

Avances en la ecología y biología para la
conservación de la especie críticamente
amenazada *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758),
endemismo mediterráneo



Universidad
**Católica de
Valencia**
San Vicente Mártir

Tesis Doctoral
2021

Sebastià Hernandis Caballero

Dirigida por:
Dr. José Rafael García March
Dr. José Tena Medialdea

“La vida que sucede al margen de las opiniones
que insistimos en dar es maravillosa.”

Manuel González Rodríguez (Toteking). “Bunker”.

AGRADECIMIENTOS

El doctorado es un proceso largo, una carrera de resistencia para construir una montaña a base de pequeños granitos de arena. En este proceso, uno se cruza con infinidad de personas, en ocasiones en el ámbito personal, otras, en el ámbito académico y, a veces, en ambos. La tesis puede tener un único firmante, pero no la hace uno solo, y cada una de estas personas contribuye en mayor o menor medida a que se lleve a término. Pido perdón de antemano, pues estoy seguro que quedarán nombres sin reflejar en las siguientes líneas que merecen estarlo, pues su ayuda, incluso con el menor de los granitos de arena, ha resultado fundamental para terminar esta gran montaña y que no se derrumbará por el camino.

Me gustaría empezar agradeciendo a mis directores, José Rafael García March y José Tena Medialdea. Ambos confiaron en mí hace más de 5 años, ofreciendo un contrato de trabajo a un chico recién graduado. Ese contrato significó poder hacer un master dos años después, hoy significa poder acabar mi tesis y, todo lo que venga después, vendrá de la mano de ese impulso inicial. Gracias por el apoyo y por todo lo aprendido durante estos años.

A Diana López y Clara Téllez. No creo que nadie me haya ayudado tanto a llevar la carga de la tesis como vosotras dos. Hemos compartido momentos maravillosos, pero si hay algo que une son las situaciones de sufrimiento y cansancio infinito, los buceos gélidos y eternos, las horas extras e interminables en la noche o los kilómetros inacabables recorridos. Mil gracias a las dos por los momentos compartidos.

Hace ya una eternidad que no las veo, pero no me puedo olvidar de Silvia Fraissinet y Martina Scanu. Los meses que compartí con vosotras los guardo con un cariño especial. Os volvisteis parte de mi familia, espero que nos encontremos pronto.

Mención especial se merece Marina Albentosa, una referente a nivel personal y profesional. Gracias por tu apoyo incondicional y por darle el impulso definitivo a mi tesis.

Mi más sincero agradecimiento a Patricia Prado, investigadora por la que siento una profunda admiración. Gracias por todo lo que he aprendido trabajando a tu lado y por todo el apoyo que me has dado.

Gracias a Irrintzi Ibarrola por su ayuda y por su inestimable aportación a mi formación.

También a Paco Gómez, por acogerme durante mis estancias en el IEO de Murcia y por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo.

Gracias a Nardo Vicente, investigador incansable y un pionero en los trabajos con la nacra.

Agradecer también a Michella Tundo, Maria del Toro, Alberto Martínez, Gwendaline Provenzani, Sophie Piaentini por su ayuda en el procesado de las conchas utilizadas en el trabajo de crecimiento de *Pinna nobilis* y a la Reserva Marina de Tabarca y a Santi Jiménez por su ayuda en la obtención de las conchas.

Por su puesto, gracias a la Universidad Católica de Valencia SVM, al IMEDMAR-UCV y a todo el profesorado que me ha acompañado en algún momento desde el inicio de mis estudios de grado.

También al Instituto Español de Oceanografía (IEO) de San Pedro del Pinatar y al Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (IRTA) por su ayuda a través de las estancias realizadas en ambos centros.

Gracias de todo corazón a mi compañera de viaje, Mar Roca, por todo lo compartido, por todo lo vivido.

A mi familia, a mis padres por todo su apoyo, a mi hermana María por su cariño y ayuda infinita y a mis hermanas pequeñas África e Irene por todo el amor que me transmiten.

Sin duda, no me puedo olvidar de que la investigación requiere de fondos para su desarrollo. Sin esta financiación no se podría haber materializado la presente tesis, ni se podrían haber llevado a cabo los diferentes proyectos realizados. Por ello me gustaría agradecer a:

Parte de esta tesis, en concreto la relacionada con la fisiología energética de *Pinna nobilis* y *P. rudis* y los estudios de crecimiento de *P. rudis*, ha sido financiada por la Fundación Biodiversidad con el apoyo del actual Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO), a través de proyecto PinnaSpat “Reproducción de *Pinna nobilis* en condiciones de cautividad e identificación de zonas libres de *Haplosporidium pinnae* para la reintroducción de juveniles mediante semilla centinela”. Además, la financiación por parte del MITECO del proyecto “Rescate de 215 ejemplares de nacra (*Pinna nobilis*) y su mantenimiento en 5 centros especializados en el marco del Proyecto UFE IP-PAF INTEMARES (LIFE15 IPE ES 012)” permitió el desarrollo de los estudios de la mortandad

masiva de *P. nobilis*. Agradecer también a todas las entidades que participaron en este último proyecto (Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (IRTA), Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Instituto Español de Oceanografía de España (IEO) y l'Oceanogràfic de Valencia).

A la Fundación Príncipe Alberto II de Mónaco por su apoyo a través del proyecto “*The study, protection and possible breeding of pen shell (Pinna nobilis) in the Boka Kotorska Bay*” que permitieron el desarrollo de los estudios de actividad de las valvas y monitorización de los parámetros ambientales.

A la Fundación de la Comunidad Valenciana para el Medio Ambiente por su apoyo a través del proyecto “Estudio del crecimiento del mayor bivalvo del Mediterráneo, la nacra (*Pinna nobilis*), en las costas de la Comunidad Valenciana”, mediante el cual se pudieron realizar los estudios de crecimiento de *Pinna nobilis*.

Parte de las infraestructuras utilizadas para el desarrollo de los ensayos in situ fueron financiadas por la Caise d'Epargne, a través del proyecto “*Etude écosystémique et économique de la grande nacre de Méditerranée espèce endémique de Méditerranée*”, fondos FEDER (European Regional Development Fund) y la propia Universidad Católica de Valencia SVM.

También me gustaría agradecer a la Dirección General de Sostenibilidad de la Costa y el Mar y la Secretaría de Pesca del Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (RMIP-SGMMAGRAMA), la Conselleria de Infraestructuras, Territorio y Medio Ambiente (CITMA) y la Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient, Canvi Climàtic i Desenvolupament Rural (Generalitat Valenciana), a la Direcció General de Polítiques Ambientals i Medi Natural, del Departament de Territori i sostenibilitat (Generalitat de Catalunya), al Parc Natural del Delta del Ebre, el Parc Natural del Montgrí, Les Illes Medes i el Baix Ter y el Parc Natural de Cap de Creus, , y a Andromeda Group por conceder los permisos necesarios durante los diferentes trabajos realizados para la translocación y manipulación de ejemplares de *Pinna nobilis* y *P. rudis*.

Resumen

La nacra, *Pinna nobilis*, es un molusco bivalvo endémico del mar Mediterráneo. Es el segundo bivalvo más grande del mundo, con una concha que puede superar los 120 cm. Actualmente se encuentra en peligro crítico de extinción, desde que a finales de 2016 una enfermedad causada por el protozoo *Haplosporidium pinnae* haya llevado a la mayor parte de sus poblaciones a la desaparición, dejando, por ahora, únicamente algunas poblaciones dispersas en ambientes parálisis.

En el presente trabajo se completan lagunas en el conocimiento de la especie para intentar evitar su extinción. Se ha profundizado en los conocimientos relativos a su ecología y su interacción con el hábitat en el que se encuentra, a través de estudios sobre la actividad de sus valvas y el crecimiento de la concha de ejemplares de *Pinna nobilis*. Además, los estudios realizados sobre la fisiología energética de esta especie han mostrado que ejemplares de 30 cm pueden filtrar más de 2500 l día⁻¹, a la vez que se ha evidenciado el estrés fisiológico de las nacras a temperaturas extremas de 8.5 y 28 °C. Se ha detectado que las poblaciones supervivientes de *P. nobilis* en ambientes parálisis son muy vulnerables a extremos climáticos e impactos de origen antropogénico.

Asimismo, se ha realizado el seguimiento del evento de mortandad en colaboración con diversas instituciones nacionales e internacionales, incluyendo el rescate de ejemplares de nacra para salvaguardarlos de la infección y mantenerlos en cautividad. Estos trabajos han permitido conocer mejor la etiología de la enfermedad y establecer las primeras bases en la lucha por salvar a la nacra de la extinción, y también han puesto de manifiesto la influencia que tiene la temperatura en el control de la enfermedad, activando la virulencia de *Haplosporidium pinnae* por encima de los 13.5 °C.

De manera paralela, se han realizado estudios de fisiología energética en su congénere *Pinna rudis*, como modelo biológico del género *Pinna*, dado que los escasos ejemplares de *P. nobilis* limitan la posibilidad de realizar estos experimentos. Se ha medido por primera vez el *scope for growth* (SFG) en este género, lo que ha permitido profundizar en los conocimientos sobre la alimentación, recomendándose el uso de dieta viva de microalgas. Para completar la información necesaria de *P. rudis*, se realizó un estudio de crecimiento en mar abierto durante dos años, analizando simultáneamente las variables

ambientales para detectar su influencia en el crecimiento. Este estudio ha permitido observar que *P. rudis* muestra el mayor crecimiento registrado en un bivalvo hasta la fecha (1.32 mm día⁻¹) y que la temperatura es la principal variable ambiental que modula su crecimiento.

Abstract

The fan mussel *Pinna nobilis* is an endemic bivalve from the Mediterranean Sea. It is the second largest bivalve in the world and can reach up to 120 cm in shell length. At present, it is classified as a critically endangered species because of a mortality started in late 2016. This mortality is caused by the protozoa *Haplosporidium pinnae* and it has devastated most of the fan mussel populations across the Mediterranean Sea, leaving only a few isolated populations alive in paralic environments.

The present research work focuses on expanding the knowledge necessary to avoid the extinction of the species. The fan mussel ecology and the interaction of the species within its habitat has been studied through valve activity and shell growth records. The studies conducted regarding the energetic physiology of the species have shown that individuals of 30 cm length can filter above 2500 l day⁻¹ and have shown the physiological stress of fan mussels at extreme temperatures of 8.5 and 28 °C. It has been observed that the surviving population of *Pinna nobilis* in paralic environments are particularly vulnerable to climatic extremes.

Additionally, the spread of the disease has been monitored in collaboration with national and international institutions, including the rescue of *P. nobilis* individuals to be maintained in captivity, to protect them from the infection. This study has improved the knowledge of the infection and established the first steps in saving the species from extinction. It has been especially relevant the observation of a relation between the virulence of *Haplosporidium pinnae* and temperatures above 13.5 °C.

At the same time, energetic physiology studies have been carried out with the fan mussel congener species *Pinna rudis*, which has been used as a biological model of the genus *Pinna* because of the limited number of *P. nobilis* individuals alive. The scope for growth (SFG) has been measured for the first time in this genus, which has increased the knowledge about the feeding, recommending the use of live phytoplankton. To complete the necessary information on *P. rudis*, a growth study was carried out in the open ocean for two years, simultaneously analyzing environmental variables to detect their influence on growth. This study has allowed us to observe that *P. rudis* shows the highest growth

recorded in a bivalve to date (1.32 mm day^{-1}) and that temperature is the main environmental variable that modulates its growth.

ÍNDICE

1	Introducción	1
1.1	El mar Mediterráneo	3
1.2	Familia Pinnidae; género <i>Pinna</i>	8
1.2.1	<i>Pinna nobilis</i>	14
1.2.1.1	Crecimiento	14
1.2.1.2	Actividad de las valvas	16
1.2.1.3	Amenazas y situación actual de la especie	17
1.2.2	<i>Pinna rudis</i>	21
1.2.3	Identificación <i>de visu</i> de <i>Pinna nobilis</i> y <i>Pinna rudis</i> e hibridación	22
1.2.4	Mantenimiento en cautividad	28
1.3	Objetivos	31
2	Material y métodos	33
2.1	Caracterización del hábitat de la población de <i>Pinna nobilis</i> en Calp	35
2.1.1	Parámetros oceanográficos	35
2.1.2	Sedimentación	35
2.1.3	Estudio granulométrico	37
2.2	<i>Pinna nobilis</i>	38
2.2.1	Actividad de valvas	38
2.2.1.1	Extracción de individuos	38
2.2.1.2	Mantenimiento en cautividad	39
2.2.1.3	Sistema de actividad de valvas	40
2.2.1.4	Tratamiento experimental	41
2.2.1.5	GapeR y procesado de datos	43
2.2.2	Crecimiento de <i>Pinna nobilis</i>	44
2.2.2.1	Recolección de conchas y área de estudio	44
2.2.2.2	Procesado de las conchas	47
2.2.2.3	Modelo de crecimiento	48
2.2.3	Evento de mortandad masiva de <i>Pinna nobilis</i>	49
2.2.3.1	Seguimiento del evento de mortandad	50
2.2.3.2	Relación entre la temperatura del agua y la supervivencia	51
2.2.3.3	Reclutamiento y colectores de larvas	52
2.2.3.4	Rescate de individuos	52
2.2.3.4.1	Extracción de individuos	53
2.2.3.4.2	Transporte	54
2.2.3.4.3	Mantenimiento en cautividad	55
2.2.3.5	Jaulas de exclusión de depredadores	56
2.2.4	Influencia de la temperatura en la filtración y el consumo de oxígeno de <i>Pinna nobilis</i>	58
2.2.4.1	Diseño experimental	59
2.2.4.2	Medición de las tasas fisiológicas	60
2.2.4.2.1	Tasa de aclaramiento	60
2.2.4.2.2	Consumo de oxígeno (VO_2 : $mgO_2 h^{-1}$)	61
2.2.4.2.3	Expresión de las mediciones fisiológicas	61
2.2.4.2.4	Análisis estadístico	62
2.3	<i>Pinna rudis</i> como modelo de aspectos biológicos de la familia Pinnidae	63
2.3.1	Crecimiento de <i>Pinna rudis</i>	63
2.3.1.1	Localización y recolección de juveniles	63
2.3.1.2	Diseño y ubicación de jaulas para el mantenimiento de <i>Pinna rudis in situ</i>	64

2.3.1.3	Seguimiento en las jaulas.....	66
2.3.1.4	Relación morfométrica y análisis estadístico	67
2.3.2	Fisiología energética de <i>Pinna rudis</i>	69
2.3.2.1	Transporte y aclimatación de ejemplares	69
2.3.2.2	Colocación de los ejemplares en los tanques	71
2.3.2.3	Acondicionamiento a dietas experimentales.....	72
2.3.2.4	Medidas fisiológicas	73
2.3.2.4.1	Puesta a punto del experimento	73
2.3.2.4.2	Tasa de aclaramiento	74
2.3.2.4.3	Características de las dietas	75
2.3.2.4.4	Tasa de ingestión.....	76
2.3.2.4.5	Eficiencia de absorción y tasa de absorción	76
2.3.2.4.6	Tasa metabólica	77
2.3.2.4.7	<i>Scope for growth</i> y eficiencias de crecimiento brutas y netas	78
2.3.2.5	Expresión de las mediciones fisiológicas y análisis estadístico	78
3	Resultados	79
3.1	Caracterización del hábitat de la población de <i>Pinna nobilis</i> en Calp (Alicante)....	81
3.1.1	Parámetros oceanográficos.....	81
3.1.2	Sedimentación.....	87
3.1.3	Estudio granulométrico	87
3.2	<i>Pinna nobilis</i>	90
3.2.1	Actividad de las valvas	90
3.2.1.1	Cambio del patrón de actividad de las valvas	90
3.2.1.2	Respuesta al fotoperiodo.....	92
3.2.1.3	Análisis estadístico	93
3.2.2	Modelos de crecimiento de <i>Pinna nobilis</i>	96
3.2.3	Evento de mortandad en <i>Pinna nobilis</i>	102
3.2.3.1	Seguimiento del evento de mortandad	102
3.2.3.2	Importancia de la temperatura en la supervivencia	102
3.2.3.3	Reclutamiento y colectores de larvas	104
3.2.3.4	Rescate de individuos	104
3.2.3.4.1	Ejemplares de la Marina Real de Valencia	104
3.2.3.4.2	Ejemplares de Portlligat (Girona) y bahía dels Alfacs (Tarragona)	105
3.2.3.5	Jaulas de exclusión de depredadores.....	106
3.2.4	Influencia de la temperatura en la filtración y el consumo de oxígeno de <i>Pinna nobilis</i>	107
3.2.4.1	Datos biométricos.....	107
3.2.4.2	Mediciones fisiológicas	107
3.3	<i>Pinna rudis</i> como modelo de aspectos biológicos de la familia Pinnidae.....	111
3.3.1	Crecimiento de <i>Pinna rudis</i>	111
3.3.2	Fisiología energética de <i>Pinna rudis</i>	116
3.3.2.1	Colocación de los ejemplares en los tanques	116
3.3.2.2	Análisis biométrico de <i>Pinna rudis</i>	116
3.3.2.3	Tasas fisiológicas	117
4	Discusión.....	121
4.1	Hábitat de las poblaciones de <i>Pinna nobilis</i> en Calp (Alicante).....	123
4.2	<i>Pinna nobilis</i>	125
4.2.1	Actividad de valvas	125
4.2.2	Modelos de crecimiento de <i>Pinna nobilis</i>	129
4.2.3	Evento de mortandad en <i>Pinna nobilis</i>	136
4.2.3.1	Seguimiento del evento de mortandad	136
4.2.3.2	Relación entre la temperatura del agua y la supervivencia	138
4.2.3.3	Reclutamiento y colectores de larvas	140
4.2.3.4	Rescate de individuos	142

4.2.3.4.1	Ejemplares de la Marina Real de Valencia	142
4.2.3.4.2	Ejemplares de Portlligat y bahía dels Alfacs	143
4.2.3.5	Jaulas de exclusión de depredadores.....	144
4.2.3.6	Acciones y recomendaciones	144
4.2.4	Influencia de la temperatura en la filtración y el consumo de oxígeno de <i>Pinna nobilis</i>	147
4.2.4.1	Mediciones fisiológicas	147
4.2.4.2	Rol ecológico de <i>Pinna nobilis</i>	150
4.2.4.3	<i>Pinna nobilis</i> en cautividad	152
4.3	<i>Pinna rudis</i> como modelo de aspectos biológicos de la familia Pinnidae.....	155
4.3.1	Crecimiento de <i>Pinna rudis</i>	155
4.3.2	Fisiología energética de <i>Pinna rudis</i>	161
4.3.2.1	Tasas fisiológicas: Análisis cuantitativo.....	161
4.3.2.2	Comparación de dietas	165
4.3.2.3	Implicaciones para <i>Pinna nobilis</i>	167
5	Conclusiones	169
6	Referencias bibliográficas	175
	Anexo I. Tablas suplementarias	203
	Anexo II. Lista de publicaciones realizadas durante el doctorado	213



1. Introducción

1.1 El mar Mediterráneo

La formación del mar Mediterráneo se inició con la rotura de Pangea, iniciada hace 175 millones de años, a partir del conocido como océano de Tetis. Su cuenca se encuentra en la zona templada del hemisferio norte, situado entre África, Europa y Asia (Figura 1). Es el mar cerrado más grande y profundo del mundo, con una extensión de 2,969,000 km², una profundidad media de 1,460 m y una profundidad máxima de 5,267 m (Coll *et al.*, 2010). Presenta dos cuencas principales, la cuenca occidental y la cuenca oriental, conectadas a través del estrecho de Sicilia. El intercambio de agua con otros mares y océanos tiene lugar a través del estrecho de Gibraltar, que lo conecta con el Atlántico, del canal de Suez, que lo conecta con el mar Rojo y el océano Índico y a través del estrecho de los Dardanelos, que lo conecta con el mar de Mármara y el mar Negro.

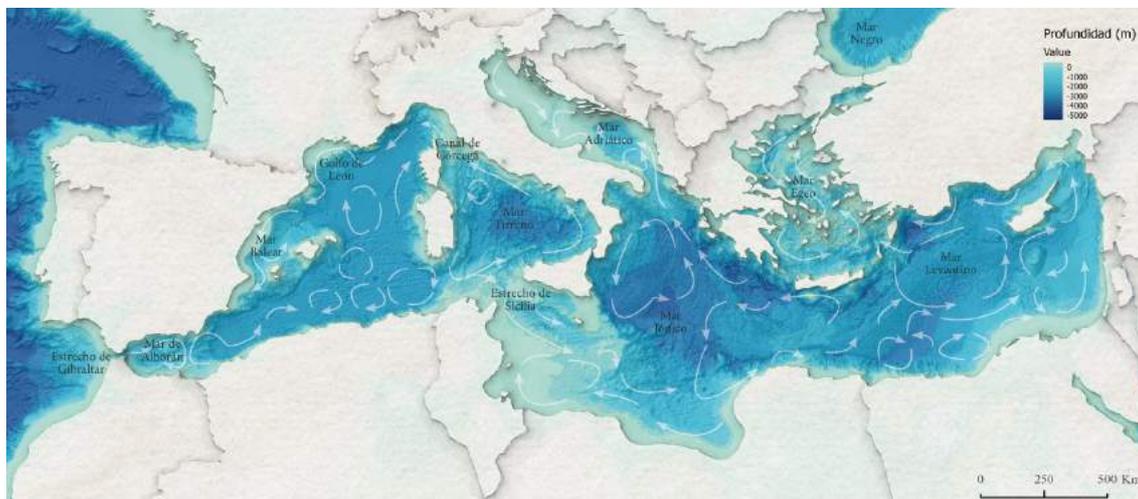


Figura 1: Mapa de la batimetría y corrientes superficiales del mar Mediterráneo. Mapa: Mar Roca.

El limitado contacto del mar Mediterráneo con otras masas de agua y la latitud a la que se encuentra, dan lugar a unas condiciones oceanográficas particulares. La temperatura presenta una gran variación estacional y un gradiente geográfico, con temperaturas más bajas al norte y al oeste que aumentan gradualmente hacia el sur y el este, con una media superficial de ≈ 15.5 °C y ≈ 21 °C respectivamente para las cuencas occidental y oriental (Würtz, 2010; Pisano *et al.*, 2020). En consecuencia, la evaporación es mayor en la zona oriental, bajando el nivel del mar y aumentando la salinidad en torno a 39‰ respecto al Mediterráneo occidental, que se encuentra alrededor de 37.6‰ (Würtz, 2010). El exceso de evaporación, comparado con los aportes de agua dulce, dan lugar a un balance hídrico negativo, que es compensado por la introducción de aguas menos densas superficiales del Atlántico, a través del estrecho de Gibraltar. El Mediterráneo es un mar oligotrófico,

aunque existen áreas costeras que presentan características oceanográficas particulares (resurgimientos locales, corrientes y descargas de ríos, impactos antropogénicos, etc.) que provocan un enriquecimiento orgánico. En consecuencia, como determinaron Estrada (1996) y Bosc *et al.* (2004), la producción biológica es máxima en determinadas áreas costeras y se encuentra inversamente relacionada con el aumento de la temperatura y la salinidad hacia el sur y hacia el este, siendo, por lo tanto, mínima en la cuenca oriental (Danovaro *et al.*, 1999; Bosc *et al.*, 2004).

La circulación general del Mediterráneo es compleja debido a las numerosas subcuencas que conforman las dos cuencas principales y que designan a los pequeños mares que conforman el Mediterráneo (Figura 1), conectados entre sí por zonas de transición que hacen que sus límites sean difusos (Bianchi, 2004). En superficie, la corriente entrante desde el Atlántico a través del estrecho de Gibraltar se dirige, pasando por el mar de Alborán, hacia el este bordeando el continente africano en una serie de giros (Bas, 2009). Parte de estos giros producidos en la costa de Argelia se separan de la corriente principal hacia el norte, sin sobrepasar la línea formada entre las islas Baleares y Croacia, lo que divide el Mediterráneo sur occidental del Mediterráneo norte occidental (Teruzzi *et al.*, 2014). De la corriente principal una ramificación se separa en dirección al mar Tirreno, que continua por la costa italiana cruzando el canal de Croacia en dirección al golfo de León y al mar Balear. La corriente principal atraviesa el poco profundo estrecho de Sicilia (300 m de profundidad), continuando por la costa sur, generándose una serie de giros similares a los de la costa argelina, hacia el mar Levantino. En avance de esta corriente a través de la cuenca oriental da lugar al giro principal que encontramos en la cuenca oriental (Millot y Taupier-Letage, 2005), en el mar Jónico, y al giro en el mar Levantino, a partir de los cuales parte de la corriente se desvía hacia el mar Adriático y el mar Egeo, entrando en ambos mares por su parte oriental y saliendo por la occidental (Bas, 2009). En la cuenca oriental, la principal formación de masas de agua intermedia (masas de agua localizadas entre zonas poco profundas hasta los 400 m) se da en el mar Levantino y al sur del mar Adriático (Bas, 2009). Estas aguas conectan con la cuenca occidental a través de las zonas más profundas del estrecho de Sicilia (Astraldi *et al.*, 1996; Garcia-Solsona *et al.*, 2020). Por su parte, en la cuenca occidental la principal formación de aguas intermedias se da en el golfo de León, corriente que junto con el resto de aguas intermedias formadas en la cuenca oriental terminará saliendo de nuevo al Atlántico por la parte más profunda del estrecho de Gibraltar (Cacho *et al.*, 2000; Bas, 2009).

El cierre del estrecho de Gibraltar hace aproximadamente 6 millones de años produjo una gran desecación debido al balance hídrico negativo que presenta el Mediterráneo, lo que llevo a una gran reducción de la biodiversidad (Bouchet y Taviani, 1992; Myers, 1996; Bianchi y Morri, 2000). La apertura del estrecho hace 5 millones de años, condujo a una repoblación del Mediterráneo con especies atlánticas, alternándose entradas de especies de climas más fríos o de climas subtropicales en función de la alternancia de periodos de glaciares e interglaciares (Briggs, 1974; Bianchi y Morri, 2000). El Mediterráneo presenta unas condiciones que permiten la supervivencia simultánea tanto de organismos de climas templados como subtropicales y el origen de su formación junto con los distintos sucesos ocurridos durante su historia, dan lugar a la gran biodiversidad presente en la época actual, con especies provenientes de distintas categorías biogeográficas (Bianchi y Morri, 2000): 1) un “núcleo” atlántico-mediterráneo templado; 2) especies cosmopolitas/panoceanicas; 3) especies endémicas, que comprenden tanto especies paleoendémicas (posiblemente de origen proveniente del océano de Tetis) como especies neoendémicas (principalmente de origen pliocénico); 4) especies del Atlántico subtropical (provenientes de periodos de interglacial); 5) especies del Atlántico boreal (provenientes principalmente del último periodo de glaciación); 6) especies del mar Rojo (migración lessepsiana, afectando en mayor medida al Mediterráneo oriental); 7) especies del Atlántico oriental (afectando en mayor medida al Mediterráneo occidental). Por ello, a pesar de representar menos del 1% de la superficie del océano, actualmente podemos encontrar alrededor del 4–18% de las especies marinas macroscópicas, destacando, además, su elevado porcentaje de endemismos (20–30%), lo que lleva a considerar al Mediterráneo como un punto de elevada biodiversidad (Cuttelod *et al.*, 2009; Mannino *et al.*, 2017).

El calentamiento global afecta a todos los mares y océanos, pero las condiciones geológicas, climatológicas e hidrológicas comentadas previamente, convierten al Mediterráneo en un punto caliente del cambio climático, con tasas de calentamiento 2–3 veces más elevadas que la media global (Figura 2) (Diffenbaugh *et al.*, 2007; Vargas-Yáñez *et al.*, 2008; Lejeusne *et al.*, 2010). Como consecuencia, los modelos estiman un panorama poco alentador a corto plazo (desde el punto de vista geológico, aunque con implicaciones a escala humana), con un continuado aumento de la temperatura y la intensificación de los eventos climatológicos extremos (Giorgi y Lionello, 2006; Molina *et al.*, 2020), y su consecuente efecto en la vida marina (Jorda *et al.*, 2012; Marbà *et al.*, 2015). La suma del cambio climático, efectos antropogénicos como la destrucción de

hábitats o sobreexplotación y la introducción de especies invasoras, muchas veces relacionada con los anteriores (Katsanevakis *et al.*, 2014), son las principales amenazas a las que se enfrenta la vida marina (Benoit y Comeau, 2012; Bianchi *et al.*, 2012). Como resultado, el 20% del total de la cuenca y entre el 60–99% de las aguas territoriales de los países europeos mediterráneos muestran un grado de impacto elevado, con menos del 1% del territorio mostrando relativamente ningún tipo de impacto (Micheli *et al.*, 2013).

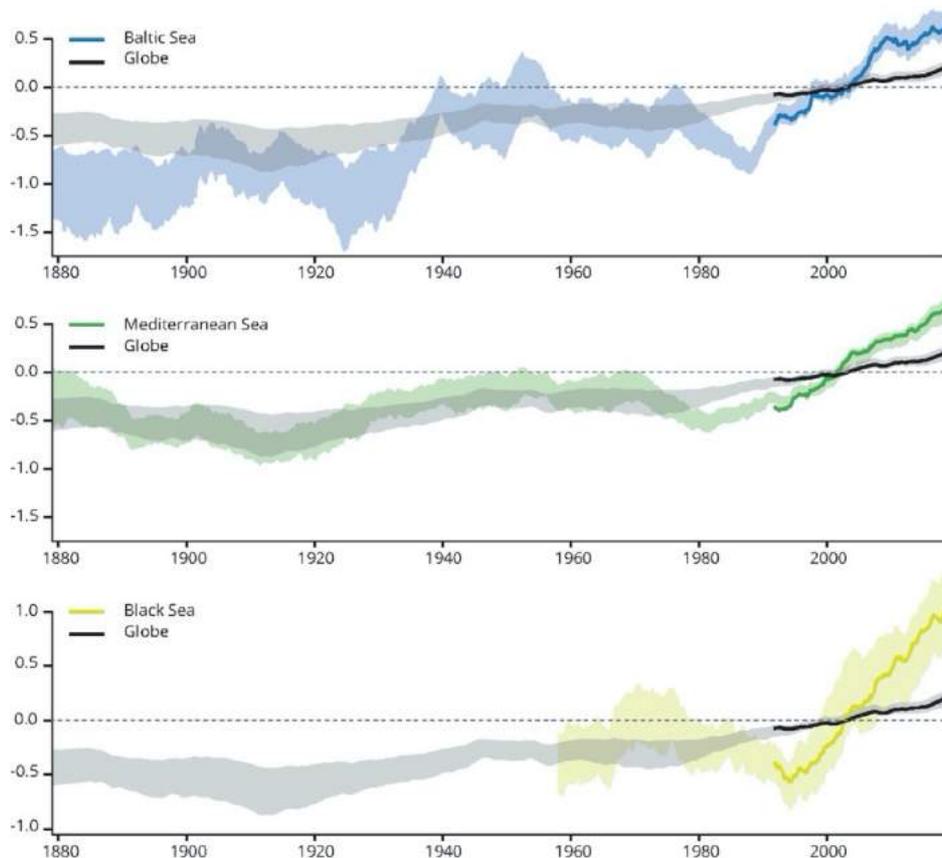


Figura 2: Anomalías en la temperatura de la superficie del mar promediadas a nivel global y regional en relación con una línea base de 1981–2010. La línea continua muestra una serie basada en satélites que combina el análisis SST CCI (hasta 2016) con las actualizaciones de OSTIA casi en tiempo real (hasta 2018). El área sombreada en cada gráfico indica el rango de incertidumbre superior e inferior de la evolución a largo plazo de los promedios regionales basados en tres conjuntos de datos globales (HadSST.4.0.0.0, ERSSTv5 y HadISST). Fuente EEA (2019).

Por si fuera poco, estos impactos están impulsando cambios en la dinámica de los brotes de enfermedades marinas infecciosas (Tracy *et al.*, 2019), y los huéspedes ectotérmicos con parásitos con etapas de transmisión ambiental que pueden persistir fuera del huésped, se encuentran entre las especies más vulnerables al calentamiento global (Altizer *et al.*, 2013). La reducción de la biodiversidad, la translocación de especies, la alteración del hábitat natural y la composición de la comunidad debido a la acción humana y al cambio climático facilitan la aparición de enfermedades marinas infecciosas pandémicas, con considerables costos económicos y ecosistémicos (Lafferty *et al.*, 2015; Harvell *et al.*,

2019). Sin embargo, evaluar si el número de enfermedades está aumentando o disminuyendo en el océano y cuantificar las causas antropogénicas de las enfermedades marinas infecciosas es un desafío debido a la falta de datos y de registros a largo plazo (Tracy *et al.*, 2019).

En relación con estas últimas consideraciones, dentro de la familia Pinnidae existen dos especies consideradas estructurales y, por ello, de alto valor ecológico y que son objetivo del presente trabajo. *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758), un molusco bivalvo azotado por una enfermedad infecciosa que lo ha envuelto en un evento de mortandad masiva llevándolo prácticamente a su extinción y su congénere *P. rudis* (Linnaeus, 1758), afectado como muchas otras especies por impactos de origen antrópico, libre de esta enfermedad y que supone, a día de hoy, el mejor modelo de estudio en la lucha por evitar la extinción de *P. nobilis*. Ambas especies son los representantes más emblemáticos de la familia Pinnidae y únicas del género *Pinna* en el mar Mediterráneo (Figura 3).

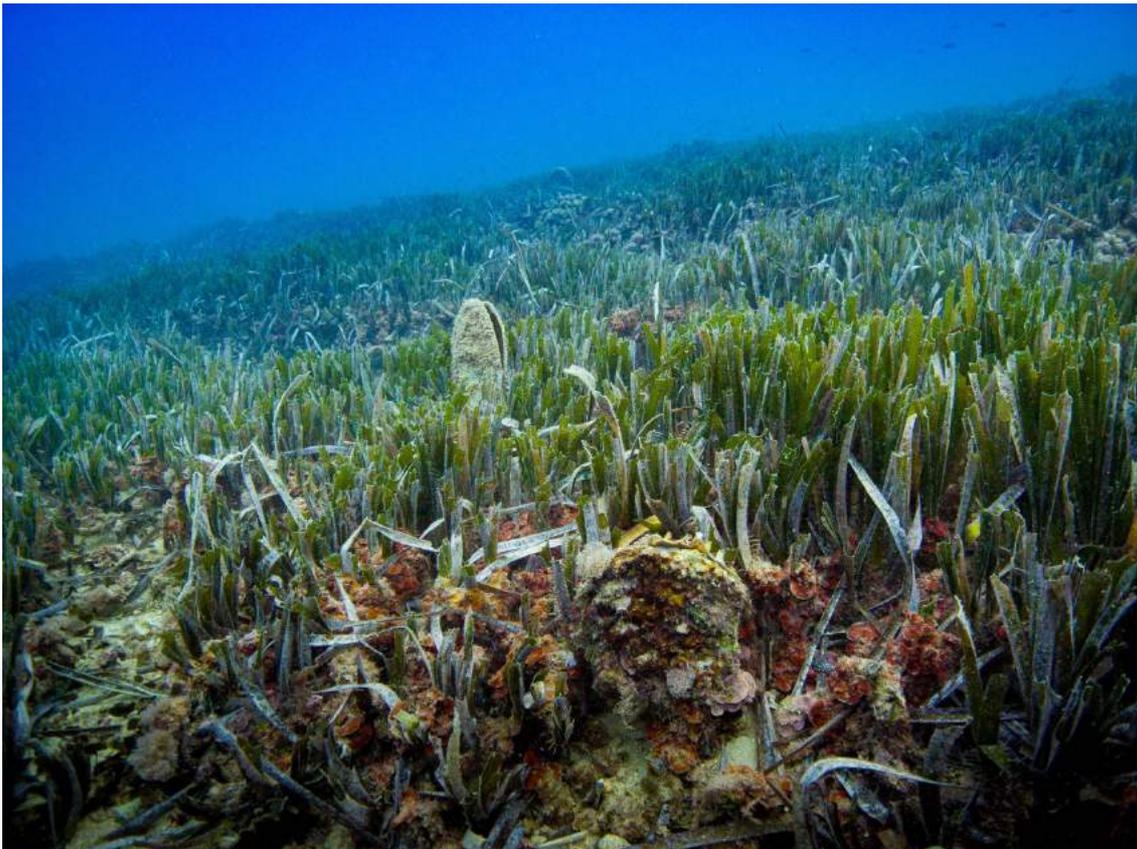


Figura 3: Ejemplar de *Pinna rudis* (en primer plano) y *P. nobilis* (unos metros más atrás) en Calp (Alicante). Foto: fuente propia.

1.2 Familia Pinnidae; género *Pinna*

La familia Pinnidae (Leach, 1819) incluye 3 géneros y 55 especies distribuidas por todo el mundo en regiones templadas y tropicales, desde áreas someras hasta los 600 m (Schultz y Huber, 2013; Lemer *et al.*, 2014). El género *Pinna* únicamente está representado en el Mediterráneo por 2 de sus 25 especies, *Pinna nobilis* y *P. rudis*, siendo la primera de ellas endémica. Las especies de este grupo se caracterizan por la forma triangular de la concha, con la parte anterior puntiaguda incrustada en el substrato hasta aproximadamente 1/3 de la longitud total y la parte posterior elevándose por encima de la superficie del fondo. La sujeción al fondo se produce a través de los filamentos del biso (Figura 4).

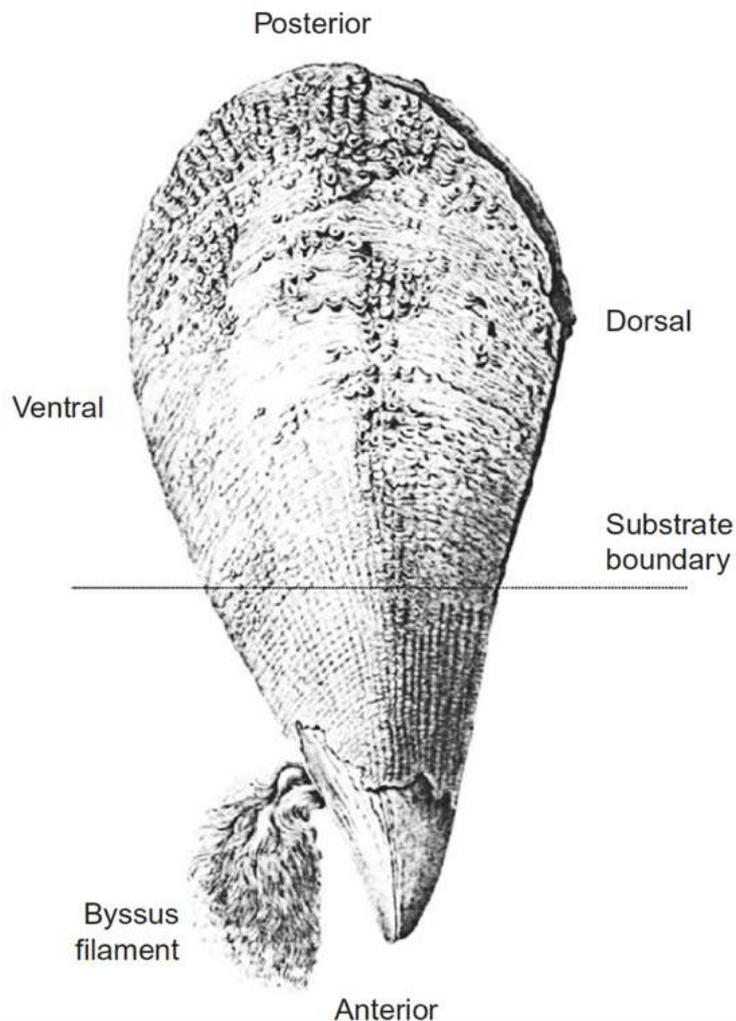


Figura 4: Esquema general de un ejemplar de *Pinna nobilis*. Redibujado por Basso *et al.* (2015c) de Czihak y Dierl (1961).

La anatomía general es similar a la del resto de bivalvos como se puede observar en la, aunque presentan algunas características exclusivas del grupo (Figura 5 y Figura 6):

- i) Presencia de un canal de desecho en la zona ventral. Este canal presenta un gran número de cilios que generan una corriente para la eliminación de pseudoheces (partículas embebidas en mucus desechadas y no ingeridas).

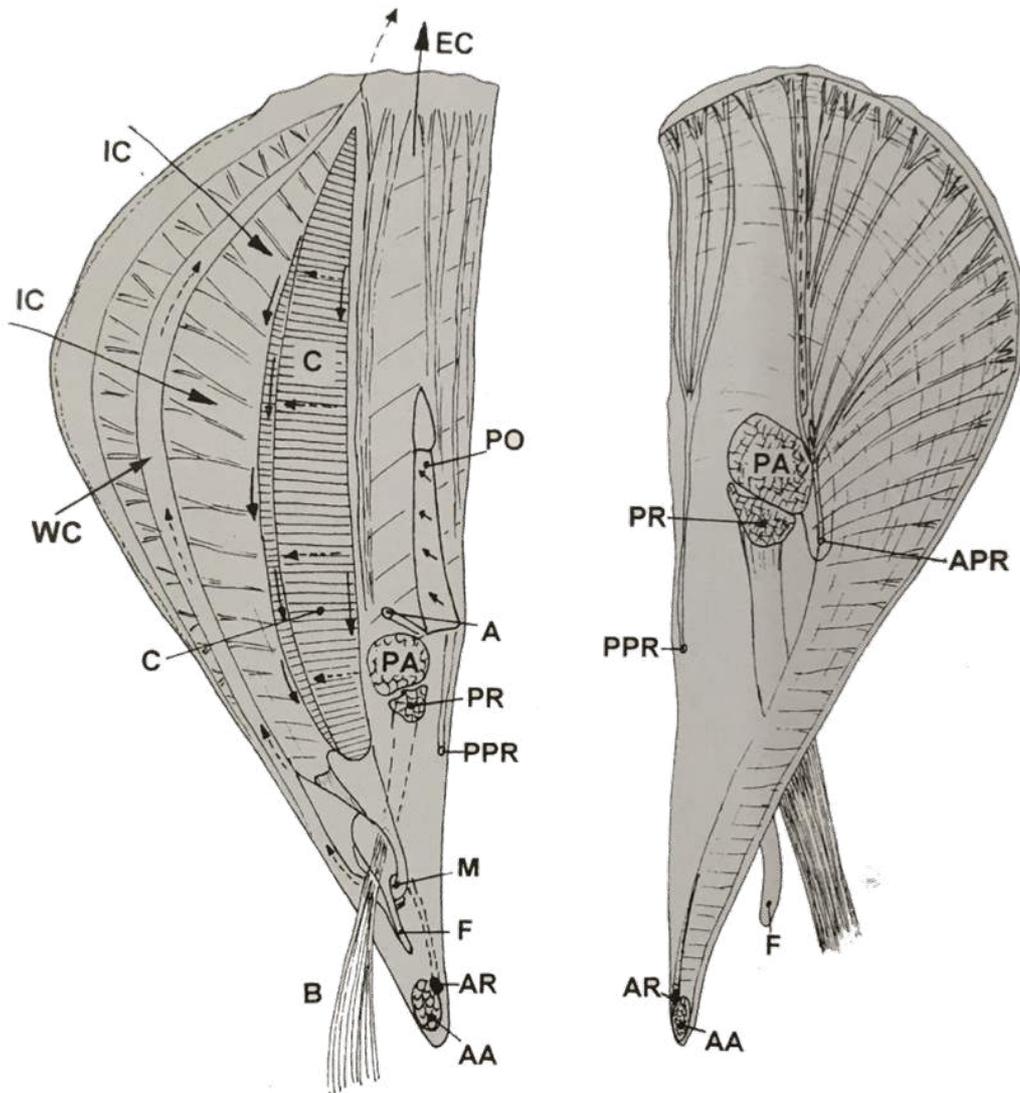


Figura 5: Dibujo de la anatomía de *Pinna carnea*. Visión ventral de las valvas izquierda y derecha. A, ano; AA, músculo aductor anterior; APR, retractor paleal anterior; AR, músculo anterior retractor; B, biso; C, branquia; EC, corriente exhalante; F, pie; IC, corriente inhalante; M, boca; PA, músculo aductor posterior; PO, órgano paleal; PPR, retractor paleal posterior; PR, músculo retractor posterior; WC, canal de desecho. Figura de Yonge (1953) modificada por Schultz y Huber (2013).

- ii) La concha, especialmente en su parte posterior, es estructuralmente simple, lo que les permite un rápido crecimiento y reparación. Además, la capacidad de retracción del manto, que no se encuentra unido a la concha como ocurre en otros bivalvos, les permite regenerar prácticamente toda la parte posterior de la concha (García-March, 2005). Esta capacidad de regeneración les permite sobrevivir y mantener su hábito semiinfaunal (Yonge, 1953) ya que las conchas pueden sufrir roturas al sobresalir varias decenas de centímetros sobre el substrato (Schultz y Huber, 2013). Cuando se producen roturas importantes de la parte posterior, regeneran rápidamente la concha hasta poder cerrarla de nuevo, de forma que pueda protegerse de amenazas externas incluso sin recuperar su tamaño o forma original (Figura 7).

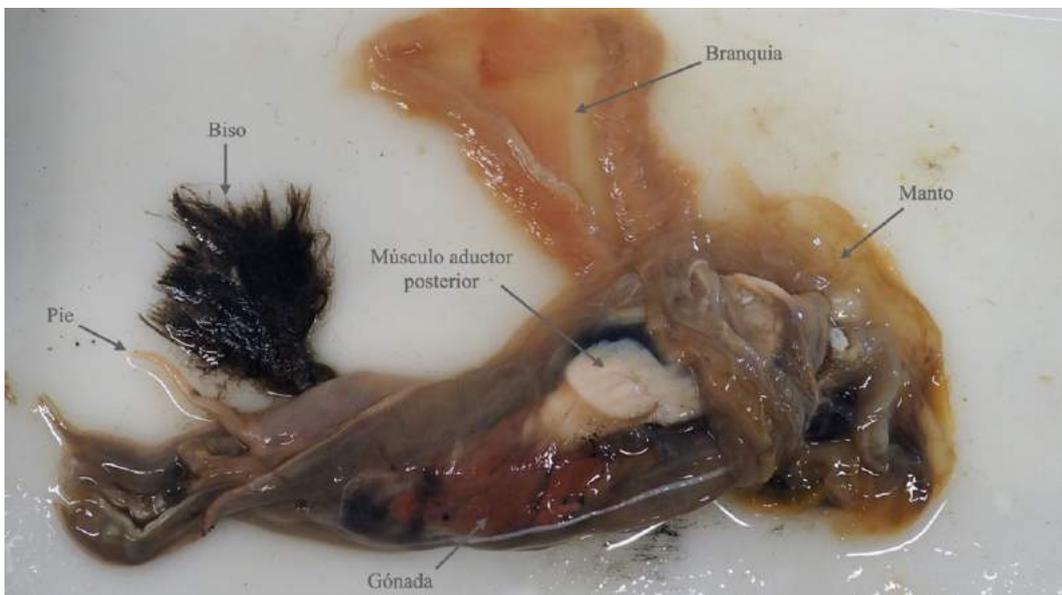


Figura 6: Fotografía de la disección de un ejemplar muerto de *Pinna nobilis* con las principales partes anatómicas señaladas. Foto: fuente propia.

- iii) Muestran un órgano exclusivo, el órgano paleal, localizado sobre el músculo aductor posterior (Figura 8). Este órgano de tamaño reducido tiene la capacidad de aumentar en gran medida su tamaño por presión hidrostática mediante fluidos corporales. Las funciones de este órgano no son totalmente conocidas, pero es muy ácido (pH 1–2) lo que le permitiría mantener la concha interna libre de epibiontes (a excepción a la parte más posterior inalcanzable para el órgano paleal) y, quizá, incluso para el aturdimiento y posterior captura de especies epi y endobentónicas que se encuentren en la concha (Morton y Puljas, 2019).



Figura 7: Ejemplares de *Pinna nobilis* en el delta del Ebro con una deformación en la concha a causa de una rotura.
Foto: fuente propia.

Durante los primeros años de vida, las especies del género *Pinna* presentan de las mayores tasas de crecimiento observadas en bivalvos (Arizpe, 1995; Richardson *et al.*, 1999; Narvaez *et al.*, 2000), pudiendo alcanzar en pocos años grandes tamaños que les permiten reducir la mortalidad causada por depredadores (Kersting y García-March, 2017) y posibilita, al elevarse sobre el sustrato, una mayor disponibilidad de partículas para alimentación y una dieta más variada (Richardson *et al.*, 1999; Davenport *et al.*, 2011). Este rápido crecimiento ha supuesto que se plantee su potencial uso en acuicultura (Kozul *et al.*, 2011), aunque hasta ahora solo unas pocas especies de la familia Pinnidae han despertado interés comercial. Se han desarrollado pequeñas pesquerías en los golfo de México y California y en el mar del Caribe, a partir de *Pinna rugosa*, *P. carnea*, *Atrina maura* y *A. Tuberculosa*, grupo de especies conocido en la zona como “callo de hacha” (Narvaez *et al.*, 2000; Basurto, 2006; Palacios-Abrantes *et al.*, 2018). *P. nobilis* también se ha recolectado para consumo humano, aunque nunca se ha establecido una pesquería comercial como tal (Katsanevakis *et al.*, 2008; Katsanevakis *et al.*, 2011). Pero, a pesar de su rápido crecimiento, el reclutamiento bajo y variable mostrado por estas especies (Butler, 1987; Kersting y García-March, 2017; Prado *et al.*, 2019a) podría provocar que sus poblaciones naturales sean incapaces de soportar la presión de las pesquerías comerciales, como se ha observado en *P. rugosa*, bajo la presión de pesca artesanal (Palacios-Abrantes *et al.*, 2018). Además, el desarrollo de técnicas de maricultura también se puede utilizar como una herramienta para apoyar la continuidad de la especie con la repoblación de individuos (Bell *et al.*, 2005; Arnold, 2008; Bell *et al.*, 2008). Esto es especialmente relevante para especies en peligro crítico de extinción, como es el caso de *P. nobilis* (Kersting *et al.*, 2020a).

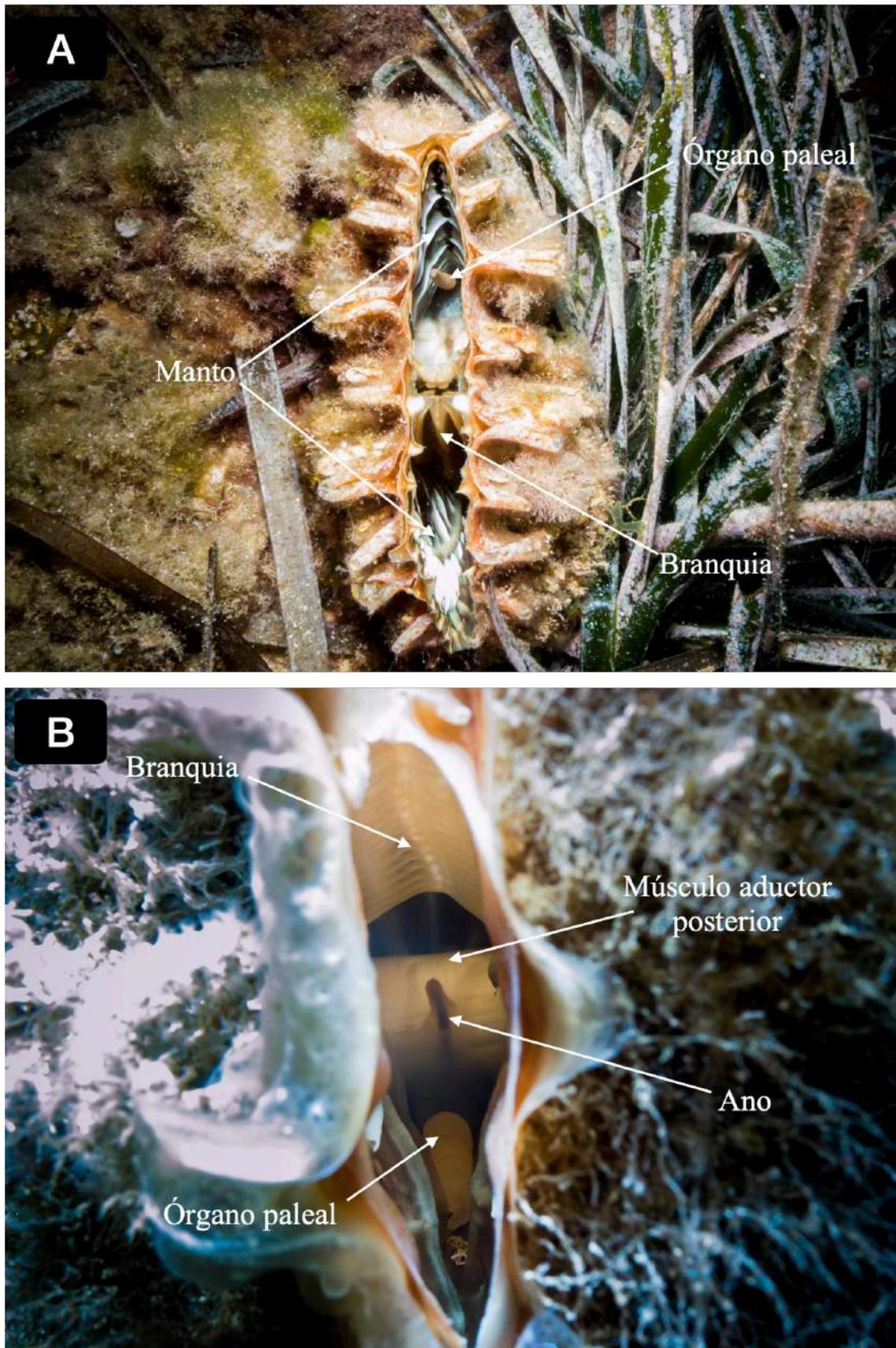


Figura 8: A) Plano general de un ejemplar de *Pinna rudis* pudiéndose observar la branquia, el manto y el órgano paleal; B) Foto de un ejemplar de *P. rudis* en el que se pueden observar la branquia, el músculo aductor posterior, el ano y el órgano paleal. Foto: fuente propia.

1.2.1 *Pinna nobilis*

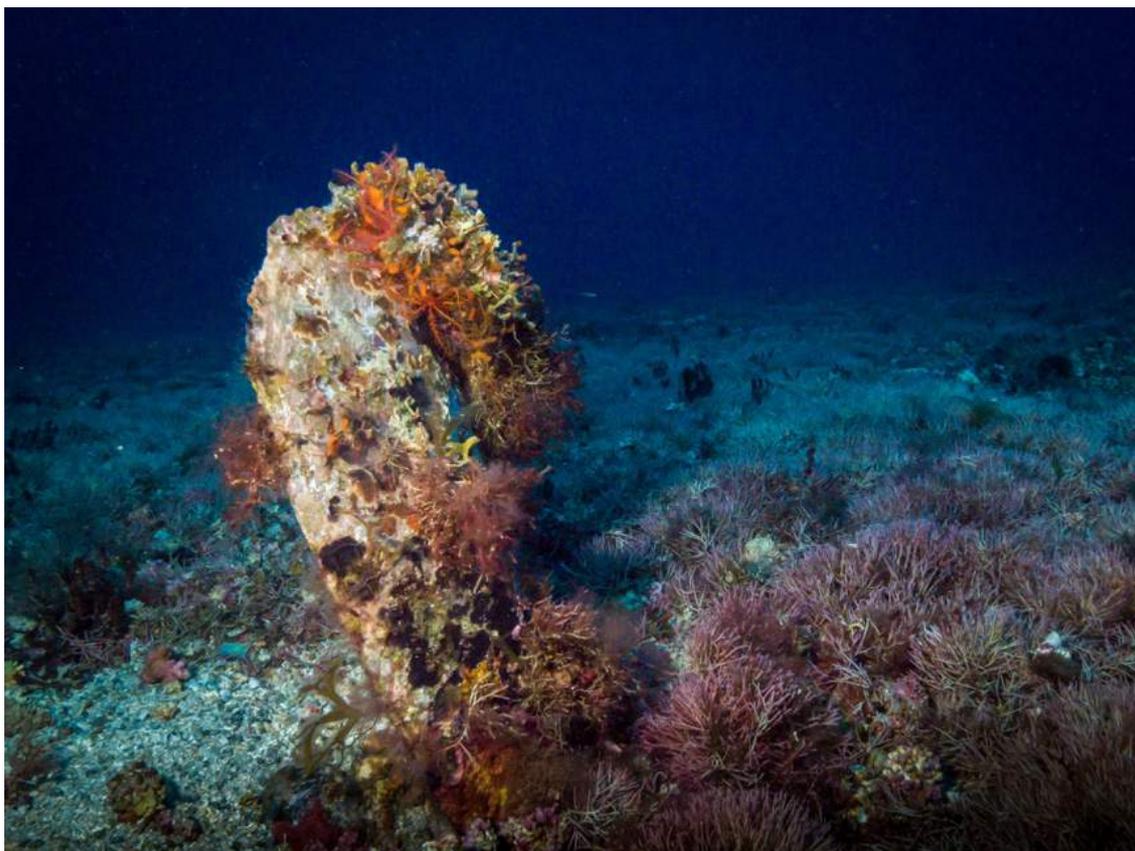


Figura 9: Ejemplar de *Pinna nobilis*. Foto: fuente propia

Pinna nobilis (Linnaeus, 1758), comúnmente conocida en España como nacra (*fan mussel/noble penshell* en inglés), es un bivalvo marino endémico del mar Mediterráneo (Figura 9). Es el molusco bivalvo más grande de este mar y el segundo más grande del mundo, con una concha que suele medir entre 40 y 80 cm de largo en ejemplares adultos pero que puede alcanzar los 120 cm (Zavodnik, 1991; Gofas, 2011). También destaca por su longevidad, ya que puede vivir al menos hasta los 50 años (Rouanet *et al.*, 2015). La nacra suele encontrarse típicamente entre 0.5 y 60 m de profundidad, asociada a praderas de *Posidonia oceanica*, aunque también puede encontrarse en fondos con otras fanerógamas como *Cymodocea nodosa*, en arena desnuda, fondos detríticos y fondos de maërl (Basso *et al.*, 2015c).

1.2.1.1 Crecimiento

Como hemos comentado anteriormente, la nacra presenta uno de los crecimientos de concha más rápidos del mundo entre los bivalvos (Richardson *et al.*, 2004), especialmente notable durante los primeros meses de vida (Hendriks *et al.*, 2012; Kersting y García-March, 2017). Este crecimiento es muy variable entre poblaciones (Richardson *et al.*,

1999) e incluso dentro de la misma población, a diferentes profundidades (García-March *et al.*, 2007a). Las diferencias oceanográficas entre sitios (por ejemplo, profundidad, temperatura, hidrodinámica y disponibilidad de alimento) pueden tener una gran influencia en la tasa de crecimiento de la especie (García-March *et al.*, 2007a; García-March *et al.*, 2007b; Kersting y García-March, 2007; Hendriks *et al.*, 2011). La comprensión de los parámetros de edad y crecimiento de las poblaciones de nacra que habitan en diferentes condiciones y su relación con variables ambientales como la hidrodinámica podría mejorar la calidad de los estudios demográficos y la implementación de medidas de protección para la especie (Richardson *et al.*, 2004; García-March *et al.*, 2011a; Basso *et al.*, 2015c).

Como ya postuló Margalef (1998), la edad y el crecimiento son características clave en la demografía de las poblaciones y relacionan los aspectos tróficos y demográficos de un sistema. En este contexto, el crecimiento también es una herramienta que se puede utilizar para estimar la edad en función de su relación con las dimensiones medibles del organismo estudiado. Las diferencias de tamaño, edad y crecimiento entre las poblaciones de bivalvos pueden estar relacionadas con las características ambientales de sus hábitats, como las condiciones hidrodinámicas y la cobertura de fanerógamas marinas (Irlandi, 1996; García-March *et al.*, 2007b; Hendriks *et al.*, 2011), disponibilidad y calidad del alimento (Fréchette y Bourget, 1985; Wong y Cheung, 2001; Ortmann y Grieshaber, 2003; Blicher *et al.*, 2010), densidad de población (van Erkom Schurink y Griffiths, 1993), temperatura (Blicher *et al.*, 2010; Schwartzmann *et al.*, 2011) y tipo de sedimento (De la Huz *et al.*, 2002) entre otros posibles factores. Además, las características demográficas han sido utilizadas con éxito para estimar los mejores hábitats para la reintroducción o protección de especies en peligro de extinción (Fariñas-Franco *et al.*, 2016).

Se han realizado pocos estudios demográficos a gran escala con *Pinna nobilis* que incluyan mediciones de la edad y el crecimiento, principalmente porque estas estimaciones de edad y crecimiento eran costosas y/o poco fiables hasta hace poco (Basso *et al.*, 2015c). Sin embargo, la metodología propuesta por (García-March *et al.*, 2011a), que utiliza las marcas de crecimiento del registro del músculo aductor posterior (PAMS por sus siglas en inglés) observadas en las secciones radiales de la concha, permite desarrollar estimaciones de edad y crecimiento más precisas y menos costosas para esta especie (Kersting y García-March, 2017).

1.2.1.2 Actividad de las valvas

La actividad de valvas de *Pinna nobilis* incluye *in situ* un ciclo anual con dos patrones (P1 y P2) y un ciclo circadiano a lo largo del año (García-March *et al.*, 2008; García-March *et al.*, 2016). El factor que provoca el cambio entre los dos patrones anuales era desconocido hasta el desarrollo del presente trabajo, ver Hernandis *et al.* (2018). P1 ocurre entre mediados de julio/principios de agosto y principios de noviembre. Durante estos períodos, *P. nobilis* sigue con su actividad de valvas el sol y la luna y presenta un ritmo circadiano (c.) 23.7 h. Las valvas se cierran durante la noche en las noches de luna nueva y se abren si hay luz ambiental, ya sea producida por la luna durante la noche o por el sol entre el amanecer y el atardecer. P2 ocurre desde principios de noviembre hasta mediados de julio/principios de agosto. Durante estos períodos, la apertura de las valvas no depende ni del sol o la luz de la luna ni de ningún otro factor ambiental conocido, aunque aún conserva el ritmo c. 23.7 h (García-March *et al.*, 2016). Durante P2, las nacras mantienen sus valvas abiertas la mayor parte del tiempo, pero producen cierres periódicos de varias horas todos los días. Después de haber estudiado el comportamiento de la actividad de las valvas *in situ*, García-March *et al.* (2016) planteó una hipótesis sobre los factores que potencialmente inducirían la alternancia entre P1 y P2. Las variaciones de temperatura del agua, o su concentración de oxígeno o una combinación de ambos parámetros, se postularon como los desencadenantes más probables del cambio.

La actividad de las valvas proporciona una respuesta medible del estrés en los bivalvos (Fournier *et al.*, 2004; Andrade *et al.*, 2016). El uso de dispositivos para la medición de la apertura de las valvas permite evaluar el efecto de factores ambientales como temperatura, corrientes, tóxicos, luz y comida en los bivalvos (Rodland *et al.*, 2009; Robson *et al.*, 2010a; Tran *et al.*, 2011; García-March *et al.*, 2016). Además de la respuesta directa a factores estresantes naturales o antropogénicos, la actividad de las valvas en los bivalvos suele seguir diferentes ciclos, como los ritmos circadianos, circamareales o circanuales (Palmer, 2000; Rensing *et al.*, 2001; Tran *et al.*, 2011; Mat *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2020). Estos ritmos pueden ser consecuencia de un reloj interno provocado por un factor ambiental (zeitgeber) o una respuesta fisiológica al mismo (Vaze y Sharma, 2013). Si se conocen con precisión tanto los ritmos como la relación entre la variación de los parámetros ambientales y la actividad de valvas, esta se puede utilizar para desarrollar sistemas de alerta biológica temprana (Sluyts *et al.*, 1996; Borcharding, 2006; Liao *et al.*, 2009; Sobrino-Figueroa y Caceres-Martinez, 2009; Sow *et al.*, 2011;

Bae y Park, 2014). Estos sistemas pueden proporcionar datos invaluable, contribuyendo a comprender mejor la biología de las especies monitorizadas, pero también ayudando a comprender los efectos del cambio climático en la autoecología de las especies (Andrade *et al.*, 2016). Para *P. nobilis*, entre otros beneficios, comprender qué causa el cambio entre P1 y P2 podría llevar a utilizar a la nacra para la monitorización del cambio climático a escala local, además del seguimiento de las poblaciones supervivientes de nacra, tanto para monitorizar el propio ecosistema, como del estado de la propia población.

1.2.1.3 Amenazas y situación actual de la especie

Hasta finales de 2016, *Pinna nobilis* era considerada una especie en peligro, siendo las amenazas que afectaban a la especie similares a las que se enfrentan otras especies marinas en el Mediterráneo (Coll *et al.*, 2010). Entre ellas: i) la pérdida de hábitat, principalmente en forma de regresión de las praderas de fanerógamas marinas, el hábitat de la nacra por excelencia, teniendo un efecto negativo sobre sus poblaciones (Basso *et al.*, 2015c); ii) las embarcaciones, cuyo anclaje causa daño físico y un aumento de la mortalidad de ejemplares, principalmente de ejemplares adultos, afectando en consecuencia a las poblaciones de nacra al ser los individuos más grandes los principales reproductores (Hendriks *et al.*, 2013; Vázquez-Luis *et al.*, 2015). También el impacto con embarcaciones recreativas en ejemplares de poblaciones someras como es el caso del delta del Ebro, en la actualidad una de las dos únicas poblaciones supervivientes de nacra en España. Estos impactos causan mortandad y un elevado estrés para los supervivientes, que deben invertir su energía en la reconstrucción de la concha (Prado *et al.*, 2014); iii) el cambio climático, por su impacto global y por su efecto más severo sobre el Mediterráneo, afectando a la distribución de especies (Vargas-Yáñez *et al.*, 2008; Lejeusne *et al.*, 2010), y de forma negativa a la nacra (Basso *et al.*, 2015b) y favoreciendo, junto a las actividades antropogénicas, la entrada de especies invasoras (Stachowicz *et al.*, 2002; Rilov y Galil, 2009), como el alga *Lophocladia lallemandii*, que se ha detectado que tiene un efecto en la dieta de *P. nobilis*, disminuyendo su nivel trófico (Cabanellas-Reboredo *et al.*, 2010) y generando un estrés biológico en los individuos afectados (Box *et al.*, 2009). Además, esta alga también presenta un relevante efecto nocivo sobre *Posidonia oceanica* (Sureda *et al.*, 2008).

Si ya era delicada esta situación, desde finales de 2016 el panorama para *Pinna nobilis* se ha vuelto desolador. Sus poblaciones han sido devastadas por una enfermedad asociada a *Haplosporidium pinnae*, una nueva especie de parásito protozoo descrita por Catanese *et al.* (2018) y que, en algunos casos, se ha visto asociada a la presencia de micobacteria (Carella *et al.*, 2019; Carella *et al.*, 2020) (Figura 10). Los primeros informes de la extinción se produjeron en septiembre de 2016 en el sureste de España (Vázquez-Luis *et al.*, 2017) y desde entonces la mortandad se ha extendido por todas las costas mediterráneas españolas, llegando a Francia, Italia, Grecia, Chipre y otros países mediterráneos en pocos años (Katsanevakis *et al.*, 2019; Acarli *et al.*, 2020; Catanese, 2020; Özalp y Kersting, 2020; Zotou *et al.*, 2020; Betti *et al.*, 2021) (Figura 11). Hasta la fecha, los datos indican que la especie de protozoos es específica de *P. nobilis* y no afecta a otros invertebrados, incluyendo a la especie congénere *P. rudis* (Catanese *et al.*, 2018). La prevalencia y la posterior mortalidad alcanza prácticamente el 100% en las poblaciones infectadas siendo una situación de extrema gravedad ya que, por ejemplo, las muertes reportadas que han afectado en otras especies de bivalvos comerciales como *Crassostrea virginica* u *Ostrea edulis* han podido ser masivas, pero generalmente nunca llegan al 100% (Culloty y Mulcahy, 2007; Bower, 2014) por lo que la posibilidad de recuperación es mucho mayor que en el caso de *P. nobilis*. Aunque la explotación comercial de estas especies se ha derrumbado en algunas áreas, nunca se consideró la extinción como una posibilidad. Después de muchas décadas, la selección de cohortes que son resistentes a los parásitos (de forma natural y artificial) ha mejorado la acuicultura de estos bivalvos (Dégremont *et al.*, 2015). Cultivarlos en agua deltaica de baja salinidad también ha sido eficaz para lograr una producción comercialmente rentable, aunque esta estrategia se ve comprometida durante los años de mayor sequía (Soniati *et al.*, 2008). Asimismo, las muertes de bivalvos reportadas anteriormente en el mar Mediterráneo que afectaron a *Spondylus gaederopus* (Meinesz y Mercier, 1983; Kersting *et al.*, 2006) y *Arca noae* (Teresa *et al.*, 2017) mostraron porcentajes y/o extensiones de mortalidad reducidos en comparación con la muerte observada en la nacra. Aunque dramáticas, las mortalidades en estos bivalvos no supusieron un riesgo de extinción para las especies afectadas.



Figura 10: Ejemplar muerto de *Pinna nobilis* en la reserva marina de Columbretes (noviembre de 2020). Foto: fuente propia.

Cuando a principios de 2017 se descubrió que un protozoo haplosporidio era el agente causal más probable de la muerte de *Pinna nobilis*, el grupo de expertos que siguió el evento predijo un alto riesgo de que la enfermedad, sin obstáculos potenciales debido a la ausencia de barreras marinas, se propagaría por las corrientes marinas por las costas mediterráneas españolas y más allá de sus fronteras en los siguientes meses y años (Vázquez-Luis *et al.*, 2017). Esta observación, junto con las características ecológicas de la nacra, podrían eventualmente provocar la extinción ecológica, si no total, de la especie, lo que representaría un proceso sin precedentes en el mar Mediterráneo. Como consecuencia, las autoridades españolas en 2019 catalogaron el estado de *Pinna nobilis* de “en peligro” a “en peligro de extinción” a lo largo de las costas españolas (Orden TEC/596/2019, de 8 de abril). Desde 2017 se inició un seguimiento del mayor número posible de las poblaciones españolas restantes y el Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico con competencias en medio ambiente del Estado español impulsó un programa de rescate de ejemplares libres de la enfermedad, para mantener individuos en cautiverio protegidos de la llegada del parásito. El seguimiento de las poblaciones ayudó a comprender mejor la propagación de la enfermedad, siendo

las corrientes superficiales el principal factor que influye en la dispersión local. El efecto letal de la enfermedad analizado en los ejemplares en cautividad, parece estar estrechamente relacionado con temperaturas superiores a 13.5 °C y con un rango de salinidad entre 36.5 y 39.7 psu (Cabanellas-Reboredo *et al.*, 2019). Los individuos rescatados han aportado valiosos avances en el estudio del parásito (Catanese *et al.*, 2018), ayudando a preparar nuevas herramientas para la rápida identificación de su presencia en muestras (qPCR) (López-Sanmartín *et al.*, 2019), realizar estudios de mejoramiento genético y, en general, tratar de comprender mejor la etiología de la enfermedad y sus implicaciones globales.



Figura 11: Mapa del estado de las poblaciones de *Pinna nobilis* en noviembre de 2020 (Katsanevakis *et al.*, 2021).

1.2.2 *Pinna rudis*



Figura 12: Ejemplar de *Pinna rudis*. Foto: fuente propia.

Pinna rudis (Linnaeus, 1758), conocida en muchos puntos de la costa mediterránea española como ‘nacra rugosa o de roca’, es un bivalvo marino presente en mar Mediterráneo y el océano Atlántico (Figura 12). Su tamaño es un tanto menor al de la nacra y se considera el segundo bivalvo más grande del Mediterráneo. La concha suele medir entre 30 y 45cm de largo, aunque puede alcanzar los 56.5 cm (Schultz y Huber, 2013). Presenta una larga vida, pudiendo alcanzar al menos 31 años de edad (Nebot-Colomer *et al.*, 2016).

La información disponible sobre *Pinna rudis* es muy escasa (Gvozdenović *et al.*, 2019), sobre todo si la comparamos con su congénere en el Mediterráneo *P. nobilis*. Sus poblaciones están amenazadas por obras costeras, contaminación, pesca y caza furtiva por buzos recreativos (Barea-Azcón *et al.*, 2008). De hecho, *P. rudis* figura como especie protegida en el Anexo II del Convenio de Berna y como especie marina amenazada o en peligro de extinción por el Convenio de Barcelona. Los pocos estudios poblacionales realizados *in situ* en *P. rudis* sugieren que antes de 2016 la especie tenía densidades de individuos mucho más bajas que *P. nobilis* (0.06 individuos 100 (m²)⁻¹ en el parque

nacional de Cabrera) (Nebot-Colomer *et al.*, 2016) y una proporción de 5:1 a 7:1 (*P. nobilis*: *P. rudis*) en el Área Marina Protegida de las Islas Columbretes (Kersting y García-March, 2017). El único estudio sobre los parámetros de crecimiento de *P. rudis* mostró un $K = 0.14$ (la velocidad a la que se alcanza la longitud máxima) y $L_{max} = 45.27$ cm (el tamaño máximo individual estimado) en el parque nacional de Cabrera (Nebot-Colomer *et al.*, 2016). Sin embargo, la densidad de individuos de *P. rudis* es actualmente muy superior debido a los eventos de mortalidad masiva comentados anteriormente (1.2.1.3. Amenazas y situación actual de la especie) asociados a *Haplosporidium pinnae* y que afectan exclusivamente a *P. nobilis* (Panarese *et al.*, 2019). Recientemente se ha observado una gran cantidad de ejemplares jóvenes de *P. rudis* gracias al fuerte evento de reclutamiento ocurrido en el verano de 2017 (García-March *et al.*, 2020; Kersting *et al.*, 2020b).

Esta mayor disponibilidad de juveniles de *Pinna rudis*, ha convertido a la especie en el mejor modelo para realizar experimentos de manipulación en pínidos mediterráneos. Por ejemplo, el uso de *P. rudis* para ensayar metodologías antes de su aplicación a *P. nobilis*, una especie que actualmente está en peligro de extinción, podría ayudar a reducir la mortalidad en *P. nobilis* durante la experimentación. Sin embargo, primero es necesario completar el actual vacío de conocimiento sobre la biología de *P. rudis*. Además, la escasa información disponible para *P. rudis* dificulta la realización de programas de conservación efectivos para la especie (Escudero *et al.*, 2003; Bell *et al.*, 2006), especialmente en el contexto del cambio climático y su efecto en la supervivencia (Schwartz *et al.*, 2006; Jorda *et al.*, 2012; García-March *et al.*, 2019) y distribución de poblaciones (Fitzpatrick y Hargrove, 2009; Márquez *et al.*, 2011).

1.2.3 Identificación *de visu* de *Pinna nobilis* y *Pinna rudis* e hibridación

Ambas especies son fácilmente confundibles a vista inexperta debido a sus similitudes, aunque en general, si se atiende a una serie de características morfológicas concretas, gran parte de los ejemplares que presentan un morfotipo definido son relativamente sencillos de identificar. Sin embargo, la variación de ciertas características morfológicas dependiendo del ejemplar incrementa la dificultad de la identificación. Por ello, hay casos en los que es complicado discernir *in situ* si se trata de una especie u otra, incluso algunos casos donde no es posible debido a que el ejemplar puede no pertenecer a ninguna de las dos especies, por tratarse de un ejemplar híbrido, como ha demostrado Vázquez-Luis *et*

al. (2021) mediante análisis genéticos, observando que estos ejemplares híbridos pueden presentar niveles de similitud mayores con una u otra especie. El número de híbridos localizados es por ahora escaso y, aunque aún se desconoce qué papel puede jugar su existencia en la recuperación de *Pinna nobilis*, sin duda se abren nuevas vías de investigación con nuevas oportunidades para salvar la especie.

Estos ejemplares híbridos, al menos por el momento, parecen ser escasos y la mayoría de los ejemplares del género *Pinna* que actualmente se localizan probablemente pertenecerán a una de las dos especies concretas que pueden ser diferenciadas, aunque no siempre de modo determinante, con estos aspectos:

- i) En general *Pinna nobilis* está más asociada a praderas de fanerógamas marinas mientras que *P. rudis* se suele encontrar en zonas rocosas pero, aunque el hábitat puede ser un indicador, no es un factor determinante como podemos ver en la Figura 13.
- ii) También el tamaño de ambas especies puede ser útil para identificar ejemplares adultos, pudiendo alcanzar *P. nobilis* tamaños mucho mayores que *P. rudis* (≥ 60 cm vs ≤ 45 cm respectivamente).
- iii) Las diferencias más visuales para diferenciar estas especies están en relación con las características morfológicas de la concha. En la concha de *Pinna nobilis* (principalmente durante los primeros años de vida) suelen encontrarse un gran número de espinas de pequeño tamaño, mientras que en *P. rudis* el número de espinas es mucho menor, son de mayor tamaño y se encuentran distribuidas en entre 5 y 10 costillas radiales (Figura 14).
- iv) Hay que tener en cuenta que estas espinas pueden erosionarse debido al efecto del hidrodinamismo, siendo común encontrar ejemplares adultos de *Pinna nobilis* con la concha pulida, y en ocasiones, aunque con menor frecuencia, pudiendo ocurrir también con *P. rudis* (Figura 15).

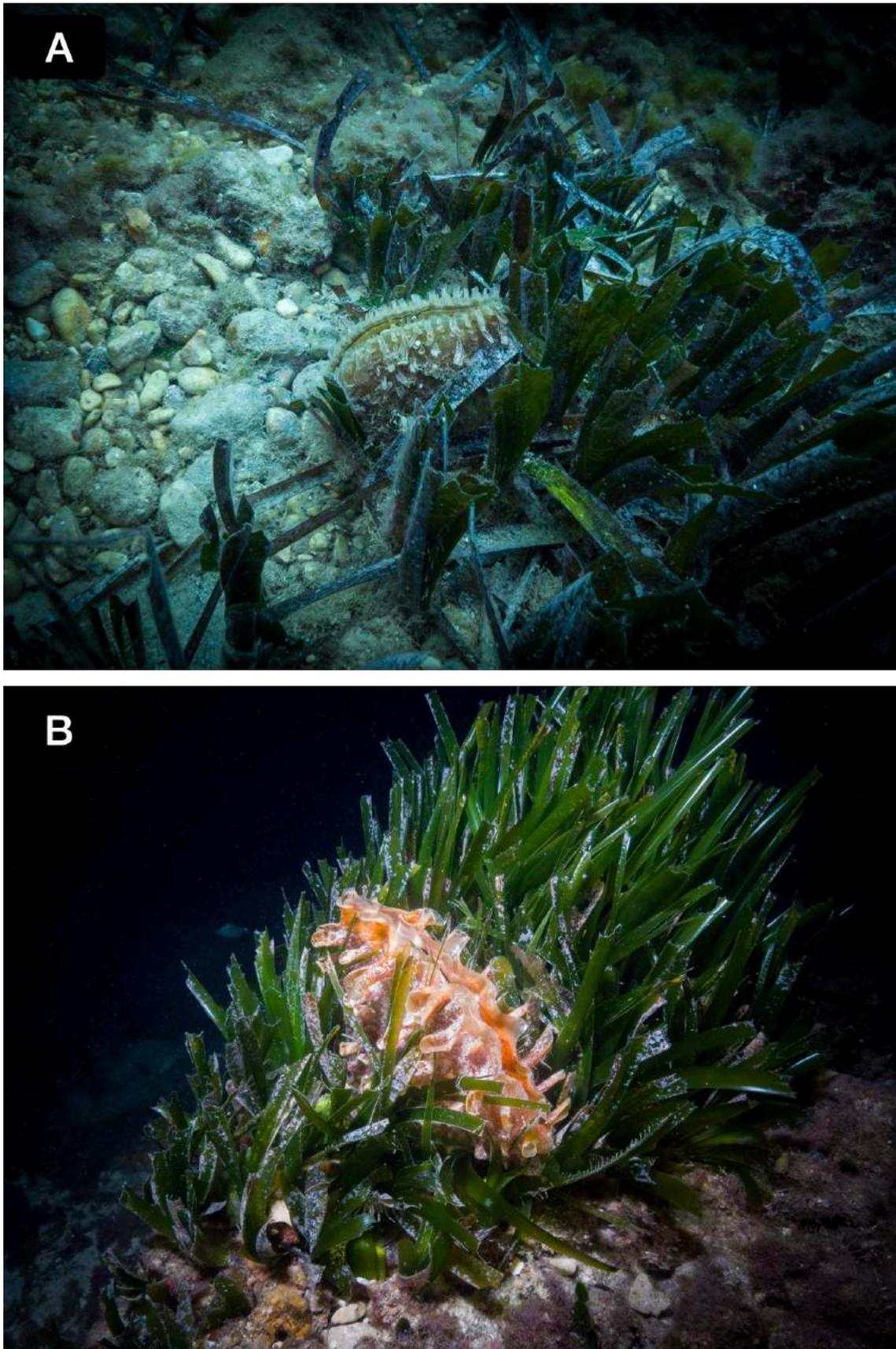


Figura 13: A) Ejemplar de *Pinna nobilis* en una zona de transición entre *Posidonia oceanica* y guijarros; B) Ejemplar de *P. rudis* en *P. oceanica*. Foto: fuente propia.

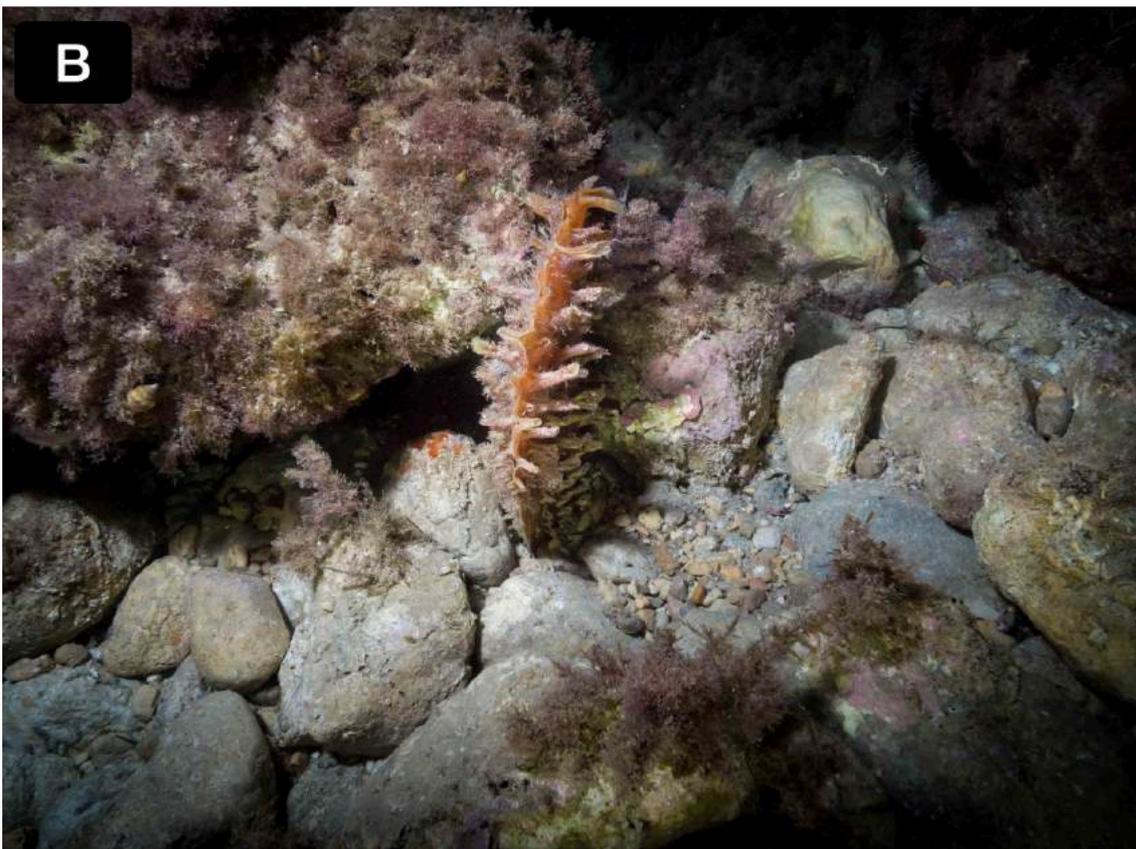


Figura 14: A) Ejemplar de *Pinna nobilis* con numerosas espinas pequeñas; B) Ejemplar de *P. rudis* donde se aprecia un menor número de espinas, pero de mayor tamaño. Foto: fuente propia.

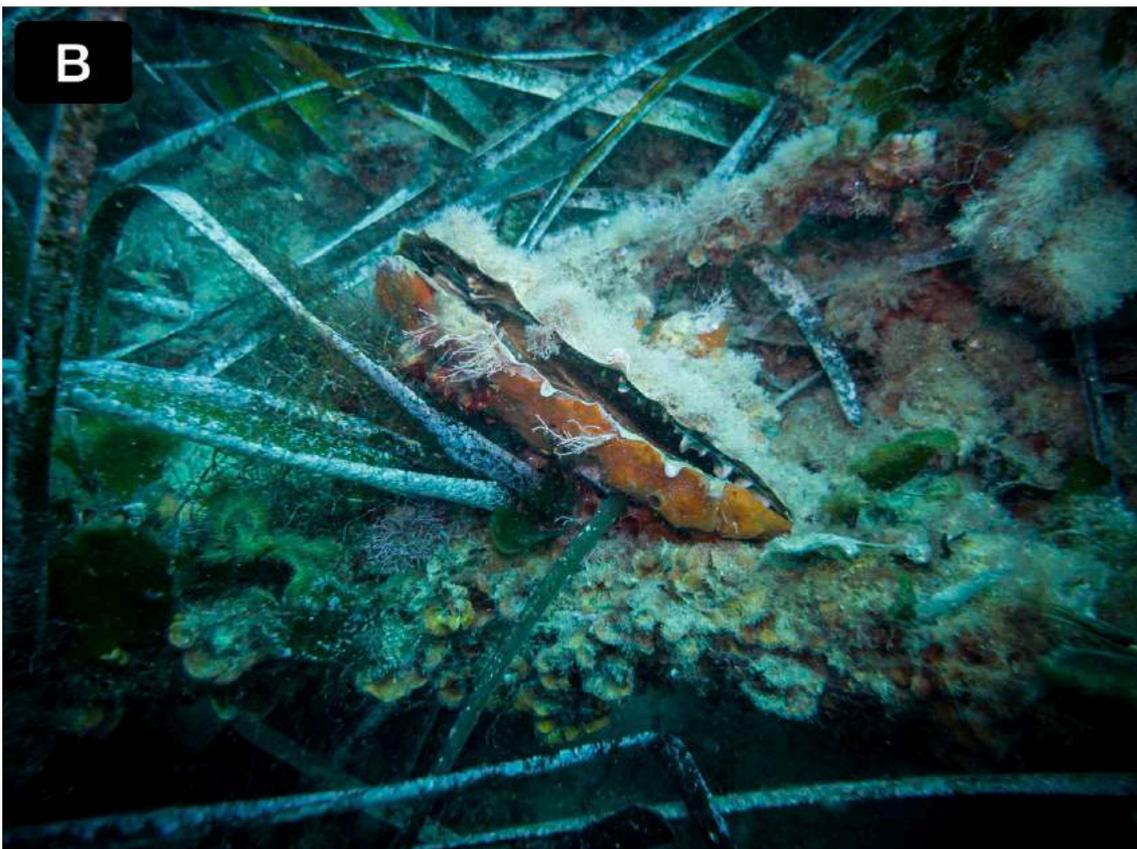


Figura 15: A) Ejemplar de *Pinna nobilis*; B) Ejemplar de *P. rudis*. Ambos ejemplares presentan la concha pulida sin espinas. Foto: fuente propia.

- v) Para estas situaciones donde las espinas no sirven para la identificación, la rugosidad de la concha puede ser también un indicador. *Pinna rudis* se caracteriza por la presencia de una serie de costillas radiales (entre 5 y 10). Es importante prestar atención a la concha para esta clave de identificación (Figura 16), ya que las conchas suelen estar recubiertas por epibiontes que pueden complicar su observación (Corriero y Pronzato, 1987; Cosentino y Giacobbe, 2007).



Figura 16: Ejemplar de *Pinna rudis*. Se pueden apreciar en la concha 5 costillas radiales. Foto: fuente propia.

- vi) Las características en manto y branquia pueden permitir la diferenciación entre especies, principalmente a nivel de coloración (Figura 17). La coloración del manto y la branquia en *Pinna nobilis* suele presentar tonalidades rosáceas, mientras que el borde del manto puede presentar en algunos casos un color oscuro azulado. En cambio, la coloración del manto en *P. rudis* puede presentar distintos niveles de moteado de color blanco, al igual que la branquia que suele ser de color blanca, confiriendo, a menudo, un aspecto “brillante” al borde del tejido.



Figura 17: A y B) *Pinna nobilis* con el manto y la branquia de color rosáceo y el borde del manto azulado; C y D) *P. rudis* con el manto moteado blanco y la branquia blanca, que contrasta fuertemente con el resto de tejidos. Fotos: fuente propia.

1.2.4 Mantenimiento en cautividad

La rápida propagación de la enfermedad en esta especie y su elevada letalidad (Cabanellas-Reboredo *et al.*, 2019; García-March *et al.*, 2020) ha devastado gran parte de las poblaciones de *Pinna nobilis* en el Mediterráneo y la persistencia del protozoo en mar abierto impide la recolonización de las poblaciones afectadas. Por otra parte, las actuales poblaciones supervivientes en deltas y lagunas costeras son vulnerables a impactos antropogénicos y, ante la imposibilidad de recolonización por la falta de conectividad entre las poblaciones restantes por la mortalidad ocurrida en mar abierto, podrían estar condenadas a la auto-desaparición (García-March *et al.*, 2019). Esta situación invita a pensar en el cautiverio como la principal oportunidad para la supervivencia de la especie y, aunque el reciente hallazgo de híbridos de Vázquez-Luis *et al.* (2021) abre nuevas posibilidades, es muy probable que la estabulación de ejemplares sea necesaria para asegurar la supervivencia de esta especie. Por el momento, el mantenimiento de los individuos en cautividad a largo plazo ha supuesto un desafío debido a la mortalidad asociada a las infecciones tanto por *Haplosporidium pinnae* como por *Vibrio*

mediterranei (Prado *et al.*, 2019b; García-March *et al.*, 2020). Además, las técnicas de maricultura que pudieran asegurar el mantenimiento a largo plazo de la especie están por desarrollar y todavía no ha sido posible de cerrar el ciclo reproductivo de la nacra en cautividad (Trigos *et al.*, 2018). La nutrición es una de las principales barreras a superar en el cultivo de bivalvos (Albentosa *et al.*, 1996b; Marquez *et al.*, 2019; Cheng *et al.*, 2020), por lo que la confección de una dieta para *P. nobilis* es una prioridad, especialmente para lograr la maduración de individuos en cautiverio. El fitoplancton vivo es la base principal para el cultivo de bivalvos (Helm, 2004; Rosa *et al.*, 2017; Cheng *et al.*, 2020), pero el cultivo de microalgas para el criadero puede suponer hasta el 50% del costo de la producción en bivalvos, además de los inconvenientes causados por el colapso del cultivo, la contaminación y la necesidad de producir varias especies de fitoplancton para completar una dieta equilibrada (Willer y Aldridge, 2019). En este sentido, el coste del cautiverio de *P. nobilis* también podría ser problemático para instituciones incapaces de producir fitoplancton, tanto por motivos económicos como estructurales por la indisponibilidad de instalaciones, al menos en lo referido a cumplimentar el 100% de la dieta con alimento vivo. La exploración de fuentes alternativas de alimento es común en la cría de bivalvos (Coutteau y Sorgeloos, 1992; Knauer y Southgate, 1999; Aji, 2011) y podría usarse como una sustitución parcial o completa de la dieta de *P. nobilis*. Aun así, por ahora, tanto el fitoplancton vivo como las dietas comerciales han mostrado resultados pobres (Prado *et al.*, 2020a). De hecho, es importante analizar el posible papel esencial del zooplancton y las partículas suspendidas en la dieta de *P. nobilis* (Kennedy *et al.*, 2001; Davenport *et al.*, 2011; Prado *et al.*, 2021). Sin embargo, el concentrado de microalgas Shellfish Diet 1800® o especies separadas del mismo producto, se han utilizado con éxito como una sustitución total en la dieta de tridacna y ostra (Southgate *et al.*, 2016; Wassnig y Southgate, 2016; Southgate *et al.*, 2017). Desafortunadamente, la escasez de individuos de *P. nobilis* disponible complica la prueba de dietas, ya que cada día de experimentación bajo condiciones estresantes podría derivar en muerte de individuos (Figura 18). En su lugar, el uso de *P. rudis* como modelo podría evitar la posibilidad de sacrificio involuntario de ejemplares de *P. nobilis* al tiempo que se obtiene un resultado de aproximación suficientemente aceptable debido a la proximidad taxonómica entre estas especies.

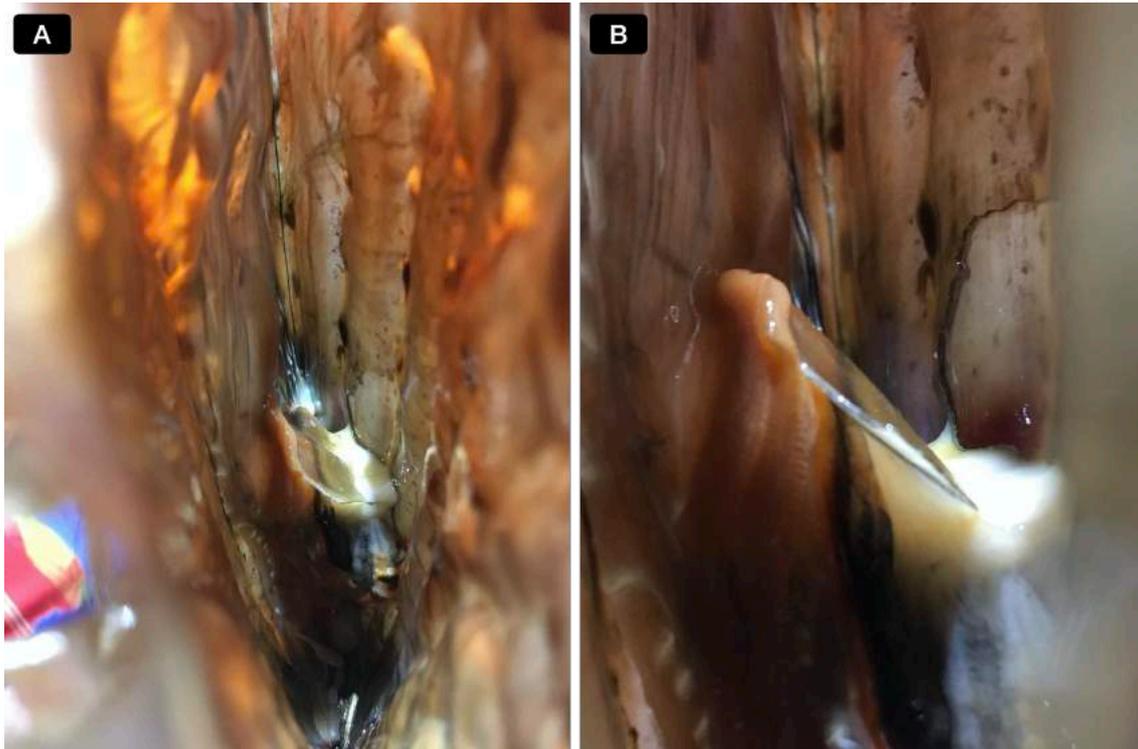


Figura 18: Ejemplar de *Pinna rudis* con desprendimiento de concha interno, probablemente debido a la fuerza realizada con el músculo abductor posterior debido al estrés durante un proceso de extracción y limpieza de concha. Fotos: fuente propia.

El *scope for growth* (SFG) es una técnica utilizada en bivalvos para evaluar su condición biológica midiendo cuatro procesos vitales: i) Filtración, entendido como el volumen de agua filtrado con el tiempo; ii) Ingestión, la cantidad de materia particulada filtrada; iii) Absorción, la capacidad para incorporar la materia orgánica presente en la materia particulada filtrada; iv) Consumo de oxígeno, gasto energético del organismo en el mantenimiento de sus funciones vitales. Esta técnica implica el cálculo de la energía disponible para el crecimiento y/o reproducción bajo unas condiciones de laboratorio estandarizadas (Widdows y Staff, 2006). El SFG es un biomarcador biológico a nivel individual/organismo completo, con un alto nivel de relevancia ecológica que es utilizado como una herramienta para programas de monitoreo de contaminación marina (Widdows *et al.*, 2002; Halldörsson *et al.*, 2005; Albentosa *et al.*, 2012b), para probar condiciones ambientales en condiciones de laboratorio (Zhang *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2018) y para experimentar con dietas (Albentosa *et al.*, 1996a; Navarro *et al.*, 2000). Aunque generalmente se ha aplicado con éxito sobre todo a especies comerciales, es igualmente aplicable para especies vulnerables o en peligro de extinción, ya que permitiría mejorar el conocimiento relativo a su ecología y su mantenimiento en condiciones artificiales.

1.3 Objetivos

El objetivo principal de la presente tesis es el estudio de aquellos aspectos poco conocidos de la biología de *Pinna nobilis* que son fundamentales para poder implementar técnicas adecuadas de mantenimiento en cautividad para asegurar la supervivencia de la especie. Como consecuencia de la situación crítica de la especie y el bajo número de ejemplares disponibles, se incluye *P. rudis* como modelo de algunos de los aspectos biológicos de *P. nobilis*. Para la consecución del mismo se han planteado los siguientes objetivos específicos:

Objetivos específicos

- 1- Describir las características del ambiente donde vive *Pinna nobilis* y su influencia en la fisiología y ontogenia de la especie.
- 2- Desarrollar conocimientos básicos sobre la dieta y el mantenimiento en cautividad de la especie.
- 3- Propuestas y acciones implementadas en respuesta al evento de mortandad.



2. Material y métodos

2.1 Caracterización del hábitat de la población de *Pinna nobilis* en Calp

Con el fin de mejorar el conocimiento de los factores ambientales en los que se encuentran las poblaciones de *Pinna nobilis*, se realizó el seguimiento de parámetros oceanográficos, de forma continua y durante 3 años, así como tipología de los sedimentos aledaños, materia orgánica y la velocidad de sedimentación –mensual a bimestral– al sur del peñón de Ifach en la localidad de Calp (Alicante, España). Este sector albergaba importantes poblaciones de *P. nobilis* antes de que el evento de mortandad asolar a la especie a finales de 2016 (Vázquez-Luis *et al.*, 2017).

2.1.1 Parámetros oceanográficos

Desde finales de 2016 se tomaron de forma ininterrumpida dos perfiles oceanográficos bimensuales de los parámetros: oxígeno disuelto (mg l^{-1}), clorofila *a* ($\mu\text{g l}^{-1}$), turbidez (FTU), salinidad (PSU) y temperatura ($^{\circ}\text{C}$) mediante la sonda oceanográfica AAQ-RINKO 177 en dos estaciones en los alrededores del peñón de Ifach en Calp (Alicante, España) a 15 y 30 metros de profundidad (Figura 19).

Los perfiles oceanográficos para cada parámetro se representaron mediante una interpolación usando el algoritmo *B-Spline multinivel* del paquete MBA de R (Finley *et al.*, 2017) basado en los cálculos originales de Lee *et al.* (1997).

Los datos relativos a turbidez se midieron en FTU (Unidades de Turbidez de la Formazina) y fueron convertidos a SSC (Concentración de Sedimento Suspendido), en mg l^{-1} , siguiendo el método descrito por Guillén *et al.* (2000) para una zona costera con un rango de turbidez similar: $SSC = 1.21 \cdot FTU + 0.43$.

2.1.2 Sedimentación

Debido al carácter filtrador de esta especie (García-March, 2005) es importante averiguar la tasa de sedimentación de partículas en el fondo para conocer sus pautas en este ambiente. Para ello se instalaron tres trampas de sedimento en tres localizaciones, C01, C02 y C03, a 5, 10 y 15 m de profundidad respectivamente, al sur del peñón de Ifach (Figura 19). Las trampas de sedimento fueron diseñadas acorde con la descripción de Hakanson *et al.* (1989) que constaba de una barra de metal clavada en el sedimento, a modo de sistema de fijación de la trampa, con un tubo de PVC en disposición transversal en la parte superior de la misma. Este tubo perforado se hacía servir de soporte de cada

uno de los 3 recipientes de plástico de ratio 4:1 (largo:ancho) que conformaban cada trampa (Figura 20).

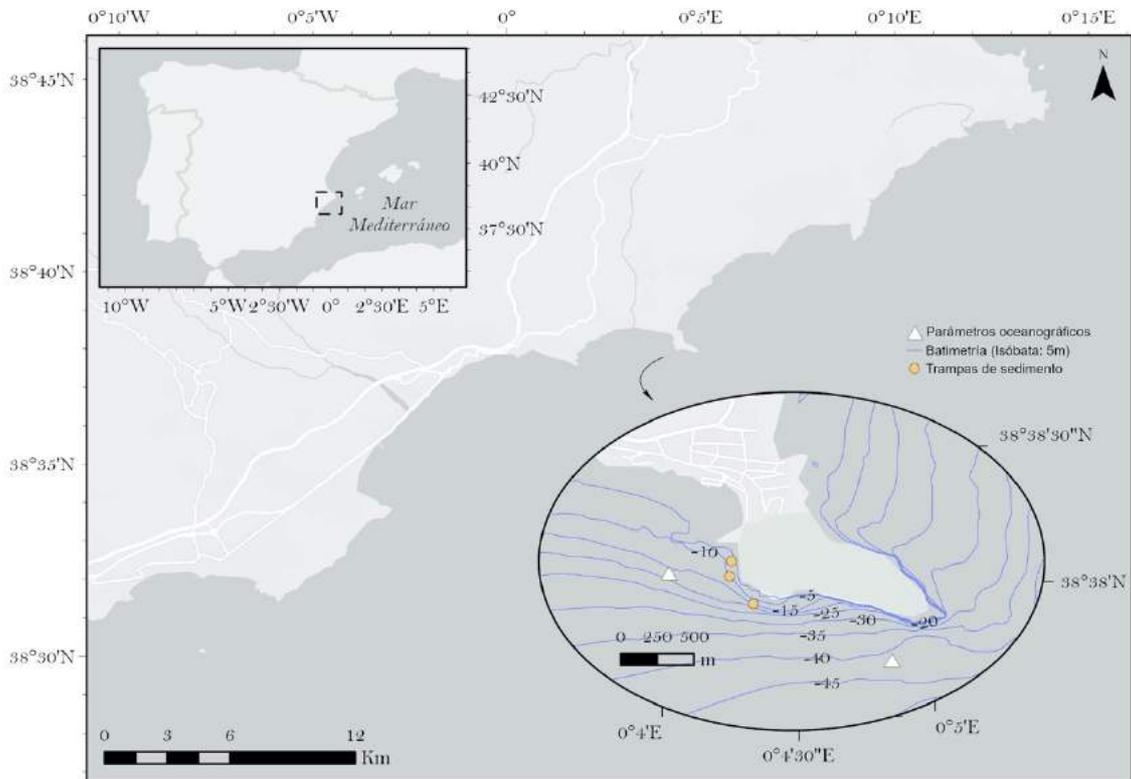


Figura 19: Mapa con la localización de las estaciones oceanográficas y trampas de sedimento.



Figura 20: Trampa de sedimento instalada en el fondo. Foto: fuente propia.

Una vez colocados, los tubos de plástico se mantenían durante un mínimo de tres días y un máximo de una semana. Este procedimiento se realizaba dos veces consecutivas y se

repetía nuevamente después de dos semanas de descanso. El seguimiento se realizó durante 3 años.

2.1.3 Estudio granulométrico

Con una periodicidad mensual, en los mismos puntos donde se establecieron las trampas de sedimento, se tomaron muestras de sedimento superficial del fondo para su análisis textural del sedimento mediante recolecta manual en inmersión con escafandra autónoma insertando perpendicularmente en el sedimento un bote de plástico de 250 ml. El procesado se realizó siguiendo el método de Buchanan *et al.* (1984) con modificaciones de Villora-Moreno y De Zio Grimaldi (1993). Se separaba una submuestra de 200 g, se secaba a 80 °C durante 48 h y se calcinaba a 400 °C durante 2 h para eliminar la materia orgánica. Posteriormente, la muestra se procesaba en una torre de tamizado en función de la escala de Wentworth (1922), separándose las muestras en los grupos principales de gravas (> 2 mm), arenas (< 2 mm y > 0.063 mm) y finos (< 0.063 mm). Posteriormente se pesaba en una balanza de precisión cada una de las fracciones obtenidas.

2.2 *Pinna nobilis*

2.2.1 Actividad de valvas

Habida cuenta del interés por profundizar en la influencia de la temperatura en la actividad de la especie, se realizó un experimento para testar la hipótesis planteada por García-March *et al.* (2016) sobre la influencia de este factor en el cambio entre los patrones de actividad de valvas de *Pinna nobilis*. Para ello se recolectaron ejemplares entre el 22 y el 25 de abril de 2016, previo al evento de mortalidad masiva, se mantuvieron en los tanques experimentales durante 71 días y finalmente se reintrodujeron en el mar. Durante el período experimental se aplicaron diferentes tratamientos de temperatura y luz. Para registrar el momento de cambio entre patrones, se monitorizó la actividad de las valvas y se registró la distancia de apertura en mm cada segundo. A continuación se explican los pasos para la puesta a punto y desarrollo de este experimento.

2.2.1.1 Extracción de individuos

Se seleccionaron 8 individuos de *Pinna nobilis* en la zona marina adyacente al peñón de Ifach, en Calp (Alicante, España) entre 8–12 m de profundidad. Dos semanas antes de su extracción, entre el 11 y 12 de abril, se les adhirieron a las valvas los soportes sobre los que posteriormente se atornillan los sensores de actividad, pegados a las conchas de cada individuo mediante resina epoxi (Ivegor®) (García-March *et al.*, 2008; García-March *et al.*, 2016). Una vez asegurados estos soportes, entre el 22 y el 25 de abril se realizaron las inmersiones de extracción de individuos. Los ejemplares se recolectaron con máxima precaución y evitando dañar las fibras del biso. Esto se consideró importante de cara a la reimplantación de los individuos una vez finalizado el experimento. Los individuos recogidos se encontraban con un patrón P2 (patrón de invierno) de comportamiento tal y como se pudo confirmar durante los primeros días del experimento y de acuerdo con información experimental previa (García-March *et al.*, 2016), se esperaba que mantuvieran este patrón hasta mediados de julio o principios de agosto, es decir, durante los 71 días de duración del experimento. En *P. nobilis*, la fijación al substrato se realiza a través del biso (Basso *et al.*, 2015c), por lo que una reimplantación simple (enterrar la parte anterior) hubiera puesto en peligro la integridad de los individuos hasta que estos hubieran sido capaces de fijarse de nuevo por sí mismos. Por ello, se fabricó una extensión artificial del biso (Figura 21) mediante una malla doblada (tamaño original de 50x45 cm y plegada a 20x15 cm) y piquetas de plástico para asegurar un agarre temporal suficiente

para que los individuos pudieran fijarse al sustrato, aumentando así sus probabilidades de supervivencia.



Figura 21: Extensión artificial de biso para la reimplantación de *Pinna nobilis*. Foto: IMEDMAR-UCV.

2.2.1.2 Mantenimiento en cautividad

Los individuos de *Pinna nobilis* presentaron un largo de concha máximo (García-March y Vicente, 2006) entre 41.5 y 63.5 cm (Tabla 1). Se dividieron en dos grupos de 4 ejemplares de tamaños similares y fueron colocados en sendos sistemas de circulación cerrada de 750 l. Cada sistema se equipó con un filtro EHEIM profesional 3, un skimmer Bubble Magus Rock SP4000 y un climatizador TK 2000. El sistema para el registro de la actividad de valvas se instaló en todos los individuos y se dejaron 7 días para la aclimatación. Para poder controlar el fotoperiodo, los sistemas se instalaron en una sala completamente sellada de forma que la única fuente de luz disponible, una tira de led blanca, pudiera ser controlada. Inicialmente el agua se mantuvo a una temperatura de $16.9^{\circ}\text{C} \pm 0.6$ y saturada en oxígeno disuelto, condiciones similares a las de mar abierto en el momento de recogida. Todos los parámetros fueron controlados por el sistema Profilux 3.1T, que permitía: Control de la luz (ON/OFF), temperatura ($\pm 0.1^{\circ}\text{C}$), pH (± 0.01), oxígeno ($\pm 0.01\text{ mg l}^{-1}$) y salinidad ($\pm 0.1\text{ psu}$). Estos datos se guardaban automáticamente

a intervalos de 5 minutos. Inicialmente, el fotoperiodo se estableció en intervalos de 12/12 h L/D (día/noche) y se fue modificando de acuerdo con los tratamientos realizados durante el experimento (2.2.1.4. Tratamiento experimental). Los individuos fueron alimentados de forma automatizada mediante bombas dosificadoras controladas por el sistema Profilux 3.1T. La dosis diaria de alimento para cada tanque se compuso de 30 g de fango ($10.0\% \pm 2.4\%$ de contenido de materia orgánica) y 40 ml de un concentrado de microalgas (Reefphyto®-5 live species phytoplankton) (Trigos *et al.*, 2014). Las dosis se disolvieron en 3 l de agua y fueron administradas en dosis iguales cada 6 h.

Tabla 1: Largo máximo de concha (García-March y Vicente, 2006) para cada ejemplar.

Individuo	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	4B
Tamaño (cm)	61.3	53.7	55.1	49.3	58.9	63.5	56.8	41.5

2.2.1.3 Sistema de actividad de valvas

El sistema para el registro de la actividad de valvas consiste en sensores magnetoresistentes similares a los usados por García-March *et al.* (2016) pero adaptados a las condiciones de laboratorio (Figura 22). Los sensores se instalaron en la concha de los individuos de *Pinna nobilis* y se conectaron al sistema de *Pinna-Interface*, diseñado para procesar y almacenar los datos de los sensores de actividad de valvas en una memoria SD. *Pinna-Interface* estaba conectado a un ordenador con un programa específicamente diseñado -*Pinna*- que permitía, no solo grabar los datos, sino mostrarlos en tiempo real. En caso de un apagón eléctrico, las baterías internas de *Pinna-Interface* permitían mantener el registro de los datos durante 48 h. *Pinna-Interface* se programó para grabar un dato por segundo de cada individuo. Los sensores magnetoresistentes, utilizados para medir la actividad de las valvas, tenían un rango de 0–30 mm con 1 mm de precisión. Para evitar posibles sesgos debidos a la variación de la temperatura, cada tanque tenía su propio sensor de temperatura, sincronizado con los sensores de actividad de valvas (los datos se registraban y guardaban en el mismo archivo) que se utilizaba para calibrar los sensores de actividad.

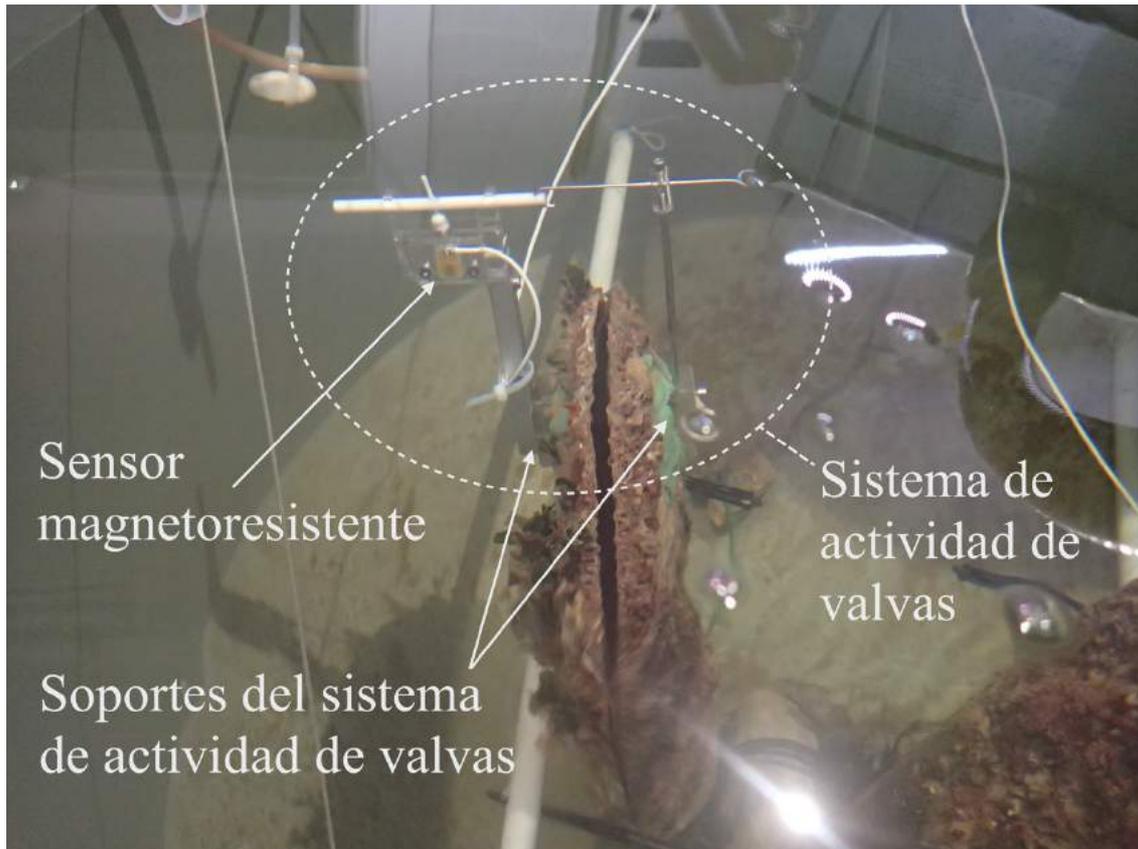


Figura 22: Ejemplar de *Pinna nobilis* en laboratorio con el sistema de actividad de valvas instalado. Foto: fuente propia.

2.2.1.4 Tratamiento experimental

Los individuos del tanque A –individuos 1A, 2A, 3A y 4A– se utilizaron como control, mientras que los individuos del tanque B –individuos 1B, 2B, 3B, 4B– se utilizaron en el experimento. Se aplicó un tratamiento (TR) (Tabla 2) para testear la hipótesis de que las variaciones de la temperatura del agua eran las responsables del cambio entre los patrones P1 (ciclo de verano) y P2 (ciclo de invierno) y viceversa. Este tratamiento consistió en elevar la temperatura del tanque B hasta 25.0 ± 0.1 °C a $0.5\text{--}1$ °C cada dos días. El resto de parámetros se mantuvieron constantes. De acuerdo con esta hipótesis, los individuos del tanque B cambiarían de patrón de P2 a P1 una vez la temperatura superara los 23 °C.

Una vez aplicadas las condiciones del TR durante 15 días al tanque B (contando desde el día en el que las condiciones máximas de TR se alcanzaron), en caso de detectarse alguna respuesta, el protocolo experimental se invertiría, lo que implicaría reducir la temperatura a 18 °C a $0.5\text{--}1$ °C por día. Para este caso, lo esperado es una respuesta de cambio en el patrón de comportamiento (de P1 a P2) por debajo de los 20 °C. Para incrementar la cantidad de datos, el experimento se replicó aplicando TR al tanque A, usando el mismo protocolo descrito para el tanque B.

Tabla 2: Esquema de los diferentes tratamientos utilizados.

Fecha (2016)	Tratamiento tanque A	Fotoperiodo	Tratamiento tanque B
15 abril			Aplicación protocolo TR
10 mayo			Condiciones TR alcanzadas
16 mayo		i) Reducción del periodo de luz a 20 h/4 h L/D	
19 mayo	Aplicación protocolo TR (23 °C)		
22-23 mayo		ii) Noche de luna llena	
26 mayo			Aplicación de protocolo inverso
31 mayo	Continuación de TR		
5 junio	Condiciones TR alcanzadas		
19 junio			Protocolo inverso alcanzado
20 junio	Aplicación de protocolo inverso		
22 junio		iii) Oscuridad repentina	
29 junio		iv) Noche de luna llena	
5 julio	Protocolo inverso alcanzado		

Se aplicaron distintos periodos de iluminación para testear la influencia de la luz en la actividad de valvas de los individuos en caso de que la aplicación de TR diera lugar al cambio de patrón de P2 a P1. Los periodos de iluminación aplicados son los siguientes (Tabla 2):

- i) Reducción progresiva del periodo de oscuridad de 12 h (12/12 h L/D) a 4 h (20/4 h L/D). Este periodo de luz también se utilizó para prevenir un estrés excesivo en los individuos en el patrón P1. Durante P1 los individuos cierran las valvas con la oscuridad. Con las valvas cerradas, los ejemplares detienen el proceso filtrador y por lo tanto la respiración,

por lo que mantener oscuridad de forma artificial durante largos periodos podría causar fatiga en los individuos.

- ii) Reducción paulatina de las horas de noche hasta el estado de “luna llena” (24/0 L/D) y a continuación retornar a 20/4 h L/D.
- iii) Estado repentino de “luna llena” (24/0 L/D)
- iv) Estado de oscuridad repentina en mitad del día.

La reimplantación de los individuos en el campo se programó para 10 días después de las condiciones de protocolo inverso, contando desde el primer día en el que estas condiciones fueron alcanzadas (18 °C) en el tanque A.

2.2.1.5 GapeR y procesamiento de datos

Los datos se analizaron utilizando una nueva versión de gapeR (disponible en la plataforma Github: https://github.com/Sebas92hc/GapeR_tesis), un código para el procesamiento y análisis de los datos desarrollado usando la plataforma R (García-March *et al.*, 2016). Esta nueva versión de gapeR permitía al usuario trabajar con las series de datos temporales mediante una gráfica interactiva; visualizar todos los datos de actividad de valvas de los diferentes individuos y los datos de los sensores y realizar análisis estadísticos como Fast Fourier Transform (FFT), auto-correlación (ACF) y cross-correlación (CC). Los días se contabilizaron como “Días experimentales”, siendo el primer día de experimento el Día experimental 1.

Para el tratamiento de los datos, la serie de datos se separó en cada uno de los dos patrones observados (P1 y P2). La estadística se aplicó tanto a la serie temporal de cada individuo por separado como a la serie temporal media de los individuos del tanque A (avA) y tanque B (avB). Las medias se calcularon únicamente para los días donde el patrón (P1 o P2) de todos los individuos del tanque era el mismo.

Un filtro band-pass Butterworth de segundo orden (baja frecuencia = 48 h^{-1} , alta frecuencia = 15 h^{-1}) se aplicó a cada fracción de la serie temporal. Para evitar el efecto transitorio del filtro, se añadió a cada extremo de la serie temporal original 200 datos con la media del valor. Una vez se aplicó el filtro, estos 200 datos se eliminaron para mantener la serie temporal original pero ya filtrada. Con el fin de estudiar las principales frecuencias encontradas en la serie temporal, se aplicó el FFT a los distintos fragmentos de la serie temporal. La ACF se aplicó para ver la auto-covarianza de la media de los

fragmentos de la serie temporal de cada tanque. La CC se usó entre pares de individuos en momentos de la serie temporal donde el patrón mostrado entre los individuos era el mismo.

2.2.2 Crecimiento de *Pinna nobilis*

Se realizó un estudio comparativo de 12 poblaciones estadísticas, denominadas en adelante ‘poblaciones’ (Ludwig y Reynolds, 1988) de *Pinna nobilis* presentes en diversas condiciones ambientales y ubicadas en áreas protegidas y no protegidas del Mediterráneo occidental (Francia y España). La relación entre los parámetros de crecimiento estimados mediante el método de García-March *et al.* (2011a) y las condiciones del hábitat de los animales se evaluaron sobre la base de diferencias en el sitio (laguna, delta o mar abierto), profundidad (superficial o profunda) y régimen hidrodinámico del hábitat (protegido y expuesto). También se consideró el estado de protección de las áreas marinas (protegidas o desprotegidas). Los resultados de este estudio permitirán una mejor comprensión de la ecología de la nacra en relación con factores ambientales como la exposición al oleaje, considerando que el IPCC (2018) predice que en el futuro se producirán un aumento de los extremos climáticos. Los resultados obtenidos también ayudarán en la planificación de acciones efectivas de repoblación, la evaluación de la resiliencia de las poblaciones restantes y la creación de nuevas áreas marinas protegidas diseñadas específicamente para la recuperación de poblaciones de *P. nobilis*.

2.2.2.1 Recolección de conchas y área de estudio

Para el estudio se utilizaron 229 conchas de 12 poblaciones distintas de *Pinna nobilis* ubicadas en España y Francia (Mediterráneo occidental), obtenidas bien por recolección directa o por donación de colecciones de distintos colegas de Institutos y Laboratorios de investigación (Figura 23). Las conchas provienen de localizaciones sometidas a distintas condiciones hidrodinámicas, ambientales y distintos niveles de protección, 5 localizaciones tenían algún tipo de protección, si bien, todas ellas se encontraban incluidas en la red Natura2000.

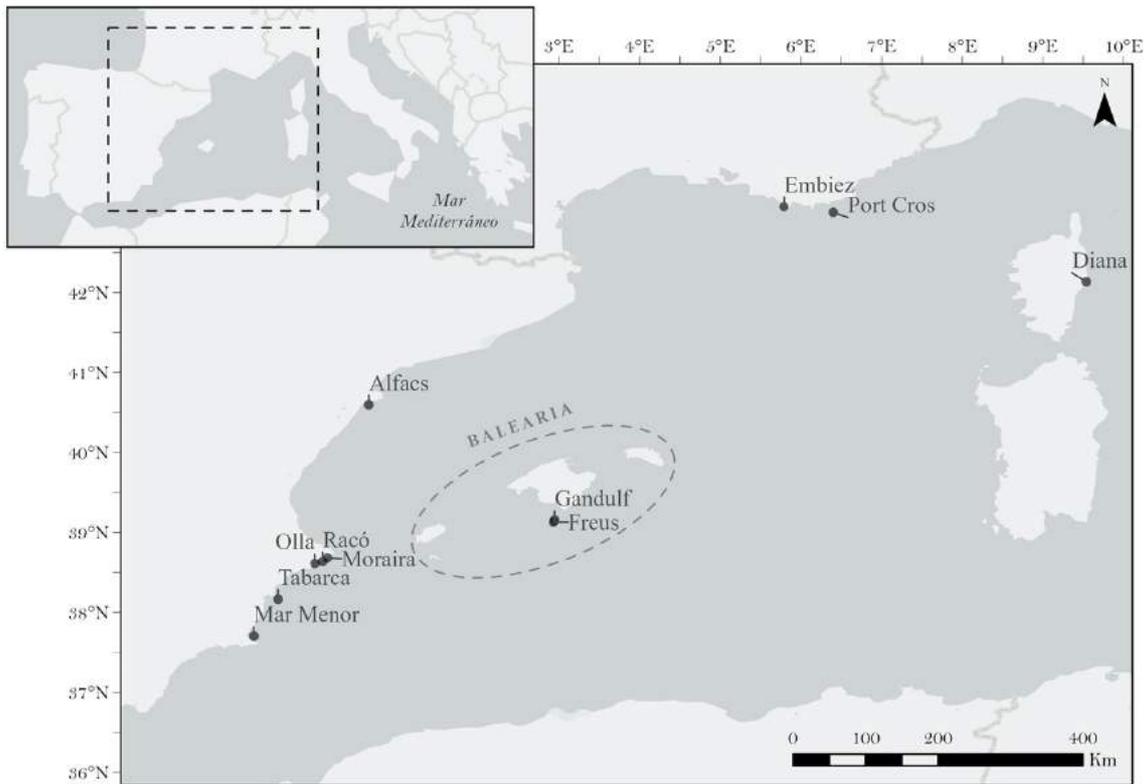


Figura 23: Localización de las poblaciones estudiadas en el trabajo de crecimiento sobre *Pinna nobilis*.

Para el cálculo de los parámetros de crecimiento pudieron utilizarse las 229 conchas y siempre que fue posible, el análisis incluyó 20 conchas por población, escogiendo aquellas que cubrieran todo el rango de tamaños disponible. En los casos de las conchas de individuos pequeños, menores a los 3 años, no se utilizaron para el cálculo de los parámetros de crecimiento. El tamaño muestral para cada población varió entre 8 y 21 conchas por población (Tabla 3).

Las conchas de las poblaciones 1 (Freus, $N = 16$) y 2 (Gandulf, $N = 16$) se obtuvieron de una zona expuesta y otra abrigada respectivamente, por parte del Instituto Español de Oceanografía (IEO) de Baleares del área marina protegida del parque nacional de Cabrera (Islas Baleares). Las poblaciones se encontraban en una pradera de *Posidonia oceanica* entre 5–10 m de profundidad. La población 3 (Tabarca, $N = 20$) corresponde al área marina protegida de la isla de Tabarca, la primera área marina protegida de interés pesquero (RMIP) de España, creada en 1986. Las conchas se recogieron en una pradera de *P. oceanica* ubicada en la parte occidental de la isla, en una zona protegida de las tormentas y a profundidades entre 5–10 m. La población 4 (Port-Cros, $N = 20$) pertenece al Parque Nacional de Port-Cros (noroeste del Mediterráneo, Var, Francia), uno de los parques nacionales marinos más antiguos del mar Mediterráneo, creado en 1963. A partir

de 1969, se inició un programa de monitoreo en el "Champ de La Palud" con el objetivo principal de controlar la evolución de las poblaciones de *Pinna nobilis* en esta área (Vicente *et al.*, 1980). Las conchas que se obtuvieron esta área procedían en su mayoría de un fondo dominado por mata muerta de *P. oceanica* entre 15–25 m de profundidad y fueron recogidas por parte del Institut Océanographique Paul Ricard. Las conchas de la población 5 (Olla, N = 19) se obtuvieron de la zona suroeste de un pequeño islote en el parque natural marítimo terrestre Serra Gelada próximo a la población de Altea (Alicante, España), en una pradera de *P. oceanica* expuesta al oleaje a 5–10 m de profundidad, siendo parte de las conchas recogidas por parte de la Asociación Poseidón. La población 6 (Mar Menor, N = 17) se obtuvo de la laguna costera hiperhalina del Mar Menor (Murcia, España), siendo las conchas recogidas por el Laboratorio de Invertebrados y Biología Marina de la Universidad de Valencia. El Mar Menor está incluido en la Convención RAMSAR y es una de las mayores lagunas costeras mediterráneas. La profundidad máxima de la laguna es de 7 m, y las conchas se recogieron de un lecho fangoso cubierto por *Caulerpa prolifera* a 2–6 m de profundidad. Las conchas de la Población 7 (Moraira, N = 21) fueron recogidas por el Laboratorio de Invertebrados y Biología Marina de la Universidad de Valencia y se obtuvieron de una bahía que está orientada hacia el sur, delimitada por las salientes de Moraira e Ifach (Alicante, España) y expuesta al oleaje proveniente del Sur (García-March y Marquez-Aliaga, 2007). Las conchas se obtuvieron de una densa pradera de *P. oceanica* localizada a 5–7 m de profundidad. La población 8 (Racó, N = 18) se localizó en Calp (Alicante, España) en la vertiente occidental del peñón de Ifach a 5–10 m de profundidad en una pradera de *P. oceanica* al abrigo del oleaje que proporciona este promontorio rocoso. La población 9 (laguna de Diana, N = 14) se localizaba en la costa Este de Córcega (Francia) y las conchas fueron recogidas por el Institut Océanographique Paul Ricard. Esta laguna es la más profunda de las que se localizan en Córcega (11 m de profundidad), sin embargo, las poblaciones más densas de *P. nobilis*, de las cuales se obtuvieron las conchas, se encuentran en praderas de *Cymodocea nodosa* a una profundidad entre 0.5–1 m (De Gaulejac y Vicente, 1990). Las conchas de la Población 10 (Embiez, N = 8) se obtuvieron por parte del Institut Océanographique Paul Ricard en la laguna de Le Brusca, ubicada en el extremo sur del archipiélago de Embiez. Esta laguna poco profunda está protegida del mar abierto por un arrecife barrera de *P. oceanica*. La zona de recolección de las conchas estaba cubierta por una pradera dispersa de *P. oceanica*, con una profundidad máxima de 1.5 m. La población 11 (Balearia, N = 21) agrupa a individuos de poblaciones provenientes de varias áreas

alrededor de las Islas Baleares, todas ubicadas a 20 m de profundidad. Estas conchas fueron recogidas por el Instituto Español de Oceanografía de Baleares. La población 12 (Alfacs, N = 20) se obtuvo de la parte sur del delta del Ebro (Cataluña, España) por el Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (IRTA). Esta área presenta parches dispersos de *C. prolifera* y *C. nodosa*. Las conchas se obtuvieron a profundidades entre 0.2–1.2 m. Con respecto a sus características ambientales, las poblaciones muestreadas provenían de: áreas poco profundas en mar abierto protegidas del hidrodinamismo, factor perjudicial para *P. nobilis* (Gandulf, Racó, Tabarca); áreas lo suficientemente profundas como para no verse afectadas por el hidrodinamismo (Port-Cros y Balearia); áreas poco profundas en mar abierto que están expuestas al hidrodinamismo (Olla, Moraira y Freus); lagunas marinas costeras (Embiez, Diana y Mar Menor); deltas (Alfacs).

Tabla 3: Datos para cada población: N (número de conchas); Profundidad (m) (profundidad a la que se recogieron las conchas); Ubicación (mar abierto, laguna o delta); S/E (si el área está protegida de (S) o expuesta a (E) la hidrodinámica); P/U (si el área tiene un estado de protección especial (P) o no está protegida (U)).

Población	N	Profundidad (m)	Localización	S/E	P/U
Freus	16	5-10	Mar abierto	E	P
Gandulf	16	5-10	Mar abierto	S	P
Tabarca	20	5-10	Mar abierto	S	P
Port-Cros	19	10-25	Mar abierto	S	P
Olla	19	5-10	Mar abierto	E	P
Mar Menor	17	0-2	Laguna	S	U
Moraira	21	5-7	Mar abierto	E	U
Racó	18	5-10	Mar abierto	S	U
Diana	14	0-2	Laguna	S	U
Le Brusca	8	0-2	Laguna	S	U
Balearia	21	20	Mar abierto	S	U
Alfaques	20	0-2	Delta	S	U

2.2.2.2 Procesado de las conchas

Las conchas fueron tratadas de acuerdo con la metodología descrita por García-March *et al.* (2011a) para lo cual, el lóbulo dorsal de una valva de cada concha se embebió en resina

epoxi y se cortó en 3 a 5 secciones de 8 cm de largo (la porción de la capa perdida en el corte fue de aproximadamente 0.4 mm). Posteriormente, cada sección se cortó radialmente a través del registro del músculo abductor posterior (PAMS). Un lado de la sección radial se pulió con lija de agua hasta un grano fino de P1200 según escala FEPA (Federación Europea de Productores Abrasivos) y se montó en un portaobjetos de vidrio, cortándose una lámina delgada (aproximadamente 300 μm) con una sierra de corte de precisión (sierra de baja velocidad Buehler Isomet). La superficie libre del portaobjetos fue pulida de nuevo hasta un grano de P1200. Las láminas delgadas producidas de esta manera permiten el análisis microestructural de los registros de crecimiento utilizando una lente binocular de aumento y microscopía óptica (García-March y Marquez-Aliaga, 2007).

Para estimar los parámetros de crecimiento, las posiciones de los PAMS se relacionaron con el tamaño total de la concha (Ht) mediante el análisis de regresión lineal. Sobre la base de la relación lineal entre Ht y la longitud del lóbulo dorsal del nácar (DNL), se ajustó una ecuación a los datos para cada población (Vicente *et al.*, 1980; Richardson *et al.*, 1999; García-March y Marquez-Aliaga, 2007; García-March *et al.*, 2011a). También se calcularon los tamaños totales de los individuos correspondientes a cada registro de crecimiento.

Como suele ocurrir en las nacras, la capa de calcita está incompleta en la parte anterior de la concha, especialmente en muestras de adultos. Por esta razón, pueden faltar algunos de los incrementos anuales más antiguos (García-March *et al.*, 2011a). Dado que el espesor de la calcita en cada incremento anual es una función del número de años durante los cuales se deposita (García-March y Marquez-Aliaga, 2007), el número de registros perdidos podría obtenerse al comparar el espesor de la calcita en los 3 o 4 registros más antiguos para todos los individuos de una población.

2.2.2.3 Modelo de crecimiento

Los datos de tamaño para cada edad se ajustaron a la función de crecimiento de Von-Bertalanffy utilizando modelos mixtos no lineales (Vigliola y Meekan, 2009) considerando L_{∞} (tamaño teórico máximo de la población) como aleatorio y t_0 (el momento en el que un individuo tiene longitud cero, sin significado biológico) y K (la velocidad a la que se alcanza el tamaño asintótico) como fijos (García-March *et al.*, 2011a). Este método ajusta cualquier modelo no lineal a datos longitudinales con gran

flexibilidad para modelar las correlaciones dentro del grupo que, a menudo, están presentes en este tipo de datos (Vigliola y Meekan, 2009). Se utilizó el escalado multidimensional no paramétrico (MDS) como método de ordenación para explorar las afinidades entre poblaciones de acuerdo con la edad máxima, Max_Ht (tamaño máximo individual en la población), L_{∞} y K. La matriz de similitud, calculada mediante el método *Bray-Curtis index* basado en datos transformados mediante la raíz cuadrada, se utilizó para construir gráficos MDS bivariados. El análisis multivariante se realizó utilizando el paquete PRIMER v.5 (Clarke y Gorley, 2001).

Se utilizó la prueba *Z-test* (Clogg *et al.*, 1995) para determinar la significancia de las diferencias en los parámetros L_{∞} y K entre los grupos, aplicando la corrección de Bonferroni ($\alpha = 0.0083$). Los grupos también fueron comparados con la población estudiada por García-March *et al.* (2011a) en la bahía de Moraira (Mor), en Alicante, localizada en la misma área que la población de Calp incluida en el presente estudio, pero a un rango de profundidad diferente (11–13 m de profundidad).

Las diferencias de tamaño entre grupos de diferentes edades se comprobaron aplicando el *Tukey's honestly significant differences (HDS)* a los datos de tamaño por edad obtenidos previamente (2.2.2.2. Procesado de las conchas). Las edades comparadas fueron entre 2 años (la primera edad para la que se dispuso de datos para la mayoría de los individuos) y 11 (cuando ya solo había datos suficientes para comparar SO y EO). A partir de los 7 años, no hubo datos suficientes de LG para la comparación (solo se pudieron comparar SO, EO y Alfacs) y a partir de los 11 años hubo datos insuficientes de Alfacs (solo se pudieron comparar SO y EO).

2.2.3 Evento de mortandad masiva de *Pinna nobilis*

Este apartado está dedicado a los datos de campo y a los datos ecológicos recopilados sobre la propagación de la extinción de *Pinna nobilis* en España y países vecinos. También se incluyen datos adicionales del rescate de ejemplares del medio natural y las acciones de aislamiento de individuos en el medio mediante jaulas de exclusión de depredadores. Además, se pudo realizar un compendio de recomendaciones para mejorar el proceso de recolección, transporte y aislamiento de ejemplares, basadas en el conocimiento adquirido. Esta información servirá como base para la implementación de programas de protección y para incrementar el éxito de iniciativas activas para salvar a la especie de la extinción. También ayudará a crear conciencia y preparar a los científicos y

administraciones para el futuro incremento previsto de la extinción de invertebrados marinos provocada por enfermedades emergentes transmitidas por el agua (Harvell *et al.*, 2002; Fey *et al.*, 2015).

2.2.3.1 Seguimiento del evento de mortandad

Tras detectarse mortalidades inusuales en el sur y el este de las costas mediterráneas españolas, Vázquez-Luis *et al.* (2017), publicaron un primer informe de la situación. Posteriormente, gracias a la colaboración de numerosos grupos de investigación y a la colaboración ciudadana, fue posible añadir nuevas estaciones y áreas de control de la propagación de la mortandad. Para el presente estudio, fue posible reunir información de 58 localizaciones a lo largo de las costas mediterráneas española y francesa gracias a trabajos *in situ* y la colaboración de numerosos grupos de investigación, que aportaron sus datos (Figura 24). Para todas las localidades, el esfuerzo de muestreo de los distintos grupos de investigación implicados en el seguimiento se distribuyó utilizando áreas de control de diferentes extensiones (mínimo 1 unidad de 100 m²), que generalmente correspondían a estaciones que habían sido objeto de seguimiento periódico antes del inicio de la mortalidad masiva. Las áreas adyacentes fueron rastreadas utilizando un muestreo exploratorio extenso (García-March y Vicente, 2006) para compararlas con las áreas control. Esta información se pudo completar con datos proporcionados por distintos medios de colaboración ciudadana (clubes de buceo locales, buzos profesionales y aficionados) para aumentar el número de observaciones y la extensión de las áreas analizadas. La información obtenida por ciencia ciudadana, enfocada principalmente en la presencia de nacras vivas/muertas, siempre fue supervisada por expertos, ya fuera directamente, visitando la zona, o indirectamente, mediante la observación de registro fotográfico digital, antes de ser validada científicamente (Cabanellas-Reboredo *et al.*, 2019). Dada la variabilidad de las fuentes de datos y los períodos de muestreo, los datos se proporcionaron como porcentajes mensuales de individuos vivos, incluyendo todos los individuos que estaban vivos en la fecha de la observación, a pesar de que algunos mostraban síntomas de enfermedad. El seguimiento de la dispersión de la mortalidad incluyó solo poblaciones que todavía tenían individuos vivos en octubre de 2016. Las temperaturas mensuales del agua para las ubicaciones monitorizadas se obtuvieron de diferentes fuentes y equipos de investigación. Estos datos incluyen medidas *in situ* con periodicidad mensual o bimestral con una sonda multiparamétrica, registro de datos *in situ* cada hora, promedios extraídos de lecturas mediante satélite diarias proporcionadas

por la NOAA (www.seatemperature.org) y estaciones meteorológicas locales. La información específica para cada ubicación se encuentra en la tabla suplementaria 1 y 2 del anexo I.

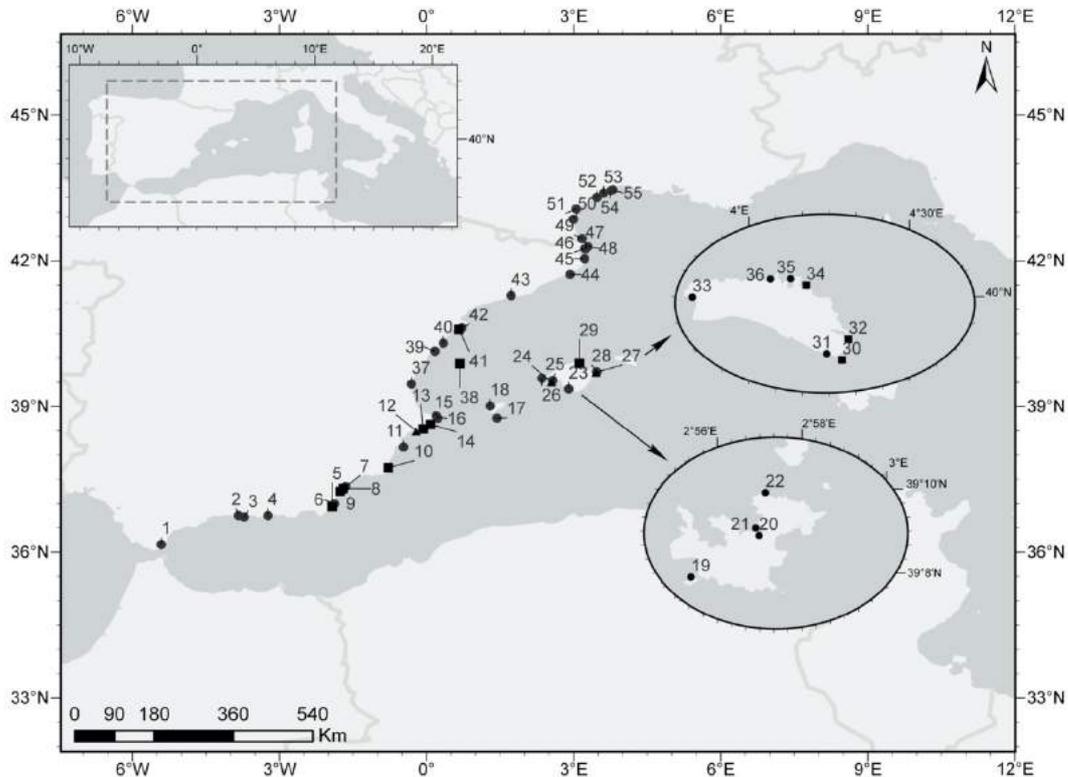


Figura 24: Mapa de distribución de las estaciones monitorizadas para dinámica poblacional e instalación de recolectores de larvas. Los círculos indican estaciones de dinámica poblacional, los triángulos indican estaciones de recolectores de larvas y los cuadrados indican estaciones con puntos de recolección de larvas y dinámica poblacional. 1, Algeciras. 2, Caleta Maro. 3, Marina del Este. 4, Melicena. 5, Agua Amarga. 6, Isla de San Andrés. 7, Loza del Payo. 8, El Calón. 9, Terreros. 10, Mar Menor. 11, Illa de Tabarca. 12, Villajoyosa. 13, Serra Gelada. 14, Calp. 15, Illa Portixol. 16, Cap de Sant Antoni. 17, Illetes. 18, Cala Gelada. 19, Rates (20 m). 20, Santa María Racó (10 m). 21, Santa María (20 m). 22, Morobuti (30 m). 23, Cap Pinar. 24, Magaluf. 25, Portals. 26, Sant Elm. 27, Cala Ratjada. 28, Cala Gat. 29, Pollença. 30, Illa de l'aire. 31, Benibecar. 32, La Mola. 33, Sa Farola. 34, Son Saura. 35, Fornells-Cabra Salada. 36, Cala Mica. 37, Marina Reial. 38, Illes Columbretes. 39, Prat de Cabanes. 40, Serra d'Irta. 41, Bahía dels Alfacs. 42, El Fangar. 43, Canyelles. 44, Tossa de Mar. 45, Illes Medes. 46, Montjoi. 47, Joncols. 48, Portlligat. 49, Peyrefite. 50, Etang de Leucate. 51, Etang de Ayrolles. 52, Agde. 53, Etang de Thau. 54, Frontignan. 55, Les Aresquiers.

2.2.3.2 Relación entre la temperatura del agua y la supervivencia

Analizando los valores de temperatura del agua desde los primeros casos de mortalidad y teniendo en cuenta que la temperatura juega un papel fundamental en el metabolismo de los seres vivos, se planteó evaluar la relación entre la temperatura del agua y la mortalidad en presencia de *Haplosporidium pinnae*. Para ello, se analizaron datos de individuos del delta del Ebro (Tarragona) como grupo de control y de Portlligat (Girona) utilizado como grupo experimental, tanto de aguas abiertas como de los ejemplares rescatados y mantenidos en tanques. Se seleccionaron los datos del conjunto de toda la información recopilada (anexo I, tabla suplementaria 1 y 2), teniendo en cuenta los

siguientes aspectos: 1) Presencia/ausencia de *H. pinnae* confirmada por PCR (numerosos positivos en individuos de Portlligat y ningún positivo en muestras de individuos del delta del Ebro hasta julio de 2018) y 2) Registros de temperatura y supervivencia mensuales entre noviembre de 2017 y septiembre de 2018.

2.2.3.3 Reclutamiento y colectores de larvas

Debido a la virulencia del protozoo y su rapidez de expansión, se planteó como de especial interés analizar si se detectaba y cómo se desarrollaba la reproducción de la nacra en el medio natural. Para controlar el reclutamiento y la supervivencia de las semillas de nacra, se instalaron colectores de juveniles entre junio de 2017 y noviembre de 2017 en 11 estaciones a lo largo de las costas mediterráneas españolas (Figura 24). Los colectores se basaron en los diseños de García-March y Vicente (2006); Cabanellas-Reboredo *et al.* (2009); Kersting y García-March (2017), consistentes en bolsas de malla de plástico que en su interior portaban otras bolsas de malla de plástico, lo que genera un ambiente plagado de multitud de microcavidades, donde las larvas encuentran un lugar óptimo para fijarse. Los colectores se dispusieron en líneas de captadores dispuestos en intervalos de 1 a 1.5 m en profundidades comprendidas entre 0.5 y 20 m. En el delta del Ebro se instalaron captadores sólo a 0.5 m de profundidad y en el resto de emplazamientos, el colector menos profundo se situó a una profundidad de 3 m. Entre octubre y noviembre de 2017, los colectores fueron extraídos y transportados en neveras con agua de mar del lugar de recogida en la estación marina del Instituto de Investigación en Medio Ambiente y Ciencia Marina (IMEDMAR-UCV). Los colectores se examinaron *de visu* en el laboratorio y todos los pínidos encontrados se dispusieron en acuarios de 50 l con circuito cerrado y alimentados con el mismo gel de fitoplancton que los adultos (2.2.3.4.3. Mantenimiento en cautividad). Para alimentar a los juveniles se les proporcionó < 1 ml día⁻¹ de cada especie de gel de fitoplancton. El agua se filtró a 1μ y se expuso a radiación ultravioleta > 100 mWs⁻¹ cm⁻¹. Se llevaron a cabo censos adicionales de reclutamiento *in situ* cada vez que se monitoreó una estación de control de la supervivencia de adultos.

2.2.3.4 Rescate de individuos

Dentro de la coordinación del proyecto de “rescate de 215 ejemplares de nacra (*Pinna nobilis*) y su mantenimiento en cinco centros especializados” por parte del IMEDMAR-UCV se unificó y se realizó el filtrado y análisis de los datos propios y de los centro participantes (Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (IRTA), Instituto

de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Instituto Español de Oceanografía de España (IEO) y l'Oceanogràfic de Valencia), materializándose el resultado en la publicación realizada por García-March *et al.* (2020).

2.2.3.4.1 Extracción de individuos

Debido a la rapidez con que se detectaban zonas con elevada mortalidad de *Pinna nobilis* desde octubre de 2016, se hacía necesaria la localización de ejemplares vivos en nuestras costas para poder aislarlos del ataque del protozoo y mantenerlos en condiciones de cautividad. Así, en febrero de 2017 fue posible recoger 16 nacras adultas de la Marina Real de Valencia (Puerto de Valencia), de los que 8 ejemplares se alojaron en el IMEDMAR-UCV y 8 en las instalaciones de l'Oceanogràfic de la Ciudad de las Artes y de las Ciencias de Valencia. La rápida propagación del protozoo por las costas españolas durante la primavera-verano de 2017 desde el sur, llevó al Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico a declarar un rescate de emergencia de 215 ejemplares de las costas de Girona para aislarlos de la presumible llegada el protozoo y poder mantenerlos con vida en cautividad. Este rescate, coordinado por el IMEDMAR-UCV, permitió la recolección de 100 individuos de la bahía dels Alfacs (delta del Ebro, Tarragona) y 115 procedentes de Portlligat (Cap de Creus, Girona) en noviembre de 2017. Estos individuos se trasladaron a diversos centros en un vehículo adaptado para el transporte de esta especie en tanques de 600 l con sistema de aireación continua. Los 100 individuos del delta del Ebro fueron acogidos en el Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (IRTA). Los 115 individuos de Portlligat se dividieron en 4 grupos: 50 fueron acogidos en el Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Agua del Pino en Huelva, 50 en el Instituto Español de Oceanografía de España (IEO) en Murcia, 5 en las instalaciones de l'Oceanogràfic de Valencia y 10 en la estación marina de IMEDMAR-UCV en Calp (Alicante). Las instituciones fueron seleccionadas por su experiencia en el mantenimiento en cautividad de especies marinas, incluyendo bivalvos marinos y/o *P. nobilis*, además de por su disponibilidad para albergar nacras. El número de ejemplares por institución dependió de las posibilidades de espacio disponible para mantenerlos en las condiciones adecuadas. Para asegurar que todas las nacras recolectadas fueran adultos con capacidad reproductiva, solo se extrajeron especímenes con una longitud de concha mayor a 40 cm. Para la extracción de individuos tanto en La Marina Real de Valencia (febrero de 2017) sobre fondos sedimentarios como los de Portlligat (noviembre de 2017) en pradera de *Posidonia oceanica*, 2 buzos en

inmersión con escafandra autónoma cavaban un agujero en el sedimento cerca de la parte ventral de la concha, para liberar el biso cortando los filamentos enterrados en el sedimento con un cuchillo o sierra de filo largo (Figura 25). Para el caso de la extracción de individuos de la bahía dels Alfacs (noviembre de 2017), donde la tipología del fondo era fangosa y se localizaban a menos de 1 m de profundidad, se utilizó una bomba de agua eléctrica en nacras situadas en parches sin vegetación a poca profundidad. Se bombeó agua a presión en la parte ventral de los individuos para eliminar el barro y la arena que cubría el biso. Cada individuo se mantuvo con agua y solo se expuso al aire durante unos segundos para colocarlo dentro de los tanques de transporte.



Figura 25: Rescate de nacras en Portlligat (Girona). Foto: Raúl Álvarez (Kraken Dive).

2.2.3.4.2 Transporte

Para el transporte se adaptó una furgoneta con 3 tanques de 300 l de agua de mar. La aireación constante del agua se logró con un compresor de aire portátil. La temperatura del agua se pudo mantener alrededor de 14 °C, coincidiendo con la temperatura ambiente invernal durante los días de trabajo. Los tanques para el traslado estaban provistos de secciones individuales para cada nacra, separados con paredes de cota de malla plástica de 5 mm de luz, de manera que cada contenedor podía albergar hasta 10 ejemplares. Las

nacras se colocaban suavemente en su sección con el eje anteroposterior descansando horizontalmente y la parte dorsal o ventral hacia arriba (Figura 26). Aunque las distancias desde el punto de recolección hasta la institución de acogida oscilaron entre 4 km y 1270 km, todos los viajes se realizaron en un solo día.



Figura 26: Sistema de transporte de ejemplares de *Pinna nobilis* durante el rescate en Portlligat. Foto: IMEDMAR-UCV.

2.2.3.4.3 Mantenimiento en cautividad

Una vez en las distintas instalaciones de acogida de ejemplares, las nacras se colocaron en tanques de distintas formas y volúmenes según los centros de recepción, entre 400 y 5.000 l, de modo que se instalaron en grupos entre 4 y 12 individuos. Para el caso de los individuos de l'Oceanogràfic e IMEDMAR-UCV (8 + 8 ejemplares de la Marina Real y 5 + 10 de Portlligat) se utilizaron sistemas de circuito cerrado para los pequeños grupos alojados en sus instalaciones. En el caso de los alojados en el IEO de Murcia (50 ejemplares) y en el IFAPA en Huelva (50 ejemplares) se utilizaron circuitos semicerrados donde se renovó el agua dos veces por semana en el IEO y cada 2 días en el IFAPA. En el caso de las 100 nacras alojadas en el IRTA, el sistema fue en circuito abierto. En todos los sistemas, el agua se pasó a través de filtros de 1 μm y se expuso a radiación UV ($> 100 \text{ mWs}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) antes de llegar los depósitos con los individuos, siguiendo las recomendaciones de Ford *et al.* (2001) para el caso de la infección de ostras con *Haplosporidium nelsoni* y *Perkinsus marinus*. La temperatura del agua dentro de los tanques para la recepción de individuos en las distintas instituciones se dispuso por encima del considerado límite mínimo de confort de 16 °C (Trigos *et al.*, 2015). Sin embargo, debido al gran volumen de agua en el circuito abierto del IRTA y semiabierto

del IFAPA, la temperatura del agua solo se pudo elevar hasta los 13.9 y hasta los 15 °C respectivamente. En el resto de instalaciones donde los tanques de ejemplares eran más pequeños (IEO-Murcia, Oceanogràfic e IMEDMAR-UCV) la temperatura del agua durante la recepción se mantuvo a 17 °C. Todos los individuos fueron colocados verticalmente con el extremo anterior de la concha apuntando hacia abajo, pero sin enterrarlos en sedimento. Para mantener a los individuos en posición vertical se utilizaron diversos soportes, como bloques de hormigón donde se insertaban los individuos en los huecos o tubos de PVC donde los individuos se apoyaban de un lado. Los individuos también se dispusieron en los tanques evitando proximidad a las cámaras de inhalación y exhalación entre ejemplares contiguos. Para alimentar a las nacras, se suministró una mezcla diaria inicial de gel de fitoplancton (easyreefs®) y detritos fangosos autoclavados con alto contenido de materia orgánica (MO) y suplementos (lío-filizado *easy SPS*®) en las siguientes concentraciones por individuo promedio de 55 cm: 2.4 a 7.2 ml de *Isochrysis galbana* (0.0120 a 0.036 g MO ml⁻¹) 2.4 a 7.2 ml de *Phaeodactylum tricornutum* (0.0121 a 0.0363 g de MO ml⁻¹) 1.5–4.5 ml de *Tetraselmis chuii* (0.0172–0.0516 g MO ml⁻¹) 0.3 g de detritos fangosos (10% de contenido de MO) 0.1 g de SPS fácil (83.88% de contenido de MO). Se implementaron modificaciones en la cantidad de los distintos componentes de la dieta a posteriori, de acuerdo con la configuración específica de los tanques de cada institución, la aceptación de alimentos y la producción de pseudoheces. El alimento se suministró diluido en agua de la siguiente manera: de forma continua (IFAPA), en una sola dosis diaria (l’Oceanogràfic), dos dosis diarias (IRTA e IEO-MURCIA) o cuatro dosis por día (IMEDMAR-UCV). Los epibiontes en las conchas se limpiaron un mes después de la recepción de los individuos para minimizar el estrés del cautiverio. Para ello, se dispusieron las nacras dentro de bandejas llenas de agua de mar para el proceso de limpieza. En este proceso, se eliminaban cuidadosamente todos los epibiontes que fuera posible sin dañar de la superficie de la concha, mediante una rasqueta o estropajo de acero inoxidable.

2.2.3.5 Jaulas de exclusión de depredadores

Para comprobar si la infección por *Haplosporidium pinnae* era suficiente para causar la muerte de los ejemplares o si el parásito producía un debilitamiento que dejaba a los ejemplares a merced de los depredadores, se estimó conveniente aislar algunos ejemplares de *Pinna nobilis* del posible ataque de depredadores, desde el momento que se constató que estaban expuestos a la infección de *H. pinnae*. Así pues, se seleccionaron

35 individuos de la población de Portlligat (Cap de Creus) que fueron enjaulados a salvo de los predadores, en mayo de 2018 (30 jaulas) y en junio (5 jaulas), uno y dos meses después de detectarse el inicio de la mortandad en esta población. Se seleccionaron cuatro áreas de 500 m² incluyendo 8 o 9 individuos en cada una protegidos por jaulas individuales (Figura 27). Se realizó un seguimiento mensual hasta que murió el último de los ejemplares aislados. Cada mes, las jaulas se abrían, se limpiaban de epibiontes y de posibles depredadores que pudieran haber entrado como juveniles y se hubieran instalado en la jaula. Estas jaulas de exclusión consistieron en un cilindro de 30 cm de diámetro y 50 cm de longitud de 5 mm de luz de malla, la tapa superior hacía de puerta con cierre y estaba formada por una malla de 2 mm. La parte inferior del cilindro se diseñó con malla flexible de 2 mm de luz, con un cierre de cordón que se fijaba alrededor de la concha de la nacra en el punto de inserción en el sedimento, para evitar la entrada de depredadores, por la parte inferior de la jaula. El sistema de abertura y cierre de la parte superior disponía de otro cierre de cordón (Figura 27). Se utilizaron tres varillas de acero con una longitud de 1 m para sujetar la jaula al fondo del mar y proporcionar un mejor ajuste de la estructura a la forma plana de las nacras.

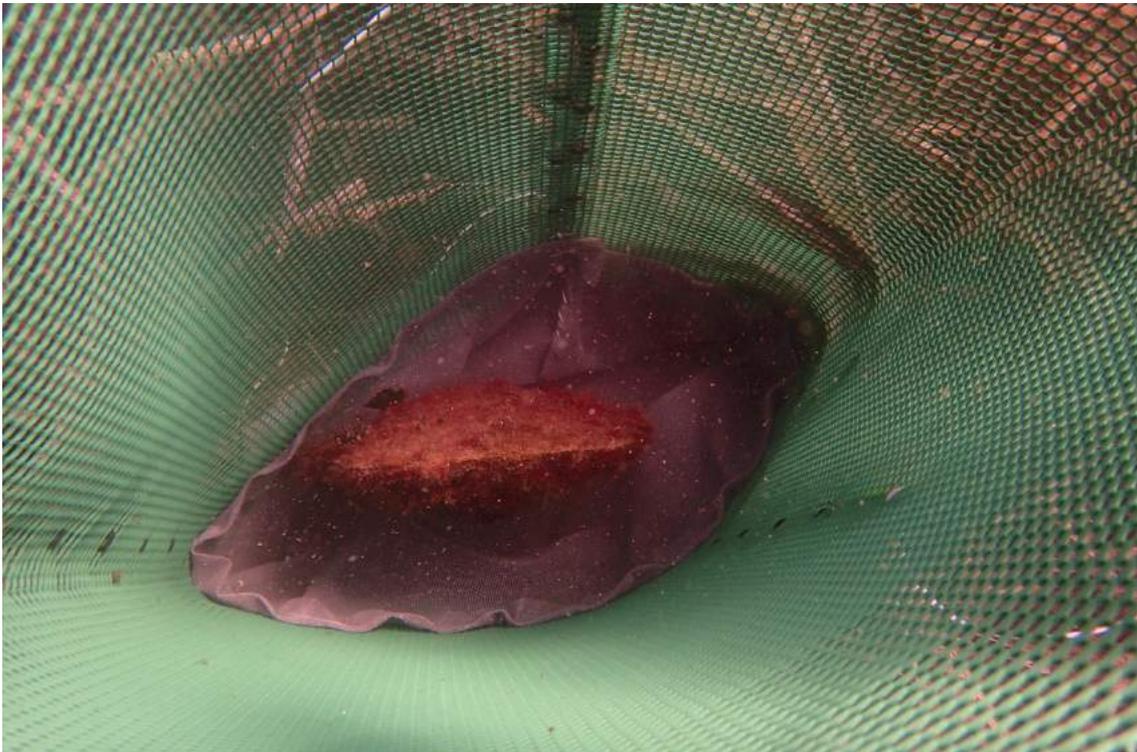


Figura 27: Ejemplo del interior de una jaula de exclusión de depredadores utilizada en Portlligat. Foto: IMEDMAR-UCV.

2.2.4 Influencia de la temperatura en la filtración y el consumo de oxígeno de *Pinna nobilis*

El estudio de los parámetros fisiológicos básicos como la tasa de aclaramiento y la tasa metabólica, así como sus variaciones en función de la temperatura, podría ayudar a desarrollar mejores protocolos para mantener ejemplares en cautividad, siendo especialmente interesante poder cuantificar la capacidad de filtración y requerimientos energéticos de las nacras cautivas en función de la temperatura. Además, este conocimiento mejorará la comprensión del papel ecológico de la especie en el ecosistema en general, en las poblaciones supervivientes que habitan en entornos parálisis amenazados y en un contexto de cambio climático y aumento de temperaturas en el mar Mediterráneo en el que nos encontramos. Para ello, se realizó un experimento para estimar la tasa de aclaramiento (CR) y el consumo de oxígeno (VO₂) en ejemplares de *Pinna nobilis* en cinco temperaturas diferentes.

En febrero de 2020 se recolectaron 8 ejemplares jóvenes de *Pinna nobilis* de tamaños similares (≈ 30 cm) en la bahía del Fangar en el delta del Ebro (Tarragona). Los individuos fueron transportados siguiendo los protocolos de transporte antes descritos, a las instalaciones de IMEDMAR-UCV en Calp (Alicante). Se midió la longitud máxima antero-posterior (García-March y Vicente, 2006) y el ancho dorso-ventral máximo, medido desde el punto de inflexión hasta el punto ventral con máxima anchura horizontal de los ejemplares (De Gaulejac y Vicente, 1990) y se mantuvieron durante 6 meses en dos tanques de 750 l en un sistema de circuito cerrado como el descrito en el apartado anterior para las instalaciones de mantenimiento de ejemplares. La aclimatación se realizó a una temperatura de 14 ± 0.5 °C y una salinidad a 37.5 – 38.0 psu. A partir de la ecuación obtenida para *Pinna rudis* en el apartado “2.3.1.4. Relación morfométrica y análisis estadístico” de la presente tesis como modelo biológico de pinnidae, los ejemplares de *P. nobilis* fueron alimentados con una ración diaria de fitoplancton vivo cultivado en las instalaciones del IMEDMAR-UCV del 6% (Helm, 2004) del peso seco (DW) estimado de cada individuo. La ración diaria se distribuyó en dosis de ≈ 2 mm³ l⁻¹ de *Isochrysis galbana* (T-ISO), una concentración por debajo del umbral de producción de pseudoheces (Bayne *et al.*, 1989; Bayne, 1993).

2.2.4.1 Diseño experimental

Para los experimentos, después del mantenimiento en los tanques de 750 l, los 8 ejemplares de *Pinna nobilis* fueron trasladados individualmente a ocho acuarios de 55 l (Figura 28). Además, un acuario extra con las mismas características se dejó sin ningún ejemplar para ser utilizado como control. Los acuarios se mantuvieron en un circuito cerrado con idénticas condiciones de agua. El agua circulaba desde los acuarios a través de un sumidero equipado con un filtro mecánico y biológico, un skimmer y un climatizador y luego recirculaba de regreso a los acuarios. Las nacras se colocaron en posición horizontal, ya que no se observó ningún efecto significativo en la fisiología de esta familia en función de la postura (apartado 2.3.2.2. Colocación de los ejemplares en los tanques).

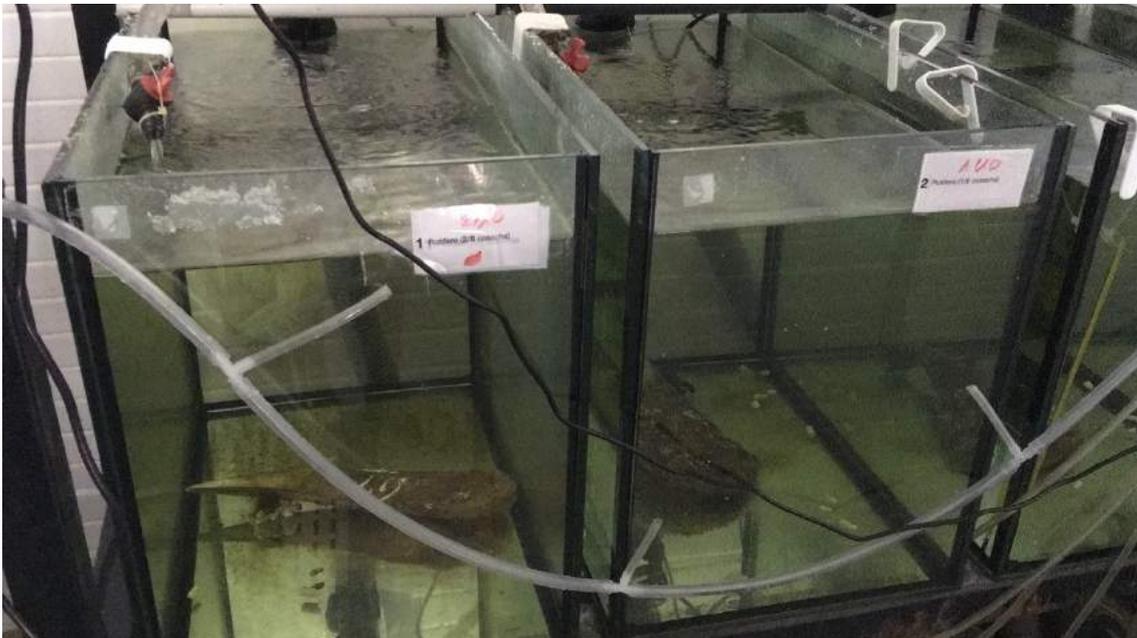


Figura 28: Ejemplares de *Pinna nobilis* en acuarios de 55 l durante el experimento. Foto: fuente propia.

Para analizar el efecto inducido por el cambio térmico sobre los parámetros fisiológicos, se midieron las tasas de aclaramiento ($CR: 1 \text{ h}^{-1}$) y consumo de oxígeno ($VO_2: \text{mgO}_2 \text{ h}^{-1}$) a 5 temperaturas (8.5, 14, 18, 23 y 28 °C). Se consideró que la temperatura más baja (8.5 °C) representaba la temperatura más fría que puede observarse en zonas superficiales del mar Mediterráneo, como las lagunas costeras (Quintana *et al.*, 2018a). 14 °C es una temperatura común durante el invierno en el mar Mediterráneo (García-March *et al.*, 2011b), 18 °C y 23 °C representan temperaturas intermedias dentro del confort térmico para la especie (Basso *et al.*, 2015b; Trigos *et al.*, 2015) y 28 °C se consideró como una temperatura límite del rango de confort de *P. nobilis* (Basso *et al.*, 2015b), una

temperatura que, además, se puede alcanzar y superar en ambientes parálidos en los que también se encuentra esta especie (Yalçın *et al.*, 2017; Prado *et al.*, 2020b; Romero *et al.*, 2020; Llorca *et al.*, 2021). Se evitaron temperaturas más altas para reducir la probabilidad de mortalidad de ejemplares, dado el estado de protección de la especie. El experimento se realizó siguiendo el siguiente protocolo: inicialmente, la temperatura del agua se redujo de 14 °C (temperatura a la que se encontraban previamente en los tanques de 750 l) a 8.5 ± 0.5 °C en 48 horas. Posteriormente, los individuos se mantuvieron a esta temperatura de exposición durante 1 semana y al séptimo día se midieron la CR y el VO₂. Una vez finalizadas las mediciones, se aumentó la temperatura del agua a la siguiente temperatura de exposición en dos días, y las mediciones fisiológicas se determinaron después de 7 días de mantenimiento. Se prosiguió con esta metodología hasta completar el ciclo con las cinco temperaturas experimentales.

Durante el experimento térmico, las nacras se alimentaron de forma continua a diario durante 16 h con los filtros desactivados. Esta dosificación permitía mantener el agua limpia al inicio de cada día, de forma que en el séptimo día a cada temperatura se podía proceder al inicio del experimento. La comida se administró en dosis de $\approx 2 \text{ mm}^3 \text{ l}^{-1}$ de *Isochrysis galbana* (T-ISO) mediante bombas peristálticas y se volvía a administrar media dosis cada vez que la concentración en el agua alcanzaba la mitad de la dosis inicial. Durante las siguientes 8 h del día, no se daba alimento a los acuarios y se activaban los filtros para dejar que el agua se limpiara hasta el día siguiente.

2.2.4.2 Medición de las tasas fisiológicas

2.2.4.2.1 Tasa de aclaramiento

Para determinar la tasa de aclaramiento, se interrumpió la recirculación del agua en los acuarios para estancar el agua y utilizar los acuarios como sistemas estáticos. Posteriormente, se añadió a cada acuario una dosis de alimento ($\approx 2 \text{ mm}^3 \text{ l}^{-1}$) de *Isochrysis galbana* (T-ISO) y se calculó la tasa de aclaramiento a partir del descenso de la concentración de partículas en el acuario siguiendo la expresión de Coughlan (1969):

$$\ln(C_0) - \ln(C_t) = \left(\frac{CR}{V} + \alpha\right) \cdot t$$

Donde C_0 y C_t representan la concentración de partículas en el tiempo 0 y t , respectivamente, V es el volumen de agua en el acuario (55 l) y α es la tasa de sedimentación

de las partículas (determinada como $\ln(C_0) - \ln(C_t) = \alpha t$ en un acuario control sin animal).

La concentración de partículas se determinó usando un Coulter-Multisizer III. La primera muestra (C_0) se tomó 2 minutos después de la adición de las microalgas para permitir la homogenización del alimento en el agua y se tomaron de 4 a 5 muestras más en tiempos regulares (a intervalos de 7 a 25 min) dependiendo de la temperatura. Este procedimiento se repitió cuatro veces consecutivas para cada individuo, incluido el control, y cada temperatura de exposición. El agua se recirculó y se filtró por un filtro de 1 μm entre replicas para limpiar cualquier fitoplancton que pudiera quedar sin filtrar. Finalmente, la tasa de aclaramiento individual se calculó como el valor de CR medio obtenido para cada individuo en las cuatro determinaciones.

2.2.4.2.2 Consumo de oxígeno (VO_2 : $\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1}$)

Una vez que se completaron las mediciones de la CR para cada temperatura, las nacas se transfirieron a respirómetros para determinar su consumo de oxígeno. Los respirómetros consistían en cubos de plástico de 15 l sellados y llenos de agua a la temperatura experimental. El volumen del cubo era reducido añadiendo botes sellados para disminuir el volumen de agua y reducir los tiempos de medición. El volumen final se media después de cada medición para los cálculos. El consumo de oxígeno se calculó como la tasa de reducción de la concentración de oxígeno disuelto (DOC) en el respirómetro a lo largo del tiempo. Se midió la DOC cada 15 min (30 min para 8.5 °C) utilizando el sensor de oxígeno de la sonda oceanográfica AAQ-RINKO 177 y se colocó una bomba de recirculación en el interior del cubo para permitir la circulación del agua y el correcto funcionamiento del sensor de oxígeno. Los individuos se mantuvieron dentro del respirómetro hasta que se detectó una diferencia del 20% en la concentración de oxígeno inicial, o hasta que pasaron un máximo de 3 horas. Para mantener una temperatura constante, los respirómetros se colocaron dentro de un tanque de 350 l a la temperatura experimental controlada por un climatizador.

2.2.4.2.3 Expresión de las mediciones fisiológicas

Las tasas fisiológicas generalmente se estandarizan a 1 g de peso seco (DW) de biomasa corporal usando coeficientes alométricos para corregir las diferencias de tamaño entre individuos. Sin embargo, dado que actualmente no se dispone de estudios alométricos de las variables fisiológicas para estas especies, no pudimos utilizar las tasas fisiológicas

estandarizadas. Además, se evitó la disección de animales de experimentación dado el estado de protección y la situación crítica de la especie y, por lo tanto, se estimó el peso seco de los tejidos blandos de los ejemplares del experimento mediante la regresión longitud-peso seco obtenida en el apartado “2.3.1.4. Relación morfométrica y análisis estadístico” para *Pinna rudis*, la especie más cercana para la que hay datos disponibles. Como consecuencia, con fines comparativos, las tasas fisiológicas se expresaron como tasas específicas de masa dividiendo las tasas fisiológicas individuales por el peso seco estimado de los tejidos blandos.

2.2.4.2.4 Análisis estadístico

La dependencia térmica de las variables fisiológicas se analizó calculando los coeficientes Q_{10} , utilizando la ecuación $Q_{10} = (R_2/R_1)^{10/(t_2-t_1)}$ donde R_2 y R_1 son la tasa fisiológica a la temperatura t_2 y t_1 respectivamente (Bayne y Newell, 1983).

La normalidad y la varianza de los datos se probaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Bartlett, respectivamente. Las diferencias en CR y VO_2 entre temperaturas se analizaron por medio de pruebas t emparejadas múltiples usando la corrección de Bonferroni. Todos los análisis se realizaron utilizando el entorno informático estadístico R.

2.3 *Pinna rudis* como modelo de aspectos biológicos de la familia Pinnidae

2.3.1 Crecimiento de *Pinna rudis*

Para obtener información sobre la poco conocida biología de *Pinna rudis*, se llevó a cabo un estudio de crecimiento de ejemplares juveniles mantenidos en jaulas en el mar durante 2 años. El estudio permitió obtener información sobre el peso seco (DW) y datos morfométricos. Como se describe en el apartado 2.1.1. Parámetros oceanográficos, durante este periodo se realizó el registro de parámetros oceanográficos (oxígeno disuelto –DO–, clorofila *a*, turbidez, salinidad y temperatura) de manera simultánea para obtener información ambiental que pudiera influir en la tasa de crecimiento de *P. rudis*. La información obtenida incrementa el conocimiento de la ecología de esta especie a partir de datos biométricos, supervivencia y su relación con variables ambientales. Esta información permite utilizar *P. rudis* como modelo para la aplicación de experimentos manipulativos que se realicen posteriormente en *P. nobilis*, a la vez que permite comprender mejor la resiliencia de sus poblaciones en el mar Mediterráneo en el contexto del cambio climático.

2.3.1.1 Localización y recolección de juveniles

Debido al fenómeno de reclutamiento masivo observado en los cabos de las estructuras de una instalación acuícola (Grupo Andrómeda Ibérica) en Vila Joiosa, Alicante (España) el 19 de febrero de 2018, se pudieron obtener 39 juveniles de *Pinna* spp. de tamaños similares (34.9 ± 6.2 mm) (Figura 29). Los individuos pudieron ser identificados *de visu* como pertenecientes a las especies *Pinna rudis* o *P. nobilis* siguiendo las indicaciones dadas anteriormente (ver apartado 1.2.3. Identificación *de visu* de *Pinna nobilis* y *Pinna rudis* e hibridación), si bien para corroborar la eficacia de los rasgos morfológicos utilizados se realizó un análisis genético en una submuestra de 5 individuos en el laboratorio CRIOBE (Centre de Recherches Insulaires et Observatoire de l'Environnement). Este análisis permitió clarificar la variabilidad de caracteres en los ejemplares de las dos especies. Los individuos se localizaron principalmente en los cabos horizontales de la instalación, de 60 m de largo, localizados a 4–6 m de profundidad y que sostenían tres filas de 6 jaulas cada una. El 20% de las cuerdas fueron muestreadas para estimar el número de reclutas. Cuatro meses después, el 29 de junio de 2018, se recolectaron 80 *P. rudis* (48.6 ± 8.8 mm) y se transportaron utilizando una nevera portátil con agua de mar, para ser colocadas en jaulas dispuestas en mar abierto el mismo día.

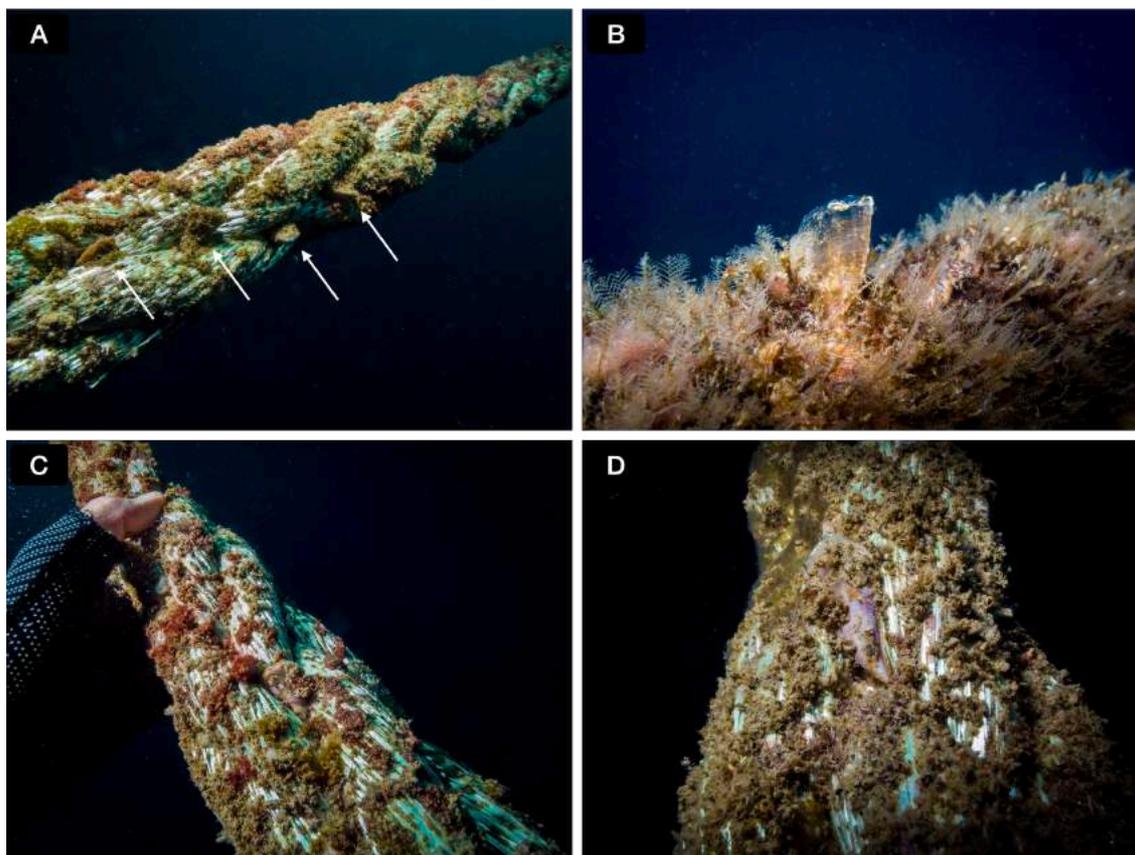


Figura 29: Juveniles de *Pinna rudis* y *P. nobilis* en los cabos de las jaulas de acuicultura de Vila Joiosa, Alicante (España). Fotos: fuente propia.

2.3.1.2 Diseño y ubicación de jaulas para el mantenimiento de *Pinna rudis* *in situ*

Los juveniles se dividieron en dos grupos, el grupo 1 ($n = 40$) se utilizó para el seguimiento del crecimiento (largo y ancho) mientras que el grupo 2 ($n = 40$) se utilizó para obtener una relación entre las medidas de tamaño y peso. Los ejemplares se instalaron en jaulas en el mar el 29 de junio de 2018. El grupo 1 se colocó en 4 jaulas independientes suspendidas en la columna de agua a 15 m de profundidad (Figura 30) en la zona marina adyacente al parque natural del penyal d'Ifac en Calp, Alicante (España) (Figura 31). Cada jaula, confeccionada con de malla de plástico de 4.5 mm, incluía 10 individuos. En el interior, cada ejemplar se alojaba en una caja independiente de 35 x 15 x 10 cm (largo x ancho x alto). Las cajas de cada jaula se distribuyeron en dos filas de 5 cajas cada una. Las jaulas fueron ancladas a bloques de cemento a 20 m de profundidad mediante un cabo y permanecieron suspendidas en la columna de agua a 15 m sobre cuatro flotadores pequeños, dispuestos cada uno en una esquina de la jaula. Los juveniles del grupo 2 se colocaron en dos jaulas individuales de 100 x 60 x 10 cm (largo x ancho x alto), fondeadas a 20 m de profundidad y a 1 m por encima del fondo. La ubicación y

profundidad de las jaulas fueron seleccionadas para evitar el enterramiento, la depredación y la posible interferencia de pescadores o buzos recreativos (Figura 31).

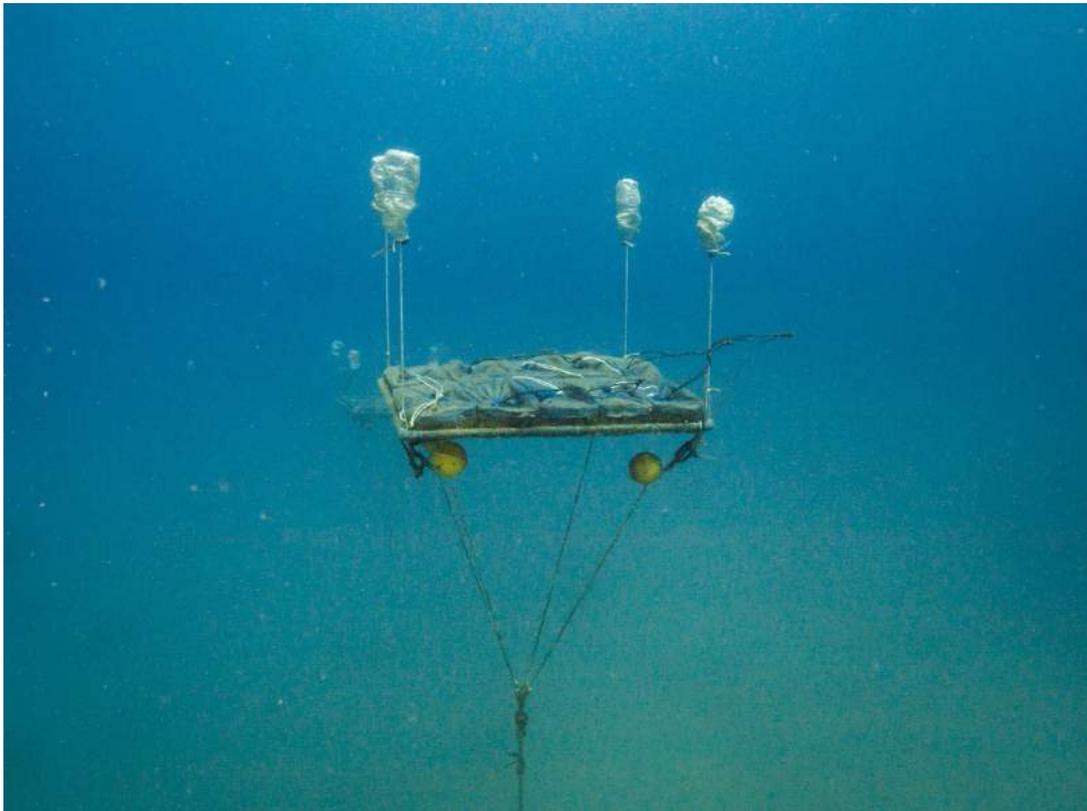


Figura 30: Cajas suspendidas en la columna de agua con los ejemplares de *Pinna rudis* pertenecientes al grupo 1. Foto: fuente propia.

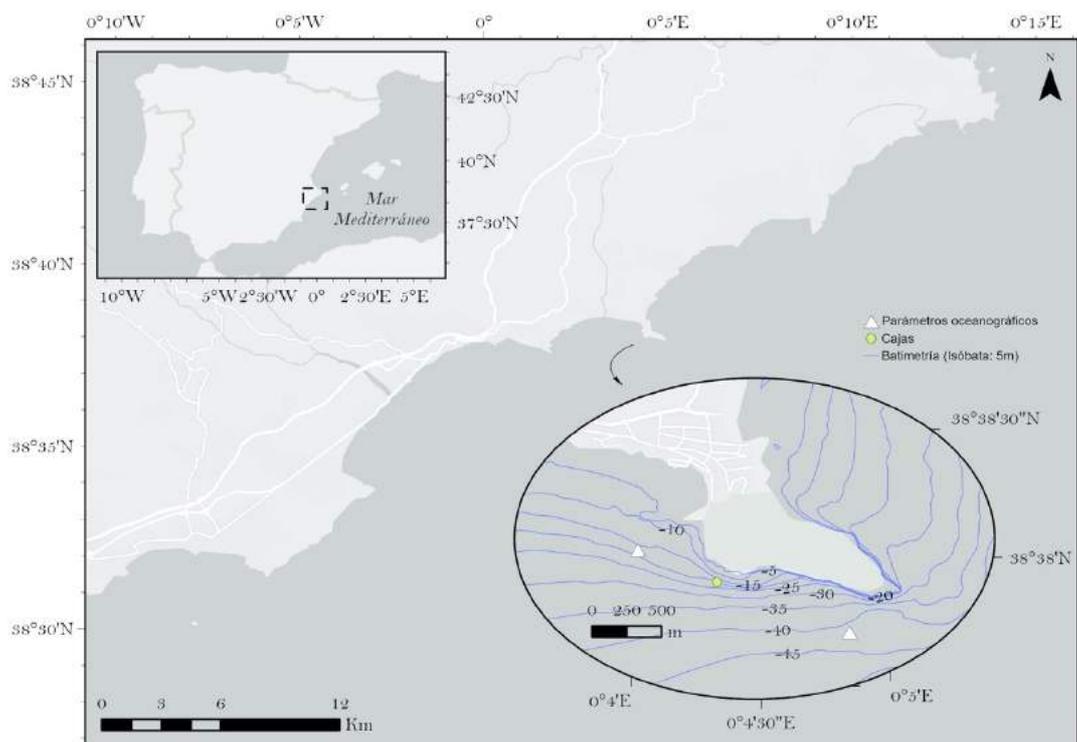


Figura 31: Ubicación de las jaulas de *Pinna rudis* y el área de muestreo de los datos oceanográficos.

2.3.1.3 Seguimiento en las jaulas

Con una periodicidad mensual entre junio de 2018 y julio de 2020 (25 meses) se realizaron inmersiones de seguimiento de los ejemplares de *Pinna rudis* (Figura 32). El período entre mediciones varió entre 20 y 40 días dependiendo de las condiciones climáticas, con la excepción de la campaña de marzo-abril de 2020, que se omitió debido a las restricciones por pandemia de COVID19 en España.

Para el caso de los ejemplares del grupo 1 se midieron, *in situ* con precisión milimétrica, la longitud máxima antero-posterior (García-March y Vicente, 2006) y la anchura máxima dorso-ventral, medido desde el punto de inflexión hasta el punto ventral con máxima anchura horizontal (De Gaulejac y Vicente, 1990). Las medidas se tomaron con un pie de rey para longitudes de concha < 15 cm y una forcípula para longitudes de concha > 15 cm (Figura 33).



Figura 32: Transporte de una caja de mantenimiento de *Pinna rudis* para su reparación. Foto: Jordi Chias.

A los ejemplares del grupo 2 se les dejaba crecer y se recolectaron sistemáticamente durante el período de monitorización para obtener un rango de tamaños hasta 300 mm de longitud de concha. En el momento de recolección se tomaron medidas de la longitud anteroposterior máxima y el ancho dorso ventral siguiendo las pautas de los ejemplares del grupo 1. Los ejemplares del grupo 2 fueron sacrificados, se separaron los tejidos blandos de la concha, se secaron a 105 °C durante 48 h y se pesaron.

Para ambos grupos de ejemplares, las jaulas se limpiaron de epibiontes en cada inmersión mensual durante todo el período de seguimiento. Los parámetros oceanográficos (oxígeno disuelto (DO), clorofila *a*, turbidez, salinidad y temperatura) se obtuvieron a partir de las medidas bimensuales tomadas en la estación a 15 m de profundidad descritas previamente en el apartado 2.1.1. Parámetros oceanográficos.

2.3.1.4 Relación morfométrica y análisis estadístico

Los datos de crecimiento (grupo 1) se expresaron en mm día^{-1} para cada período de seguimiento. La relación entre longitud-ancho (grupo 1 y grupo 2) y longitud-DW (grupo 2) se ajustó mediante regresión lineal, utilizando el grado de asociación dado por el coeficiente R^2 . Los datos de longitud-DW se transformaron previamente mediante logaritmo para ajustarlos a una regresión lineal. Se calculó un modelo de crecimiento utilizando el modelo de efectos mixtos no lineales (Vigliola y Meekan, 2009) para ajustar los datos de tamaño por edad a la función de crecimiento de Von-Bertalanffy. L_{∞} se consideró aleatorio y t_0 y K fijos (García-March *et al.*, 2011a). Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (Benesty *et al.*, 2009) entre el crecimiento (mm día^{-1}) y los datos oceanográficos. Para ello, se restó la tendencia ontogenética a los datos de crecimiento utilizando el método no paramétrico *Seasonal and Trend Decomposition Using Loess* (STL) descrito por Cleveland *et al.* (1990) mediante el software libre R.



Figura 33: A) Medición de *Pinna rudis* < 15 cm mediante un calibre vernier (foto: Fabian Joulins); B) Medición de *Pinna rudis* > 15 cm con una forcípula. Foto: Sebastián Hernandis Giner.

2.3.2 Fisiología energética de *Pinna rudis*

Se realizó un experimento de fisiología energética en *Pinna rudis* usando la técnica de estudio *scope for growth* SFG (ver apartado 1.2.4. Mantenimiento en cautividad) para tres dietas diferentes (100% fitoplancton vivo, 100% dieta comercial y 50% fitoplancton vivo + 50% dieta comercial). Con este experimento se pretendía conocer la fisiología energética de *P. rudis* para desarrollar mejores protocolos de cautiverio para *P. rudis* y otros pínidos, analizar la efectividad de una dieta comercial para el mantenimiento de esta especie en condiciones de cautiverio y evaluar el nivel de sustitución de la dieta de microalgas vivas.

Para este experimento se utilizaron ejemplares juveniles recolectados previamente en la instalación de acuicultura de Vila Joiosa, del mismo modo que los ejemplares del apartado “2.3.1.1. Localización y recolección de juveniles”. Estos ejemplares fueron mantenidos en jaulas cerca del fondo en el mar durante 1.5 años, con el mismo sistema descrito en el apartado “2.3.1.2. Diseño y ubicación de jaulas para el mantenimiento de *Pinna rudis in situ*”.

2.3.2.1 Transporte y aclimatación de ejemplares

Los 30 ejemplares de *Pinna rudis* fueron recolectados de las jaulas fondeadas en Calp y, en el sistema de transporte descrito anteriormente para el transporte de ejemplares de *P. nobilis*, se trasladaron a las instalaciones del Instituto Español de Oceanografía (IEO) en San Pedro del Pinatar en Murcia para iniciar este experimento (Figura 34).

Todos los animales fueron identificados a su llegada a los laboratorios del IEO y se midió su longitud (distancia antero-posterior expresada como cm ind^{-1}) y su peso vivo (expresada como g ind^{-1}). La aclimatación a las condiciones de laboratorio se realizó durante dos semanas. Para ello se utilizaron cuatro tanques de agua (90 l) con circuito cerrado y con renovación total del agua, realizando limpieza tres veces por semana (Figura 35).



Figura 34: Ejemplares de *Pinna rudis* transportados en agua de mar mediante neveras para los experimentos de fisiología energética realizados en las instalaciones del Instituto Español de Oceanografía (IEO). Foto: fuente propia.

Las condiciones del agua durante todo el proceso del experimento fueron: salinidad 37 psu, temperatura 18 °C y concentración de saturación de oxígeno disuelto. Los juveniles de *Pinna rudis* se alimentaron diariamente con microalgas vivas cultivadas en el laboratorio del IEO (*Isochrysis galbana*, t-ISO) y se ajustaron a una ración del 6% del peso seco de los individuos (DW). La ración se distribuyó a lo largo del día en dosis iguales utilizando bombas peristálticas multicanal con el fin de mantener a los animales a una concentración por debajo del umbral de pseudoheces ($\approx 2 \text{ mm}^3 \text{ l}^{-1}$, $\approx 1 \text{ mg}$ de materia orgánica l^{-1}) (Widdows *et al.*, 1979; Bayne *et al.*, 1989; Bayne, 1993). Dado el estado de protección de *Pinna rudis*, se estimó conveniente no sacrificar ningún ejemplar para este experimento. El DW de cada individuo se estimó a partir de las medidas de talla (L) utilizando la ecuación de regresión talla-peso obtenida para esta especie en el apartado “2.3.1.4. Relación morfométrica y análisis estadístico”.



Figura 35: Ejemplares de *Pinna rudis* mantenidos en 4 cajas de 90 l para la aclimatación a las condiciones de laboratorio en las instalaciones del Instituto Español de Oceanografía (IEO). Foto: fuente propia.

2.3.2.2 Colocación de los ejemplares en los tanques

Debido a la ausencia de estudios previos sobre la fisiología de esta especie en cautividad y dado el tamaño de los individuos, se llevó a cabo un experimento preliminar para comprobar si la posición corporal de los individuos (es decir, vertical u horizontal) podía provocar un efecto significativo en la determinación fisiológica del equilibrio energético (Figura 36). Para ello, se seleccionaron 12 individuos de tamaño similar y se colocaron en 6 acuarios de 15 l ($n = 2$ individuos por acuario). En los acuarios 1 a 3 (A1, A2 y A3), los ejemplares de *P. rudis* se colocaron en vertical, mientras que en los acuarios 4 a 6 (A4, A5 y A6) los individuos se dispusieron en horizontal, tumbados en el fondo. Después de una semana de aclimatación, se midió la tasa de disminución en la concentración de partículas después de suministrar $35,860 \pm 1366$ cel ml^{-1} de *Isochrysis galbana* (t-ISO). La concentración de partículas se determinó cada 5 minutos durante 20 minutos con un contador Coulter Multisizer III (MS III) provisto de un tubo con un tamaño de apertura de $100 \mu\text{m}$. Las mediciones se repitieron 3 veces en cada acuario, con una renovación total del agua cada vez.

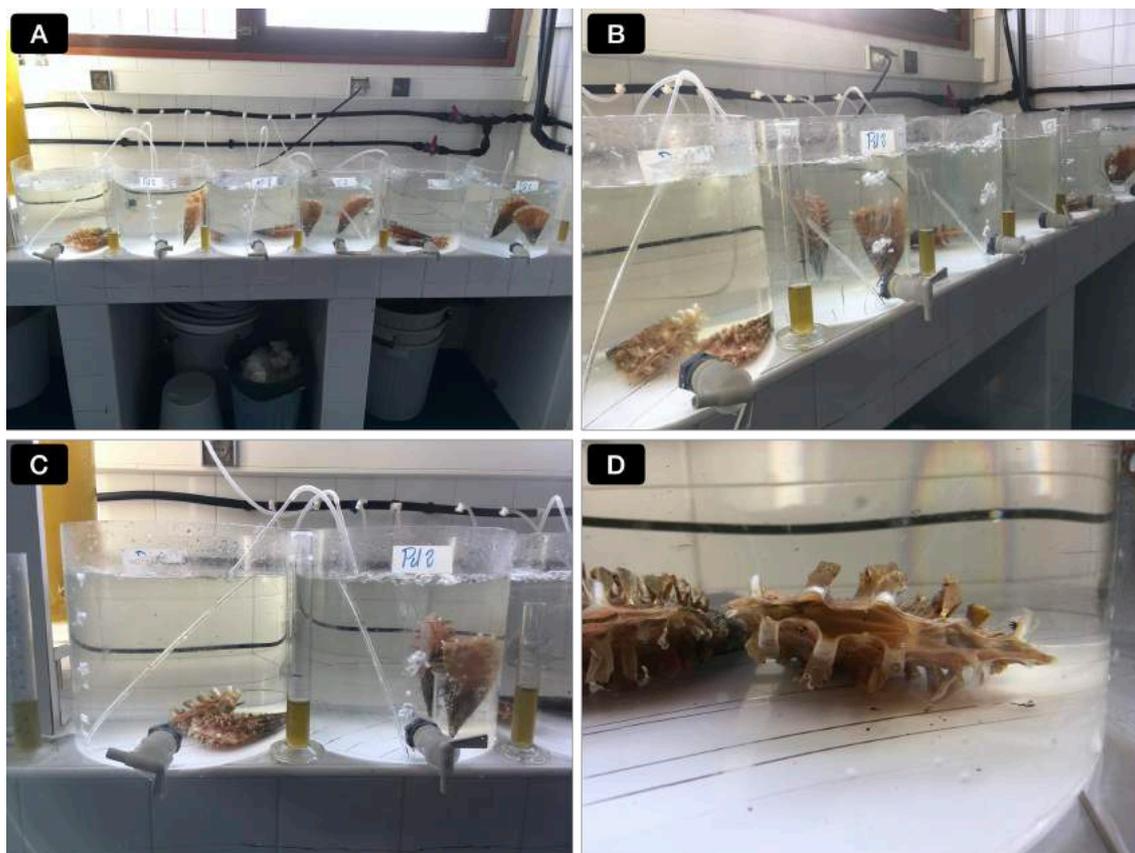


Figura 36: Experimento preliminar para la observación del efecto de la posición (horizontal/vertical) en el desempeño fisiológico de los ejemplares de *Pinna rudis*. Fotos: fuente propia.

2.3.2.3 Acondicionamiento a dietas experimentales

Tras la aclimatación al laboratorio, 30 ejemplares de tamaños similares se distribuyeron en tres grupos ($n = 10$). El primer grupo (Control: C) continuó alimentándose con *Isochrysis galbana*; al segundo grupo (Dieta shellfish: SF) se le proporcionó el concentrado de microalgas comercial Shellfish Diet 1800®. Este producto es producido y comercializada por Instant Algae (https://reedmariculture.com/product/shellfish_diet_1800.php) y consiste en una mezcla de las microalgas marinas: *Isochrysis* sp., *Pavlova* sp., *Tetraselmis* sp., *Chaetoceros calcitrans*, *Thalassiosira weissfloggi*, y *Thalassiosira pseudonana*; Los individuos del tercer grupo (Dieta mixta: MX) se alimentaron con una mezcla 50/50 (según volumen de partículas) de *I. galbana* (t-ISO) y Shellfish Diet 1800®.

Las dietas se incorporaron a los tanques de alimentación mediante bombas peristálticas multicanal, a velocidades establecidas para proporcionar una concentración de partículas de $\approx 2 \text{ mm}^3 \text{ l}^{-1}$ ($\approx 1 \text{ mg}$ de materia orgánica l^{-1}), por debajo del umbral de pseudoheces en bivalvos (Widdows *et al.*, 1979; Bayne *et al.*, 1989; Bayne, 1993). La ración diaria se

mantuvo en un 6% de peso seco (DW). Los individuos fueron acondicionados durante dos semanas a las diferentes dietas previo a la determinación de los parámetros fisiológicos del balance energético.

2.3.2.4 Medidas fisiológicas

2.3.2.4.1 Puesta a punto del experimento

Para estimar la tasa de aclaramiento (CR: $l\ h^{-1}$) y la eficiencia de absorción de alimentos (AE: porcentaje), los ejemplares de *Pinna rudis* ($n = 10$) se colocaron individualmente en las Cámaras de Flujo Continuo (FTC), a las que se añadieron dos cámaras extra solo con agua para usarlas como control. Las cámaras consisten en tanques de plástico de 4 l (260 mm de largo x 160 mm de ancho x 100 mm de alto) con entrada de agua situada en una esquina próxima al fondo del tanque y la salida en el lado opuesto cerca de la parte superior. Los individuos se colocaron dispuestos horizontalmente en el fondo, con el canal inhalante dirigido a la entrada de agua.

Las dietas en suspensión utilizadas en las FTC consistieron en mezclas de i) células de fitoplancton de la dieta correspondiente (*Control*, Shellfish diet® o la mezcla de ambas) y ii) partículas recolectadas, calcinadas (a 800 °C) y tamizadas (<40 μm) de limo marino. La adición de partículas de limo es imprescindible para determinar la eficiencia de absorción utilizando el método de Conover (1966). La concentración de alimento en las determinaciones de la CR se estableció en una concentración nominal de 1.5 $mg\ l^{-1}$ de material particulado. Las dietas concentradas (fitoplancton y limo calcinado) se introdujeron en un tanque de mezcla de agua de mar utilizando bombas peristálticas multicanal (ISMATEC MCP) a velocidades ajustadas para proporcionar una concentración de alimento estable. El tanque de mezcla se colocó sobre las FTC, de forma que las suspensiones de alimentación se suministraron por gravedad a las cámaras de filtración. El caudal en cada cámara era fácilmente ajustable mediante el uso de llaves de paso.

2.3.2.4.2 Tasa de aclaramiento

La tasa de aclaramiento (CR: 1 h^{-1}) se midió individualmente utilizando el método de Cámara de Flujo Continuo (FTC) de Hildreth y Crip (1976) como se describe en Albentosa *et al.* (2012b), con modificaciones particulares relacionadas con el tamaño de *Pinna rudis* (Figura 37) y se calculó en función de:

$$CR = \frac{f \cdot (C_i - C_o)}{C_i}$$

donde **f** es el caudal de agua (L h^{-1}); **C_i** es la concentración de partículas de entrada (obtenida de la salida de agua de las cámaras de control) y **C_o** la concentración de partículas en la salida para cada cámara experimental con ejemplar de *Pinna rudis*. La concentración de partículas se midió con el MS III.

La velocidad de flujo se ajustó para lograr una velocidad que proporcionara diferencias de concentración de partículas entre **C_i** y **C_o** superiores al 10% pero inferiores al 40% para la obtención de datos fiables tal y como indica Riisgård (2001) para este método. El caudal medio resultante fue de $24 \pm 1.8 \text{ l h}^{-1}$. Los individuos se mantuvieron 6 h en el FCT antes de limpiar todas las heces en las cámaras para desechar las heces provenientes de la dieta sin el limo calcinado. Para asegurar que los ejemplares estaban de nuevo relajados tras la limpieza, se esperó una hora antes de comenzar con las mediciones del experimento. Tras esta hora, se tomó una muestra cada hora de cada salida de agua (4 muestras por cámara en total) para calcular la tasa de aclaramiento.

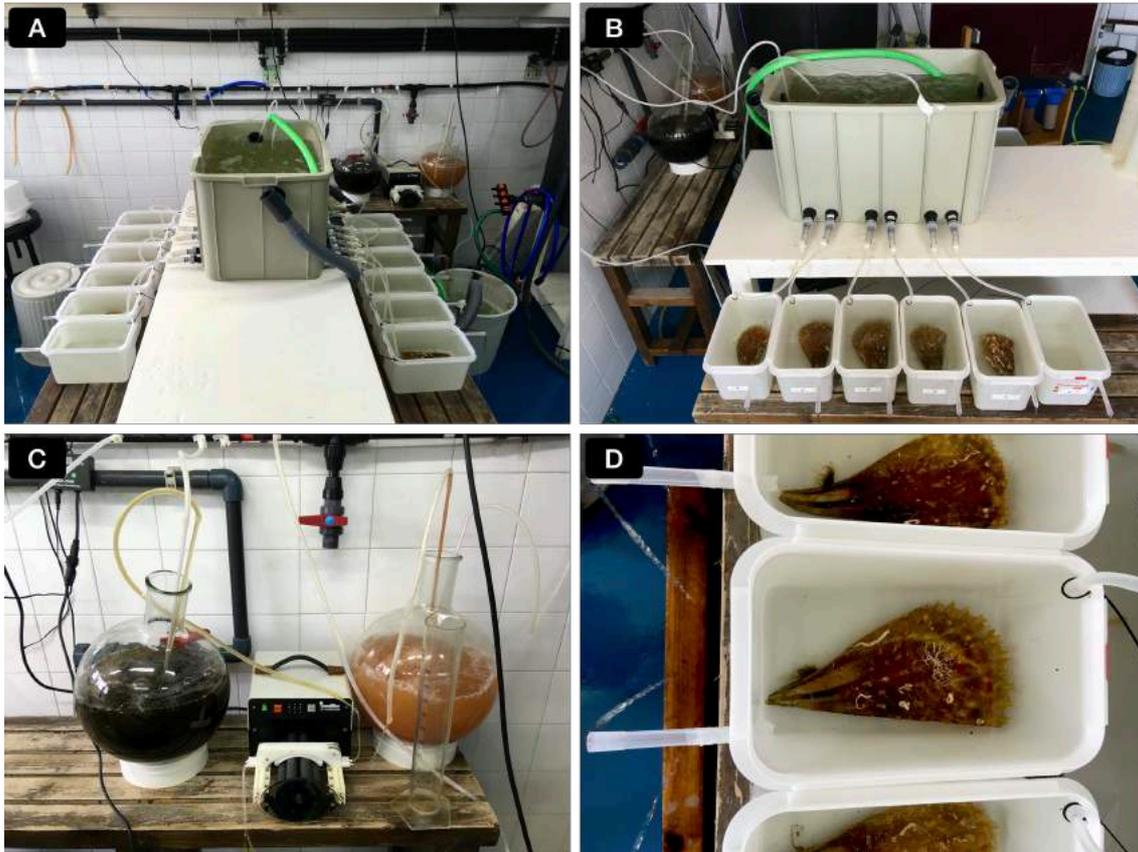


Figura 37: Método de cámara de flujo continuo (FTC). A) Visión general del experimento al completo. Se observan las 12 cámaras (10 con ejemplar y 2 blancos) de 4 l distribuidas en dos filas de 6, el cubo de mezcla en el suelo a la derecha, el tanque de distribución del agua con el alimento sobre la mesa blanca y, al fondo, los 2 balones, uno con *Isocrhysis galbana* y otro con el sedimento marino, con la bomba peristáltica en el medio para su distribución al cubo de mezcla. B) Visión lateral del experimento. C) Fotografía de los balones con *I. galbana* y el sedimento marino con la bomba peristáltica en el centro. D) Foto de las cámaras de 4 l que contienen los ejemplares de *Pinna rudis*, donde se puede apreciar la entrada del alimento a la derecha, que llega hasta el fondo de la cámara, y la salida de agua a la izquierda en superficie. Fotos: fuente propia.

2.3.2.4.3 Características de las dietas

La suspensión utilizada en las FTC en términos de materia particulada total (TPM, mg l^{-1}), materia particulada orgánica (POM, mg l^{-1}), materia particulada inorgánica (PIM, mg l^{-1}) y contenido orgánico (OC: POM/ TPM) se determinaron en 8 ocasiones. Las muestras de agua (2 l) obtenidas del flujo de salida de la cámara de control, se hicieron pasar a través de filtros Whatman GF/C previamente calcinados y pesados. El TPM se calculó como el incremento de peso de los filtros después del secado a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. El PIM se calculó como el peso de la materia que queda en los filtros después de calcinar los filtros a $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora y el POM se calculó como la diferencia entre TPM y PIM. El número de partículas y volumen empaquetado también se midieron usando el Multisizer III. Las características de las dietas experimentales se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Característica de las dietas experimentales durante las mediciones fisiológicas. TPM = material particulado total; POM = materia orgánica particulada; OC = fracción orgánica. Las diferencias entre las dietas se evaluaron mediante el ANOVA y una prueba de Tukey de comparaciones múltiples en la que las diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

	Control	Dieta Shellfish	Dieta Mixta
10^6 cel l^{-1}	59.6 ± 0.87^A	57 ± 0.85^B	50.2 ± 1.34^C
$mm^3 l^{-1}$	2.16 ± 0.08^A	2.13 ± 0.01^A	2.06 ± 0.09^A
TPM (mg l^{-1})	1.54 ± 0.12^A	1.23 ± 0.10^B	1.46 ± 0.18^A
PIM (mg l^{-1})	0.71 ± 0.10^A	0.55 ± 0.07^B	$0.61 \pm 0.17^{A,B}$
POM (mg MO l^{-1})	0.83 ± 0.03^A	0.68 ± 0.04^B	0.86 ± 0.03^A
OC (fracción)	0.54 ± 0.04^A	0.56 ± 0.03^A	0.59 ± 0.07^A

2.3.2.4.4 Tasa de ingestión

La tasa de ingestión de materia orgánica (OIR, en mg POM h^{-1}) de cada individuo se calculó como el producto de la CR media ($l h^{-1}$) y la POM (mg l^{-1}). Las tasas de ingestión del alimento se transformaron en unidades energéticas ($J h^{-1}$), asumiendo que el alimento tiene un contenido energético de 23 J mg POM $^{-1}$ (Widdows y Johnson, 1988).

2.3.2.4.5 Eficiencia de absorción y tasa de absorción

Las heces producidas por los ejemplares de *Pinna rudis* durante las primeras 6 horas en el FTC se limpiaron y desecharon. De esta forma, se aseguraba que las dietas que se recogieran posteriormente provenían únicamente de la dieta correspondiente junto con el sedimento. Posteriormente, 4 horas más tarde (tiempo suficiente para la producción de heces) se recolectaron todas las heces producidas por cada individuo, se pasaron por filtros GF/C previamente calcinados y pesados y se procesaron para la determinación del contenido orgánico e inorgánico para calcular la eficiencia de absorción de alimentos (AE) siguiendo el método de Conover (1966):

$$AE = \left[\frac{F - E}{(1 - E) \cdot F} \right] \cdot 100$$

donde F y E, representan el porcentaje de materia orgánica en los alimentos (F) y las heces (E). La tasa de absorción (AR, tanto en términos de mg POM h^{-1} y $J h^{-1}$) se calculó luego como el producto de IR (mg POM h^{-1} o $J h^{-1}$) y AE ($AR = IR \cdot AE$)).

2.3.2.4.6 Tasa metabólica

La tasa metabólica de los individuos (RMR: $J h^{-1}$) se determinó a partir del consumo de oxígeno (VO_2 : $mgO_2 h^{-1}$). Una vez que se completó la determinación de CR y AE, los ejemplares de *Pinna rudis* se retiraron del FTC y se transfirieron a cámaras de respiración selladas de 2.6 l (Figura 38). El consumo de oxígeno se determinó a partir de la tasa de disminución de la concentración de oxígeno disuelto en las cámaras registradas durante 1 h cada 10 min, tiempo suficiente para detectar una bajada significativa dado el volumen de las cámaras de respiración. Se utilizaron sondas de oxígeno Bod de la serie YSI Pro. Una cámara de control permitió comprobar la estabilidad de la concentración de oxígeno. Los consumos de oxígeno se transformaron en tasa metabólica mediante el uso del coeficiente oxi-calórico de 20.08 $J ml O_2$ (Gnaiger, 1983).



Figura 38: Ejemplar de *Pinna rudis* en la cámara sellada para la medición del consumo de oxígeno mediante la sonda YSI Pro series Bod. Foto: fuente propia.

2.3.2.4.7 *Scope for growth* y eficiencias de crecimiento brutas y netas

Para la estimación del crecimiento se calculó el *Scope for Growth* (SFG) considerándose como $SFG = AR$ (tasa de absorción) $- VO_2$ (consumo de oxígeno), ambas tasas expresadas como $J h^{-1}$. La energía perdida en la excreción, inferior al 5% de la energía adquirida según Bayne y Newell (1983), no se consideró en la estimación de SFG. Finalmente, se calcularon las estimaciones de la eficiencia de crecimiento bruto individual, $K1 = SFG/IR$ (tasa de ingestión), y la de crecimiento neto, $K2 = SFG/AR$ (tasa de absorción) (Ivlev, 1966).

2.3.2.5 Expresión de las mediciones fisiológicas y análisis estadístico

Dado que no existen datos sobre coeficientes alométricos, las tasas fisiológicas se estandarizaron en función de la estimación del peso seco (DW) siguiendo el mismo método de estandarización que en el apartado “2.2.4.2.3. Expresión de las mediciones fisiológicas”.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el entorno informático estadístico R. Se utilizó la prueba *t de Student* para analizar las diferencias en la tasa de reducción de partículas entre los ejemplares mantenidos en posición de pie y acostada. Se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilk y la prueba de Bartlett, respectivamente, para evaluar las diferencias de normalidad y varianza en los datos. Se utilizaron ANOVA y el *Tukey's honestly significant differences (HDS)* para analizar las diferencias en las mediciones biométricas y fisiológicas. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (Benesty *et al.*, 2009) entre las tasas fisiológicas de todas las dietas y el SFG.



3. Resultados

3.1 Caracterización del hábitat de la población de *Pinna nobilis* en Calp (Alicante)

3.1.1 Parámetros oceanográficos

Los resultados obtenidos para la temperatura mostraron variaciones estacionales (Figura 39 y Figura 40), con un mínimo de 13.73 °C en marzo de 2018 y un máximo de 28.39 °C en agosto de 2017. Agosto de 2017 fue el único mes en el que se superaron los 28 °C, mientras que los veranos de 2018, 2019 y 2020 la temperatura máxima superó ligeramente los 27 °C. Los meses más cálidos en estos tres años fueron septiembre en 2018 y agosto en 2019 y 2020. Los meses más fríos corresponden a marzo de 2018 y enero de 2020, los únicos por debajo de los 14 °C.

Como es habitual en estas aguas, los meses invernales se caracterizaron por una homogeneidad en la columna de agua, mientras que el periodo estival presentó una termoclina estacional, con temperaturas superiores a 20 °C por encima de los 30 m de profundidad. Cabe destacar la entrada de una masa de agua fría profunda todos los veranos, que redujo la profundidad de la termoclina estival. Esta se observó principalmente entre agosto y septiembre para los años 2017, 2018 y 2020, adelantándose a julio-agosto en 2019.

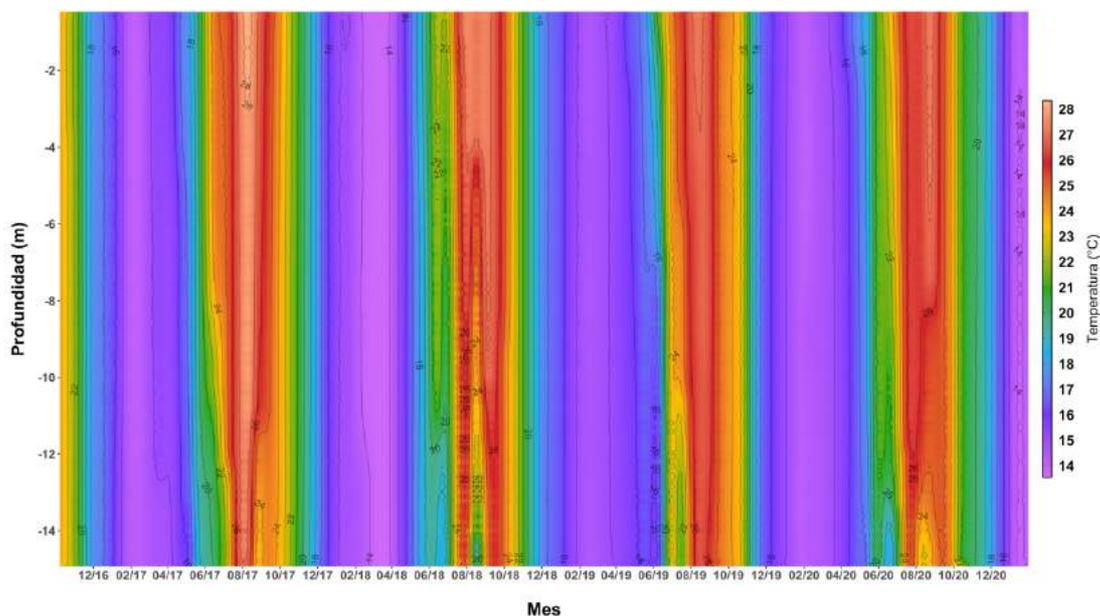


Figura 39: Perfil oceanográfico en la estación a 15 m de profundidad de los valores de temperatura durante el periodo de muestreo en Calp.

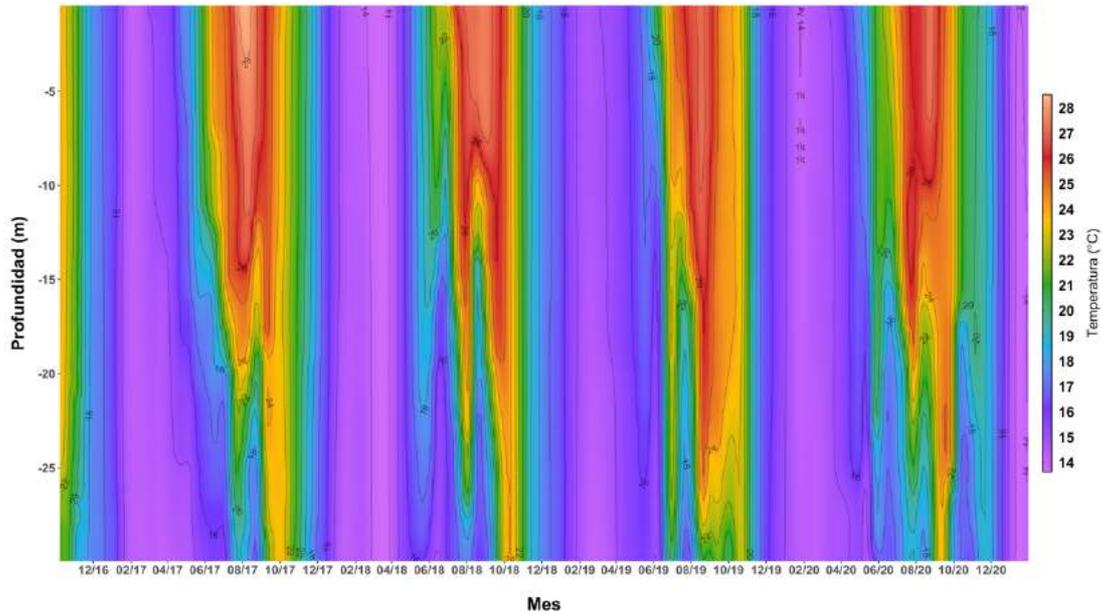


Figura 40: Perfil oceanográfico en la estación a 30 m de profundidad de los valores de temperatura durante el periodo de muestreo en Calp.

Los niveles de clorofila *a* (Figura 41 y Figura 42) mostraron variaciones estacionales. Los valores máximos, por encima de $1.9 \mu\text{g l}^{-1}$ se observaron en marzo de 2017 y mayo de 2020. Por su parte, los mínimos, por debajo de $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ y a distintas profundidades, únicamente se apreciaron entre los meses de mayo y septiembre para todos los años.

En general, las concentraciones más elevadas para todos los años (por encima de $1 \mu\text{g l}^{-1}$) se observan a partir de finales de otoño coincidiendo con la rotura de la termoclina en octubre-noviembre y durante el invierno y la primavera hasta abril-mayo.

Por el contrario, durante los meses principalmente de verano, entre mayo y octubre, se observa una mayor homogeneidad de la columna de agua con concentraciones bajas, generalmente por debajo de $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$.

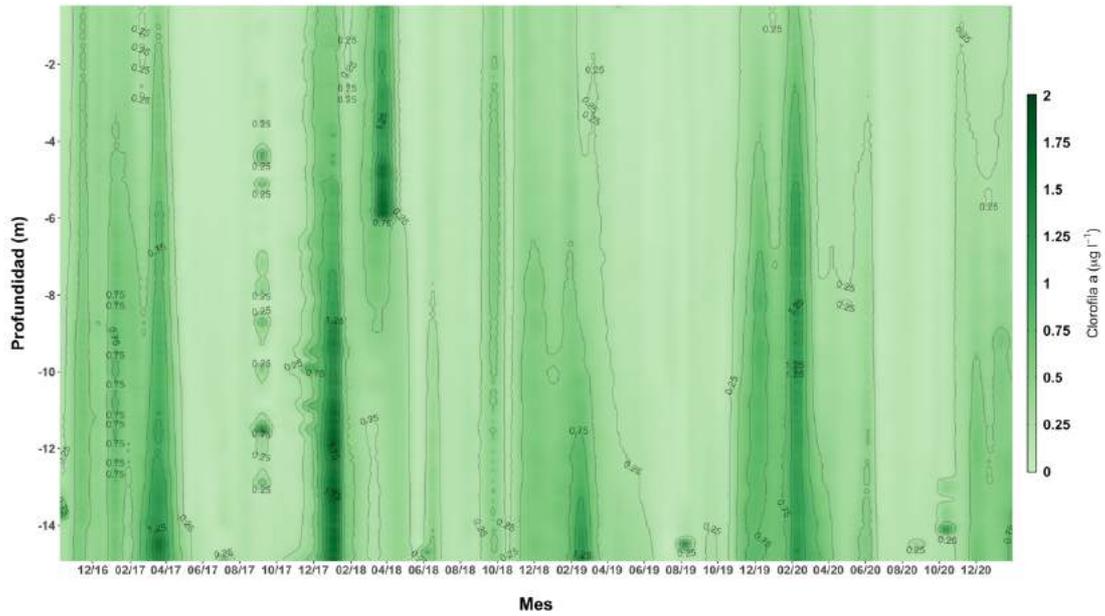


Figura 41: Perfil oceanográfico en la estación a 15 m de profundidad de los valores de clorofila a durante el periodo de muestreo en Calp.

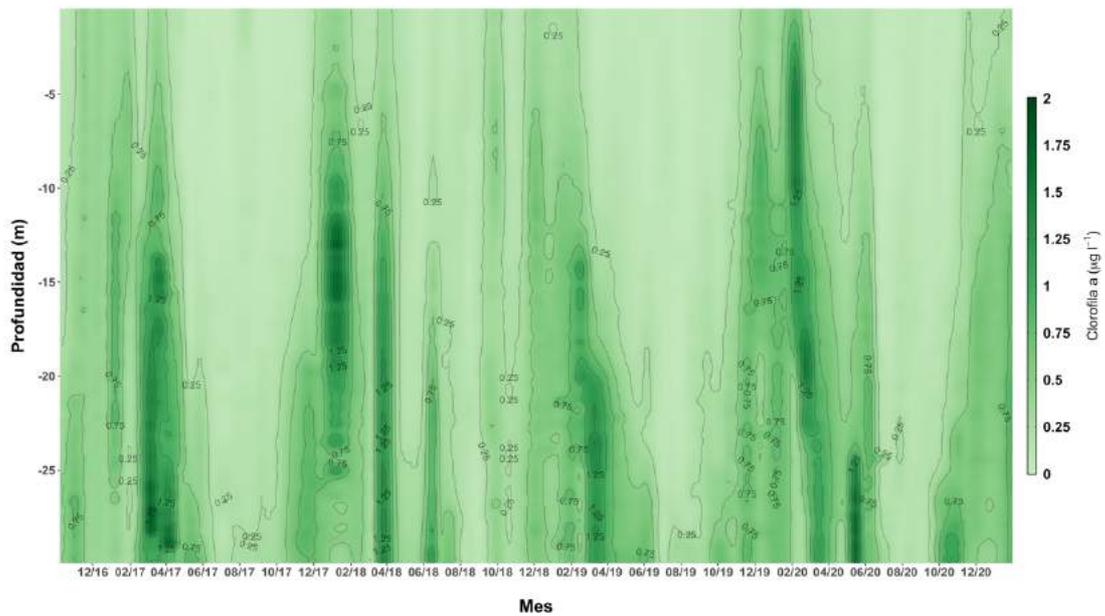


Figura 42: Perfil oceanográfico en la estación a 30 m de profundidad de los valores de clorofila a durante el periodo de muestreo en Calp.

Durante el periodo de estudio, la concentración de oxígeno disuelto (OD) representada en la Figura 43 y Figura 44 mostró un perfil similar al de la temperatura, dada la relación que existe entre estas dos variables. Las concentraciones más elevadas (por encima de 8.00 mg l^{-1}) se observaron principalmente en profundidad (por debajo de los 15m) coincidiendo con la entrada de una masa de agua fría previamente comentada en los perfiles de temperatura. Durante el invierno, la baja temperatura también favorece que se mantengan concentraciones elevadas de oxígeno disuelto, por encima de los 7 mg l^{-1} . En

cambio, durante el verano, coincidiendo con la termoclina estacional se observan concentraciones menores, generalmente por debajo de los 6.5 mg l^{-1} , alcanzando valores mínimos entre 5.66 y 6 mg l^{-1} coincidiendo con las temperaturas más elevadas. También durante enero y febrero de 2018 se detectó en profundidad concentraciones por debajo de 6 mg l^{-1} .

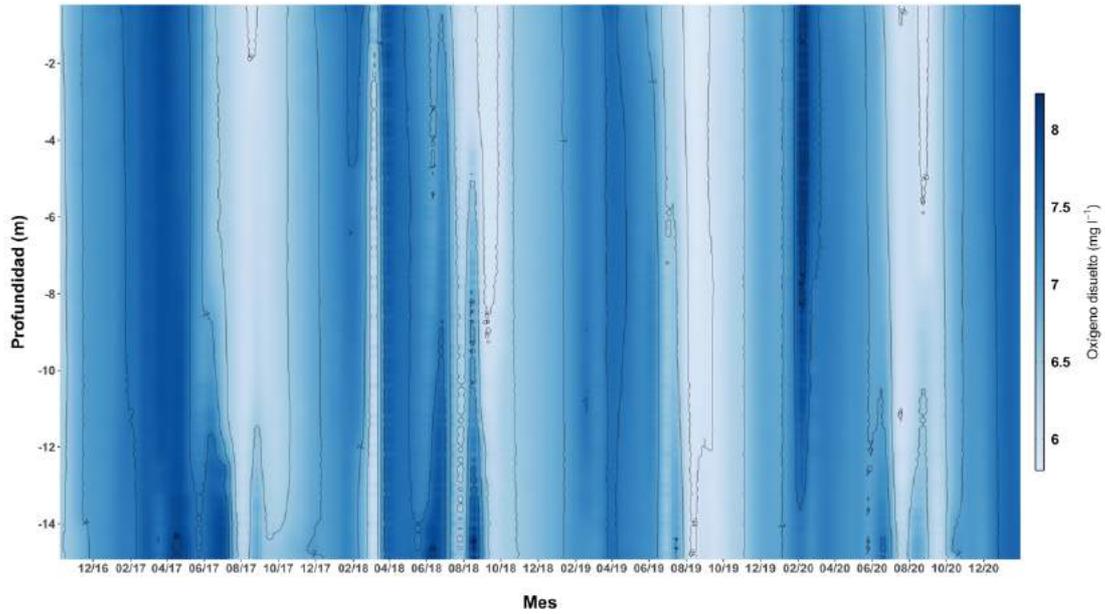


Figura 43: Perfil oceanográfico en la estación a 15 m de profundidad de los valores de oxígeno disuelto durante el periodo de muestreo en Calp.

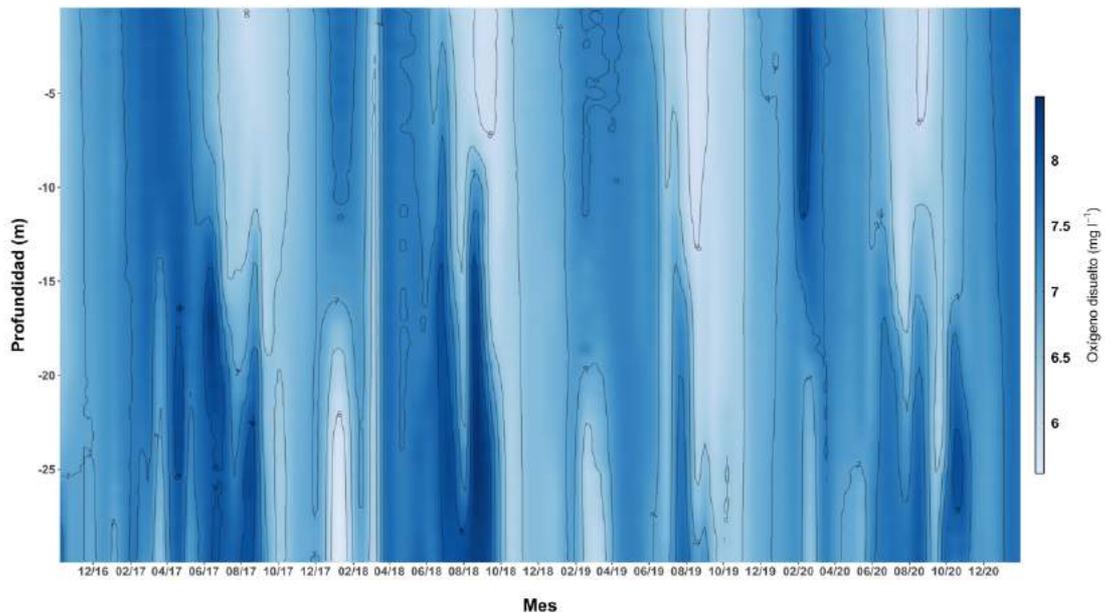


Figura 44: Perfil oceanográfico en la estación a 30 m de profundidad de los valores de oxígeno disuelto durante el periodo de muestreo en Calp.

Tal y como se aprecia en la Figura 45 y Figura 46, la salinidad mostró pocas variaciones, con un rango entre 38.40 psu y 36.79 psu durante el tiempo de muestreo. Las menores concentraciones de salinidad, por debajo de 37.20 psu, se detectaron entre agosto y diciembre de 2017 y 2020. En cambio, las mayores concentraciones, por encima de 38.00 psu, se observaron entre febrero y mayo de 2018, entre diciembre de 2018 y agosto de 2019 y entre octubre de 2019 y febrero de 2020.

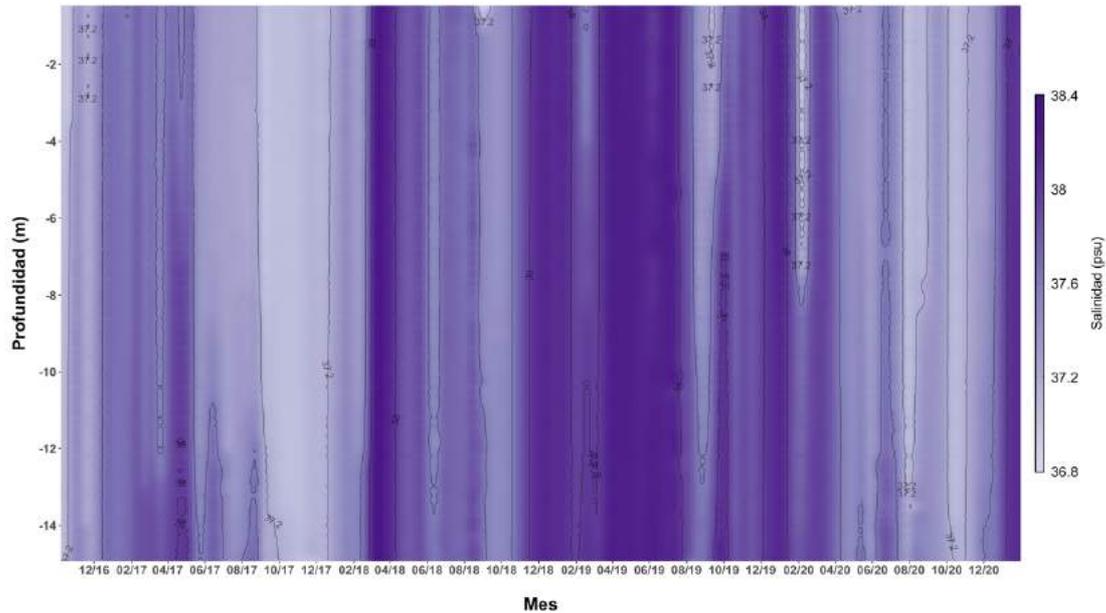


Figura 45: Perfil oceanográfico en la estación a 15 m de profundidad de los valores de salinidad durante el periodo de muestreo en Calp.

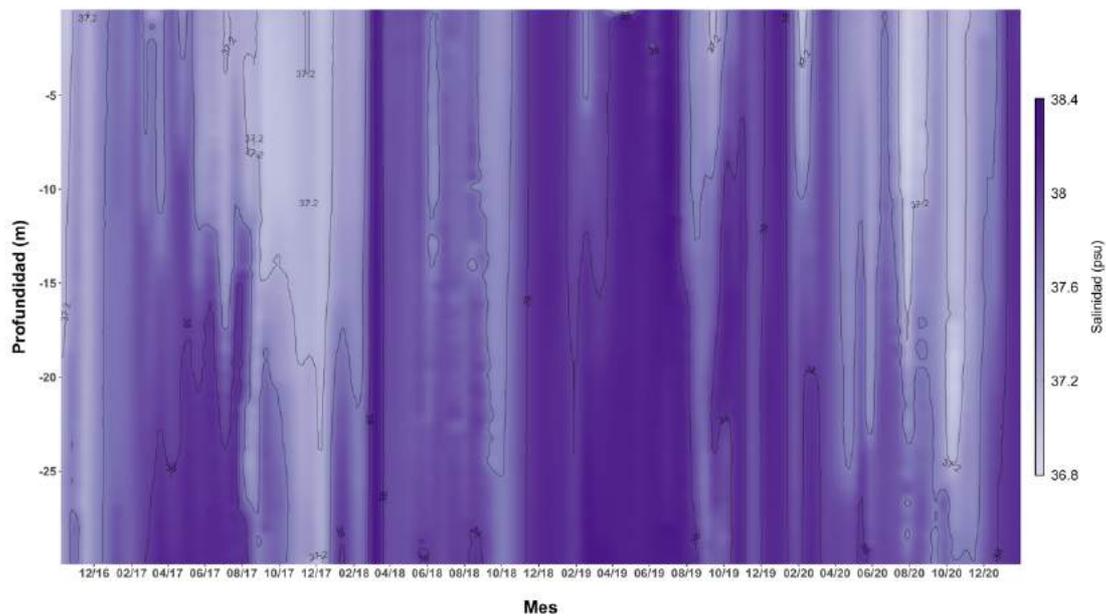


Figura 46: Perfil oceanográfico en la estación a 30 m de profundidad de los valores de salinidad durante el periodo de muestreo en Calp.

La turbidez mostró de manera generalizada valores por debajo de 1 mg l^{-1} (0.69 FTU) con la excepción de eventos puntuales de mayores concentraciones a lo largo de toda la columna coincidiendo con eventos de fuertes tormentas invernales (Figura 47 y Figura 48). Destacan los eventos sucedidos entre diciembre de 2016 y febrero de 2017 y en enero-febrero de 2020, con concentraciones que llegaron hasta 4 mg l^{-1} (4.32 FTU).

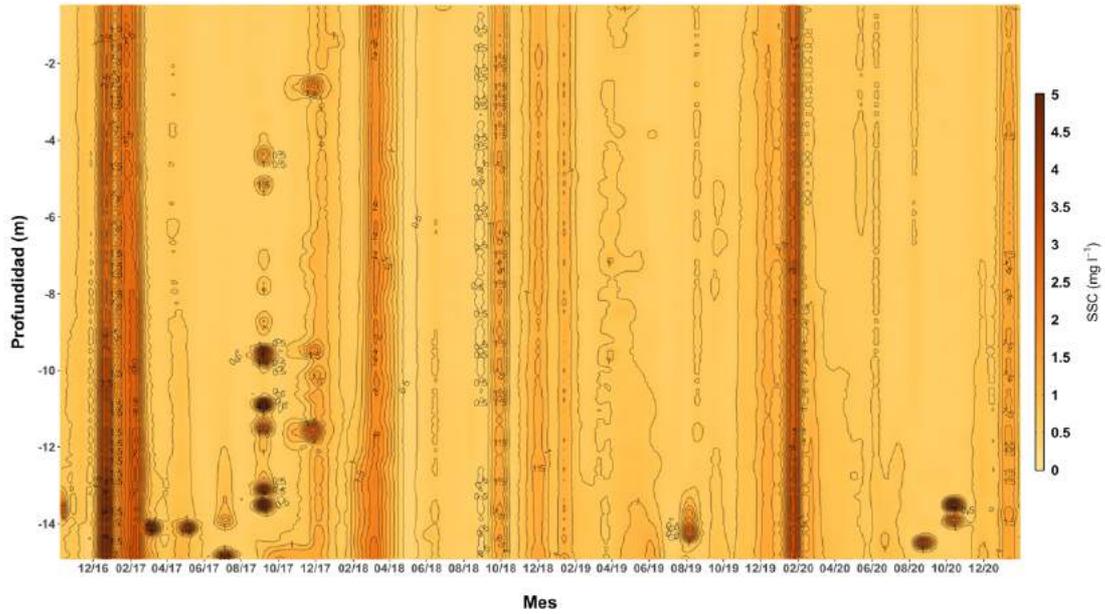


Figura 47: Perfil oceanográfico en la estación a 15 m de profundidad de los valores de turbidez durante el periodo de muestreo en Calp.

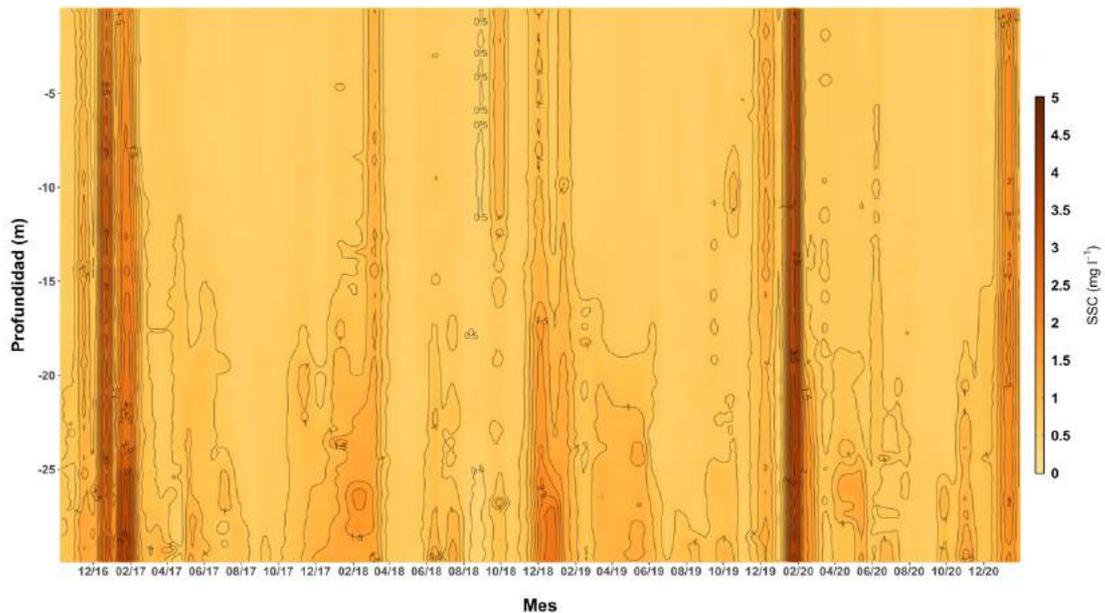


Figura 48: Perfil oceanográfico en la estación a 30 m de profundidad de los valores de turbidez durante el periodo de muestreo en Calp.

3.1.2 Sedimentación

Las trampas de sedimentación (Figura 49) mostraron una tasa de sedimentación en general menor a $20 \text{ g (m}^2\text{)}^{-1} \text{ día}^{-1}$ durante el año, con valores mínimos de 2.2, 2.5 y 5.5 $\text{g (m}^2\text{)}^{-1} \text{ día}^{-1}$ respectivamente para cada una de las trampas C01, C02 y C03 (5, 10 y 15 m de profundidad). Se observaron picos máximos superiores a los $800 \text{ g (m}^2\text{)}^{-1} \text{ día}^{-1}$ y valores de $100 \text{ g (m}^2\text{)}^{-1} \text{ día}^{-1}$, en C01 y C02 durante diciembre de 2016, de marzo a mayo de 2017 y entre marzo y mayo de 2018. Las fuertes tormentas de enero y febrero de 2017 impidieron la recuperación de las trampas de sedimento en estas fechas.

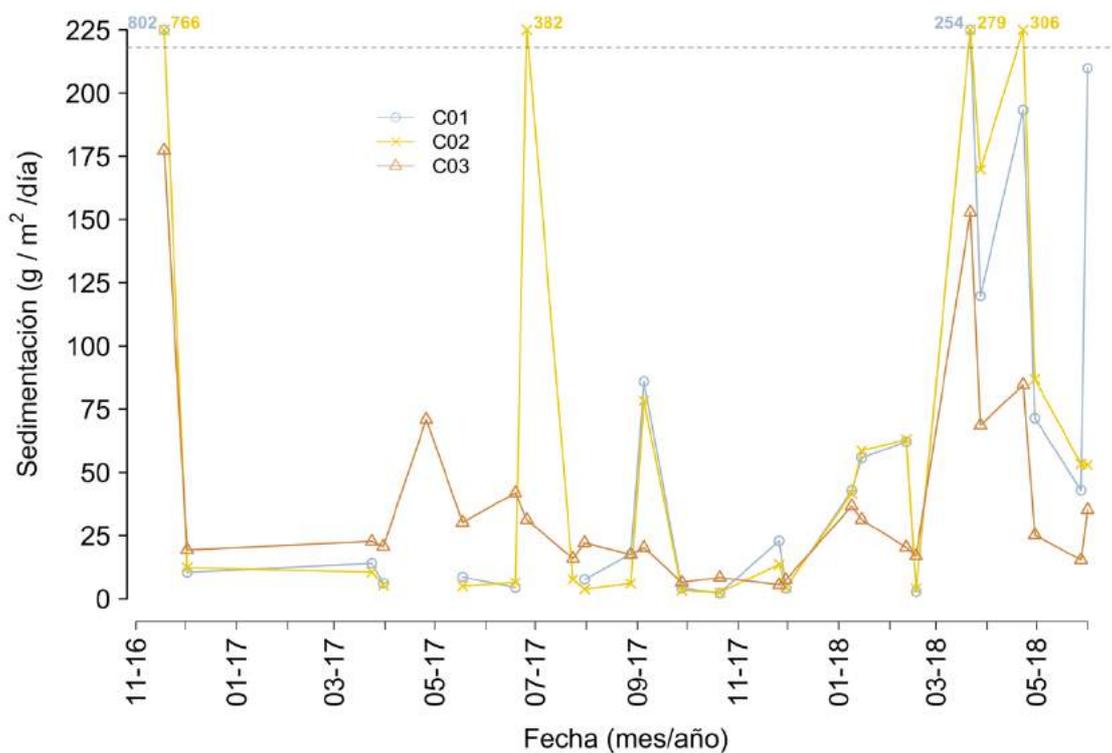
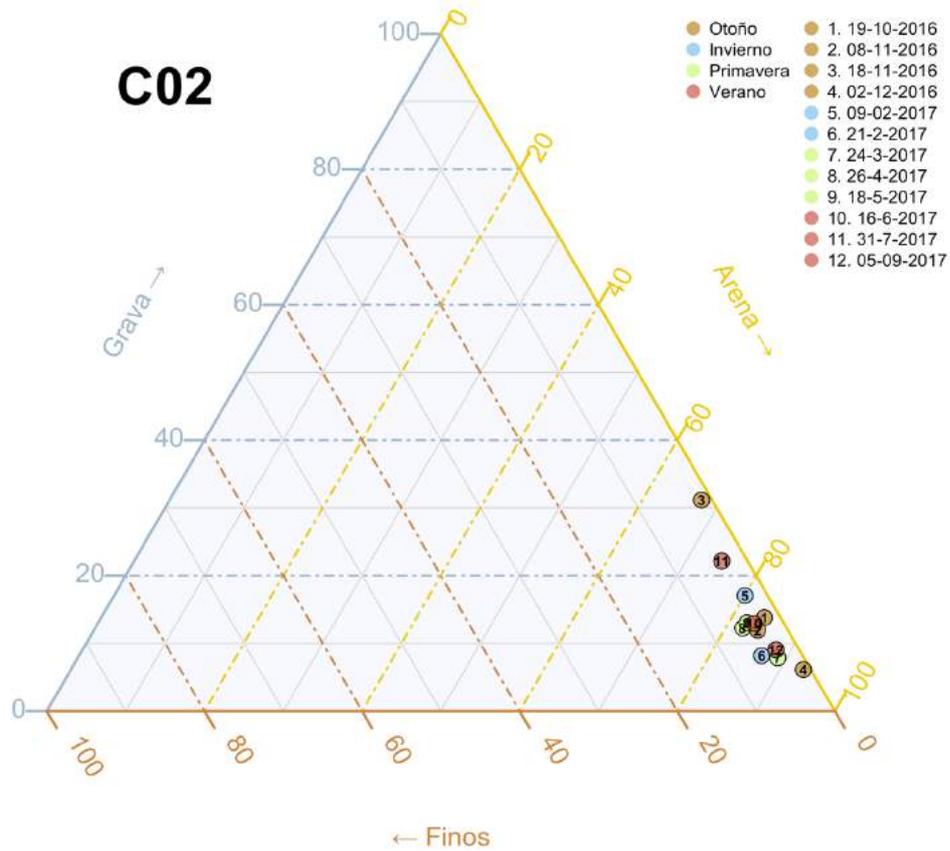
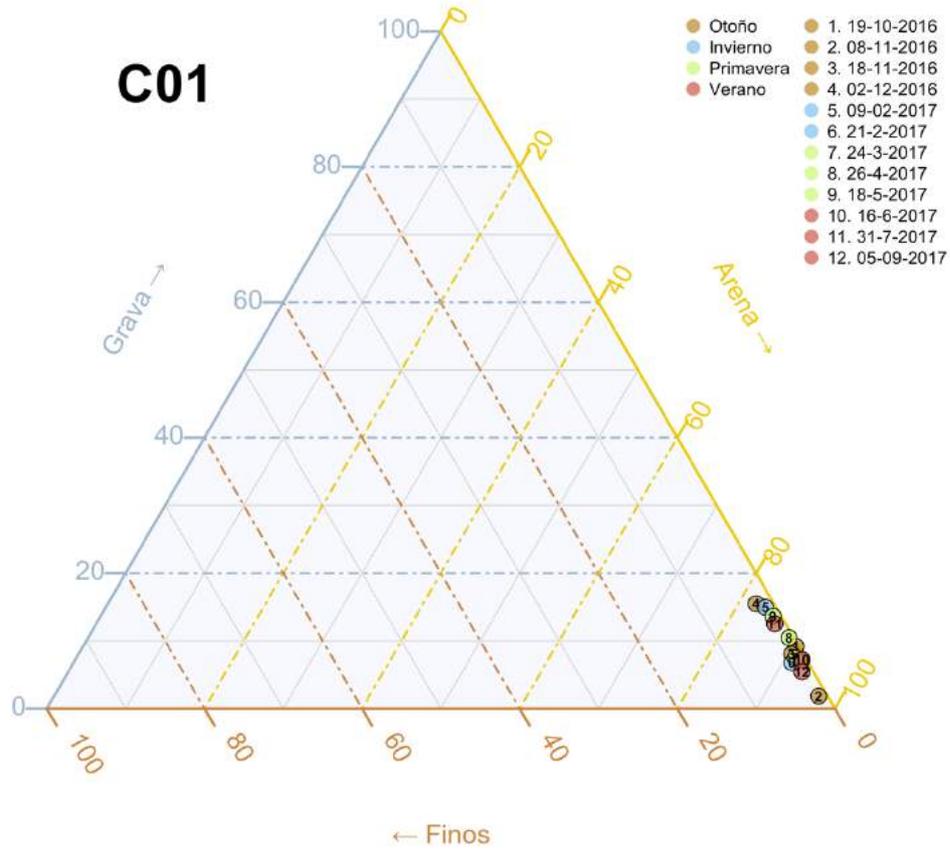


Figura 49: Resultados de sedimentación en $\text{g (m}^2\text{)}^{-1} \text{ día}^{-1}$ para cada una de las estaciones (C01, C02 y C03). Los valores por encima de la línea de puntos ($220 \text{ g (m}^2\text{)}^{-1} \text{ día}^{-1}$) han sido escalados para la representación de la gráfica y el valor real se ha señalado manualmente.

3.1.3 Estudio granulométrico

En análisis de los sedimentos muestra predominancia de la fracción de arenas con poca presencia de gravas y muy poca presencia de finos. La presencia de arena ($< 2 \text{ mm}$ y $> 0.063 \text{ mm}$) fue de al menos el 60% para todas las muestras, superando en la gran mayoría el 80%. La estación C02 (10 m) mostró la mayor variación estacional en el contenido de grava, oscilando entre el 8 y el 32%. Esta tendencia también se percibe, pero en menor medida, en C01 (entre 2 y 18%) y C03 (entre 2 y 10%) (Figura 50).



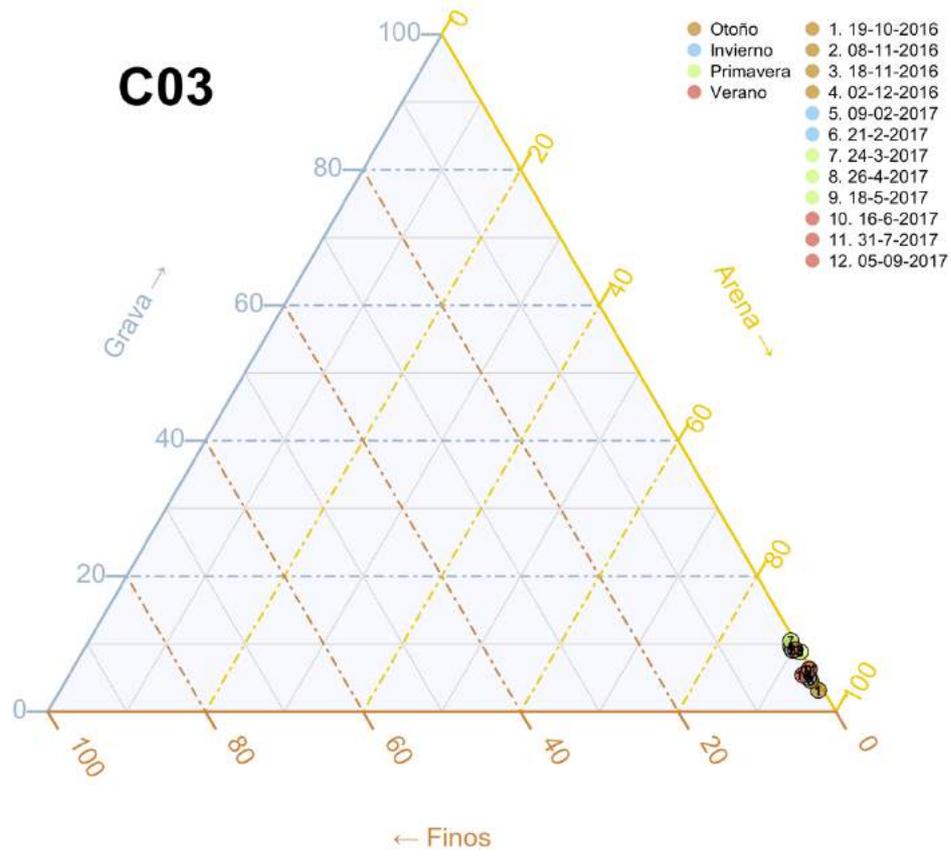


Figura 50: Diagramas granulométricos triangulares para cada una de las localizaciones (C01, C02 y C03).

3.2 *Pinna nobilis*

3.2.1 Actividad de las valvas

3.2.1.1 Cambio del patrón de actividad de las valvas

La aplicación del tratamiento TR (aumento de la temperatura a 25 °C) en los tanques experimentales provocó el cambio de P2 a P1 en los individuos 1B, 2B y 3B (Figura 51A, Tabla 5). Estos individuos cambiaron de P2 a P1 después de 1, 5 y 15 días de que la temperatura alcanzara los 24.5 °C. Sin embargo, el individuo 4B mantuvo P2 durante todo el experimento. Una semana después de que el primer individuo alcanzara P1 en el tanque B, se aplicó TR al tanque A. Puesto que se había obtenido una respuesta clara en tres individuos del tanque B a 24.5 °C, se decidió mantener la temperatura del agua del tanque a 23 °C durante 5 días antes de continuar el experimento (extendiendo el estudio programado en 5 días). Al hacer esto, fue posible verificar si el cambio de patrones se debió a que la temperatura alcanzó un pico de alrededor de 24.5 °C, o a temperaturas cálidas sostenidas ≥ 23 °C. Sin embargo, no se observó ningún cambio de patrón después de los 5 días. En cambio, los individuos 1A, 2A y 3A cambiaron de P2 a P1 2, 3 y 4 días después de que la temperatura alcanzara los 24.5 °C (Figura 51, Tabla 5). Al igual que el individuo 4B, el individuo 4A no cambió de patrón y se mantuvo en P2 durante todo el experimento.

El promedio para cada grupo se realizó solo con los individuos que mostraron ambos patrones (4A y 4B no respondieron al tratamiento y se excluyen de los resultados), además, debe considerarse que para P2 hay 8 individuos y 6 para P1, por lo que solo estos 6 se usaron en ambos casos para calcular el promedio y comparar patrones). Como consecuencia, el total de días con todos los individuos en el mismo patrón para el cálculo de los promedios fue para avA de N = 25 (P1) y N = 41 (P2) y para avB de N = 26 (P1) y N = 15 (P2).

Tabla 5: Resumen cronológico de las fechas de aplicación del tratamiento TR y del momento de cambio del patrón de actividad de valvas en los distintos ejemplares de *Pinna nobilis*.

Fecha (2016)	Tratamiento tanque A	Tratamiento tanque B
15 abril		Aplicación protocolo TR
10 mayo		Condiciones TR alcanzadas
11 mayo		Individuo 1B cambia de P2 a P1
15 mayo		Individuo 2B cambia de P2 a P1
19 mayo	Aplicación protocolo TR (23 °C)	
25 mayo		Individuo 3B cambia de P2 a P1
26 mayo		Aplicación de protocolo inverso
31 mayo	Continuación de TR	
5 junio	Condiciones TR alcanzadas	
7 junio	Individuo 3A cambia de P2 a P1	
8 junio	Individuo 2A cambia de P2 a P1	
9 junio	Individuo 1A cambia de P2 a P1	
19 junio		Protocolo inverso alcanzado
20 junio	Aplicación de protocolo inverso	
5 julio	Protocolo inverso alcanzado	

3.2.1.2 Respuesta al fotoperiodo

Los distintos periodos de luz mostraron un resultado positivo, con todos los individuos en P1 siguiendo la presencia/ausencia de luz con la actividad de sus valvas. La reducción progresiva el periodo de oscuridad a 20/4 h L/D muestra un cambio progresivo en el momento de cierre de las valvas de los individuos en P1 durante las horas de oscuridad (Figura 51A). Los individuos del tanque A no mostraron ningún tipo de respuesta a la luz al contrario que los del B (en P1), manteniéndose en P2 hasta la aplicación de TR (Figura 51B y Figura 51D). Una vez TR fue aplicado a ambos tanques, los individuos 1A, 2A y 3A (Figura 51C) y 1B, 2B, 3B (Figura 51D) mantuvieron sus valvas abiertas durante los eventos de “luna llena” (noches de los días experimentales 28 y 66) y cerraron sus valvas durante las horas de oscuridad, incluso cuando esto ocurrió en mitad del día (de 11:45 a 15:30 del día experimental 59), abriéndolas de nuevo cuando la luz regresaba (Figura 51C).

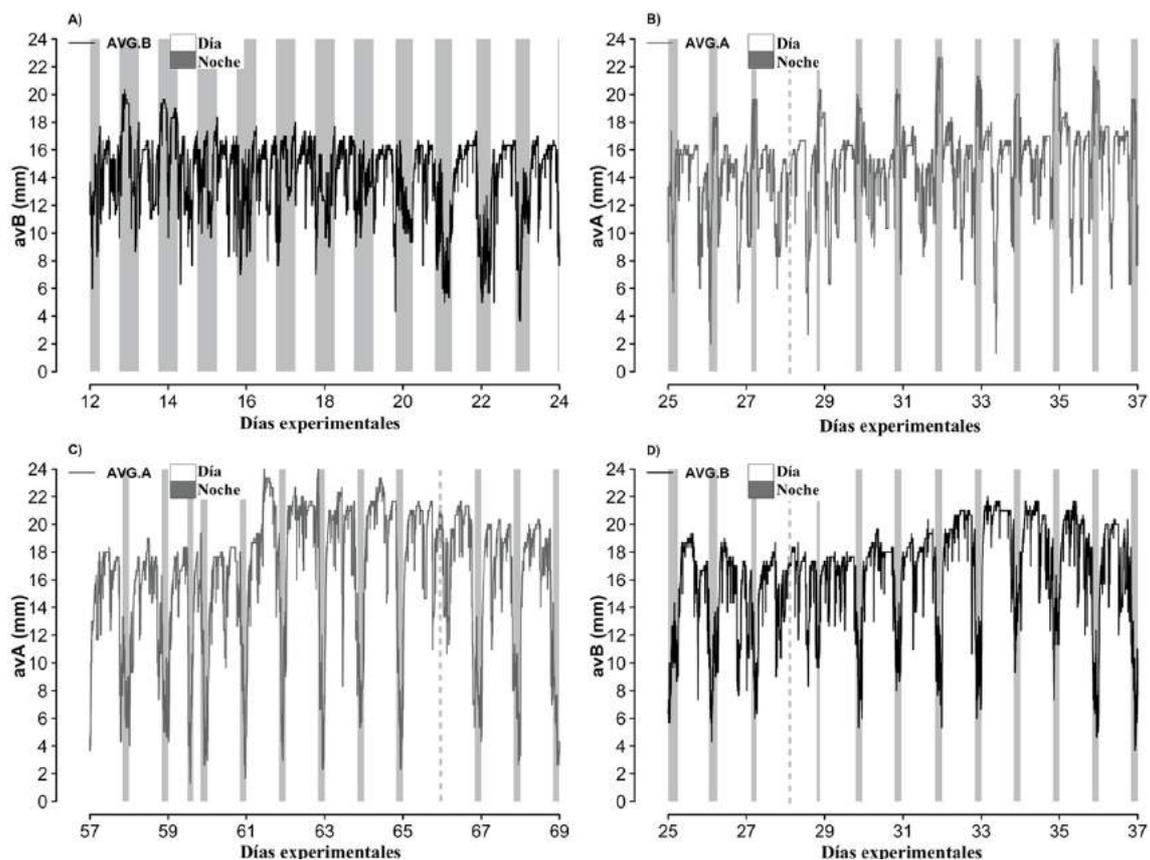


Figura 51: Ejemplos de los datos de actividad de valvas de *Pinna nobilis*. A) Promedio del tanque B (avB) ($n = 3$) durante el cambio de P2 a P1. B) Promedio del tanque A (avA) ($n = 3$), control en P2 durante el mismo período que la Figura 1D. C) avA ($n = 3$) durante P1 mostrando un período de oscuridad repentina en el día experimental 59. D) avB ($n = 3$) durante P1, que muestra un período de luna llena en el día experimental 28. Las líneas punteadas indican el momento en el que un período de oscuridad debería haber ocurrido de acuerdo con los ciclos de luz anteriores. Hay que tener en cuenta que los individuos 4A y 4B no se seleccionaron para calcular los promedios porque no cambiaron de P2 a P1 durante todo el experimento.

Todos los individuos mantuvieron el patrón P1 (excepto los individuos 4A y 4B, que siempre mantuvieron el patrón P2) a pesar de la aplicación del protocolo inverso (reducción de la temperatura del agua a 18 °C a 0.5–1 °C por día) durante un periodo de 10 días.

Los individuos del tanque A y tanque B fueron reimplantados después de 10 y 15 días respectivamente de la aplicación del protocolo inverso, ya que fueron necesarios 5 días para la reimplantación de los individuos del tanque A antes de proceder con los del tanque B. Los individuos del tanque B permanecieron pues 5 días más a 18 °C que los del tanque A, pero mantuvieron igualmente el patrón P1, siguiendo los ciclos de luz.

3.2.1.3 Análisis estadístico

El análisis llevado a cabo mediante FFT reveló picos claros de 23.11 h y 23.15 h para avA y avB respectivamente durante P1. Durante P2, solo se detectó un pico de 5.96 h para avA (Tabla 6 y Figura 52).

Tabla 6: Período dominante en horas (h) obtenido de la Transformada Rápida de Fourier (FFT), período de máxima autocorrelación (acf lag) y coeficiente de autocorrelación (acf) para cada individuo, promedio de todos los individuos en el tanque A (avA) y promedio de todos los individuos en el tanque B (avB).

Patrón	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	4B	avA	avB
FFT (h)										
P2	-	-	5.96*	-	-	-	-	-	5.96*	-
P1	23.11	23.11	23.11	-	23.56	23.53	23.15	-	23.11	23.15
acf lag (h)										
P2	23.89	23.35	18.02	23.97	13.96	24.02	19.52	24	23.98	23.99
P1	23.28	23.96	24.01	-	24.00	23.99	23.86	-	23.97	24.00
acf										
P2	0.38	0.31	0.29	0.29	0.16	0.27	0.18	0.38	0.48	0.28
P1	0.34	0.67	0.66	-	0.54	0.59	0.49	-	0.69	0.66

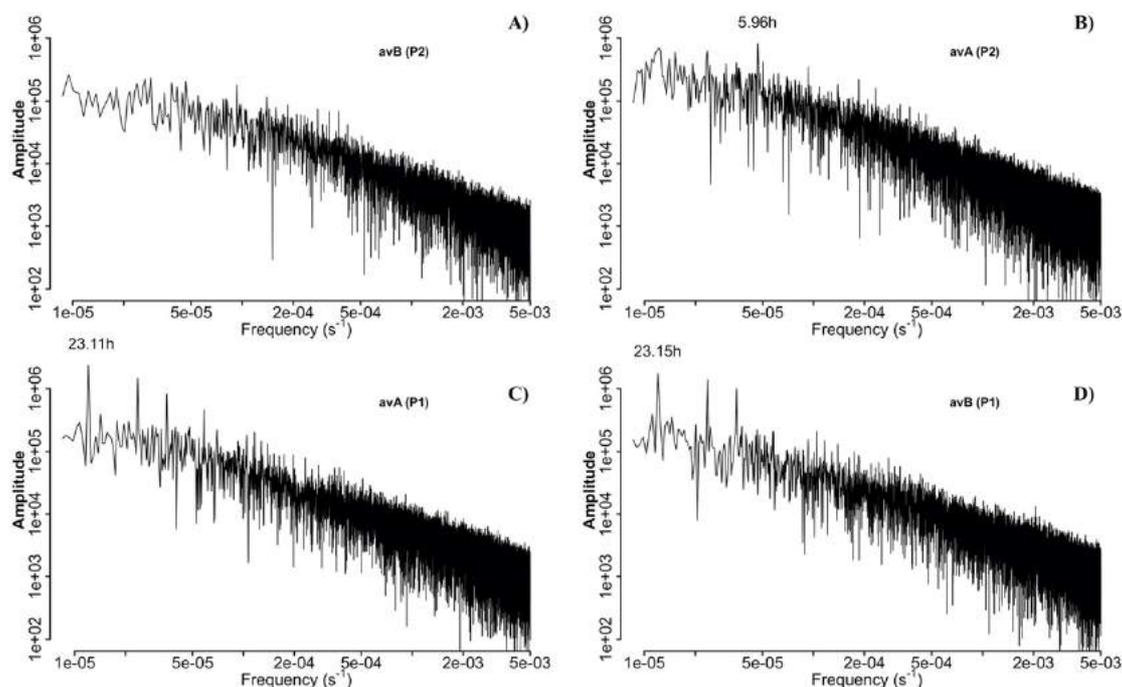


Figura 52: Transformada rápida de Fourier de los datos brutos. A) Promedio del tanque B (avB) ($n = 3$) durante P2. B) Promedio del tanque A (avA) ($n = 3$) durante P2. C) Promedio del tanque A (avA) ($n = 3$) durante P1. D) Promedio del tanque B (avB) ($n = 3$) durante P1. Debe tenerse en cuenta que durante P2 (figuras A y B), no se encuentra la frecuencia de c. 23 h. En B, se observa un pico a las 5.96 h, coincidiendo con el momento de los pulsos de alimentación. Los individuos 4A y 4B no se seleccionaron para calcular los promedios porque no cambiaron de P2 a P1 en todo el experimento.

El coeficiente de autocorrelación para avA y avB fue de 0.69 y 0.66 respectivamente durante P1 (Figura 53C y Figura 53D). Para P2, los coeficientes fueron de 0.28 y 0.48 respectivamente (Figura 53A y Figura 53B). Se observó un pico, también detectado por el FFT, cada 5.96 h para avA durante P2 (Figura 53B). Los coeficientes de autocorrelación de cada individuo fueron mayores durante P1 (Tabla 6) con la excepción del individuo 1A, que mostro valores coeficientes bajos tanto para P1 como P2.

Los coeficientes de CC (*Cross-Correlation*) mostraron una fuerte correlación entre los individuos de cada tanque durante P1, tanto para los datos brutos como para los filtrados. Únicamente la correlación entre los individuos 1B y 3B fue mayor para P2 que P1 (Tabla 7).

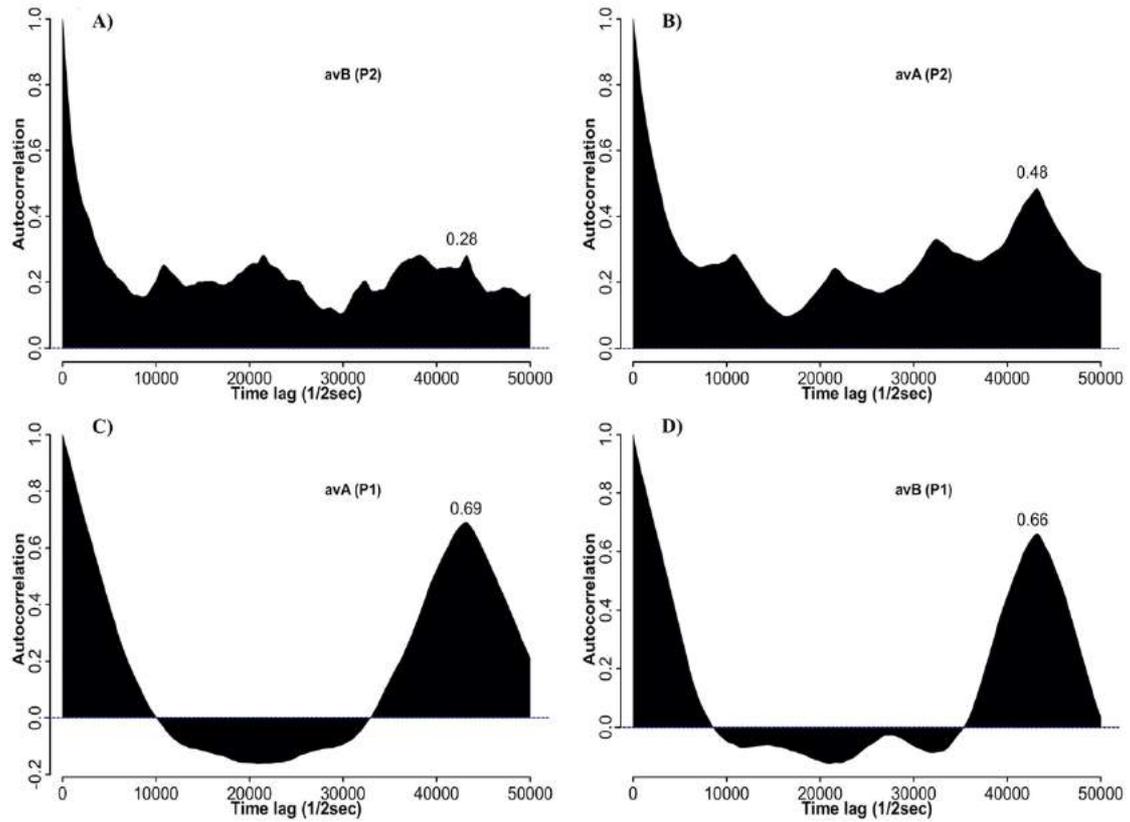


Figura 53: Función de autocorrelación de los datos promediados. A) Promedio del tanque B (avB) ($n = 3$) durante P2. B) Promedio del tanque A (avA) ($n = 3$) durante P2. C) Promedio del tanque A (avA) ($n = 3$) durante P1. D) Promedio del tanque B (avB) ($n = 3$) durante P1. Hay que tener en cuenta que los individuos 4A y 4B no se seleccionaron para calcular los promedios porque no cambiaron de P2 a P1 durante el experimento.

Tabla 7: Coeficiente obtenido de la función de correlación cruzada entre pares de individuos de *Pinna nobilis*.

	Datos brutos	Suavizado	Datos brutos	Suavizado
	P1 / P2	P1 / P2	P1 / P2	P1 / P2
	2A		3A	
1A	0.55 / 0.36	0.68 / 0.39	0.45 / 0.26	0.57 / 0.21
2A	-	-	0.70 / 0.24	0.88 / 0.35
	2B		3B	
1B	0.59 / 0.23	0.73 / 0.37	0.42 / 0.12	0.44 / 0.64
2B	-	-	0.30 / 0.10	0.42 / 0.13

3.2.2 Modelos de crecimiento de *Pinna nobilis*

Los resultados de los parámetros de edad y crecimiento se muestran en la Figura 54, donde se aprecia una notable variabilidad según la procedencia de las conchas. En la Tabla 8 recoge todos los parámetros obtenidos para las distintas poblaciones. La edad máxima observada osciló desde los 6 años en la laguna Embiez a los 38 en Port-Cros. La longitud máxima de concha (Max_Ht) varió entre 44.7 cm en Freus y 79.1 cm en Balearia. En la función de crecimiento de *Von-Bertalanffy*, el parámetro K, la velocidad a la que se alcanza el tamaño asintótico, varió entre 0.15 en Port-Cros y 0.37 en la laguna del Mar Menor, mientras que L_{∞} varió entre 39.5 cm en Olla y 75.0 cm en Alfacs. Los datos para cada población se presentan en la Tabla 8.

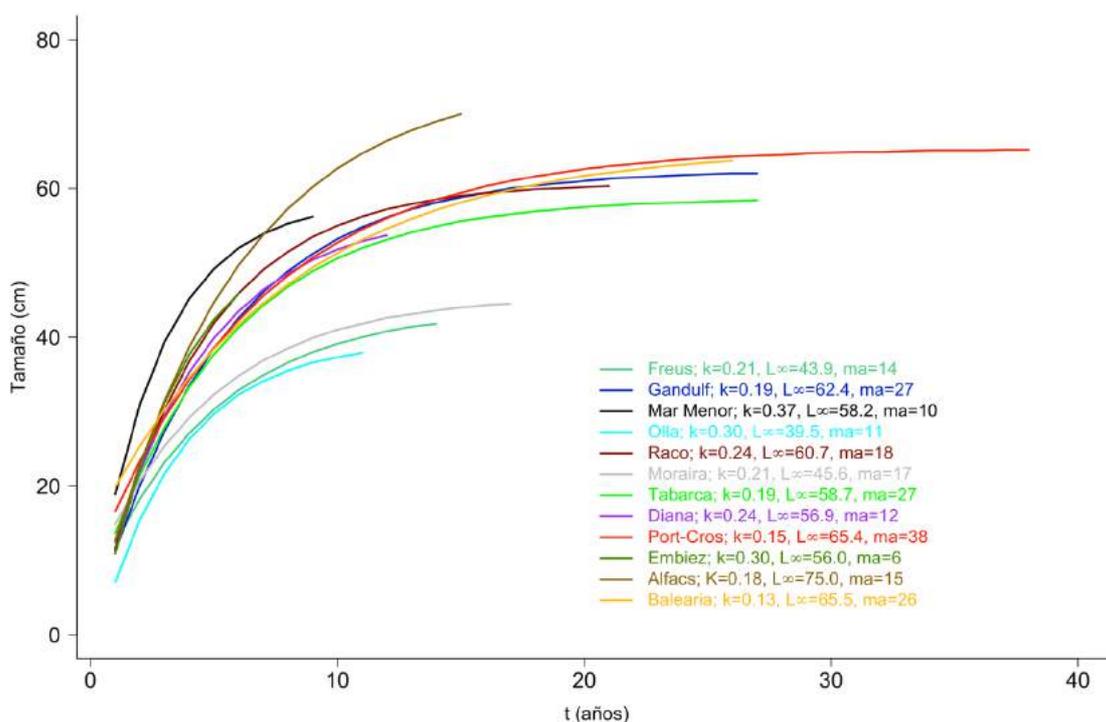


Figura 54: Modelos de crecimiento de las 12 poblaciones de *Pinna nobilis* estudiadas. K, velocidad a la que se alcanza el tamaño asintótico; L_{∞} , tamaño máximo según modelo; ma, edad máxima detectada entre los individuos estudiados en la población.

Tabla 8: Datos para cada población: N (número de conchas); Profundidad (m) (profundidad a la que se recogieron las conchas); Ubicación (mar abierto, laguna o delta); S / E (si el área está protegida (S) o expuesta (E) al hidrodinamismo); P / U (si el área tiene un estado de protección especial (P) o no está protegida (U)); Edad máxima (población de edad máxima detectada); Edad mínima (edad mínima detectada en la población). Max Ht (tamaño máximo individual en la población); Min Ht (tamaño mínimo individual de la población); k (la velocidad a la que se alcanza el tamaño asintótico); k SE error estándar; L_∞ (tamaño teórico máximo de la población); L_∞ SE Error estándar; t0 (el momento en el que un individuo tiene longitud cero. No tiene significado biológico); T0 SE Error estándar; SO (Mar abierto protegido); EO (Mar abierto expuesto); y LG (lagunas).

Población	N	Profundidad (m)	Localización	S/E	P/U	Edad max. (años)	Edad min. (años)	Max Htr (cm)	Min Htr (cm)	k	k SE	L _∞ (cm)	L _∞ SE	t0	t0 SE
Freus	16	5-10	Mar abierto	E	P	14	5	44.7	28.8	0.21	0.02	43.9	1.3	-0.57	0.23
Gandulf	16	5-10	Mar abierto	S	P	27	5	65.6	38.5	0.19	0.01	62.4	1.5	-0.05	0.13
Tabarea	20	5-10	Mar abierto	S	P	27	4	68.8	30.9	0.19	0.01	58.7	1.4	-0.40	0.12
Port-Cros	19	10-25	Mar abierto	S	P	38	3	68.0	29.3	0.15	0.00	65.4	1.9	-0.95	0.12
Olla	19	5-10	Mar abierto	E	P	11	4	51.5	18.7	0.29	0.02	39.9	1.9	0.24	0.13
Mar Menor	17	0-2	Laguna	S	U	9	3	58.0	30.0	0.37	0.04	58.2	2.5	-0.06	0.13
Moraira	21	5-7	Mar abierto	E	U	17	6	49.1	25.6	0.21	0.01	45.6	1.0	-0.88	0.12
Racó	18	5-10	Mar abierto	S	U	21	4	68.2	20.9	0.24	0.01	60.7	1.7	0.12	0.10
Diana	14	0-2	Laguna	S	U	12	3	47.8	26.8	0.24	0.04	56.9	3.9	-0.04	0.21
Le Brusca	8	0-2	Laguna	S	U	6	4	54.3	26.3	0.30	0.05	56.0	4.5	0.28	0.12
Balearia	21	20	Mar abierto	S	U	26	3	79.1	39.0	0.13	0.00	65.5	1.9	-1.78	0.16
Alfaques	20	0-2	Delta	S	U	15	5	59.8	42.8	0.18	0.01	75.0	2.6	-0.03	0.16
SO	113									0.17	0.00	63.1	0.8	-0.67	0.06
EO	56									0.23	0.01	43.0	0.8	-0.47	0.09
LG	36									0.30	0.03	56.5	2.3	-0.05	0.11

El análisis multivariante reveló 4 grupos dentro de las poblaciones estudiadas con un 95% de similitud (Figura 55): 1) Mar abierto protegido –SO– (Gandulf, Racó, Tabarca, Balearia y Port-Cros); 2) Mar abierto expuesto –EO– (Olla, Moraira y Freus); 3) Lagunas –LG– (Embiez, Diana y Mar Menor), localizado en lagunas marinas costeras; y 4) Alfacs, localizado en un delta.

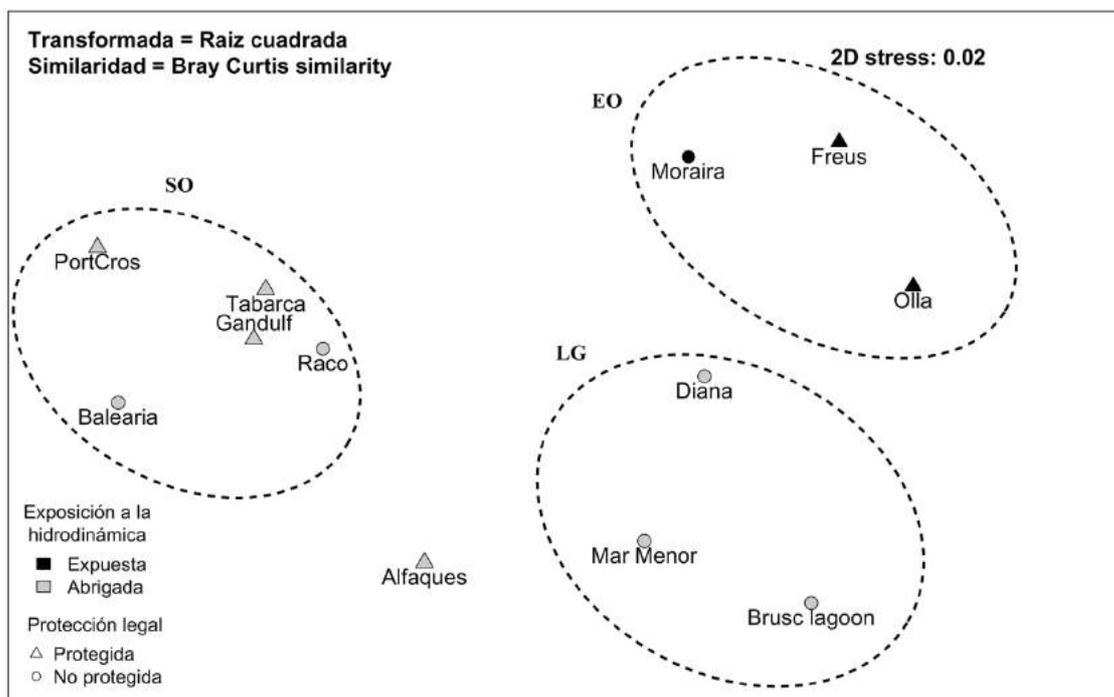


Figura 55: Gráfica bidimensional de MDS para las 12 poblaciones de *Pinna nobilis* estudiadas en función del grado de exposición al hidrodinamismo y la protección legal del área, basada en la raíz cuadrada transformada y la similitud de Bray Curtis de edad máxima, Max_Ht , L_{∞} y K . Los grupos se basan en un 95% de similitud: SO: Protegido Mar abierto, EO: Mar abierto expuesto y LG: Lagunas.

A excepción del grupo Alfacs, que incluía sólo una población, se calculó el modelo general para los grupos identificados por el análisis multivariante (SO, EO y LG; Figura 56 y Tabla 8): SO (N = 113) con $K = 0.17$ y $L_{\infty} = 63.1$ cm (ec. (1)); LG (N = 39) con $K = 0.30$ y $l = 56.5$ cm (ec. (2)); y EO (N = 56) con $K = 0.23$ y $L_{\infty} = 43.0$ cm (ec. (3)). Los residuales estandarizados en relación con el tamaño para cada uno de los grupos no mostraron tendencias relevantes y pocos valores atípicos; la mayoría de los datos se encontraron dentro de 2 desviaciones estándar de la media (SO = 94.1%, EO = 95.3%, LG = 94.8% y Alfacs = 92.62%), lo que indica un buen ajuste de los modelos Figura 57.

$$SO: \quad L_t = 63.1 \cdot (1 - e^{-0.17 \cdot (t+0.67)}) \quad (1)$$

$$LG: \quad L_t = 56.5 \cdot (1 - e^{-0.30 \cdot (t+0.05)}) \quad (2)$$

$$EO: \quad L_t = 43.0 \cdot (1 - e^{-0.23 \cdot (t+0.47)}) \quad (3)$$

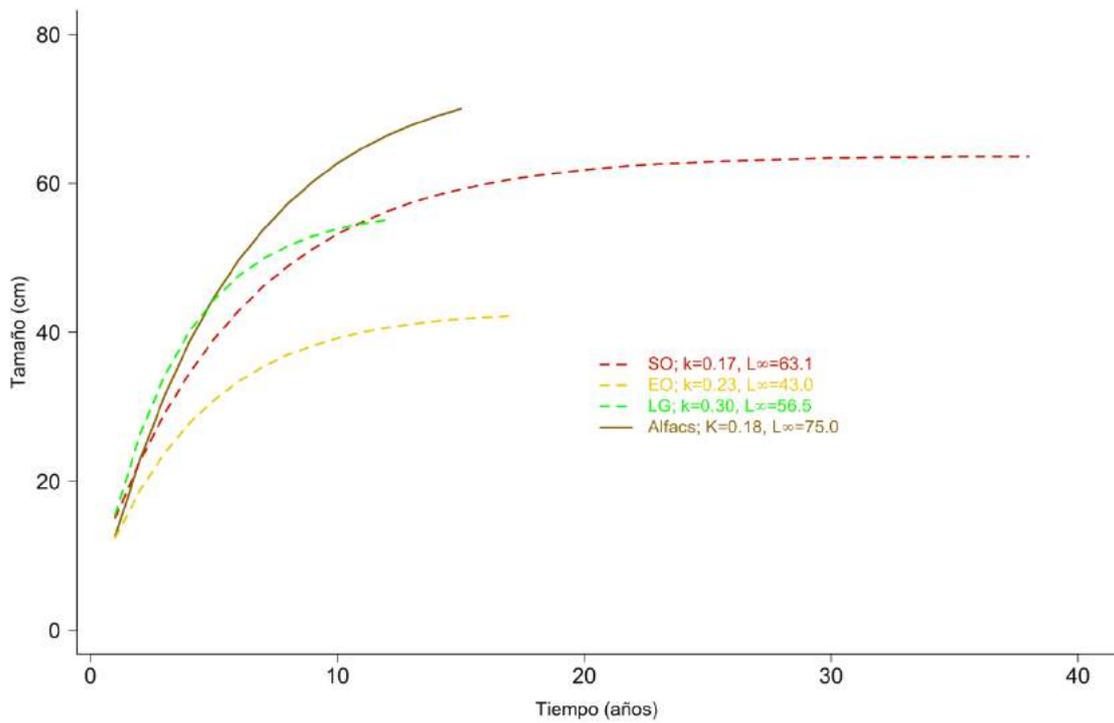


Figura 56: Modelos de crecimiento general para las tres agrupaciones en función de los resultados del análisis multivariante (Mar abierto protegido –SO–; Mar abierto expuesto –EO–; Laguna –LG–; Alfacs, única población que habita un delta).

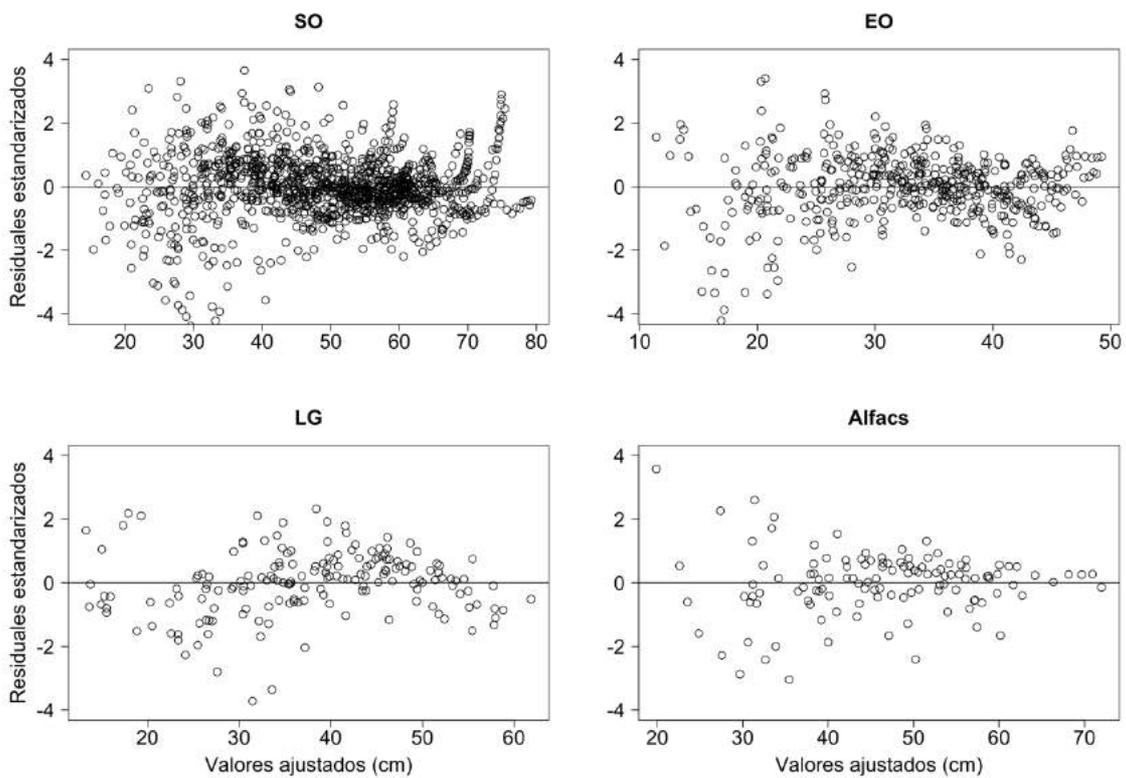


Figura 57: Residuales estandarizados en relación al tamaño para cada uno de los grupos resultantes del análisis multivariante.

El p-valor de dos colas para los resultados de la prueba Z -test (Tabla 9) muestra diferencias significativas en L_∞ entre SO-EO, SO-Alfacs, SO-Mor, EO-LG, EO-Alfacs, EO-Mor, LG-Alfacs y Alfacs-Mor y diferencias significativas en K entre SO-EO, SO-LG, EO-Alfacs, EO-Mor, LG-Alfacs y LG-Mor.

El HDS de Tukey encontró diferencias significativas entre los grupos a lo largo de los años (edad teórica de las nacras estimada por los modelos). EO muestra diferencias significativas con todos los grupos en todos los años excepto con Alfacs a la edad de 2 años. LG muestra diferencias significativas con SO en todos los años, y SO y Alfacs muestran diferencias significativas entre las edades de 5 a 10 años. Los resultados del análisis HDS de Tukey se encuentran en la Tabla 10.

Tabla 9: Resultados de la prueba Z para la comparación de los valores de L_∞ y k entre los grupos establecidos por análisis multivariante y Mor, la población estudiada por García-March *et al.* (2011a) en Moraira.

	L_∞				
	SO	EO	LG	Alfacs	Mor
SO		***	0.017	***	***
EO	0		***	***	***
LG				***	0.765
Alfacs					***
	k				
	SO	EO	LG	Alfacs	Mor
SO		***	***	0.5	0.146
EO			0.016	**	***
LG				***	***
Alfacs					0.244

***p-valor < 0.001; **p-valor < 0.01; *p-valor < 0.05.

Tabla 10: Resultados de la prueba de diferencias *HDS* de Tukey entre grupos. A partir de los 7 años, no hubo datos suficientes de LG para la comparación (solo se pudieron comparar SO, EO y Alfacs), y desde los 11 años en adelante no hubo datos suficientes para Alfacs (solo se pudieron comparar SO y EO).

	2 años				7 años			
	SO	EO	LG	Alfacs	SO	EO	LG	Alfacs
SO		**	*	0.936		***	—	***
EO			***	0.161			—	***
LG				0.906				—
	3 años				8 años			
	SO	EO	LG	Alfacs	SO	EO	LG	Alfacs
SO		***	***	0.463		***	—	***
EO			***	***			—	***
LG				0.085				—
	4 años				9 años			
	SO	EO	LG	Alfacs	SO	EO	LG	Alfacs
SO		***	***	0.072		***	—	***
EO			***	***			—	*
LG				0.398				—
	5 años				10 años			
	SO	EO	LG	Alfacs	SO	EO	LG	Alfacs
SO		***	***	**		***	—	0.078
EO			***	***			—	***
LG				0.775				—
	6 años				11 años			
	SO	EO	LG	Alfacs	SO	EO	LG	Alfacs
SO		***	***	***		***	—	—
EO			***	***			—	—
LG				0.977				—

***p-valor < 0.001; **p-valor < 0.01; *p-valor < 0.05.

3.2.3 Evento de mortandad en *Pinna nobilis*

3.2.3.1 Seguimiento del evento de mortandad

La tabla suplementaria 2 (anexo I) muestra los individuos vivos encontrados en las estaciones monitorizadas desde octubre de 2016 a septiembre de 2018. La extinción se extendió hacia el Norte y hacia el Este desde el Sureste de la península ibérica, mostrando picos de mortalidad en los meses más cálidos. Debe considerarse que la periodicidad del muestreo fue variable entre ubicaciones y, en algún caso, no fue posible realizar campañas de muestreo durante los meses más calurosos debido a la presión turística. Se observaron varios puntos críticos, como la propagación al noreste de España (Castellón y Cataluña) a finales de 2017, el inicio de la mortalidad en Francia a mediados de 2018 y el inicio de la mortalidad en el delta del Ebro en el verano de 2018, pero restringida a las estaciones más cercanas al mar abierto. En las Islas Columbretes y Baleares, fue posible realizar censos en poblaciones profundas hasta 45 m. En todas las estaciones monitorizadas donde se habían observado especímenes adultos con anterioridad al evento de mortalidad, sólo se encontraron conchas vacías de individuos muertos (equivalente a 0% de supervivencia). Desafortunadamente, en muchas localizaciones no se dispuso de información sobre el estado de las poblaciones más profundas y cuya situación en la actualidad sigue siendo desconocida, aunque las pocas observaciones comunicadas por ciencia ciudadana han sido siempre de valvas vacías a estas profundidades. En septiembre de 2018, sólo se encontraron vivas 6 nacras en zona de aguas abiertas en toda la costa mediterránea española. Excluyendo las poblaciones del interior del delta del Ebro y laguna del Mar Menor, así como 2 individuos de las Islas Columbretes y 4 individuos de las Islas Baleares, todos los datos arrojaron como resultado la identificación de un 0% de individuos vivos.

3.2.3.2 Importancia de la temperatura en la supervivencia

La Figura 58 muestra los datos de supervivencia y temperatura de las diferentes estaciones durante su seguimiento. En Portlligat, la mortalidad se observó por primera vez en abril de 2018, cuando la temperatura subió a 14 °C desde el mínimo invernal de 12.3 °C observado en marzo de 2018 (ver tabla suplementaria 2 del anexo I). A partir de ese momento, la curva de supervivencia mostró una pendiente muy negativa, con una mortalidad del 100% a los 5 meses de la última observación sin mortalidad. En cuanto a las nacras del Oceanogràfic, donde la temperatura en los tanques se mantuvo constante

en 17 °C, la mortalidad siguió una tendencia similar a la de Portlligat (pendiente muy negativa con mortalidad total a los 5 meses de la última observación sin mortalidad). Por el contrario, en IFAPA, IEO e IMEDMAR-UCV, donde la temperatura del agua se redujo por debajo de 14 °C, hubo un cambio en la pendiente de la curva de supervivencia después de reducir la temperatura del agua, manteniendo individuos vivos en las tres localidades en septiembre de 2018. La supervivencia fue menor en las estaciones donde la temperatura del agua se mantuvo por encima de los 15 °C durante más tiempo (es decir, IEO - IMEDMAR - IFAPA en orden creciente de supervivencia y orden decreciente de temperatura); en IFAPA, donde la temperatura del agua se mantuvo a 15 °C o menos la mayor parte del tiempo, la supervivencia fue la más alta.

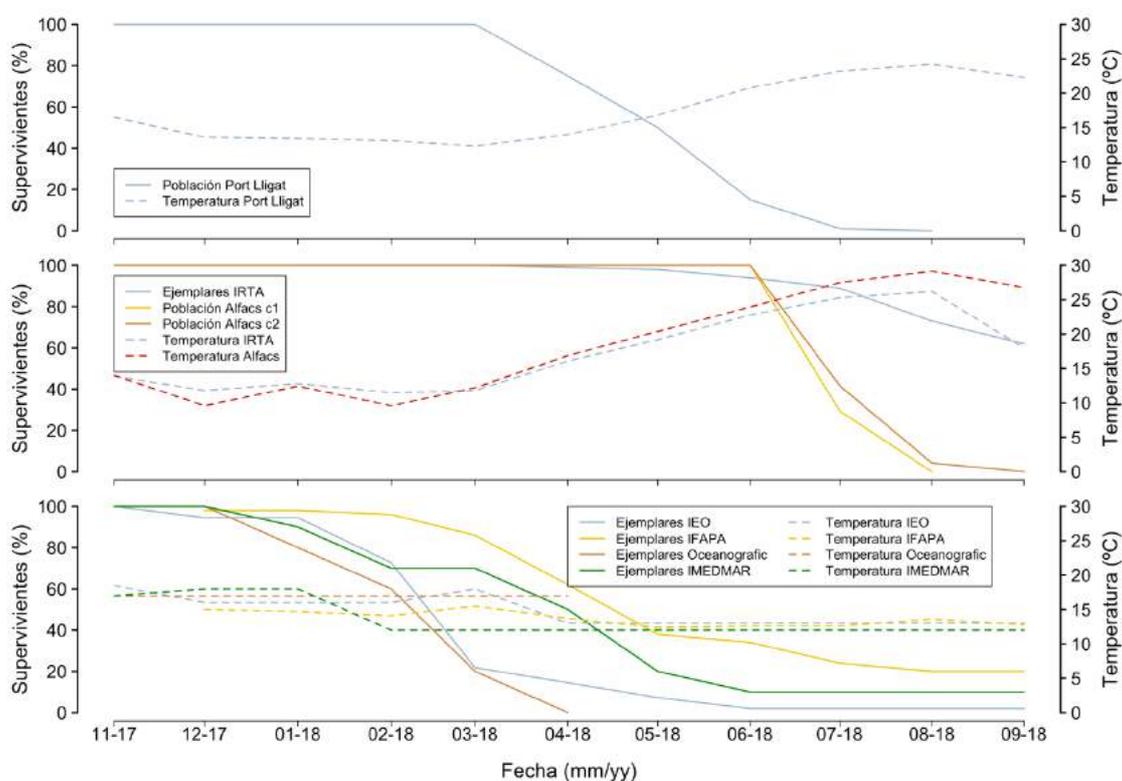


Figura 58: Curvas de supervivencia y temperatura del agua en Portlligat (arriba), delta del Ebro e IRTA (medio), y los tanques en IEO, IFAPA, Oceanogràfic e IMEDMAR-UCV (abajo). Las líneas continuas representan la supervivencia de ejemplares, la línea discontinua del mismo color representa la temperatura para esa población o grupo de ejemplares, con la excepción de “Temperatura Alfacs”, que es la temperatura *in situ* para ambas poblaciones de Alfacs (c1 y c2). La temperatura del agua en Portlligat corresponde a la estación de monitorización más cercana ubicada en aguas abiertas de Estartit (una milla de las islas Medas). Portlligat es una pequeña bahía cerrada y la temperatura del agua registrada *in situ* durante el programa de rescate realizado en noviembre de 2017 fue todos los días inferior a 13° C. Por lo tanto, la temperatura del agua registrada en Estartit fue más alta que la temperatura del agua observada directamente en Portlligat en noviembre de 2017.

3.2.3.3 Reclutamiento y colectores de larvas

Entre cientos de juveniles de *Pinna rudis* provenientes de los cabos de la estructura de la piscifactoría de Vilajoiosa (Alicante) se identificaron 51 juveniles de *P. nobilis*. Cabe mencionar que esos juveniles fueron encontrados gracias a la colaboración ciudadana. En septiembre de 2018, se encontraron otros 30 juveniles de nacra en Calp (Alicante), estos individuos se hallaron unidos a una de las jaulas de exclusión diseñadas para proteger de los depredadores a juveniles de *P. rudis* que habían sido reclutados la temporada anterior. La jaula se encontraba suspendida a una profundidad de 15 m. Los juveniles, trasladados a las instalaciones del IMEDMAR-UCV, sólo crecieron unos milímetros en los tanques y murieron. El periodo más largo con vida en el acuario para estos ejemplares no superó los 6 meses. De los 30 individuos recolectados en septiembre de 2018 en Calp, 29 se colocaron en las mismas jaulas donde se alojaban los juveniles de *P. rudis* y 1 se mantuvo en los tanques. En noviembre de 2018, estos 29 ejemplares colocados en las jaulas en el mar estaban muertos (los ejemplares de *P. rudis* situados en la misma jaula permanecieron vivos), y el individuo mantenido en acuario aún estaba vivo, pero sin mostrar señales de crecimiento. Se analizaron 30 muestras de juveniles de *P. nobilis* muertos de los tanques para detectar la presencia de *Haplosporidium pinnae* mediante prueba PCR específica (Catanese *et al.*, 2018). Los resultados fueron positivos para 25 ejemplares, si bien la calidad del ADN de los 5 restantes fue deficiente y, por lo tanto, proporcionó resultados poco fiables. No se encontraron juveniles de *P. nobilis* en ningún otro lugar que no fueran los colectores, los cabos de la piscifactoría, o las jaulas.

3.2.3.4 Rescate de individuos

3.2.3.4.1 Ejemplares de la Marina Real de Valencia

Los 8 individuos recogidos en la Marina real de Valencia sobrevivieron al transporte, manteniéndose una temperatura entre 17 y 20 °C. De los 8 ejemplares alojados en el IMEDMAR-UCV, uno murió en mayo de 2017, otros dos en julio de 2017 y los 5 restantes en agosto de 2017, 7 meses después de la recolección. Todos los individuos que murieron mostraron síntomas de estar afectados por el parásito: retracción del manto, falta de respuesta a los estímulos y ausencia de crecimiento. Las muestras de tejido de estos individuos dieron positivo a la presencia de *Haplosporidium pinnae*, si bien en ese tiempo, no se conocía aún la especie causante de la enfermedad. 8 individuos fueron mantenidos en el Acuario Oceanográfico de Valencia. El primer individuo que murió de

este contingente fue en abril de 2017, dos en mayo y otro en agosto de ese mismo año. Las muestras de estos individuos también fueron positivas para la presencia de *H. pinnae*. En agosto de 2017, los cuatro individuos restantes que se encontraban en un mismo tanque empezaron a mostrar algún síntoma de posible infección como la leve retracción del manto, si bien este síntoma se revirtió a los pocos días extendiendo de nuevo el manto, llegando a sobrevivir durante 18 meses más, hasta agosto de 2018 cuando murieron todos al mismo tiempo. El seguimiento constante de estos ejemplares permitió observar que uno de los individuos cerró la concha en julio de 2018, permaneciendo así hasta agosto de 2018, momento en el que abrió la concha, retrayendo el manto y muriendo a los pocos días. Los otros tres individuos también retrajeron el manto, abrieron la concha y murieron en pocos días durante agosto de 2018. Las muestras recolectadas después de la muerte dieron positivo a la infección por el parásito.

3.2.3.4.2 Ejemplares de Portlligat (Girona) y bahía dels Alfacs (Tarragona)

Todos los individuos procedentes de Portlligat (Girona) y de la bahía dels Alfacs (Tarragona) sobrevivieron al transporte hasta los centros donde se instalaron. Sólo un ejemplar de Portlligat, transportado al IFAPA en Agua del Pino (Huelva), el viaje más largo (1270 km), mostró signos de estrés a su llegada al centro de acogida. A los dos días de su llegada, esta nacra había retraído su manto y abierto la parte ventral de la concha. Al no observarse ningún tipo de respuesta mecánica y para confirmar la presencia o no del parásito, el ejemplar fue sacrificado por los técnicos del IFAPA. El análisis de los tejidos confirmó que estaba infectado por el parásito, convirtiéndose en la primera evidencia de que la población de donantes de Portlligat ya estaba infectada cuando se llevó a cabo el rescate en noviembre de 2017. Por el contrario, 25 individuos aleatorios de los 100 recolectados en la bahía dels Alfacs que se encontraban en las instalaciones del IRTA en Tarragona, fueron sometidos a biopsias de manto, por los técnicos del IRTA, cuyo resultado reveló que todos ellos fueron negativos para el parásito, demostrando que esta población estaba libre de *Haplosporidium pinnae* en el momento del rescate. Durante el período noviembre 2017–enero 2018, la temperatura del agua se mantuvo en 11.8 °C en el IRTA, 15 °C en IFAPA, 16 °C en IEOMurcia, 17 °C en el Oceanogràfic y 18 °C en IMEDMAR-UCV. En febrero-marzo, la temperatura del agua se elevó a 18 °C en IEOMurcia, se redujo a 12 °C en IMEDMAR-UCV y se mantuvo a 11.8 °C en IRTA y 15.5 °C en IFAPA. A partir de abril de 2018, las temperaturas se mantuvieron por debajo

de los 14 °C en todos los tanques excepto en los del IRTA y el Oceanogràfic (16 °C y 17 °C respectivamente). La temperatura del agua en las instalaciones del IRTA aumentó en los meses siguientes de forma similar a las temperaturas del agua del delta del Ebro, alcanzando un máximo de 26.2 °C en agosto de 2018 (tabla suplementaria 1 del anexo I y Figura 58). En enero de 2018, dos meses después del rescate, murieron otros 11 individuos de Portlligat (Figura 58). En abril de 2018, 63 ejemplares de Portlligat murieron (Figura 58). En julio de 2018 habían muerto 81 individuos de Portlligat y 6 del delta del Ebro, y en septiembre de 2018 seguían con vida 12 nacras de Portlligat y 62 del delta del Ebro (tabla suplementaria 2 del anexo I). Para diciembre de 2018 solo 4 ejemplares provenientes de Portlligat quedaban con vida. A finales de enero y ante el buen estado de las 4 nacras, se comenzó a aumentar paulatinamente la temperatura y la alimentación, sin embargo, entre la última semana de mayo y las dos primeras de abril fueron muriendo a pesar de la reducción de nuevo de la temperatura por debajo de 13 °C una vez se habían detectado de nuevo los síntomas. Las pruebas PCR realizadas a los ejemplares muertos procedentes de Portlligat fueron positivas para la presencia del parásito *Haplosporidium pinnae*, sin embargo, dieron negativas para los ejemplares muertos procedentes del delta del Ebro. Por el contrario, estos individuos del delta del Ebro resultaron positivos para la infección bacteriana por *Vibrio mediterranei* (Prado et al., 2020).

3.2.3.5 Jaulas de exclusión de depredadores

De los 35 ejemplares aislados en jaulas en Portlligat (Girona), en junio de 2018, 10 ejemplares fueron encontrados muertos. Estas jaulas se aprovecharon para la introducción de los únicos 5 individuos que se encontraron vivos en los alrededores del lugar donde se instalaron las jaulas el mes anterior. En julio de 2018, sólo 7 individuos permanecían vivos en el interior de las jaulas y no se observaron más individuos vivos alrededor de las estaciones de monitorización. En agosto de 2018, todos los individuos de las jaulas estaban muertos, al igual que los localizados fuera de las mismas. Los muestreos realizados en los meses siguientes confirmaron la ausencia de individuos vivos en Portlligat.

3.2.4 Influencia de la temperatura en la filtración y el consumo de oxígeno de *Pinna nobilis*

3.2.4.1 Datos biométricos

El tamaño medio de los 8 ejemplares utilizados en el experimento fue de 29.4 ± 2.2 cm y 12.0 ± 1.0 cm de largo y ancho de concha. La media estimada de peso seco fue de 5.7 ± 1.0 g. Los datos biométricos de cada individuo se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Datos biométricos para cada ejemplar de *Pinna nobilis*.

Individuo	Longitud (cm)	Ancho (cm)	DW* (g)
1	29.30	11.45	5.62
2	32.20	13.20	7.09
3	31.40	12.00	6.67
4	31.10	12.40	6.51
5	29.40	11.30	5.66
6	26.50	12.00	4.38
7	26.20	10.40	4.26
8	29.10	13.20	5.52

*Peso seco estimado obtenido usando la regresión talla-peso seco disponible para *Pinna rudis* (apartado “2.3.1.4. Relación morfométrica y análisis estadístico”).

3.2.4.2 Mediciones fisiológicas

La tasa de aclaramiento media (CR: $l\ g^{-1}\ h^{-1}$) de las nacras aumentó significativamente con el aumento de la temperatura del agua (Figura 59). En el rango de temperatura fría la CR media varía notablemente de $0.55 \pm 0.27\ l\ h^{-1}\ g^{-1}$ a $8.5\ ^\circ C$ a $4.27 \pm 1.36\ l\ h^{-1}\ g^{-1}$ a $14\ ^\circ C$, con un Q_{10} para este intervalo de temperaturas de 56.59 ± 47.37 (Tabla 12). En el rango de temperaturas intermedias ($14 - 18 - 23\ ^\circ C$) la tasa de aclaramiento aumentó hasta $5.68 \pm 1.88\ l\ h^{-1}\ g^{-1}$ a $18\ ^\circ C$ y hasta $7.86 \pm 2.64\ l\ h^{-1}\ g^{-1}$ a $23\ ^\circ C$ (Q_{10} aproximadamente de 2 para este rango de temperaturas, Tabla 12). La sensibilidad térmica de la tasa de aclaramiento aumentó significativamente a temperaturas cálidas: de 23 a $28\ ^\circ C$, la CR incrementó de $7.86 \pm 2.64\ l\ h^{-1}\ g^{-1}$ a $14.55 \pm 4.14\ l\ h^{-1}\ g^{-1}$ ($Q_{10} = 6.03 \pm 6.45$, Tabla 12).

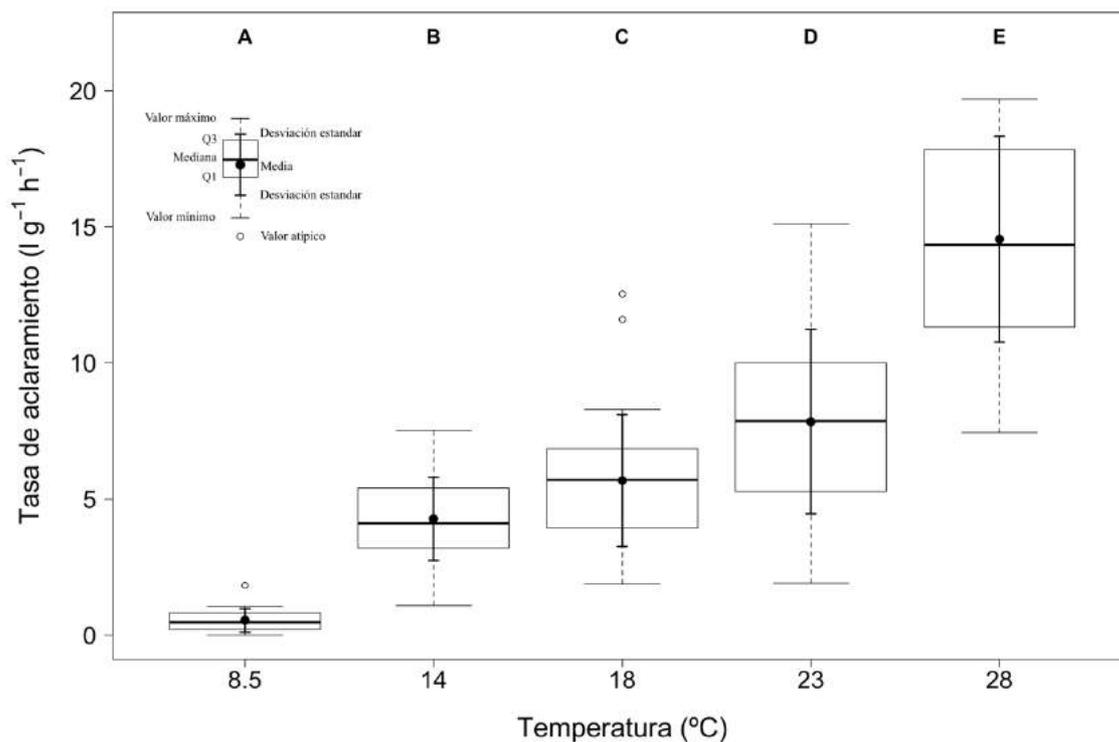


Figura 59: Tasa de aclaramiento específica (CR: $l\ h^{-1}\ g^{-1}$) de los ejemplares de *Pinna nobilis* ($n = 8$) en función de la temperatura del agua. Las letras A - E representan grupos estadísticamente diferentes.

Los valores medios del consumo de oxígeno (VO_2 : $mgO_2\ g^{-1}\ h^{-1}$) se han representado en una función de la temperatura en la Figura 60. En el rango de temperatura fría (8.5 a 14 °C) el VO_2 mostró una dependencia térmica elevada, con un $Q_{10} = 6.60 \pm 2.45$ (Tabla 12), pasando de 0.26 ± 0.06 a $0.70 \pm 0.11\ mgO_2\ g^{-1}\ h^{-1}$. En temperaturas intermedias (14 – 18 – 23 °C) el VO_2 aumentó a $0.85 \pm 0.16\ mgO_2\ g^{-1}\ h^{-1}$ a 18 °C y a $1.10 \pm 0.26\ mgO_2\ g^{-1}\ h^{-1}$ a 23 °C, mostrando una dependencia térmica menor, con un Q_{10} aproximado de 1.7 (Tabla 12). Al contrario que en el resto de temperaturas, en el rango de 23 a 28 °C no hubo diferencias significativas del VO_2 , con valores de $1.10 \pm 0.26\ mgO_2\ g^{-1}\ h^{-1}$ a 23 °C y $1.25 \pm 0.08\ mgO_2\ g^{-1}\ h^{-1}$ a 28 °C.

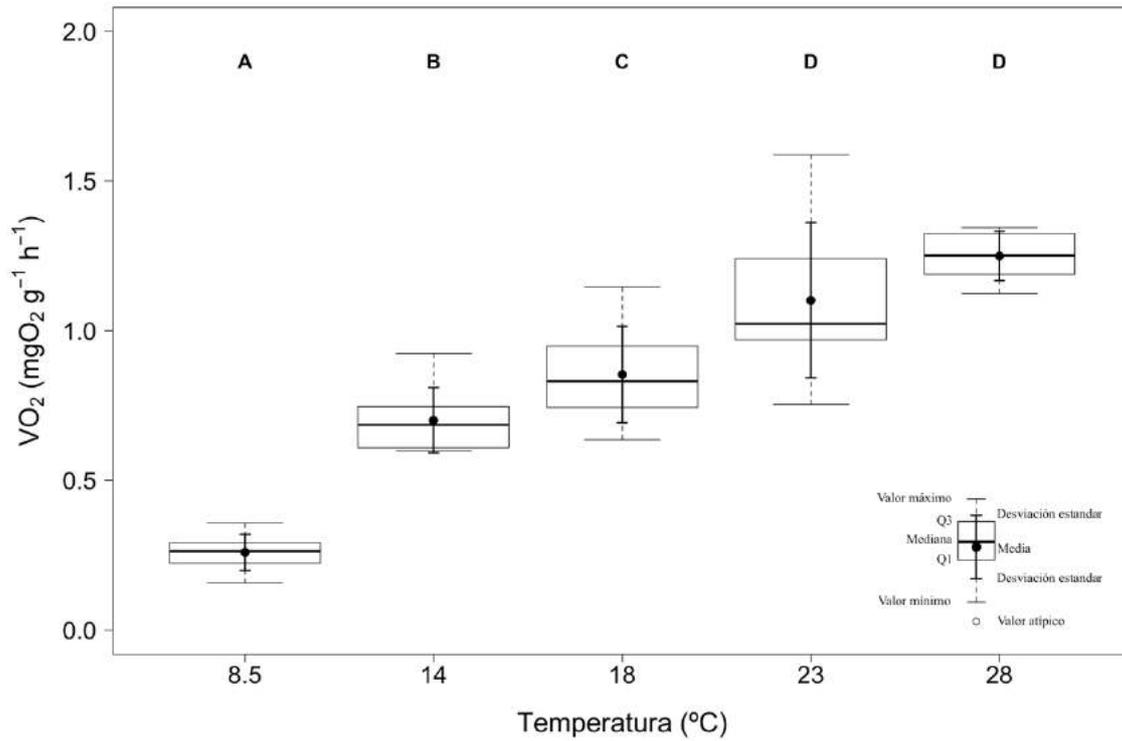


Figura 60: Consumo de oxígeno (VO_2 : $mgO_2 h^{-1} g^{-1}$) de los ejemplares de *Pinna nobilis* ($n = 8$) en función de la temperatura del agua. Las letras A - D representan grupos estadísticamente diferentes.

Tabla 12: Resultados del coeficiente Q_{10} para las mediciones fisiológicas de la tasa de aclaramiento (CR) y el consumo de oxígeno (VO_2).

Temperaturas °C	Q_{10}	
	CR	VO_2
8.5 — 14	56.59 ± 47.37	6.60 ± 2.45
14 — 18	2.68 ± 1.66	1.67 ± 0.45
18 — 23	2.20 ± 1.02	1.72 ± 0.56
23 — 28	6.03 ± 6.45	$1.45 \pm 0.60^*$

*No se detectaron diferencias significativas en el consumo de oxígeno entre los 23 y los 28 °C, por lo tanto el Q_{10} para este rango de temperaturas podría ser considerado como 1.

La ratio entre de CR y VO_2 se ilustra en la Figura 61. Mientras que en las temperaturas intermedias la relación CR/VO_2 mantuvo valores constantes en torno a 6.5, la ratio disminuyó a 2.1 y aumentó a 11.9 en, respectivamente, la temperatura más fría y la más cálida.

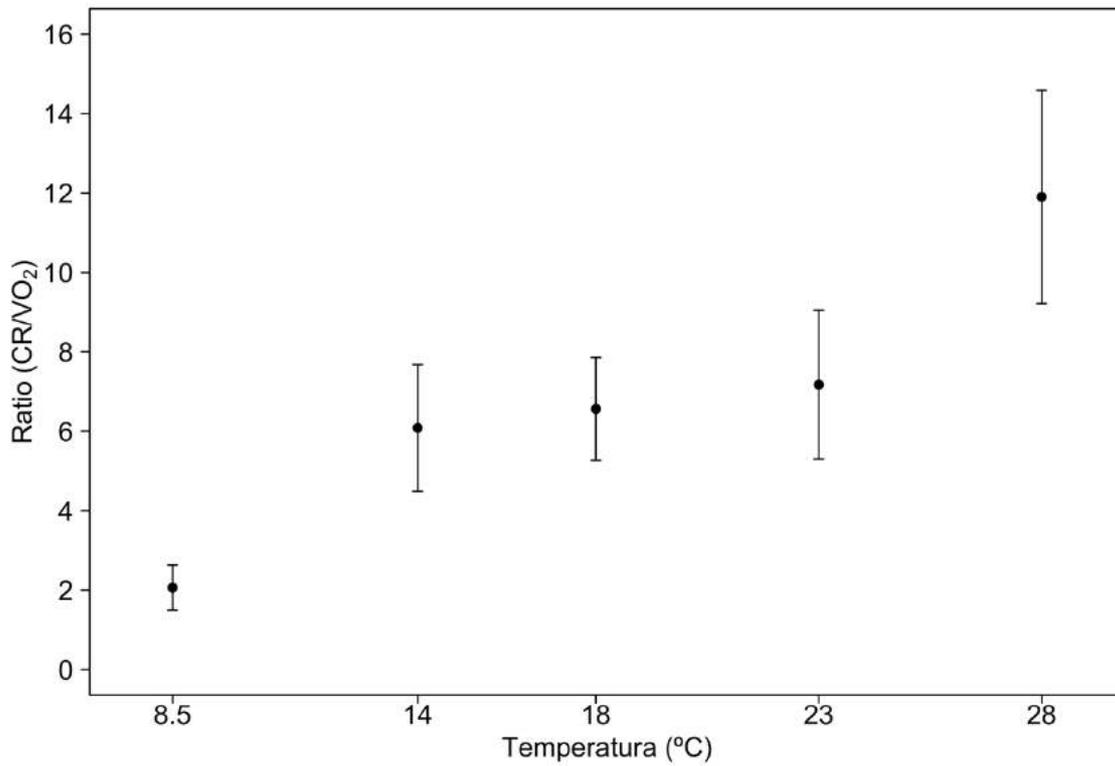


Figura 61: Ratio $CR/VO_2 \pm SD$ para las diferentes temperaturas experimentales.

3.3 *Pinna rudis* como modelo de aspectos biológicos de la familia Pinnidae

3.3.1 Crecimiento de *Pinna rudis*

En febrero de 2018 se contabilizaron un total de 635 ejemplares juveniles de *Pinna* spp. (70 ± 34 individuos en cada cabo) en los cabos de sujeción analizados en las instalaciones de acuicultura de la Vila Joiosa (Alicante). El 94.6% de los individuos fueron identificados como *Pinna rudis* y el 5.4% como *P. nobilis*. En este momento, los individuos mostraron un tamaño medio de longitud de 34.9 ± 6.2 mm ($N = 39$). Cuatro meses después (junio de 2018), fueron recogidos los 80 ejemplares para el experimento en jaulas de mar abierto, siendo en ese momento el tamaño medio de los ejemplares 48.6 ± 8.8 mm de largo y 27.98 ± 5.7 mm de ancho. Después del primer año en las jaulas experimentales, los individuos del grupo 1 alcanzaron un tamaño de 215.2 ± 17.2 mm de largo y 134.0 ± 14.4 mm de ancho, y al final del experimento (758 días) mostraron un tamaño de 279.0 ± 16.9 mm de largo y 163.2 ± 13.1 mm de ancho (Tabla 13).

Se registró un 0% de mortalidad natural en los ejemplares del grupo 1 y 2. Sin embargo, la jaula 4 desapareció a los 15 meses junto con los cabos y bloques de hormigón, sin ningún indicio de las causas (Figura 62).

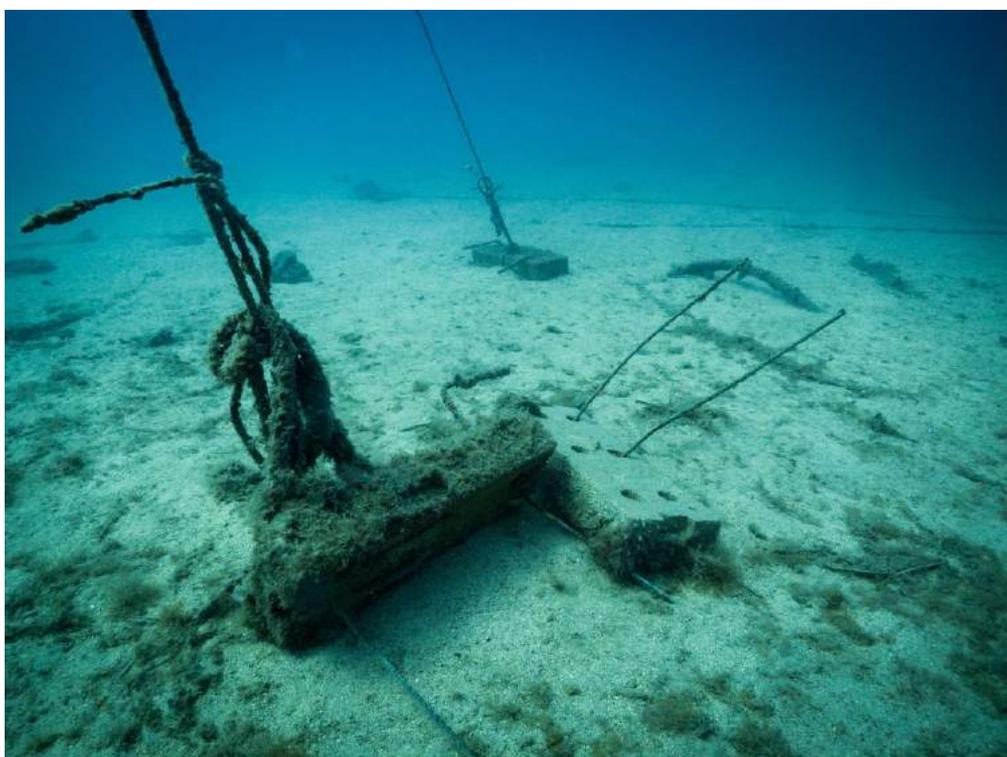


Figura 62: Fotografía del estado de los bloques de hormigón usados como soporte de las cajas después de la desaparición de la jaula 4. Se puede apreciar cómo dos de los bloques de las jaulas restantes habían sido arrancados y arrastrados por el fondo. Foto: fuente propia.

Tabla 13: Datos de largo y ancho de los ejemplares del grupo 1 para cada medición.

Fecha	N	Longitud media (mm)	Ancho medio (mm)
2018-06-29	40	48.64 ± 8.84	27.88 ± 5.72
2018-07-25	40	69.46 ± 8.46	41.78 ± 6.02
2018-08-29	40	93.53 ± 10.49	57.86 ± 9.40
2018-10-04	40	118.16 ± 12.07	72.68 ± 9.74
2018-11-08	40	143.64 ± 14.72	88.65 ± 12.11
2018-12-05	40	156.00 ± 13.92	98.43 ± 11.71
2018-12-27	40	163.93 ± 15.35	106.78 ± 11.84
2019-02-05	40	173.18 ± 17.10	109.49 ± 13.28
2019-03-04	40	181.80 ± 17.41	111.71 ± 12.79
2019-04-04	40	188.63 ± 17.64	118.88 ± 13.89
2019-04-30	40	192.20 ± 17.44	121.68 ± 13.98
2019-06-03	40	202.43 ± 17.23	125.45 ± 14.73
2019-07-05	40	215.23 ± 17.15	134.03 ± 14.42
2019-07-25	40	219.98 ± 16.78	135.50 ± 14.96
2019-08-28	40	227.43 ± 17.39	135.65 ± 14.79
2019-09-26	30	231.87 ± 17.68	137.20 ± 15.42
2019-10-30	30	239.57 ± 16.80	139.77 ± 13.52
2019-12-10	30	248.37 ± 16.95	144.67 ± 12.31
2020-01-09	30	250.60 ± 16.02	145.47 ± 12.59
2020-02-04	30	251.40 ± 15.40	145.67 ± 12.29
2020-02-28	30	255.30 ± 15.64	147.93 ± 12.07
2020-04-27	30	264.33 ± 16.61	156.67 ± 14.23
2020-05-26	30	275.77 ± 16.75	160.60 ± 14.54
2020-06-29	30	276.93 ± 16.42	162.03 ± 13.34
2020-07-27	30	278.97 ± 16.91	163.17 ± 13.09

El crecimiento máximo registrado para un sólo juvenil (individuo A1.2) fue de 34.3 mm el 7 de julio de 2018, durante un período de 26 días (1.32 mm d^{-1}). Para un periodo de un año, el crecimiento máximo detectado para un individuo (A1.1) fue de 209.0 mm de longitud (0.57 mm d^{-1}). Los datos de crecimiento medio de longitud (mm d^{-1}) se encuentran en la Figura 63.

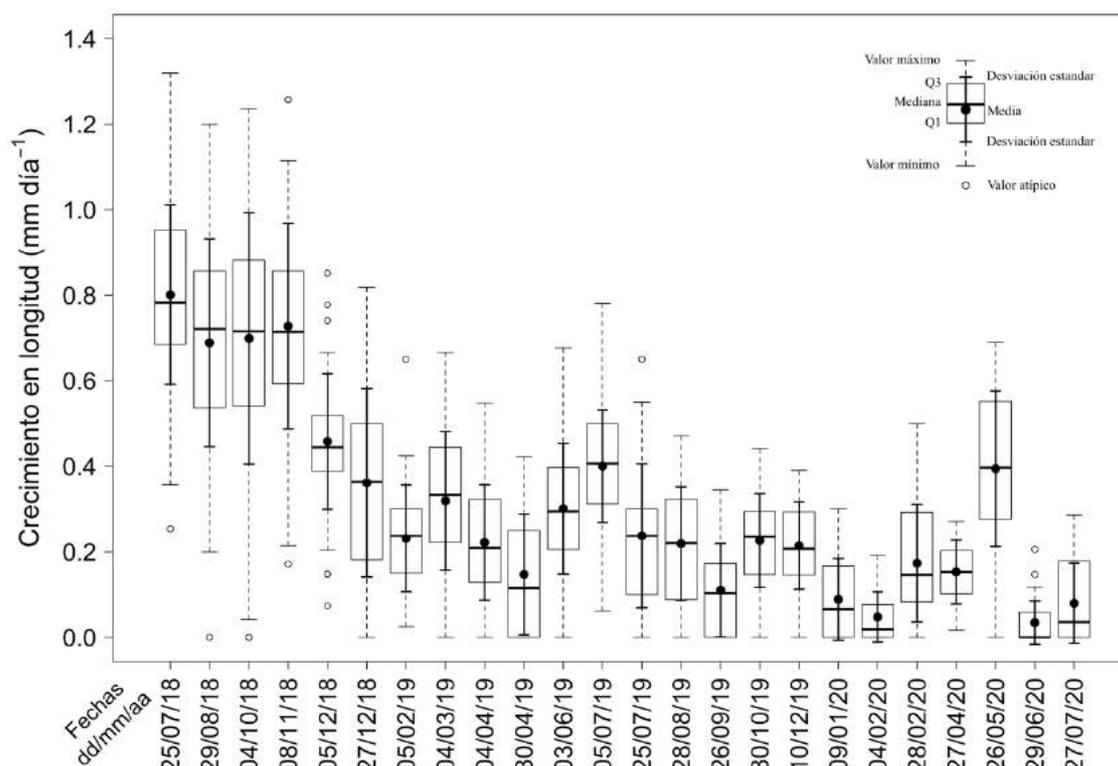


Figura 63: Crecimiento medio de la longitud (mm día^{-1}) para cada período de medición. Los valores atípicos se consideran valores superiores al Q_3 o inferiores a Q_1 en 1.5 veces el rango intercuartílico.

Se encontró una correlación positiva entre longitud-ancho ($R = 0.94$, $p\text{-valor} < 0.001$) y longitud-DW ($R = 0.97$, $p\text{-valor} < 0.001$) mediante regresión lineal (Figura 64 y Figura 65). El modelo de crecimiento mostró un L_∞ de 29.06 cm, un K de 1.16 y un t_0 de -0.18. Los resultados estandarizados revelaron que el 94.56% de los datos se encontraban dentro de 2 desviaciones estándar de la media.

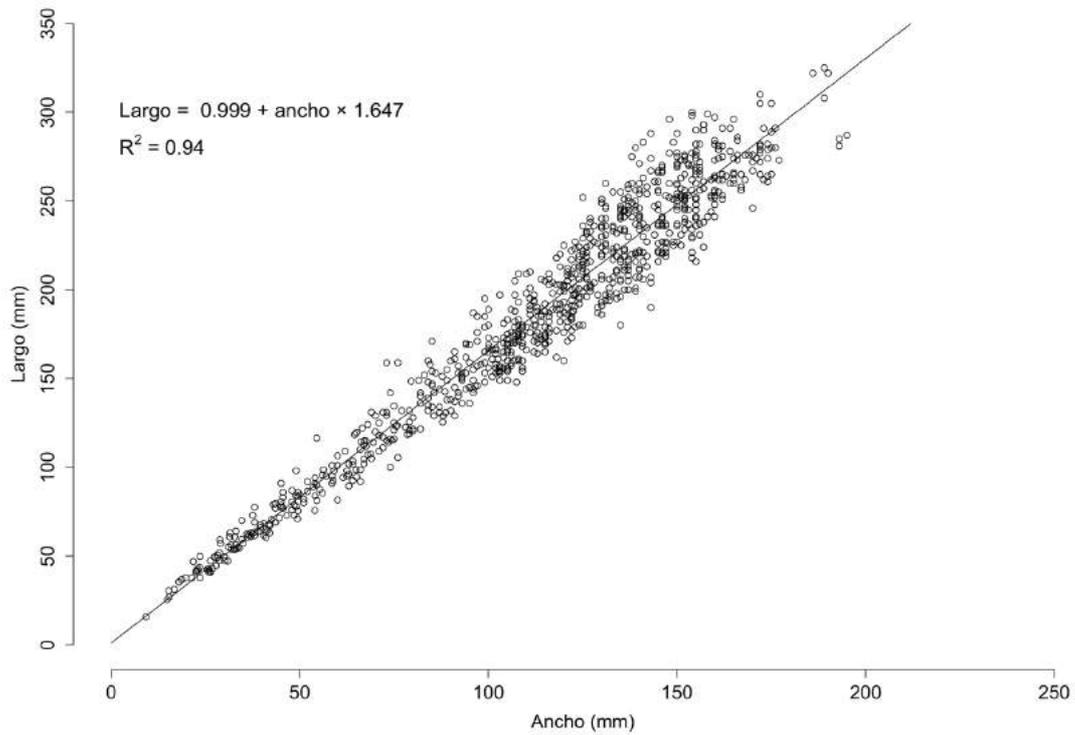


Figura 64: Relación lineal largo-ancho con la ecuación y el R^2 .

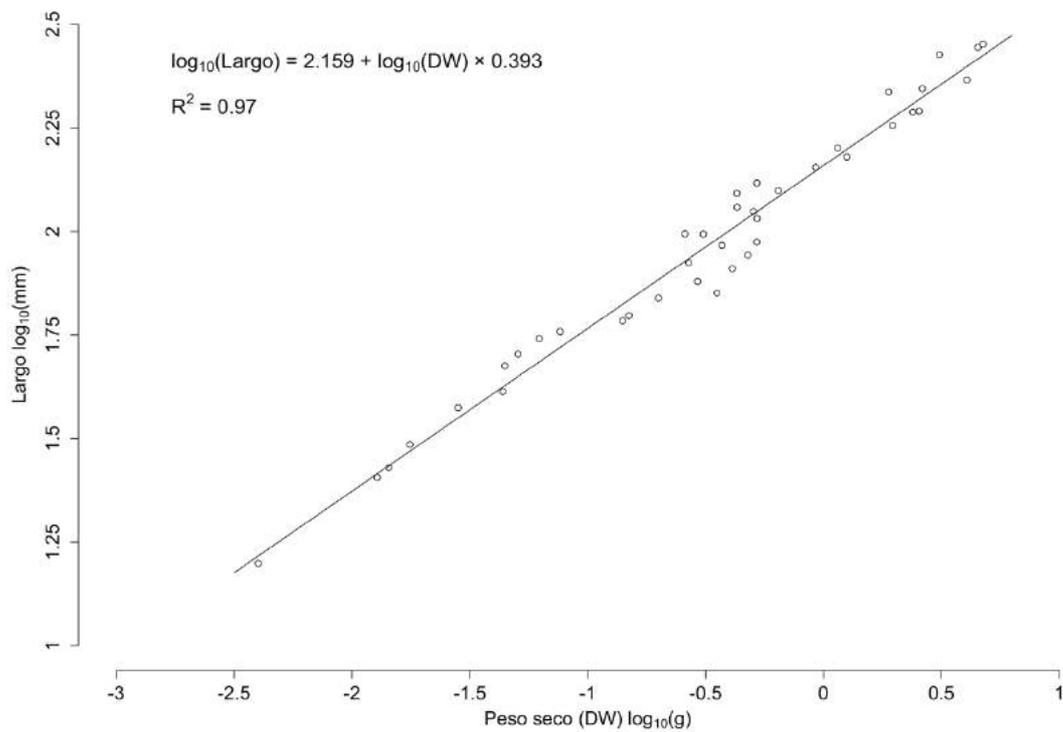


Figura 65: Relación lineal talla-peso (transformada logarítmica) con la ecuación y el R^2 .

Los datos de crecimiento con la tendencia separada (serie de datos de crecimiento original, tendencia de la serie y crecimiento estacional) se presentan en la Figura 66A. El crecimiento estacional mostró una correlación significativa con la temperatura (0.67, p-valor < 0.001), clorofila *a* (-0.56, p-valor < 0.01) y OD (-0.58, p-valor < 0.01) y ninguna correlación con la turbidez y la salinidad (p-valor > 0.05). Los datos de crecimiento estacional, temperatura, clorofila *a* y OD se muestran en la Figura 66B.

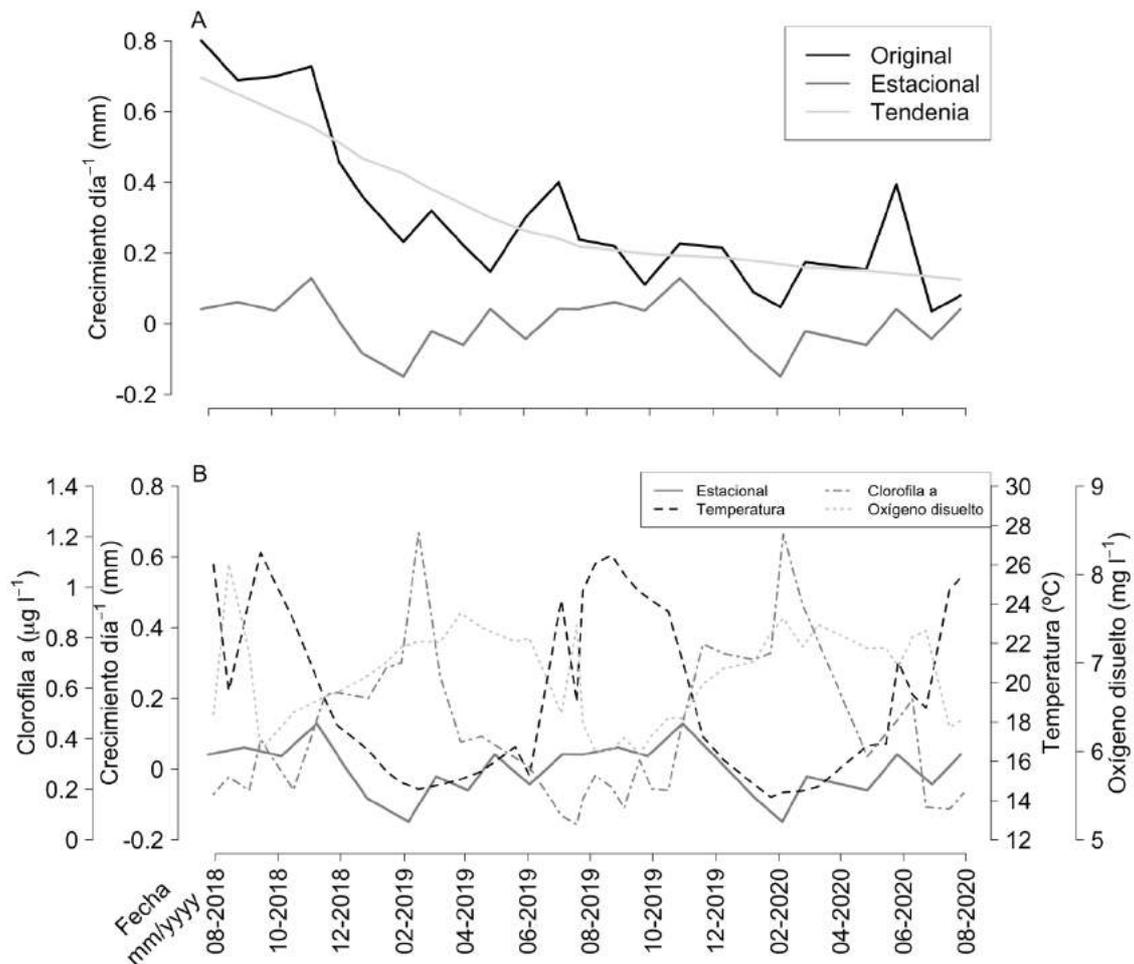


Figura 66: A) Crecimiento de longitud (mm d⁻¹) sin tendencia (dato original, tendencia de los datos y dato estacional). B) Datos sin la tendencia (crecimiento estacional) en mm d⁻¹ con temperatura, oxígeno disuelto y clorofila *a*.

3.3.2 Fisiología energética de *Pinna rudis*

3.3.2.1 Colocación de los ejemplares en los tanques

Como se puede observar en la Figura 67, las pruebas preliminares para evaluar el efecto de la posición de los ejemplares (horizontal/vertical) en los tanques en relación a las determinaciones fisiológicas mostraron que la posición del animal no afectó al aclaramiento de microalgas (*t-test*, $p\text{-valor} > 0.05$). De acuerdo con este resultado, las determinaciones fisiológicas descritas a continuación se obtuvieron de animales dispuestos en horizontal con la excepción del consumo de oxígeno, que se realizó en cámaras selladas con los individuos dispuestos en posición vertical.

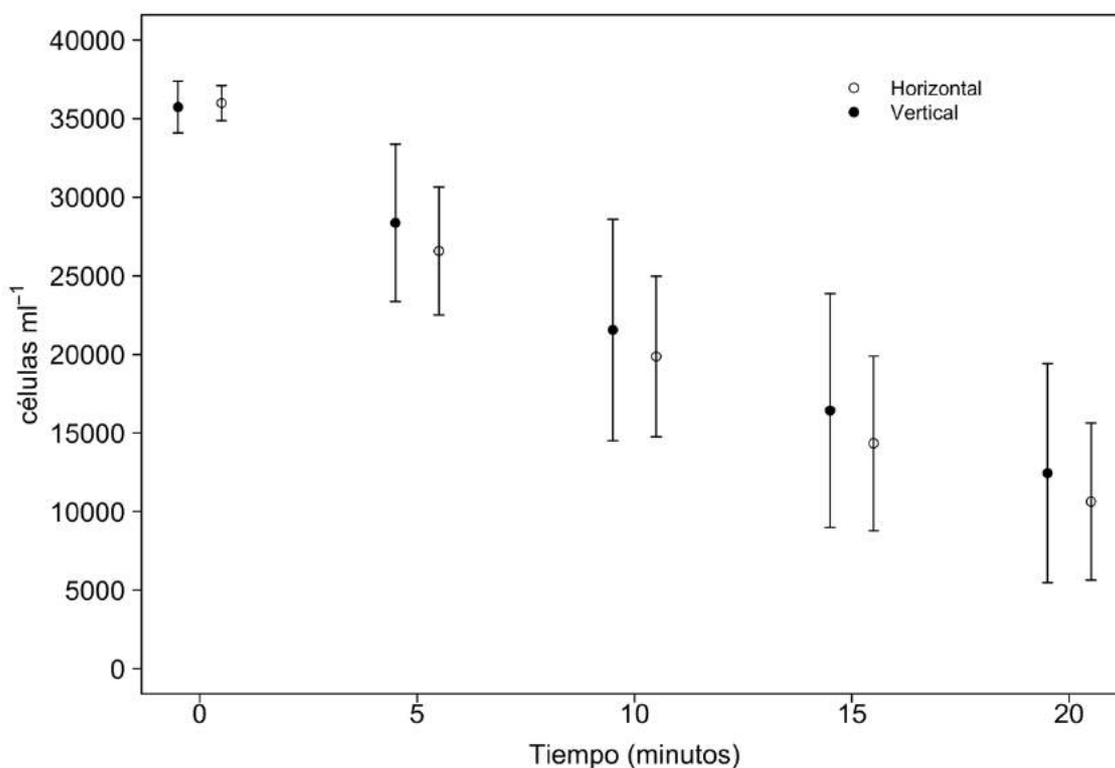


Figura 67: Variación de la concentración de partículas en función del tiempo para individuos de *Pinna rudis* colocados en posición horizontal y vertical.

3.3.2.2 Análisis biométrico de *Pinna rudis*

Las medidas biométricas para cada grupo de individuos se muestran en la Tabla 14. Todos los grupos presentaron tamaños similares, alrededor de 18 cm de longitud y un DW estimado de 1.8 g ind⁻¹, sin que se encontraran diferencias estadísticas entre grupos.

Tabla 14: Medidas biométricas para cada grupo de individuos de *Pinna rudis*. DW = Peso seco; WW = Peso húmedo.

Dieta	Longitud (cm)	Ancho (cm)	DW (g)*	WW (g)
Control	18.48 ± 16.88	10.54 ± 9.19	1.82 ± 0.41	101.83 ± 21.55
Dieta <i>shellfish</i>	18.37 ± 16.36	10.58 ± 15.38	1.79 ± 0.39	92.28 ± 22.75
Dieta mixta	18.71 ± 17.21	10.51 ± 9.75	1.87 ± 0.41	99.49 ± 16.87

*Peso seco de biomasa corporal estimado a partir de la regresión talla-peso establecida según el apartado “2.3.1.4. Relación morfométrica y análisis estadístico”.

3.3.2.3 Tasas fisiológicas

Los resultados de las mediciones fisiológicas se muestran en la Figura 68 y sus equivalentes energéticos se detallan en la Tabla 15.

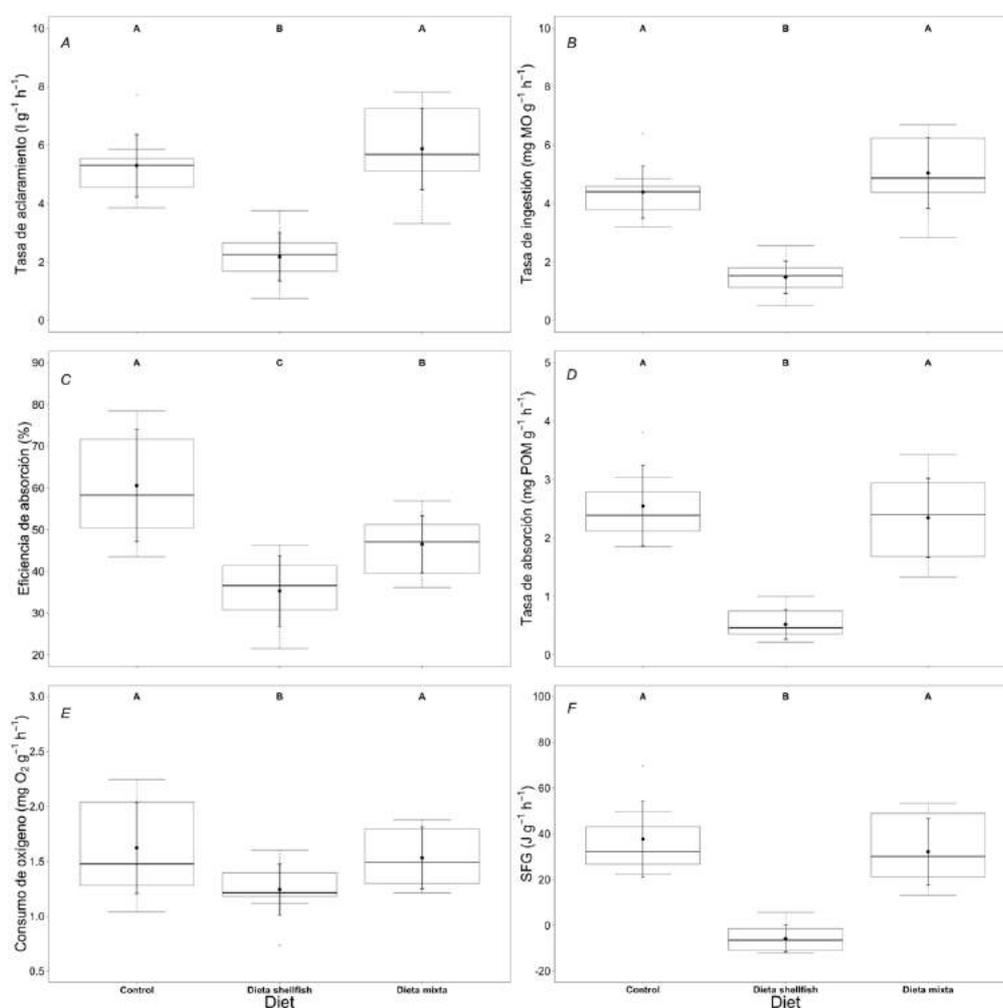


Figura 68: *Box-plot* de las tasas fisiológicas estandarizadas a 1 g de biomasa corporal en peso seco (DW): A) Tasa de aclaramiento (CR); B) Tasa de ingestión (IR); C) Eficiencia de absorción (AE); D) Tasa de absorción (AR); E) Consumo de oxígeno (VO_2); F) Potencial de crecimiento o *scope for growth* (SFG). El efecto de la dieta se evaluó mediante ANOVA y el *Tukey's honestly significant differences (HSD)* para las comparaciones múltiples donde las diferentes letras mayúsculas muestran diferencias significativas ($p < 0.05$). Las letras A-C representan grupos estadísticamente diferentes.

La tasa de filtración (CR) de *Pinna rudis* con las dietas experimentales utilizadas fue sobre $5.5 \text{ l g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para las dietas control y mixta, no observándose diferencias significativas entre ambas. Sin embargo, hubo una importante reducción de la filtración, superior al 50% ($2.2 \text{ l g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en el grupo alimentado con la dieta *shellfish*. Como consecuencia, la tasa de ingestión de la dieta de control (IR de $4.2 \text{ mgMO g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y la dieta mixta ($5.1 \text{ mgMO g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) fue tres veces más alta que la ingestión de la dieta *shellfish* (IR de $1.5 \text{ mgMO g}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Tabla 15: Índices fisiológicos medidos para cada dieta. Los datos muestran el promedio de 10 individuos de *Pinna rudis* \pm desviaciones estándar. CR es la tasa de filtración expresada como $\text{l g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, IR es la tasa de ingestión en $\text{J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, AE es el porcentaje de absorción del alimento ingerido, AR es la tasa de absorción en $\text{J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, VO_2 es el consumo de oxígeno en $\text{J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y SFG es el margen de crecimiento, también expresado como $\text{J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Todas las tasas fisiológicas se relacionan con el peso seco de carne estimado para cada individuo. Las letras A-C representan grupos estadísticamente diferentes.

	Control (CO)	Dieta <i>shellfish</i> (SF)	Dieta mixta (MX)
CR ($\text{l g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	5.29 ± 1.073^A	2.18 ± 0.82^B	5.87 ± 1.4^A
IR ($\text{J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	100.86 ± 20.45^A	33.97 ± 12.87^B	115.88 ± 27.84^A
AE (%)	60.60 ± 13.5^A	35.33 ± 8.5^C	46.47 ± 6.8^B
AR ($\text{J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	58.64 ± 15.84^A	12.03 ± 5.79^B	53.94 ± 15.58^A
VO_2 ($\text{J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	23.07 ± 5.91^A	17.70 ± 3.30^B	21.79 ± 4.01^A
SFG ($\text{J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	37.71 ± 16.66^A	-5.67 ± 5.88^B	32.15 ± 14.60^A

La EA en la dieta de control (CO) fue del 60.60% y disminuyó a casi la mitad (35.33%) en la dieta *shellfish* (SF). En la dieta mixta (MX) se obtuvo un valor intermedio de 46.47%, detectándose diferencias significativas entre las tres dietas. La AR de la dieta de control ($2.5 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) fue casi 5 veces mayor que la SF ($0.5 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), sin embargo se obtuvo un resultado similar al control en la dieta MX, con una AR de $2.4 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. El mayor VO_2 se observó en el control ($1.6 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) con una disminución de casi el 25% en la SF ($1.2 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). El VO_2 en la dieta mixta fue ligeramente menor que en el control ($1.5 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), aunque no se observaron diferencias estadísticas entre ellos. Sí se encontraron diferencias significativas en el VO_2 entre los ejemplares alimentados con CO y MX respecto a los ejemplares alimentados con SF. La integración de las diferentes tasas fisiológicas en la ecuación de balance energético nos permite calcular el SFG, que fue positivo y similar para el control ($37.71 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y la dieta mixta ($32.15 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

$\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$). Por el contrario, los animales alimentados con la dieta SF mostraron un valor negativo de SFG, $-5.67 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

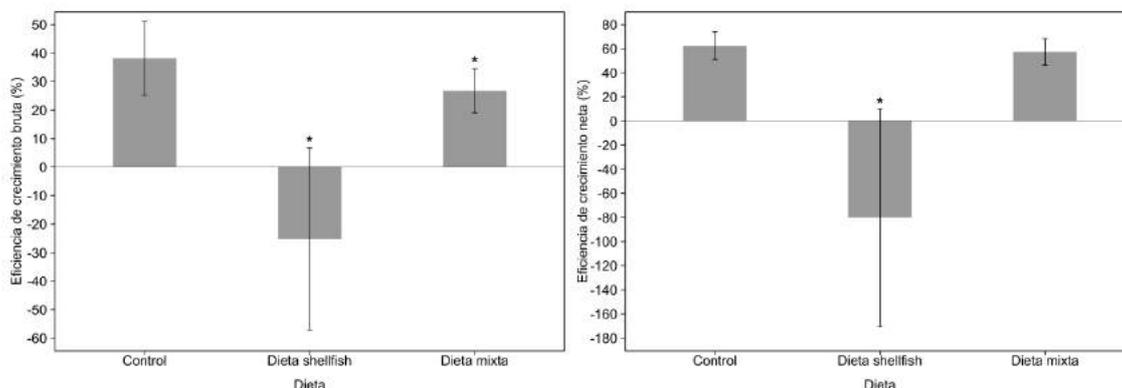


Figura 69: Eficiencia de crecimiento bruta (izquierda) y neta (derecha) para cada dieta experimental. El * indica diferencias significativas con la dieta control.

La mayor eficiencia de crecimiento bruto (k1) se observó en la dieta de control, donde el 38.2% de la energía ingerida se utilizó para el crecimiento (Figura 69). Dado que el SFG para los animales alimentados con SF fue negativo, K1 también mostró un resultado negativo. Se observó un K1 significativamente menor (33.1%) con la dieta MX en relación al control. Esta diferencia significativa entre la dieta de control y la mezcla desaparece cuando se considera la eficiencia del crecimiento en relación con la absorción (K2). En ambos casos, la eficiencia de crecimiento neto estuvo cerca del 60% de la fracción absorbida, mientras que la dieta SF mostró nuevamente valores negativos para K2 (Figura 69).

Tabla 16: Análisis de la correlación de Pearson entre las tasas fisiológicas y el SFG.

	CR g	AE	AR	VO ₂
SFG	0.89***	0.74***	0.99***	0.30
CR g		0.46*	0.91***	0.47**
AE			0.76***	0.37
AR				0.46*

***p-valor < 0.001; **p-valor < 0.01; *p-valor < 0.05.

La correlación máxima con el SFG para las tasas fisiológicas se apreció en la AR (0.99, $p < 0.001$). El VO₂ fue la única tasa fisiológica sin correlación significativa con el SFG (valor de $p > 0.05$). Los resultados de todas las correlaciones se muestran en la Tabla 16.



4. Discusión

4.1 Hábitat de las poblaciones de *Pinna nobilis* en Calp (Alicante)

Los resultados de las variables oceanográficas muestran una estacionalidad típica de mares templados (Miller, 2009), con inviernos suaves en los que las temperaturas no suelen bajar de los 14 °C en aguas abiertas y temperaturas cálidas por encima de 26 °C que solo se superan en zonas más superficiales. Según las observaciones realizadas por Trigos *et al.* (2015) este rango de temperaturas indicaría que la población de *Pinna nobilis* de Calp, y, por extensión, aquellas poblaciones de mar abierto con condiciones oceanográficas similares, se encontrarían durante algunos periodos del año fuera de la zona de confort de la especie. Sin embargo, los resultados observados en el presente trabajo (3.2.4. Influencia de la temperatura en la filtración y el consumo *de oxígeno de Pinna nobilis*) mostrarían que el rango de confort de temperaturas de la especie podría ser más amplio y que se encontraría dentro de las variaciones estacionales típicas del Mediterráneo. Por lo tanto, la población de Calp se encontraría a lo largo de todo el año en un rango térmico confortable para la especie.

Por su parte, las variaciones de salinidad observadas son mínimas al encontrarse en mar abierto y dentro del rango entre 34–40 psu adecuado para *Pinna nobilis* (Butler *et al.*, 1993). De hecho, *P. nobilis* también está presente en ambientes parálidos donde la salinidad presenta valores más extremos, como es el caso de la laguna del Mar Menor (Murcia) donde la salinidad puede alcanzar valores entre 42–47 psu (Fernández-Torquemada y Sánchez-Lizaso, 2011) o en la bahía del Fangar, en el delta del Ebro (Tarragona), donde la salinidad oscila entre 20 y 35 psu (Carrasco *et al.*, 2008).

Del mismo modo, la variación del oxígeno disuelto nunca alcanza valores que pudieran suponer un riesgo para la especie. Para bivalvos, la concentración letal 50 (CL50, concentración a la cual morirían el 50% de los individuos) es de $1.42 \pm 0.14 \text{ mg}^{-1}$ y en moluscos, la concentración subletal 50 (CSL50, concentración a la cual el 50% de los individuos mostrarían efectos no letales) es de $1.99 \pm 0.16 \text{ mg}^{-1}$ (Vaquer-Sunyer y Duarte, 2008). De hecho, ningún bivalvo de los recogidos en la revisión de Vaquer-Sunyer y Duarte (2008) muestran una CL50 por encima de los 4 mg^{-1} . Las observaciones en otros moluscos y bivalvos junto con los resultados obtenidos por Basso *et al.* (2015a) en los que se observó tolerancia de ejemplares de *Pinna nobilis* sometidos a concentraciones de 3.07 mg^{-1} , parecen indicar que las variaciones de oxígeno disuelto en Calp nunca

alcanzaron valores que pudieran suponer un riesgo para la especie ya que los valores siempre estuvieron por encima de los 5 mg l⁻¹.

Los niveles de clorofila *a* observados durante todo el periodo de estudio se situaron dentro del rango habitual observado para áreas con condiciones oceanográficas similares, sin mostrar eventos extremos de concentración. De manera semejante, el nivel de turbidez, en general, tampoco superó valores extremos que pudieran perjudicar a los bivalvos en general y *Pinna nobilis* en particular, con concentraciones habitualmente por debajo de 1.5 mg l⁻¹. Sin embargo, sí se observaron eventos puntuales de elevados niveles de turbidez con concentraciones de hasta 4 mg l⁻¹ y tasas de sedimentación superiores a 800 g (m²)⁻¹ día⁻¹ coincidiendo con grandes tormentas que, en estos casos, podrían suponer un riesgo para *P. nobilis*, y no sólo por el fuerte hidrodinamismo generado que afecta negativamente a la especie (García-March *et al.*, 2007b; Hendriks *et al.*, 2011). La elevada turbidez puede tener un efecto negativo en los bivalvos a nivel fisiológico, alterando la filtración y la absorción del alimento, generalmente como causa de un incremento de la concentración y del porcentaje de material inorgánico en suspensión. Todo ello genera estrés en el animal y puede producir la muerte por agotamiento ante la incapacidad de alimentarse e incluso respirar (Loosanoff, 1962; Beninger *et al.*, 2008). Así pues, estos eventos puntuales con concentraciones más elevadas podrían presentar un efecto negativo sobre *P. nobilis* y tener un efecto de control de la densidad de individuos a largo plazo, por provocar la muerte de los más débiles que, sin este tipo de eventos, probablemente podrían ser más longevos. Aun así, considerando que son eventos puntuales muy esporádicos (2–3 eventos observados en todo el periodo de muestreo) parecen indicar que las condiciones de turbidez en Calp son, en general, buenas para *P. nobilis*.

4.2 *Pinna nobilis*

4.2.1 Actividad de valvas

Los resultados observados indican que la temperatura es el factor responsable del cambio de patrón en la actividad de valvas de P1 a P2 en esta especie. A pesar del limitado número de individuos utilizados en el experimento (8) debido al estado de protección de la especie, la respuesta de 6 de 8 de los individuos encaja con las predicciones establecidas, basadas en los estudios realizados por García-March *et al.* (2008); García-March *et al.* (2016). Si bien las condiciones de laboratorio pueden alterar la actividad de los bivalvos (Williams y Pilditch, 1997; Robson *et al.*, 2010b), el conocimiento previo en campo sobre el comportamiento natural de la especie (García-March *et al.*, 2008; García-March *et al.*, 2016) se utilizó para clarificar si estos resultados en los tanques era producto de los tratamientos aplicados y, por lo tanto, un resultado relevante. En cualquier caso, el limitado tamaño muestral haría recomendable replicar el experimento, con otras poblaciones, para confirmar que el comportamiento de la actividad de las valvas está efectivamente regulado por la temperatura del agua, sin olvidar que los resultados con individuos estabulados de la población de Calpe, coinciden con lo observado *in situ* en las poblaciones de Moraira y Tabarca en Alicante (García-March *et al.*, 2008; García-March *et al.*, 2016). La reducción de la concentración de oxígeno se evitó puesto que se consiguió este cambio de patrón únicamente con la temperatura y se consideró un riesgo innecesario dado el estado de protección de la especie. Futuros experimentos controlando la concentración de oxígeno disuelto ayudarían a entender si este parámetro tiene algún efecto, quizá modulador de la respuesta a la temperatura, en la actividad de valvas de *P. nobilis*.

Como muestran los resultados, el cambio entre patrones ocurrió una vez la temperatura del agua alcanzó 24.5 °C. Todos los individuos del tanque A mantuvieron P2 a pesar de mantener la temperatura del agua a 23.0 °C durante 5 días. Los individuos de ambos tanques únicamente comenzaron a cambiar de P2 a P1 uno o dos días después de alcanzar los 24.5 °C. Este hecho, refuerza la idea de que, en el campo, son los picos de altas temperaturas en verano los que provocarían este cambio de patrón y no aguas cálidas mantenidas en el tiempo. 6 de los 8 individuos siguieron los periodos de iluminación marcados, mostrando efectivamente este cambio de P2 a P1. Los individuos abrieron sus valvas con la luz y las cerraron durante los periodos de oscuridad, incluso cuando estos

eventos eran repentinos y fuera de horario, inesperados, como pueda ser el fenómeno de “luna llena” y oscuridad total durante el día. Esto confirma la importancia que tiene la luz durante P1 y que, durante este periodo, *P. nobilis* no predice los ciclos de luz ni muestra este patrón debido a un ciclo interno, más bien se trata de una respuesta directa a la presencia/ausencia de luz. Los beneficios que puede aportar este cambio de patrón y su consecuente seguimiento de la luz durante los meses de verano no están todavía claros. De acuerdo con Ortmann y Grieshaber (2003), el cierre de las valvas durante la noche podría ser una forma de ahorro de energía cuando el alimento es escaso. Sin embargo, durante nuestros experimentos, la comida se proporcionaba regularmente cada 6 h, y durante los momentos de oscuridad en P1 mantenían las valvas cerradas aun con alimento a su disposición. En condiciones naturales durante P1, la actividad de las valvas de *Pinna nobilis* también fue independiente de la presencia de fitoplancton, tal y como constatan García-March *et al.* (2016). Alternativamente, el seguimiento de la luz mediante la actividad de las valvas durante P1 supone un método de sincronización entre los individuos de una población. Esta sincronización podría tener beneficios para la reproducción durante los meses de verano. Observaciones indirectas de Cabanellas-Reboredo *et al.* (2009); Kersting y García-March (2017) sugieren que la reproducción de *P. nobilis* ocurre mayoritariamente entre junio y agosto, aunque análisis histológicos realizados por Deudero *et al.* (2017) muestran como el evento reproductivo puede comenzar en mayo, siendo más intenso en los meses de junio y julio. Estas diferencias podrían deberse a la profundidad a la que se encuentran las poblaciones, la posición de la termoclina, gradientes latitudinales u otros factores locales. En cualquier caso, la sincronización con la luz podría marcar el momento idóneo para el evento reproductivo, aunque esta hipótesis deberá ser demostrada.

Dado que los individuos 4A y 4B mantuvieron P2 durante todo el experimento y suponiendo que el seguimiento de la luz durante P1 estuviera relacionado con la reproducción, cabría la posibilidad que los individuos 4A y 4B, de menor tamaño, fueran inmaduros. En este supuesto, la sincronización con el resto de individuos sería innecesaria y el seguimiento de la luz significaría más una carga que un beneficio. Si bien, cabe considerar que Trigos (2016) sugiere que individuos de esta talla tendrían un tamaño suficiente para ser maduros. Lamentablemente, dado el estado de protección de *P. nobilis*, los individuos no se sacrificaron para comprobar su estado de madurez.

García-March *et al.* (2016) postularon que el oxígeno podría estar involucrado en el cambio entre patrones de actividad de valvas en *P. nobilis*. En su experimento únicamente se analizó la respuesta en función de la temperatura, aunque estas variaciones, de forma indirecta, inducen variaciones en el oxígeno disuelto. Esto podría explicar porqué García-March *et al.* (2016) detectaron correlación con temperatura y oxígeno en el momento de cambio entre los patrones de actividad de *Pinna nobilis*. Se requieren nuevos estudios relacionados con la actividad de las valvas para comprender mejor lo que provoca que algunos individuos no cambien de patrón de actividad a temperaturas elevadas. Del mismo modo, sería de interés conocer la posible relación entre el estado de madurez de las nacras y los patrones estacionales de actividad.

En la almeja gigante *Hippopus hippopus*, Schwartzmann *et al.* (2011) observaron un comportamiento de la actividad de las valvas similar a P1. Esta especie tropical vive siempre en aguas con elevadas temperaturas y con poca variación estacional (21–28 °C). Cabría la posibilidad de que la falta de aguas frías estuviera manteniendo a *H. hippopus* en P1. Este comportamiento se ve alterado cuando la temperatura del agua se mantiene en 27–28 °C durante varias semanas, causando gran cantidad de aberturas y cierres de las valvas durante el día, pero manteniendo los cierres durante la noche (Schwartzmann *et al.*, 2011). Si esta especie de almeja gigante está siempre en P1 debido a las elevadas temperaturas, no es descartable que pudiera cambiar a P2 si durante varias semanas se mantuviera de manera artificial a temperaturas más frías (18–20 °C). A pesar de que el comportamiento de actividad de valvas de *Crassostrea gigas* se debe mayoritariamente a las mareas, Mat *et al.* (2012) observaron un ritmo dual relacionado con el fotoperiodo en condiciones naturales. Esta especie es diurna durante primavera-verano y nocturna durante otoño-invierno, sin embargo, cambia de patrón incluso a temperatura constante en el laboratorio, lo que sugiere que este cambio de comportamiento está provocado por causas endógenas (Mat *et al.*, 2012). Las similitudes entre *P. nobilis* e *H. hippopus*, pero no con *C. gigas*, sugieren que probablemente la influencia de la temperatura del agua en la respuesta de la actividad de las valvas a la luz es una característica común en bivalvos, pero no universal. Nuevas investigaciones en otras especies de bivalvos podrían ayudar a entender los beneficios evolutivos de esta influencia.

Durante la aplicación del protocolo inverso, los individuos mantuvieron P1 a pesar de mantener la temperatura a 18 °C durante 10 y 15 días respectivamente para los tanques A y B. De acuerdo con lo observado en el medio natural por García-March *et al.* (2016), el

cambio de P1 a P2 se esperaba que ocurriera por debajo de los 20 °C. Si la sincronización con la luz tiene una finalidad reproductiva, como se sugirió anteriormente, sería posible que los individuos de *Pinna nobilis* requieran de un tiempo mínimo en P1, que les permita la maduración y desove, antes de cambiar de nuevo a P2. En este caso, el efecto de la temperatura quedaría enmascarado por la necesidad de completar el ciclo reproductivo. Alternativamente, sería posible que los ejemplares de *P. nobilis* requieran de más tiempo para el cambio entre patrones debido a requerimientos fisiológicos intrínsecos. En este caso, el método experimental aplicado no posibilitaría el cambio entre patrones debido al corto espacio de tiempo entre un cambio y otro. Para definir en futuros estudios los factores que provocan el cambio entre P1 y P2, sería recomendable aumentar el tiempo de mantenimiento en cada patrón.

El análisis espectral (FFT), muestra una periodicidad de 23.11 h y 23.15 h para avA y avB respectivamente, durante P1. Los resultados son similares a los obtenidos por García-March *et al.* (2016) para individuos en el medio natural durante P1. Sin embargo, durante P2 en el laboratorio no se detectó ningún ciclo circadiano, que sí se producía en el medio natural (García-March *et al.*, 2016) y únicamente se detectó un ciclo de 5.96 h para avA.

La autocorrelación confirma la periodicidad de 23.11 h y 23.15 h respectivamente para avA y avB detectada por el FFT y relacionada con los ciclos de luz, con valores de 0.69 y 0.66 para avA y avB respectivamente (Figura 53C y Figura 53D). En cambio, la autocorrelación para las 5.96 h detectadas por el FFT (10728 segundos en la escala de tiempo $\frac{1}{2}$ segundos) durante P2 para avA fue mucho menor, con un valor de 0.28 (Figura 53B). Los ciclos de alimentación, cada 6 h, produjeron una respuesta cambiante en los individuos de *Pinna nobilis*, que detectaban los pulsos de comida y variaban la abertura de las valvas de forma inconstante. La autocorrelación para un ciclo circadiano durante P2 fue mucho menor que la observada *in situ* por García-March *et al.* (2016), siendo indetectable como ya sugerían los resultados obtenidos por el FFT. Cabría la posibilidad de que las condiciones de laboratorio hubieran alterado el ritmo circadiano, más débil, durante P2 (García-March *et al.*, 2016). En el caso de que el ritmo circadiano durante P2 no esté causado por un zeitgeber (nombre que reciben aquel o aquellos factores ambientales que intervienen en los ritmos biológicos), como sugerían los estudios en el medio natural, sería posible que fuera más sensible a ser alterado por factores externos. Este factor externo podrían ser los ciclos artificiales de comida (6h), que podrían explicar el pico de 5.96 h detectado por el FFT para avA durante P2. También podrían ser el

resultado de pequeñas alteraciones aleatorias que se dan con facilidad en condiciones de laboratorio. En conjunto, todo ello podría enmascarar los ritmos internos durante P2. Así pues, se recomienda realizar futuros estudios en condiciones de *free running* en ambos patrones (P1 y P2), manteniendo constante la luz/oscuridad y el suministro de comida para evitar su efecto y así mejorar el conocimiento de estos ciclos internos.

La alta CC (*Cross-Correlation*) obtenida en la comparación entre pares de individuos durante P1, muestra la sincronización entre ellos siguiendo los ciclos de luz con la abertura de sus valvas. Para P2, los valores de CC fueron mucho menores de lo esperado según el trabajo de (García-March *et al.*, 2016), lo que refuerza la idea de un reloj interno rigiendo ambos patrones. Teniendo en cuenta que, mientras que la luz ejerce de “director” durante P1 reforzando el ritmo circadiano, P2 sería más fácilmente alterable al no presentar ningún factor ambiental que lo gobierne.

La relación entre la actividad de las valvas y la temperatura en *P. nobilis* hace de esta especie un potencial biomonitor en el contexto de cambio climático. El seguimiento de individuos para comprobar las variaciones del momento de cambio entre patrones podría ayudar a entender la dirección de las variaciones ambientales y sus posibles efectos. La combinación de seguimiento de actividad de valvas en tiempo real y la esclerocronología de las conchas podría ayudar a descifrar la información contenida en las propias conchas, aportando datos de series temporales climatológicas a nivel local. Futuros estudios, combinando estas dos perspectivas para calibrar los datos obtenidos mediante estudios de esclerocronología, nos ayudarían a obtener series temporales a nivel local de datos climatológicos como la temperatura (García-March *et al.*, 2011b).

4.2.2 Modelos de crecimiento de *Pinna nobilis*

El presente trabajo constituye el primer estudio comparativo de crecimiento de la especie actualmente en peligro crítico de extinción *Pinna nobilis*, en 12 localizaciones del Mediterráneo occidental en España y Francia. Se detectó una considerable variabilidad en el crecimiento y la longevidad en función de las condiciones ambientales y el grado de exposición al hidrodinamismo. El análisis multivariante muestra 4 grupos de poblaciones, cada uno de los cuales comparte características ambientales comunes. Los grupos son: 1) SO, poblaciones en mar abierto ubicadas en áreas poco profundas y profundas pero siempre al resguardo del hidrodinamismo (Gandulf, Racó, Tabarca, Balearia y Port-Cros); 2) EO, poblaciones localizadas en mar abierto, en áreas poco

profundas y expuestas al hidrodinamismo (Olla, Moraira y Freus); 3) LG, poblaciones ubicadas en lagunas marinas costeras (Embiez, Diana y Mar Menor); y 4) Alfacs, separada de los demás grupos y la única población estudiada que se encuentra en un ambiente deltaico.

Si bien es deseable poder establecer modelos específicos para cada población, los tres modelos generales analizados en el presente estudio podrían considerarse como referencia para otras poblaciones de *Pinna nobilis* localizadas en áreas similares. Desembocaduras como el delta del Ebro podrían considerarse en un modelo de crecimiento general diferente; sin embargo, debido a que Alfacs (localizada en el propio delta) fue la única población muestreada de este tipo de ambiente, sería preceptivo analizar el comportamiento del modelo, incrementando el número de poblaciones en ambientes deltaicos y poder respaldar su singularidad. Las poblaciones de EO muestran tasas de crecimiento y L_{∞} más bajas que otras poblaciones. Según García-March *et al.* (2007b); Deudero *et al.* (2015), los efectos del hidrodinamismo alto de forma intermitente o moderado pero continuado en el tiempo podrían aumentar la mortalidad y limitar el crecimiento al provocar estrés y/o roturas de la concha. García-March *et al.* (2016) estudiaron la actividad de valvas *in situ* de *Pinna nobilis*, revelando que las corrientes bimodales, como las generadas por las olas, causan una mayor perturbación a los individuos de *P. nobilis* que las corrientes unimodales como las mareas, incluso a velocidades más bajas del agua. El efecto de estas fuerzas disminuye con la profundidad y con la presencia de *Posidonia oceanica*, además de la influencia de la topografía del fondo marino (García-March *et al.*, 2007b; Hendriks *et al.*, 2011).

Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que el tamaño máximo de las poblaciones de EO puede verse limitado por el oleaje, mientras que las poblaciones de SO y LG pueden crecer a tamaños mayores puesto que, normalmente, se encuentran protegidas al hidrodinamismo.

En general, en el medio marino las condiciones ambientales tienden a ser más estables en áreas profundas. Por su parte, aunque las áreas poco profundas están protegidas del hidrodinamismo, son más propensas a los impactos antropogénicos y los extremos climáticos. Por lo tanto, es razonable esperar que las poblaciones profundas en diferentes áreas del mar Mediterráneo occidental tuvieran más similitudes en sus parámetros de crecimiento que las poblaciones más cercanas que viven en áreas superficiales al

resguardo del oleaje. Sin embargo, las poblaciones dentro del grupo SO muestran patrones de crecimiento similares a pesar de vivir a diferentes profundidades. Esto apoya la idea de que, efectivamente, en mar abierto, el hidrodinamismo puede ser un factor determinante del crecimiento de la nacra que limita el tamaño de la concha en las poblaciones que habitan en lugares expuestos. Por el contrario, cuando el efecto hidrodinámico sobre la nacra es bajo, debido a que las poblaciones están resguardadas o situadas a mayor profundidad, por lo general el efecto del resto de factores ambientales tendría poca capacidad de modular el crecimiento de la especie, independientemente de la ubicación.

En este sentido, la población estudiada hace unos años por García-March *et al.* (2007a) en Moraira (Alicante, España) y a 11–13 m de profundidad, ya mostró un modelo de crecimiento con L_{∞} mayor que el de la población EO, pero menor que el de la población SO, y una K menor que la de la población EO, pero similar al de la población SO. Esta población podría encontrarse en una situación intermedia entre las poblaciones profundas (20 m) y las expuestas, pudiendo estar parcialmente afectada por el régimen hidrodinámico. Por otro lado, tal y como muestra el análisis multivariante, tanto L_{∞} y la ratio de crecimiento se comportan de manera independiente en relación con el estatus de protección legal del área. Este análisis no detecta diferencias estadísticamente significativas entre poblaciones con o sin algún tipo de protección legal.

Las poblaciones de Alfacs y LG se localizan en aguas confinadas. Estas poblaciones destacan por su mayor tasa de crecimiento de 5 a 9 años, por su mayor L_{∞} (Alfacs) y una mayor tasa de crecimiento, entre 2 a 7 años (LG) en comparación con las demás poblaciones estudiadas (Figura 56). Las condiciones específicas que existen en estos ambientes parálidos podrían ser responsables de estos extremos. Una mayor disponibilidad de alimento en comparación con el mar abierto podría explicar esta discrepancia, como se ha demostrado para las diferencias de crecimiento y supervivencia de *Pinna nobilis* entre ejemplares que viven en ambientes eutróficos versus oligotróficos (Alomar *et al.*, 2015). Las aguas del delta del Ebro están enriquecidas en nutrientes por entradas provenientes del riego agrícola (Mañosa *et al.*, 2001; Sierra *et al.*, 2002; Falco *et al.*, 2010; Prado, 2018). Lo mismo ocurre con las lagunas costeras, también afectadas por el aumento de la población en las zonas costeras, por la agricultura o la industria. Estos impactos, junto con las condiciones ambientales tales como la baja circulación del agua y su baja renovación, hacen que estas áreas sean más susceptibles al enriquecimiento

de nutrientes y el crecimiento fitoplanctónico (Kennish y Paerl, 2010). Esta situación ha sido especialmente relevante e intensa en la laguna del Mar Menor en Murcia durante los últimos años, en los que ha sufrido diferentes grados de eutrofización (Pérez-Ruzafa *et al.*, 2005b; Velasco *et al.*, 2006; Garcia-Ayllon, 2018). Se desconoce la razón por la que, para la población Alfacs, L_{∞} es 18.5 cm mayor que el valor predicho por el modelo de crecimiento general para LG. Los regímenes de salinidad de los ambientes parálidos muestran mayores fluctuaciones que los de los ambientes de mar abierto debido a sus características ambientales (Kennish y Paerl, 2010). Sin embargo, estas fluctuaciones no se reflejan en las tendencias de crecimiento observadas en las poblaciones de nacra que viven en estas áreas. La salinidad en Alfacs suele ser menor que la del mar abierto debido a la precipitación y descarga de canales de riego (Solé *et al.*, 2009). Por el contrario, el Mar Menor es una laguna hiperhalina que puede alcanzar niveles de salinidad de hasta 51 psu (Pérez-Ruzafa *et al.*, 2005a). Las lagunas de Diana y Embiez en Francia, muestran niveles de salinidad más bajos que el Mar Menor, pero a menudo oscilan por debajo y por encima del nivel del mar abierto después de las estaciones húmedas y secas (De Gaulejac y Vicente, 1990; Burgeot *et al.*, 1996; Rouanet *et al.*, 2009). En conjunto, los datos sugieren que factores ambientales distintos a la salinidad podrían tener más peso en la determinación de las tendencias de crecimiento observadas en los ambientes parálidos. Sin embargo, antes de descartar definitivamente la posibilidad de que el crecimiento de la nacra se vea afectado por la salinidad sería deseable profundizar con estudios adicionales en mayor número de poblaciones de nacra en medios de salinidades anómalas.

Por otra parte, se detectó una variación importante en relación con la supervivencia y la edad máxima entre las poblaciones estudiadas. Las poblaciones EO, LG y Alfacs presentaron las edades máximas más bajas de los individuos estudiados (17, 12 y 15 años respectivamente). En áreas expuestas, el efecto de las condiciones hidrodinámicas, como se señaló anteriormente, podría ser responsable de una menor supervivencia, sin embargo, las condiciones hidrodinámicas suelen ser suaves en ambientes de lagunas/deltas. El hecho de que las poblaciones de lagunas/deltas sean las únicas en las que L_{∞} es mayor que Max_Ht podría indicar que, en estos lugares, los individuos mueren antes de alcanzar el tamaño máximo y/o que, por roturas traumáticas de las conchas, la parte posterior se ha reconstruido aparentando menor tamaño del que debería tener por edad. La rotura de la concha es frecuente en estos hábitats debido al intenso tráfico de embarcaciones, que a menudo las golpea y fragmenta (Prado *et al.*, 2014). Este hecho podría explicar el estado

de la población Alfacs, donde 19 de 20 conchas mostraban evidentes marcas de reconstrucción. Por lo tanto, múltiples factores podrían estar afectando a la esperanza de vida de las poblaciones de lagunas/deltas, como son:

1) En comparación con los ecosistemas de mar abierto, estos presentan condiciones extremas más estresantes (Quintana *et al.*, 2018a). Durante el invierno y la temporada de lluvias, la temperatura y la salinidad podrían acercarse al límite de tolerancia de la especie. Lo mismo ocurre durante el verano, cuando se producen altas temperaturas y altos niveles de salinidad (excepto en el caso del delta del Ebro, donde la salinidad disminuye en verano debido a los vertidos agrícolas) y las concentraciones de oxígeno pueden alcanzar niveles peligrosamente bajos (Cataudella *et al.*, 2015).

2) La presencia de contaminantes químicos producidos por las actividades antropogénicas es común en estos ambientes (Kennish y Paerl, 2010), como es el caso del delta del Ebro (Solé *et al.*, 2000; Mañosa *et al.*, 2001; Köck *et al.*, 2010), Mar Menor (Pérez-Ruzafa *et al.*, 2000; Quintana *et al.*, 2018a) y la laguna de Diana (Burgeot *et al.*, 1996; Galgani *et al.*, 2006).

3) Aunque aún no se ha sido demostrado para *Pinna nobilis*, en algunos taxones, el crecimiento rápido y el tamaño corporal grande parecen estar relacionados con una esperanza de vida más corta (Metcalf y Monaghan, 2003).

Ya sea aisladamente o en conjunto, estos factores podrían limitar la esperanza de vida de las poblaciones de nacra que viven en ambientes de lagunas/deltas. En consecuencia, el modelo general de LG debe usarse con precaución. Las oscilaciones que ocurren en las lagunas costeras debido a las condiciones naturales y los efectos antropogénicos podrían inducir variaciones estocásticas en el crecimiento de *Pinna nobilis*.

Los efectos antropogénicos van más allá de la contaminación y se ha demostrado que otras amenazas como el anclaje de embarcaciones, la pérdida de hábitat y la pesca furtiva de conchas diezman las poblaciones de nacra (Katsanevakis *et al.*, 2011; Hendriks *et al.*, 2013; Vázquez-Luis *et al.*, 2014; Basso *et al.*, 2015c; Deudero *et al.*, 2015; Vázquez-Luis *et al.*, 2015). Es reseñable que las edades máximas detectadas, 38 y 34 años, se dieron en ejemplares obtenidos del parque nacional de Port-Cros, que fue creado en 1963. Las demás reservas marinas, la Reserva Nacional Marina de Tabarca y el parque nacional marítimo-terrestre del Archipiélago de Cabrera, en comparación con Port-Cros, son

relativamente recientes (creados en 1986 y 1991, respectivamente). En estas reservas españolas se localizaron individuos de 27 años, edad similar a la de las propias reservas en el momento del muestreo de las conchas. Las edades máximas de las poblaciones muestreadas sugieren un posible efecto positivo de la protección de las áreas marinas en relación con la longevidad de *Pinna nobilis*, si bien, se recomienda estudios adicionales para determinar de manera concluyente la relación entre el estado de protección y la longevidad de ejemplares.

Lamentablemente, la situación actual de *P. nobilis* es crítica a raíz del reciente evento de mortalidad masiva que afecta a la especie, diezmando prácticamente todas las poblaciones de nacra (Catanese, 2020; García-March *et al.*, 2020; Kersting *et al.*, 2020a; Öndes *et al.*, 2020; Özalp y Kersting, 2020; Šarić *et al.*, 2020). Sólo algunas poblaciones de aguas confinadas como lagunas y deltas consiguen resistir, aunque se desconocen las razones de ello. Entre las poblaciones abordadas en el presente estudio, sólo las poblaciones del Mar Menor, Alfacs (García-March *et al.*, 2020) y Diana (Nardo Vicente, com. Pers.) permanecen en la actualidad con ejemplares vivos, mientras que el resto de poblaciones en aguas abiertas han experimentado una mortalidad prácticamente del 100% (García-March *et al.*, 2020). En la situación actual, una estrategia para asegurar el futuro de la especie se encuentra en la cría en cautividad y reintroducción de juveniles al medio marino. Tras el análisis realizado en este trabajo, las poblaciones de Port-Cros, Gandulf y Tabarca parecen ser los lugares más óptimos para la reintroducción de *Pinna nobilis* según los tamaños y edades alcanzadas por los individuos y el estado de protección de estos puntos. Sin embargo, la persistencia a largo plazo de la enfermedad convierte estas áreas en inadecuadas para la reintroducción de la nacra, a menos que fuera con ejemplares resistentes, que son extremadamente escasos. Ante este panorama, las lagunas y deltas se presentan como la única esperanza para la supervivencia de esta especie a corto plazo, gracias a los individuos que actualmente sobreviven en ellas y por su capacidad de albergar juveniles no resistentes criados en cautividad. Los parámetros de crecimiento de las poblaciones que habitan estos entornos indican que pueden ser buenas zonas para el crecimiento de la especie durante los primeros años de vida. Sin embargo, las poblaciones que habitan en lagunas, y en menor medida en el delta del Ebro, parecen estar en un hábitat inestable a largo plazo, la corta vida útil de las nacras en estos entornos sugiere que estas poblaciones dependen de un reclutamiento abundante. Además, la supervivencia de los individuos introducidos podría verse limitada a largo plazo por la

inestabilidad de estos ecosistemas debido a factores tanto naturales como antropogénicos (Reizopoulou y Nicolaidou, 2007; Kennish y Paerl, 2010) que podrían conducir a un colapso repentino de las mismas. En la laguna del Mar Menor, la eutrofización ha estado amenazando al ecosistema durante décadas, hasta que terminó por colapsar el frágil equilibrio ecológico de la laguna durante el verano de 2015 y la primavera de 2016 (García-Ayllon, 2018; Pérez-Ruzafa *et al.*, 2019). Además, la recolonización o llegada de juveniles de *P. nobilis* a estas lagunas costeras o deltas después de un colapso y recuperación del hábitat sería muy complicada al haber desaparecido las poblaciones en mar abierto, ya que tendría que haber una conexión directa a través de las corrientes entre estos ambientes parálisis, por lo que sería necesario llevar a cabo una reintroducción manual de nacras (García-March *et al.*, 2020). En cambio, la alta diversidad genética en las poblaciones de *P. nobilis* y la poca diferenciación entre ellas (Wesselmann *et al.*, 2018; González-Wangüemert *et al.*, 2019) permitiría preservar la variabilidad genética de la especie solo con preservar algunas de estas poblaciones aisladas o unos pocos ejemplares mantenidos en acuarios (Peyran *et al.*, 2021).

Por otro lado, el cangrejo azul *Callinectes sapidus* procedente del Atlántico, especie invasora en el Mediterráneo, se está extendiendo por todas las costas ribereñas. Ha sido observado recientemente en el delta del Ebro (Fuentes *et al.*, 2019) y se ha constatado su presencia de manera permanente en el Mar Menor durante los últimos años (Castejón y Guerao, 2013; Mancinelli *et al.*, 2017). Este voraz crustáceo es una potencial amenaza para los juveniles de *P. nobilis* en estos reservorios de nacras. Por lo tanto, como también sugieren los parámetros de crecimiento y la longevidad, la supervivencia de las poblaciones de nacra de estos ambientes podría estar en peligro debido nuevamente a la ausencia de conectividad con otras poblaciones. Se hace prioritario implementar medidas urgentes para aumentar la estabilidad a largo plazo de estas áreas en el futuro y así preservar a *P. nobilis* de la extinción.

Los datos obtenidos en este trabajo también pueden servir para predecir la resiliencia de la nacra en el contexto del cambio climático, situación que puede producir un escenario de fenómenos meteorológicos extremos en conjunto, con un mayor oleaje en el mar Mediterráneo (IPCC, 2018). Se espera que las poblaciones supervivientes en las áreas expuestas experimenten un estrés hidrodinámico creciente en el futuro, lo que probablemente resulte en individuos que morirán más jóvenes y crecerán a tamaños menores. Es necesario realizar más estudios que permitan generalizar estos modelos a

otras condiciones ambientales y ajustar las variaciones morfológicas inherentes a las conchas de *P. nobilis*. La forma de la concha parece estar relacionada con las condiciones ambientales en las que crecen los individuos y podría usarse bidireccionalmente. Sería factible separar los modelos de crecimiento dentro de una población según la forma de la concha y sería viable lograr estimaciones más precisas de la tasa de crecimiento y la edad. Por otro lado, el método podría usarse junto con las estimaciones de los parámetros de crecimiento como indicador de las condiciones ambientales.

4.2.3 Evento de mortandad en *Pinna nobilis*

4.2.3.1 Seguimiento del evento de mortandad

Los datos recopilados durante los dos años posteriores al inicio de la mortalidad (octubre 2016) mostraron que la enfermedad estaba causando muchas bajas en las poblaciones de *Pinna nobilis*, llegando a no detectarse ejemplares vivos en muchos sectores que hasta la fecha presentaban poblaciones muy numerosas. Es muy probable que el patógeno se transmita por el agua y se propague con las corrientes (Vázquez-Luis *et al.*, 2017; Cabanellas-Reboredo *et al.*, 2019). Las observaciones directas han demostrado la rápida propagación en cuatro años desde el inicio de la mortandad masiva de ejemplares desde el sureste de España hacia el este y noreste de España y hacia otros países como Francia, Italia, Malta, Grecia, Chipre y Croacia (Katsanevakis *et al.*, 2019; Panarese *et al.*, 2019). La presencia de células uni y multinucleadas capaces de infección directa, junto con la presencia de esporas resistentes, confieren a *Haplosporidium pinnae* una fuerte capacidad infecciosa y de propagación a la vez que una fuerte resistencia a los cambios en las condiciones ambientales (Catanese *et al.*, 2018). Por lo tanto, el parásito podría permanecer vivo en algún tipo de reservorio como puedan ser huéspedes intermedios aún desconocidos o sedimentos, infectando a los nuevos colonos de manera similar a *Bonamia ostreae* (Culloty y Mulcahy, 2007). Este hecho limitaría la repoblación de hábitats después de la extinción local. Hasta la fecha, no se ha detectado asentamiento de juveniles en las áreas afectadas, a pesar de los reclutas encontrados en colectores de larvas en las temporadas de reclutamiento de 2017 y 2018. En el Mediterráneo español, la especie ha sido acorralada en la laguna costera del Mar Menor y el delta del Ebro (bahías dels Alfacs y del Fangar), aunque la enfermedad se constata que ha comenzado a afectar a la bahía dels Alfacs, y la población del Fangar fue arrasada por la Dana Gloria de enero de 2020. Como se ha comentado anteriormente, estas áreas parálidas son hábitats fuertemente

antropizados, sujetos a una serie de impactos que los hacen muy vulnerables y propensos a cambios ambientales repentinos (Vidović *et al.*, 2016; Nasi *et al.*, 2018). Estos impactos comprometen la supervivencia de las comunidades locales, como por ejemplo en la laguna del Mar Menor (García-Ayllon, 2018; Quintana *et al.*, 2018b) y pueden llevar a la extinción casi total de las poblaciones de nacra en todo el mar Mediterráneo español. De manera similar, en el resto del Mediterráneo, prácticamente solo han quedado algunas áreas costeras donde ha podido sobrevivir *P. nobilis* como diversas lagunas costeras en el golfo de León (Peyran *et al.*, 2021), la laguna de Marano (Curiel *et al.*, 2020) y el mar de Mármara (Cinar *et al.*, 2021). Se desconocen los factores que explican por qué las nacras pueden sobrevivir más tiempo al parásito en estas áreas y debe considerarse qué cambios ambientales provocados por causas antrópicas o naturales podrían terminar con estos refugios, de momento los únicos para las nacras, lo que tendría consecuencias fatales y catastróficas para la especie. Una vez ocurrido un cambio de las condiciones en estas lagunas, la recolonización de forma natural de *P. nobilis*, en el caso que las condiciones retornaran a un estado óptimo, sería impracticable debido a la barrera que suponen las aguas abiertas con la presencia del parásito. Por otra parte, debido a la escasez de individuos vivos resistentes en aguas abiertas en la actualidad, es improbable que puedan reproducirse debido a su bajo número y aislamiento, lo que los hace descartados como fuente de semillas para repoblar poblaciones diezmadas. En consecuencia, es razonable suponer que *P. nobilis* podría estar enfrentándose a la extinción total a medio plazo, a menos que se actúe sobre los ejemplares actualmente vivos, por ejemplo, con acciones de repoblación artificial de hábitats libres de parásito utilizando individuos de poblaciones supervivientes o repoblación con individuos resistentes. Esta actuación se vería favorecida por la baja diferenciación interpoblacional característica de *P. nobilis* debido a la alta conectividad y bajo aislamiento de las poblaciones (Wesselmann *et al.*, 2018; Peyran *et al.*, 2021). Los registros de extinciones de invertebrados marinos son extremadamente raros (Carlton, 1993; Carlton *et al.*, 1999; Boero *et al.*, 2013) y no se han documentado previamente de manera consistente. Además, los recientes episodios de extinción se han relacionado principalmente con anomalías térmicas positivas y una exposición prolongada a condiciones de verano más cálidas, junto con la estabilidad de la columna de agua y la reducción de los recursos alimentarios (Coma *et al.*, 2009; Rivetti *et al.*, 2014). Las muertes debidas a enfermedades casi nunca se incluyen entre las causas de extinción, con algunas excepciones, como Dulvy *et al.* (2003). En esta ocasión, la lapa *Lottia alveus* se extinguió en la década de 1930 debido al catastrófico declive de su hábitat

principal, *Zostera marina* desde el Labrador hasta Nueva York en el océano Atlántico occidental. En este caso, la lapa no pudo adaptarse al refugio en agua salobre de *Z. marina* y se extinguió (Carlton *et al.*, 1991). La propagación y virulencia de la infección por *Haplosporidium pinnae* y la distribución geográfica de la nacra, endémica del mar Mediterráneo, proporcionan predicciones igualmente pesimistas para *P. nobilis*. La capacidad de vivir en ambientes parálisis parece ser actualmente la única oportunidad ecológica que queda para evitar el mismo destino que *L. alveus*, pero únicamente supondría un receso en el destino de la especie, si se mantienen las condiciones actuales.

4.2.3.2 Relación entre la temperatura del agua y la supervivencia

Se postuló una hipótesis nula de acuerdo a las observaciones de mortalidad después del desarrollo del programa de rescate, la cual parecía estar relacionada con el aumento de temperatura del agua en los tanques con respecto a la temperatura del agua *in situ*. Esta hipótesis postulaba que la temperatura del agua tendría poco o ningún efecto sobre el parásito y la extinción comenzaría en Portlligat independientemente de la temperatura del agua. En consecuencia, la reducción de la temperatura del agua en los tanques tendría poco o ningún efecto en la reducción de la mortalidad de la nacra. Alternativamente, la temperatura del agua y la mortalidad estarían correlacionadas, de modo que, si la temperatura del agua fuera un factor importante para la infección y de la capacidad de dispersión del parásito, la muerte de individuos comenzaría en Portlligat tan pronto como la temperatura del agua aumentara del mínimo invernal. Por su parte, la mortalidad en los tanques se reduciría si la temperatura del agua se mantuviera a temperaturas similares al mínimo invernal en el mar Mediterráneo (entre 12 °C y 14 °C). Lo más notable fue la observación del inicio de la mortalidad en Portlligat cuando las temperaturas subieron de 12.3 °C a 14 °C (Figura 58), lo que indica la existencia de un umbral de temperatura para la activación del parásito situado entre estas dos temperaturas. Esta observación coincide con los cálculos del modelo de Cabanellas-Reboredo *et al.* (2019) y sugiere que las temperaturas de refugio para *Pinna nobilis* están por debajo de los 14 °C. La importancia de la temperatura en la supervivencia de la nacra se vio reforzada por la mayor supervivencia en los tanques donde se mantuvo una temperatura baja del agua durante más tiempo. En las instalaciones del IFAPA, donde la temperatura se mantuvo entre 14.1 °C y 15.5 °C en el período de diciembre de 2017 a marzo de 2018, la mortalidad mostró una tendencia menor que en las otras estaciones y se disparó en abril, inmediatamente después del aumento a 15.5 °C en marzo. En el Oceanogràfic de Valencia, la mortalidad

total de los individuos se produjo después de mantener una temperatura constante del agua a 17 °C. Este resultado se interpreta como la existencia de un rango de temperaturas entre 13.5 °C y 15 °C, en el que *Haplosporidium pinnae* parece activarse con virulencia moderada y muestra la máxima capacidad de virulencia a temperaturas superiores, > 15 °C. Cabe señalar que, en los tanques, una vez que la temperatura se redujo por debajo de los 14 °C, los individuos enfermos podían permanecer con vida durante varios meses (a diferencia de lo que ocurría cuando se mantenía una temperatura alta del agua como ocurrió con los ejemplares del Oceanogràfic). Por lo tanto, la mortalidad de ejemplares enfermos que se infectaron durante períodos de temperaturas cálidas podría ocurrir cuando la temperatura del agua estuviera fría (< 14 °C) meses después. El *H. pinnae* necesitó más tiempo para matar nacras a bajas temperaturas, una tendencia que se observó claramente por el suave cambio en las pendientes de supervivencia de IEO en Murcia, IMEDMAR-UCV e IFAPA, una vez se redujo la temperatura del agua. La mortalidad de los ejemplares enfermos continuó durante varios meses a bajas temperaturas antes de detenerse, ya que la reducción de la temperatura del agua no detuvo automáticamente la mortandad (Figura 58).

Las infecciones de *Ostrea edulis* por el protozoo *Perkinsus marinus* también son estacionales, alcanzan su punto máximo en verano y otoño, disminuyendo en invierno y primavera. La latencia de los parásitos podría ocurrir durante los meses más fríos del invierno y reactivarse con el aumento de las temperaturas en primavera (McCollough *et al.*, 2007). Asimismo, las infecciones de *Haplosporidium nelsoni* adquiridas a fines del verano por *Crassostrea virginica* pueden persistir durante el invierno y causar mortalidad en abril/mayo del año siguiente (Ford y Haskin, 1982) como se observó con *Haplosporidium pinnae* en la población de Portlligat en Girona.

En cuanto a los individuos rescatados de la bahía dels Alfacs (Tarragona) y alojados en las instalaciones del IRTA, no se vieron afectados por *Haplosporidium pinnae* y su supervivencia no se vio afectada por el umbral de 13.5–14 °C en la temperatura del agua. La mortalidad de estos individuos se debió a una infección bacteriana (*Vibrio mediterranei*) relacionada con las temperaturas cálidas del verano cuando el agua en los tanques superó los 22 °C, mostrando un pico de mortalidad por encima de los 25 °C. Rodríguez *et al.* (2017); Rodríguez *et al.* (2018) aislaron cepas de *V. mediterranei* en nacras enfermas recolectadas en Almería (España) en octubre de 2016 y utilizando estas mismas, observaron una mortalidad del 100% en infecciones experimentales de rodaballo

(*Scophthalmus maximus*) y almeja de manila (*Ruditapes philippinarum*) a 25 y 24 °C respectivamente. Estos valores de temperatura son muy similares a los observados durante el pico de mortalidad en el IRTA. Considerando que *V. mediterranei* es una especie cosmopolita (Tarazona *et al.*, 2014) y que su virulencia depende de temperaturas cálidas de verano ≥ 24 °C, las bacterias parecen ser oportunistas, afectando a algunos individuos débiles pero no responsables de la muerte sucedida en aguas abiertas. Recientemente se ha asociado una *Mycobacterium* con la extinción observada en el mar Tirreno (Carella *et al.*, 2019), lo que ha llevado a los autores a sugerir que se profundice en el estudio de la importancia de las infecciones bacterianas y los efectos sinérgicos entre diferentes patógenos en el aumento de la virulencia de la enfermedad. En contra de lo sugerido por estos autores, los resultados observados en el informe de Navas *et al.* (2020), el bajo número de ejemplares muestreados (n = 13) por la propia Carella *et al.* (2019) una vez gran parte de la población ya había muerto y la detección generalizada de *Haplosporidium pinnae* en áreas con mortalidad de *P. nobilis* (Katsanevakis *et al.*, 2019; García-March *et al.*, 2020), indican que *H. pinnae* es el principal causante de la enfermedad, mientras que el *Mycobacterium* actúa más como un patógeno oportunista. Por su parte, la llegada de *H. pinnae* a la bahía dels Alfacs en julio de 2018 sugiere la presencia de alguna barrera ecológica que limita su capacidad de dispersión o supervivencia en este entorno, ya que murieron la mayoría de individuos que vivían en la parte externa de la bahía, cerca de su desembocadura.

4.2.3.3 Reclutamiento y colectores de larvas

La presencia de juveniles del durante el verano de 2017 en los colectores de larvas de Castellón y Alicante, cabos de la piscifactoría de Villajoirosa (Alicante) y la bahía dels Alfacs (Tarragona), apuntan a que 2017 fue un buen año para la reproducción de la nacra, aunque se desconoce el origen de estas larvas. Las cuatro fuentes principales que estuvieron disponibles en el verano de 2017 probablemente fueron: Islas Columbretes, delta del Ebro, Francia continental y Córcega (Wesselmann *et al.*, 2018). Los juveniles y las larvas de *Ostrea edulis* pueden estar infectados por *Bonamia ostreae*, pero la mortalidad afecta principalmente a las ostras mayores de 2 años (Arzul *et al.*, 2011). Sin embargo, las ostras juveniles de *Crassostrea virginica* expuestas a *Perkinsus marinus* se infectan y mueren rápidamente (McCollough *et al.*, 2007). La presencia de juveniles de *Pinna nobilis* en los colectores y en los cabos de la piscifactoría, indica la posibilidad de sobrevivir algunos meses en aguas abiertas. Sin embargo, si los juveniles de nacra

podieran sobrevivir hasta los dos años, como los de *Ostrea edulis* infectados por *Bonamia ostreae*, tendría que haberse detectado al menos parte de los juveniles asentados durante el verano de 2016, cuyo tamaño debería ser de aproximadamente 20 cm en verano de 2018 (García-March *et al.*, 2007a; García-March *et al.*, 2011a; Kersting y García-March, 2017). Sin embargo, los datos recopilados hasta la fecha muestran que las áreas afectadas no están siendo repobladas de manera natural por *P. nobilis*. La infección confirmada de los juveniles de nacra mantenidos en tanques en el presente estudio, así como la falta de observaciones de nuevos juveniles *in situ* hasta la fecha, indican que los juveniles también están siendo infectados por el protozoo y que la respuesta es más similar a la de *C. virginica* infectada por *P. marinus*. Esta observación difiere de la dinámica de enfermedades infecciosas de otros invertebrados marinos, como el erizo de mar *Diadema antillarum* en el Caribe. Poco después del inicio de la extinción sufrida por esta especie en 1983–1984, se observó un reclutamiento natural, probablemente de larvas que ya estaban presentes en el plancton al llegar la enfermedad. Durante los siguientes 30 años, se observaron pequeños episodios de reclutamiento de individuos. Sin embargo, estos nuevos reclutas sucumbieron posteriormente a la mortalidad, lo que se interpretó como consecuencia de un factor desconocido de la mortalidad posterior al asentamiento. Las poblaciones de *D. antillarum* se han recuperado hasta el 12% de las que existían antes de la extinción, debido a que el reclutamiento en las poblaciones después del período de mortalidad estuvo limitado de manera persistente durante décadas, a pesar de un suministro de larvas que seguía aumentando lentamente (Lessios, 2016). En comparación con la ausencia total de reclutamiento natural observado en *P. nobilis* después de la mortalidad, un resultado similar después de 30 años parece ser un escenario optimista. Teniendo en cuenta las limitaciones adicionales que encuentran las nacras para repoblar las áreas afectadas, podríamos ser testigos de su potencial extinción. La recuperación de las poblaciones de *P. nobilis*, si es posible, en cualquier caso, será un proceso a largo plazo que durará muchas décadas. Los eventos de extinción de invertebrados mediterráneos reportados anteriormente fueron causados generalmente por el calentamiento de las temperaturas del agua de mar y patrones anómalos de baja circulación durante el verano, tanto en hábitats más profundos (Garrabou *et al.*, 2001; Garrabou *et al.*, 2009) como poco profundos (Kersting *et al.*, 2013), y no han afectado a *Pinna nobilis*. Sin embargo, estos eventos fueron generalmente puntuales y no mataron a todas las poblaciones, por lo que las densidades se pudieron recuperar mediante el reclutamiento después de unos años (Cerrano *et al.*, 2005). La actual extinción

experimentada por la nacra es más similar a la observada en *Ostrea edulis*, *Cassostrea gigas* y en la lapa *Lottia alveus* (Carlton *et al.*, 1991). En última instancia, es probable que las poblaciones naturales de *P. nobilis* en el mar Mediterráneo desaparezcan en los próximos años, con la excepción, quizás, de las poblaciones de lagunas costeras. Una pandemia de este tipo es muy inusual en los organismos marinos y plantea interrogantes sobre las acciones que deberían emprenderse en un futuro muy cercano, antes de que se extinga toda la población de mar abierto. Estas acciones deben planificarse teniendo en cuenta la emergencia, ya que la enfermedad ha eliminado las poblaciones de nacra de las costas españolas y se ha extendido a la mayor parte del mar Mediterráneo en solo un par de años.

4.2.3.4 Rescate de individuos

Los programas de rescate han demostrado que las nacras son resistentes a la extracción y el transporte, incluso a largas distancias, como se describe en el presente estudio.

4.2.3.4.1 Ejemplares de la Marina Real de Valencia

Las temperaturas superiores a 14°C durante el mantenimiento de los ejemplares procedentes de la Marina Real de Valencia probablemente aceleraron su muerte, especialmente en las instalaciones de IMEDMAR-UCV. Estos ejemplares se iban a utilizar para la experimentación de reproducción *in situ* y se requerían temperaturas altas para facilitar la maduración de las gónadas. La primera exploración realizada en esta población en diciembre de 2016 no mostraba signos de mortalidad. Sin embargo, dos meses después, cuando se llevó a cabo la recolección de individuos, la mortalidad alcanzaba el 40%. Es reseñable comentar que, en ese tiempo, el patógeno aún no estaba identificado y que se desconocía la relación entre la temperatura del agua y la virulencia de la enfermedad. Por el contrario, se planteó la hipótesis de que mantener a los individuos dentro de su rango de temperatura de confort conocida en el momento (entre 16 °C y 24 °C) (Trigos *et al.*, 2015) podría ayudar a mejorar su capacidad para combatir la enfermedad en condiciones de cautiverio. Así pues, esta mayor temperatura en las instalaciones de IMEDMAR-UCV probablemente aceleró la mortalidad de *P. nobilis*, no quedando ningún ejemplar con vida 7 meses después de la recolección.

Procedentes también de la Marina Real de Valencia, 4 individuos sobrevivieron en buen estado durante 18 meses en el acuario Oceanogràfic donde se mantuvieron a una temperatura constante de 17 °C. Estas ejemplares deberían haber muerto si se infectaron

porque la temperatura era lo suficientemente alta como para causar la muerte rápida de ejemplares infectados. Es posible que estas nacras tuvieran algún tipo de resistencia y mantuvieran al protozoo en una condición crónica y que un debilitamiento incontrolado de su sistema inmunológico pudiera haberlos llevado a su muerte final. Alternativamente, los individuos estaban afortunadamente libres del protozoo cuando fueron recolectados y permanecieron sin infectarse hasta julio de 2018, cuando el tanque pudo haber estado expuesto involuntariamente al protozoo, provocando la muerte de las nacras. Independientemente de las causas, dado que los individuos provenían de una población afectada y sobrevivieron durante 18 meses, se demuestra que es posible prolongar la vida de los ejemplares de *Pinna nobilis* rescatados de áreas afectadas.

4.2.3.4.2 Ejemplares de Portlligat y bahía dels Alfacs

En septiembre de 2018, 12 individuos (11%) de entre los rescatados de Portlligat seguían con vida. En esta fecha la población de donantes ya había desaparecido y no se podía encontrar ningún individuo vivo en esta localización desde el mes anterior. El principal factor que limitó la mortalidad en los tanques fue la disminución de la temperatura del agua por debajo de los 14 °C. Nuevamente, queda patente que el rescate de individuos prolongó su vida, confirmando que es posible salvar nacras provenientes de poblaciones infectadas. *A priori* solo se espera que sobrevivan aquellos ejemplares que no han sido infectados, por lo que la supervivencia dependería de la prevalencia de la infección en el momento de la recolección. La supervivencia fue mucho mayor para los individuos de la bahía dels Alfacs, lo que era esperable porque la enfermedad no había llegado a esta región cuando se recolectaron los individuos. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, hubo una mortalidad durante el período de estabulación asociada a *Vibrio mediterranei*, que también se sabe que infecta a otras especies de bivalvos (Tarazona *et al.*, 2014). Con el nuevo conocimiento de la presencia de *V. mediterranei* en *Pinna nobilis* en condiciones de cautividad, las muestras que se tomaron en ejemplares muertos y fueron analizadas para detectar la presencia de *Haplosporidium pinnae* deben volver a revisarse en busca de bacterias para evaluar la posibilidad de coexistencia de otros patógenos presentes.

4.2.3.5 Jaulas de exclusión de depredadores

Todos los ejemplares de *Pinna nobilis* utilizados en este experimento murieron en agosto de 2018. Sería posible que un mayor número de jaulas favoreciera la supervivencia de algunos individuos –los más resistentes–, sin embargo, instalar y mantener uno o dos órdenes de magnitud más de jaulas sumergidas en el mar, resultaría un trabajo muy exigente para los bajos niveles de éxito esperados. Considerando estos resultados, parece más razonable y asequible rescatar ejemplares y mantenerlos en condiciones de cautividad, que protegerlos de depredadores *in situ* esperando que sobrevivan al parásito. Sin embargo, el impacto más positivo de enjaular respecto a rescatar individuos es que, en el caso de la jaula, un superviviente implicaría una resistencia mucho mayor a *Haplosporidium pinnae*, lo que lo haría mucho más importante a la hora de combatir la enfermedad.

4.2.3.6 Acciones y recomendaciones

A partir de la información recopilada durante los años de seguimiento de la especie, se pueden emprender una serie de acciones y recomendaciones para mejorar la supervivencia de la nacra. Estas actuaciones darían más tiempo y, por lo tanto, una mayor esperanza de supervivencia de *Pinna nobilis*. Ahora bien, no es posible conocer si su implementación evitaría la extinción potencial de la nacra o no puesto que depende de muchas variables incontrolables (algunas aún desconocidas). Una acción inminente debería ser la protección de las poblaciones en lagunas, eliminando o minimizando las actividades que podrían crear una amenaza para las nacras que viven en ellas. La protección de los individuos en jaulas parece ser ineficaz, a menos que se proteja un gran número de especímenes y, aun así, el éxito de incrementar el número de jaulas debería ser reevaluado. Alternativamente, rescatar individuos parece ser una buena opción incluso si provienen de una población afectada. Otro aspecto importante es comprender el motivo por el que los ejemplares que viven en entornos parálisis no se ven afectadas por la extinción (por ejemplo, la laguna del Mar Menor) o están menos gravemente afectadas (bahía dels Alfacs). No parece claro si se trata de la temperatura y/o la salinidad o de alguna condición química que se produzca en estos ambientes, impidiendo la entrada directa, matando al parásito, o indirecta, eliminando algún vector potencial del mismo. Pese a que tanto la laguna del Mar Menor como el delta del Ebro no muestran variaciones extremas de salinidad, sus salinidades son hiperhalina e hipohalina respectivamente, en comparación con el mar Mediterráneo, por lo que *Haplosporidium pinnae* podría no tener

la capacidad de adaptarse a condiciones de temperatura y/o salinidad del agua (Cabanellas-Reboredo *et al.*, 2019). Alternativamente, las nacras que sobreviven en estos entornos estresantes podrían poseer algún tipo de resistencia. El estudio de las condiciones ambientales de las lagunas y las diferencias genéticas entre los individuos que viven dentro y fuera de las lagunas o deltas costeros, podría ayudar a comprender mejor el comportamiento y los ciclos vitales de *H. pinnae*. Además, la obtención de más información sobre otras nacras que sobrevivan en entornos parálisis en áreas afectadas, mejoraría la comprensión de los factores que condicionan su supervivencia. El cierre del ciclo de reproducción en cautividad de *Pinna nobilis* sería un avance fundamental para garantizar la supervivencia de la especie. Una vez que se domine el proceso de reproducción en cautividad, se podría aplicar a individuos resistentes para que desarrollen semillas resistentes y repoblar las poblaciones devastadas de nacra. Finalmente, las búsquedas extensivas de individuos resistentes en poblaciones ya afectadas son de suma importancia, ya que estos individuos podrían proporcionar las semillas para futuras repoblaciones en aguas abiertas con juveniles producidos artificialmente.

En cuanto al rescate de individuos, es aconsejable extraer nacras antes de la llegada del parásito en aquellas escasas áreas del Mediterráneo donde aún no está presente. De lo contrario, se deben recolectar grupos pequeños entre 5 y 10 individuos para permitir la selección de aquellos que gocen de buena salud, es decir, extensión total del manto y una respuesta de cierre rápido de las valvas ante estímulos externos. Después de colocarlos en agua fría, preferiblemente a 12.5 °C, los individuos deben ser revisados diariamente, especialmente la extensión del manto, durante las siguientes semanas para mantener únicamente a aquellos que muestran extensión total del manto. Se recomienda la repartición de los ejemplares en el mayor número de grupos posible, ya que, si algún individuo está infectado, puede infectar a otros en el mismo tanque, especialmente si la temperatura del agua supera los 14 °C. Por lo tanto, es muy importante mantener una baja temperatura y aislar rápidamente a cualquier individuo que presente cualquier síntoma de la enfermedad. Es recomendable obtener muestras de manto de todos los individuos, conservarlas en etanol absoluto y analizarlas para detectar la presencia del parásito mediante PCR (Catanese *et al.*, 2018; López-Sanmartín *et al.*, 2019). *Perkinsus marinus* y *Haplosporidium nelsoni*, que infectan a *Crassostrea virginica*, experimentan una transmisión y prevalencia reducidas a temperaturas invernales de 10 a 15 °C, aunque *P. marinus* puede sobrevivir a temperaturas tan bajas como 4 °C (Soniati *et al.*, 2008). Los

brotos repetidos también pueden reducir las infecciones por *P. marinus* en *C. virginica* a temperaturas bajas, lo que resulta en una baja prevalencia general, una baja mortalidad de ostras y un buen crecimiento (La Peyre *et al.*, 2003). Ya hemos visto que *Pinna nobilis* puede sobrevivir en ambientes parálisis sometidos a importantes oscilaciones estacionales de salinidad y temperatura. Aunque existe una brecha de conocimiento con respecto a sus límites de tolerancia, la distribución del hábitat sugiere que es una especie eurihalina y euriterma. Considerando que la salinidad extrema del delta del Ebro y el Mar Menor es una de las posibles variables ambientales que previenen la infección de las nacras por el parásito, valdría la pena determinar si esta especie puede sobrevivir a bajas temperaturas ($< 8\text{ }^{\circ}\text{C}$) y a salinidad extrema ($< 15\text{ psu}$ o $> 45\text{ psu}$). Tomando como referencia los resultados publicados por Cabanellas-Reboredo *et al.* (2019), es razonable sospechar que la transmisión y replicación de *Haplosporidium pinnae* puede verse restringida al menos por las bajas temperaturas y probablemente también por las salinidades extremas como se observa en otros protozoos similares. Un tratamiento combinado con bajas temperaturas y salinidades extremas podría ser una buena opción para mantener a los individuos durante las primeras semanas de cuarentena. Esta estrategia podría reducir la transmisión de la enfermedad entre individuos, mientras que los individuos sanos y enfermos son separados. Además, debería estudiarse si la prevalencia del parásito en los ejemplares infectados podría reducirse con este tipo de tratamientos.

El mar Mediterráneo ha sido considerado un laboratorio para examinar procesos globales (Krijgsman, 2002; Lejeusne *et al.*, 2010) utilizando *Pinna nobilis* como especie modelo (Basso *et al.*, 2015c). Cuando comenzó este evento de mortalidad masiva de la nacra muchos equipos de investigación ya estaban estudiando la especie debido a su interés ecológico y social. Como sugirió previamente Dulvy *et al.* (2003), las extinciones marinas pueden subestimarse debido al bajo poder de detección y al lapso prolongado (en promedio 53 años) entre el último avistamiento de un organismo y la notificación de la extinción. En el contexto actual de impactos antropogénicos y cambio climático, el caso de la nacra muestra que la virulencia y velocidad de los eventos de mortalidad masiva pueden aumentar. Se necesitarán respuestas rápidas de gestión a los eventos infecciosos de mortalidad masiva provocados por el cambio climático de modo que, tanto los investigadores como las partes interesadas, deberán estar preparados para actuar en colaboración para responder a estas amenazas. Además, el actual evento de mortalidad

masiva muestra que los efectos de las enfermedades infecciosas tienen implicaciones importantes en la futura redistribución de las especies y la biodiversidad. Esto justificaría su consideración en los modelos de predicción como por ejemplo el de Jones y Cheung (2015), porque sus efectos son globales y ocurren en períodos de tiempo muy cortos, comparados incluso con la velocidad del cambio climático, y pueden tener efectos estructurales considerables en la comunidad biológica (Harvell *et al.*, 2019).

4.2.4 Influencia de la temperatura en la filtración y el consumo de oxígeno de *Pinna nobilis*

4.2.4.1 Mediciones fisiológicas

La temperatura es uno de los principales factores que afectan el metabolismo de los bivalvos (Newell y Branch, 1980), incluida su capacidad de filtración (Fuchs y Specht, 2018; Specht y Fuchs, 2018). La tasa de aclaramiento (CR) normalmente aumenta con la temperatura hasta el límite de tolerancia de la especie, cuando se observa un rápido decaimiento de la capacidad filtradora (Griffiths y Griffiths, 1987). En consecuencia, en el presente estudio la CR en *Pinna nobilis* aumentó correlativamente con la temperatura, alcanzando su máximo a 28 °C.

Sin embargo, mientras que la CR casi se duplicó de 23 °C a 28 °C, el VO₂ apenas aumentó, como puede observarse por una ratio más elevada en CR / VO₂ a 28 °C. El aumento de la CR sin un aumento constante del VO₂ indica la implicación de un metabolismo anaeróbico para mantener los gastos metabólicos de esta mayor actividad de filtración. En invertebrados marinos, la aparición de este metabolismo anaeróbico en aguas oxigenadas podría indicar los límites de la tolerancia térmica (Anestis *et al.*, 2007). Podríamos considerar este umbral a 28 °C como una temperatura por encima de la temperatura de pejus, una temperatura a partir de la cual observaríamos este debilitamiento del suministro de oxígeno provocando un estrés metabólico, provocando que se alcanzara el límite de tolerancia a largo plazo (Pörtner, 2002). Por lo tanto, la resistencia de los individuos se convertiría en una cuestión de tiempo dependiendo de sus reservas y su tolerancia al hambre (Pörtner, 2002). En caso de alcanzarse una temperatura crítica se produciría el colapso del metabolismo, como observaron Anestis *et al.* (2007) en *Mytilus galloprovincialis*, con un 20% de mortalidad durante los primeros 5 días a 28 °C. Esta conclusión se vería reforzada por el alto coeficiente Q₁₀ obtenido para la CR en el rango 23–28 °C, que indicaría una alta dependencia térmica y por lo tanto la superación

del límite de confort térmico de la especie (Albentosa *et al.*, 1994; Nie *et al.*, 2017). De manera similar, Basso *et al.* (2015b) observaron también un estrés térmico a 26 °C con una mayor mortalidad de juveniles de *P. nobilis* mantenidos en cautividad en comparación con individuos mantenidos a temperaturas más bajas de 20 y 23 °C durante una exposición a estas temperaturas de 36 días. Prado *et al.* (2019b) también observaron una alta mortalidad de individuos como consecuencia del aumento de temperaturas por encima de los 25 °C, aunque en este caso fue consecuencia de una infección por *Vibrio mediterranei*. En el presente estudio, la exposición a cada temperatura fue de una semana, lo que podría ser insuficiente para causar un crecimiento excesivo de patógenos o condiciones de mayor estrés para causar mortalidad. Probablemente, una exposición a largo plazo habría puesto a prueba la capacidad de las nacras para tolerar altas temperaturas (28 °C). Además, el estrés inherente del cautiverio podría hacer que *P. nobilis* sea aún más vulnerable a temperaturas elevadas y enfermedades asociadas en comparación con el mar abierto (Dickens *et al.*, 2010). Se observó también una clara disminución de la CR y el VO₂ a bajas temperaturas (8 °C), y se observó un Q₁₀ extremadamente alto en el rango de 8–14 °C, especialmente para la CR, lo que indica una alta dependencia térmica (Albentosa *et al.*, 1994; Saucedo *et al.*, 2004). De manera similar al límite térmico superior testado, a una temperatura fría de 8 °C, encontramos que se habría sobrepasado la temperatura de pejus, por lo que la resistencia a largo plazo de las nacras se vería comprometida a causa de la baja actividad ciliar de las branquias, lo que causaría inanición y baja absorción de oxígeno (Pörtner, 2002).

La CR específica de masa registrada a 18 °C para *Pinna nobilis* (5.68 l g⁻¹ h⁻¹) es similar a la observada para *Pinna rudis* (5.29 l g⁻¹ h⁻¹) (ver apartado 3.3.2.3. Tasas fisiológicas). Por el contrario, Nieves-Soto *et al.* (2013) observaron una CR mucho menor para todas las temperaturas medidas en el pínrido *Atrina tuberculosa* (0.37, 1.39 y 3.96 l g⁻¹ h⁻¹ respectivamente a 17, 22.5 y 28 °C para *A. tuberculosa* vs 5.68, 7.86 y 13.45 l g⁻¹ h⁻¹ respectivamente a 18, 23 y 28 °C para *P. nobilis*). Las elevadas diferencias podrían ser consecuencia de una aplicación errónea de la FTC. La diferencia en la concentración de partículas entre la entrada y la salida debe ser inferior al 30% (Riisgård, 2001), sin embargo, Nieves-Soto *et al.* (2013) observaron una diferencia del 90% (un flujo de 50 ml min⁻¹ frente a una filtración mínima observada de 45 ml min⁻¹), subestimando así la capacidad de filtración real de *A. tuberculosa*. La CR específica de masa en *Pinna nobilis* fue mayor en general en comparación con la de otros grupos de bivalvos como mejillones,

vieiras, ostras y berberechos (Cranford *et al.*, 2011), aunque se han reportado CR incluso más altas en otras especies como *Pinctada margaritifera* y *Pinctada maxima* (Yukihira *et al.*, 1998; Pouvreau *et al.*, 1999), con una RC máxima de 25.88 l g⁻¹ h⁻¹ a 28 °C (frente a un máximo de 19.67 l g⁻¹ h⁻¹ para *P. nobilis* a la misma temperatura).

El efecto de la temperatura sobre el metabolismo y la CR en bivalvos resulta en una influencia directa sobre el consumo de oxígeno (VO₂) (Buxton *et al.*, 1981), como consecuencia del mayor gasto energético con el aumento de la CR (Navarro *et al.*, 1992; Velasco y Navarro, 2002). Por el contrario, Trigos *et al.* (2015) observaron un mayor VO₂ a 20 °C que a 25 °C. Una posible explicación podría ser el uso de diferentes individuos por Trigos *et al.* (2015) para el experimento a 20 °C y 25 °C, especialmente considerando que los resultados se muestran por individuo, no estandarizados. Además, Trigos *et al.* (2015) observaron valores más bajos de consumo de oxígeno por individuo a 16 °C (3.1 mg O₂ indiv⁻¹ h⁻¹) en comparación con el presente estudio a 14 °C (4.2 mg O₂ indiv⁻¹ h⁻¹) a pesar de que los individuos en el presente estudio eran más pequeños y la temperatura más baja. Por el contrario, Basso *et al.* (2015b) observaron un VO₂ muy superior al del presente estudio, con valores superiores a 1.5 mg O₂ g⁻¹ h⁻¹ a 20 °C y 23 °C y superiores a 3.0 mg O₂ g⁻¹ h⁻¹ a 26 °C vs valores de 1.35 mg O₂ g⁻¹ h⁻¹ en el presente estudio a 28 °C. Las variaciones entre Basso *et al.* (2015b) y el presente estudio podría explicarse por diferencias de tamaño. Los individuos utilizados por Basso *et al.* (2015b) fueron más pequeños (longitud máxima de 9.48 cm) que los del presente estudio, y se puede esperar un VO₂ más alto por g⁻¹ en individuos más pequeños. Alternativamente, las diferencias en el VO₂ podrían deberse a la variación del óptimo térmico como consecuencia de las distintas temperaturas de aclimatación de los ejemplares (Newell *et al.*, 1977; Buxton *et al.*, 1981), que fue de 20 °C en Basso *et al.* (2015b) vs. 14 °C en el presente experimento. Ambos argumentos encajarían con los resultados observados en la presente tesis para *Pinna rudis* (3.3.2.3. Tasas fisiológicas), donde un tamaño intermedio de individuos (18.4 cm), aclimatado a una temperatura intermedia de 18 °C, mostró un VO₂ intermedio por g⁻¹ (1.61 mg O₂ g⁻¹ h⁻¹ a 18 °C en *P. rudis* vs 0.92 mg O₂ g⁻¹ h⁻¹ a 18 °C en *P. nobilis* vs 1.55 – 3.51 mg O₂ g⁻¹ h⁻¹ a 20 °C en Basso *et al.* (2015b)).

4.2.4.2 Rol ecológico de *Pinna nobilis*

La alta CR específica de masa observada en *Pinna nobilis*, junto con su gran tamaño, confirman la hipótesis de que la nacra destaca por su gran capacidad como filtro de agua. Los ejemplares estudiados, con un tamaño de ≈ 30 cm mostraron una capacidad de filtración por individuo de 78.59 l día^{-1} a 8.5 °C , $608.78 \text{ l día}^{-1}$ a 14 °C , $827.67 \text{ l día}^{-1}$ a 18 °C , $1,142.82 \text{ l día}^{-1}$ a 23 °C y $2,208.86 \text{ l día}^{-1}$ a 28 °C . Además, cabe considerar que la especie puede alcanzar hasta 120 cm (Zavodnik, 1991), siendo común observar tamaños superiores a 50 cm (García-March *et al.*, 2019), y podría esperarse que se detecte una CR más alta por individuo en adultos mucho más grandes que los individuos utilizados en el presente estudio. Por tanto, el impacto ambiental de las nacras sería sustancial, especialmente para aquellas áreas cerradas con grandes poblaciones que son, además, las únicas áreas con poblaciones resistentes a la enfermedad, como la laguna del Mar Menor (Giménez-Casalduero *et al.*, 2020), el delta del Ebro (Prado *et al.*, 2020b), varias lagunas costeras del golfo de León (Peyran *et al.*, 2021), la laguna de Marano (Curiel *et al.*, 2020) y el mar de Mármara (Cinar *et al.*, 2021).

Como parte del estudio sobre qué impacto podría tener la nacra como filtrador en estos ambientes parálidos, se puede realizar una aproximación considerando la CR observada para ejemplares de *Pinna nobilis* ≈ 30 cm para aquellos ambientes para los que hay datos disponibles respecto al número de individuos. Además, estas áreas son particularmente susceptibles a sufrir acumulaciones de nutrientes debido a mayores impactos antropogénicos y baja renovación de agua (Kennish y Paerl, 2010), por lo que la importancia de la filtración de agua por parte de las nacras será mayor en comparación a mar abierto. La bahía dels Alfacs, el lugar donde se extrajeron los ejemplares de *P. nobilis* utilizados en este experimento, tenía una población estimada de 90,303 individuos (Prado *et al.*, 2014). Esta bahía recibe aportes de nutrientes del riego agrícola (Mañosa *et al.*, 2001; Falco *et al.*, 2010) y tiene un volumen aproximado de 150 hm^3 (Jordana *et al.*, 2015). El tiempo de renovación de agua es de 45 días en la parte interior de la bahía, aunque el tiempo de renovación disminuye considerablemente cerca de la desembocadura de la bahía (Cerralbo *et al.*, 2019). La filtración de agua de la población de nacras en esta área podría alcanzar un 4% del volumen total de la bahía dels Alfacs en un mes (Tabla 17). Para el Mar Menor, el impacto de las nacras aumenta sustancialmente dado el mayor aislamiento de la laguna y el mayor número de ejemplares. En la laguna de agua salada más grande de Europa, la amenaza de eutrofización ha sido constante durante años

(Velasco *et al.*, 2006; Robledano Aymerich *et al.*, 2008) antes del colapso de la laguna a fines de 2015 (García-Ayllon, 2018), cuando la población estimada de *P. nobilis* era de 1,609,943 individuos para 2013–2014 (Giménez-Casalduero *et al.*, 2020). Para esta laguna, el volumen total se estima en 598.8 hm³ y el tiempo de renovación de agua es de 384 días (Umgiesser *et al.*, 2014). La capacidad de filtración de la población de nacras podría llegar a un 16.6% del volumen total de la laguna en un mes (Tabla 17). Además, es importante considerar que en ambas áreas era común encontrar ejemplares de *P. nobilis* de tamaños mayores (> 30cm) (García-March, 2005; García-March *et al.*, 2019) por lo que se podría esperar una mayor capacidad de filtración.

Tabla 17: Estimación del porcentaje del volumen total filtrado al mes por las poblaciones de *Pinna nobilis* en la bahía dels Alfacs y en el Mar Menor en función de la temperatura.

Temperaturas	Porcentaje del volumen total filtrado	
	Bahía dels Alfacs	Mar Menor
°C		
8.5	0.14	0.63
14	1.10	4.91
18*	1.50	6.68
23	2.06	9.22
28	4.00	17.82

* Temperatura del agua media anual para el Mar Menor (Romero *et al.*, 2020) y Alfacs (Fernández-Tejedor *et al.*, 2010).

El interés de utilizar el cultivo de mejillones para mejorar la calidad del agua y la sustracción de nutrientes ha ido creciendo en los últimos años, reportando resultados positivos y viabilidad económica para los proyectos (Petersen *et al.*, 2014; Ferreira y Bricker, 2016; Bricker *et al.*, 2017; Dvarskas *et al.*, 2020). Las estimaciones realizadas con *Pinna nobilis* son solo una aproximación, pero un buen indicador del potencial de la especie como bioextractor. Además, en algunos programas de restauración se ha incorporado un sustrato duro para mejorar el asentamiento de ciertos bivalvos como las ostras (zu Ermgassen *et al.*, 2020), y se ha demostrado que la gran superficie de concha de *P. nobilis* proporciona una superficie dura sobre la que asentarse a multitud de organismos, incluidas especies de moluscos como *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis*, *Pinctada radiata* y *Anomia epphipium* (Addis *et al.*, 2009; Rabaoui *et al.*, 2009). La restauración y el mantenimiento de las poblaciones de *P. nobilis* supervivientes es

esencial para la especie, especialmente dada la resiliencia de *Haplosporidium pinnae* en mar abierto, y esta línea de trabajo podría vincularse también como un programa de restauración para entornos parálisis bajo amenazas como la eutrofización.

Sin embargo, los resultados observados a 28 °C deben considerarse con cautela para las poblaciones que habitan estos ambientes parálisis. Estas áreas pueden alcanzar y superar durante el verano los 28 °C (Yalçın *et al.*, 2017; Prado *et al.*, 2020b; Romero *et al.*, 2020; Llorca *et al.*, 2021) y la resistencia de *Pinna nobilis* a esas temperaturas podría llegar a su límite dado el aumento de la duración y la intensidad de las olas de calor (Cramer *et al.*, 2018; Abbasnia y Toros, 2019). Por otro lado, temperaturas tan bajas como 8 °C son infrecuentes en mar abierto (García-March *et al.*, 2011b), pero pueden ocurrir en áreas someras de las lagunas costeras, cuyo reducido volumen de agua y circulación las hacen más propensas a condiciones climáticas extremas (Quintana *et al.*, 2018a). La superación del confort térmico podría afectar la esperanza de vida de *P. nobilis*, como fue observado por García-March *et al.* (2019) para las poblaciones de nacra que habitan en lagunas costeras y deltas.

4.2.4.3 *Pinna nobilis* en cautividad

Los datos proporcionados en los presentes experimentos son útiles para implementar protocolos de alimentación para el mantenimiento a largo plazo de *Pinna nobilis* en cautiverio y para mejorar la calidad de la semilla con el fin de cerrar el ciclo reproductivo de la especie. Partiendo de los valores de la CR y el VO₂ obtenidos en este experimento, hemos estimado los requerimientos alimenticios y el *scope for growth* (SFG) para ejemplares de *P. nobilis* a diferentes temperaturas (Tabla 18). Para las estimaciones de SFG, hemos asumido que i) la eficiencia de absorción en *P. nobilis* no sería significativamente diferente (60.6%) a la obtenida para *P. rudis* alimentados con la misma concentración de células de *Isochrysis galbana* (T-ISO) (apartado 3.3.2.3. Tasas fisiológicas), ii) el contenido de energía de *Isochrysis galbana* es de 23 J mg⁻¹ y 1 ml de oxígeno es igual a 20.33 J (Widdows y Johnson, 1988), iii) la energía perdida por excreción es insignificante ya que generalmente representa menos del 5% de la energía adquirida (Bayne y Newell, 1983), iv) la POM en la dieta se consideró de 1.14 mg MO l⁻¹ en función de la ratio (0.54 mg MO (mm³)⁻¹) obtenida en el apartado 2.3.2.4.3. Características de las dietas (Tabla 4).

El SFG estimado con una dieta de 1.14 mg MO l⁻¹ indicaría condiciones de alto estrés para ejemplares de *Pinna nobilis* a una temperatura de 8 °C, con un SFG < 5 J g⁻¹ h⁻¹ (Widdows *et al.*, 2002), lo que se ajusta a la presunción de un límite de tolerancia térmica a 8 °C. La SFG obtenida a 18 °C fue mayor que la obtenida para *P. rudis* (37.7 J g⁻¹ h⁻¹, ver apartado 3.3.2.3. Tasas fisiológicas) a la misma temperatura sin embargo, la POM fue menor en el experimento con *P. rudis* (0.83 mgMO l⁻¹). La menor concentración de comida por lo tanto resultaría en una menor ingestión ante un nivel de filtración similar, lo que explicaría al menos parte de las diferencias observadas. De hecho, con una misma dieta de 1.14 mgMO l⁻¹, el SFG resultante habría sido muy similar (61.87 J g⁻¹ h⁻¹ para *P. rudis*). Sin embargo, el SFG obtenido a 28 °C debe considerarse con cautela. Como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos para la tasa CR/VO₂ mostraron claros signos de un metabolismo anaeróbico, por lo que la tasa metabólica rutinaria estimada para esta temperatura estaría subestimada, resultando en un menor SFG en un contexto de estrés metabólico.

Tabla 18: Tasa metabólica de rutina (RMR) expresada en J g⁻¹ h⁻¹, tasa de absorción (AR) considerando la eficiencia de absorción de *Pinna rudis* (apartado 3.3.2.3. Tasas fisiológicas) expresada en J g⁻¹ h⁻¹, tasa de mantenimiento (SFG = 0) expresado como % del peso seco de ejemplares de *P. nobilis* y estimación del alcance de crecimiento (SFG) para el presente experimento con una dieta de 1.14 mgMO l⁻¹.

Temperature	RMR	AR	Dieta SFG = 0	SFG
°C	J g ⁻¹ h ⁻¹	J g ⁻¹ h ⁻¹	(%)	J g ⁻¹ h ⁻¹
8.5	3.69 ± 0.86	6.35 ± 3.17	0.64 ± 0.15	2.66 ± 2.55
14	9.97 ± 1.55	49.42 ± 15.77	1.72 ± 0.27	39.44 ± 14.87
18	12.14 ± 2.28	65.71 ± 21.75	2.10 ± 0.40	53.56 ± 19.88
23	15.67 ± 3.70	90.89 ± 30.50	2.70 ± 0.64	75.22 ± 28.05
28	17.80 ± 1.17	168.32 ± 37.18	3.06 ± 0.20	150.90 ± 36.97*

* Existen evidencias de una subestimación de la tasa metabólica de rutina a 28 °C, lo que indicaría un estrés metabólico a esta temperatura y un SFG menor al obtenido.

Es importante considerar que no existe consenso sobre si la eficiencia de absorción (AE) cambia en función de la temperatura o no. En algunos estudios se ha observado que esta se mantiene con cambios de temperatura mientras que en otros disminuye o aumenta con el aumento de temperatura dependiendo de la especie (Widdows y Bayne, 1971; Buxton *et al.*, 1981; Ezgeta-Balić *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2019). Por lo tanto, futuras

investigaciones deberían enfocarse en dilucidar cuál es el efecto de la temperatura sobre la tasa de absorción en *Pinna* spp.

Teniendo en cuenta la filtración continua por bivalvos y el umbral límite de la producción de pseudoheces, lo recomendable en la alimentación de *P. nobilis* sería la administración de una dieta continua. Sin embargo, la administración continua de una dieta no es siempre posible en función de los medios disponibles, por lo que en segunda instancia se recomendaría una dieta por encima del porcentaje mínimo de DW distribuida en dosis por debajo del umbral de pseudoheces, que debería servir para el mantenimiento de los individuos en cautiverio y favorecer su crecimiento somático y gonadal.

4.3 *Pinna rudis* como modelo de aspectos biológicos de la familia Pinnidae

4.3.1 Crecimiento de *Pinna rudis*

Las instalaciones de acuicultura proporcionan grandes superficies adecuadas para el asentamiento y fijación de larvas de multitud de organismos del denominado *biofouling*. Este proceso a menudo se considera una molestia porque daña las instalaciones y podría tener efectos negativos en las especies cultivadas (Dürr y Watson, 2010; Fitridge *et al.*, 2012; Bannister *et al.*, 2019). Sin embargo, entre el *biofouling* asentado, también se pueden encontrar algunas especies en peligro de extinción, como indica Theodorou *et al.* (2015) respecto a *Pinna nobilis*, o el presente trabajo con *P. rudis* y *P. nobilis*. Aunque generalmente pasan desapercibidas, estas especies se tratan en su conjunto con el resto de organismos incrustantes y se descartan durante la limpieza de los cabos. Sería recomendable aprovechar estos eventos de reclutamiento natural y utilizar lo que se considera un desecho para la recuperación de determinadas especies (Theodorou *et al.*, 2015). Además, la legislación de estas prácticas y la implicación de la industria en programas de conservación ayudarían también a mejorar la percepción pública de la acuicultura (Bacher, 2015; Froehlich *et al.*, 2017). En el género *Pinna*, una de las principales causas naturales de mortalidad juvenil es la depredación, que disminuye con el incremento de la edad y el tamaño (Butler *et al.*, 1993; Basso *et al.*, 2015c). Los adultos tienen una vida larga (Butler, 1987; Rouanet *et al.*, 2015; Nebot-Colomer *et al.*, 2016), aunque los tamaños más grandes los hacen más vulnerables a la hidrodinámica fuerte (García-March *et al.*, 2007b; Hendriks *et al.*, 2011; Nebot-Colomer *et al.*, 2016), siendo las características del hábitat un factor determinante en su esperanza de vida (García-March *et al.*, 2019). En el presente estudio, el experimento de mantenimiento en el medio natural de *Pinna rudis* en jaulas sumergidas con luz de malla de 4.5 x 4.5 mm, previno la mortalidad debido a depredación y/o factores ambientales estresantes como la hidrodinámica. Las jaulas mantuvieron a los individuos protegidos, evitando la depredación observada en otros estudios con juveniles de *Pinna* (Arizpe, 1995; Narvaez *et al.*, 2000; Beer y Southgate, 2006; Kozul *et al.*, 2011). Wu y Shin (1998) también observaron mortalidad por depredación, aunque las mayores pérdidas (superiores al 90%) se observaron en individuos trasplantados al fondo sin ningún tipo de protección. Esto también fue observado por Cendejas *et al.* (1985), quienes compararon diferentes métodos de cultivo y obtuvieron un 100% de supervivencia en aquellos que fueron completamente eficientes para mantener alejados a los depredadores. En *Pinna*, la unión

al sustrato se logra mediante el biso (Basso *et al.*, 2015c), por lo tanto, los individuos recién trasplantados necesitan tiempo para adherirse al fondo mediante estas fibras, lo que los hace durante este periodo más vulnerables a la hidrodinámica o los depredadores. Así pues, una fijación natural para sujetarlos, jaulas anti-depredadores, o una extensión artificial del biso sería necesaria para fijar a los individuos al lecho marino y maximizar su supervivencia (Hernandis *et al.*, 2018). La alta tasa de crecimiento registrada en el presente estudio (hasta 1.32 mm d⁻¹) sugiere que la capacidad de alimentación de los individuos no se vio afectada por la malla. Wu y Shin (1998) también observaron que la capacidad de alimentación no se vio afectada por la jaula para ejemplares de *Pinna bicolor*, aunque utilizaron una abertura de malla mayor (65 mm), lo que podría haber permitido la entrada de depredadores y explicaría la mayor mortalidad de juveniles observada. En contraste, la abertura de malla de 4.5 mm utilizada en el presente estudio, junto con la limpieza mensual de las jaulas, evitó la entrada de depredadores, al tiempo que permitió la circulación del agua. Además, este sistema podría haber proporcionado condiciones más estables y menos traumáticas para el desarrollo de *Pinna rudis* en el interior de las jaulas, en comparación con el medio natural, donde la hidrodinámica u otros factores a menudo provocan roturas o erosión de la concha, modificando su forma. Esto podría explicar la mayor correlación alométrica de largo vs ancho observada en el presente estudio ($R^2 = 0.94$, p-valor < 0.001), en comparación con las encontradas por Cosentino y Giacobbe (2006) para *P. rudis* ($R^2 = 0.82$, p-valor < 0.001) y *P. nobilis* ($R^2 = 0.57$, p-valor < 0.01).

A pesar de la desaparición de una de las jaulas con 10 individuos, el 0% de mortalidad natural detectada en las de los grupos 1 y 2, respalda que el uso de una metodología similar sería un método de “engorde” eficaz para *Pinna* spp. Los ejemplares obtenidos mediante el reclutamiento (Cabanellas-Reboredo *et al.*, 2009; Kersting y García-March, 2017), podrían criarse en jaulas suspendidas y luego trasplantarse cuando alcanzaran tamaños mayores, haciéndolos menos vulnerables a la depredación. Esta técnica podría ser una herramienta útil especialmente para la recuperación de *P. nobilis*. De manera similar, la estimación del DW a través de la longitud en *P. rudis* podría usarse como una aproximación del DW en *P. nobilis*. DW es una variable común utilizada en los bivalvos para la determinación de la proporción de la dieta, que es necesaria para el mantenimiento y la maduración de los individuos y también para estandarizar los parámetros fisiológicos (Winter, 1978; Bayne y Newell, 1983; Albentosa *et al.*, 2012b) y su aproximación con *P.*

rudis permite evitar la pérdida invaluable de individuos de *P. nobilis*. El crecimiento máximo registrado para un individuo en el presente estudio (1.32 mm d^{-1}) es la tasa mensual más alta reportada para la familia *Pinnidae*, aunque anteriormente ya se habían observado tasas de un crecimiento rápida en otras especies de la familia. De hecho, esta es una característica de supervivencia, porque la estructura fina y simple de la parte posterior de la concha (Schultz y Huber, 2013), permite una rápida regeneración y adaptación de *Pinna* spp. a ambientes extremos, donde el daño y la rotura de la concha es habitual. Estos ambientes ocurren típicamente en áreas someras expuestas a hidrodinámica (García-March *et al.*, 2019) o a otros riesgos como el impacto de embarcaciones (Prado *et al.*, 2014) o desecación en aguas someras (Prado, com. Pers.). Por ejemplo, los individuos de la bahía dels Alfacs (delta del Ebro) muestran altas tasas de regeneración de conchas, lo que permite la supervivencia de los individuos en condiciones difíciles. Butler y Brewster (1979) estimaron un tamaño asintótico de la concha al año de edad, de 20 cm para *Pinna bicolor*, aunque la edad podría haber sido subestimada por la ausencia del registro externo de anillos de marcas musculares (García-March *et al.*, 2011a). En *P. nobilis*, Richardson *et al.* (1999) estimó tasas máximas de crecimiento de hasta 1 mm d^{-1} durante los meses más cálidos del primer año de vida, aunque se ha demostrado que la metodología para la determinación de la edad utilizando el registro externo de las marcas del músculo aductor posterior proporciona medidas de edad subestimadas (García-March y Marquez-Aliaga, 2007; García-March *et al.*, 2011a). En otros estudios de crecimiento en condiciones de cultivo en mar abierto, Narvaez *et al.* (2000) observaron una tasa de crecimiento de 0.77 mm d^{-1} en *P. carnea* durante los primeros cuatro meses, seguida de una disminución a 0.30 mm d^{-1} en un período de 14 meses. Kozul *et al.* (2011) detectaron un crecimiento máximo de 0.58 mm d^{-1} durante un mes en *P. nobilis*. Por su parte, Arizpe (1995) reportó para *Pinna rugosa* una tasa de crecimiento de 0.65 mm d^{-1} , muy destacable considerando que fue durante un año entero, con un pico máximo de 1.1 mm d^{-1} durante un mes (mayo-junio). Beer y Southgate (2006) reportaron una tasa de crecimiento promedio de 0.42 mm d^{-1} durante un año en *P. bicolor*. Las tasas de crecimiento más altas, generalmente se mantienen durante el período inicial de vida. A partir de entonces, la tasa de crecimiento disminuye normalmente con la llegada del primer invierno (Butler, 1987; Arizpe, 1995), al menos para las especies no tropicales (Narvaez *et al.*, 2000). De manera similar, los juveniles de *P. rudis* en el presente estudio mostraron mayores tasas de crecimiento durante los primeros cuatro meses, entre el 29 de junio y 8 de noviembre de 2018. La disminución en las tasas de

crecimiento coincidió con la caída de la temperatura por debajo de los 20 °C, característica ya observada para *P. nobilis* por Richardson *et al.* (1999). Del mismo modo, Cendejas *et al.* (1985) detectaron correlación positiva entre temperatura y crecimiento en *P. rugosa*. Otros parámetros ambientales, como la clorofila *a* y el OD, mostraron una correlación indirecta con el crecimiento en el presente estudio. Por el contrario, Acarli *et al.* (2011) encontró una correlación positiva entre el crecimiento, la clorofila *a* y la materia inorgánica particulada y ninguna correlación con la temperatura en *P. nobilis*. Los diferentes métodos utilizados para medir la clorofila *a* en ambos estudios, impiden una comparación más profunda de esta variable entre ellos. En un principio, parece contradictorio que, en el presente estudio, los meses de crecimiento más rápido de *P. rudis* coincidan con los de menor presencia de clorofila *a*. Sin embargo, esto podría ser un indicador de que, el lugar donde se ubicó el experimento, la disponibilidad de alimento fue suficiente como para cumplir con las altas tasas de crecimiento observadas. Una explicación plausible es que la notable frecuencia de corrientes constantes en la zona de ubicación de las jaulas detectada por los buzos durante las inmersiones de muestreo podría proporcionar el alimento necesario mediante la renovación del agua incluso siendo la concentración de clorofila *a* relativamente baja. Wu y Shin (1998) encontraron una tasa de crecimiento más alta en los individuos de cultivo suspendidos en comparación con los del fondo, sugiriendo que un mayor flujo de corriente en la columna de agua puede mejorar la disponibilidad de alimento. En este escenario, las correlaciones indirectas observadas entre la clorofila *a* y las tasas de crecimiento estacional se deberían a que los *blooms* estacionales de fitoplancton alcanzan su punto máximo en primavera y otoño y disminuyen en verano siguiendo las tendencias de los nutrientes; estos patrones son típicos de los mares templados (Cognetti *et al.*, 2001; Miller, 2009). De manera similar, la correlación indirecta entre el crecimiento estacional y el OD sería el resultado de la correlación indirecta que existe entre la temperatura y el OD. Cabe reseñar que, durante los dos años de seguimiento, los picos máximos de crecimiento estacional se observaron después de la ruptura de la termoclina en noviembre y coincidiendo con un aumento de la concentración de clorofila *a* (por encima de 0.4 µg L⁻¹), además con temperaturas del agua aún moderadas (por encima de 20 °C). Pero tan pronto como la temperatura descendió por debajo de los 20 °C, las tasas de crecimiento cayeron drásticamente, a pesar de concentraciones más altas de clorofila *a*. Esto podría implicar que *Pinna rudis* podría haber crecido incluso más de lo observado durante los meses más cálidos del verano si el alimento (representado por la concentración de clorofila *a*) hubiera sido más abundante

durante este período, pero a pesar de la mayor disponibilidad de alimento, el crecimiento cae por debajo de un umbral de temperatura del agua (aprox. 20 °C). La disponibilidad de alimento ha sido señalada como el factor más importante que modula las tasas de crecimiento de los bivalvos (Gosling, 2015), aunque Killam y Clapham (2018); Saulsbury *et al.* (2019) encontraron en la temperatura su mejor predictor, especialmente para los bivalvos de mares templados. Como se observa en el presente estudio, ambos factores podrían jugar un papel importante en la modulación del crecimiento, unas veces sumando y otras contrarrestando sus efectos, dependiendo de su variabilidad anual y los límites de tolerancia de la especie a su variación.

En cualquier caso, las tasas de crecimiento observadas deberían poder confirmarse también en otras poblaciones. Los juveniles del presente estudio se recolectaron a principios de junio de 2018, pero la temporada de reproducción ocurre supuestamente durante los meses cálidos del año anterior, como también se observa para *Pinna nobilis* (Deudero *et al.*, 2017). De hecho, en el momento del hallazgo de los juveniles en febrero de 2018, la longitud de la concha ya era de 34.9 ± 6.2 mm, lo que respalda que el reclutamiento se había producido varios meses antes. Sin embargo, los individuos mantuvieron un tamaño pequeño y un crecimiento bajo mientras estuvieron sujetos a los cabos de la instalación acuícola (34.9 ± 6.2 mm en el momento del hallazgo en febrero frente a 48.6 ± 8.8 mm de los detectados y recolectados en junio de 2018) a pesar de que se suelen observar las tasas de crecimiento más altas durante el primer año. Por lo tanto, es plausible que los individuos podrían haber tenido entre 10 y 12 meses de edad cuando se colocaron en las jaulas en junio de 2018. Se ha demostrado que las condiciones ambientales modifican el tamaño y el crecimiento de los individuos en *P. nobilis* (García-March *et al.*, 2019) y es probable que las condiciones extremas de estar fijados a un cabo a poca profundidad, restringieran el crecimiento forzando el pequeño tamaño de los individuos. El colocarlos en las jaulas fondeadas y suspendidas podría haber resultado en mejores tasas de crecimiento durante los meses siguientes, en comparación con lo que se esperaría en el campo. Independientemente de la causa, el modelo de crecimiento arrojó una K de 1.16, muy superior a la obtenida por Nebot-Colomer *et al.* (2016) para otras poblaciones de *P. rudis* y por García-March *et al.* (2019); Prado *et al.* (2020b) para diferentes poblaciones de *P. nobilis* (valor máximo de 0.39 para la población de la bahía del Fangar en Tarragona). Por el contrario, el L_{∞} obtenido en el presente estudio es menor que el de otras poblaciones de pínidos mediterráneos (Nebot-Colomer *et al.*, 2016;

García-March *et al.*, 2019; Prado *et al.*, 2020b) y más bajo de lo que podría esperarse para ejemplares de *P. rudis* que crecen en, supuestamente, buenas condiciones en el hábitat natural. Sin embargo, el modelado de los primeros tres años de vida (dos años de datos) en una especie longeva dificulta la determinación del crecimiento asintótico de estos individuos. Una drástica desaceleración en la tasa de crecimiento, como se observa en el presente estudio, podría interpretarse erróneamente en el modelo matemático como el alcance de la asíntota, a pesar de que los individuos podrían seguir creciendo a un ritmo mucho más lento, pero notable, hasta alcanzar tamaños máximos típicos de la especie en los siguientes años. Alternativamente, las severas condiciones de vida en los cabos acuícolas durante el primer año después del reclutamiento podrían haber resultado en una mayor tasa de crecimiento cuando los individuos fueron trasplantados a las jaulas, pero haber producido también efectos deletéreos que limitaran su tamaño asintótico. Posteriores investigaciones sobre estos individuos podrán clarificar si realmente han alcanzado su tamaño máximo o si continúan creciendo más lentamente. Futuros estudios también servirán para esclarecer si el aumento de la temperatura del mar Mediterráneo afecta al crecimiento y expansión de las poblaciones de *P. rudis* en el contexto del cambio climático. El calentamiento de los océanos, especialmente en aguas relativamente cerradas como el mar Mediterráneo (Giorgi y Lionello, 2006; Diffenbaugh *et al.*, 2007), podría causar un impacto negativo en especies inadaptadas (Schwartz *et al.*, 2006), pero beneficiar a otras especies más aptas para aguas cálidas, como *P. rudis* (Barea-Azcón *et al.*, 2008). El presente estudio ha demostrado que el crecimiento de *P. rudis* se reduce fuertemente a temperaturas inferiores a 20 °C, lo que significa que inviernos más cortos y cálidos, como se predice en los modelos climáticos para el mar Mediterráneo (Moraitis *et al.*, 2019; Molina *et al.*, 2020), extenderían el periodo de crecimiento estacional de *P. rudis*. Un crecimiento más rápido podría reducir la mortalidad por depredación (Kersting y García-March, 2017) aumentando, por lo tanto, la densidad de la población, lo que podría conducir, eventualmente, a una expansión de su nicho ecológico sobre una parte del que dejó vacío *P. nobilis*.

4.3.2 Fisiología energética de *Pinna rudis*

4.3.2.1 Tasas fisiológicas: Análisis cuantitativo

El presente estudio muestra la primera estimación del crecimiento potencial o *Scope For Growth* (SFG) en *Pinna*, género que ya se ha comentado, incluye grandes bivalvos raramente criados en cautiverio. *Pinna rudis*, al igual que otras especies del género *Pinna*, suelen encontrarse en posición vertical o con cierta inclinación con respecto al suelo. Las pruebas preliminares de la tasa de filtración (CR) mostraron que su capacidad filtradora no se ve afectada por la posición del cuerpo, vertical u horizontal, en condiciones de laboratorio. En campo, donde las condiciones en la columna de agua y la re-suspensión del sedimento son variables, la posición vertical podría tener la ventaja de poder filtrar agua de mayor calidad (con menos partículas de sedimento) reduciendo el costo energético que supone la producción de pseudoheces para liberar el exceso de partículas. Los experimentos desarrollados en laboratorio incluían una concentración de partículas por debajo del umbral de pseudoheces considerado para muchos bivalvos (Bayne *et al.*, 1979; Widdows *et al.*, 1979; Bayne, 1993) y se consideró que la posición del animal parece ser irrelevante para los estudios fisiológicos.

Como se ha explicado anteriormente en material y métodos, el estado de protección de *Pinna rudis* pesó en la decisión de no sacrificar más individuos de los estrictamente necesarios y, por lo tanto, la estandarización no se realizó por g de peso seco de biomasa. Se tiene constancia de que la condición de los animales es variable dependiendo de las condiciones ambientales, enfermedades o estado de maduración y, por lo tanto, se asume que puede haber una variación del peso seco (DW) real frente a la obtenida a través de la ecuación. Sin embargo, esta aproximación podría ser la mejor opción, y a veces la única, para especies protegidas con densidades poblacionales bajas.

Uno de los principales roles ecológicos asociados a *Pinna* spp. es su contribución a la generación de aguas limpias y claras por su capacidad de filtrar grandes volúmenes de ésta (Basso *et al.*, 2015c). Las principales variables que afectan a la tasa de filtración en los bivalvos son la temperatura, la salinidad, la viscosidad del agua, la velocidad de la corriente, la concentración de alimentos y el tamaño de los individuos (Winter, 1978; Cranford *et al.*, 2011). En el presente estudio, los individuos alimentados con la dieta control mostraron una tasa de aclaramiento (CR) de $5.29 \text{ l g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Nieves-Soto *et al.* (2013) observaron en *Atrina tuberculosa* una CR mucho menor de $0.37 \text{ l g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para una

temperatura (17 °C), POM (0.579 mg l⁻¹) y tamaño de ejemplares (17.0–20.5 cm) similares. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente (4.2.4.1. Mediciones fisiológicas) la discrepancia podría deberse a una aplicación incorrecta del método de cámara de flujo continuo (FTC). Por el contrario, Arrieche *et al.* (2011) describieron para otra especie de este género, *A. maura*, una tasa de ingestión dos veces a la observada para *Pinna rudis* en nuestro estudio (229 J g⁻¹ h⁻¹). Las diferencias podrían explicarse por una concentración de alimentos tres veces mayor, temperatura más elevada (26 °C) y la menor talla de los ejemplares (72.4 mm). Para otras especies de bivalvos, Albentosa *et al.* (2012b) observaron un rango de CR entre 2.5 y 6.83 l g⁻¹ h⁻¹ para *Mytilus galloprovincialis* a una temperatura menor de 15 °C y a una menor concentración de alimento de 0.5 mg POM L⁻¹, o para el caso de *Ruditapes philippinarum* que mostró un CR de 5.8 l g⁻¹ h⁻¹ a la misma temperatura y a una concentración de alimento similar a la del presente estudio (TPM = 1.57 mg l⁻¹, POM = 1.20 mg l⁻¹) (Tamayo *et al.*, 2011). A pesar de que los pínidos son conocidos por su rápido crecimiento (Schultz y Huber, 2013), la tasa de filtración (CR) estandarizada por peso en *P. rudis* no fue diferente a la de otros bivalvos conocidos (Cranford *et al.*, 2011). Aun así, *Pinna* spp. muestra su máximo crecimiento durante el primer año de vida (Butler y Brewster, 1979; Richardson *et al.*, 1999; Narvaez *et al.*, 2000), por lo que cabría esperar unas tasas fisiológicas estandarizadas a peso seco más altas en individuos más pequeños que los utilizados en presente experimento.

La eficiencia de absorción (EA) está relacionada principalmente con el tiempo de residencia del alimento en el intestino, dependiendo así de la tasa de ingestión (IR) y, en consecuencia, de la tasa de aclaramiento y concentración de partículas (variables con las que se calcula la IR, (Bayne y Newell, 1983)). Por debajo del umbral de formación de pseudoheces, la IR aumenta junto con la concentración de alimentos y, como consecuencia, disminuye la EA (Griffiths y Griffiths, 1987). Sin embargo, las diferencias en la eficiencia de absorción en la dieta de control (60.60%) con respecto a otros bivalvos, fueron independientes de la concentración de alimento. En este sentido, Ibarrola *et al.* (2008) describieron una EA menor, con un rango entre 40–60%, para el berberecho *Cerastoderma edule*, alimentado con una dieta de microalgas a una concentración mayor (3 mm³ l⁻¹, 1.6 mg POM l⁻¹). Para concentraciones de alimento más bajas (0.5 mg POM l⁻¹), Albentosa *et al.* (2012b) obtuvieron también un rango de EA más bajo (40–65%) para *Mytilus galloprovincialis* y con una concentración de alimento similar a la del presente estudio (1.3 mg POM L⁻¹), Tamayo *et al.* (2011) describieron un EA menor, alrededor

del 50%, en juveniles de *Ruditapes philippinarum*. En el caso de otras especies del género *Atrina*, la EA fue ligeramente superior a *Pinna rudis*, 70.00 y 74.44% respectivamente para *Atrina maura* y *A. tuberculosa* (Arrieche *et al.*, 2011; Nieves-Soto *et al.*, 2013). Sin embargo, estos resultados podrían no ser comparables ya que en esos estudios las dietas experimentales estaban compuestas exclusivamente por microalgas sin partículas de sedimento, tal y como se contempla en nuestro estudio, considerando la aplicación del método Conover que requiere la incorporación de partículas inorgánicas (generalmente del sedimento) que aumentan la materia inorgánica (componente trazador) de la dieta dado el bajo contenido inorgánico de fitoplancton (Conover, 1966; Albentosa *et al.*, 2012b).

Los requerimientos de energía para mantener las funciones vitales se reflejan en los bivalvos a través del consumo de oxígeno (VO_2) como el gasto de energía metabólica. El VO_2 de *Pinna rudis* bajo la dieta Control fue $26.46 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, menor en comparación a *Ruditapes Philippinarum* ($35.2 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), a pesar de una temperatura y tasa de aclaramiento similares (Tamayo *et al.*, 2011). Para *Mytilus galloprovincialis*, Albentosa *et al.* (2012b) observó un VO_2 inferior ($6\text{--}10 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) como era de esperar teniendo en cuenta la temperatura más fría ($15 \text{ }^\circ\text{C}$) y para *Atrina maura*, se observó un VO_2 más alta ($66\text{--}160 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) probablemente como consecuencia también de una temperatura más alta, en este caso ($26 \text{ }^\circ\text{C}$) (Arrieche *et al.*, 2011).

El alcance de los resultados de crecimiento potencial o *Scope For Growth* (SFG) para *Pinna rudis* bajo la dieta Control ($37.31 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) reflejó un alto potencial de crecimiento y condiciones de estrés bajas si lo comparamos con los valores de referencia dados en otros estudios como Widdows *et al.* (2002) ($> 15 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y Albentosa *et al.* (2012b) ($> 18 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), siendo además comparables a los valores más altos obtenidos para distintas poblaciones de *Mytilus galloprovincialis* estudiadas por Albentosa *et al.* (2012b) y superiores a los obtenidos por Tamayo *et al.* (2011) para *Ruditapes Philippinarum* ($25.2 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). En bivalvos, el exceso de energía se emplea para el crecimiento y la reproducción. Utilizando los datos de crecimiento *in situ* con *Pinna rudis* (3.3.1. Crecimiento de *Pinna rudis*), realizamos una estima del coste energético del crecimiento para la comparación con los resultados de SFG obtenidos en laboratorio. Estas estimaciones se realizaron de nuevo mediante la estimación del peso seco (ver apartado 2.3.1.4. Relación morfométrica y análisis estadístico) y transformado este incremento de DW en J considerando un contenido orgánico de 0.82 y 1 mg de materia orgánica como

23 J (Widdows y Johnson, 1988). Mediante esta aproximación, observamos que el gasto energético máximo en crecimiento *in situ* fue de $14.24 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (en el período junio-julio de 2018 para un tamaño de 48.64 a 69.46 mm). Además, para una comparativa cercana a las condiciones del estudio de fisiología energética en laboratorio (a una temperatura de $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y un tamaño de $\approx 18 \text{ cm}$), el periodo más similar en términos de temperatura y tamaño sería el de junio-julio de 2019, periodo en el que la estimación del gasto energético de crecimiento sería de $3.46 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Por lo tanto, observamos que el gasto energético *in situ* estimado resultaría en valores menores al SFG en condiciones de laboratorio, lo cual es esperable dada la maximización de la disponibilidad de alimento en el tiempo para los individuos de *P. rudis* estabulados. Sin embargo, debe tenerse en cuenta en cualquier caso que, para los ejemplares *in situ*, no se está considerando la posible inversión de energía en la acumulación de reservas y la maduración, por lo que el gasto energético real, si se pudieran tomar datos reales del peso seco, podría ser superior al estimado y, por lo tanto, acercarse más a los valores observados en el laboratorio.

El balance energético total permite estimar una ración de mantenimiento (SFG = 0), por encima de la cual se obtendría un balance positivo y, por tanto, una energía disponible para crecimiento y maduración. Esta ración de mantenimiento, considerada como un porcentaje diario del peso seco de los individuos, podría calcularse utilizando los gastos metabólicos (consumo de oxígeno), la eficiencia de absorción y considerando 1 mg de materia orgánica como 23 J (Widdows y Johnson, 1988). El 3.96% de ración del DW obtenido para los individuos de *Pinna rudis* es similar a las recomendaciones para otros bivalvos, en las que se sugiere una relación del 3–6% (Delgado y Pérez Camacho, 2003; Marshall *et al.*, 2014; Maneiro *et al.*, 2020), considerando que Helm (2004) recomendó raciones más altas ($> 6\%$) para impulsar el crecimiento y raciones más bajas para el acondicionamiento (2–4%).

A tenor de nuestros resultados, se puede asumir una buena asimilación de *Isochrysis galbana* (t-ISO), lo que indica que *Pinna rudis* puede adquirir suficiente energía para el crecimiento y la maduración a partir del fitoplancton vivo. Aun así, Prado *et al.* (2020a) obtuvieron resultados deficientes de crecimiento y supervivencia en los juveniles alimentados exclusivamente con fitoplancton vivo, en comparación con las observaciones de campo, a pesar de que se les proporcionó una ración diaria elevada. En este sentido, la baja eficacia observada por Prado *et al.* (2020a) podría ser consecuencia de la alta concentración de las dos únicas dosis diarias administradas de $380 \cdot 10^6 \text{ cel l}^{-1}$ que supone

una cantidad seis veces superior a la suministrada en el presente estudio. Cuantitativamente, las dosis proporcionadas por Prado *et al.* (2020a) podrían contener suficiente MO para satisfacer las necesidades energéticas diarias, pero es muy probable que superen el umbral de pseudoheces, forzando a estos bivalvos a limpiar el agua rechazando la comida antes de la ingestión tal y como sugieren (Bayne *et al.*, 1989; Bayne, 1993). Por tanto, para maximizar la producción y aproximarse al crecimiento y supervivencia observados en el medio natural, se recomendaría una alimentación continua o una distribución de la ración diaria en dosis por debajo del umbral de pseudoheces.

Se ha considerado la posibilidad de aportar fuentes adicionales de alimento, como grupos de zooplancton para contrarrestar el menor crecimiento de *Pinna nobilis* en cautividad (Prado *et al.*, 2020a). De hecho, Davenport *et al.* (2011) encontraron especies de micro y mesozooplancton en el contenido intestinal de *P. nobilis* y, por otra parte, Prado *et al.* (2021) observaron una presencia significativa de fuente zooplanctónica, hasta un 34.9%, junto a una importante contribución de fitoplancton mediante el uso de isótopos. Morton y Puljas (2019) también destacan el potencial de la glándula bucal y el estómago para la digestión de este tipo de presas y describe esta especie como depredadora oportunista, que podría usar su órgano paleal para aturdir y capturar especies marinas mesoplanctónicas, endo y epibentónicas. Como consecuencia, la necesidad de un suplemento de zooplancton en *Pinna* spp. debería ser considerado para su mantenimiento en cautividad.

4.3.2.2 Comparación de dietas

El uso de dietas alternativas para los bivalvos puede ahorrar los inconvenientes y costes de la producción de microalgas vivas (Coutteau y Sorgeloos, 1992; Helm, 2004; Willer y Aldridge, 2019), sin embargo, la dieta artificial debe cumplir ciertos requisitos como un tamaño de partícula adecuado para la ingestión, digestibilidad, un perfil nutricional adecuado y no toxicidad (Knauer y Southgate, 1999; Cheng *et al.*, 2020). El producto comercial Shellfish Diet 1800[®] ha mostrado éxito para la cría de larvas de algunas especies de bivalvos como la almeja gigante *Tridacna noae* (Militz *et al.*, 2021) o la ostra *Pteria penguin* (Southgate *et al.*, 2016) utilizando una dieta basada al 100% en este producto. Sin embargo, los individuos de *Pinna rudis* alimentados con la dieta shellfish (SF) mostraron una disminución importante, inferior a la mitad de la tasa de filtración

(CR), en comparación con la dieta de control. Este hecho podría deberse a una adaptación para disminuir el gasto energético de la filtración en una situación de inanición de estrés nutricional como apuntan Albentosa *et al.* (2007). Esta caída en la capacidad de filtración de los individuos también se refleja en una menor eficiencia de absorción (AE) para SF, a pesar de que un mayor tiempo de transición a través del intestino, dada la menor tasa de ingestión (IR), debería favorecer la absorción. La AE es un indicador de la digestibilidad de la dieta que refleja, por tanto, una menor digestibilidad del producto de SF, como también se ha observado en otras especies con otras dietas 100% artificiales (Albentosa *et al.*, 1997; Arney *et al.*, 2015). Se detectó un consumo de oxígeno menor (VO_2) en los individuos bajo la SF como consecuencia probablemente de la menor actividad de filtración que mostraron, al igual que se indica en los trabajos de (Navarro *et al.*, 1992; Velasco y Navarro, 2002), dando como resultado un menor gasto de energía. Además, los deficientes resultados en la tasa de absorción (AR) obtenidos de la IR y la AE mostraron grandes diferencias entre la dieta SF y CO para el *scope for growth* (SFG) a pesar de que el VO_2 fue menor para SF. Los individuos sometidos a SF expresan un balance energético negativo ($-3.00 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), lo que indica condiciones de estrés elevado (Widdows *et al.*, 2002) y una insuficiente adquisición de energía a través de la dieta para el mantenimiento de los procesos vitales (Albentosa *et al.*, 2007). Este fenómeno podría derivar en un proceso catabólico ya observado en ejemplares estabulados de *Pinna nobilis* por Prado *et al.* (2021). Se desconoce la causa de esta mala asimilación de la dieta *shellfish* por parte de *P. rudis*, aunque Prado *et al.* (2020a) también observaron un bajo rendimiento utilizando un concentrado diferente de microalgas en *P. nobilis*, lo que podría indicar una incompatibilidad entre la fabricación de estos productos y estas especies.

La aceptación de una dieta artificial puede mejorarse mediante la adición de microalgas vivas, mejorando la digestibilidad de la dieta artificial y permitiendo a su vez una sustitución parcial en la dieta de microalgas vivas (Brown y Robert, 2002; Doroudi *et al.*, 2002; Babuin, 2009; Arney *et al.*, 2015; Tanyaros y Chuseingjaw, 2016). En este sentido, la dieta mixta (MX) mejoró considerablemente los resultados en comparación con la dieta *shellfish* (SF). Por consiguiente, no se observaron diferencias significativas en la tasa de aclaramiento (CR) ni la tasa de ingestión (IR) entre la dieta control (CO) y MX. Sin embargo, aunque la eficiencia de absorción (EA) de MX mejoró en comparación con SF, fue menor que CO, confirmando así la baja digestibilidad de *Shellfish Diet 1800®* por parte de *Pinna rudis*. Por su parte, el consumo de oxígeno (VO_2) fue similar entre CO y

MX, probablemente como resultado de gastos metabólicos parejos dados por un CR similar. Sin embargo, a pesar de la EA más baja en MX, se obtuvieron resultados de *Scope For Growth* (SFG) similares entre ambas dietas (CO y MX), lo que implica una cantidad de energía disponible muy parecida, utilizando ambas dietas para el crecimiento y la maduración. La razón de un SFG análogo, a pesar de las diferencias observadas en EA, podría explicarse por un mayor IR en MX (no significativo, pero levemente mayor), lo que implica una mayor ingesta de la dieta resultando en una mayor tasa de absorción (AR) y compensando el menor EA. De hecho, la IR es el principal parámetro fisiológico que influye en la tasa de crecimiento (Toro *et al.*, 2003). Aun así, el resultado de una EA más baja podría indicar una inadecuación de Shellfish Diet 1800® para *Pinna* spp., un resultado altamente resaltado con la dieta SF. Babuin (2009) observó la falta de proteasa digestiva después de 60 días de exposición alimentaria, un tiempo mayor al experimentado en nuestro trabajo. Así pues, la exposición prolongada a MX podría deteriorar los resultados observados en el presente estudio como consecuencia de la menor digestibilidad de la dieta, por lo que los resultados observados en MX deberían tomarse con precaución. En resumen, los resultados obtenidos sobre las dietas junto al estado de protección de *Pinna* spp., especialmente *Pinna nobilis*, se desaconsejaría también el uso de una dieta mixta en pínidos, en favor de las dietas frescas.

4.3.2.3 Implicaciones para *Pinna nobilis*

Los distintos experimentos realizados en el presente estudio, centrados en *Pinna rudis*, hasta la fecha una especie poco estudiada, pretenden, además de incrementar el conocimiento relativo a esta especie, poder trasladarlo a otras especies del género *Pinna*, de manera especial, para el caso de *Pinna nobilis*, en peligro crítico de extinción. Lamentablemente, hasta la fecha no se han establecido técnicas de maricultura para estas especies, probablemente debido al bajo interés comercial (Velasco y Borrego, 2004; Basurto, 2006; Katsanevakis *et al.*, 2008), si bien la situación actual ha puesto a la nacra en el centro de atención para tratar de evitar su extinción. Así las cosas, la falta de individuos vivos y sanos ofrece pocas posibilidades de investigar y mejorar las condiciones y requisitos del mantenimiento en cautividad de *P. nobilis*. Los resultados obtenidos en este trabajo que utilizan *P. rudis* como modelo, podrían ayudar a comprender la fisiología de esta especie próxima y así poder acelerar el desarrollo de protocolos para el mantenimiento de *P. nobilis* en cautividad.

El uso de dietas alternativas en *Pinna* spp. se desaconseja a tenor de los resultados obtenidos en el presente trabajo y los estudios previos de Prado *et al.* (2020a). El fitoplancton se revela como la principal fuente de las dietas para bivalvos en la acuicultura hasta la fecha y también debería ser la base para *Pinna* spp. Las dietas alternativas podrían evitar algunos de los inconvenientes de la producción de microalgas vivas, pero aún no se han mejorado lo suficiente para garantizar su viabilidad y desgraciadamente el margen de error con *P. nobilis* es mínimo. Sin embargo, el complemento de zooplancton en la dieta debe ser investigado en profundidad dadas las peculiaridades de la especie y los buenos resultados observados en otros estudios (Morton y Puljas, 2019; Prado *et al.*, 2020a).

La dieta de mantenimiento obtenida en este trabajo debe considerarse como una dieta mínima a incrementar para favorecer el crecimiento somático y gonadal siguiendo las recomendaciones de (Albentosa *et al.*, 2012a) para otros bivalvos. Sin duda, aún son muchos los pasos que dar para poder dominar el cultivo de esta especie y es importante profundizar en el análisis de las variaciones de su metabolismo con la temperatura, factor cuyo incremento favorece la maduración (Utting y Millican, 1997) pero que debería reducirse para disminuir la mortalidad por *Haplosporidium pinnae* (Cabanellas-Reboredo *et al.*, 2019; García-March *et al.*, 2020). También es preceptivo poder estimar el coste energético de la maduración de las gónadas, asegurando un balance energético positivo suficiente para la reproducción. Se debe considerar que las similitudes entre especies (*Pinna rudis* y *P. nobilis*) fomentan una comparación cualitativa y por tanto se puede esperar un efecto fisiológico similar de una dieta, pero desde el punto de vista cuantitativo, podría ser necesario escalar los requerimientos energéticos habida cuenta del mayor tamaño que puede alcanzar *Pinna nobilis* (Nebot-Colomer *et al.*, 2016; García-March *et al.*, 2019). Finalmente, considerando que el régimen de alimentación y la concentración de la dieta afectan en gran medida el proceso fisiológico de otros bivalvos (Barillé *et al.*, 1997; Albentosa, 2002; Helm, 2004) debería también ser estudiado en *Pinna*. spp.



5. Conclusiones

Durante el desarrollo de la presente tesis se han estudiado diferentes aspectos de la ecofisiología y el hábitat de *Pinna nobilis* en un contexto de mortandad masiva causada por el protozoo parásito *Haplosporidium pinnae*. Para ello se han monitorizado las condiciones ambientales en las que se encontraba la población de *Pinna nobilis* de Calp (Alicante), se ha estudiado el efecto de la temperatura sobre su actividad de valvas y se han desarrollado modelos de crecimiento para poblaciones de nacra habitando ambientes diferentes. También se ha realizado un seguimiento del evento de mortandad que está asolando a las poblaciones de *P. nobilis*, en colaboración con instituciones nacionales e internacionales, analizando su evolución e implementando medidas para mejorar el conocimiento de la enfermedad y que permitieran mejorar la situación de la especie. Asimismo, se han desarrollado experimentos de fisiología energética en laboratorio, tanto con la especie objetivo *P. nobilis* como con su congénere *P. rudis*, que ha sido utilizada como modelo biológico del género *Pinna* ante la situación de peligro crítico de extinción de la nacra. Con la intención de maximizar los resultados en su uso como modelo biológico, se realizó un experimento de crecimiento en mar abierto para conocer el efecto de las variables ambientales en su desarrollo. A tenor pues de los resultados obtenidos, se plantean las siguientes conclusiones:

- El análisis de los parámetros oceanográficos estudiados muestra que la turbidez alta que se alcanza durante fuertes tormentas puede suponer un alto riesgo para ejemplares de *Pinna nobilis*, ya que estos valores pueden causar la muerte debido al agotamiento de los ejemplares.
- La temperatura controla el patrón de actividad de valvas de *Pinna nobilis*. Hemos observado que, por encima de 24.5 °C, las nacras mantenidas en el laboratorio pasan de un patrón 2 de invierno a un patrón 1 de verano.
- El estudio de crecimiento a partir de las conchas revela la existencia de al menos tres modelos de crecimiento dependientes del ambiente en el que habitan las poblaciones: SO, poblaciones de mar abierto en zonas someras o profundas y al abrigo de hidrodinámicas perjudiciales; EO, poblaciones de mar abierto expuestas a hidrodinámicas perjudiciales; LG, poblaciones de lagunas costeras.
- Las poblaciones de nacras que presentan una esperanza de vida más baja y que al mismo tiempo son las únicas que han sobrevivido al evento de mortandad masiva, son las localizadas en lagunas costeras y deltas. Los resultados de esta tesis

apuntan a que estas poblaciones no garantizan la supervivencia de la especie a largo plazo.

- La temperatura por encima de los 13.5 °C favorece la incidencia de la mortandad de ejemplares infectados por *Haplosporidium pinnae*. Los ejemplares mantenidos en temperaturas más frías son capaces de sobrevivir durante varios meses a la infección.
- Las jaulas de exclusión de depredadores no han supuesto una mayor supervivencia de los ejemplares infectados, aunque esto puede deberse al bajo número de ejemplares protegidos y la alta virulencia de la enfermedad.
- Se ha estimado por primera vez la capacidad de filtración de *Pinna nobilis*. Así, por ejemplo, individuos de 30 cm pueden llegar a filtrar más de 2500 l día⁻¹ a una temperatura ambiente de 28 °C, lo que indica el elevado poder de depuración del agua de esta especie.
- *Pinna nobilis* puede vivir a temperaturas extremas de 8.5 y 28 °C. Los datos de fisiología energética muestran que la exposición a estas temperaturas supondría la muerte de los individuos por agotamiento a corto/medio plazo. Temperaturas entre 14 y 23 °C son las más adecuadas para el mantenimiento de esta especie en cautividad.
- Los experimentos realizados han permitido establecer la alimentación adecuada en función de la temperatura para el mantenimiento en cautividad de ejemplares del género *Pinna*.
- *Pinna rudis* presenta el máximo crecimiento registrado hasta la fecha para un bivalvo (1.32 mm día⁻¹). De los distintos parámetros ambientales estudiados, la temperatura muestra la mejor correlación con el crecimiento de esta especie.
- Se presenta una relación entre el tamaño de *Pinna rudis* y su peso seco, este último es fundamental para el cálculo de la cantidad de alimento que debe suministrarse a los bivalvos en cautividad. Los resultados de esta tesis muestran que se puede utilizar como aproximación para el cálculo de la alimentación de ejemplares de *P. nobilis*.
- Se aconsejan dietas basadas en microalgas vivas en lugar de dietas artificiales para el mantenimiento de ejemplares del género *Pinna*, dado que el *Scope for Growth* con estas últimas es muy inferior al que se obtiene con fitoplancton vivo.

- Habida cuenta de la delicada situación en la que se encuentra en la actualidad *Pinna nobilis*, el cambio climático puede tener consecuencias fatales sobre las escasas poblaciones supervivientes en los ambientes parálisis, por lo que se hace necesaria la búsqueda de alternativas para la recuperación de la especie.

Por último, esta tesis pretende contribuir al inicio de la recuperación de *Pinna nobilis*. Para ello, será necesario profundizar en los protocolos planteados para el mantenimiento en cautividad de la nacra a largo plazo. Asimismo, el cierre del ciclo reproductivo y su aplicación a ejemplares resistentes supondrá el punto de inflexión necesario para la recuperación de la especie.



6. Referencias bibliográficas

- ABBASNIA, M. & TOROS, H. 2019. Analysis of long-term changes in extreme climatic indices: a case study of the Mediterranean climate, Marmara Region, Turkey. *In*: VILIBIĆ, I., HORVATH, K. & PALAU, J. L. (eds.) *Meteorology and Climatology of the Mediterranean and Black Seas*. Cham: Springer International Publishing.
- ACARLI, D., ACARLI, S. & ÖKTENER, A. 2020. Mass Mortality Report of Critically Endangered Fan Mussel (*Pinna nobilis*, Linnaeus 1758) from Cunda Island, Ayvalık (Aegean Sea, Turkey). 1, 109-117.
- ACARLI, S., LOK, A., YIGITKURT, S. & PALAZ, M. 2011. Culture of fan mussel (*Pinna nobilis*, Linnaeus 1758) in relation to size on suspended culture system in Izmir Bay, Aegean Sea, Turkey. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17, 995-1002.
- ADDIS, P., SECCI, M., BRUNDU, G., MANUNZA, A., CORRIAS, S. & CAU, A. 2009. Density, size structure, shell orientation and epibiotic colonization of the fan mussel *Pinna nobilis* L. 1758 (Mollusca: Bivalvia) in three contrasting habitats in an estuarine area of Sardinia (W Mediterranean). *Scientia Marina*, 73, 143-152.
- AJI, L. P. 2011. The use of algae concentrates, dried algae and algal substitutes to feed bivalves. *Makara Journal of Science*, 15(1), 1-8.
- ALBENTOSA, M. 2002. Effect of Food Concentration Inside Eelgrass Beds on the Energy Balance of the Invasive Mussel *Musculista Senhousia*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 35, 247-260.
- ALBENTOSA, M., BEIRAS, R. & CAMACHO, A. P. 1994. Determination of optimal thermal conditions for growth of clam (*Venerupis pullastra*) seed. *Aquaculture*, 126, 315-328.
- ALBENTOSA, M., CAMACHO, A. P. & BEIRAS, R. 1996a. The effect of food concentration on the scope for growth and growth performance of *Ruditapes decussatus* (L.) seed reared in an open-flow system. *Aquaculture Nutrition*, 2, 213-220.
- ALBENTOSA, M., FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J., LABARTA, U. & PÉREZ-CAMACHO, A. 2007. Response of two species of clams, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*, to starvation: Physiological and biochemical parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 146, 241-249.
- ALBENTOSA, M., PÉREZ-CAMACHO, A., LABARTA, U. & FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J. 1996b. Evaluation of live microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. *Aquaculture*, 148, 11-23.
- ALBENTOSA, M., PÉREZ-CAMACHO, A., LABARTA, U. & FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J. 1997. Evaluation of freeze-dried microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. *Aquaculture*, 154, 305-321.
- ALBENTOSA, M., SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, M., CAMPILLO, J. A. & MOYANO, F. J. 2012a. Relationship between physiological measurements (SFG-scope for growth-) and the functionality of the digestive gland in *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 163, 286-295.
- ALBENTOSA, M., VIÑAS, L., BESADA, V., FRANCO, A. & GONZÁLEZ-QUIJANO, A. 2012b. First measurements of the scope for growth (SFG) in mussels from a large scale survey in the North-Atlantic Spanish coast. *Science of the Total Environment*, 435, 430-445.

- ALOMAR, C., VAZQUEZ-LUIS, M., MAGRANER, K., LOZANO, L. & DEUDERO, S. 2015. Evaluating stable isotopic signals in bivalve *Pinna nobilis* under different human pressures. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 467, 77-86.
- ALTIZER, S., OSTFELD, R. S., JOHNSON, P. T. J., KUTZ, S. & HARVELL, C. D. 2013. Climate Change and Infectious Diseases: From Evidence to a Predictive Framework. *Science*, 341, 514.
- ANDRADE, H., MASSABUAU, J.-C., COCHRANE, S., CIRET, P., TRAN, D., SOW, M. & CAMUS, L. 2016. High frequency non-invasive (HFNI) bio-sensors as a potential tool for marine monitoring and assessments. *Frontiers in Marine Science*, 3.
- ANESTIS, A., LAZOU, A., PÖRTNER, H. O. & MICHAELIDIS, B. 2007. Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293, R911-R921.
- ARIZPE, C. 1995. Mortality, growth and somatic secondary production of the bivalve, *Pinna rugosa* (Sowerby), in suspended and bottom culture in Bahia de La Paz, Mexico. *Aquaculture Research*, 26, 843-853.
- ARNEY, B., LIU, W., FORSTER, I. P., MCKINLEY, R. S. & PEARCE, C. M. 2015. Feasibility of dietary substitution of live microalgae with spray-dried *Schizochytrium* sp. or Spirulina in the hatchery culture of juveniles of the Pacific geoduck clam (*Panopea generosa*). *Aquaculture*, 444, 117-133.
- ARNOLD, W. S. 2008. Application of Larval Release for Restocking and Stock Enhancement of Coastal Marine Bivalve Populations. *Reviews in Fisheries Science*, 16, 65-71.
- ARRIECHE, D., MAEDA-MARTINEZ, A., ZENTENO-SAVIN, T., ASCENCIO, F. & FARÍAS-SÁNCHEZ, J. 2011. Scope for growth, biochemical composition, and antioxidant immune responses of the penshell *Atrina maura* to flow velocity and concentration of microalgae. *Aquaculture*, 319, 211-220.
- ARZUL, I., LANGLADE, A., CHOLLET, B., ROBERT, M., FERRAND, S., OMNES, E., LEROND, S., COURALEAU, Y., JOLY, J.-P., FRANÇOIS, C. & GARCIA, C. 2011. Can the protozoan parasite *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis*? *Veterinary Parasitology*, 179, 69-76.
- ASTRALDI, M., GASPARINI, G., SPARNOCCHIA, S., MORETTI, M. & SANSONE, E. The characteristics of the water masses and the water transport in the Sicily Strait at long time scales. 1996.
- BABUIN, J. 2009. *Evaluation of live phytoplankton and live algae substitute diets for feeding juvenile oysters (Crassostrea gigas) in nursery culture*. Memorial University of Newfoundland.
- BACHER, K. 2015. Perceptions and misconceptions of aquaculture: a global overview. *GLOBEFISH Research Programme*, 120, 1.
- BAE, M.-J. & PARK, Y.-S. 2014. Biological early warning system based on the responses of aquatic organisms to disturbances: A review. *Science of the Total Environment*, 466, 635-649.
- BANNISTER, J., SIEVERS, M., BUSH, F. & BLOECHER, N. 2019. Biofouling in marine aquaculture: a review of recent research and developments. *Biofouling*, 35, 631-648.

- BAREA-AZCÓN, J. M., BALLESTEROS-DUPERÓN, E. & MORENO, D. 2008. Libro rojo de los invertebrados de Andalucía. *Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla*.
- BARILLÉ, L., PROU, J., HÉRAL, M. & RAZET, D. 1997. Effects of high natural seston concentrations on the feeding, selection, and absorption of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 212, 149-172.
- BAS, C. 2009. The Mediterranean: a synoptic overview. *Contributions to Science*, 25-39.
- BASSO, L., HENDRIKS, I., STECKBAUER, A. & DUARTE, C. 2015a. Resistance of juveniles of the Mediterranean pen shell, (*Pinna nobilis*) to hypoxia and interaction with warming. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 165, 199-203.
- BASSO, L., HENDRIKS, I. E. & DUARTE, C. M. 2015b. Juvenile Pen Shells (*Pinna nobilis*) Tolerate Acidification but Are Vulnerable to Warming. *Estuaries and Coasts*, 38, 1976-1985.
- BASSO, L., VAZQUEZ-LUIS, M., GARCIA-MARCH, J. R., DEUDERO, S., ALVAREZ, E., VICENTE, N., DUARTE, C. M. & HENDRIKS, I. E. 2015c. The Pen Shell, *Pinna nobilis*: a review of population status and recommended research priorities in the Mediterranean Sea. *Advances in Marine Biology*, 71, 109-160.
- BASURTO, X. 2006. Commercial diving and the Callo de Hacha fishery in Seri territory. *Journal of the Southwest*, 189-209.
- BAYNE, B., MOORE, M., WIDDOWS, J., LIVINGSTONE, D. & SALKELD, P. 1979. Measurement of the responses of individuals to environmental stress and pollution: studies with bivalve molluscs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 286, 563-581.
- BAYNE, B. & NEWELL, R. 1983. Physiological energetics of marine molluscs. *The mollusca*. Elsevier.
- BAYNE, B. L. 1993. Feeding physiology of bivalves: time-dependence and compensation for changes in food availability. *Bivalve filter feeders*. Springer.
- BAYNE, B. L., HAWKINS, A. J. S., NAVARRO, E. & IGLESIAS, I. P. 1989. Effects of seston concentration on feeding digestion and growth in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series*, 55, 47-54.
- BEER, A. C. & SOUTHGATE, P. C. 2006. Spat collection, growth and meat yield of *Pinna bicolor* (Gmelin) in suspended culture in northern Australia. *Aquaculture*, 258, 424-429.
- BELL, J., BARTLEY, D., LORENZEN, K. & LONERAGAN, N. 2006. Restocking and stock enhancement of coastal fisheries: potential, problems and progress. *Fisheries Research*, 80, 1-8.
- BELL, J., ROTHLSBERG, P., MUNRO, J. L., LONERAGAN, N., NASH, W., WARD, R. & ANDREW, N. L. 2005. Restocking and stock enhancement of marine invertebrate fisheries. *Advances in Marine Biology*, 49.
- BELL, J. D., LEBER, K. M., BLANKENSHIP, H. L., LONERAGAN, N. R. & MASUDA, R. 2008. A New Era for Restocking, Stock Enhancement and Sea Ranching of Coastal Fisheries Resources. *Reviews in Fisheries Science*, 16, 1-9.
- BENESTY, J., CHEN, J., HUANG, Y. & COHEN, I. 2009. Pearson correlation coefficient. *Noise reduction in speech processing*. Springer.
- BENINGER, P. G., VALDIZAN, A., DECOTTIGNIES, P. & COGNIE, B. 2008. Impact of seston characteristics on qualitative particle selection sites and efficiencies in the

- pseudolamellibranch bivalve *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 360, 9-14.
- BENOIT, G. & COMEAU, A. 2012. *A sustainable future for the Mediterranean: the Blue Plan's environment and development outlook*, Routledge.
- BETTI, F., VENTURINI, S., MEROTTO, L., CAPPANERA, V., FERRANDO, S., AICARDI, S., MANDICH, A., CASTELLANO, M. & POVERO, P. 2021. Population trends of the fan mussel *Pinna nobilis* from Portofino MPA (Ligurian Sea, Western Mediterranean Sea) before and after a mass mortality event and a catastrophic storm. *The European Zoological Journal*, 88, 18-25.
- BIANCHI, C. 2004. Proposta di suddivisione dei mari italiani in settori biogeografici. *Notiziario SIBM*, 46, 57-59.
- BIANCHI, C. N. & MORRI, C. 2000. Marine Biodiversity of the Mediterranean Sea: Situation, Problems and Prospects for Future Research. *Marine Pollution Bulletin*, 40, 367-376.
- BIANCHI, C. N., MORRI, C., CHIANTORE, M., MONTEFALCONE, M., PARRAVICINI, V. & ROVERE, A. 2012. Mediterranean Sea biodiversity between the legacy from the past and a future of change. *Life in the Mediterranean Sea: a look at habitat changes*, 1, 55.
- BLICHER, M. E., RYSGAARD, S. & SEJR, M. K. 2010. Seasonal growth variation in *Chlamys islandica* (Bivalvia) from sub-Arctic Greenland is linked to food availability and temperature. *Marine Ecology Progress Series*, 407, 71-86.
- BOERO, F., CARLTON, J. & BRIAND, F. Marine extinctions. Patterns and processes. CIESM Workshop Monogr, 2013. 5-19.
- BORCHERDING, J. 2006. Ten years of practical experience with the Dreissena-Monitor, a biological early warning system for continuous water quality monitoring. *Hydrobiologia*, 556, 417-426.
- BOSC, E., BRICAUD, A. & ANTOINE, D. 2004. Seasonal and interannual variability in algal biomass and primary production in the Mediterranean Sea, as derived from 4 years of SeaWiFS observations. *Global Biogeochemical Cycles*, 18.
- BOUCHET, P. & TAVIANI, M. 1992. The Mediterranean deep-sea fauna: pseudopopulations of Atlantic species? *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 39, 169-184.
- BOWER, S. 2014. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish: *Haplosporidium nelsoni* (MSX) of oysters [WWW document]. *Fisheries and Oceans Canada*. URL: <https://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/hapneloy-eng.html>.
- BOX, A., SUREDA, A. & DEUDERO, S. 2009. Antioxidant response of the bivalve *Pinna nobilis* colonised by invasive red macroalgae *Lophocladia lallemandii*. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 149, 456-460.
- BRICKER, S., FERREIRA, J., ZHU, C., ROSE, J., GALIMANY, E., WIKFORS, G., SAUREL, C., MILLER, R., WANDS, J., TROWBRIDGE, P., GRIZZLE, R., WELLMAN, K., RHEAULT, R., STEINBERG, J., JACOB, A., DAVENPORT, E., AYVAZIAN, S., CHINTALA, M. & TEDESCO, M. 2017. The role of shellfish aquaculture in reduction of eutrophication in an urban estuary. *Environmental Science & Technology*, 52.
- BRIGGS, J. C. 1974. *Marine zoogeography*, New York, McGraw-Hill.

- BROWN, M. & ROBERT, R. 2002. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 207, 289-309.
- BUCHANAN, J., HOLME, N. & MCINTYRE, A. 1984. Methods for the study of marine benthos. *IBP Hand Book*, 16, 41-65.
- BURGEOT, T., WOLL, S. & GALGANI, F. 1996. Evaluation of the micronucleus test on *Mytilus galloprovincialis* for monitoring applications along French coasts. *Marine Pollution Bulletin*, 32, 39-46.
- BUTLER, A. 1987. Ecology of *Pinna bicolor* Gmelin (Mollusca: Bivalvia) in Gulf St Vincent, South Australia: density, reproductive cycle, recruitment, growth and mortality at three sites. *Marine and Freshwater Research*, 38, 743-769.
- BUTLER, A. & BREWSTER, F. 1979. Size distributions and growth of the fan-shell *Pinna bicolor* Gmelin (Mollusca: Eulamellibranchia) in South Australia. *Marine and Freshwater Research*, 30, 25-39.
- BUTLER, A., VICENTE, N. & GAULEJAC, B. 1993. Ecology of the pteroid bivalves *Pinna bicolor* Gmelin and *Pinna nobilis* L. *Marine Life*, 3, 37-45.
- BUXTON, C., NEWELL, R. & FIELD, J. 1981. Response surface analysis of the combined effects of exposure and acclimation temperatures on filtration, oxygen consumption and scope for growth in the oyster *Ostrea edulis*. *Marine Ecology Progress Series*, 6, 73-82.
- CABANELLAS-REBOREDO, M., BLANCO, A., DEUDERO, S. & TEJADA, S. 2010. Effects of the invasive macroalga *Lophocladia lallemandii* on the diet and trophism of *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) and its guests *Pontonia pinnophylax* and *Nepinnotheres pinnotheres* (Crustacea: Decapoda). *Scientia Marina*, 74, 101-110.
- CABANELLAS-REBOREDO, M., DEUDERO, S., ALOS, J., VALENCIA, J. M., MARCH, D., HENDRIKS, I. E. & ALVAREZ, E. 2009. Recruitment of *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) on artificial structures. *Marine Biodiversity Records*, 2, 1-5.
- CABANELLAS-REBOREDO, M., VÁZQUEZ-LUIS, M., MOURRE, B., ELVIRA, A. P., DEUDERO, S., AMORES, A., ADDIS, P., BALLESTEROS, E., BARRAJÓN, A., COPPA, S., GARCIA-MARCH, J., GIACOBBE, S., CASALDUERO, F., HADJIOANNOU, L., JIMÉNEZ-GUTIÉRREZ, S., KATSANEVAKIS, S., KERSTING, D., MACIC, V., MAVRIČ, B. & HENDRIKS, I. 2019. Tracking a mass mortality outbreak of pen shell *Pinna nobilis* populations: A collaborative effort of scientists and citizens. *Scientific reports*, 9, 1-11.
- CACHO, I., GRIMALT, J. O., SIERRA, F. J., SHACKLETON, N. & CANALS, M. 2000. Evidence for enhanced Mediterranean thermohaline circulation during rapid climatic coolings. *Earth and Planetary Science Letters*, 183, 417-429.
- CARELLA, F., ACETO, S., POLLARO, F., MICCIO, A., IARIA, C., CARRASCO, N., PRADO, P. & DE VICO, G. 2019. A mycobacterial disease is associated with the silent mass mortality of the pen shell *Pinna nobilis* along the Tyrrhenian coastline of Italy. *Scientific Reports*, 9, 2725.
- CARELLA, F., ELISABETTA, A., SIMONE, F., FULVIO, S., DANIELA, M., PRADO, P., ROSSELLA, P., MARINO, F., ELEONORA, F. & TOBIA, P. 2020. In the Wake of the Ongoing Mass Mortality Events: Co-occurrence of *Mycobacterium*, *Haplosporidium* and Other Pathogens in *Pinna nobilis* Collected in Italy and Spain (Mediterranean Sea). *Frontiers in Marine Science*, 7, 48.

- CARLTON, J. T. 1993. Neoextinctions of Marine Invertebrates. *American Zoologist*, 33, 499-509.
- CARLTON, J. T., GELLER, J. B., REAKA-KUDLA, M. L. & NORSE, E. A. 1999. Historical Extinctions in the Sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30, 515-538.
- CARLTON, J. T., VERMEIJ, G. J., LINDBERG, D. R., CARLTON, D. A. & DUBLEY, E. C. 1991. The First Historical Extinction of a Marine Invertebrate in an Ocean Basin: The Demise of the Eelgrass Limpet *Lottia alveus*. *The Biological Bulletin*, 180, 72-80.
- CARRASCO, N., ARZUL, I., BERTHE, F. C. J., FERNÁNDEZ-TEJEDOR, M., DURFORT, M. & FURONES, M. D. 2008. Delta del Ebre is a natural bay model for *Marteilia* spp. (Paramyxea) dynamics and life-cycle studies. *Diseases of Aquatic Organisms*, 79, 65-73.
- CASTEJÓN, D. & GUERAO, G. 2013. A new record of the American blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Decapoda: Brachyura: Portunidae), from the Mediterranean coast of the Iberian Peninsula. *BioInvasion Records*, 2, 141-143.
- CATANESE, G. 2020. An emergency situation for pen shells in the Mediterranean: the Adriatic Sea, one of the last *Pinna nobilis* shelters, is now affected by a mass mortality event. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107388.
- CATANESE, G., GRAU, A., MARIA VALENCIA, J., RAFAEL GARCIA-MARCH, J., ALVAREZ, E., VAZQUEZ-LUIS, M., DEUDERO, S., DARRIBA, S., CARBALLAL, M. J. & VILLALBA, A. 2018. *Haplosporidium pinnae* sp. nov., a haplosporidan parasite associated with mass mortalities of the fan mussel, *Pinna nobilis*, in the Western Mediterranean Sea. *Journal of invertebrate pathology*.
- CATAUDELLA, S., CROSETTI, D. & MASSA, F. 2015. Mediterranean coastal lagoons: sustainable management and interactions among aquaculture, capture fisheries and the environment. *General Fisheries Commission for the Mediterranean. Studies and Reviews*, 1.
- CENDEJAS, J., CARVALLO, M. & JUÁREZ, L. 1985. Experimental spat collection and early growth of the pen shell, *Pinna rugosa* (Pelecypoda: Pinnidae), from the Gulf of California. *Aquaculture*, 48, 331-336.
- CERRALBO, P., F.-PEDRERA BALSELLS, M., MESTRES, M., FERNANDEZ, M., ESPINO, M., GRIFOLL, M. & SANCHEZ-ARCILLA, A. 2019. Use of a hydrodynamic model for the management of water renovation in a coastal system. *Ocean Sci.*, 15, 215-226.
- CERRANO, C., ARILLO, A., AZZINI, F., CALCINAI, B., CASTELLANO, L., MUTI, C., VALISANO, L., ZEGA, G. & BAVESTRELLO, G. 2005. Gorgonian population recovery after a mass mortality event. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 15, 147-157.
- CHENG, M. C., SARÀ, G. & WILLIAMS, G. A. 2018. Combined effects of thermal conditions and food availability on thermal tolerance of the marine bivalve, *Perna viridis*. *Journal of thermal biology*, 78, 270-276.
- CHENG, P., ZHOU, C., CHU, R., CHANG, T., XU, J., RUAN, R., CHEN, P. & YAN, X. 2020. Effect of microalgae diet and culture system on the rearing of bivalve mollusks: Nutritional properties and potential cost improvements. *Algal Research*, 51, 102076.
- CINAR, M. E., BİLECENOĞLU, M., YOKEŞ, M. B. & GÜÇLÜSOY, H. 2021. *Pinna nobilis* in the south Marmara Islands (Sea of Marmara); it still remains uninfected by the epidemic and acts as egg laying substratum for an alien invader. *Mediterranean Marine Science; Vol 22, No 1 (2021)*.

- CLARKE, K. & GORLEY, R. 2001. PRIMER (Plymouth routines in multivariate ecological research) v5: user manual/tutorial. *Primer-E Ltd, Plymouth*, 1-91.
- CLEVELAND, R. B., CLEVELAND, W. S., MCRAE, J. E. & TERPENNING, I. 1990. STL: a seasonal-trend decomposition. *Journal of official statistics*, 6, 3-73.
- CLOGG, C. C., PETKOVA, E. & HARITOU, A. 1995. Statistical methods for comparing regression coefficients between models. *American Journal of Sociology*, 100, 1261-1293.
- COGNETTI, G., SARÀ, M. & MAGAZZÙ, G. 2001. *Biología marina*, Ariel.
- COLL, M., PIRODDI, C., STEENBEEK, J., KASCHNER, K., BEN RAIS LASRAM, F., AGUZZI, J., BALLESTEROS, E., BIANCHI, C. N., CORBERA, J., DAILIANIS, T., DANOVARO, R., ESTRADA, M., FROGLIA, C., GALIL, B. S., GASOL, J. M., GERTWAGEN, R., GIL, J., GUILHAUMON, F., KESNER-REYES, K., KITSOS, M.-S., KOUKOURAS, A., LAMPADARIOU, N., LAXAMANA, E., LÓPEZ-FÉ DE LA CUADRA, C. M., LOTZE, H. K., MARTIN, D., MOUILLOT, D., ORO, D., RAICEVICH, S., RIUS-BARILE, J., SAIZ-SALINAS, J. I., SAN VICENTE, C., SOMOT, S., TEMPLADO, J., TURON, X., VAFIDIS, D., VILLANUEVA, R. & VOULTSIADOU, E. 2010. The Biodiversity of the Mediterranean Sea: Estimates, Patterns, and Threats. *PLOS ONE*, 5, e11842.
- COMA, R., RIBES, M., SERRANO, E., JIMÉNEZ, E., SALAT, J. & PASCUAL, J. 2009. Global warming-enhanced stratification and mass mortality events in the Mediterranean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 6176.
- CONOVER, R. J. 1966. Assimilation of organic matter by zooplankton. *Limnology and oceanography*, 11, 338-345.
- CORRIERO, G. & PRONZATO, R. 1987. Epibiotic sponges on the bivalve *Pinna nobilis*. *Marine Ecology Progress Series*, 35, 75-82.
- COSENTINO, A. & GIACOBBE, S. 2007. Aspects of epizoobiotic mollusc assemblages on *Pinna* shells. I. Composition and structure. *Cahiers De Biologie Marine*, 48, 187-197.
- COUGHLAN, J. 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Marine Biology*, 2, 356-358.
- COUTTEAU, P. & SORGELOOS, P. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *Journal of Shellfish Research*, 11, 467-467.
- CRAMER, W., GUIOT, J., FADER, M., GARRABOU, J., GATTUSO, J.-P., IGLESIAS, A., LANGE, M. A., LIONELLO, P., LLASAT, M. C. & PAZ, S. 2018. Climate change and interconnected risks to sustainable development in the Mediterranean. *Nature Climate Change*, 8, 972-980.
- CRANFORD, P. J., WARD, J. E. & SHUMWAY, S. E. 2011. Bivalve filter feeding: variability and limits of the aquaculture biofilter. *Shellfish aquaculture and the environment*, 81-124.
- CULLOTY, S. C. & MULCAHY, M. F. 2007. *Bonamia ostreae* in the native oyster *Ostrea edulis*.
- CURIEL, D., MIOTTI, C., CHECCHIN, E., RISSMONDO, A., PIERINI, A., ZUCCHETTA, M., BETTOSO, N. & DE LUCA, M. 2020. Distribuzione di *Pinna nobilis* Linnaeus, 1758 nella laguna di Marano e Grado e nel settore a mare del Banco Mula di Muggia (Nord Adriatico). *Bollettino del Museo di Storia Naturale di Venezia*, 71, 35-43.

- CUTTELOD, A., GARCÍA, N., MALAK, D. A., TEMPLE, H. J. & KATARIYA, V. 2009. The Mediterranean: a biodiversity hotspot under threat. *Wildlife in a Changing World—an analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species*, 89.
- CZIHAK, G. & DIERL, W. 1961. *Pinna nobilis* L.: eine Präparationsanleitung, Fischer.
- DANOVARO, R., DINET, A., DUINEVELD, G. & TSELEPIDES, A. 1999. Benthic response to particulate fluxes in different trophic environments: a comparison between the Gulf of Lions–Catalan Sea (western-Mediterranean) and the Cretan Sea (eastern-Mediterranean). *Progress in Oceanography*, 44, 287-312.
- DAVENPORT, J., EZGETA-BALIC, D., PEHARDA, M., SKEJIC, S., NINCEVIA-GLADAN, Z. & MATIJEVIC, S. 2011. Size-differential feeding in *Pinna nobilis* L. (Mollusca: Bivalvia): Exploitation of detritus, phytoplankton and zooplankton. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 92, 246-254.
- DE GAULEJAC, B. & VICENTE, N. 1990. Ecologie de *Pinna nobilis* (L.) mollusque bivalve sur les côtes de Corse. *Essais de transplantation et expériences en milieu contrôlé. Haliotis*, 10, 83-100.
- DE LA HUZ, R., LASTRA, M. & LÓPEZ, J. 2002. The influence of sediment grain size on burrowing, growth and metabolism of *Donax trunculus* L.(Bivalvia: Donacidae). *Journal of Sea Research*, 47, 85-95.
- DÉGREMONT, L., GARCIA, C. & ALLEN JR, S. K. 2015. Genetic improvement for disease resistance in oysters: a review. *Journal of invertebrate pathology*, 131, 226-241.
- DELGADO, M. & PÉREZ CAMACHO, A. 2003. A study of gonadal development in *Ruditapes decussateu* (L.)(Mollusca, Bivalvia), using image analysis techniques: influence of food ration and energy balance. *Journal of Shellfish Research*, 22, 435-442.
- DEUDERO, S., GRAU, A., VAZQUEZ-LUIS, M., ALVAREZ, E., ALOMAR, C. & HENDRIKS, I. E. 2017. Reproductive investment of the pen shell *Pinna nobilis* (Bivalvia, Pinnidae) Linnaeus, 1758 in Cabrera National Park, Spain. *Mediterranean Marine Science*, 18, 271-284.
- DEUDERO, S., VÁZQUEZ-LUIS, M. & ÁLVAREZ, E. 2015. Human stressors are driving coastal benthic long-lived sessile fan mussel *Pinna nobilis* population structure more than environmental stressors. *PloS one*, 10, e0134530.
- DICKENS, M. J., DELEHANTY, D. J. & MICHAEL ROMERO, L. 2010. Stress: An inevitable component of animal translocation. *Biological Conservation*, 143, 1329-1341.
- DIFFENBAUGH, N. S., PAL, J. S., GIORGI, F. & GAO, X. 2007. Heat stress intensification in the Mediterranean climate change hotspot. *Geophysical Research Letters*, 34.
- DOROUDI, M. S., SOUTHGATE, P. C. & MAYER, R. J. 2002. Evaluation of partial substitution of live algae with dried *Tetraselmis* for larval rearing of black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L.). *Aquaculture International*, 10, 265-277.
- DULVY, N. K., SADOVY, Y. & REYNOLDS, J. D. 2003. Extinction vulnerability in marine populations. *Fish and fisheries*, 4, 25-64.
- DÜRR, S. & WATSON, D. 2010. Biofouling and Antifouling in Aquaculture.
- DVARSKAS, A., BRICKER, S. B., WIKFORS, G. H., BOHORQUEZ, J. J., DIXON, M. S. & ROSE, J. M. 2020. Quantification and Valuation of Nitrogen Removal Services Provided by Commercial Shellfish Aquaculture at the Subwatershed Scale. *Environmental Science & Technology*, 54, 16156-16165.
- EEA. 2019. *Decadal average sea surface temperature anomaly in different European seas* [Online]. European Environment Agency. Available:

- <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/figures/decadal-average-sea-surface-temperature> [Accessed April 5, 2021].
- ESCUDERO, A., IRIONDO, J. M. & TORRES, M. E. 2003. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation*, 113, 351-365.
- ESTRADA, M. 1996. Primary production in the northwestern Mediterranean.
- EZGETA-BALIĆ, D., RINALDI, A., PEHARDA, M., PRUSINA, I., MONTALTO, V., NICETA, N. & SARÀ, G. 2011. An energy budget for the subtidal bivalve *Modiolus barbatus* (Mollusca) at different temperatures. *Marine Environmental Research*, 71, 79-85.
- FALCO, S., NIENCHESKI, L., RODILLA, M., ROMERO, I., DEL RÍO, J. G., SIERRA, J. P. & MÖSSO, C. 2010. Nutrient flux and budget in the Ebro estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 87, 92-102.
- FARIÑAS-FRANCO, J. M., SANDERSON, W. G. & ROBERTS, D. 2016. Phenotypic differences may limit the potential for habitat restoration involving species translocation: a case study of shape ecophenotypes in different populations of *Modiolus modiolus* (Mollusca: Bivalvia). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 26, 76-94.
- FERNÁNDEZ-TORQUEMADA, Y. & SÁNCHEZ-LIZASO, J. L. 2011. Responses of two Mediterranean seagrasses to experimental changes in salinity. *Hydrobiologia*, 669, 21.
- FERREIRA, J. G. & BRICKER, S. B. 2016. Goods and services of extensive aquaculture: shellfish culture and nutrient trading. *Aquaculture International*, 24, 803-825.
- FEY, S. B., SIEPIELSKI, A. M., NUSSLÉ, S., CERVANTES-YOSHIDA, K., HWAN, J. L., HUBER, E. R., FEY, M. J., CATENAZZI, A. & CARLSON, S. M. 2015. Recent shifts in the occurrence, cause, and magnitude of animal mass mortality events. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 1083.
- FINLEY, A. O., BANERJEE, S., HJELLE, Ø. & BIVAND, R. 2017. MBA: Multilevel B-spline Approximation, 2017. URL <https://cran.r-project.org/web/packages/MBA/MBA.pdf>.
- FITRIDGE, I., DEMPSTER, T., GUENTHER, J. & DE NYS, R. 2012. The impact and control of biofouling in marine aquaculture: A review. *Biofouling*, 28, 649-69.
- FITZPATRICK, M. C. & HARGROVE, W. W. 2009. The projection of species distribution models and the problem of non-analog climate. *Biodiversity and Conservation*, 18, 2255.
- FORD, S. E. & HASKIN, H. H. 1982. History and epizootiology of *Haplosporidium nelsoni* (MSX), an oyster pathogen in Delaware Bay, 1957–1980. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40, 118-141.
- FOURNIER, E., TRAN, D., DENISON, F., MASSABUAU, J. C. & GARNIER-LAPLACE, J. 2004. Valve closure response to uranium exposure for a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*): Quantification of the influence of pH. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 1108-1114.
- FRÉCHETTE, M. & BOURGET, E. 1985. Food-limited growth of *Mytilus edulis* L. in relation to the benthic boundary layer. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42, 1166-1170.
- FROELICH, H. E., GENTRY, R. R., RUST, M. B., GRIMM, D. & HALPERN, B. S. 2017. Public perceptions of aquaculture: evaluating spatiotemporal patterns of sentiment around the world. *PloS one*, 12, e0169281.

- FUCHS, H. L. & SPECHT, J. A. 2018. Evidence for diverse responses to viscosity in suspension-feeding bivalves: Reply to Riisgård & Larsen (2018). *Marine Ecology Progress Series*, 596, 267-270.
- FUENTES, M., TORRENT, L., BARRERA, S. & BOIX, D. 2019. Rapid invasion of the American blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 in the North-East of the Iberian Peninsula. *BioInvasions Records*, 8.
- GALGANI, F., CHIFFOLEAU, J.-F., ORSONI, V., COSTANTINI, L., BOISSERY, P., CALENDINI, S. & ANDRAL, B. 2006. Chemical contamination and sediment toxicity along the coast of Corsica. *Chemistry and Ecology*, 22, 299-312.
- GARCIA-AYLLON, S. 2018. The Integrated Territorial Investment (ITI) of the Mar Menor as a model for the future in the comprehensive management of enclosed coastal seas. *Ocean & Coastal Management*.
- GARCÍA-MARCH, J., HERNANDIS, S., VÁZQUEZ-LUIS, M., PRADO, P., DEUDERO, S., VICENTE, N. & TENA-MEDIALDEA, J. 2019. Age and growth of the endangered fan mussel *Pinna nobilis* in the western Mediterranean Sea. *Marine environmental research*, 104795.
- GARCÍA-MARCH, J. & VICENTE, N. 2006. Protocol to study and monitor *Pinna nobilis* populations within marine protected areas. *Malta Environment and Planning Authority, MedPAN Project*, 17-38.
- GARCÍA-MARCH, J. R. 2005. *Aportaciones al conocimiento de la biología de Pinna nobilis Linneo, 1758 (Mollusca Bivalvia) en el litoral mediterráneo ibérico*. Universitat de Valencia, Servei de Publicacions.
- GARCÍA-MARCH, J. R., GARCÍA-CARRASCOSA, A. M., CANTERO, A. L. P. & WANG, Y. G. 2007a. Population structure, mortality and growth of *Pinna nobilis* Linnaeus, 1758 (Mollusca, Bivalvia) at different depths in Moraira bay (Alicante, Western Mediterranean). *Marine Biology*, 150, 861-871.
- GARCÍA-MARCH, J. R., JIMÉNEZ, S., SANCHIS, M. A., MONLEON, S., LEES, J., SURGE, D. & TENA-MEDIALDEA, J. 2016. *In situ* biomonitoring shows seasonal patterns and environmentally mediated gaping activity in the bivalve, *Pinna nobilis*. *Marine Biology*, 163, 1-12.
- GARCÍA-MARCH, J. R. & MARQUEZ-ALIAGA, A. 2007. *Pinna nobilis* L., 1758 age determination by internal shell register. *Marine Biology*, 151, 1077-1085.
- GARCÍA-MARCH, J. R., MARQUEZ-ALIAGA, A., WANG, Y. G., SURGE, D. & KERSTING, D. K. 2011a. Study of *Pinna nobilis* growth from inner record: how biased are posterior adductor muscle scars estimates? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407, 337-344.
- GARCÍA-MARCH, J. R., PEREZ-ROJAS, L. & GARCÍA-CARRASCOSA, A. M. 2007b. Influence of hydrodynamic forces on population structure of *Pinna nobilis* L., 1758 (Mollusca : Bivalvia): The critical combination of drag force, water depth, shell size and orientation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 342, 202-212.
- GARCÍA-MARCH, J. R., SOLSONA, M. A. S. & GARCÍA-CARRASCOSA, A. M. 2008. Shell gaping behaviour of *Pinna nobilis* L., 1758: circadian and circalunar rhythms revealed by in situ monitoring. *Marine Biology*, 153, 689-698.
- GARCÍA-MARCH, J. R., SURGE, D., LEES, J. M. & KERSTING, D. K. 2011b. Ecological information and water mass properties in the Mediterranean recorded by stable

- isotope ratios in *Pinna nobilis* shells. *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences*, 116, 14.
- GARCÍA-MARCH, J. R., TENA, J., HERNANDIS, S., VÁZQUEZ-LUIS, M., LÓPEZ, D., TÉLLEZ, C., PRADO, P., NAVAS, J. I., BERNAL, J., CATANESE, G., GRAU, A., LÓPEZ-SANMARTÍN, M., NEBOT-COLOMER, E., ORTEGA, A., PLANES, S., KERSTING, D., JIMENEZ, S., HENDRIKS, I., MORENO, D., GIMÉNEZ-CASALDUERO, F., PÉREZ, M., IZQUIERDO, A., SÁNCHEZ, J., VICENTE, N., SANMARTI, N., GUIMERANS, M., CRESPO, J. L., VALENCIA, J. M., TORRES, J., BARRAJON, A., ÁLVAREZ, E., PEYRAN, C., MORAGE, T. & DEUDERO, S. 2020. Can we save a marine species affected by a highly infective, highly lethal, waterborne disease from extinction? *Biological Conservation*, 243, 108498.
- GARCIA-SOLSONA, E., PENA, L. D., PAREDES, E., PÉREZ-ASENSIO, J. N., QUIRÓS-COLLAZOS, L., LIRER, F. & CACHO, I. 2020. Rare earth elements and Nd isotopes as tracers of modern ocean circulation in the central Mediterranean Sea. *Progress in Oceanography*, 185, 102340.
- GARRABOU, J., COMA, R., BENSOUSSAN, N., BALLY, M., CHEVALDONNÉ, P., CIGLIANO, M., DIAZ, D., HARMELIN, J. G., GAMBI, M. C., KERSTING, D. K., LEDOUX, J. B., LEJEUSNE, C., LINARES, C., MARSCHAL, C., PÉREZ, T., RIBES, M., ROMANO, J. C., SERRANO, E., TEIXIDO, N., TORRENTS, O., ZABALA, M., ZUBERER, F. & CERRANO, C. 2009. Mass mortality in Northwestern Mediterranean rocky benthic communities: effects of the 2003 heat wave. *Global Change Biology*, 15, 1090-1103.
- GARRABOU, J., PEREZ, T., SARTORETTO, S. & HARMELIN, J. G. 2001. Mass mortality event in red coral *Corallium rubrum* populations in the Provence region (France, NW Mediterranean). *Marine Ecology Progress Series*, 217, 263-272.
- GIMÉNEZ-CASALDUERO, F., GOMARIZ-CASTILLO, F., ALONSO-SARRÍA, F., CORTÉS, E., IZQUIERDO-MUÑOZ, A. & RAMOS-ESPLÁ, A. A. 2020. *Pinna nobilis* in the Mar Menor coastal lagoon: a story of colonization and uncertainty. *Marine Ecology Progress Series*, 652, 77-94.
- GIORGI, F. & LIONELLO, P. 2006. Climate change projections for the Mediterranean region. *Global and planetary change*, 63, 90-104.
- GNAIGER, E. Calculation of Energetic and Biochemical Equivalents of Respiratory Oxygen Consumption. In: GNAIGER, E. & FORSTNER, H., eds. *Polarographic Oxygen Sensors*, 1983// 1983 Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg, 337-345.
- GOFAS, S. 2011. *Moluscos marinos de Andalucía*, Universidad de Málaga, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico.
- GONZÁLEZ-WANGÜEMERT, M., BASSO, L., BALAU, A., COSTA, J., RENAULT, L., SERRÃO, E. A., DUARTE, C. M. & HENDRIKS, I. E. 2019. Gene pool and connectivity patterns of *Pinna nobilis* in the Balearic Islands (Spain, Western Mediterranean Sea): Implications for its conservation through restocking. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29, 175-188.
- GOSLING, E. 2015. *Marine bivalve molluscs*, John Wiley & Sons.
- GRIFFITHS, C. L. & GRIFFITHS, R. J. 1987. Bivalvia. In: PANDIAN, T. J. & VERNBERG, F. J. (eds.) *Animal energetics*. New York: Academic Press.
- GUILLÉN, J., PALANQUES, A., PUIG, P., DURRIEU DE MADRON, X. & NYFFELER, F. 2000. Field calibration of optical sensors for measuring suspended sediment concentration in the western Mediterranean. *Scientia Marina*, 64, 427-435.

- GVOZDENOVIĆ, S., MAČIĆ, V., PEŠIĆ, V., NIKOLIĆ, M., PERAŠ, I. & MANDIĆ, M. 2019. Review on *Pinna rudis* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Pinnidae) Presence in the Mediterranean. *Agriculture & Forestry*, 65, 115-126.
- HAKANSON, L., FLODERUS, S. & WALLIN, M. 1989. Sediment trap assemblages - A methodological description. *Hydrobiologia*, 176, 481-490.
- HALLDÖRSSON, H. P., SVAVARSSON, J. & GRANMO, Å. 2005. The effect of pollution on scope for growth of the mussel (*Mytilus edulis* L.) in Iceland. *Marine environmental research*, 59, 47-64.
- HARVELL, C. D., MITCHELL, C. E., WARD, J. R., ALTIZER, S., DOBSON, A. P., OSTFELD, R. S. & SAMUEL, M. D. 2002. Climate Warming and Disease Risks for Terrestrial and Marine Biota. *Science*, 296, 2158.
- HARVELL, C. D., MONTECINO-LATORRE, D., CALDWELL, J. M., BURT, J. M., BOSLEY, K., KELLER, A., HERON, S. F., SALOMON, A. K., LEE, L., PONTIER, O., PATTENGILL-SEMMENS, C. & GAYDOS, J. K. 2019. Disease epidemic and a marine heat wave are associated with the continental-scale collapse of a pivotal predator (*Pycnopodia helianthoides*). *Science Advances*, 5, eaau7042.
- HELM, M. M. 2004. *Hatchery culture of bivalves: a practical manual*, FAO.
- HENDRIKS, I. E., BASSO, L., DEUDERO, S., CABANELLAS-REBOREDO, M. & ÁLVAREZ, E. 2012. Relative growth rates of the noble pen shell *Pinna nobilis* throughout ontogeny around the Balearic Islands (Western Mediterranean, Spain). *Journal of Shellfish Research*, 31, 749-756.
- HENDRIKS, I. E., CABANELLAS-REBOREDO, M., BOUMA, T. J., DEUDERO, S. & DUARTE, C. M. 2011. Seagrass Meadows Modify Drag Forces on the Shell of the Fan Mussel *Pinna nobilis*. *Estuaries and Coasts*, 34, 60-67.
- HENDRIKS, I. E., TENAN, S., TAVECCHIA, G., MARBA, N., JORDA, G., DEUDERO, S., ALVAREZ, E. & DUARTE, C. M. 2013. Boat anchoring impacts coastal populations of the pen shell, the largest bivalve in the Mediterranean. *Biological Conservation*, 160, 105-113.
- HERNANDIS, S., GARCÍA-MARCH, J. R., SANCHIS, M. Á., MONLEON, S., VICENTE, N. & TENA, J. 2018. Temperature regulates the switch between light-synchronized and unsynchronized activity patterns in the subtidal bivalve *Pinna nobilis*. *Mediterranean Marine Science*, 10.
- HILDRETH, D. I. & CRIP, D. J. 1976. A corrected formula for calculation of filtration rate of bivalve molluscs in an experimental flowing system. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 56, 111-120.
- IBARROLA, I., LARRETXE, X., NAVARRO, E. & URRUTIA, M. 2008. Effects of body size and season on digestive organ size and the energy balance of cockles fed with a constant diet of phytoplankton. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 178, 501-14.
- IPCC 2018. Summary for Policymakers. In: Global warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty. World Meteorological Organization, Geneva, Switzerland: Masson-Delmotte, V. Zhai, P. Pörtner, H. O. Roberts, D. Skea, J. Shukla, P. R. Pirani, A. Moufouma-Okia, W. Péan, C. Pidcock,

- R. Connors, S. Matthews, J. B. R. Chen, Y. Zhou, X. Gomis, M. I. Lonnoy, E. Maycock, T. Tignor, M. Waterfield, T. (eds.).
- IRLANDI, E. 1996. The effects of seagrass patch size and energy regime on growth of a suspension-feeding bivalve. *Journal of Marine Research*, 54, 161-185.
- IVLEV, V. S. 1966. The Biological Productivity of Waters. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 23, 1727-1759.
- JONES, M. C. & CHEUNG, W. W. L. 2015. Multi-model ensemble projections of climate change effects on global marine biodiversity. *ICES Journal of Marine Science*, 72, 741-752.
- JORDA, G., MARBA, N. & DUARTE, C. M. 2012. Mediterranean seagrass vulnerable to regional climate warming. *Nature Climate Change*, 2, 821-824.
- JORDANA, E., PINEDO, S. & BALLESTEROS, E. 2015. Macrobenthic assemblages, sediment characteristics and heavy metal concentrations in soft-bottom Ebre Delta bays (NW Mediterranean). *Environmental Monitoring and Assessment*, 187, 71.
- KATSANEVAKIS, S., CARELLA, F., ÇINAR, M., CIZMEK, H., JIMENEZ, C., KERSTING, D., MORENO, D., RABAOUI, L. & VICENTE, N. 2021. The Fan Mussel *Pinna nobilis* on the Brink of Extinction in the Mediterranean.
- KATSANEVAKIS, S., COLL, M., PIRODDI, C., STEENBEEK, J., BEN RAIS LASRAM, F., ZENETOS, A. & CARDOSO, A. C. 2014. Invading the Mediterranean Sea: biodiversity patterns shaped by human activities. *Frontiers in Marine Science*, 1.
- KATSANEVAKIS, S., LEFKADITOU, E., GALINOUMITSOU, S., KOUTSOUBAS, D. & ZENETOS, A. 2008. Molluscan species of minor commercial interest in Hellenic seas: distribution, exploitation and conservation status. *Mediterranean marine science*, 9, 77-118.
- KATSANEVAKIS, S., POURSANIDIS, D., ISSARIS, Y., PANOU, A., PETZA, D., VASSILOPOULOU, V., CHALDAIOU, I. & SINI, M. 2011. "Protected" marine shelled molluscs: thriving in Greek seafood restaurants. *Mediterranean Marine Science*, 12, 429-438.
- KATSANEVAKIS, S., TSIRINTANIS, K., TSAPARIS, D., DOUKAS, D., SINI, M., ATHANASSOPOULOU, F., KOLYGAS, M., TONTIS, D., KOUTSOUBAS, D. & BAKOPOULOS, V. 2019. The cryptogenic parasite *Haplosporidium pinnae* invades the Aegean Sea and causes the collapse of *Pinna nobilis* populations. *Aquatic Invasions*, 14, 150-164.
- KENNEDY, H., RICHARDSON, C. A., DUARTE, C. M. & KENNEDY, D. P. 2001. Diet and association of *Pontonia pinnophylax* occurring in *Pinna nobilis*: insights from stable isotope analysis. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 81, 177-178.
- KENNISH, M. J. & PAERL, H. W. 2010. *Coastal lagoons: critical habitats of environmental change*, CRC Press.
- KERSTING, D., BENABDI, M., ČIŽMEK, H., GRAU, A., JIMENEZ, C., KATSANEVAKIS, S., ÖZTÜRK, B., TUNCER, S., TUNESI, L., VÁZQUEZ-LUIS, M., VICENTE, N. & OTERO VILLANUEVA, M. 2020a. *Pinna nobilis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T160075998A160081499.
- KERSTING, D., GARCÍA-MARCH, J. & TEMPLADO, J. 2006. Evaluation of *Spondylus gaederopus* Linné, 1758, mass mortality event in the Columbretes Islands Marine Reserve (western Mediterranean, Spain). *Org Divers Evol*, 6.

- KERSTING, D. K., BENSOUSSAN, N. & LINARES, C. 2013. Long-Term Responses of the Endemic Reef-Builder *Cladocora caespitosa* to Mediterranean Warming. *PLOS ONE*, 8, e70820.
- KERSTING, D. K. & GARCÍA-MARCH, J. R. Preliminary data on *Pinna nobilis* larval recruitment using mesh collectors in Columbretes Islands Marine Reserve, NW Mediterranean. European Symposium on Marine Protected Areas, September 25th-28th 2007 Murcia (Spain).
- KERSTING, D. K. & GARCÍA-MARCH, J. R. 2017. Long-term assessment of recruitment, early stages and population dynamics of the endangered Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis* in the Columbretes Islands (NW Mediterranean). *Marine Environmental Research*, 130, 282-292.
- KERSTING, D. K., VÁZQUEZ-LUIS, M., MOURRE, B., BELKHAMSSA, F. Z., ÁLVAREZ, E., BAKRAN-PETRICIOLI, T., BARBERÁ, C., BARRAJÓN, A., CORTÉS, E. & DEUDERO, S. 2020b. Recruitment disruption and the role of unaffected populations for potential recovery after the *Pinna nobilis* mass mortality event. *Frontiers in Marine Science*.
- KILLAM, D. & CLAPHAM, M. 2018. Identifying the ticks of bivalve shell clocks: seasonal growth in relation to temperature and food supply. *PALAIOS*, 33, 228-236.
- KNAUER, J. & SOUTHGATE, P. C. 1999. A Review of the Nutritional Requirements of Bivalves and the Development of Alternative and Artificial Diets for Bivalve Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*, 7, 241-280.
- KÖCK, M., FARRÉ, M., MARTÍNEZ, E., GAJDA-SCHRANTZ, K., GINEBREDÁ, A., NAVARRO, A., DE ALDA, M. L. & BARCELÓ, D. 2010. Integrated ecotoxicological and chemical approach for the assessment of pesticide pollution in the Ebro River delta (Spain). *Journal of Hydrology*, 383, 73-82.
- KOZUL, V., GLAVIC, N., BOLOTIN, J. & ANTOLOVIC, N. 2011. Growth of the fan mussel *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia) in experimental cages in the South Adriatic Sea. *Aquaculture Research*, 44, 31-40.
- KRIJGSMAN, W. 2002. The Mediterranean: Mare Nostrum of Earth sciences. *Earth and Planetary Science Letters*, 205, 1-12.
- LA PEYRE, M. K., NICKENS, A. D., VOLETY, A. K., TOLLEY, G. S. & LA PEYRE, J. F. 2003. Environmental significance of freshets in reducing *Perkinsus marinus* infection in eastern oysters *Crassostrea virginica*: potential management applications. *Marine Ecology Progress Series*, 248, 165-176.
- LAFFERTY, K. D., HARVELL, C. D., CONRAD, J. M., FRIEDMAN, C. S., KENT, M. L., KURIS, A. M., POWELL, E. N., RONDEAU, D. & SAKSIDA, S. M. 2015. Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Annual Review of Marine Science*, 7, 471-496.
- LEE, S., WOLBERG, G. & SHIN, S. Y. 1997. Scattered data interpolation with multilevel B-splines. *IEEE transactions on visualization and computer graphics*, 3, 228-244.
- LEJEUSNE, C., CHEVALDONNÉ, P., PERGENT-MARTINI, C., BOUDOURESQUE, C. F. & PÉREZ, T. 2010. Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. *Trends in Ecology & Evolution*, 25, 250-260.
- LEMER, S., BUGÉ, B., BEMIS, A. & GIRIBET, G. 2014. First molecular phylogeny of the circumtropical bivalve family Pinnidae (Mollusca, Bivalvia): Evidence for high levels of cryptic species diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 75, 11-23.

- LESSIOS, H. A. 2016. The Great *Diadema antillarum* Die-Off: 30 Years Later. *Annual Review of Marine Science*, 8, 267-283.
- LIAO, C. M., JAU, S. F., LIN, C. M., JOU, L. J., LIU, C. W., LIAO, V. H. C. & CHANG, F. J. 2009. Valve movement response of the freshwater clam *Corbicula fluminea* following exposure to waterborne arsenic. *Ecotoxicology*, 18, 567-576.
- LLORCA, M., VEGA-HERRERA, A., SCHIRINZI, G., SAVVA, K., ABAD, E. & FARRÉ, M. 2021. Screening of suspected micro(nano)plastics in the Ebro Delta (Mediterranean Sea). *Journal of Hazardous Materials*, 404, 124022.
- LOOSANOFF, V. 1962. Effects of turbidity on some larval and adult bivalves.
- LÓPEZ-SANMARTÍN, M., CATANESE, G., GRAU, A., VALENCIA, J. M., GARCÍA-MARCH, J. R. & NAVAS, J. I. 2019. Real-Time PCR based test for the early diagnosis of *Haplosporidium pinnae* affecting fan mussel *Pinna nobilis*. *PLOS ONE*, 14, e0212028.
- LUDWIG, J. A. & REYNOLDS, J. F. 1988. *Statistical ecology: a primer in methods and computing*, John Wiley & Sons.
- MANCINELLI, G., CHAINHO, P., CILENTI, L., FALCO, S., KAPIRIS, K., KATSELIS, G. & RIBEIRO, F. 2017. The Atlantic blue crab *Callinectes sapidus* in southern European coastal waters: Distribution, impact and prospective invasion management strategies. *Marine pollution bulletin*, 119, 5-11.
- MANEIRO, V., SANTOS, Y., PAZOS, A. J., SILVA, A., TORRES-CORRAL, Y., SÁNCHEZ, J. L. & PÉREZ-PARALLÉ, M. L. 2020. Effects of food ration, water flow rate and bacteriological levels of broodstock on the reproductive conditioning of the European flat oyster (*Ostrea edulis*, Linnaeus 1758). *Aquaculture Reports*, 18, 100412.
- MANNINO, A. M., BALISTRERI, P. & DEIDUN, A. 2017. The marine biodiversity of the Mediterranean Sea in a changing climate: the impact of biological invasions. *Mediterranean identities-environment, society, culture*, 101-127.
- MAÑOSA, S., MATEO, R. & GUITART, R. 2001. A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro delta biota and wildlife. *Environmental Monitoring and Assessment*, 71, 187-205.
- MARBÀ, N., JORDA, G., AGUSTI, S., GIRARD, C. & DUARTE, C. M. 2015. Footprints of climate change on Mediterranean Sea biota. *Frontiers in Marine Science*, 2.
- MARGALEF, R. 1998. Ecología. Barcelona, Spain. *Omega*.
- MARQUEZ, A., LODEIROS, C., LOOR, A., REVILLA, J., DA COSTA, F. & SONNENHOLZNER, S. 2019. Microalgae diet for juveniles of *Spondylus limbatus*. *Aquaculture International*, 27, 323-335.
- MÁRQUEZ, A. L., REAL, R., OLIVERO, J. & ESTRADA, A. 2011. Combining climate with other influential factors for modelling the impact of climate change on species distribution. *Climatic Change*, 108, 135-157.
- MARSHALL, R., MCKINLEY, R. & PEARCE, C. 2014. Effect of ration on gonad development of the Pacific geoduck clam, *Panopea generosa* (Gould, 1850). *Aquaculture Nutrition*, 20, 349-363.
- MAT, A. M., MASSABUAU, J. C., CIRET, P. & TRAN, D. 2012. Evidence for a plastic dual circadian rhythm in the oyster *Crassostrea gigas*. *Chronobiology International*, 29, 857-867.
- MCCOLLOUGH, C. B., ALBRIGHT, B. W., ABBE, G. R., BARKER, L. S. & DUNGAN, C. F. 2007. Acquisition and progression of *Perkinsus marinus* infections by specific-

- pathogen-free juvenile oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin) in a mesohaline Chesapeake Bay tributary. *Journal of Shellfish Research*, 26, 465-477.
- MEINESZ, A. & MERCIER, D. 1983. Sur les fortes mortalités de Spondyles (*Spondylus gaederopus* Linné) observées sur les côtes de Méditerranée. *Trav. sci. Parc nation. Port-Cros*, 9, 89-95.
- METCALFE, N. B. & MONAGHAN, P. 2003. Growth versus lifespan: perspectives from evolutionary ecology. *Experimental Gerontology*, 38, 935-940.
- MICHELI, F., HALPERN, B. S., WALBRIDGE, S., CIRIACO, S., FERRETTI, F., FRASCHETTI, S., LEWISON, R., NYKJAER, L. & ROSENBERG, A. A. 2013. Cumulative Human Impacts on Mediterranean and Black Sea Marine Ecosystems: Assessing Current Pressures and Opportunities. *PLOS ONE*, 8, e79889.
- MILITZ, T. A., BRALEY, R. D. & SOUTHGATE, P. C. 2021. Factors influencing the capacity for pediveliger larvae of the giant clam, *Tridacna noae*, to ingest and digest cells of microalgae concentrates. *Aquaculture*, 533, 736121.
- MILLER, C. B. 2009. *Biological Oceanography*, John Wiley & Sons.
- MILLOT, C. & TAUPIER-LETAGE, I. 2005. Circulation in the Mediterranean Sea. In: SALIOT, A. (ed.) *The Mediterranean Sea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- MOLINA, M., SÁNCHEZ, E. & GUTIÉRREZ, C. 2020. Future heat waves over the Mediterranean from an euro-CORDEX regional climate model ensemble. *Scientific Reports*, 10, 1-10.
- MORAITIS, M. L., VALAVANIS, V. D. & KARAKASSIS, I. 2019. Modelling the effects of climate change on the distribution of benthic indicator species in the Eastern Mediterranean Sea. *Science of The Total Environment*, 667, 16-24.
- MORTON, B. & PULJAS, S. 2019. An improbable opportunistic predator: the functional morphology of *Pinna nobilis* (Bivalvia: Pterioidea: Pinnidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 99, 359-373.
- MYERS, A. A. 1996. Species and Generic Gamma-Scale Diversity in Shallow-Water Marine Amphipoda with Particular Reference to the Mediterranean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 76, 195-202.
- NARVAEZ, N., LODEIROS, C., FREITES, L., NUNEZ, M., PICO, D. & PRIETO, A. 2000. Abundance and growth of *Pinna carnea* (Mytiloidea: Pinnacea) juveniles in suspended-frame culture. *Revista de biologia tropical*, 48, 785-797.
- NASI, F., NORDSTRÖM, M. C., BONSDORFF, E., AURIEMMA, R., CIBIC, T. & DEL NEGRO, P. 2018. Functional biodiversity of marine soft-sediment polychaetes from two Mediterranean coastal areas in relation to environmental stress. *Marine Environmental Research*, 137, 121-132.
- NAVARRO, E., IGLESIAS, J. I. P. & ORTEGA, M. M. 1992. Natural sediment as a food source for the cockle *Cerastoderma edule* (L.): effect of variable particle concentration on feeding, digestion and the scope for growth. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 156, 69-87.
- NAVARRO, J., LEIVA, G., MARTINEZ, G. & AGUILERA, C. 2000. Interactive effects of diet and temperature on the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 247, 67-83.
- NAVAS, J. I., LÓPEZ-SANMARTÍN, M., MÍNGUEZ PIÑEIRO, C., QUINTERO ANILLO, D., DÍAZ FLORES, A., PACHECO GUTIÉRREZ, M., LÓPEZ GALÁN, J. J., NARANJO MORENO, A., HERVES PÉREZ, A., GARRIDO CIRERA, I. & ÁLVAREZ VILLA, A. 2020. INFORME.

- Actuaciones realizadas al amparo del convenio de colaboración entre el instituto andaluz de investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA), y la fundación Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir (UCV), para la realización del proyecto denominado “Rescate y mantenimiento de 50 ejemplares de nacra (*Pinna nobilis*) en el Centro IFAPA Agua del Pino (Huelva)” en el marco del Proyecto Life IPE-PAF Intemares (life15 IPE ES 012)
- . Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica.
- NEBOT-COLOMER, E., VAZQUEZ-LUIS, M., GARCIA-MARCH, J. R. & DEUDERO, S. 2016. Population structure and growth of the threatened pen shell, *Pinna rudis* (Linnaeus, 1758) in a Western Mediterranean marine protected area. *Mediterranean Marine Science*, 17, 785-793.
- NEWELL, R. C. & BRANCH, G. M. 1980. The Influence of Temperature on the Maintenance of Metabolic Energy Balance in Marine Invertebrates. In: BLAXTER, J. H. S., RUSSELL, F. S. & YONGE, M. (eds.) *Advances in Marine Biology*. Academic Press.
- NEWELL, R. C., JOHSON, L. G. & KOFOED, L. H. 1977. Adjustment of the components of energy balance in response to temperature change in *Ostrea edulis*. *Oecologia*, 30, 97-110.
- NIE, H., CHEN, P., HUO, Z., CHEN, Y., HOU, X., YANG, F. & YAN, X. 2017. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia excretion in different colour strains of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture Research*, 48, 2778-2786.
- NIEVES-SOTO, M., RAMÍREZ, L. F.-B., PICA-VALDEZ, P., MEDINA-JASSO, M. A., MIRANDA-BAEZA, A., MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R. & LÓPEZ-ELÍAS, J. A. 2013. Combined effect of temperature and food concentration on the filtration and clarification rates and assimilation efficiency of *Atrina tuberculosa* Sowerby, 1835 (Mollusca: Bivalvia) under laboratory conditions. *Archives of Biological Sciences*, 65, 99-106.
- ÖNDES, F., ALAN, V., AKÇALI, B. & GÜÇLÜSOY, H. 2020. Mass mortality of the fan mussel, *Pinna nobilis* in Turkey (eastern Mediterranean). *Marine Ecology*, 41, e12607.
- ORTMANN, C. & GRIESHABER, M. K. 2003. Energy metabolism and valve closure behaviour in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Journal of Experimental Biology*, 206, 4167-4178.
- ÖZALP, H. B. & KERSTING, D. K. 2020. A pan-Mediterranean extinction? *Pinna nobilis* mass mortality has reached the Turkish straits system. *Marine Biodiversity*, 50, 81.
- PALACIOS-ABRANTES, J., HERRERA-CORREAL, J., RODRÍGUEZ, S., BRUNKOW, J. & MOLINA, R. 2018. Evaluating the bio-economic performance of a Callo de hacha (*Atrina maura*, *Atrina tuberculosa* & *Pinna rugosa*) fishery restoration plan in La Paz, Mexico. *PloS one*, 13.
- PALMER, J. D. 2000. The clocks controlling the tide-associated rhythms of intertidal animals. *Bioessays*, 22, 32-37.
- PANARESE, R., TEDESCO, P., CHIMIANTI, G., LATROFA, M. S., QUAGLIO, F., PASSANTINO, G., BUONAVOGLIA, C., GUSTINELLI, A., TURSI, A. & OTRANTO, D. 2019. *Haplosporidium pinnae* associated with mass mortality in endangered *Pinna*

- nobilis* (Linnaeus 1758) fan mussels. *Journal of Invertebrate Pathology*, 164, 32-37.
- PÉREZ-RUZAFÁ, A., CAMPILLO, S., FERNÁNDEZ-PALACIOS, J. M., GARCÍA LACUNZA, A., GARCÍA-OLIVA, M., IBAÑEZ, H., PÉREZ-MARCOS, M., PÉREZ-RUZAFÁ, I., QUISPE, J. I. & SALA, A. 2019. Long term dynamic in nutrients, chlorophyll a and water quality parameters in a coastal lagoon during a process of eutrophication for decades, a sudden break and a relatively rapid recovery. *Frontiers in Marine Science*, 6, 26.
- PÉREZ-RUZAFÁ, A., FERNÁNDEZ, A. I., MARCOS, C., GILABERT, J., QUISPE, J. I. & GARCÍA-CHARTON, J. A. 2005a. Spatial and temporal variations of hydrological conditions, nutrients and chlorophyll a in a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, Spain). *Hydrobiologia*, 550, 11-27.
- PÉREZ-RUZAFÁ, A., MARCOS, C. & GILABERT, J. 2005b. The ecology of the Mar Menor coastal lagoon: a fast-changing ecosystem under human pressure. *Coastal Lagoons: Ecosystem Processes and Modeling for Sustainable Use and Development*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, 392-422.
- PÉREZ-RUZAFÁ, A., NAVARRO, S., BARBA, A., MARCOS, C., CÁMARA, M., SALAS, F. & GUTIERREZ, J. 2000. Presence of pesticides throughout trophic compartments of the food web in the Mar Menor lagoon (SE Spain). *Marine Pollution Bulletin*, 40, 140-151.
- PETERSEN, J. K., HASLER, B., TIMMERMANN, K., NIELSEN, P., TØRRING, D. B., LARSEN, M. M. & HOLMER, M. 2014. Mussels as a tool for mitigation of nutrients in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 82, 137-143.
- PEYRAN, C., BOISSIN, E., MORAGE, T., NEBOT-COLOMER, E., IWANKOW, G. & PLANES, S. 2021. Genetic homogeneity of the critically endangered fan mussel, *Pinna nobilis*, throughout lagoons of the Gulf of Lion (North-Western Mediterranean Sea). *Scientific Reports*, 11, 7805.
- PISANO, A., MARULLO, S., ARTALE, V., FALCINI, F., YANG, C., LEONELLI, F. E., SANTOLERI, R. & BUONGIORNO NARDELLI, B. 2020. New Evidence of Mediterranean Climate Change and Variability from Sea Surface Temperature Observations. *Remote Sensing*, 12.
- PÖRTNER, H. O. 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132, 739-761.
- POUVREAU, S., JONQUIÈRES, G. & BUESTEL, D. 1999. Filtration by the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, under conditions of low seston load and small particle size in a tropical lagoon habitat. *Aquaculture*, 176, 295-314.
- PRADO, P. 2018. Seagrass epiphytic assemblages are strong indicators of agricultural discharge but weak indicators of host features. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 204, 140-148.
- PRADO, P., ANDREE, K. B., TRIGOS, S., CARRASCO, N., CAIOLA, N., GARCÍA-MARCH, J. R., TENA, J., FERNÁNDEZ-TEJEDOR, M. & CARELLA, F. 2019a. Breeding, planktonic and settlement factors shape recruitment patterns of one of the last remaining major population of *Pinna nobilis* within Spanish waters. *Hydrobiologia*, 1-16.
- PRADO, P., CABANES, P., CATANESE, G., CARELLA, F., CARRASCO, N., GRAU, A., HERNANDIS, S., GARCÍA-MARCH, J. R., TENA, J. & CAIOLA, N. 2020a. Growth of

- juvenile *Pinna nobilis* in captivity conditions: Dietary and pathological constraints. *Aquaculture*, 735167.
- PRADO, P., CABANES, P., HERNANDIS, S., GARCÍA-MARCH, R. & TENA, J. 2021. Stable isotope analyses reveal major nutritional deficiencies in captive vs. field juvenile individuals of *Pinna nobilis*. *Marine Environmental Research*, 105304.
- PRADO, P., CAIOLA, N. & IBÁÑEZ, C. 2014. Habitat use by a large population of *Pinna nobilis* in shallow waters. *Scientia Marina*, 78, 555-565.
- PRADO, P., CARRASCO, N., CATANESE, G., GRAU, A., CABANES, P., CARELLA, F., GARCÍA-MARCH, J. R., TENA, J., ROQUE, A. & BERTOMEU, E. 2019b. Presence of *Vibrio mediterranei* associated to major mortality in stabled individuals of *Pinna nobilis* L. *Aquaculture*, 734899.
- PRADO, P., GRAU, A., CATANESE, G., CABANES, P., CARELLA, F., FERNÁNDEZ-TEJEDOR, M., ANDREE, K. B., AÑÓN, T., HERNANDIS, S., TENA, J. & GARCÍA-MARCH, J. R. 2020b. *Pinna nobilis* in suboptimal environments are more tolerant to disease but more vulnerable to severe weather phenomena. *Marine Environmental Research*, 163, 105220.
- QUINTANA, X., BOIX, D., GASCÓN, S., IBÁÑEZ, C. & CAIOLA, N. 2018a. *Management and restoration of Mediterranean coastal lagoons in Europe*, (Càtedra d'Ecosistemes litorals Mediterrànis i LIFE Pletera 220).
- QUINTANA, X., BOIX, D., GASCÓN, S. & SALA, J. 2018b. Management and restoration of Mediterranean coastal lagoons in Europe.
- RABAOUI, L., TLIG-ZOUARI, S., COSENTINO, A. & BEN HASSINE, O. K. 2009. Associated fauna of the fan shell *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) in the northern and eastern Tunisian coasts. *Scientia Marina*, 73, 129-141.
- REIZOPOULOU, S. & NICOLAIDOU, A. 2007. Index of size distribution (ISD): a method of quality assessment for coastal lagoons. *Lagoons and Coastal Wetlands in the Global Change Context: Impacts and Management Issues*. Springer.
- RENSING, L., MEYER-GRAHLE, U. & RUOFF, P. 2001. Biological timing and the clock metaphor: Oscillatory and hourglass mechanisms. *Chronobiology International*, 18, 329-369.
- RICHARDSON, C. A., KENNEDY, H., DUARTE, C. M., KENNEDY, D. P. & PROUD, S. V. 1999. Age and growth of the fan mussel *Pinna nobilis* from south-east Spanish Mediterranean seagrass (*Posidonia oceanica*) meadows. *Marine Biology*, 133, 205-212.
- RICHARDSON, C. A., PEHARDA, M., KENNEDY, H., KENNEDY, P. & ONOFRI, V. 2004. Age, growth rate and season of recruitment of *Pinna nobilis* (L) in the Croatian Adriatic determined from Mg : Ca and Sr : Ca shell profiles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 299, 1-16.
- RIISGÅRD, H. U. 2001. On measurement of filtration rates in bivalves—the stony road to reliable data: review and interpretation. *Marine Ecology Progress Series*, 211, 275-291.
- RILOV, G. & GALIL, B. 2009. Marine Bioinvasions in the Mediterranean Sea – History, Distribution and Ecology. In: RILOV, G. & CROOKS, J. A. (eds.) *Biological Invasions in Marine Ecosystems: Ecological, Management, and Geographic Perspectives*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- RIVETTI, I., FRASCHETTI, S., LIONELLO, P., ZAMBIANCHI, E. & BOERO, F. 2014. Global Warming and Mass Mortalities of Benthic Invertebrates in the Mediterranean Sea. *PLOS ONE*, 9, e115655.
- ROBLEDANO AYMERICH, F., PAGÁN ABELLÁN, I. & CALVO SENDÍN, J. F. 2008. Waterbirds and nutrient enrichment in Mar Menor Lagoon, a shallow coastal lake in southeast Spain. *Lakes & Reservoirs: Science, Policy and Management for Sustainable Use*, 13, 37-49.
- ROBSON, A. A., DE LEANIZ, C. G., WILSON, R. P. & HALSEY, L. G. 2010a. Behavioural adaptations of mussels to varying levels of food availability and predation risk. *Journal of Molluscan Studies*, 76, 348-353.
- ROBSON, A. A., DE LEANIZ, C. G., WILSON, R. P. & HALSEY, L. G. 2010b. Effect of anthropogenic feeding regimes on activity rhythms of laboratory mussels exposed to natural light. *Hydrobiologia*, 655, 197-204.
- RODLAND, D. L., SCHONE, B. R., BAIER, S., ZHANG, Z. J., DREYER, W. & PAGE, N. A. 2009. Changes in gape frequency, siphon activity and thermal response in the freshwater bivalves *Anodonta cygnea* and *Margaritifera falcata*. *Journal of Molluscan Studies*, 75, 51-57.
- RODRÍGUEZ, S., BALBOA, S. & BARJA, J. Search for an assay model for marine potential microbial pathogens: the case of *Pinna nobilis*. International Symposium on Marine Science. Vigo, 2018.
- RODRÍGUEZ, S., BALBOA, S., OLVEIRA, G., MONTES, J., MORENO, D., BARRAJÓN, A. & BARJA, J. First report of mass mortalities in natural population of *Pinna nobilis*. A microbial perspective. International Congress of the FEMS-SEM, 2017. Valencia.
- ROMERO, D., BARCALA, E., MARÍA-DOLORES, E. & MUÑOZ, P. 2020. European eels and heavy metals from the Mar Menor lagoon (SE Spain). *Marine Pollution Bulletin*, 158, 111368.
- ROSA, M., WARD, J. E., HOLOHAN, B. A., SHUMWAY, S. E. & WIKFORS, G. H. 2017. Physicochemical surface properties of microalgae and their combined effects on particle selection by suspension-feeding bivalve molluscs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 486, 59-68.
- ROUANET, E., BONNEFONT, J.-L. & DURAND, R. 2009. Site Natura 2000 FR 9302001 "Lagune du Brus" – Document d'Objectifs – Tome 1 : Diagnostics écologiques et socioéconomiques, enjeux et objectifs de conservation hiérarchisés. Convention cadre Etat/Communauté d'agglomération Toulon Provence Méditerranée: Institut Océanographique Paul Ricard.
- ROUANET, E., TRIGOS, S. & VICENTE, N. 2015. From youth to death of old age: the 50-year story of a *Pinna nobilis* fan mussel population at Port-Cros Island Port-cros National Park, Provence, Mediterranean Sea. *Scientific reports of the Port-Cros national park*, 29, 209-222.
- ŠARIĆ, T., ŽUPAN, I., ACETO, S., VILLARI, G., PALIĆ, D., DE VICO, G. & CARELLA, F. 2020. Epidemiology of noble pen shell (*Pinna nobilis* L. 1758) mass mortality events in adriatic sea is characterised with rapid spreading and acute disease progression. *Pathogens*, 9, 776.
- SAUCEDO, P. E., OCAMPO, L. A., MONTEFORTE, M. & BERVERA, H. 2004. Effect of temperature on oxygen consumption and ammonia excretion in the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). *Aquaculture*, 229, 377-387.

- SAULSBURY, J., MOSS, D. K., IVANY, L. C., KOWALEWSKI, M., LINDBERG, D. R., GILLOOLY, J. F., HEIM, N. A., MCCLAIN, C. R., PAYNE, J. L. & ROOPNARINE, P. D. 2019. Evaluating the influences of temperature, primary production, and evolutionary history on bivalve growth rates. *Paleobiology*, 45, 405-420.
- SCHULTZ, P. W. & HUBER, M. 2013. *Revision of the worldwide Recent Pinnidae and some remarks on fossil European Pinnidae*, ConchBooks.
- SCHWARTZ, M. W., IVERSON, L. R., PRASAD, A. M., MATTHEWS, S. N. & O'CONNOR, R. J. 2006. Predicting extinctions as a result of climate change. *Ecology*, 87, 1611-1615.
- SCHWARTZMANN, C., DURRIEU, G., SOW, M., CIRET, P., LAZARETH, C. E. & MASSABUAUA, J. 2011. *In situ* giant clam growth rate behavior in relation to temperature: A one-year coupled study of high-frequency noninvasive valvometry and sclerochronology. *Limnology and Oceanography*, 56, 1940-1951.
- SIERRA, J., SÁNCHEZ-ARCILLA, A., DEL RÍO, J. G., FLOS, J., MOVELLAN, E., MÖSSO, C., MARTINEZ, R., RODILLA, M., FALCO, S. & ROMERO, I. 2002. Spatial distribution of nutrients in the Ebro estuary and plume. *Continental Shelf Research*, 22, 361-378.
- SLUYTS, H., VANHOOF, F., CORNET, A. & PAULUSSEN, J. 1996. A dynamic new alarm system for use in biological early warning systems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 1317-1323.
- SOBRINO-FIGUEROA, A. & CACERES-MARTINEZ, C. 2009. Alterations of valve closing behavior in juvenile Catarina scallops (*Argopecten ventricosus* Sowerby, 1842) exposed to toxic metals. *Ecotoxicology*, 18, 983-987.
- SOLÉ, J., TURIEL, A., ESTRADA, M., LLEBOT, C., BLASCO, D., CAMP, J., DELGADO, M., FERNÁNDEZ-TEJEDOR, M. & DIOGÈNE, J. 2009. Climatic forcing on hydrography of a Mediterranean bay (Alfacs Bay). *Continental Shelf Research*, 29, 1786-1800.
- SOLÉ, M., PORTE, C., BARCELO, D. & ALBAIGES, J. 2000. Bivalves residue analysis for the assessment of coastal pollution in the Ebro Delta (NW Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin*, 40, 746-753.
- SONIAT, T. M., HOFMANN, E. E., KLINCK, J. M. & POWELL, E. N. 2008. Differential modulation of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) disease parasites by the El-Niño-Southern Oscillation and the North Atlantic Oscillation. *International Journal of Earth Sciences*, 98, 99.
- SOUTHGATE, P. C., BEER, A. C. & NGALUAFE, P. 2016. Hatchery culture of the winged pearl oyster, *Pteria penguin*, without living micro-algae. *Aquaculture*, 451, 121-124.
- SOUTHGATE, P. C., BRALEY, R. D. & MILITZ, T. A. 2017. Ingestion and digestion of micro-algae concentrates by veliger larvae of the giant clam, *Tridacna noae*. *Aquaculture*, 473, 443-448.
- SOW, M., DURRIEU, G., BRIOLLAIS, L., CIRET, P. & MASSABUAU, J. C. 2011. Water quality assessment by means of HFNI valvometry and high-frequency data modeling. *Environmental Monitoring and Assessment*, 182, 155-170.
- SPECHT, J. A. & FUCHS, H. L. 2018. Thermal and viscous effects of temperature on *Mercenaria mercenaria* suspension feeding. *Marine Ecology Progress Series*, 589, 129-140.

- STACHOWICZ, J. J., TERWIN, J. R., WHITLATCH, R. B. & OSMAN, R. W. 2002. Linking climate change and biological invasions: ocean warming facilitates nonindigenous species invasions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 15497-15500.
- SUREDA, A., BOX, A., TERRADOS, J., DEUDERO, S. & PONS, A. 2008. Antioxidant response of the seagrass *Posidonia oceanica* when epiphytized by the invasive macroalgae *Lophodadia lallemandii*. *Marine Environmental Research*, 66, 359-363.
- TAMAYO, D., IBARROLA, I., URRUTIA, M. B. & NAVARRO, E. 2011. The physiological basis for inter-individual growth variability in the spat of clams (*Ruditapes philippinarum*). *Aquaculture*, 321, 113-120.
- TANYAROS, S. & CHUSEINGJAW, S. 2016. A partial substitution of microalgae with single cell detritus produced from seaweed (*Porphyra haitanensis*) for the nursery culture of tropical oyster (*Crassostrea belcheri*). *Aquaculture Research*, 47, 2080-2088.
- TARAZONA, E., LUCENA, T., ARAHAL, D. R., MACIÁN, M. C., RUVIRA, M. A. & PUJALTE, M. J. 2014. Multilocus sequence analysis of putative *Vibrio mediterranei* strains and description of *Vibrio thalassae* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 37, 320-328.
- TERESA, B., GIUSEPPA, S. & SALVATORE, G. 2017. Mass Mortality in Noah'S Ark *Arca noae* (Linnaeus, 1758): A Case Study from the Strait of Messina (Mediterranean Sea). *Journal of Shellfish Research*, 36, 749-753.
- TERUZZI, A., DOBRICIC, S., SOLIDORO, C. & COSSARINI, G. 2014. A 3-D variational assimilation scheme in coupled transport-biogeochemical models: Forecast of Mediterranean biogeochemical properties. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 119, 200-217.
- THEODOROU, J. A., JAMES, R., TZOVENIS, I. & HELLIO, C. 2015. The recruitment of the endangered fan mussel *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758) on the ropes of a Mediterranean mussel long line farm. *Journal of Shellfish Research*, 34, 409-414.
- TORO, B., NAVARRO, J. M. & PALMA-FLEMING, H. 2003. Use of clearance rate in *Choromytilus chorus* (Bivalvia: Mytilidae) as a non-destructive biomarker of aquatic pollution. *Revista chilena de historia natural*, 76, 267-274.
- TRACY, A. M., PIELMEIER, M. L., YOSHIOKA, R. M., HERON, S. F. & HARVELL, C. D. 2019. Increases and decreases in marine disease reports in an era of global change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286, 20191718.
- TRAN, D., NADAU, A., DURRIEU, G., CIRET, P., PARISOT, J. P. & MASSABUAU, J. C. 2011. Field chronobiology of a molluscan bivalve: How the moon and sun cycles interact to drive oyster activity rhythms. *Chronobiology International*, 28, 307-317.
- TRAN, D., PERRIGAULT, M., CIRET, P. & PAYTON, L. 2020. Bivalve mollusc circadian clock genes can run at tidal frequency. *Proceedings of the Royal Society B*, 287, 20192440.
- TRIGOS, S. 2016. *Estudio de la ecofisiología y ensayo de cultivo de la nacra Pinna nobilis Linnaeus, 1758*. Tesis Título Doctoral, Universidad Católica de Valencia San Vicente mártir.
- TRIGOS, S., GARCIA-MARCH, J. R., VICENTE, N., TENA, J. & TORRES, J. 2014. Utilization of muddy detritus as organic matter source by the fan mussel *Pinna nobilis*. *Mediterranean Marine Science*, 15, 667-674.

- TRIGOS, S., GARCIA-MARCH, J. R., VICENTE, N., TENA, J. & TORRES, J. 2015. Respiration rates of the fan mussel *Pinna nobilis* at different temperatures. *Journal of Molluscan Studies*, 81, 217-222.
- TRIGOS, S., VICENTE, N., PRADO, P. & ESPINOS, F. J. 2018. Adult spawning and early larval development of the endangered bivalve *Pinna nobilis*. *Aquaculture*, 483, 102-110.
- UMGIESSER, G., FERRARIN, C., CUCCO, A., DE PASCALIS, F., BELLAFFIORE, D., GHEZZO, M. & BAJO, M. 2014. Comparative hydrodynamics of 10 Mediterranean lagoons by means of numerical modeling. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 119, 2212-2226.
- UTTING, S. & MILLICAN, P. 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*, 155, 45-54.
- VAN ERKOM SCHURINK, C. & GRIFFITHS, C. 1993. Factors affecting relative rates of growth in four South African mussel species. *Aquaculture*, 109, 257-273.
- VAQUER-SUNYER, R. & DUARTE, C. M. 2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 15452.
- VARGAS-YÁÑEZ, M., JESÚS GARCÍA, M., SALAT, J., GARCÍA-MARTÍNEZ, M. C., PASCUAL, J. & MOYA, F. 2008. Warming trends and decadal variability in the Western Mediterranean shelf. *Global and Planetary Change*, 63, 177-184.
- VAZE, K. M. & SHARMA, V. K. 2013. On the adaptive significance of circadian clocks for their owners. *Chronobiology International*, 30, 413-433.
- VÁZQUEZ-LUIS, M., ÁLVAREZ, E., BARRAJÓN, A., GARCÍA-MARCH, J. R., GRAU, A., HENDRIKS, I. E., JIMÉNEZ, S., KERSTING, D., MORENO, D., PÉREZ, M., RUIZ, J. M., SÁNCHEZ, J., VILLALBA, A. & DEUDERO, S. 2017. S.O.S. *Pinna nobilis*: A mass mortality event in western Mediterranean Sea. *Frontiers in Marine Science*, 4, 109.
- VÁZQUEZ-LUIS, M., BORG, J. A., MORELL, C., BANACH-ESTEVE, G. & DEUDERO, S. 2015. Influence of boat anchoring on *Pinna nobilis*: a field experiment using mimic units. *Marine and Freshwater Research*, 66, 786-794.
- VÁZQUEZ-LUIS, M., MARCH, D., ÁLVAREZ, E., ÁLVAREZ-BERASTEGUI, D. & DEUDERO, S. 2014. Spatial distribution modelling of the endangered bivalve *Pinna nobilis* in a Marine Protected Area. *Mediterranean Marine Science*, 15, 626-634.
- VÁZQUEZ-LUIS, M., NEBOT-COLOMER, E., DEUDERO, S., PLANES, S. & BOISSIN, E. 2021. Natural hybridization between pen shell species: *Pinna rudis* and the critically endangered *Pinna nobilis* may explain parasite resistance in *P. nobilis*. *Molecular Biology Reports*.
- VELASCO, J., LLORET, J., MILLÁN, A., MARIN, A., BARAHONA, J., ABELLÁN, P. & SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, D. 2006. Nutrient and particulate inputs into the Mar Menor lagoon (SE Spain) from an intensive agricultural watershed. *Water, Air, and Soil Pollution*, 176, 37-56.
- VELASCO, L. A. & BORREGO, F. 2004. Captación de semilla y cultivo experimental del hacha *Pinna carnea* Gmelin, 1791 (Bivalvia. Pinnidae) en el Parque Nacional Natural Tayrona, Caribe Colombiano. *Intropica: Revista del Instituto de Investigaciones Tropicales*, 1, 75-83.

- VELASCO, L. A. & NAVARRO, J. M. 2002. Feeding physiology of infaunal (*Mulinia edulis*) and epifaunal (*Mytilus chilensis*) bivalves under a wide range of concentrations and qualities of seston. *Marine Ecology Progress Series*, 240, 143-155.
- VICENTE, N., MORETEAU, J. & ESCOUBET, P. 1980. Etude de l'évolution d'une population de *Pinna nobilis* L.(Mollusque Eulamelibranche) au large de l'anse de la Palud (Parc National de Port-Cros). *Travaux Scientifiques du Parc National de Port-Cros*, 6, 39-67.
- VIDOVIĆ, J., NAWROT, R., GALLMETZER, I., HASELMAIR, A., TOMAŠOVÝCH, A., STACHOWITSCH, M., ČOSOVIĆ, V. & ZUSCHIN, M. 2016. Anthropogenically induced environmental changes in the northeastern Adriatic Sea in the last 500 years (Panzano Bay, Gulf of Trieste). *Biogeosciences*, 13, 5965-5981.
- VIGLIOLA, L. & MEEKAN, M. G. 2009. The back-calculation of fish growth from otoliths. *Tropical fish otoliths: information for assessment, management and ecology*. Springer.
- VILLORA-MORENO, S. & DE ZIO GRIMALDI, S. 1993. Redescription and ecology of *Batillipes phreaticus* Renaud-Debyser, 1959 (Arthrotardigrada, Batillipedidae) in the gulf of Valencia (western Mediterranean). *Cahiers de Biologie Marine*, 34, 387-399.
- WASSNIG, M. & SOUTHGATE, P. 2016. The effects of stocking density and ration on survival and growth of winged pearl oyster (*Pteria penguin*) larvae fed commercially available micro-algae concentrates. *Aquaculture Reports*, 4, 17-21.
- WENTWORTH, C. K. 1922. A scale of grade and class terms for clastic sediments. *The journal of geology*, 30, 377-392.
- WESSELMANN, M., GONZÁLEZ-WANGÜEMERT, M., SERRÃO, E. A., ENGELEN, A. H., RENAULT, L., GARCÍA-MARCH, J. R., DUARTE, C. M. & HENDRIKS, I. E. 2018. Genetic and oceanographic tools reveal high population connectivity and diversity in the endangered pen shell *Pinna nobilis*. *Scientific Reports*, 8, 4770.
- WIDDOWS, J. & BAYNE, B. L. 1971. Temperature Acclimation of *Mytilus Edulis* With Reference to its Energy Budget. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 51, 827-843.
- WIDDOWS, J., DONKIN, P., STAFF, F. J., MATTHIESSEN, P., LAW, R. J., ALLEN, Y. T., THAIN, J. E., ALLCHIN, C. R. & JONES, B. R. 2002. Measurement of stress effects (scope for growth) and contaminant levels in mussels (*Mytilus edulis*) collected from the Irish Sea. *Marine Environmental Research*, 53, 327-356.
- WIDDOWS, J., FIETH, P. & WORRALL, C. 1979. Relationships between seston, available food and feeding activity in the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 50, 195-207.
- WIDDOWS, J. & JOHNSON, D. 1988. Physiological energetics of *Mytilus edulis*: Scope for Growth. *Marine Ecology-progress Series - MAR ECOL-PROGR SER*, 46, 113-121.
- WIDDOWS, J. & STAFF, F. 2006. Biological effects of contaminants: measurement of scope for growth in mussels.
- WILLER, D. F. & ALDRIDGE, D. C. 2019. Microencapsulated diets to improve bivalve shellfish aquaculture for global food security. *Global Food Security*, 23, 64-73.
- WILLIAMS, B. G. & PILDITCH, C. A. 1997. The entrainment of persistent tidal rhythmicity in a filter-feeding bivalve using cycles of food availability. *Journal of Biological Rhythms*, 12, 173-181.

- WINTER, J. E. 1978. A review on the knowledge of suspension-feeding in lamellibranchiate bivalves, with special reference to artificial aquaculture systems. *Aquaculture*, 13, 1-33.
- WONG, W. & CHEUNG, S. 2001. Feeding rates and scope for growth of green mussels, *Perna viridis* (L.) and their relationship with food availability in Kat O, Hong Kong. *Aquaculture*, 193, 123-137.
- WU, R. & SHIN, P. 1998. Transplant experiments on growth and mortality of the fan mussel *Pinna bicolor*. *Aquaculture*, 163, 47-62.
- WÜRTZ, M. 2010. *Mediterranean pelagic habitat: oceanographic and biological processes, an overview*, IUCN.
- YALÇIN, B., ARTÜZ, M. L., PAVLIDOU, A., ÇUBUK, S. & DASSENAKIS, M. 2017. Nutrient dynamics and eutrophication in the Sea of Marmara: Data from recent oceanographic research. *Science of The Total Environment*, 601-602, 405-424.
- YONGE, M. 1953. Form and habit in *Pinna carnea* Gmelin. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 237, 335-374.
- YUKIHIRA, H., KLUMPP, D. & LUCAS, J. 1998. Comparative effects of microalgal species and food concentration on suspension feeding and energy budgets of the pearl oysters *Pinctada margaritifera* and *P. maxima* (Bivalvia: Pteriidae). *Marine Ecology Progress Series*, 171, 71-84.
- ZAVODNIK, D. H.-B., M. LEGAC, M. 1991. Synopsis on the fan shell *Pinna nobilis* L. in The Eastern Adriatic Sea. In: C. F. BOUDOURESQUE, M. A., AND V. GRAVEZ (ed.) *Les Espèces Marines à Protéger en Méditerranée*. Marseille: GIS Posidonie Publications.
- ZHANG, H., SHIN, P. K. & CHEUNG, S. 2015. Physiological responses and scope for growth upon medium-term exposure to the combined effects of ocean acidification and temperature in a subtidal scavenger *Nassarius conoidalis*. *Marine Environmental Research*, 106, 51-60.
- ZHANG, P., ZHAO, T., ZHOU, L., HAN, G., SHEN, Y. & KE, C. 2019. Thermal tolerance traits of the undulated surf clam *Paphia undulata* based on heart rate and physiological energetics. *Aquaculture*, 498, 343-350.
- ZOTOU, M., GKRAANTOUNIS, P., KARADIMOU, E., TSIRINTANIS, K., SINI, M., POURSANIDIS, D., AZZOLIN, M., DAILIANIS, T., KYTINO, E., ISSARIS, Y., GERAKARIS, V., SALOMIDI, M., LARDI, P.-I., RAMFOS, A., AKRIVOS, V., SPINOS, E., DIMITRIADIS, C., PAPAGEORGIOU, D., LATTOS, A. & KATSANEVAKIS, S. 2020. *Pinna nobilis* in the Greek seas (NE Mediterranean): on the brink of extinction? *Mediterranean Marine Science*.
- ZU ERMGASSEN, P. S. E., THURSTAN, R. H., CORRALES, J., ALLEWAY, H., CARRANZA, A., DANKERS, N., DEANGELIS, B., HANCOCK, B., KENT, F., MCLEOD, I., POGODA, B., LIU, Q. & SANDERSON, W. G. 2020. The benefits of bivalve reef restoration: A global synthesis of underrepresented species. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 30, 2050-2065.

Anexo I. Tablas suplementarias

Tabla suplementaria 1: Temperatura del agua mensual media en el sitio más cercano a las estaciones de muestreo. Las filas consecutivas con un mismo color agrupan ubicaciones cercanas a una estación de medición de temperatura.

Localización	Fecha de observación															
	ag-16	sep-16	oct-16	nov-16	dic-16	en-17	feb-17	mar-17	abr-17	may-17	jun-17	jul-17	ag-17	sep-17	oct-17	
	Temperatura (°C)															
Murcia	25.9	24.4	22.1	19.3	16.6	14.8	14.3	14.7	16.6	18.9	22	24.7	25.9	24.4	22.1	
Isla Mijana-Serra Gelada																
Alicante			23.4	19.5	17.3	14.9	14.4	15.2	16.3	19	24.3	26	27.3	25		
Isla Portisot																
Cabo San Antonio																
Cabrera, Santa María 10 m	25.9	25.6	23.6	19.7	16.6	15.4	14.3	14.1	15.3	17.3	19.8	23.5	25.9	25.6	23.6	
Cabrera, Santa María 20 m																
Cabrera, Rates 20 m																
Cabrera, Morobutí 30 m																
Mallorca, Pollensa																
Mallorca, Cabo Pinar																
Mallorca, Portals																
Mallorca, Cala Gat																
Isla Baleares																
Mallorca, San Telmo																
Ibiza, Cala Salada																
Formentera, Illetes																
Menorca, La Mola																
Menorca, Fornells, Cala Sallida																
Menorca, Isla del Aire																
Menorca, Cala Mica																
Menorca, Binibecar																
Menorca, Sa Farola																
Maritim Real	25.8	24.6	22.2	19.1	16.1	14.2	13.8	14.1	16.1	18.8	22.5	24.8	25.8	24.6	22.2	
Valencia																
Maritim Real (tanques IMEDMAR-1(CV))							16	16	18	18	22	22	22	22		
Maritim Real (tanques Oceanographic)							17	17	17	17	17	17	17	17	17	
Columbretes Islands		25.9	23.4	20.1	17.0	15.1	14.2	14.5	16.4	19.1	24.0	25.8	26.7	24.8	21.8	
Serra d'Iria																
Prat de Cabanes																
Tossa de Mar				23	19.7	17.4	15.1	13.9	12.8	12.7	13.6	15.8	19.2	22.8	21.3	18.7

Tabla suplementaria 1

Localización	Fecha de observación															
	ag-16	sep-16	oct-16	nov-16	dic-16	en-17	feb-17	mar-17	abr-17	may-17	jun-17	jul-17	ag-17	sep-17	oct-17	
	Temperatura (°C)															
Medas Islands																
Bahía Alfacas (Zona 1, círculo 1)	25.2	21.5	15.5	12.6	9.4	11.9	15.8	17.9	20.8	26.1	26.7	27.7	22.8	21.5		
Bahía Alfacas (Zona 1, círculo 2)																
Bahía Alfacas (Zona 2, círculo 1)																
Bahía Alfacas (Zona 2, círculo 2)																
Bahía Alfacas (Zona 3, círculo 1)																
Bahía Alfacas (Zona 3, círculo 2)																
Delta del Ebro Galatxo																
Delta del Ebro Mari																
Bahía Fangar (círculo 1)	24.6	20.8	14.2	12.2	7.8	12.8	14.7	18.3	20.8	26.1	24.9	26.3	22.6	20.7		
Bahía Fangar (círculo 2)																
Bahía Fangar (círculo 3)																
Delta Ebro (IRIA)	23	19.7	17.4	15.1												
Cap de Creus I (Portlligat)																
Cap de Creus I (Portlligat tanques IEO)																
Cap de Creus I (Portlligat tanques EAPA)																
Cap de Creus I (Portlligat tanques Oceanografía)																
Cap de Creus I (Portlligat tanques IMEDMAR-LUCV)																
Cap de Creus II (Joncobs)																
Cap de Creus III (Montjoi)																
Cap de Creus III (Canyelles)																
Banyuls-sur-mer (Peyrefitte)	21.9	21.5	19.2	16.9	14.6	13.2	12.8	13.1	14.2	16.8	19.9	21.3	21.5	19.2		
Etang de Leucate																
Etang de Thau																
Etang de Arolles																
Les Aresquiers (Montpellier)																
Frontignan																
Agde																

Tabla suplementaria I

Localización	Fecha de observación												Fuente de los datos	Método de obtención
	nov-17	dic-17	ene-18	feb-18	mar-18	abr-18	may-18	jun-18	jul-18	ago-18	sep-18			
Murcia	Mar Menor	19.3	16.6	14.8	14.3	14.7	16.6	18.9	22	24.7	25.9	24.4	Medias de www.seatemperature.org	Extracción de lecturas de satélite diarias
	Isla Mijana-Serra Gelada													
Alicante	Calpe	19.1	17	14.8	14.3	13.8	15.9	19.4	21.4	25.8	27.1	26.6		
	Isla Porriñol													
	Cabo San Antonio													
Islas Baleares	Cabrera, Santa Maria 10 m	19.7	16.6	15.4	14.3	14.1	15.3	17.3	19.8	23.5	25.9	25.6	Temperature de COB (media desde 2011 a	Sensor Tibdrit
	Cabrera, Santa Maria 20 m													
	Cabrera, Rotes 20 m													
	Cabrera, Morobutí 30 m													
	Mallorca, Pollensa													
	Mallorca, Cabo Pinar													
	Mallorca, Porrals													
	Mallorca, Cala Gat													
	Mallorca, San Telmo													
	Ibiza, Cala Salada													
	Formentera, Illetes													
	Valencia	Menorca, La Mola												
Menorca, Fornells, Cala Salada														
Menorca, Isla del Aire														
Menorca, Cala Mica														
Menorca, Binibecar														
Menorca, Sa Farola														
Castellón	Marina Real	19.1	16.1	14.2	13.8	14.1	16.1	18.8	22.5	24.8	25.8	24.6	Medias de www.seatemperature.org	Extracción de lecturas de satélite diarias
	Marina Real (tanques IMEDMAR-LUCY)												Temperaturas de IMEDMAR-LUCY	Sensor en el tanque
	Marina Real (tanques Oceanografía)	17	17	17	17	17	17	17	17	13	13	13	Temperature de Oceanograts	Sensor en el tanque
Castellón	Columbretes Islands	18.2	14.6	14.2	12.1	11.4	15.4	17.5	23.5	25.8	27.1	26.6	Temperatura de Diego Kur e IMEDMAR-LUCY	Perfiles de sonda multiparamétrica en Islas
	Serra d'Irta													
	Prat de Cabanes													
Tossa de Mar	16.5	13.6	13.4	13.3	12.5	12	16	21	23	24.5	21.8	Temperatura Shimon y datos de Startt	Registro de datos in situ	

Tabla suplementaria 1

Localización	Fecha de observación												Fuente de los datos	Método de obtención			
	nov-17	dic-17	en-18	feb-18	mar-18	abr-18	may-18	jun-18	jul-18	ag-18	sep-18	Temperatura (°C)					
Medas Islands																	
Bahía Alfaes (Zona 1, círculo 1)	14	9.6	12.43	9.6	12.2	16.9	20.4	23.95	27.5	29.15	26.8						Sonda multiparamétrica
Bahía Alfaes (Zona 1, círculo 2)																	
Bahía Alfaes (Zona 2, círculo 1)																	
Bahía Alfaes (Zona 2, círculo 2)																	
Bahía Alfaes (Zona 3, círculo 1)																	
Bahía Alfaes (Zona 3, círculo 2)																	
Delta del Ebro Galatxo																	
Delta del Ebro Marí																	
Bahía Fangar (círculo 1)	12.4	8.6	9.73	8.9	12.3	16.4	18.8	23.8	27.5	27	26						Sonda multiparamétrica
Bahía Fangar (círculo 2)																	
Bahía Fangar (círculo 3)																	
Delta Ebro (IRTA)	13.9	11.8	12.8	11.5	11.8	16.1	19.2	22.8	25.3	26.2	18						Sonda multiparamétrica
Cap de Creus (Portlligat tanques IEO)	16.5	13.6	13.4	13.3	12.5	12	16	21	23	24.5	21.8						Sonda multiparamétrica
Cap de Creus I (Portlligat tanques IFAPA)	18.5	16	16	16	18	13	13	13	13	13	13						Sensor en el tanque
Cap de Creus I (Portlligat tanques Oceanografic)	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17						Sensor en el tanque
Cap de Creus I (Portlligat tanques IMEDMAR-UCV)	17	18	18	12	12	12	12	12	12	12	12						Sensor en el tanque
Cap de Creus II (doncos)	16.5	13.6	13.4	13.3	12.5	12	16	21	23	24.5	21.8						Sonda multiparamétrica
Cap de Creus III (Montjoi)	16.5	13.6	13.4	13.3	12.5	12	16	21	23	24.5	21.8						Sonda multiparamétrica
Cap de Creus III (Canyelles)	16.5	13.6	13.4	13.3	12.5	12	16	21	23	24.5	21.8						Sonda multiparamétrica
Banyuls-sur-mer (Peyrefitte)	16.9	14.6	13.2	12.8	13.1	14.2	16.8	19.9	21.3	21.9	21.5						Extrado de lecturas de satélite dtmas www.seatemperature.org
Etang de Leucate																	
Etang de Thau																	
Etang de Ayrrolles																	
Les Araspuiers (Montpellier)																	
Frontignan																	
Agde																	

Tabla suplementaria 1

Tabla suplementaria 2: Supervivientes mensuales de *Pinna nobilis* en cada estación muestreada.

Localización	Fecha de observación												
	ag-16	sep-16	oct-16	nov-16	dic-16	en-17	feb-17	mar-17	abr-17	may-17	jun-17	jul-17	ag-17
	Supervivientes* (%)												
Murcia					1***								
			50									0	
Alicante	100		60	10	0								
			50										
			80										
	100						16		0				
	100						2.3		0				
	100			13			5.6		0				
	100							1**					
	100			75.61							0		
	100			46.99							0		
	100	100							0				
	100				16								
	100								1**				
		0		0									
		0											
	100		33.3							0			
	100								27.3	0			
	100									0			
	100									0			
	100								20	0			
	100									1**			1**
					100							0	
Valencia							100		100	88	88	50	0
									88	63	63	63	50
			100										23.7
Castellón													

Tabla suplementaria 2

Localización	Fecha de observación												
	ag-16	sep-16	oct-16	nov-16	dic-16	en-17	feb-17	mar-17	abr-17	may-17	jun-17	jul-17	ag-17
Medus Islands		95											
Bahía Alfacés (Zona 1, círculo 1)													
Bahía Alfacés (Zona 1, círculo 2)													
Bahía Alfacés (Zona 2, círculo 1)													
Bahía Alfacés (Zona 2, círculo 2)													
Bahía Alfacés (Zona 3, círculo 1)													
Bahía Alfacés (Zona 3, círculo 2)													
Delta del Ebro Galatxo										100			
Delta del Ebro Mari										100			
Bahía Fangar (círculo 1)													
Bahía Fangar (círculo 2)													
Bahía Fangar (círculo 3)													
Delta Ebro (RITA)													
Cap de Creus (Portlligat)													
Cap de Creus I													
Portlligat (lanques IEO)													
Cap de Creus I (Portlligat lanques)													
Cap de Creus I (Portlligat lanques)													
Cap de Creus I (Portlligat lanques)													
Cap de Creus II (denols)													
Cap de Creus III (Montjoi)													
Cap de Creus III (Canyetes)													
Banyuls-sur-mer (Peyrefitte)													
Etang de Lencate													
Etang de Than													
Etang de Ayrolles													
Les Aresquiers (Montpellet)													
Frontignan													
Agde													

Tabla suplementaria 2

Localización	Fecha de observación												
	sep-17	oct-17	nov-17	dic-17	ene-18	feb-18	mar-18	abr-18	may-18	jun-18	jul-18	ago-18	sep-18
Murcia													
Alicante	Mar Menor												
	Isla Mijangas-Serra												
	Goñadiá												
	Calpe												
	Isla Portixol		0										
	Cabo San Antonio	0							0				
	Cabrera, Santa Maria 10 m												
	Cabrera, Santa Maria 20 m												
	Cabrera, Rates 20 m												
	Cabrera, Morobutti 30 m												
Islas Baleares	Mallorca, Pollensa												
	Mallorca, Cabo Pinar												
	Mallorca, Portals												
	Mallorca, Cala Gat												
	Mallorca, San Telmo	0											
	Ibiza, Cala Salada												
	Formentera, Illetes												
	Menorca, La Mola												
	Menorca, Fornells, Cala Salada												
	Menorca, Isla del Aire												
Valencia	Menorca, Cala Mica												
	Menorca, Binibecar												
	Menorca, Sa Farola		1**			0							
	Marina Real												
	Marina Real (tanques IMEDMAR-LUCY)												
	Marina Real (tanques Oceanogràfic)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	25	0	
	Columbretes Islands		6.6										1**
	Serra d'Iria					100					0		
	Prat de Cabanes		49								0		
	Castellón	Tossa de Mar		82			66		45		1**	0	

Tabla suplementaria 2

Localización	sep-17	oct-17	nov-17	dic-17	ene-18	feb-18	mar-18	abr-18	may-18	jun-18	jul-18	ago-18	sep-18
	Fecha de observación												
	Supervivientes (%)												
Medas Islands			50				28			0			
Bahía Albes (Zona 1, círculo 1)			100	100	100	100	100	100	100	100	29.41	0	
Bahía Albes (Zona 1, círculo 2)			100	100	100	100	100	100	100	100	41.67	4.17	
Bahía Albes (Zona 2, círculo 1)			100	100	100	100	100	100	100	100	91.67	75	
Bahía Albes (Zona 2, círculo 2)			100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Bahía Albes (Zona 3, círculo 1)			100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Bahía Albes (Zona 3, círculo 2)			100	100	100	100	100	100	100	100	92.86	85.72	
Delta del Ebro Galatxo					83								
Delta del Ebro Mari					98								
Bahía Fangar (círculo 1)					100	100	100	100	100	100	100	100	100
Bahía Fangar (círculo 2)					100	100	100	100	100	100	100	100	100
Bahía Fangar (círculo 3)					100	100	100	100	100	100	100	100	100
Delta Ebro (REIA)			100		100	100	100	99	98	94	89	73	62
Cap de Creus (Pordrigat)			100	100	100	100	100	75	50	15	1**	0	
Cap de Creus I (Pordrigat tanques IEO)			100	94.5		72.7	21.8	14.5	7.3	2	2	2	2
Cap de Creus I (Pordrigat tanques)				98	98	96	86	62	38	34	24	20	20
Cap de Creus I (Pordrigat tanques)			100	100	80	60	20	0					
Cap de Creus I (Pordrigat tanques)			100	100	90	70	70	50	20	10	10	10	10
Cap de Creus II (dòncols)			100					50			0		
Cap de Creus III (Mondjo)			100					25		0			
Cap de Creus III (Canyóles)			100					25		0			
Banyols-sur-mer (Peyrefite)			100	100	100	100	100	100	100		50	30	
Etang de Lezente												100	
Etang de Thau												100	
Etang de Ayoilles									100				
Les Arsequiers (Champellier)													
Frontignan							100						
Agde											100		

Tabla suplementaria 2

Anexo II. Lista de publicaciones realizadas durante el doctorado

- GARCÍA-MARCH, J., HERNANDIS, S., VÁZQUEZ-LUIS, M., PRADO, P., DEUDERO, S., VICENTE, N. & TENA-MEDIALDEA, J. 2019. Age and growth of the endangered fan mussel *Pinna nobilis* in the western Mediterranean Sea. *Marine environmental research*, 104795.
- GARCÍA-MARCH, J. R., TENA, J., HERNANDIS, S., VÁZQUEZ-LUIS, M., LÓPEZ, D., TÉLLEZ, C., PRADO, P., NAVAS, J. I., BERNAL, J., CATANESE, G., GRAU, A., LÓPEZ-SANMARTÍN, M., NEBOT-COLOMER, E., ORTEGA, A., PLANES, S., KERSTING, D., JIMENEZ, S., HENDRIKS, I., MORENO, D., GIMÉNEZ-CASALDUERO, F., PÉREZ, M., IZQUIERDO, A., SÁNCHEZ, J., VICENTE, N., SANMARTI, N., GUIMERANS, M., CRESPO, J. L., VALENCIA, J. M., TORRES, J., BARRAJON, A., ÁLVAREZ, E., PEYRAN, C., MORAGE, T. & DEUDERO, S. 2020. Can we save a marine species affected by a highly infective, highly lethal, waterborne disease from extinction? *Biological Conservation*, 243, 108498.
- HERNANDIS, S., GARCÍA-MARCH, J. R., SANCHIS, M. Á., MONLEON, S., VICENTE, N. & TENA, J. 2018. Temperature regulates the switch between light-synchronized and unsynchronized activity patterns in the subtidal bivalve *Pinna nobilis*. *Mediterranean Marine Science*, 10.
- HERNANDIS, S., TENA-MEDIALDEA, J., TÉLLEZ, C., LÓPEZ, D., PRADO, P. & GARCÍA-MARCH, J. R. 2021. Suspended culture of *Pinna rudis* enhances survival and allows the development of a seasonal growth model for Mediterranean Pinnids. *Aquaculture*, 736964.
- PRADO, P., CABANES, P., CATANESE, G., CARELLA, F., CARRASCO, N., GRAU, A., HERNANDIS, S., GARCÍA-MARCH, J. R., TENA, J. & CAIOLA, N. 2020a. Growth of juvenile *Pinna nobilis* in captivity conditions: Dietary and pathological constraints. *Aquaculture*, 735167.
- PRADO, P., CABANES, P., HERNANDIS, S., GARCÍA-MARCH, R. & TENA, J. 2021. Stable isotope analyses reveal major nutritional deficiencies in captive vs. field juvenile individuals of *Pinna nobilis*. *Marine Environmental Research*, 105304.
- PRADO, P., GRAU, A., CATANESE, G., CABANES, P., CARELLA, F., FERNÁNDEZ-TEJEDOR, M., ANDREE, K. B., AÑÓN, T., HERNANDIS, S., TENA, J. & GARCÍA-MARCH, J. R. 2020b. *Pinna nobilis* in suboptimal environments are more tolerant to disease but more vulnerable to severe weather phenomena. *Marine Environmental Research*, 163, 105220.