggruppano in rosette (foto 1), acrosomi verso l'interno, flagello verso l'esterno. Sono liberi, si muovono all'interno degli acini e misurano, in media, 5  $\mu\text{m}$ .

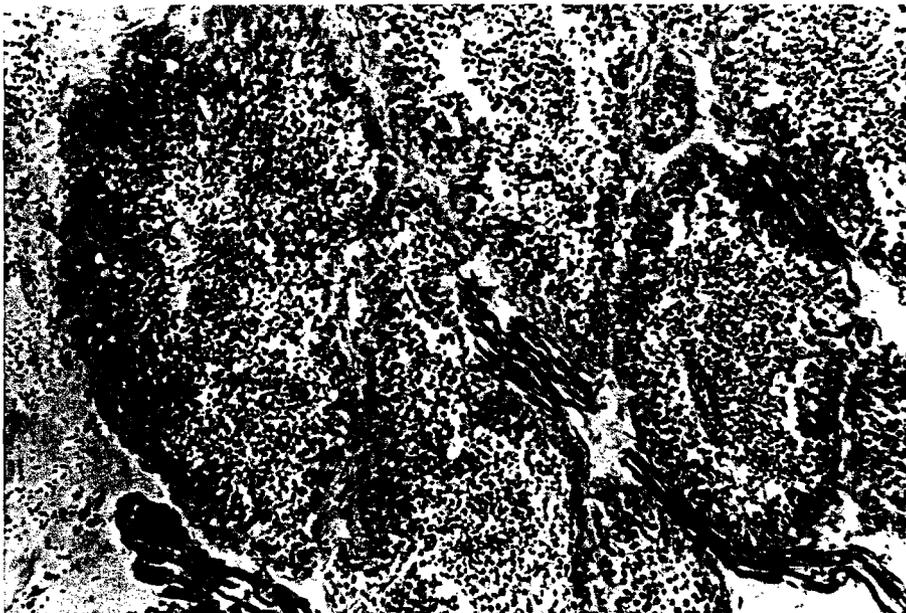


Foto 6  
*Spermatogenesi centripeta; comparsa dei primi spermatozoi (sp).*  
Centripetal spermatogenesis; development of the first spermatozooids (sp).

Sia i maschi, sia le femmine raggiungono la prima maturità sessuale tra i 15 e i 20 mm, all'età di un anno e i parametri ecologici esterni sembrano esercitare una notevole influenza. A questa età, la crescita risulta privilegiata rispetto alla riproduzione, che ha luogo molto tardi. Nel secondo anno di vita, invece, il rapporto si inverte. La fecondità aumenta con l'età mentre la crescita somatica assorbe meno energia che negli stadi giova-

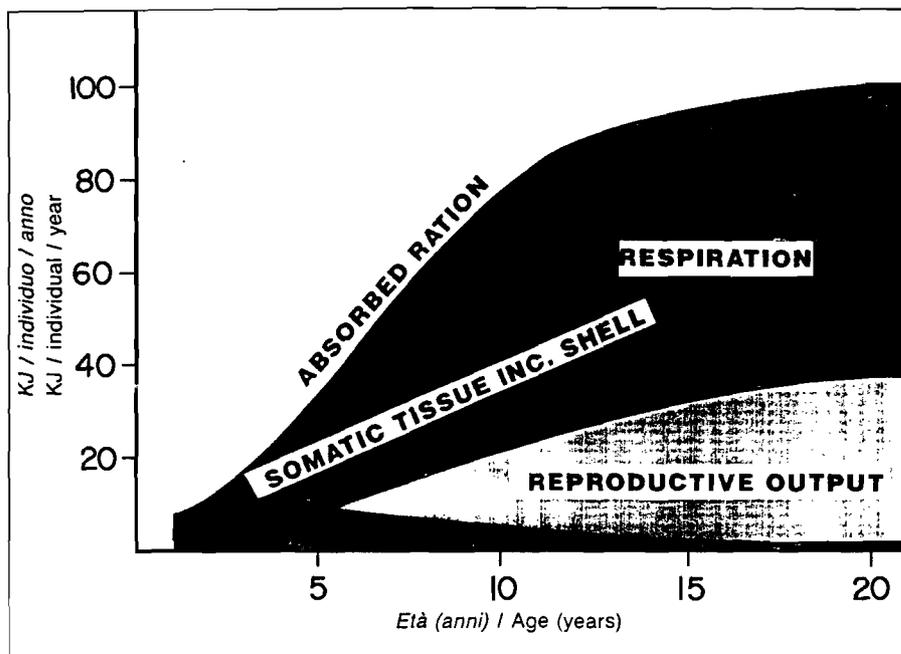


Fig. 1  
 Bilancio energetico nel bivalve *Ostrea edulis*.  
 Energy balance in bivalve *Ostrea edulis*.

nili. Come suggerisce Rodhouse (fig. 1), tuttavia, anche il soma richiede un minimo di energia. La fecondità aumenta con le dimensioni: 0,452 milioni di ovociti a 20 mm, 1,35 milioni a 40 mm secondo Yap (1977). A tre anni le vongole producono da 6 a 10 milioni di ovociti per individuo ad ogni emissione.

#### Fenomeni biochimici associati alla maturazione e all'emissione

Il testo seguente si basa essenzialmente sugli studi di Beninger e Lucas (1984), Goulletquer (1983) e Devauchelle (non pubblicato).

Il tenore di acqua raggiunge il suo massimo durante il periodo invernale di riposo sessuale (fino all'85%) e immediatamente dopo l'emissione, mentre diminuisce prima dell'emissione, talvolta fino al 75%, riflettendo così l'aumento delle riserve.

Il contenuto di ceneri, invece, risulta elevato in inverno, fino al 3,6%, e basso in periodo di emissione (1%). Il tenore di minerali quali Ca, Mg e di oligoelementi quali Fe, Cu, Mn segue le variazioni del contenuto di ceneri. Questi elementi variano poco in termini di valore assoluto nel corso del ciclo di gametogenesi, svolgendo in modo continuativo il loro ruolo metabolico, osmotico e di elementi strutturali (Beninger, 1985). Il tenore di fosforo, invece, è inversamente proporzionale al tenore di  $K^+$  e varia analogamente.

mente al tenore di glicogeno (Beninger, 1985): è basso in inverno, cresce durante la gametogenesi e diminuisce nel periodo precedente all'emissione poiché il glicogeno si trasforma in lipidi che si accumulano negli ovociti. Il massimo livello di lipidi (8% PA) si osserva proprio in questo periodo pre-emissione. Anche il tenore di proteine (50-69%) aumenta alla fine della gametogenesi, immediatamente prima dell'emissione. Gli zuccheri subiscono la massima variazione percentuale, fino al 51% tra l'inizio e la fine della gametogenesi (Saeki e Kumagai, 1980). La fase di esaurimento, che precede di poco l'emissione, corrisponde essenzialmente alla trasformazione degli zuccheri in lipidi. Il bilancio energetico, calcolato da Gouletquer (1983) su popolazioni naturali dell'area dell'Atlantico settentrionale, evidenzia che le vongole raggiungono il loro massimo valore energetico nel periodo precedente l'emissione e durante la fase autunnale di recupero. Questo valore riflette, essenzialmente, il contenuto lipidico.

Gli esperimenti di condizionamento condotti in ambiente controllato confermano tutti questi risultati. Il tenore d'acqua delle carni si è dimostrato un indicatore affidabile e facilmente calcolabile dell'evoluzione della gametogenesi. E' possibile verificare lo stato di avanzamento della gametogenesi anche pesando le vongole sgocciolate: il loro peso totale diminuisce in media del 10% quando sono mature per l'emissione (fig. 2). L'indice

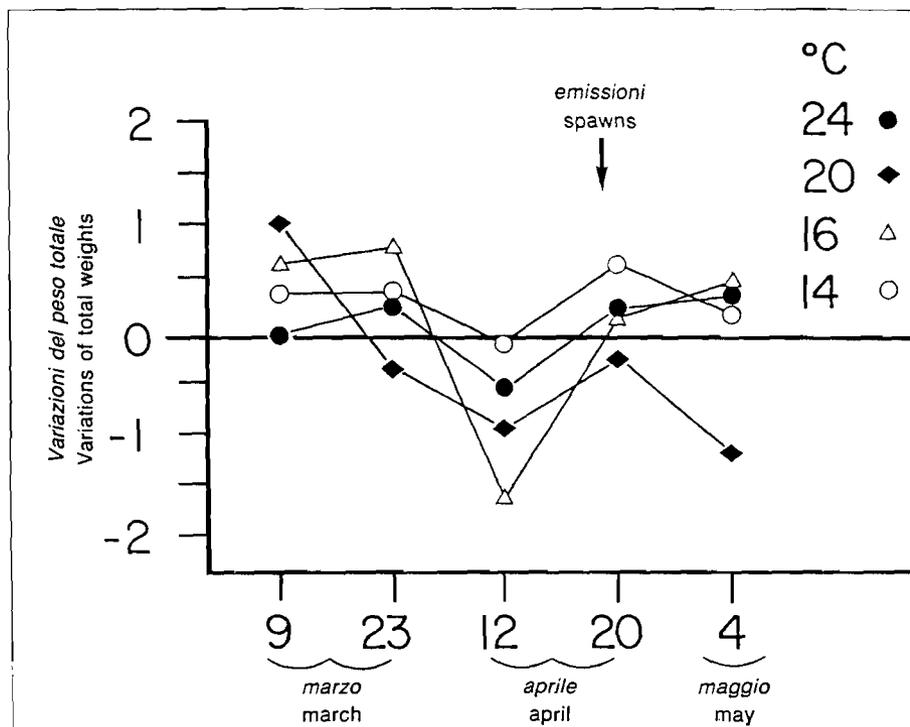


Fig. 2  
 Variazioni ponderali nelle vongole condizionate artificialmente.  
 Weight changes in artificially conditioned clams.

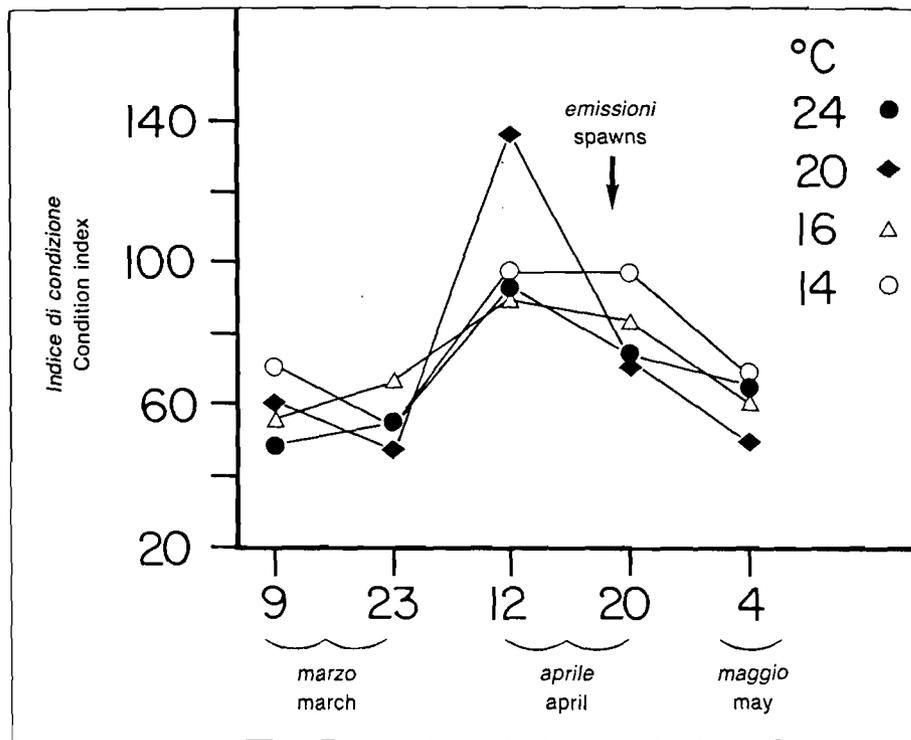


Fig. 3  
 Variazioni degli indici di condizione in corso di condizionamento.  
 Changes of condition indexes under conditioning.

di condizione (peso asciutto delle carni/peso asciutto della conchiglia) varia da 60 a 140 al momento dell'emissione e costituisce anch'esso un buon indice di maturazione (fig. 3). In condizioni sperimentali, a temperature variabili tra 14° e 24°C, le variazioni biochimiche delle carni seguono lo stesso profilo a prescindere dal regime alimentare, tranne nel caso di digiuni molto prolungati o con temperature inferiori a 12°C.

#### Fattori di avvio e di modulazione della gametogenesi e dell'emissione

Per riprodurre artificialmente una determinata specie a fini di acquicoltura, è essenziale conoscere, oltre alle caratteristiche biologiche, anche la dinamica della riproduzione onde poter modificare i periodi di emissione senza alterare la qualità dei gameti e poter effettuare esperimenti o altri interventi in qualsiasi momento dell'anno su una specie a riproduzione stagionale, come ad esempio la vongola (Devauchelle, 1989).

L'osservazione degli animali in situ ci fornisce ipotesi di lavoro che possono essere verificate in ambiente sperimentale. Per quanto concerne i molluschi, è risaputo da tempo che l'impulso che avvia della gametogenesi proviene quasi esclusivamente da fattori nutrizionali e di temperatura (Lubet, in corso di stampa). Recenti osservazioni effettuate

sui pectinidi hanno indicato che il fotoperiodo potrebbe rappresentare, come nella maggior parte degli eterotermi marini temperati, il fattore essenziale di avvio delle mitosi goniali (Devauchelle, non pubblicato). Il corretto svolgimento della vitellogenesi e la sua velocità sembrano essere determinati, essenzialmente, dalle riserve accumulate dal riproduttore, prima o durante la gametogenesi, nonché dalle condizioni termiche. Deslou Paoi e coll. (1987) hanno calcolato che i tassi di filtrazione aumentano nettamente nei periodi di produzione dei gameti. A maturità raggiunta, l'emissione viene indotta da cambiamenti delle condizioni ambientali, da variazioni del livello di salinità o di pH, da un forte irraggiamento lunare o solare, o dai movimenti delle maree.

Questi effetti sono mediati dalle caratteristiche specifiche dei diversi individui o delle coorti. Abbiamo già citato l'età e le dimensioni degli animali; la loro provenienza geografica, le mescolanze di popolazioni e la formazione di ibridi, l'infestazione da parte di agenti patogeni o parassiti (Shimura e coll., 1982, Kim e Chum, 1983) e la fisiologia di ciascun individuo possono minimizzare o accentuare l'effetto dei fattori esterni.

Per quanto concerne, in particolare, la vongola giapponese, nelle zone temperate l'animale entra nel ciclo gametogenico all'inizio della fase ascendente dei fotoperiodi, fatta eccezione per le zone tropicali dove sono le piogge a ritmare le attività biologiche: in queste zone il rapporto fotoperiodo-maturazione risulta quindi alterato. Negli schiuditori, nel periodo autunnale, corrispondente a fotoperiodi discendenti, le vongole sono sistematicamente refrattarie al condizionamento. Tuttavia, nessun esperimento ha potuto ancora confermare o smentire definitivamente il ruolo attribuito al fotoperiodo. Sono stati verificati sperimentalmente soltanto i parametri relativi alla temperatura e all'alimentazione.

Gli studi effettuati sulla temperatura indicano che, all'inizio dell'inverno è possibile accelerare la gametogenesi aumentando la temperatura dell'acqua marina. Tra 14° e 24°C la durata si riduce da 5 a 2 mesi. Entro questo intervallo termico, le vongole sono tutte mature per l'emissione nello stesso momento, poiché la temperatura influisce sulla quantità di gameti prodotti e non sulla durata della gametogenesi. Il valore ottimale si situa tra i 20° e i 22°C (Morel, 1988; Mann, 1979); 12°C è la soglia minima al di sotto della quale le vongole producono una quantità di ovociti e di spermatozoi troppo limitata per garantire l'emissione, a prescindere dal livello di alimentazione. Le figure 2 e 3 illustrano questo aspetto, mostrando le variazioni del peso a secco e degli indici di variazione delle vongole in condizionamento. Nella Colombia Britannica, in Giappone e in Italia, dove le vongole proliferano naturalmente, la temperatura dell'acqua raggiunge questi valori ottimali verso la fine della gametogenesi.

La quantità di cibo disponibile ha un effetto analogo a quello della temperatura e influenza la quantità di gameti prodotti (tab. 2). La salinità ha spesso un'importanza secondaria ma non deve tuttavia essere trascurata. In *Crassostrea gigas* diverse associazioni

Tab. 2  
Rapporto tra fecondità e alimentazione di vongole condizionate artificialmente in ambiente aperto a 18°C.  
Food/fertility ratio in artificially conditioned clams reared in an open environment at 18°C.

Razione alimentare - n. alghe / animale / giorno Food requirement - n. algae / clam / day	n. uova emesse / Femmina n. of eggs spawned / Female
0	0.31x10 <sup>6</sup>
1.50x10 <sup>9</sup>	2.75x10 <sup>6</sup>
3.75x10 <sup>9</sup>	2.40x10 <sup>6</sup>
7.60x10 <sup>9</sup>	6.23x10 <sup>6</sup>

di temperatura e salinità sembrano aver causato alterazioni riproduttive (Lubet, in corso di stampa).

Sul piano pratico, queste considerazioni e i risultati ottenuti all'Ifrermer di Brest portano a concludere che, in corrispondenza di fotoperiodi ascendenti e alti, la gametogenesi si può produrre tra 14° e 24°C; i migliori risultati si ottengono ad una temperatura di 20°C distribuendo  $15 \times 10^9$  alghe unicellulari al giorno per riproduttore. La temperatura e il livello di alimentazione influenzano il volume di gameti prodotti, piuttosto che la durata della gametogenesi.

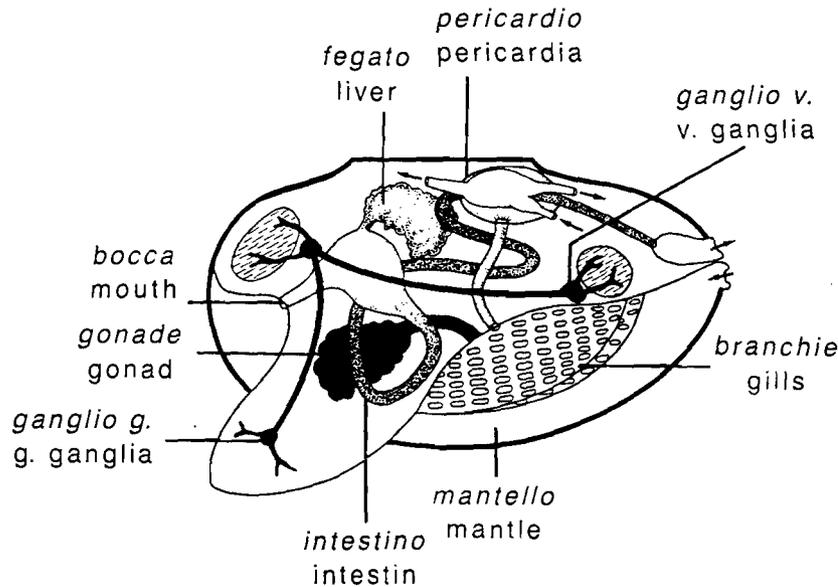


Fig. 4  
 Struttura del sistema nervoso della vongola.  
 Structure of clams' nervous system.

I fattori esterni agiscono tramite il sistema nervoso che, benché molto semplificato, è presente nei molluschi sotto forma di gangli (fig. 4). I rari studi condotti sulle vongole indicano che, come nei mitili, esistono due gruppi distinti di molecole che influenzano la riproduzione: il primo, corrispondente a sostanze peptidergiche, favorisce la mitosi gonadica e la vitellogenesi; il secondo, corrispondente piuttosto a sostanze aminergiche, provoca la ripresa della meiosi e l'emissione (serotonina e dopamina). Questi prodotti non sono tuttavia ancora stati isolati nella vongola. D'altronde, il campo della neuroendocrinologia dei bivalvi marini coltivati resta tutt'ora un settore di ricerca praticamente vergine (Lubet, 1985). E tuttavia, nel 1988, Matthieu e coll. dimostrano che un fattore di origine cerebroide, estratto dal *Mytilus edulis*, sosteneva la moltiplicazione degli ovogoni nella vongola. Inoltre Citter (1985) ha riferito di aver ottenuto l'emissione di gameti tramite iniezioni intragonadiche di serotonina.

## Biology of reproduction

The clams are strictly gonochoric. A few cases of hermaphroditism have been reported, but they are extremely rare. Male and female gonads are present in odd numbers. They are represented by a diffused tissue closely linked to the digestive system. When mature, it forms a soft, homogeneous whitish mass. The reproductive tissue originates from the differentiation of the mesoderm. From an anatomical point of view, it includes a system of canaliculi and strongly branching acini (photo 1): their small ducts merge into larger ducts which, in turn, merge into a single ciliated excretory duct directly connected to the urethra. The urine and the gametes are therefore excreted through the same pore. The acini, or canaliculi, are made up of germinative epithelium supported by connective tissue forming a kind of packaging. Male and female germinal cells become differentiated in the germinative tissue. Nutritional cells stand against the wall of the acinus: they are just a few in males, more in females. Together, these nutritional cells surrounding the ovocyte make up the follicle. The excretory duct is rather simple; there is no copulation. Fertilization takes place externally since clams, like most molluscs, reproduce by the most uncertain of methods.

The reproduction period of the Japanese clam varies depending on the geographical area (table 1). However, a period of sexual rest is always observed from late autumn to early winter. Gametogenesis usually lasts 2 to 5 months after which clams spawn. They spawn a second time 2 to 3 months later. A pre-winter recovery phase follows during which clams build up reserves by filtering sea water still rich in phytoplankton and dissolved organic matter. Regardless of the geographical area, when the sea water is cold, phytoplankton scanty and photoperiods and salinity levels low, clams are sexually at rest. The gonial splitting occurs as photoperiods rise and the sea water becomes warmer, while the phytoplankton enrichment comes later.

## Ovogenesis and spermatogenesis

Female gonads undergo different typical histological stages:

- During the period of sexual rest, no ovarian follicle can be seen. The connective tissue of the reserves can be very abundant and the sex cannot be determined (photo 2).
- The onset of gametogenesis is characterized by the appearance of young oogoniums and ovocytes in the connective tissue. The young, pre-vitellogenesis ovocytes show a clearly visible nucleolus within the nucleus, brighter due to chromatin condensation. A weft of follicles is arranged with the ovocytes grouping at the periphery of the follicle. The central connective tissue tends to disappear and the ovocytes become pedunculated (photo 3).
- The pedunculated ovocytes reach the size of 40-45  $\mu\text{m}$  approximately two months after the first ovocytes have appeared, under the climatic conditions found in the North Atlantic area (photo 4).
- By the end of the fourth month the ovocytes are 50  $\mu\text{m}$  in size and the peduncle has become very thin. At this point in time, a new generation of ovocytes appears (photo 4).
- Shortly before spawning, i.e. 4-5 months after the beginning of gonial mitoses, the ovocytes lose their peduncles and fill the lumen of the acini (photo 5). The first spawning approaches while other generations of ovocytes are growing. One can see as many as four different generations of ovocytes within a single acinus. The maturation of the ovocytes,

characterized by the resumption of mitosis, comes rather late. It takes place within the gonad before expulsion into the external environment. The polar globes appear when fertilization has occurred.

The gametes develop simultaneously within the different canaliculi of a gonad. On the other hand, different maturation stages are frequently observed among different clams. Synchronous behaviour within a population can be studied by means of biopsies. A small hole is drilled into one valve of the clam shell in order to allow biopsies to be made at any time during the reproduction period.

Spermatogenesis starts at the same time as ovogenesis. However, the first generation of spermatozooids appears before the mature ovocytes, two months after the first signs of mitosis. Spermatogenesis and spermiogenesis develop centripetally (photo 6); the spermatozooids group in rosettes (photo 1), acrosome internally, flagellum externally. They are free and mobile within the lumen of the acini and are 5  $\mu\text{m}$  in size, on average.

Both males and females reach their first sexual maturity between 15 and 20 mm of size, at the age of one year. This maturity appears to be strongly influenced by external environmental factors. At that age clams tend to grow more than they spawn, which they do very late, whereas in their second year they do just the opposite. Their fertility increases with age while somatic growth takes up less energy than in the younger stages. As Rodhouse suggests (fig. 2), however, a minimum is still required for the soma. Fertility increases with size: 0.452 million ovocytes at 20 mm, 1.35 million at 40 mm according to Yap (1977). Each three year-old clam produces 6 to 10 million ovocytes per spawning.

### **Biochemical phenomena associated with maturation and spawning (tab. 2)**

The following text is based upon studies made by Beninger and Lucas (1984), Goullet-quer (1983) and Devauchelle (unpublished).

The water content reaches its peak during the winter period of sexual rest (up to 85%) and immediately after spawning. It decreases before spawning, reaching sometimes 75%, thus reflecting the simultaneous increase of reserves.

Conversely, the ash content is high in the winter, reaching 3.6%, and low during the spawning period (1%). Minerals (Ca, Mg) and trace elements (Fe, Cu, Mn) follow the changes of the ash content. During the gametogenetic cycle these elements vary little in terms of absolute value thus playing their metabolic, osmotic and structural role on a continuing basis. Conversely, phosphorus contents are inversely proportional to  $\text{K}^+$  contents which vary with the glycogen content (Beninger, 1985): low in the winter, rising during gametogenesis and decreasing before spawning because glycogen is converted into lipids which are stocked in the ovocytes. The peak lipid content (8% PA) is observed in this pre-spawning period. The protein content (50-69% PA) too increases at the end of gametogenesis just before spawning. The sugars undergo the most significant changes with a variation coefficient of up to 51% between the beginning and the end of gametogenesis (Saeki ana Kumagai, 1980). The depletion occurring just before spawning basically corresponds to the conversion of sugars into lipids. The energy balance, assessed by Goullet-quer (1983) on natural populations in the North Atlantic area, shows that clams reach their maximum energy value before spawning and during the autumn recovery phases. This value basically reflects the lipid content.

Conditioning tests carried out under controlled environmental conditions have con-

firmed these findings. The water content of the flesh, easy to calculate, is a reliable indicator of how the gametogenesis is evolving. The weight of dry clams is a further parameter to assess the development of the gametogenesis: their total weight decreases by 10% on average when they are ready to spawn (fig. 2). The condition index (flesh dry weight-shell dry weight), which varies from 60 to 140 at the time of spawning, is a further reliable indicator of the maturation stage (fig. 3). Under test conditions, at temperatures between 14° and 24°C, the biochemical changes of the flesh follow the same pattern, regardless of feeding regimes, except for long fasting periods or temperatures below 12°C.

### **Factors inducing and governing gametogenesis and spawning**

In order to reproduce artificially a given species for aquicultural purposes, in addition to its biological features, one should know the mechanisms governing reproduction in order to change the spawning periods while safeguarding the quality of the gametes and make experimental studies on seasonally reproducing species, like clams, at any time of the year (Devauchelle, 1989).

By observing animals in situ we can make working hypotheses which can then be tested under experimental conditions. As far as molluscs are concerned, it has been known for a while now that gametogenesis is almost exclusively induced by nutritional and temperature factors (Lubet, to be published). Recent observations on pectinides tend to show that, like in most temperature marine Poikilothermes, the photoperiod could be the main factor inducing gonial mitoses (Devauchelle, unpublished). The normal development and the duration of vitellogenesis appear to be basically influenced by the amount of reserves stocked by the specimen before or during gametogenesis and by the temperature levels. Deslou Paoli and coll. (1987) have estimated that the filtration rates increase dramatically in the period of gametes production. When the clams are mature, spawning is induced by environmental, salinity and pH changes, by very bright sun or moon lighting, by tidal changes or changes in hydrostatic pressure.

These effects are modulated by the individual characteristics of specimens or cohorts. We have already mentioned age and size; geographical origin, population mix and development of hybrids, pathogen or parasite infestations (Shimura and co-workers 1982, Kim and Chun, 1983) and the physiology of each specimen can also increase or decrease the effects produced by external factors.

With regard to the Japanese clam, in particular, in temperate areas this clam enters its gametogenetic cycle when the photoperiods start their rising phase, except for tropical areas where other events, such as heavy rainfall, influence the seasons: the relationship between photoperiod and maturation is thus altered. In hatcheries, during the autumn period corresponding to decreasing photoperiods, the clams are systematically insensitive to conditioning. But no test has yet confirmed or denied the role ascribed to photoperiods. Temperature and feeding are the only parameters which have been experimentally tested.

The studies made on temperature have shown that at the beginning of the winter the gametogenesis can be stepped up by raising the temperature of the sea water. Its duration decreases from 5 to 2 months between 14° and 24°C. Within this temperature range the clams are ready to spawn all at the same time, since the temperature influences the amount of gametes spawned, not the duration of the gametogenesis. The optimal temperature is between 20° and 22°C (Morel, 1988; Mann, 1979). 12°C is the minimum

threshold below which clams produce too few oocytes and spermatozooids to spawn, regardless of their nutritional level. Fig. 2 and 3 illustrate this situation showing the changes of dry weight and condition index undergone by clams under conditioning. In British Columbia, Japan and Italy, where clams proliferate naturally, the water reaches this optimal temperature at the end of gametogenesis.

The amount of food available has an effect similar to that of the temperature, influencing the amount of gametes produced (table 2). Salinity has generally minor effects which should not be neglected, however. In *Crassostrea gigas* different combinations of temperature and salinity have resulted in changes in reproduction (Lubet, to be published).

From a practical point of view, these observations and the results obtained by Ifremer Brest show that at times of high and rising photoperiods gametogenesis can occur between 14° and 24°C, the best results being obtained at 20°C feeding  $15 \times 10^9$  monocellular algae per specimen per day. Temperature and food basically influence the volume of gametes produced but not the duration of the gametogenesis.

External factors act through the nervous system which, though very simple, has developed in bivalve molluscs in the form of ganglions (fig. 4). The very few studies done on clams have shown that, as in mussels, two different groups of molecules influence reproduction: the first group includes peptidergical substances favouring gonial mitosis and vitellogenesis; the second includes aminergic substances which induce the resumption of mitosis and spawning (serotonin, dopamin). However, these substances have not yet been detected in clams. Indeed, the neuroendocrinology of reared marine bivalves is still a virtually virgin research field (Lubet, 1985). Yet, in 1988 Matthieu and co-workers showed that a factor of cerebroid origin, extracted from *Mytilus edulis*, supported the reproduction of oogonia in clams. And Citter (1985) reported inducing spawning and spermiation in clams by means of intragonad injection of serotonin.