

LIFE IP INTEMARES

Estado de conservación de la nacra, *Pinna nobilis*, en la laguna del Mar Menor

Septiembre 2024



Autores: Elisabet Nebot-Colomer¹, Elvira Álvarez Pérez¹, Marina Albentosa², María Dolores Belando², Jaime Bernardeau-Esteller², Emilie Boissin³, Gaetano Catanese⁴, Salud Deudero¹, Eugenio Fraile-Nuez⁵, Rocío García-Muñoz², Sebastián Hernandis^{2,6}, Baptiste Mourre⁷, Natalia Petit-Marty⁸, Claire Peyran³, Serge Planes³, Aranzazu Ramos-Segura², Juan Manuel Ruiz², y Maite Vázquez-Luis¹.

Instituciones:

¹C.N. Instituto Español de Oceanografía - C.O. Baleares (IEO, CSIC), Muelle de poniente s/n, 07015, Palma de Mallorca, España.

²C.N. Instituto Español de Oceanografía - C.O. Murcia (IEO, CSIC), Calle Varadero 1, 30740, San Pedro del Pinatar, Murcia, España.

³PSL Research University: EPHE-UPVD-CNRS, UAR 3278 CRIOBE, Université de Perpignan, 66860 Perpignan Cedex, France

⁴Laboratori d'Investigacions Marines i Aquicultura, LIMIA (Gobierno Balear), Avinguda de Gabriel Roca i Garcías, 69, 07157 Port d'Andratx, Illes Balears, España.

⁵C.N. Instituto Español de Oceanografía - C.O. Canarias (IEO, CSIC), Calle Farola del Mar, 22, 38180, Santa Cruz de Tenerife, España.

⁶Instituto de Investigación en Medio Ambiente y Ciencia Marina (IMEDMAR-UCV), Universidad Católica de Valencia SVM, Valencia, Spain

⁷SOCIB, Balearic Islands Coastal Observing and Forecasting System, Palma de Mallorca, Islas Baleares, España.

⁸Instituto de Investigaciones Marinas (IIM, CSIC), Rúa de Eduardo Cabello, 6, 36208, Vigo, España.

Debe citarse como:

Nebot-Colomer, E., Álvarez, E., Albentosa, M., Belando, M.D., Bernardeau-Esteller, J., Boissin, E., Catanese, G., Deudero, S., Fraile-Nuez, E., García-Muñoz, R., Hernandis, S., Mourre, B., Petit-Marty, N., Peyran, C., Planes, S., Ramos-Segura, A., Ruiz, J.M., Vázquez-Luis, M. 2024. Instituto Español de Oceanografía (IEO-CSIC). Estado de conservación de la nacra, *Pinna nobilis*, en la laguna del Mar Menor. Entregable de la Acción C1.1 LIFE IP INTEMARES, 97 pp.

El proyecto LIFE IP INTEMARES, que coordina la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, avanza hacia un cambio de modelo de gestión eficaz de los espacios marinos de la Red Natura 2000, con la participación activa de los sectores implicados y con la investigación como herramientas básicas para la toma de decisiones.

Participan como socios el propio Ministerio, a través de la Dirección General de Biodiversidad, Bosques y Desertificación; la Junta de Andalucía, a través de la Consejería de Sostenibilidad, Medio Ambiente y Economía Azul, así como de la Agencia de Medio Ambiente y Agua; el Instituto Español de Oceanografía del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IEO-CSIC); AZTI; la Universidad de Alicante; la Universidad Politécnica de Valencia; la Confederación Española de Pesca, SEO/BirdLife y WWF-España. Cuenta con la contribución financiera del Programa LIFE de la Unión Europea.

INDICE

Resumen ejecutivo	6
Executive summary	7
1. Introducción y objetivos	8
2. Área de estudio.....	11
3. Materiales y Métodos	13
3.1. <i>Diseño muestral y obtención de datos de campo</i>	<i>14</i>
3.1.1. Búsqueda de individuos	14
3.1.2. Abundancia, densidades y estructura de tallas de la población	15
3.1.3. Modelado larvario e instalación de dispositivos de asentamiento larvario.....	18
3.1.4. Proyecto piloto de resiembra y seguimiento de juveniles en el medio	22
3.1.5. Parcelas demográficas	23
3.1.6. Salinidad y temperatura	24
3.1.7. Evento de reproducción	25
3.2. <i>Obtención de muestras de manto y análisis moleculares.....</i>	<i>27</i>
3.2.1. Toma de muestras de manto	27
3.2.2. Detección de la presencia de patógenos mediante análisis moleculares.....	28
3.2.3. Evaluación conectividad y diversidad genética de la población.....	29
3.2.4. Esfuerzo muestral del proyecto.....	30
3.3. <i>Análisis de los datos</i>	<i>33</i>
3.3.1. Densidades y estructura de tallas 2014-2022	33
3.3.2. Dispositivos de asentamiento larvario (DAL)	33
3.3.3. Cálculo tasas demográficas	33
3.3.4. Análisis de viabilidad poblacional.....	34
3.3.5. Análisis datos moleculares	38
4. Resultados	39
4.1. <i>Evaluación del estado de conservación de la población</i>	<i>39</i>
4.1.1. Distribución, abundancia y estructura de tallas de <i>P. nobilis</i> en la laguna 2014-2019	39
4.1.2. Densidades y estructura de tallas de <i>P. nobilis</i> en la laguna 2019-2022.....	47
4.1.3. Modelado larvario e instalación de dispositivos de asentamiento larvario.....	51
4.1.4. Proyecto piloto de resiembra y seguimiento de juveniles en el medio	52
4.1.5. Determinación grado afectación de la población por patógenos	57

4.1.6.	Evolución salinidad y temperatura.....	58
4.1.7.	Evaluación de la conectividad y diversidad genética de la población.....	59
4.1.8.	Evaluación del impacto del procedimiento de extracción de muestras en la supervivencia de ejemplares.....	63
4.2.	<i>Determinación de la viabilidad de recuperación de la población</i>	64
4.2.1.	Demografía	64
4.2.2.	Análisis de viabilidad poblacional.....	66
5.	Discusión	71
5.1.	<i>Evaluación del estado de conservación de la población</i>	71
5.1.1.	Evolución de la población de <i>P. nobilis</i> desde 2014 al 2019	71
5.1.2.	Evolución del estado de conservación de la población de <i>P. nobilis</i> 2019-2022	73
5.1.3.	Evaluación de la conectividad y diversidad genética de la población.....	81
5.2.	<i>Determinación de la viabilidad de recuperación de la población</i>	82
6.	Conclusiones y recomendaciones	85
7.	Agradecimientos	86
8.	Referencias	87

Resumen ejecutivo

Tras décadas de impactos antrópicos, actualmente la especie emblemática y endémica del Mar Mediterráneo *Pinna nobilis* se enfrenta a una nueva amenaza más grave, una enfermedad multifactorial, asociada a diversos patógenos como el protozoo *Haplosporidium pinnae*, ha provocado casi la extinción de la especie a nivel del Mar Mediterráneo. Actualmente, pueden encontrarse algunos individuos resistentes aislados en aguas costeras del Mar Mediterráneo y poblaciones enteras no afectadas o parcialmente afectadas en lagunas costeras, lagos y en estuarios de España, Francia Italia y Grecia. En el marco del presente proyecto (LIFE INTEMARES, subacción C1.1) se ha realizado un estudio exhaustivo de una de las poblaciones remanentes de la especie situada en la laguna costera del Mar Menor, el cual pretende realizar una evaluación de su estado de conservación y determinar la viabilidad de recuperación de la población. Para ello, entre 2019 y 2022 se han llevado a cabo 6 campañas que han permitido determinar la distribución espacial y batimétrica de la especie en la laguna, su abundancia y densidades, su crecimiento y estructura de tallas, su capacidad de reclutamiento, y su estructura y diversidad genética. Para determinar dichos parámetros se han realizado búsquedas de individuos y censos visuales prospectando un total de 281,173.35 m², se ha realizado un modelado larvario simulando la dispersión larvaria desde 6 sitios, se han instalado 75 dispositivos de asentamiento larvario y 13 parcelas demográficas, y se han obtenido 317 muestras de manto. Los resultados del presente estudio resaltan la presencia de una población de nacra con bajas densidades y principalmente con individuos localizados en zonas someras cercanas a las islas y la Manga del Mar Menor, zonas vulnerables a una serie de impactos tales como los eventos de eutrofización, lluvias torrenciales, impactos por fondeos, etc. La población, a lo largo de los 3 años de muestreo ha mostrado signos de estabilización de la densidad de individuos, con porcentajes de mortalidad normales y aumento en la talla de los individuos. Sin embargo, los resultados de los dispositivos de asentamiento larvario y las búsquedas de reclutas *in situ*, así como el seguimiento demográfico resaltan que a pesar de que los individuos son capaces de reproducirse, la población de nacra no es capaz de reclutar con éxito, probablemente debido a las condiciones ambientales de la laguna. Este dato junto con la tasa de mortalidad obtenida en las parcelas demográficas resulta en una tasa de crecimiento negativo de la población y muy dependiente de la esperanza de vida de los individuos. Los análisis de viabilidad poblacional llevados a cabo determinan que, bajo las condiciones biológicas y ambientales actuales, la población de nacra del Mar Menor está al límite de una posible extinción local en el plazo de 7 años, lo que podría suponer la pérdida de la especie en una de las pocas zonas santuario que quedan para la nacra a nivel del Mar Mediterráneo. Por tanto, son necesarias acciones urgentes de gestión y conservación centradas en la restauración del ecosistema y la protección de los individuos de *P. nobilis* para evitar esta extinción poblacional y la pérdida de uno de los últimos reservorios de esta emblemática especie.

Executive summary

After decades of anthropogenic impacts, the Mediterranean Sea endemic species *Pinna nobilis* is now facing a new and more serious threat, a multifactorial disease associated with various pathogens such as the protozoan parasite *Haplosporidium pinnae*, has caused the near extinction of the species at the Mediterranean Sea level. Currently, some isolated resistant individuals can be found in coastal waters of the Mediterranean Sea and entire unaffected or partially affected populations in coastal lagoons, lakes and estuaries in Spain, France, Italy and Greece. Within the framework of the present project (LIFE INTEMARES, subaction C1.1) an exhaustive study of one of the remaining populations of the species located in the coastal lagoon of the Mar Menor has been carried out, which aims to evaluate its conservation status and determine the viability of the population's recovery. To this end, between 2019 and 2022, 6 field campaigns have been carried out to determine the spatial and bathymetric distribution of the species in the lagoon, its abundance and densities, its growth and size structure, its recruitment capacity, and its genetic structure and diversity. To determine these parameters, searches for individuals and visual censuses were carried out, prospecting a total of 281,173.35 m², larval modeling was carried out simulating larval dispersion from 6 sites, 75 larval settlement devices and 13 demographic plots were installed, and 317 mantle samples were collected. The results of the present study highlight the presence of a pen shell population with low densities and mainly with individuals located in shallow areas close to the islands and the Manga del Mar Menor, areas vulnerable to a series of impacts such as eutrophication events, torrential rains, impacts due to anchoring, etc. The population, throughout the 3 years of sampling, has shown signs of stabilization of densities, with normal mortality percentages and an increase in the size of the individuals. However, the results of the larval settlement devices and searches for recruits in situ, as well as demographic monitoring highlight that although individuals are able to reproduce, the nacre population is not able to recruit successfully, probably due to the environmental conditions of the lagoon. This data together with the mortality rate obtained in the demographic plots conclude a negative growth rate of the population depending on the life expectancy of the individuals. The population viability analyses carried out determine that under current biological and environmental conditions, the nacre population of the Mar Menor is on the verge of possible local extinction within 7 years, which could mean the loss of the species in one of the few remaining sanctuary areas for the nacre in the Mediterranean Sea. Therefore, urgent management and conservation actions focused on the restoration of the ecosystem and the protection of *P. nobilis* individuals are necessary to avoid this population extinction and the loss of one of the last reservoirs of this emblematic species.

1. Introducción y objetivos

La especie endémica del Mar Mediterráneo *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758) es el mayor bivalvo de este mar y uno de los bivalvos más grandes del mundo (Zavodnik et al. 1991). Puede alcanzar hasta 1.20 m de longitud, y su longevidad puede superar los 45 años (Rouanet et al. 2015). La nacra es una especie hermafrodita sucesiva, el desarrollo de ambos sexos no es sincrónico para evitar la autofecundación (De Gaulejac 1995, Deudero et al. 2017), aunque este proceso no puede descartarse (Trigos et al. 2018, Prado et al. 2020). La especie alcanza la madurez sexual hacia los dos años de vida (Richardson et al. 1999) y se reproducen anualmente entre mayo-agosto (De Gaulejac et al. 1995, Deudero et al. 2017, Kersting & García-March 2017), periodo en que liberan sus gametos en la columna de agua y donde se produce fecundación externa. Se estima que las larvas pueden permanecer en la columna de agua hasta 1 mes (Deudero et al. 2017, Kersting & García-March 2017, Trigos et al. 2018), periodo tras el cual las larvas se asientan por gravedad y se fijan al sustrato. *Pinna nobilis* habita principalmente sobre fondos blandos en praderas de *Posidonia oceanica* o *Cymodocea nodosa* (Zavodnik 1967, Zavodnik et al. 1991) a profundidades que oscilan entre 0.5 y 60 m (Butler et al. 1993). También habita en estuarios (Addis et al. 2009, Prado et al. 2014), lagos marinos (Katsanevakis 2004, 2009, Donato et al. 2021) y en varias lagunas costeras de España (García-March 2003), Túnez (Zakhama-Sraieb et al. 2011, Rabaoui et al. 2011), Francia (De Gaulejac & Vicente 1990, Simide et al. 2019, Foulquie et al. 2020, Peyran et al. 2022b) e Italia (Russo 2012, 2017).

En la antigüedad, la especie fue un valioso recurso para la explotación humana. Los egipcios y romanos la explotaron por su biso, la "seda marina" con la que tejían telas de gran valor para las personas con gran poder adquisitivo del momento (Historia Naturalis, Liber IX). Otras culturas, como la islámica, en el siglo XIX recolectaban conchas para la fabricación de botones, artículos de joyería o mangos de cuchillos. La nacra también tenía gran valor como alimento en la cocina tradicional de todo el Mediterráneo (Katsanevakis et al. 2011). Además de su importante valor cultural, el gran tamaño de su concha permite a la nacra proporcionar funciones y servicios ecosistémicos, como hábitat para otras especies y mejora de la calidad del agua gracias a su gran potencial de filtración (ejemplares de 30 cm pueden filtrar más de 2500 l/día (Trigos et al. 2014). Sin embargo, durante los siglos XX y XXI, las poblaciones de *P. nobilis* se han visto reducidas considerablemente en todo el Mediterráneo debido a diversos impactos causados por actividades antropogénicas, como la recolección ornamental, la pesca comercial y recreativa, y el impacto provocado por fondeo de embarcaciones, entre otras

(Katsanevakis & Thessalou-Legaki 2009, Deudero et al. 2015, Vázquez-Luis et al. 2015a, Öndes et al. 2020). En consecuencia, desde 1992, esta especie fue catalogada como especie vulnerable y protegida por el anexo IV de la Directiva hábitats de la Unión Europea y el anexo II del Convenio de Barcelona.). En la actualidad, tras décadas de impactos antrópicos, la especie se enfrenta a una nueva amenaza más grave, una epizootia que ha provocado una mortalidad masiva se ha extendido rápidamente y ha provocado la práctica extinción de la especie a nivel del Mar Mediterráneo (Katsanevakis et al. 2021). Esta mortalidad masiva se atribuyó inicialmente a una nueva especie de parásito haplosporidio (Vázquez-Luis et al. 2017, Darriba 2017), denominada *Haplosporidium pinnae* (Catanese et al. 2018). Diversos trabajos han sugerido que puede ser el principal agente etiológico causante de la epizootia (Box et al. 2020, Grau et al. 2022), aunque estudios recientes apuntan a la existencia de una enfermedad multifactorial en la que estarían implicados otros agentes como bacterias (*Mycobacterium* sp, *Vibrio mediterranei*) o virus (Picornavirus) que puedan estar afectando y que se trate de un proceso mucho más complejo (Carella et al. 2019, Šarić et al. 2020, Scarpa et al. 2020, Künili et al. 2021). Las primeras poblaciones de *P. nobilis* afectadas por el patógeno fueron las localizadas en la costa sureste de España en otoño de 2016 (Vázquez-Luis et al. 2017), dichas poblaciones sufrieron mortalidades del 100% de los ejemplares, iniciándose así una serie de eventos de mortalidad masiva (EMMs) en los años siguientes en todo el Mar Mediterráneo, con mortalidades similares (García-March et al. 2020, Katsanevakis et al. 2021, Grau et al. 2022). Actualmente, pueden encontrarse algunos individuos resistentes aislados en aguas costeras del Mar Mediterráneo (<https://www.observadoresdelmar.es/Proyecto/Proyecto-Nacras/14>). Sin embargo, debido a la escasez de individuos resistentes y a la distancia geográfica entre ellos, es bastante improbable que se reproduzcan exitosamente. Las únicas agregaciones de individuos reproductivamente viables se encuentran en algunas lagunas costeras, lagos y estuarios de España, Francia, Italia, Croacia y Grecia (García-March et al. 2020, Zotou et al. 2020, Donato et al. 2021, Prado et al. 2021, Nebot-Colomer et al. 2022, Peyran et al. 2022b). Entre cientos y miles de individuos sanos permanecen vivos en estas zonas, no afectados o parcialmente afectados por los patógenos (Donato et al. 2021, Katsanevakis et al. 2021, Prado et al. 2021, Nebot-Colomer et al. 2022, Peyran et al. 2022a). Sin embargo, estas poblaciones están fuertemente impactadas por multitud de actividades humanas y además se encuentran en entornos inestables y vulnerables a tormentas y eventos climáticos extremos, que pueden afectar de forma parcial a poblaciones enteras (Prado et al. 2021, Cortés-Melendreras et al. 2022, Nebot-Colomer et al. 2022). Debido a esta situación, en 2018 en España la especie fue declarada especie

en “situación crítica” a través de la Orden TEC/1078/2018, de 18 de septiembre, y posteriormente fue catalogada como “en Peligro de Extinción” mediante la Orden TEC 596/2019, de 8 de abril de 2019. Además, en 2019 la especie se catalogó como especie en peligro crítico de extinción en la Lista Roja de la UICN (Kersting et al. 2019).

En España, las dos únicas poblaciones de *P. nobilis* que permanecen vivas son las situadas en el Delta del Ebro y en la laguna costera del Mar Menor (García-March et al. 2020, Cortés-Melendreras et al. 2022, Nebot-Colomer et al. 2022). Estas dos únicas poblaciones son de gran relevancia para la conservación de la especie y ambas se caracterizan por su elevada vulnerabilidad tanto por el área en la que habitan como por las amenazas existentes para la especie (Cabanellas-Reboredo et al. 2019, García-March et al. 2020, Cortés-Melendreras et al. 2022). Las nacras que forman estas poblaciones no son ejemplares resistentes a los patógenos, sino nacras que no se han infectado gracias a las condiciones ambientales especiales de ambas zonas, por lo que se las considera como “zonas santuario” libre de patógeno. No obstante, en los últimos años se han visto parcialmente afectadas por mortalidades asociadas a *H. pinnae* (Prado et al. 2021, Nebot-Colomer et al. 2022).

En relación con la laguna del Mar Menor, los primeros datos sobre la población de *P. nobilis* son de principios de los años 80, se cree que los primeros individuos de *P. nobilis* se asentaron en la laguna a partir de la apertura de canales artificiales en 1976 (Rodríguez Babio & Navarro Tárrega 1983). Posteriormente, se observó un aumento de las densidades de la población (Calvín et al. 1999, Templado 2001), llegando a observar hasta ocho individuos por 100 m² en algunas de las zonas más profundas de la cuenca norte (García-March 2003). En los años siguientes la población fue aumentando en densidad, 2 estimándose entre 2013-2014 una población total de entre $1.825.543 \pm 109.619$ (Belando et al. 2014) y $1.609.943 \pm 3.309$ individuos (Giménez-Casaldueiro et al. 2020). Sin embargo, a mitad de 2015, tras décadas de aportes de nutrientes y fitosanitarios procedentes de las actividades agrícolas cercanas de la cuenca vertiente, la laguna empezó a sufrir un colapso medioambiental experimentando floraciones masivas de algas nocivas que provocaron un grave evento de eutrofización en la primavera de 2016 (Perez-Ruzafa et al. 2019, Ruíz et al. 2020, Mercado et al. 2021). La alta concentración de fitoplancton impedía que la luz llegara a las zonas más profundas de la laguna, limitando la fotosíntesis en estas zonas (CACMM 2017). Como consecuencia, la vegetación por debajo del nuevo umbral fótico murió, y la materia orgánica que se acumuló en el fondo causó hipoxia. La ausencia de oxígeno provocó la muerte de la mayoría de las comunidades faunísticas que se encontraban más allá de los 2.5-3 m de profundidad,

incluyendo la mayoría de individuos de *P. nobilis* (Belando et al. 2017, Giménez-Casaldueiro et al. 2020, Nebot-Colomer et al. 2022). Teniendo en cuenta el contexto crítico global de la especie y la situación particular de ésta en la laguna del Mar Menor, el proyecto LIFE INTEMARES (LIFE15 IPE ES 012), subacción C1.1 “Proyectos de conservación y recuperación de hábitats y especies” pretende realizar una evaluación de su estado de conservación y determinar la viabilidad de recuperación de la población. Así como proponer acciones de conservación en el caso de que sea necesario. Para llevar a cabo estos objetivos dentro del marco del proyecto INTEMARES, subacción C1.1. se establecieron 4 subobjetivos prioritarios:

- 1) Identificar y cartografiar las poblaciones de nacras (densidad y tallas) en la laguna del Mar Menor para identificar cuáles de ellas presentan poblaciones con adultos maduros que puedan ayudar a la recuperación de la especie para priorizar en estas zonas medidas de conservación.
- 2) Elaborar un modelo para la identificación de poblaciones fuente (adultos reproductores) y zonas sumidero (receptoras de larvas) para identificar zonas óptimas de instalación de colectores larvarios.
- 3) Proyecto piloto de resiembra y seguimiento de juveniles en el medio en dos zonas óptimas a partir de la recolección de semillas de *Pinna nobilis* de colectores larvarios para asegurar la supervivencia de la especie.
- 4) Evaluar la conectividad genética entre las distintas agrupaciones de nacra dentro de la laguna del Mar Menor y determinar la diversidad genética de la población remanente.

2. Área de estudio

El proyecto se centra en la laguna del Mar Menor situada en el sureste de la Península Ibérica (37° 46 N, 0° 47 O, Figura 1), área que se caracteriza por presentar escasez de precipitaciones (<300 mm al año) que se producen principalmente en forma de tormentas en otoño e invierno (Martínez-López et al. 2014). Es una laguna semicerrada, de 135.5 km² con una profundidad entre 0 y 7.5 m, y una media de 4.9 m (Fraile-Nuez et al. 2018). La laguna, está aislada del Mediterráneo por una barra arenosa de 20 km de longitud por 100-900 m de anchura, denominada “La Manga”, únicamente conectada con el Mar Mediterráneo a través de cinco canales (“La Torre”, “El Ventorrillo”, “El Charco”, “El Estacio” y “Marchamalo”, Figura 1). En cuanto a los regímenes de temperatura y salinidad dentro de la laguna, su aislamiento parcial provoca mayores variaciones estacionales en comparación con el mar abierto. La temperatura suele oscilar entre valores cercanos a

10°C en invierno y 31°C en verano. Dichas características geomorfológicas y ambientales le confieren hipersalinidad, que suele oscilar entre 38 y 47. Es una zona de alto valor ecológico y actualmente está protegida por diferentes leyes y convenios multiestatales. En 1989, fue declarada área protegida nacional; posteriormente se han declarado diversas Zonas de Especial Protección para las Aves (ZEPA) y Zonas Especiales de Conservación (ZEC); el Mar Menor ha sido también declarado Humedal de Importancia Internacional (sitio Ramsar); y está asimismo incluido en la Zona Especialmente Protegida de Importancia para el Mediterráneo (ZEPIM) del Área del Mar Menor y zona oriental mediterránea de la costa de la Región de Murcia, así como Lugar de Importancia Comunitaria (LIC) integrado en la Red Natura 2000 (Velasco et al. 2006). Desde un punto de vista socioeconómico, este ecosistema ha proporcionado numerosos bienes y servicios y, en consecuencia, durante décadas diferentes actividades como la agricultura, el turismo, la pesca tradicional o las antiguas explotaciones mineras (plomo y zinc) han afectado el ecosistema.

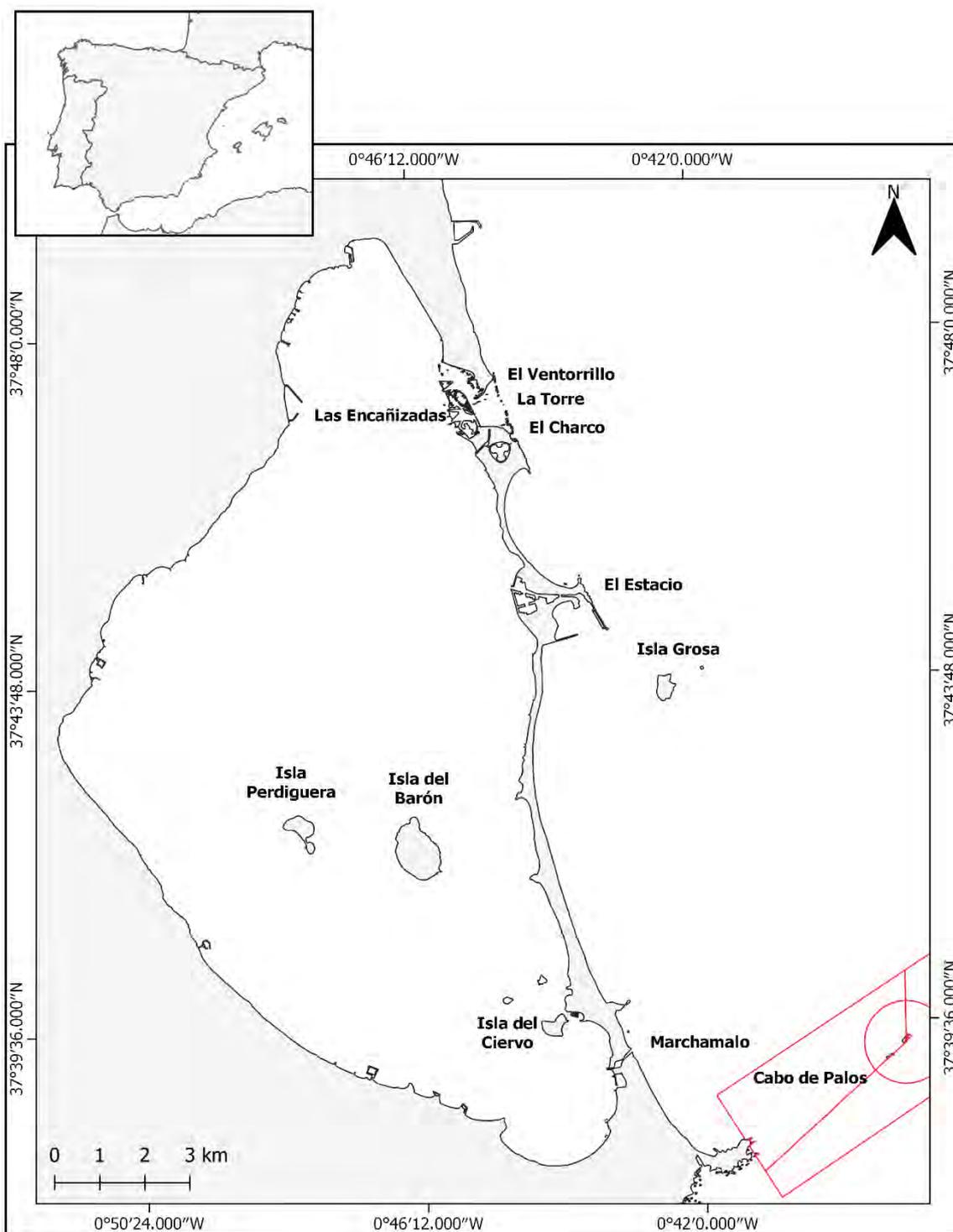


Figura 1. Área de estudio. La laguna del Mar Menor con los cinco canales que conectan con el Mar Mediterráneo (El Ventorrillo, La Torre, El Charco, El Estacio y Marchamalo). El área especial de conservación de Isla Grosa y la Reserva Marina Cabo de Palos-Islas Hormigas (en rojo los límites de la RM).

3. Materiales y Métodos

Para llevar a cabo los objetivos del proyecto desde 2019 hasta mayo de 2022 se han realizado un total de 6 campañas de muestreo en la laguna del Mar Menor: campaña

MENOR_PINNA_1119 realizada los días 18-30 de noviembre de 2019, MENOR_PINNA_0620 realizada los días 17-27 de junio de 2020, MENOR_PINNA_1020 realizada los días 2-15 de octubre de 2020, MENOR_PINNA_0421 realizada los días 20 de abril a 2 de mayo de 2021, MENOR_PINNA_0921 realizada los días 15 de septiembre a 1 de octubre de 2021 y MENOR_PINNA_0522 realizada los días 17 al 31 de mayo de 2022.

3.1. Diseño muestral y obtención de datos de campo

3.1.1. Búsqueda de individuos

Con el fin de identificar y cartografiar las poblaciones nacra en la laguna, y así identificar cuáles de ellas presentan poblaciones con adultos maduros que puedan ayudar a la recuperación de la especie, a lo largo de las campañas realizadas desde 2019 se han realizado búsquedas de individuos. Las primeras búsquedas realizadas en noviembre de 2019 consistieron en realizar censos visuales mediante buceo con escafandra autónoma. Durante estas búsquedas se prospectaron tanto zonas someras como profundas. Posteriormente, después de obtener los primeros resultados sobre la distribución espacial y batimétrica de la nacra dentro de la laguna, los esfuerzos de muestreo se centraron en las zonas que tenían mayor probabilidad de albergar individuos vivos, es decir, zonas más someras (0-3 m de profundidad). En las siguientes campañas, con el objetivo de aumentar la eficacia y superficie barrida, las búsquedas de individuos se realizaron con vehículos de propulsión subacuática (DPV) (Figura 2).

Alrededor de toda la costa somera de la laguna, se realizaron transectos de longitud y anchura variable, en función de las condiciones de visibilidad, autonomía del vehículo, presencia de redes de pesca, proximidad a zonas portuarias, etc.). Los transectos se realizaron haciendo uso del equipo ligero de buceo, donde cada buceador arrastraba una boya de superficie, junto a un GPS y una sonda de profundidad. El GPS grababa el desplazamiento del buceador mediante la toma de puntos georreferenciados cada 50 m. Durante los transectos se apuntaba la observación de nacras vivas y/o muertas, y se tomaba su punto georreferenciado y la profundidad a la que se encontraba.

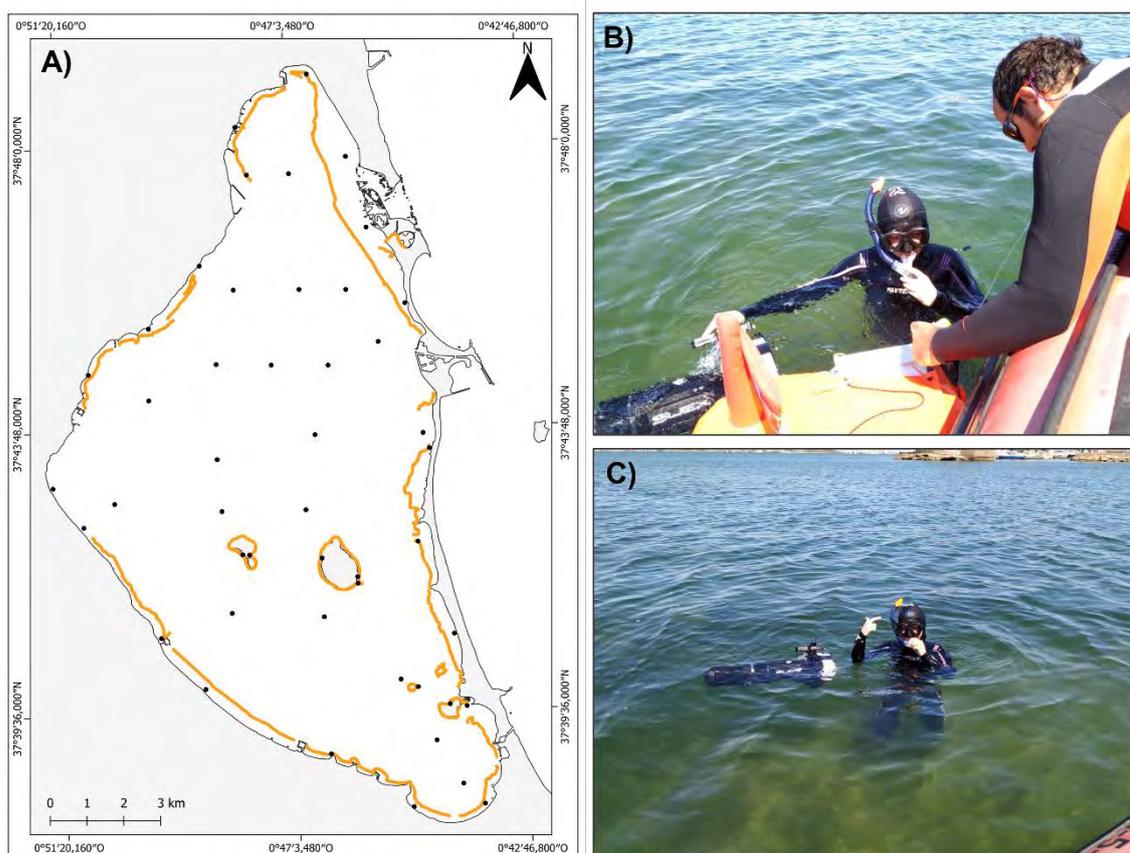


Figura 2. Búsqueda de individuos. A) Los puntos negros representan los sitios donde se realizaron censos visuales con transectos. La línea naranja es el recorrido realizado con los vehículos de propulsión subacuática (DPV). B y C) Buzos con DPV en varias localidades muestreadas.

3.1.2. Abundancia, densidades y estructura de tallas de la población

Observando resultados previos sobre la distribución y densidades de *P. nobilis* dentro de la laguna en 2014 y 2017 obtenidos a partir de los muestreos realizados por Belando et al. (2014, 2018), se diseñó el primer muestreo del proyecto que tenía como objetivo identificar y cartografiar las poblaciones de nacra en la laguna para identificar cuáles de ellas presentan poblaciones con adultos maduros que puedan ayudar a la recuperación de la especie. Con dicho fin, se determinó la densidad, abundancia y distribución espacial y batimétrica de individuos de *P. nobilis* en 2019. En noviembre de 2019, el diseño muestral empleado se asemejó bastante al utilizado por Belando et al. (2014, 2018) con el fin de obtener datos comparables. Sin embargo, se modificó ligeramente con el objetivo de muestrear sitios con una mayor probabilidad de albergar individuos de *P. nobilis*. Por lo tanto, se volvieron a visitar 37 de los 57 sitios anteriormente muestreados (2014 y 2017), y se añadieron 10 sitios nuevos. En total, 28 de los sitios muestreados en 2019 se caracterizaban por ser someros (S, 0-3 m) y 19 sitios por ser más profundos (P, 3-7 m) (Figura 3).

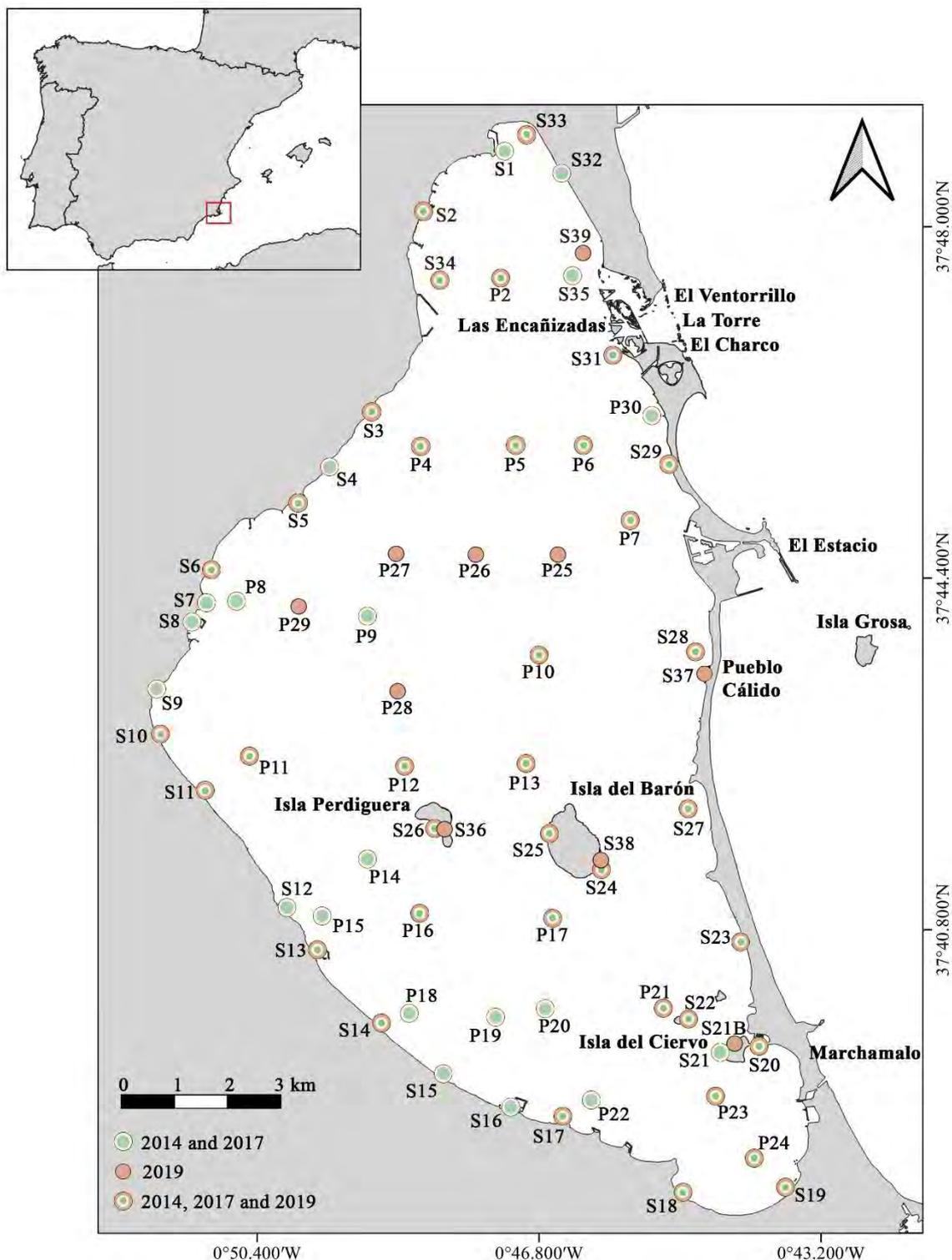


Figura 3. Sitios muestreados en la laguna del Mar Menor en 2014 y 2017 (Belando et al., 2014, 2018) y en 2019 por la presente acción C1.1. S: estaciones someras 0-3m; P: estaciones profundas 3-7m.

Para determinar la abundancia y densidad en cada sitio se llevaron a cabo transectos lineales mediante buceo con escafandra autónoma que se recorrían por una pareja de

buceadores en diversos puntos de la laguna (Figura 3). En cada transecto se contabilizaban el número de individuos vivos y muertos, la profundidad inicial y final del transecto y el hábitat predominante del sitio. El número de transectos por sitio varió de 1 a 15, y su longitud y anchura variaron en función de las condiciones de visibilidad y tipo de hábitat. En total, en 2019 se prospectaron 30,398 m² (Tabla 1) y las densidades de ejemplares se expresaron en individuos por 100 m².

Posteriormente, en base a los resultados obtenidos en 2019, durante los muestreos de 2020, 2021 y 2022 se monitorizaron mediante transectos lineales los posibles cambios en el porcentaje y la densidad de individuos vivos y muertos de los dos sitios que presentaron mayor densidad de *P. nobilis* en 2019 (Pueblo Cálido e Isla del Barón) (Figura 3). Excepcionalmente, en 2022 sólo se monitorizó Isla del Barón. En estos dos sitios objetivo, cada año de muestreo se realizaron entre 6 y 18 transectos lineales de 30 m de longitud y anchura variable (en función de la visibilidad). En total se muestreó una superficie de 1695 m² en 2020, 1050 m² en 2021 y 375 m² en 2022. En cada año de muestreo, se registró el número de individuos vivos y muertos y se expresó en individuos por 100 m².

Para determinar la estructura de tallas de la población y su crecimiento a lo largo de los 4 años de muestreo, se midió la anchura máxima de la concha de todos los individuos vivos y muertos encontrados durante cada muestreo. La anchura máxima se midió *in situ* utilizando una tablilla en forma de L con una precisión de ± 1 cm (Álvarez et al. 2017) (Figura 4).



Figura 4. Metodologías de muestreo. A) Censos visuales con transecto lineal. B) Medida de anchura máxima de la valva. Fotografías Javier Ferrer y Equipo COB-IEO.

3.1.3. Modelado larvario e instalación de dispositivos de asentamiento larvario

Una vez identificadas las poblaciones fuente con presencia de individuos vivos se realizó un modelo de dispersión larvaria para así identificar las posibles zonas que pudieran actuar como sumidero larvario, y así instalar dispositivos de asentamiento larvario (DAL). Para realizar este modelo se utilizaron datos de campos de velocidad horizontal proporcionados por las medidas ADCP recogidas durante cuatro campañas realizadas por (Fraile-Nuez et al. 2018) entre 2016 y 2017 en el marco de un estudio realizado por el IEO en colaboración con la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM) y el Instituto Hidrográfico de la Marina (IHM). Dichas medidas describían el campo de corrientes promedio en diferentes estaciones en 2016 y 2017 (noviembre de 2016, febrero de 2017, junio de 2017 y septiembre de 2017), y en varias capas de profundidad; capa superficial (0 a 3 m), capa profunda (3 a 7 m) y toda la columna de agua (1-7 m) (Fraile-Nuez et al. 2018).

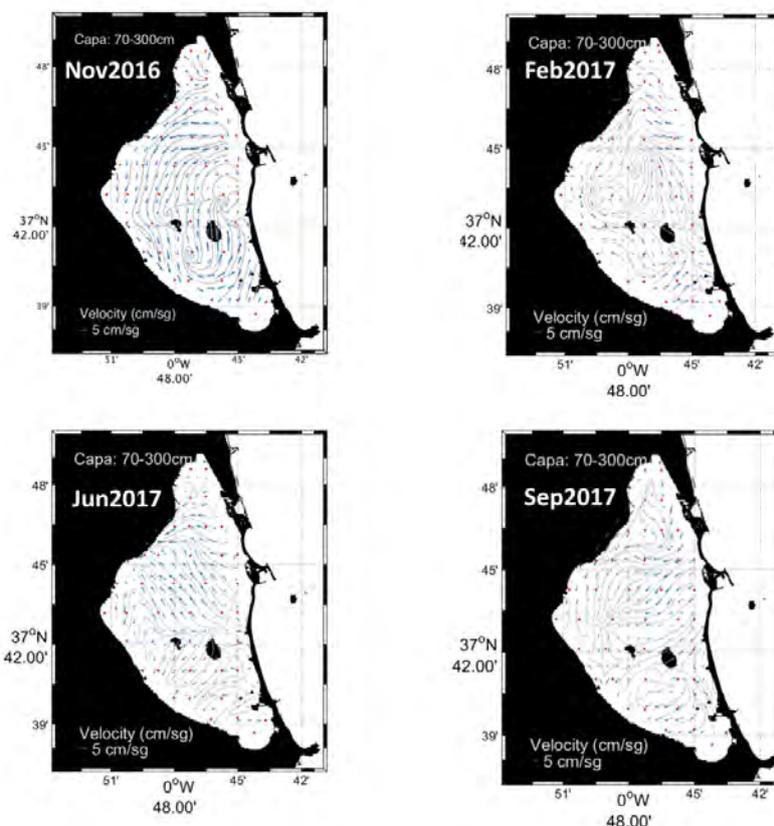


Figura 5. Ejemplo mapas de distribución del campo de velocidad promedio obtenidos de (Fraile-Nuez et al. 2018) para la capa superficial (70-300 cm) para cada una de las 4 campañas realizadas en el Mar Menor (nov16, feb17, jun17 y sep17).

Haciendo uso de estos datos de campo de corrientes promedio se realizó un modelo de dispersión larvaria mediante la simulación de la advección de partículas pasivas en los

diferentes campos de velocidad. En la simulación las partículas pasivas fueron liberadas desde los seis sitios, localizados mediante el presente proyecto, que albergaban individuos de *P. nobilis* (Pueblo Cálido, Isla del Barón, Isla Perdiguera E, e Isla Perdiguera O, (Figura 3), y fueron advectadas durante un periodo de tiempo máximo de 30 días utilizando un algoritmo Runge-Kutta de 4º orden. En la simulación no se aplicó difusión, y la advección se detuvo cuando las partículas alcanzaron la costa.

Basándonos en los resultados obtenidos en el modelo de dispersión larvaria y con el objetivo de obtener semillas para el proyecto piloto de resiembra (objetivo 3), un total de 45 dispositivos de asentamiento larvario (DALs) (Figura 6), 12 someros (0.5-3 m) y 33 profundos (3-6 m) fueron instalados dentro de la laguna en junio de 2020. Además, teniendo en cuenta la posible exportación de larvas al Mar Mediterráneo, se instalaron dos DALs adicionales fuera de la laguna, uno en Isla Grosa (C51) y el otro en Reserva Marina de Cabo de Palos e Islas Hormigas (C52) a profundidades que oscilaban entre 5 y 30 m (Figura 7). Los DALs utilizados en este estudio siguieron el diseño de otros DAL utilizados exitosamente en otros estudios (Cabanellas-Reboredo et al. 2009, Kersting & García-March 2017, Kersting et al. 2020). Estos DALs estaban formados por 3 bolsas de malla de plástico que contenían ocho mallas de cebolla cada una. Las bolsas de malla de plástico estaban sujetas a una cuerda que se fijaba a un amarre de hormigón y se mantenía verticalmente mediante una boya sumergida. Cada DAL estaba etiquetado (Figura 6).

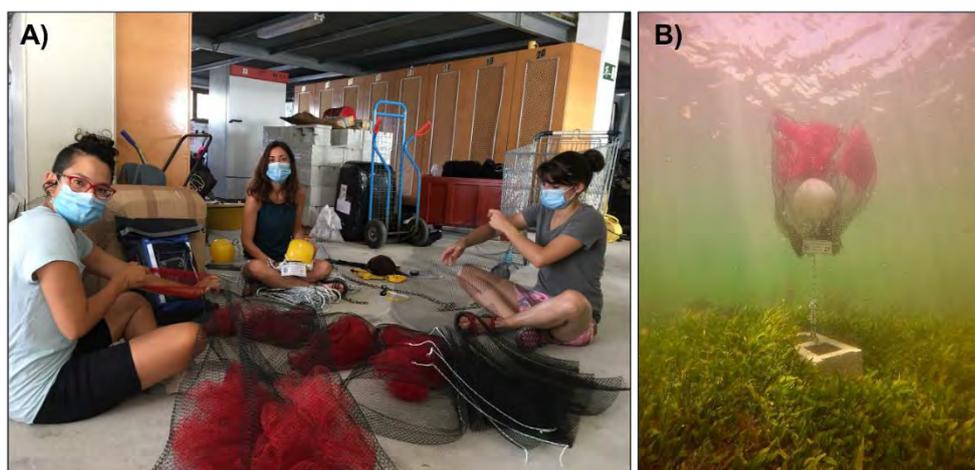


Figura 6. A) Preparación de los DAL, B) DAL instalado en Pueblo Cálido.

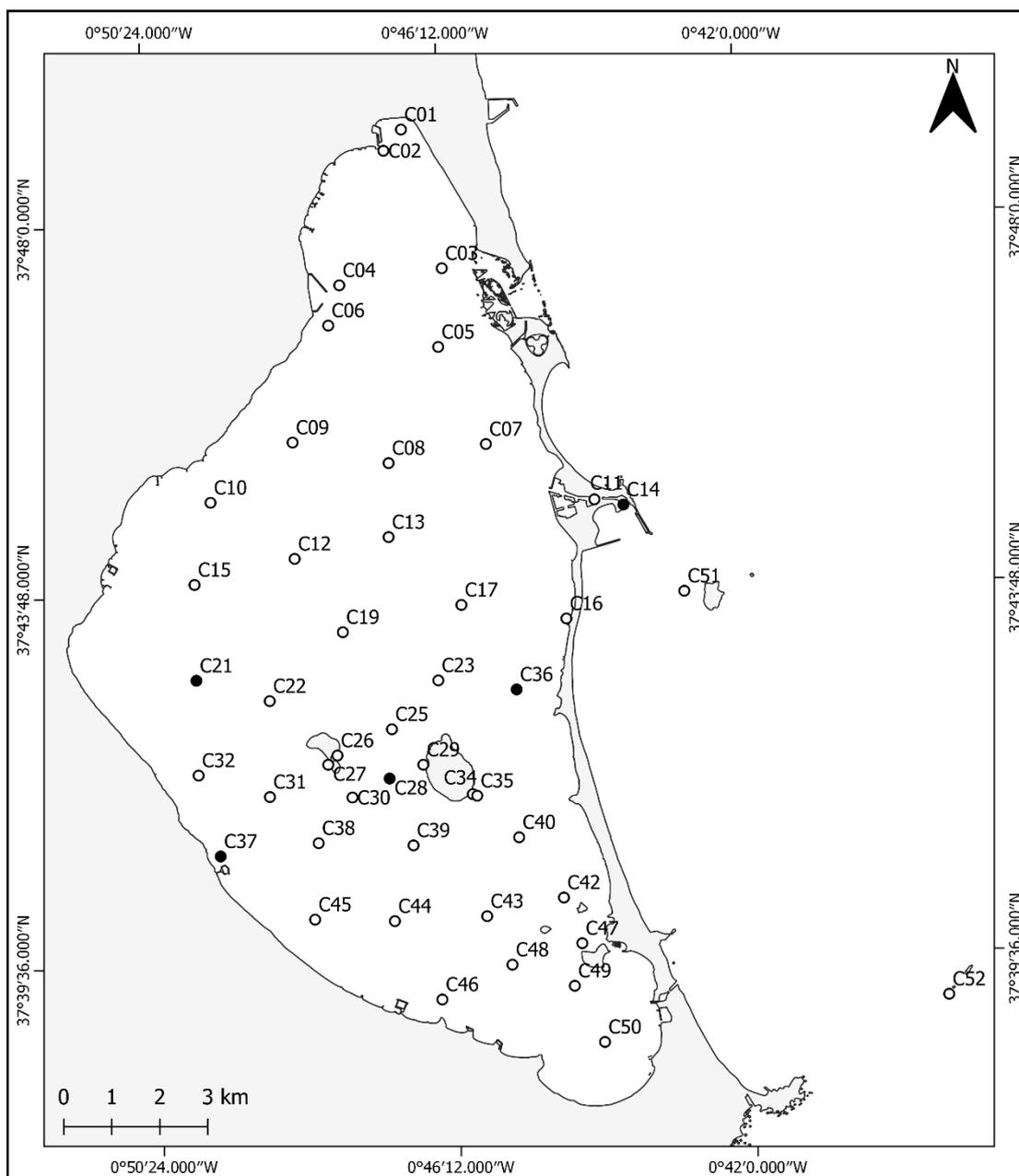


Figura 7. Dispositivos de asentamiento larvario instalados en 2020. Los puntos negros representan los dispositivos perdidos en este periodo.

La recuperación de los DAL se realizó en octubre, coincidiendo con el fin de la época de reproducción y asentamiento de las larvas. Los dispositivos de asentamiento larvario fueron extraídos mediante buceo con escafandra autónoma o apnea, los cuales fueron almacenados en capazos individuales dentro de la embarcación hasta llegar al laboratorio. Al llegar al laboratorio los DAL fueron almacenados inmediatamente en tanques con aireación (Figura 8) y fueron procesados en el laboratorio por orden de retirada del medio, siempre identificando los colectores y sus tres bolsas de malla.

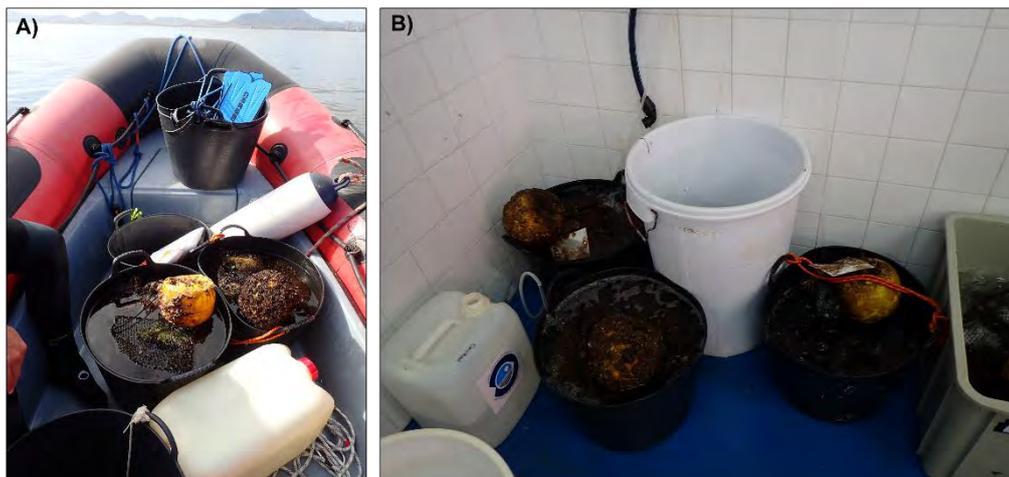


Figura 8. A) Extracción de los DAL mantenidos en agua hasta su traslado al laboratorio donde se les instalaba en tanques con aireación (B).

Todos los colectores larvarios se pesaron (peso húmedo), y las tres bolsas de malla de plástico y las 24 bolsas de cebolla se abrieron cuidadosamente para buscar reclutas de *P. nobilis* a simple vista. Además, toda la flora y fauna adherida a las bolsas se identificó y contabilizó como porcentaje de cobertura y/o abundancia (Figura 9).

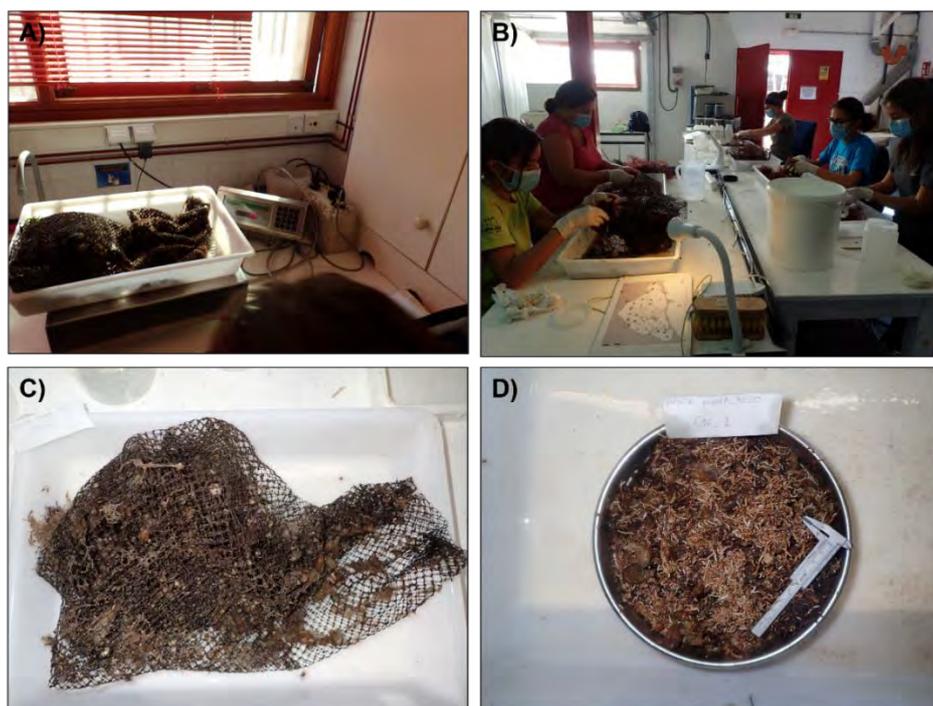


Figura 9. Procesado y triaje de los dispositivos de asentamiento larvario.

3.1.4. Proyecto piloto de resiembra y seguimiento de juveniles en el medio

A partir de las semillas recolectadas en los DAL instalados en 2020 se planteaba llevar a cabo un proyecto piloto de resiembra. Una vez los individuos hubieran alcanzado un tamaño adecuado se hubieran trasplantado en zonas con presencia de individuos vivos tales como Isla del Barón. La resiembra se hubiera llevado a cabo siguiendo la metodología utilizada por (Vázquez-Luis et al. 2016, Kersting & García-March 2017). Sin embargo, en los DAL instalados en 2020 no se encontraron semillas de *P. nobilis*. En consecuencia, como medida compensatoria a lo largo del proyecto se han llevado a cabo varias acciones, como son volver a instalar DALs en 2021 y 2022, y realizar búsquedas de reclutas *in situ*.

En cuanto a las búsquedas *in situ* de ejemplares juveniles, éstas se realizaron en el mismo momento que se han realizado los censos visuales anualmente y en las búsquedas con DPV. Respecto a la instalación de colectores en los años siguientes, a partir de los resultados obtenidos en 2020, se reajustó y optimizó la ubicación de los DALs. Así en 2021 se instalaron un total de 25 DALs siguiendo el mismo diseño que en 2020 (17 someros y 6 profundos) (Figura 10) Este año, la recuperación de los DAL se realizó en septiembre, coincidiendo con el fin de la época de reproducción y asentamiento de las larvas. La extracción, almacenaje y procesado de los DALs se realizó siguiendo la misma metodología que en 2020. Para el diseño y dispositivos instalados en 2022 ver apartado 3.1.7.

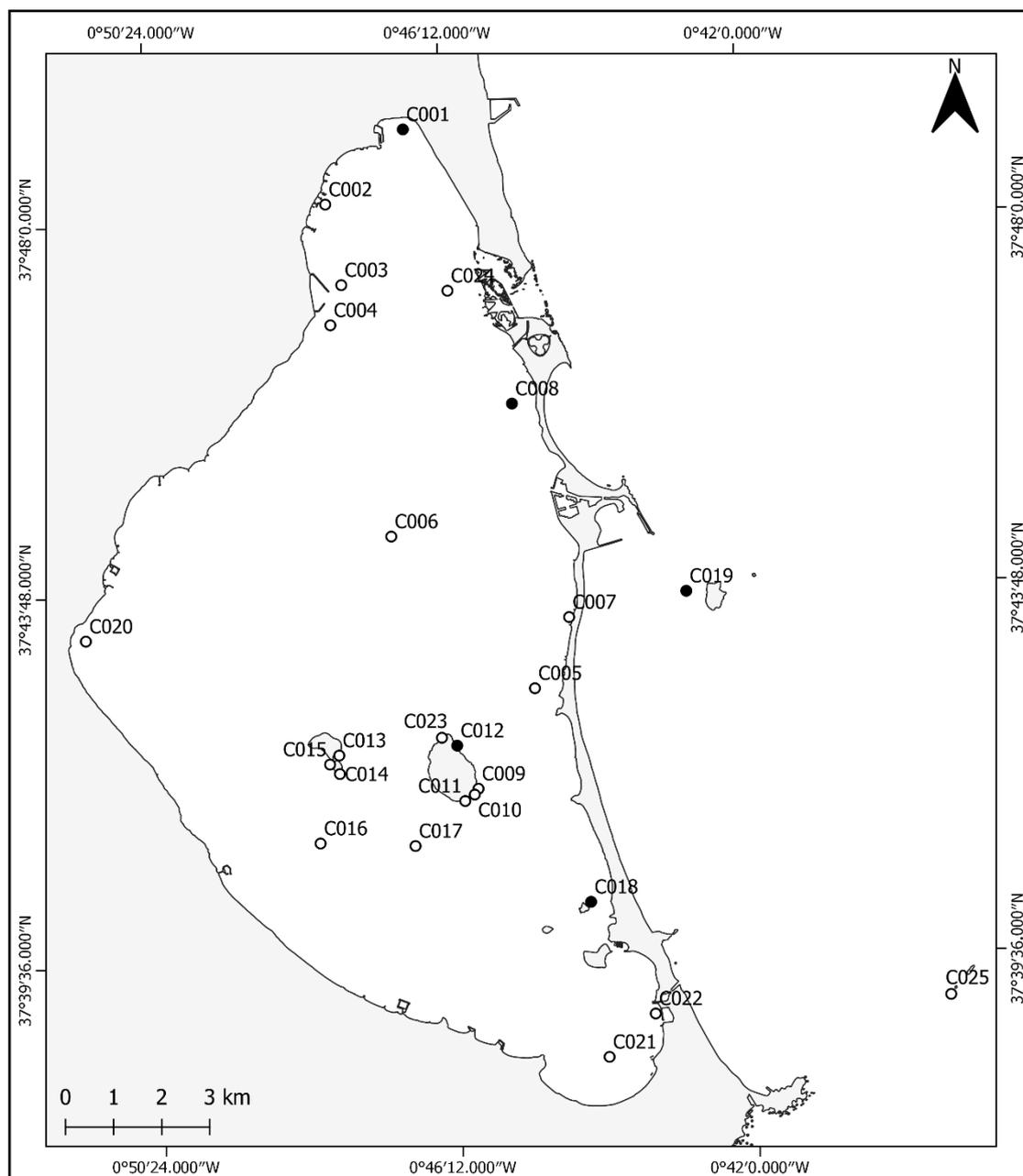


Figura 10. Dispositivos de asentamiento larvario instalados en 2021. Los puntos negros representan los dispositivos perdidos en este periodo.

3.1.5. Parcelas demográficas

Con el objetivo de llevar a cabo un seguimiento más preciso de la mortalidad, crecimiento y reclutamiento de la población de *P. nobilis* del Mar Menor se monitorizó desde abril de 2021 hasta mayo de 2022 un grupo de ejemplares presentes en las 5 zonas que albergaban mayores densidades de nacra. El monitoreo consistió en instalar trece parcelas permanentes circulares de 113 m², en cinco zonas diferentes, 4 en Isla del Barón, 2 en Pueblo Cálido, 3 en El Pedrucho, 3 en Pedruchillo-Galán y una en Isla Perdiguera (Figura 11). Dichas parcelas se instalaron en las zonas que albergaban un

mayor número de individuos dentro de la superficie de la parcela circular. Cada parcela permanente se monitorizó tres veces a lo largo de un año, en abril de 2021 (T0), septiembre de 2021 (T1) y mayo de 2022 (T2). Durante cada visita, se anotaron los datos sobre el número de individuos vivos, muertos y reclutados. También se midió la anchura máxima de cada individuo.

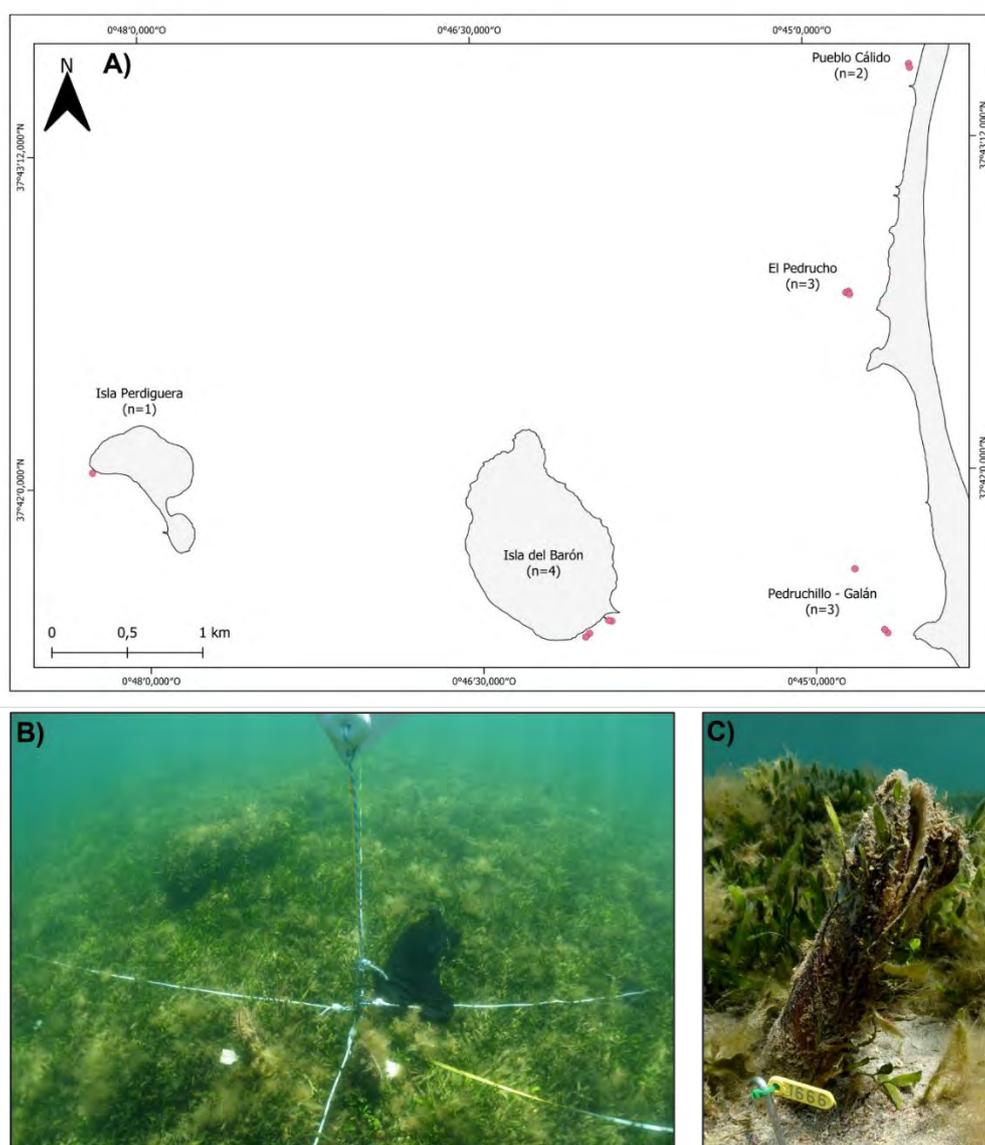


Figura 11. A) Parcelas permanentes para el seguimiento demográfico de *Pinna nobilis* instaladas en la laguna del Mar Menor. B) Ejemplo de montaje de una de las parcelas para el seguimiento demográfico de *P. nobilis*. C) Ejemplar de *P. nobilis* etiquetado.

3.1.6. Salinidad y temperatura

A lo largo de las campañas realizadas se tomaron datos de temperatura y salinidad en varios puntos de la laguna y en zonas con presencia de nacra con el objetivo de monitorizar posibles cambios en estos parámetros que permitieran la entrada de patógenos, en particular del patógeno *H. pinnae*. Los datos obtenidos se compararon con

los datos obtenidos diariamente por la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM, <https://canalmarmenor.carm.es/monitorizacion/monitorizacion-de-parametros/>). Al observar que los datos obtenidos eran semejantes a los reportados por la CARM se ha hecho uso de ambos datos durante el periodo de estudio (hasta marzo de 2023).

3.1.7. Evento de reproducción

Para evaluar la capacidad y éxito reproductivo de la especie en la laguna, en mayo de 2022 se monitorizó la actividad reproductora de varios individuos de la Isla del Barón durante cuatro días. El periodo de muestreo (17 - 31 de mayo de 2022) coincidió con la época reproductora y, en concreto, con algunos días de puesta con lo que se pudo llevar a cabo un muestreo específico durante la campaña mencionada. Durante estos días, se contabilizaron el número de individuos reproductivamente activos y se diferenció su actividad en función de su sexo (liberación de espermatozoides u ovocitos) (Figura 12B) y se determinó si su manto presentaba forma de sifón (signo de reproducción activa, Figura 12C). Cada individuo fue visitado de una a cuatro veces en días diferentes.

Por otro lado, en el momento exacto del desove, se instalaron tres colectores larvarios en la Isla del Barón, que se recuperaron 56 días después (Figura 12A). Una vez recuperado, cada colector de larvas se revisó cuidadosamente para buscar reclutas de *P. nobilis*.

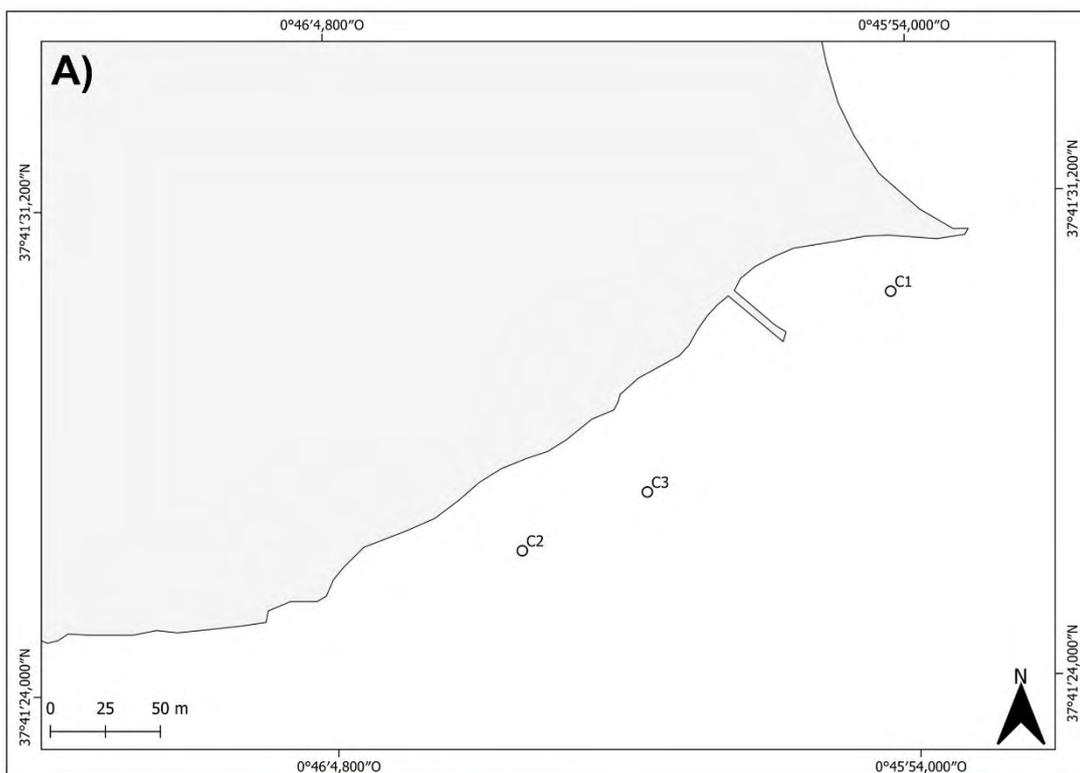


Figura 12. Evento de reproducción mayo 2022. A) instalación de colectores larvarios en Isla del Barón. B) Ejemplar de *Pinna nobilis* liberando ovocitos. C) Ejemplar de *Pinna nobilis* con el manto en forma de sifón.

3.2. Obtención de muestras de manto y análisis moleculares

3.2.1. Toma de muestras de manto

A lo largo de las campañas llevadas a cabo desde 2019 se han obtenido un total de 317 muestras de manto a individuos de *P. nobilis*. Específicamente, se obtuvieron 62 muestras en la campaña MENOR_PINNA_1119, 21 muestras en la campaña MENOR_PINNA_0620, 106 muestras en la campaña MENOR_PINNA_0921 y 128 muestras en la campaña MENOR_PINNA_0522, todas ellas muestras de manto desde 2019 hasta 2022. Para realizar la toma de muestras, previamente se prepararon unos “kits de manipulación individual”, siguiendo el protocolo establecido por la CARM (Dirección general de Medio Ambiente). Los “kits de manipulación” estaban compuestos por una bolsa transparente hermética de auto cierre que incluía una pinza metálica previamente desinfectada y esterilizada, y un tubo eppendorf estéril vacío y cerrado (previamente rotulados con código de identificación). De cada individuo mediante buceo con escafandra autónoma se tomó una biopsia de aproximadamente 1 cm³ de manto (Figura 13), seguidamente cada tejido fue introducido dentro de cada eppendorf etiquetado. Posteriormente las muestras se conservaron en etanol al 96% a temperatura ambiente hasta realizar el análisis molecular correspondiente. La toma de muestras se realizó con los permisos necesarios (Consejería de Agua, Agricultura, Ganadería, Pesca y Medio Ambiente: 2019-0676-AC3-SP-INF, 2019_0676_AC3_MEN_ATZ, 2020_0301_AC3_LIT_ATZ).



Figura 13. Metodología toma de muestras de manto de *P. nobilis*

Además, dada a vulnerabilidad de estos ejemplares y con objeto de determinar el impacto del procedimiento de la toma de biopsias en la supervivencia de los ejemplares, se ha realizado un seguimiento de algunos de los ejemplares biopsiados, así como no biopsiados (grupo control).

3.2.2. Detección de la presencia de patógenos mediante análisis moleculares

Para determinar la presencia de los patógenos *H. pinnae* y *Mycobacterium* sp., parte de las muestras de manto obtenidas cada año fueron específicamente analizadas para detección de estos dos patógenos. En 2019, un total de 58 individuos fueron analizados: 26 de Isla del Barón, 11 de Isla Perdiguera y 21 de Pueblo Cálido. En junio de 2020 se analizaron 20 individuos: 10 de Isla del Barón, 3 de Isla Perdiguera y 7 de Pueblo Cálido. De las dos campañas de 2021 se analizaron un total de 40 muestras: 17 de El Pedrucho, 10 de Isla del Barón, 10 de Pedruchillo-Galán y 3 de Pueblo Cálido. En 2022 se analizaron 20 muestras: 4 de El Pedrucho, 6 de Isla del Barón, 5 de Pedruchillo-Galán y 5 de Isla Perdiguera.

Los análisis moleculares para la detección de los patógenos fueron realizados por el Laboratorio de Investigaciones Marinas y Acuicultura (LIMIA) del Gobierno Balear. Para cada muestra, se extrajo su ADN utilizando el kit de aislamiento de ADN NucleoSpin® DNA Isolation Kit (Macherey-Nagel) (Vautier et al. 2020). Este protocolo utiliza una solución de proteinasa K para realizar la lisis del tejido muestreado. Para evitar la contaminación del ADN durante su extracción, cada procedimiento para extraer el ADN se realizó en tubos y columnas de centrifugación individuales estériles. Una vez extraído el ADN, éste se amplificó con una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando los "primers" HPNF3/HPNR3 específicos de *H. pinnae* correspondientes a un fragmento del rRNA 18S (Catanese et al. 2018), y los "primers" mycgen-f/mycgen-r específicos de fragmentos del gen rRNA 16S de *Mycobacterium* sp. (Boddinghaus et al. 1990). Las PCRs se llevaron a cabo utilizando los ciclos térmicos descritos por López-Sanmartín et al. (2019). Para detectar la posible contaminación por ADN, en cada PCR realizada se utilizaron dos reacciones control en tubos separados: (i) un "control negativo", que contenía todos los reactivos de las reacciones PCR pero ninguna muestra (para detectar cualquier contaminación por ADN en los instrumentos de laboratorio, reactivos analíticos y puntas de pipeta); y (ii) un "control positivo" que contenía una muestra positiva por patógenos (para controlar la funcionalidad de los reactivos PCR y la correcta amplificación). El resultado de la PCR fue visualizado mediante una electroforesis en un gel de agarosa teñido con GelRed (1.5% agarosa). Los resultados del gel fueron posteriormente visualizados por transiluminación ultravioleta antes de la secuenciación. Los productos de la PCR se purificaron con un kit de extracción mi-Gel (Metabion) y fueron secuenciados bidireccionalmente con un analizador genético ABI 3130 (Applied Biosystems).

3.2.3. Evaluación conectividad y diversidad genética de la población

Para determinar la diversidad y conectividad genética de la población de nacra de la laguna del Mar Menor todas las muestras obtenidas (n=317) fueron analizadas molecularmente. Dichos análisis se llevaron a cabo en el “Centre de Recherches Insulaires et Observatoire de l’Environnement (CRIOBE)” situado en la Universidad de Perpignan (Francia). Para realizar la extracción de ADN de cada tejido obtenido se cortó una pequeña parte (2 mm) que fue introducida dentro de una placa de extracción de ADN compuesta por 96 pocillos/muestras. Para realizar la digestión del tejido cada muestra fue incubada a 55°C durante 1-3 h en 200 µl de una solución de tampón VXL y 1% de proteinasa K (QIAGEN). Tras la digestión, el ADN se extrajo haciendo uso de un instrumento automatizado de extracción de ADN (QIAcube HT, QIAGEN) (Figura 14). Para comprobar si el ADN se había extraído correctamente, se visualizó el resultado con una electroforesis.

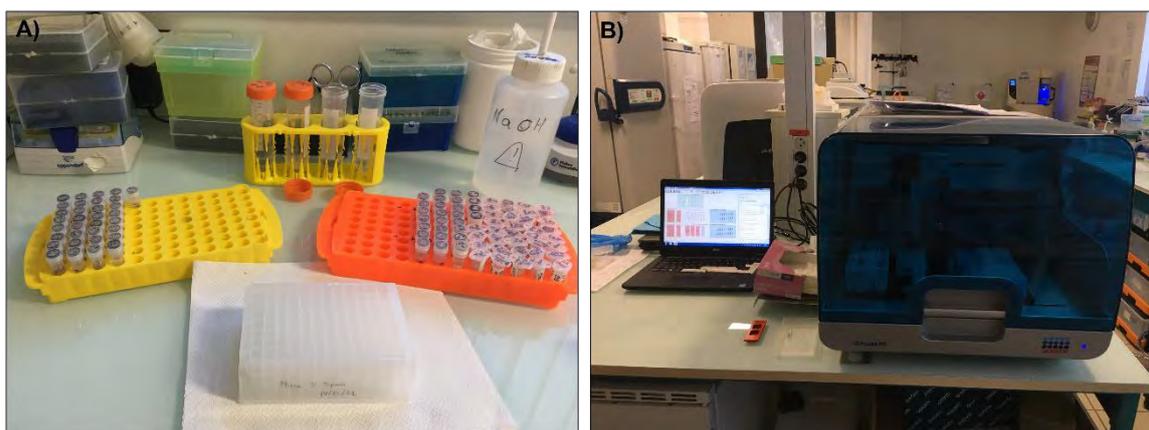


Figura 14. A) Preparación muestras para extracción de ADN. B) Robot extracción ADN

La amplificación de fragmentos específicos del ADN de *P. nobilis* se realizó mediante PCR, utilizando el kit de PCR Multiplex de QIAGEN (Figura 15). En total se utilizaron 26 microsatélites altamente polimórficos específicos de la especie, previamente desarrollados por Gonzalez-Wanguemert et al. (2015) y Peyran et al. (2020). El resultado de la PCR fue visualizado mediante una electroforesis en un gel de agarosa teñido con GelRed (1.5% agarosa). Posteriormente, los productos de la PCR fueron enviados a GenoScreen (Lille, Francia) para su procesado. El genotipado se llevó a cabo en sus instalaciones con un secuenciador ABI3c 730XL (Applied Biosystems) y todos los alelos fueron valorados manualmente con GENEMAPPER v.6.0 (Applied Biosystems).

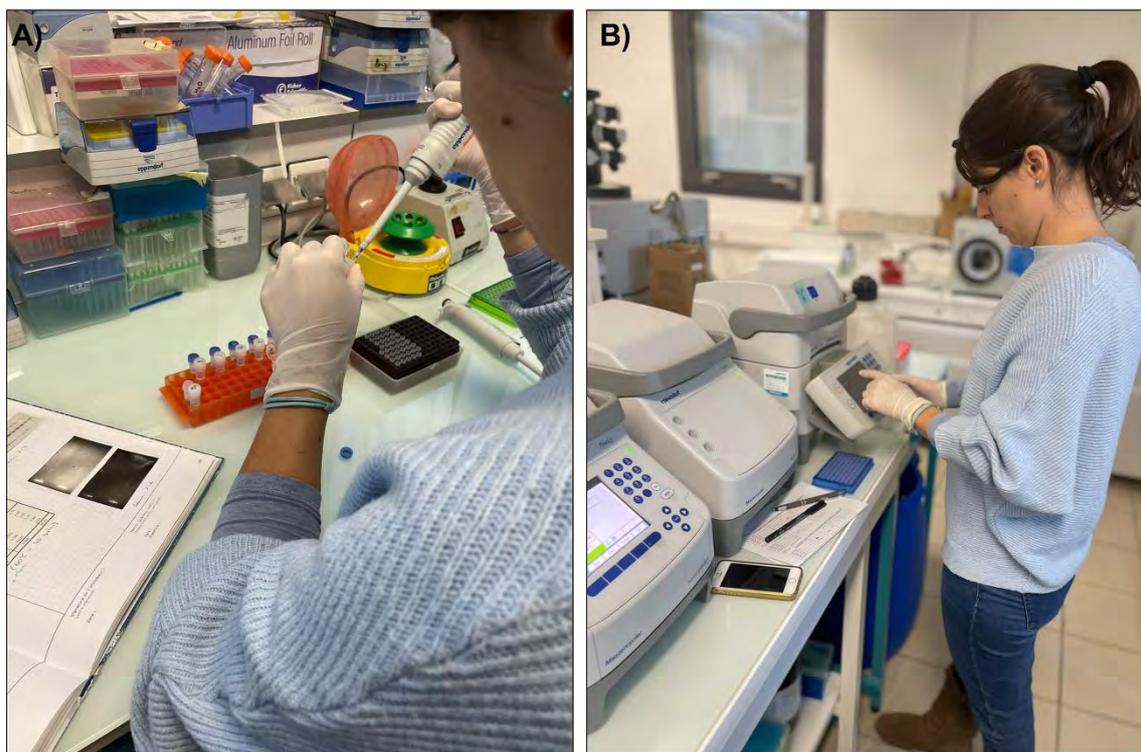


Figura 15. Preparación mezclas de microsatélites y puesta en marcha PCR.

Para determinar la diversidad y conectividad genética de la población de *P. nobilis* en la laguna del Mar Menor, primero de todo se comprobó la calidad de los microsatélites utilizados. Para seleccionar el locus más informativo y apropiado para cada población, se calcularon las frecuencias alélicas nulas y los errores potenciales de puntuación para cada locus utilizando el software MICRO-CHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). Además, también se estimaron las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg a partir del coeficiente de endogamia F_{IS} (Weir & Clark 1984) para cada locus y cada sitio utilizando el software GENETIX v.4.05 (Belkhir et al. 2004). Dichas desviaciones se comprobaron mediante una prueba exacta en GENEPOP v.4.5.1 (Rousset 2008) utilizando los parámetros predeterminados por defecto.

3.2.4. Esfuerzo muestral del proyecto

En total a lo largo del proyecto se han realizado 312 transectos lineales y junto con las búsquedas de individuos con DPV se han barrido un total de 281,173.35 m². Además, entre 2020 y 2022 se han instalado un total de 75 DALs, 13 parcelas demográficas y por último se han realizado un total de 317 toma de biopsias a individuos de *P. nobilis*. El esfuerzo realizado se puede observar en la Tabla 1 y la Figura 16.

Tabla 1. Esfuerzo muestral llevado a cabo durante las campañas específicas de muestreo en la laguna del Mar Menor entre 2019-2022. En Tareas: B: búsqueda de ejemplares supervivientes de *P. nobilis*; S: Seguimiento de ejemplares mediante censos visuales; C: instalación de colectores larvarios; *C: recogida de colectores larvarios; D: Seguimiento de ejemplares mediante parcelas de demografía.

Año	Campaña	nº días de mar	Transectos	DALs instalados / *procesados	Parcelas demografía	Superficie muestreada (m ²)	Tareas realizadas
2019	MENOR_PINNA_1119	13	165			30,398.00	B / S
2020	MENORPINNA_0620	11	24	47		2,972.50	B / C
	MENORPINNA_1020	14	32	*42		22,576.19	B / *C / S
2021	MENORPINNA_0421	13	46	25	13	182,942.13	B / C / D / S
	MENORPINNA_0921	16	25	*20	13	1,708.25	B / *C / D / S
2022	MENORPINNA_0522	15	20	3	13	40,576.28	B / C / D / S
TOTAL		82	312	75	13	281,173.35	

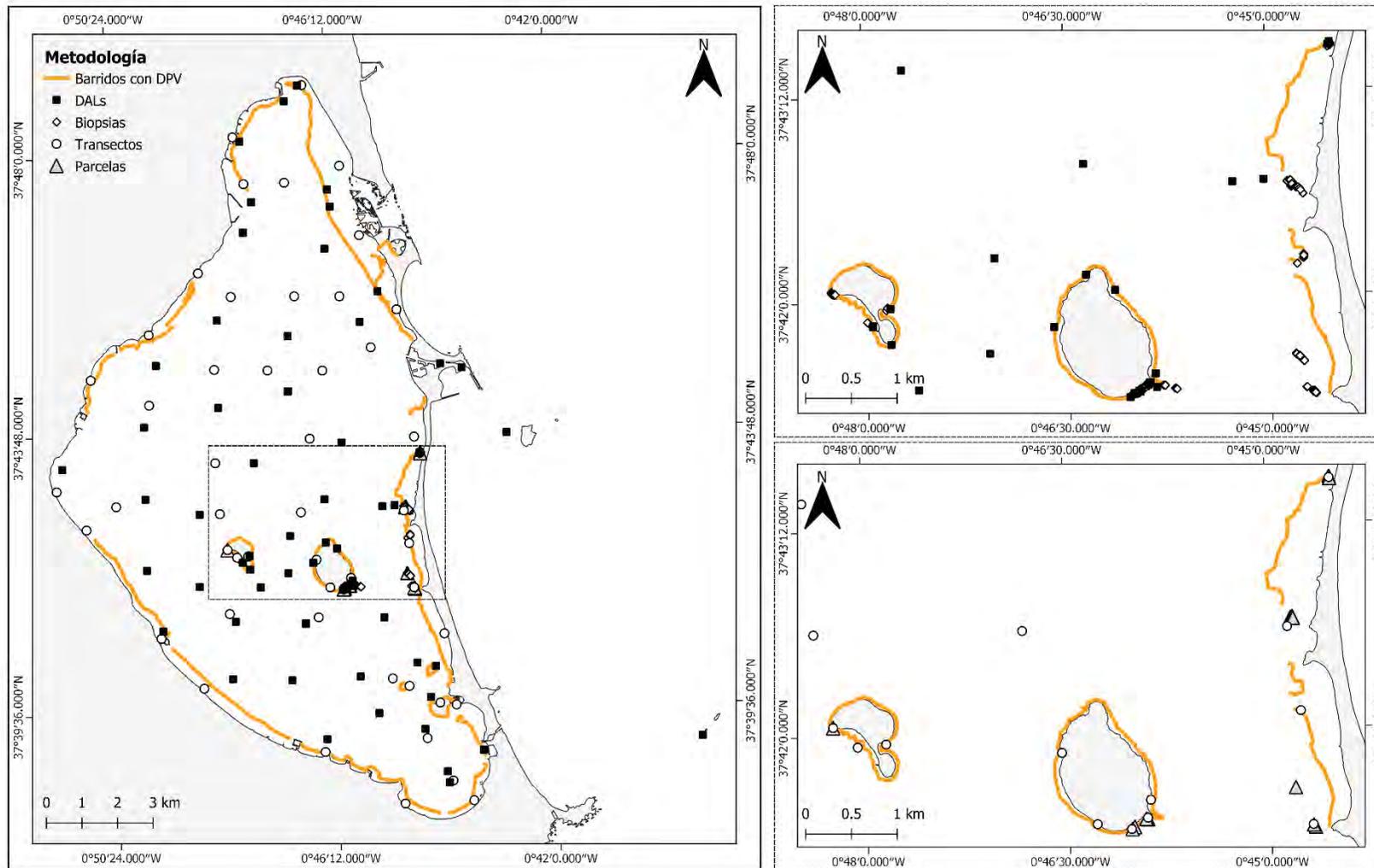


Figura 16. Esfuerzo muestral realizado en el marco del proyecto INTEMARES C1.1. Los cuadrados negros representan los DAL (75). Los barridos con DPV se representan con la línea naranja, los triángulos representan las parcelas de demografía (13), los círculos blancos las localidades donde se han realizado transectos lineales y los rombos las localidades donde se han efectuado biopsias.

3.3. Análisis de los datos

3.3.1. Densidades y estructura de tallas 2014-2022

Con el objetivo de determinar el estado de conservación de la población en términos ecológicos se quiso comparar los datos de densidad, distribución espacial y batimétrica, y estructura de tallas obtenidos en 2014 y 2017 con los obtenidos en este proyecto para toda la laguna. Por lo tanto, haciendo uso de datos previos obtenidos por (Belandro et al. 2014, 2018) se llevaron a cabo comparativas entre años. Específicamente, se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) para comprobar si existían diferencias significativas en el tamaño medio de las conchas (anchura máxima) entre 2014 y 2019, siendo "año" un factor fijo. Antes del análisis, se comprobaron los requisitos previos, se hizo la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar si los datos seguían una distribución normal, y la prueba de Barlett para la homogeneidad de la varianza. El análisis se llevó a cabo en R v.3.6.1 (R Core Team 2019), el nivel de significación se fijó en $P < 0.05$, y los resultados se expresaron como media \pm error estándar (media \pm SE).

Por otro lado, para monitorizar cambios en el porcentaje, la densidad media y en la anchura máxima media de los individuos vivos y muertos entre 2019 y 2022 se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA). Se aplicó un ANOVA factorial unidireccional con "año" como factor fijo de 4 niveles (2019, 2020, 2021 y 2022). Antes de cada análisis, se comprobaron los requisitos de normalidad y homogeneidad de los datos. Los análisis se realizaron en R v.4.1.2 (RStudio Team 2022), el nivel de significación se fijó en $P < 0.05$, y los resultados se expresaron como media \pm error estándar (media \pm SE).

3.3.2. Dispositivos de asentamiento larvario (DAL)

Por otro lado, con el objetivo de comparar la comunidad faunística asociada a los colectores larvarios de 2020 y 2021, se realizó un análisis de componentes principales (PCoA) comparando la cobertura neta de varias especies presente solo en los colectores larvarios comunes que se instalaron en el mismo sitio en 2020 y 2021. Para cada DAL, las variables cuantitativas corresponden a las diferentes especies encontradas expresadas como abundancia y porcentaje de cobertura; y para ilustrar mejor los resultados y ver una posible correlación con determinados factores, se incluyeron en el análisis 2 variables cualitativas como variables adicionales: año (2020, 2021), y profundidad del sitio (S superficial, P profunda).

3.3.3. Cálculo tasas demográficas

Los datos de mortalidad y reclutamiento obtenidos en las trece parcelas de seguimiento fueron utilizados para obtener tasas demográficas de la población. En concreto, se han

calculado tasas de mortalidad, reclutamiento y crecimiento de cada parcela en cada periodo (de T0 a T1 y de T1 a T2), tal y como se indica a continuación:

Tasa de mortalidad, M (año-1):

$$M = \frac{\ln\left(\frac{N1}{N2}\right)}{t}$$

Tasa de reclutamiento, R (año-1):

$$R = \frac{\ln\left(\frac{N2}{N1}\right)}{t}$$

Tasa de crecimiento, μ (año-1):

$$\mu = M - R$$

donde “N1” es el número de individuos supervivientes a tiempo 1; “N2” es el número de individuos supervivientes a tiempo 2 y “t” es el tiempo en años entre los dos periodos (García-March et al. 2007a). Posteriormente, se calculó la media de cada tasa demográfica para cada lugar.

3.3.4. Análisis de viabilidad poblacional

El análisis de viabilidad de la población se realizó con el programa informático Vortex v10.5.6 (Lacy 1993, Lacy & Pollak 2022). Todas las simulaciones se realizaron con 100 iteraciones, y se consideró que la población se extinguía cuando no quedaban individuos al cabo de 100 años. Los parámetros demográficos de la población se estimaron utilizando los datos recogidos en las parcelas demográficas permanentes, mientras que las características de los rasgos vitales de las especies se recopilaron tras una revisión de la bibliografía existente, y la frecuencia de catástrofes y su impacto en la reproducción y la supervivencia se obtuvo de la bibliografía de estudios relacionados o del juicio de expertos.

Resumen de los parámetros biológicos de las simulaciones:

- Número de individuos total y por sitio (N): de acuerdo con trabajos publicados anteriormente se consideraron cinco poblaciones con censo poblacional real, Isla Perdiguera, Isla del Barón, El Pedrucho, Pueblo Cálido y Pedruchillo-Galán (Cortés-Melendreras et al. 2022, Nebot-Colomer et al. 2022, BOE-4-2023-344).

- Madurez sexual y tasa de dispersión: La madurez sexual se fijó en 2 años de acuerdo con (Deudero et al. 2017). Las tasas de dispersión se distribuyeron por igual entre las cinco poblaciones (20% entre cada par de poblaciones). Se consideraron como dispersores a los individuos inmaduros (edad < 2 años), ya que la dispersión en bivalvos se realiza mediante larvas pelágicas (De Gaulejac & Vicente 1990, Butler et al. 1993). Se consideró que la supervivencia de los dispersores era del 100%, ya que las tasas de mortalidad de los individuos inmaduros (edad 0-2) ya contemplan la mortalidad de las larvas.
- Tasa de mortalidad de juveniles: La tasa de mortalidad de juveniles (edad <2) se fijó en el 99% dado que no se detectó reclutamiento en este estudio a lo largo de los 4 años de muestreo. No obstante, cabe mencionar que en 2017 se encontró un recluta de *P. nobilis* en la laguna (Kersting et al. 2020), y otros 3 reclutas fueron observados en abril de 2021 (<https://www.laverdad.es/lospiesenlatierra/noticias/nace-nacra-20210409181525-nt.html>).
- Esperanza de vida y edad máxima: La esperanza de vida y la edad máxima para la reproducción se fijó en 9 años de acuerdo con los datos obtenidos en (García-March et al. 2019). Se consideró un único evento de reproducción, produciendo 1 millón de larvas por hembra, con un porcentaje de hembras reproductoras del 77.5%. Este porcentaje se ha estimado a partir de datos de cautividad de Trigos et al. (2018) del cual se utilizó el tamaño y ratio de sexo, y en base a la estructura de tallas se estimó el porcentaje de machos y hembras.
- Capacidad de carga de la población: La capacidad de carga de las poblaciones se estimó como $N^* 100$; ya que el censo poblacional previo a la mortalidad masiva y a los eventos catastróficos ocurridos en la laguna del Mar Menor, se estimó que el tamaño real era 100 veces superior (Belando et al. 2014, Giménez-Casalduero et al. 2020).

Por otro lado, se ha considerado que la población experimenta periódicamente tres catástrofes:

1) Fuertes tormentas: de acuerdo con la frecuencia de fuertes lluvias e inundaciones observadas en la región de Murcia (Espín Sánchez et al. 2017), la frecuencia de fuertes tormentas establecida para el análisis fue de 1 cada 4 años. El impacto de estas tormentas sobre la reproducción se estimó en un 10%, mientras que su impacto sobre la supervivencia se dedujo de las tasas de mortalidad observadas en otras poblaciones afectadas por tormentas similares. Por ejemplo, García-March et al. (2007b) informaron de aproximadamente un 13,6% de mortalidad en el área de estudio debido a las tormentas. Por otro lado, Prado et al. (2021) documentaron una tasa de mortalidad aún

mayor, de alrededor del 60%, en el Delta del Ebro tras una tormenta severa. Como medida de precaución aplicamos una disminución de la supervivencia del 20% (Figura 17).

2) Impacto por fondeo de embarcaciones: se ha encontrado que el impacto por fondeo en temporada turística produce mortalidad de adultos en una tasa que es proporcional a la densidad de población y a la ocupación de las embarcaciones (Álvarez et al. 2024; BOE-4-2023-344, *observ. pers.*). Para cada sitio se consideró que la frecuencia de fondeo es: 100% en Isla Perdiguera, El Pedrucho y Pedruchillo- Galán; 50% en Isla del Barón y 0% en el área protegida de Pueblo Cálido. Aunque el fondeo de embarcaciones no parece afectar a la reproducción, reduce significativamente las tasas de supervivencia. Diversos estudios han demostrado que las densidades de población de *P. nobilis* en praderas marinas afectadas por el fondeo son menos de la mitad de las de las praderas no afectadas, con una reducción de la densidad de hasta el 78,48% (Hendriks et al. 2013a). Además, Vázquez-Luis et al. (2015b) descubrieron que el 62% de las unidades mímicas en las zonas de fondeo habían sufrido algún tipo de impacto, en comparación con el 34% en las zonas sin fondeo. Como medida de precaución, en este estudio aplicamos una disminución anual del 0,5% en la supervivencia (Figura 17).

3) Eventos eutróficos/anóxicos: los eventos de eutrofización son frecuentes en la laguna del Mar Menor (Pérez-Ruzafa et al. 2019, Ruíz et al. 2020). Basándonos en la opinión de expertos y en los análisis de los datos de campo, se ha estimado una reducción del 50% en la reproducción durante estos eventos. Para el análisis se consideró un evento eutrófico cada 2 años con una disminución de la reproducción del 50% y entre un 10-30% de disminución de la supervivencia dependiendo del sitio: Isla Perdiguera e Isla del Barón: 10%; Pueblo Cálido y El Pedrucho: 20%; Pedruchillo-Galán: 30% (Figura 17).



Figura 17. A) Fuertes tormentas (DANA 2019), B) Impacto por fondeo de embarcaciones (zona de la manga 2021), y C) Ejemplar de *P. nobilis* moribundo por un evento de anoxia (zona de el Pedrucho en septiembre de 2021).

Simulaciones llevadas a cabo:

Escenario 1: La primera simulación estima la probabilidad de supervivencia de cada población (Isla Perdiguera, Isla del Barón, El Pedrucho, Pueblo Cálido y Pedruchillo-Galán) y metapoblación considerando las condiciones biológicas y ambientales actuales: con una esperanza de vida máxima de 9 años, 99% de mortalidad de juveniles, y donde se producen eventos de eutrofización, eventos de tormentas fuertes (DANA) y hay impacto por fondeo de embarcaciones.

Escenario 2: La siguiente simulación estima la probabilidad de supervivencia de la metapoblación bajo las condiciones actuales en el caso de que, durante 1, 5 y 10 años se añadan 100 individuos a la metapoblación.

Posteriormente, para determinar qué factores afectan a la probabilidad de supervivencia, año de extinción y censo total poblacional, se simularon 30 simulaciones diferentes, para cada escenario, variando tanto los parámetros biológicos como las catástrofes (Tabla 2).

Tabla 2. Simulaciones del análisis de viabilidad poblacional llevados a cabo variando los parámetros biológicos y ambientales. Catastrophes: catástrofes, BA: boat anchoring (fondeo embarcaciones) y EE: eutrophic events (eventos eutróficos).

Escenario	Catástrofes			Parámetros biológicos	
	Tormentas	Impacto por fondeo	Eventos de eutrofización	Esperanza de vida	Mortalidad juvenil
All catastrophes	Si	Si	Si	9	99%
	Si	Si	Si	9	90%
	Si	Si	Si	15	99%
	Si	Si	Si	15	90%
	Si	Si	Si	30	99%

	Si	Si	Si	30	90%
No BA	Si	No	Si	9	99%
	Si	No	Si	9	90%
	Si	No	Si	15	99%
	Si	No	Si	15	90%
	Si	No	Si	30	99%
	Si	No	Si	30	90%
No EE	Si	Si	No	9	99%
	Si	Si	No	9	90%
	Si	Si	No	15	99%
	Si	Si	No	15	90%
	Si	Si	No	30	99%
	Si	Si	No	30	90%
No BA-EE	Si	No	No	9	99%
	Si	No	No	9	90%
	Si	No	No	15	99%
	Si	No	No	15	90%
	Si	No	No	30	99%
	Si	No	No	30	90%
No catastrophes	No	No	No	9	99%
	No	No	No	9	90%
	No	No	No	15	99%
	No	No	No	15	90%
	No	No	No	30	99%
	No	No	No	30	90%

Por último, se estimó el tiempo de recuperación de la población considerando que la población experimenta una mortalidad larvaria normal (90%) y una esperanza de vida de 30 años, como la observada para la especie en diversas Áreas Marinas Protegidas del Mediterráneo Español (García-March et al. 2019). Utilizando estos parámetros biológicos se estimó el tiempo de recuperación si la población solo experimenta tormentas y si no sufre catástrofes (eventos eutróficos/anóxicos).

3.3.5. Análisis datos moleculares

En cuanto a los análisis de datos moleculares para la detección de patógenos, las secuencias de nucleótidos obtenidos se alinearon y analizaron mediante el programa informático BioEdit 7.1.3.0 (Hall 1999) y se compararon con las secuencias publicadas mediante la herramienta de búsqueda de BLAST.

Además, para determinar la diversidad genética dentro de la población de *P. nobilis* del Mar Menor, por sitio de muestreo, se utilizó el software GenAIEx v.6.5 (Peakall & Smouse 2006). Se calcularon parámetros tales como el número total de alelos (A), número medio

(N_a), número de alelos privados (A_p), la heterocigosidad observada (H_o) y la heterocigosidad esperada (diversidad génica, H_e) por sitio muestreado. Como el número de individuos muestreados variaba entre localidades de 16 a 47, la riqueza alélica estandarizada (A_r) y la riqueza alélica privada estandarizada (A_{pr}) se estimaron utilizando un método de rarefacción con un número mínimo de genes igual a 54 en HP-RARE (Kalinowski 2005).

Además, se exploró la estructura poblacional de *P. nobilis* dentro de la laguna costera del Mar Menor realizando Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con GENALEX v.6.5 (Peakall & Smouse 2006).

Para evaluar la diferenciación genética entre cada par de lugares muestreados dentro del Mar Menor se calcularon los índices F_{ST} (Weir & Clark 1984). Las estimaciones F_{ST} entre sitios y su nivel de significación se calcularon mediante una prueba G exacta en GENEPOP, utilizando 10.000 números de desmemorización, 100 lotes y 5000 iteraciones por lote. Para evitar errores de tipo I, para todos los pares de comparaciones entre sitios se aplicó en el software R la corrección para pruebas múltiples de FDR (Benjamini & Hochberg 1995).

4. Resultados

4.1. Evaluación del estado de conservación de la población

4.1.1. Distribución, abundancia y estructura de tallas de *P. nobilis* en la laguna 2014-2019

La distribución espacial de la especie en la laguna ha variado en estos años, se observó una disminución en el área de ocupación de *P. nobilis* en la laguna entre 2014 y 2019 (Figura 18). En 2014, la población viva de *P. nobilis* estaba ampliamente distribuida a lo largo de la laguna costera con presencia de individuos en el 36.84% de los sitios muestreados. Sin embargo, en 2017 y 2019 se detectó una disminución en la ocurrencia (8.77% y 8.51%, respectivamente). En estos dos años, los individuos de *P. nobilis* se encontraron principalmente cerca de Isla del Barón, Isla del Ciervo, Isla Perdiguera y en la zona de La Manga, en Pueblo Cálido (Figura 18).

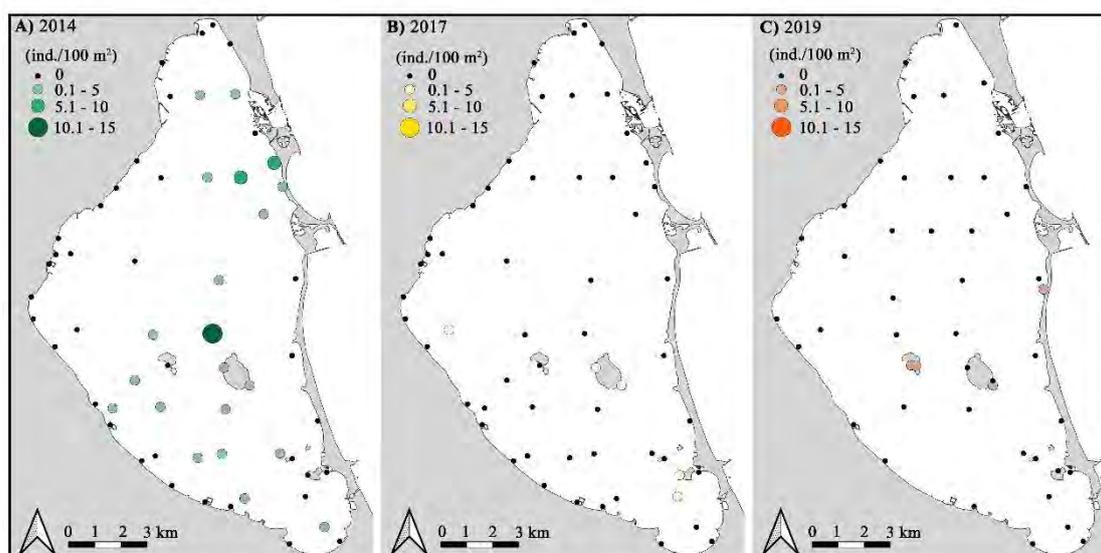


Figura 18. Densidad y distribución espacial de *P. nobilis* en 2014, 2017 y 2019. El tamaño de los círculos muestra los valores de densidad media por sitio de muestreo (individuos por 100 m²)

En cuanto a la distribución batimétrica, en 2014, el 98.34% de los individuos vivos se encontraron en un rango de profundidad de 3 a 7 m. Sin embargo, en 2017 y 2019, el 83.33% y el 100% de los individuos vivos se encontraron por encima de los 3 m de profundidad, respectivamente (Figura 19).

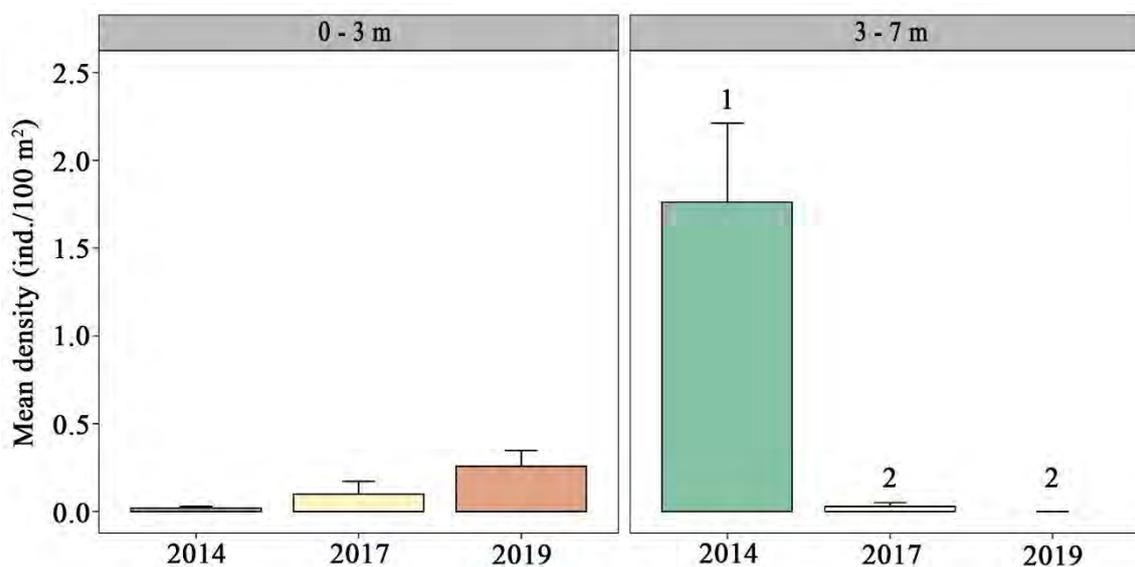


Figura 19. Valores medios de densidad y error estándar de *P. nobilis* por año y profundidad en 2014, 2017 y 2019.

Respecto la abundancia y densidades de *P. nobilis* por año, en **2014**, se contabilizaron un total de 241 individuos vivos a lo largo de 33,600 m², lo que representa una densidad media global de 0.71 ± 0.19 individuos por 100 m² (Tabla 3). Específicamente, se observaron mayores densidades medias en profundidades comprendidas entre 3 y 7 m (1.76 ± 0.45 individuos por 100 m²) que en profundidades comprendidas entre 0 y 3 m

(0.02 ± 0.01 individuos por 100 m^2 , Tabla 3, Figura 19). Las mayores densidades de individuos vivos se observaron en la zona noreste de la laguna en Las Encañizadas y El Estacio (Figura 18). Las densidades medias máximas se registraron principalmente en los sitios de muestreo más profundos; P13 (14.5 ± 5.29 individuos por 100 m^2), P30 (7.5 individuos por 100 m^2), P2 (4.33 ± 1.01 individuos por 100 m^2), y P10 (2.67 ± 1.01 individuos por 100 m^2 , Tabla 3).

Tres años más tarde, en **2017**, se detectó una disminución drástica en el número de individuos vivos; en 2017 solo se contabilizaron 12 individuos en los $33,600 \text{ m}^2$ muestreados, lo que representa una densidad media global de 0.07 ± 0.04 individuos por 100 m^2 (Tabla 3). La mayor disminución de densidad se observó entre los 3 y 7 m de profundidad; en estas profundidades, la densidad media fue de 0.03 ± 0.02 individuos por 100 m^2 (Figura 19), mientras que en los sitios más someros se detectó una densidad ligeramente superior (0.1 ± 0.07 individuos por 100 m^2 , Figura 19). La densidad media máxima se registró en la zona somera de Isla del Barón (2.33 ± 2.33 individuos por 100 m^2 , Tabla 3).

En el primer muestreo del proyecto llevado a cabo en noviembre de **2019**, se contabilizaron 94 ejemplares vivos de *P. nobilis* a lo largo de $30,398 \text{ m}^2$, lo que representa una densidad media global de 0.16 ± 0.07 individuos por 100 m^2 (Tabla 3). Respecto las densidades por rango de profundidad, la densidad de *P. nobilis* a la cota batimétrica de 0-3 m fue de 0.22 ± 0.09 individuos por 100 m^2 y cero en profundidades entre 3 y 7 m de profundidad (Figura 19). La densidad media máxima se registró en la zona somera de Isla del Barón (2.21 ± 1.11 individuos por 100 m^2) y en Pueblo Cálido (4.95 ± 1.01 individuos por 100 m^2 , Tabla 3).

Respecto la estructura de tallas de la población de *P. nobilis* de la laguna del Mar Menor entre 2014 y 2019, los resultados mostraron una distribución normal de la anchura máxima de la valva en 2014 y 2019 (Figura 20, $P > 0.05$). La anchura máxima de la valva osciló entre 10 y 22 cm. Sin embargo, se detectó una disminución significativa de casi 3 cm en el tamaño medio de la anchura máxima de la valva de la población entre 2014 ($16.43 \pm 0.13 \text{ cm}$) y 2019 ($13.72 \pm 0.18 \text{ cm}$, $F_{1,32} = 134.8$; $P < 0.01$). Específicamente, en 2014, el 75% de los individuos medían entre 15 y 20 cm de ancho, mientras que en 2019 el 76% de los individuos medían entre 10 y 15 cm de ancho.

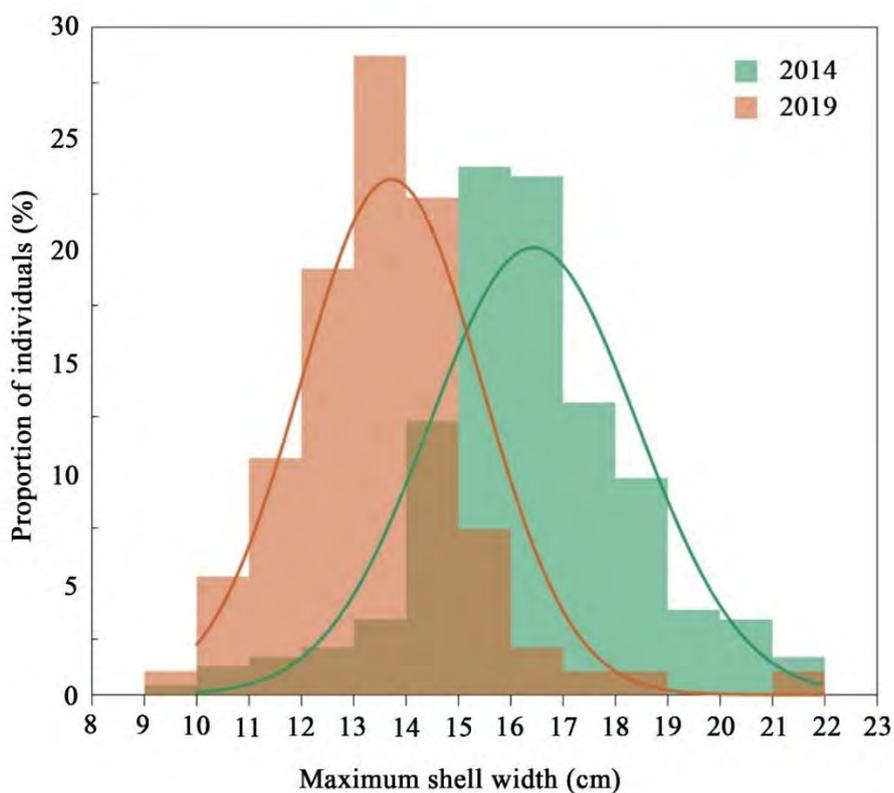


Figura 20. Distribución de la estructura de tallas de individuos vivos de *P. nobilis* en 2014 en verde ($n = 236$) y 2019 en naranja ($n = 94$). El color marrón representa el solapamiento de ambos años. La talla se refiere a la anchura máxima de la concha (cm).

Respecto los individuos hallados muertos en 2019, en total se observaron 88 ejemplares a lo largo de 30,398 m², lo que representa una densidad media global de 0.81 ± 0.28 individuos muertos por 100 m² (Tabla 3). De los 47 sitios muestreados, el 42.55% presentaban individuos muertos, y en el 57.45% de los sitios no se observaron individuos muertos (Figura 21). El sitio con mayor densidad de individuos muertos fue el P25 con 7.50 ± 7.50 individuos por 100 m² y el P26 con 5.33 ± 5.33 individuos por 100 m² (Tabla 3).

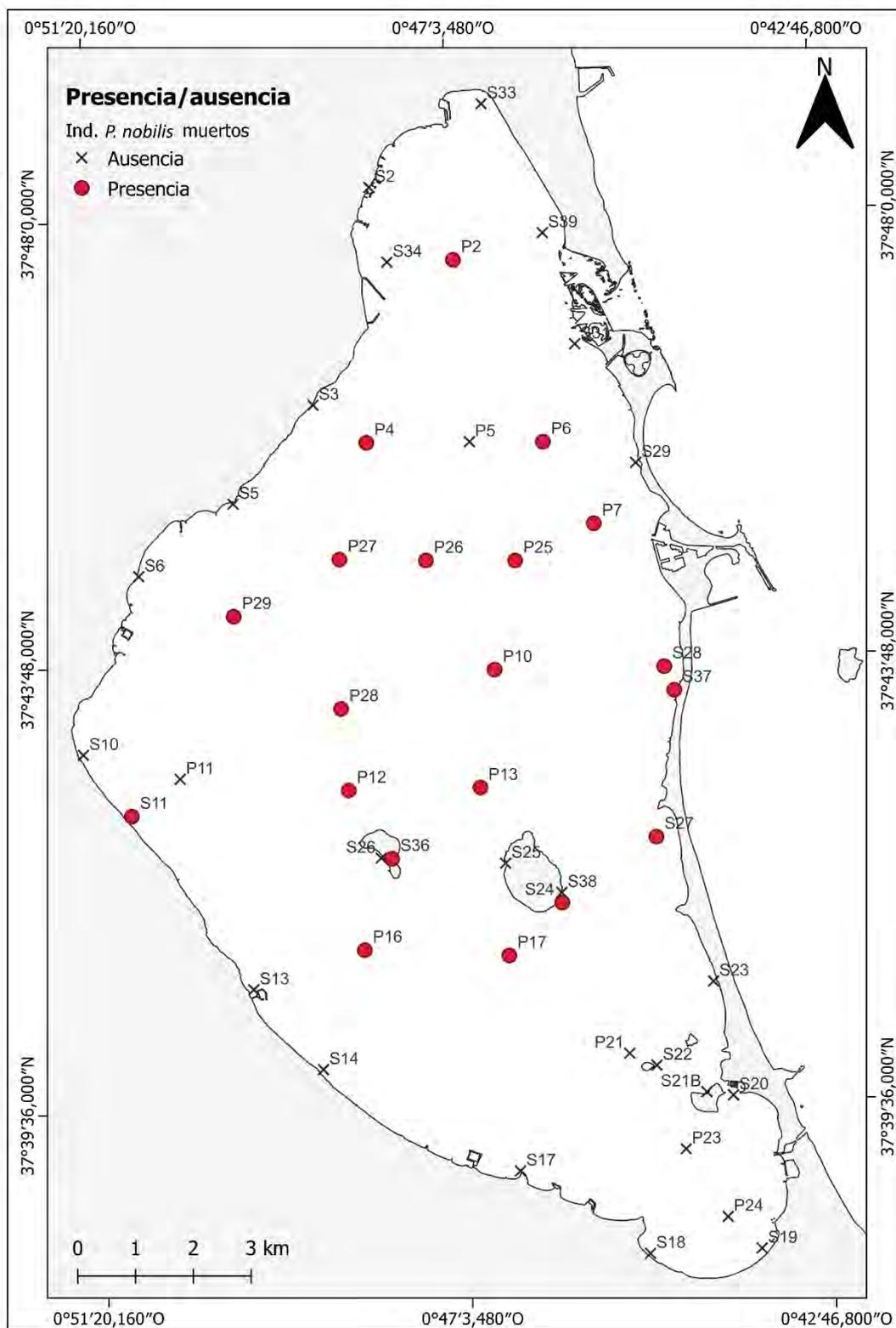


Figura 21. Localidades observadas con presencia de ejemplares de *P. nobilis* muertos en 2019.

Tabla 3. Sitios de muestreo, densidad media de *Pinna nobilis* (individuos por 100 m² ± error estándar), y superficie muestreada en 2014, 2017 y 2019. Trans.: número de transectos lineales, -: no se han obtenido datos; *: se observan 10 individuos muertos, pero no se puede estimar la densidad porque no hay dato de superficie observada.

Sitio	2014			2017			2019					
	Trans.	Densidad media (ind./100 m ²)	Area (m ²)	Trans.	Densidad media (ind./100 m ²)	Area (m ²)	Trans.	Area (m ²)	Nº vivos	Densidad media (ind./100 m ²)	Nº muertos	Densidad media muertos (ind./100 m ²)
S1	3	0	600	3	0	600	-	-	-	-	-	-
S2	3	0	600	3	0	600	4	361.69	0	0	0	0
S3	3	0	600	3	0	600	6	797.37	0	0	0	0
S4	3	0	600	3	0	600	-	-	-	-	-	-
S5	3	0	600	3	0	600	6	666.8	0	0	0	0
S6	3	0	600	3	0	600	6	244.85	0	0	0	0
S7	3	0	600	3	0	600	-	-	-	-	-	-
S8	3	0	600	3	0	600	-	-	-	-	-	-
S9	3	0	600	3	0	600	-	-	-	-	-	-
S10	2	0	400	2	0	400	5	486.48	0	0	0	0
S11	3	0	600	3	0	600	4	389.34	0	0	1	0.25 ± 0.25
S12	3	0	600	3	0	600	-	-	-	-	-	-
S13	3	0	600	3	0	600	5	508.94	0	0	0	0
S14	3	0	600	3	0	600	12	2104.31	0	0	0	0
S15	3	0	600	3	0	600	-	-	-	-	-	-
S16	3	0	600	3	0	600	-	-	-	-	-	-
S17	3	0	600	3	0	600	2	200	0	0	0	0
S18	3	0	600	3	0	600	3	440	0	0	0	0
S19	3	0	600	3	0	600	3	164	0	0	0	0
S20	3	0	600	3	0	600	3	600	0	0	0	0
S21	3	0	600	3	0.33 ± 0.33	600	-	-	-	-	-	-
S21B	-	-	-	-	-	-	3	650	0	0	0	0
S22	3	0	600	3	0	600	3	450	0	0	0	0

S23	3	0	600	3	0	600	3	750	0	0	0	0
S24	3	0.17 ± 0.17	600	3	2.33 ± 2.33	600	17	450	20	2.21 ± 1.11	3	0.67 ± 0.13
S25	3	0.17 ± 0.17	600	3	0.67 ± 0.67	600	4	320	0	0	0	0
S26	3	0	600	3	0	600	15	1755.62	4	0.23 ± 0.15	0	0
S27	3	0	600	3	0	600	5	754.05	0	0	3	0.40 ± 0.40
S28	3	0	600	3	0	600	6	1160.76	0	0	3	0.25 ± 0.25
S29	3	0.17 ± 0.17	600	3	0	600	4	506.4	0	0	0	0
S31	3	0	600	3	0	600	15	6566.85	0	0	0	0
S32	3	0	600	3	0	600	-	-	-	-	-	-
S33	3	0	600	3	0	600	4	749.36	0	0	0	0
S34	3	0	600	3	0	600	2	210	0	0	0	0
S35	3	0.17 ± 0.17	600	3	0	600	-	-	-	-	-	-
S36	-	-	-	-	-	-	8	680	9	1.13 ± 1.13	5	0.63 ± 0.63
S37	-	-	-	-	-	-	3	525	26	4.95 ± 1.01	14	2.67 ± 1.33
S38	-	-	-	-	-	-	5	440	0	0	0	0
S39	-	-	-	-	-	-	10	4000	0	0	0	0
P2	3	4.33 ± 1.01	600	3	0	600	4	628.26	0	0	4	0.67 ± 0.67
P4	3	0	600	3	0	600	5	227.4	0	0	9	3.60 ± 3.60
P5	3	2 ± 0.58	600	3	0	600	1	30	0	0	0	0
P6	3	5.17 ± 1.74	600	3	0	600	3	175	0	0	1	0.56 ± 0.56
P7	3	2.83 ± 1.74	600	3	0	600	5	173.08	0	0	4	2.00 ± 2.00
P8	3	0	600	3	0	600	-	-	-	-	-	-
P9	3	0	600	3	0	600	-	-	-	-	-	-
P10	3	2.67 ± 1.01	600	3	0.33 ± 0.33	600	2	88.02	0	0	5	5.00 ± 5.00
P11	3	0	600	3	0	600	4	338.34	0	0	0	0
P12	3	0.33 ± 0.17	600	3	0	600	5	437.86	0	0	1	0.20 ± 0.20
P13	3	14.5 ± 5.29	600	3	0	600	2	64.44	5	0	5	
P14	3	0.5 ± 0.29	600	3	0	600	-	-	-	-	-	-
P15	3	0.33 ± 0.33	600	3	0	600	-	-	-	-	-	-

P16	3	0.5 ± 0	600	3	0	600	4	197.95	0	0	1	0.50 ± 0.50
P17	3	0.67 ± 0.17	600	3	0	600	1	10	0	0	1	-
P18	3	0	600	3	0	600	-	-	-	-	-	-
P19	3	0.67 ± 0.44	600	3	0	600	-	-	-	-	-	-
P20	3	0.17 ± 0.17	600	3	0	600	-	-	-	-	-	-
P21	3	0.83 ± 0.33	600	3	0	600	3	300	0	0	0	0
P22	3	0.33 ± 0.33	600	3	0.33 ± 0.33	600	-	-	-	-	-	-
P23	3	0	600	3	0	600	2	140	0	0	0	0
P24	3	1 ± 0	600	3	0	600	3	160	0	0	0	0
P25	-	-	-	-	-	-	3	93.72	0	0	9	7.50 ± 7.50
P26	-	-	-	-	-	-	3	63.62	0	0	4	5.33 ± 5.33
P27	-	-	-	-	-	-	3	136.21	0	0	2	1.21 ± 1.21
P28	-	-	-	-	-	-	1	20	0	0	10	*
P29	-	-	-	-	-	-	2	182.24	0	0	3	1.50 ± 1.50
P30	1	7.5	200	1	0	200	-	-	-	-	-	-
Total	168	0.71 ± 0.19	33,600	168	0.07 ± 0.04	33,600	208	30,398		0.16 ± 0.07		0.81 ± 0.28

4.1.2. Densidades y estructura de tallas de *P. nobilis* en la laguna 2019-2022

Las búsquedas de individuos llevadas a cabo en la laguna mediante vehículos de propulsión subacuática a partir de 2020 permitieron la localización de nuevas zonas con presencia de individuos vivos. En la Isla Perdiguera se encontró una zona al noroeste, en Isla del Barón se encontraron dos sitios nuevos, en el sudoeste y sureste, y se encontraron dos zonas completamente nuevas en La Manga, en la zona de El Pedrucho y en Pedruchillo-Galán (Figura 22).

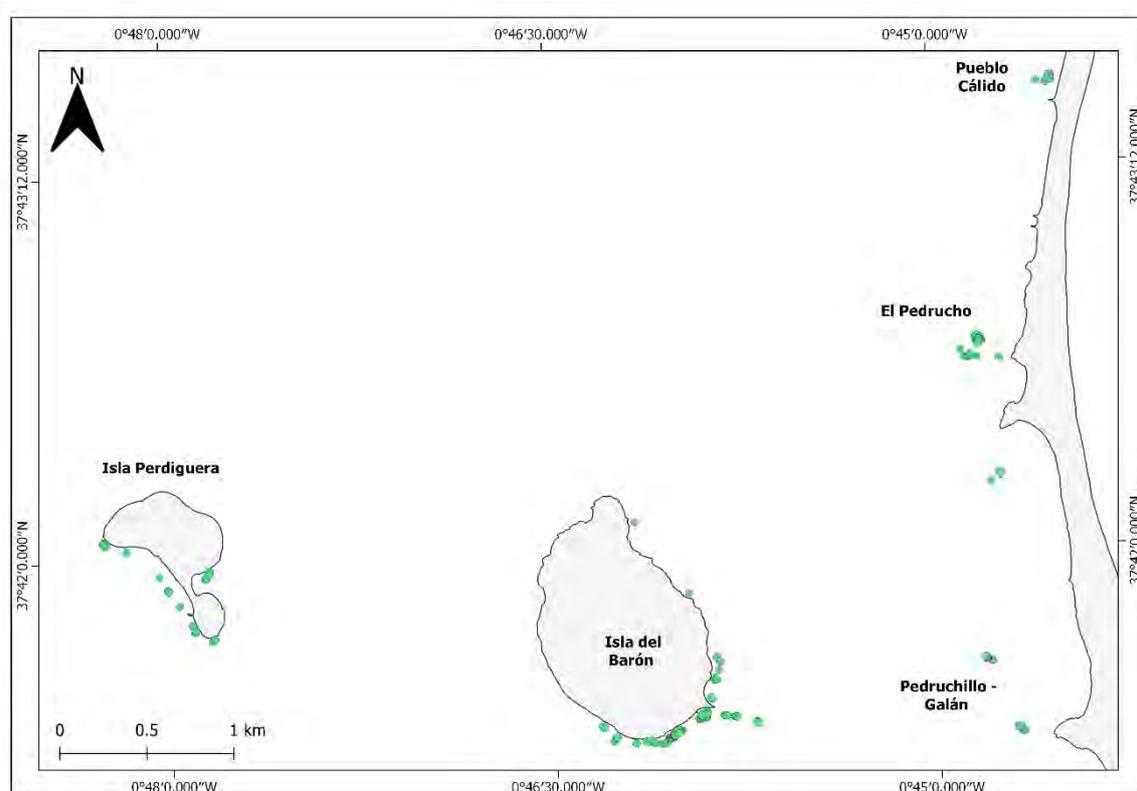


Figura 22. Individuos de *P. nobilis* vivos encontrados en la laguna del Mar Menor.

Respecto las densidades y estructura de tallas de la población de *P. nobilis* en la laguna entre 2019 y 2022 realizado en las zonas con nacras vivas, los resultados obtenidos de los dos sitios que presentan mayores densidades indican porcentajes similares de individuos vivos y muertos entre los cuatro años estudiados, variando de 74.39 ± 7.67 % a 91 ± 5.57 % para los individuos vivos y variando de 9 ± 5.57 a 25.61 ± 7.67 para los individuos muertos. Además, los resultados muestran densidades medias globales de individuos vivos y muertos entre años similares (vivos: $F_{3, 35} = 0.816$; muertos: $F_{3, 35} = 0.316$; $P > 0.05$) (Figura 23, Tabla 4).

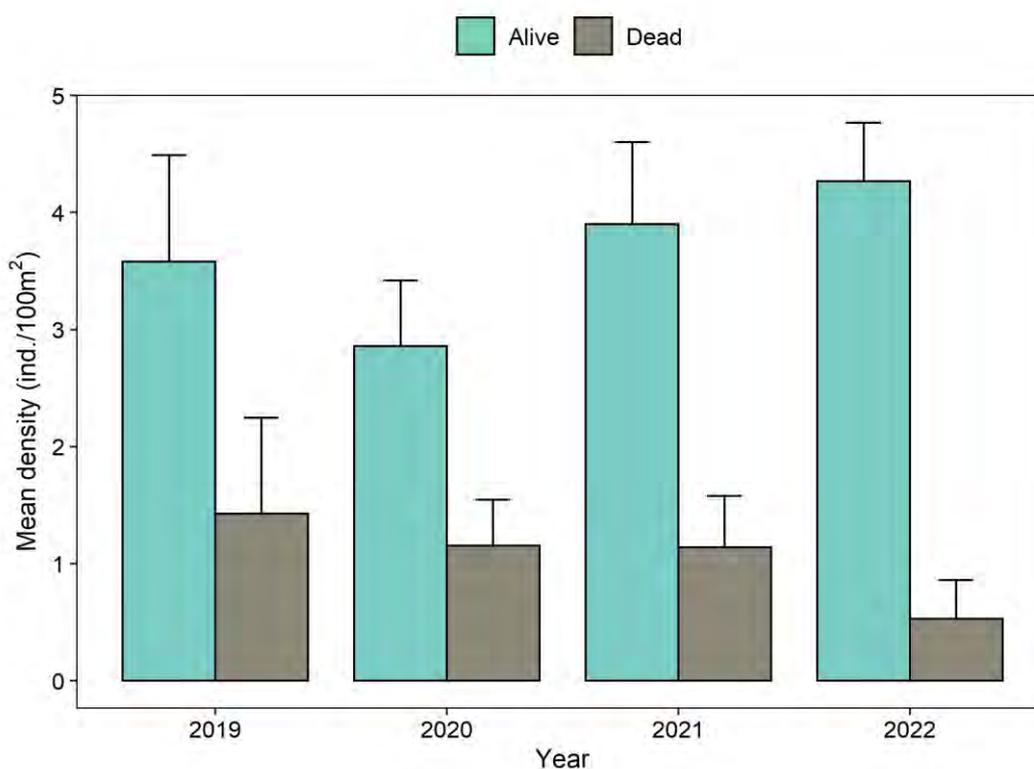


Figura 23. Densidades medias de individuos vivos (verde) y muertos (gris) de *P. nobilis* a lo largo de los años: 2019 (n=6), 2020 (n=18), 2021 (n=10) y 2022 (n=5).

Tabla 4. Valores medios de densidad de individuos de *Pinna nobilis* (individuos/100m² ± error estándar), porcentaje de individuos vivos y muertos entre 2019, 2020, 2021 y 2022. Trans: número de transectos lineales.

Año	Trans.	Área (m ²)	n	Individuos <i>P. nobilis</i> vivos			Individuos <i>P. nobilis</i> muertos			
				Densidad media (ind/100 m ²)	Porcentaje medio	Porcentaje (min-máx.)	n	Densidad media (ind/100 m ²)	Porcentaje medio	Porcentaje (min-máx.)
2019	6	975	36	3.58 ± 0.91	79.05 ± 6.96	57.14 - 100	15	1.43 ± 0.82	20.95 ± 6.96	0 - 42.86
2020	18	1695	48	2.86 ± 0.56	74.39 ± 7.67	0 - 100	20	1.16 ± 0.39	25.61 ± 32.55	0 - 100
2021	10	1050	41	3.90 ± 0.70	77.93 ± 6.82	50 - 100	12	1.14 ± 0.44	22.07 ± 6.82	0 - 50
2022	5	375	16	4.27 ± 0.50	91 ± 5.57	75 - 100	2	0.53 ± 0.33	9 ± 5.57	0 - 25

Por otro lado, los resultados muestran que la talla de los ejemplares de la población de *P. nobilis* del Mar Menor ha crecido significativamente a lo largo de los años, como se observa en la anchura máxima media de los individuos ($F_{3, 635} = 52.16$; $P < 0.05$, Figura 24, Tabla 5). De media, los individuos han crecido casi 1 cm de anchura por año. En concreto, en 2019, los individuos vivos presentaban una anchura máxima media de 13.71 ± 0.18 cm, mientras que tres años después, los individuos medían una anchura media de 16.32 ± 0.12 cm (Figura 24, Tabla 5). Respecto los individuos muertos, se observa que

cada año los individuos muertos también eran más grandes, observándose hasta 2 centímetros de diferencia entre individuos de 2019 y 2022 (Tabla 5). Por otro lado, el tamaño medio de los individuos muertos fue aproximadamente dos centímetros menos que el de los vivos. De hecho, el 56.25% de los individuos muertos en 2022 medían entre 10.1 y 15 cm (Figura 25).

Tabla 5. Valores medios de anchura máxima \pm error estándar, de individuos de *Pinna nobilis* vivos y muertos entre 2019, 2020, 2021 y 2022.

Anchura máxima (cm)						
Individuos vivos				Individuos muertos		
Año	n	Media	min-max	n	Media	min-max
2019	94	13.71 \pm 0.18	10.0 - 22.0	14	12.69 \pm 0.63	7.9 - 16.2
2020	82	14.77 \pm 0.19	11.2 - 19.4	23	12.20 \pm 0.59	7.5 - 16.7
2021	232	15.45 \pm 0.12	10.2 - 19.8	46	14.41 \pm 0.43	7.2 - 20.98
2022	231	16.32 \pm 0.12	9.2 - 23.8	32	14.76 \pm 0.38	10.7 - 19.84

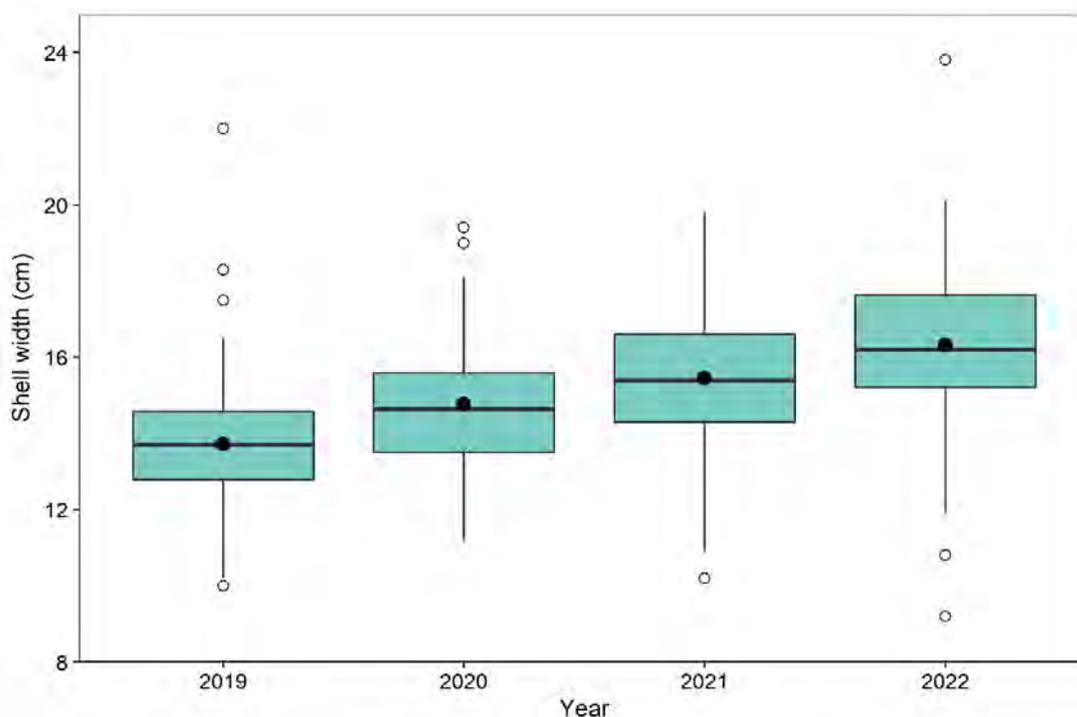


Figura 24. Tamaño medio de la anchura de la valva de los individuos de *P. nobilis* vivos por año; 2019 (n=94), 2020 (n=82), 2021 (n=232), 2022 (n=231). El punto negro indica el tamaño medio.

Si se analiza la estructura de tallas de la población, los resultados muestran claramente que la población ha crecido entre 2019 y 2022 (Figura 25). La anchura mínima y máxima de los individuos vivos en 2019 osciló entre 10 y 22 cm (Tabla 5), observándose que el 76.59% de individuos vivos medían entre 10.1 y 15 cm. En 2022, la anchura mínima y máxima era semejante que las observadas en 2019, pero el 76.19% de los individuos vivos medían entre 15.1-20 cm (Figura 25), una clase de talla mayor que en 2019. Por otro lado, a lo largo de los años muestreados se han encontrado pocos individuos vivos menores de 10 cm o más anchos de 20 cm (Figura 25, Tabla 5).

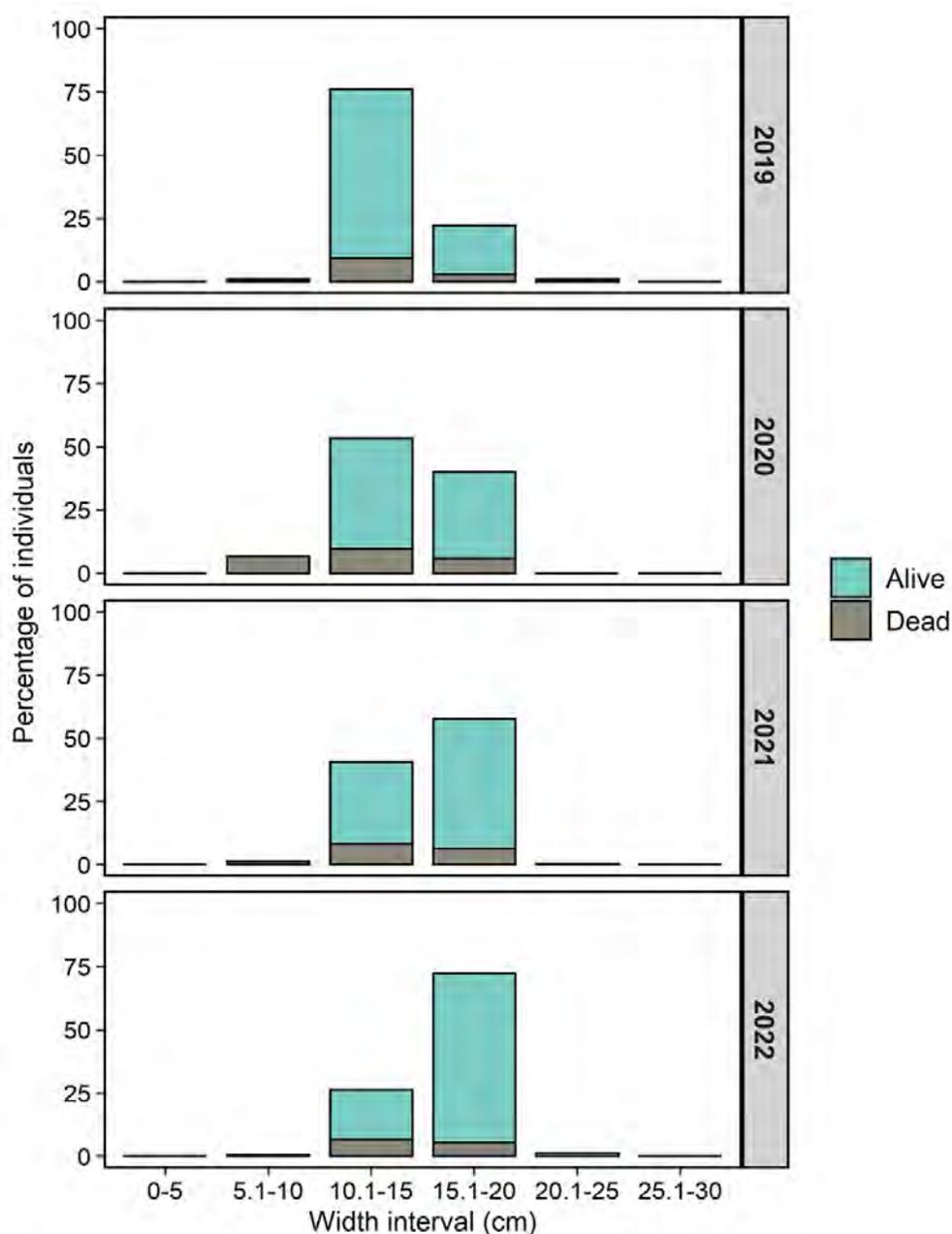


Figura 25. Distribución de la estructura del tamaño de la concha (anchura máxima) de los individuos de *Pinna nobilis* vivos y muertos cada año; 2019 (n=108), 2020 (n=278), 2021 (n=232), 2022 (n=263).

4.1.3. Modelado larvario e instalación de dispositivos de asentamiento larvario

Se ha elaborado un modelo de dispersión larvario por capas de profundidad que se ha simulado desde los 6 sitios que presentan individuos vivos en la laguna, y teniendo en cuenta el campo de corriente promedio de junio y septiembre de 2017, muestra como la dispersión larvaria se centraría principalmente en la cubeta central de la laguna (Figura 26).

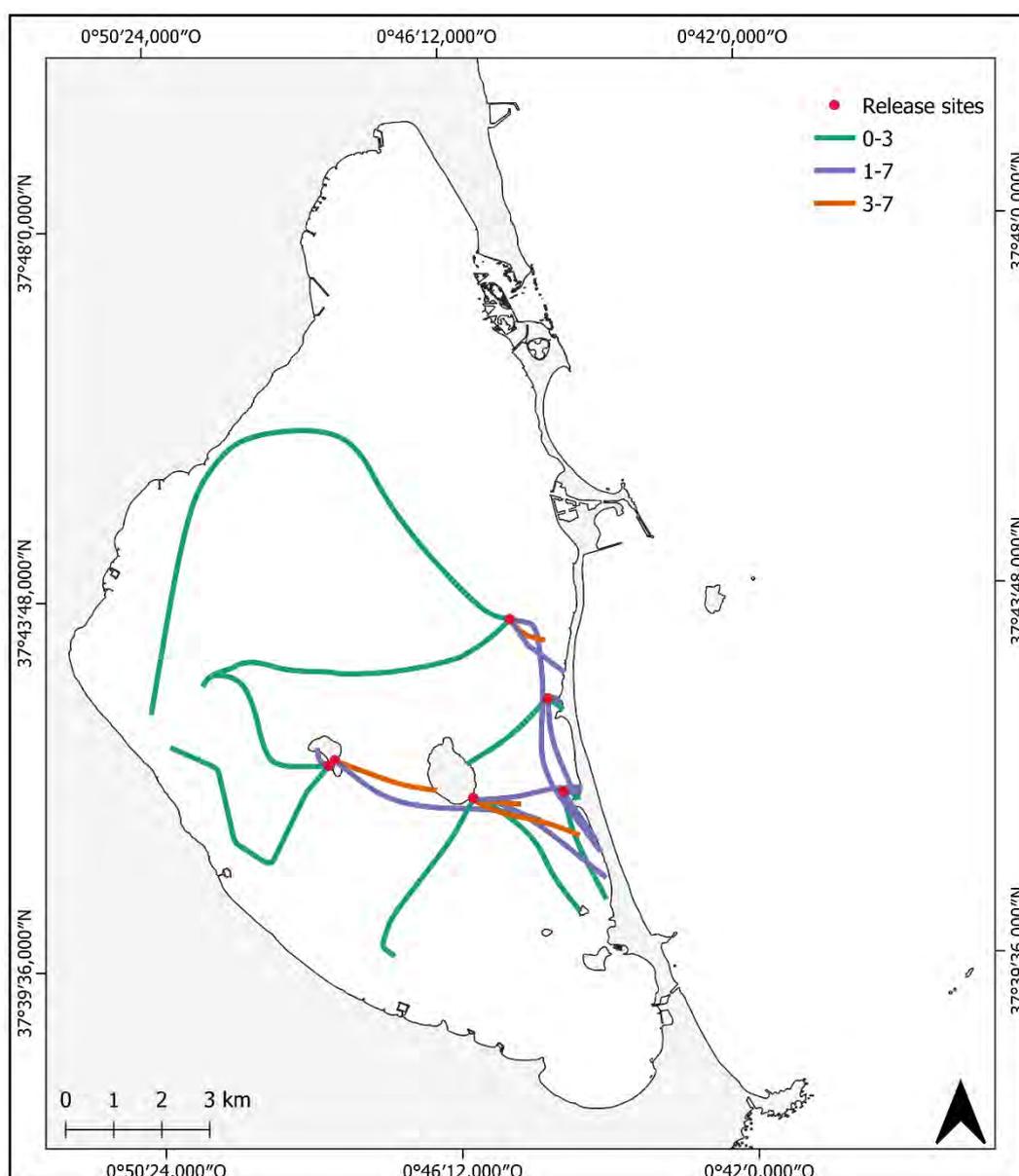


Figura 26. Simulación de la dispersión larvaria entre junio y septiembre de 2017 (duración trayectorias de 30 días). El color verde representa la dispersión de las larvas en la capa 0-3 m de profundidad, el color naranja representa la dispersión larvaria en la capa más profunda de 3-7 m de profundidad y el color lila representa la dispersión de las larvas en toda la columna de agua de 1-7 m de profundidad.

Por otro lado, respecto los DALs instalados en 2020, 42 de los 47 DALs instalados fueron recuperados de manera satisfactoria, lo que supone una tasa de recuperación de DAL del 89.4% (Figura 27). Los 5 DAL no encontrados, se consideraron perdidos (Figura 27). Además, después de realizar búsquedas minuciosas de reclutas de *P. nobilis* en los colectores larvarios, los resultados obtenidos muestran que no se encontraron reclutas de *P. nobilis* en ninguno de los colectores larvarios recuperados con éxito en 2020.

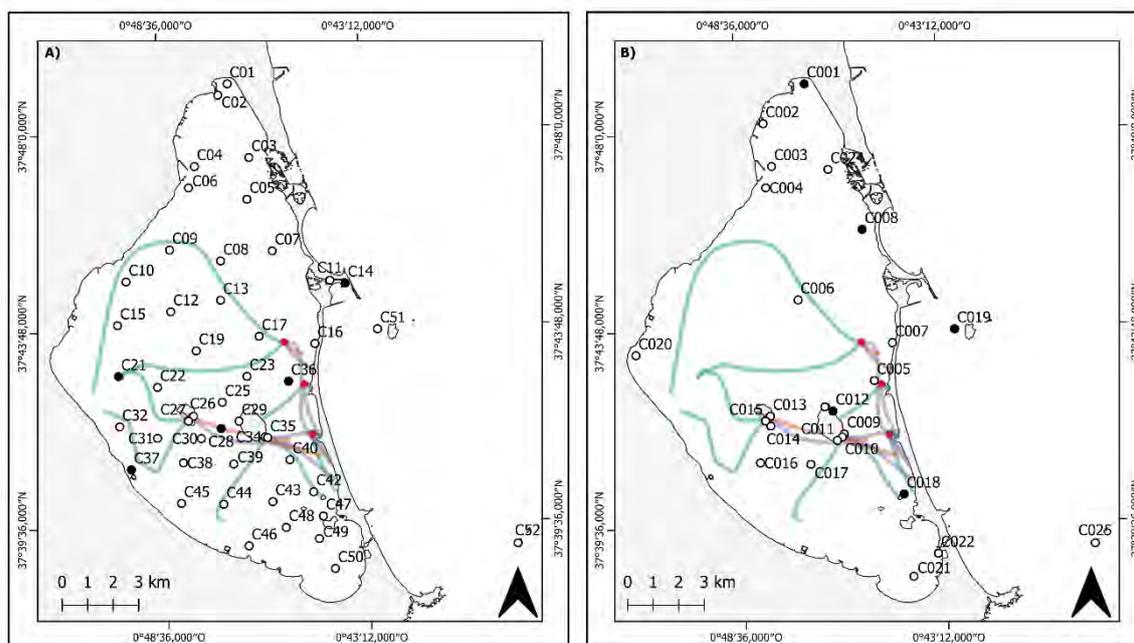


Figura 27. A) Posición colectores larvarios 2020. B) Posición colectores larvarios 2021. Los puntos negros representan los colectores larvarios perdidos.

4.1.4. Proyecto piloto de resiembra y seguimiento de juveniles en el medio

Debido a la no de obtención de semillas en los DALs instalados en 2020, se han llevado a cabo medidas compensatorias a lo largo del proyecto. La primera medida propuesta ha sido la búsqueda *in situ* de individuos reclutas. Las búsquedas han abarcado toda el área cubierta con los DPV (247,980.28 m²), el área cubierta por las parcelas demográficas (1469 m² por 3 visitas), y los censos visuales llevados a cabo desde octubre de 2020 (6643 m²). Sin embargo, a pesar del gran esfuerzo muestral realizado tampoco se detectaron reclutas de *P. nobilis* en el medio. Otra medida compensatoria implementada en 2021 y 2022 fue la instalación de DALs nuevamente. Concretamente, 20 de los 25 DALs instalados en abril de 2021 fueron recuperados de manera satisfactoria en septiembre de 2021, lo que supone una tasa de recuperación de DAL del 80% (Figura 27). Sin embargo, como ocurrió en 2020, 5 de los DALs no fueron encontrados, y, por tanto, se consideraron perdidos (Figura 27). Respecto los DALs instalados en 2022 (3

dispositivos), todos fueron recuperados con éxito. Sin embargo, en ninguno de estos dos años tampoco se observó reclutamiento de individuos de *P. nobilis* en los DALs.

A pesar de no obtener semillas de *P. nobilis* en 2020 ni 2021, en total se identificaron más de 50 taxones diferentes de fauna y flora en los DALs recogidos, y que representaban elevados niveles de biomasa. En concreto, en 2020 cada DAL pesó de media (biomasa peso húmedo) 1.68 ± 0.09 kg y 1.26 ± 0.12 kg en 2021. Entre los taxones identificados, había 34 especies sésiles, pertenecientes a 5 filos diferentes: Tunicados (9 especies), Bryozoa (3 especies), Cnidaria (4 especies), Mollusca (8 especies), Porifera (4 especies), Annelida (2 especies), Arthropoda (1 especie), Chlorophyta (2 especies), Rhodophyta (1 especie). Excepcionalmente, en una bolsa del DAL de la Reserva Marina de Cabo de Palos-Islas Hormigas, reclutaron dos individuos de la especie congénere *P. rudis* en 2021, confirmando así la eficacia de este dispositivo para la evaluación del reclutamiento de especies de *Pinna* sp.

Se ha realizado un análisis de componentes principales, expresado como porcentaje de cobertura neta, realizado para todos los colectores larvarios recuperados comunes en 2020 y 2021, y 11 de las especies y el grupo *Ascidicae* spp. permite explicar el 31% de la varianza entre DALs (Figura 28). Las especies que contribuyen más significativamente a la formación del eje 1 de forma positiva son: *Hydroides elegans* (33.59%, $\cos^2 = 0.802$), *Amphibalanus amphitrite* (21.12%, $\cos^2 = 0.636$) y *Bugula neritina* (19.49%, $\cos^2 = 0.611$). Sin embargo, se observa que la variable que contribuye más significativa y positivamente en el eje 1 (Dim 1) es el año "2021" con una coordenada de 0.249 (valor p = 0.346), seguida de la profundidad "S" con 0.045 (valor p = 0.826). Por lo tanto, la explicación por estas 2 variables no es significativa. Además, se observa una variación interanual entre años.

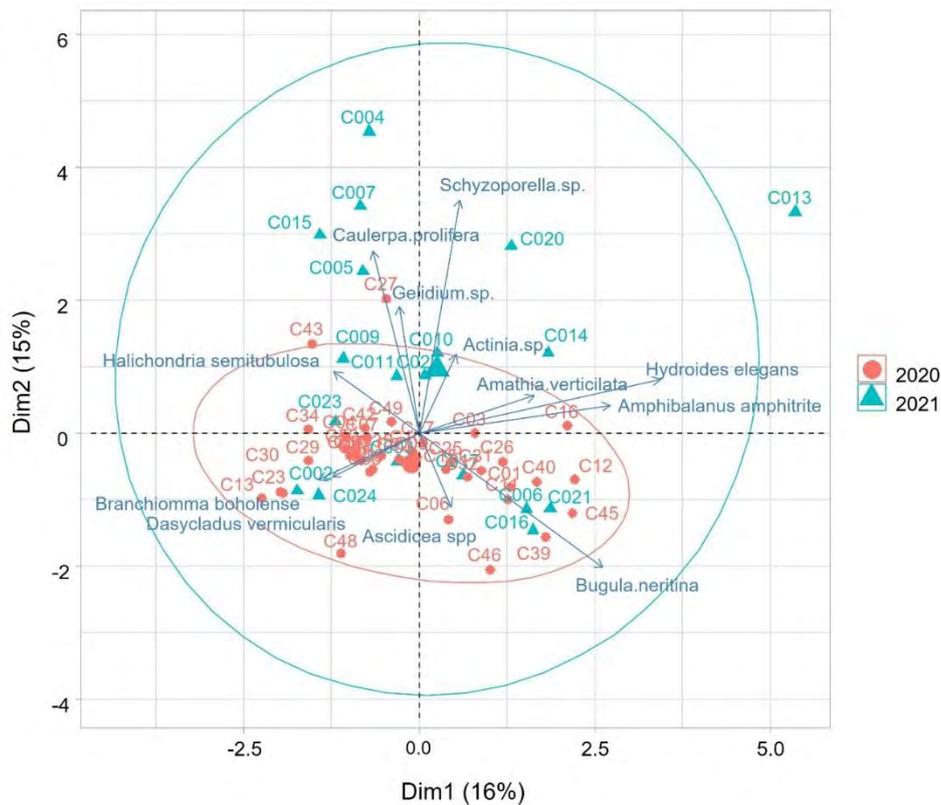


Figura 28. Análisis de componentes principales PCoA realizado sobre las especies encontradas en los dispositivos de asentamiento larvario (DAL), expresado en porcentaje de cobertura de red sobre todos los colectores larvarios recuperados comunes en 2020 y 2021.

Cabe destacar que la especie más relacionada biológicamente con *P. nobilis* que reclutó en alta abundancia en los colectores larvarios fue *Ostrea* sp., especialmente durante el periodo de reclutamiento de 2020. Debido a que es un bivalvo presente en la laguna, y considerando las altas abundancias y la similitud en el modo de dispersión larvaria con *P. nobilis*, en el marco de este proyecto se ha llevado a cabo un estudio sobre los patrones de reclutamiento de esta especie en la laguna del Mar Menor para así poder ilustrar posibles patrones de reclutamiento de *P. nobilis*. Para ello, los ejemplares de ostreidos obtenidos en los DAL de 2020 y 2021 fueron analizados. En primer lugar, se llevó a cabo la determinación taxonómica de la especie de ostra encontrada, mediante la aplicación de un análisis molecular específico en 90 semillas seleccionadas al azar de entre todas las encontradas en los colectores larvarios. Por otro lado, se calculó la abundancia y el tamaño medio (altura \pm error estándar (SE)) de cada individuo encontrado por bolsa de colector y se hizo la media por colector larvario. Los datos de abundancia y tallas fueron interpolados aplicando una interpolación ponderada por distancia inversa (IDW) utilizando el software ArcGIS (versión 10.8) con el objetivo de determinar la distribución espacial de

la especie en la laguna. Más información sobre el estudio y metodologías utilizadas se puede obtener de (Lunetta et al. 2023).

Respecto los resultados más destacados de este estudio están, por un lado, los análisis moleculares realizados, que identificaron como especie predominante en los colectores larvarios la ostra *Ostrea stentina*. Respecto su abundancia y distribución, en total se contabilizaron 3431 individuos, cuyos valores variaron entre 0 y 1212 por colector. El colector que registró el mayor número de reclutas fue el C08, situado en el lado opuesto del canal Las Encañizadas, seguido del C05 con 312, C22 con 288, C38 con 260, C45 con 229 y C04 con 119 individuos. Los colectores en los que no se detectaron reclutas de ostra fueron el C01, C02, C03, C16, C25, C42 y C49. La interpolación de abundancia realizada a lo largo de la laguna mostró mayores densidades en la zona noroeste y tres manchas más pequeñas en las zonas costeras del suroeste (Figura 29).

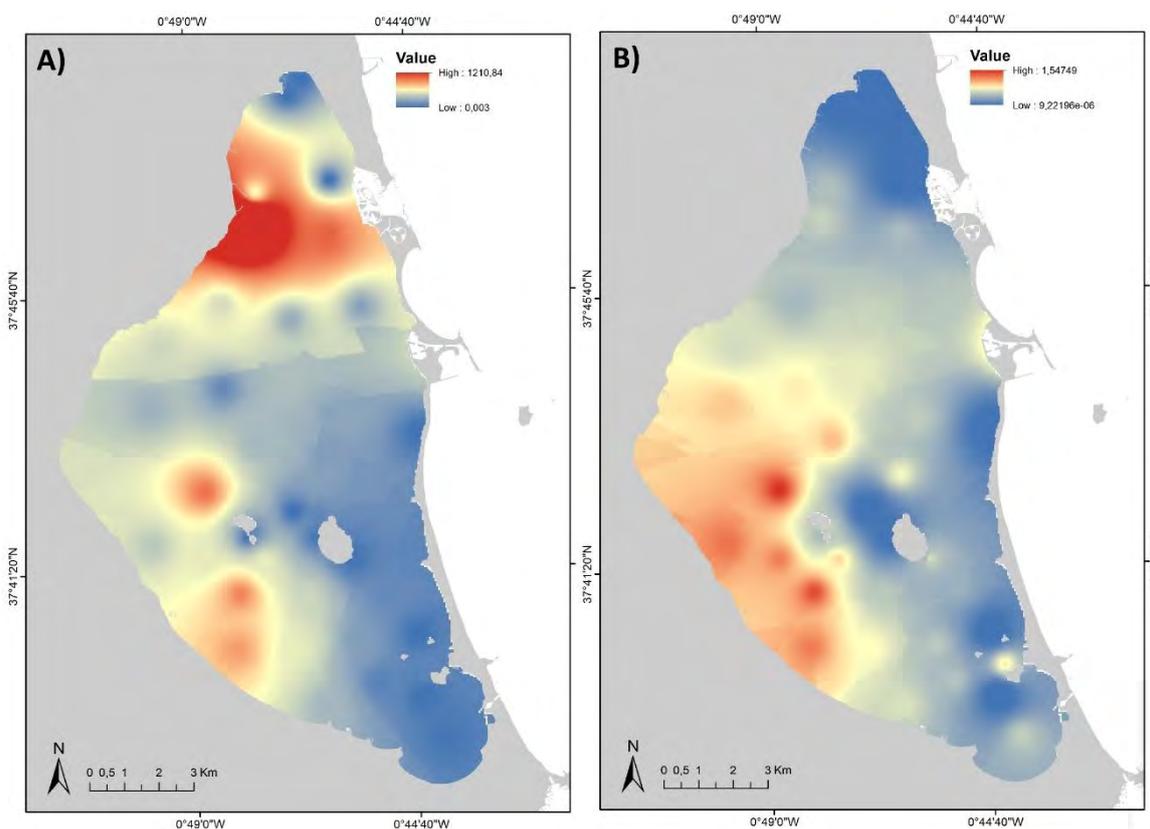


Figura 29. Interpolación de A) Abundancia media de ostras por colector/3 bolsas, y B) Tamaño medio de individuos de ostra por colector/3 bolsas reclutados entre junio y octubre de 2020.

En cuanto a la estructura de tallas, el individuo más pequeño midió 3.3 mm y el mayor 31.1 mm. La clase de talla predominante fue de 1.0-1.09 mm de altura, mostrando una distribución unimodal (Figura 30). Los resultados de la interpolación de tallas a lo largo

de la laguna mostraron que las ostras de mayor tamaño se encontraban en la parte suroeste de la laguna (Figura 29).

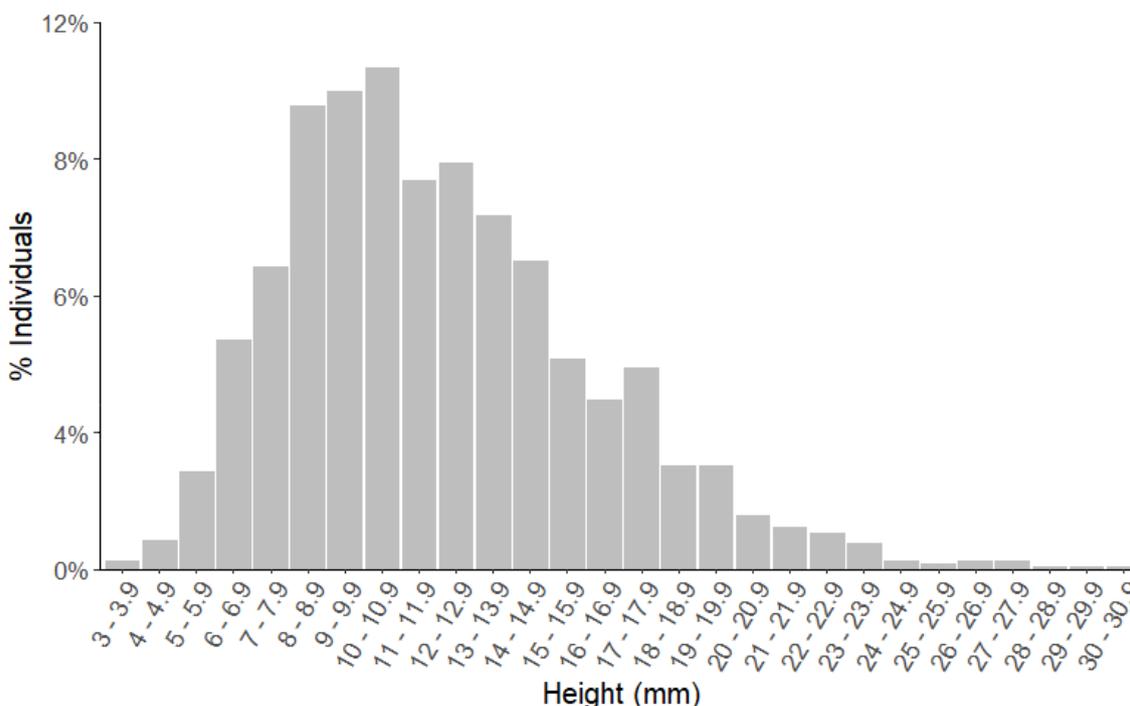


Figura 30. Porcentaje de individuos de *Ostrea stentina* por clase de talla (altura, en mm) en la laguna del Mar Menor (n = 1335) reclutados entre junio y octubre de 2020.

Cabe destacar en este apartado que a finales de mayo de 2022 se encontraron nacras en puesta, por lo que se evaluó el evento reproductivo de la población de nacra. En total, 128 individuos fueron monitorizados *in situ* durante los cuatro días de seguimiento del desove a lo largo del periodo de muestreo (del 17 al 31 de mayo). Para un total de 208 observaciones, el 14.84% de los individuos eran reproductivamente activos. De esos individuos activos, 9 eran hembras, 8 machos, uno no fue identificado y otro mostró hermafroditismo secuencial en día consecutivo (primero hembra y al día siguiente macho). Durante el desove, el 100% de los individuos observados activos presentaban el manto con forma de sifón, pero también se observaron otros 6 individuos con esta disposición del manto, pero sin desove. De esos 6, uno fue observado desovando dos días antes, mientras que los otros 5 sólo fueron observados un día. Respecto el tamaño de los individuos, el individuo más pequeño reproductivamente activo medía 13.8 cm de ancho, y el individuo más grande medía 19.90 cm. Además, no se observaron diferencias de tamaño entre individuos activos y no activos durante los días 23 y 24 (Figura 31).

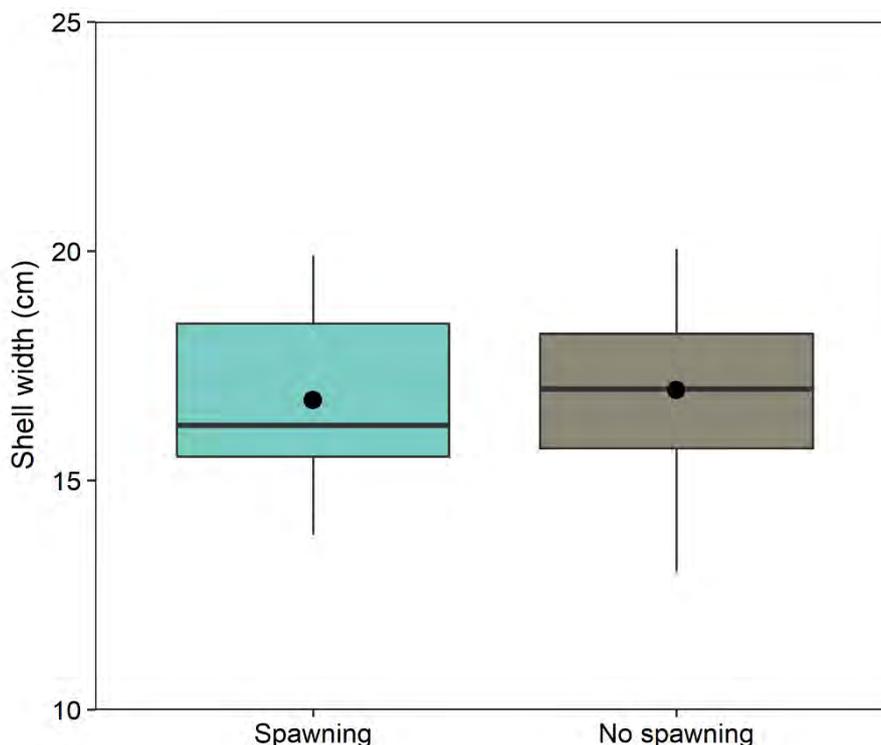


Figura 31. Tamaño medio de los individuos de *Pinna nobilis* reproductores activos (n=19) y reproductores no activos (n=69) observados los días 23 y 24 de mayo 2022. El punto negro indica el tamaño medio.

4.1.5. Determinación grado afectación de la población por patógenos

Del total de los 58 individuos analizados para la detección de infección por patógenos en 2019, un 13.8% de los individuos dieron positivo para *H. pinnae*. Concretamente, se observó un gradiente de infección por *H. pinnae* en función de la distancia al Mar Mediterráneo. El 24% de los individuos muestreados de Pueblo Cálido estaban infectados, seguidos del 8 y 9% de Isla del Barón e Isla Perdiguera, respectivamente. Por el contrario, no se detectó amplificación por *Mycobacterium* sp. en ninguna de las muestras analizadas. En los años posteriores, solo en 2021, se observó infección por *H. pinnae* en una nacra de El Pedrucho, en ninguna de las muestras restantes se obtuvo amplificación por *H. pinnae* o *Mycobacterium* sp. (Tabla 6).

Tabla 6. Muestras analizadas para detección de patógenos en ejemplares de *Pinna nobilis* y porcentaje de individuos infectados (global y por sitio).

Año	n	Ind. infectados		Ind. Infectados por sitio				
		<i>H. pinnae</i>	<i>Mycobacterium</i> sp	Pueblo Cálido	Isla del Barón	Isla Perdiguera	El Pedrucho	Pedruchillo -Galán
2019	58	13.8%	0	24%	8%	9%	-	-
2020	20	0	0	0	0	0	-	-
2021	40	2.5%	0	0	0	-	5.88%	0
2022	20	0	0	-	0	0	0	0

4.1.6. Evolución salinidad y temperatura

La actividad de reproducción y de infección de los parásitos Haplosporidios se ve afectada por condiciones ambientales (Arzul & Carnegie 2015) y la enfermedad asociada a *H. pinnae* parece manifestarse en ambientes con temperatura mayor de 13,5°C y salinidad entre 36,5 y 39,7 (Cabanelas-Reboredo et al. 2019). Desde 2017 la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, junto a la Universidad Politécnica de Cartagena llevan a cabo un seguimiento de parámetros ambientales de la laguna, entre ellos la salinidad y la temperatura, valores que se han analizado con relación a la población de *P. nobilis*, y que se han obtenido del Servidor de Datos Científicos del Mar Menor (<https://marmenor.upct.es>).

Los resultados de los dos parámetros analizados, temperatura y salinidad, mostraron un claro patrón estacional con valores mínimos en invierno y máximos en verano. La salinidad media registrada en invierno desde marzo de 2017 hasta marzo de 2023 (diciembre a marzo) fue de 41.63 ± 0.06 y la salinidad media registrada en verano (junio a agosto) fue de 42.74 ± 1.73 . Los valores de temperatura también variaron entre estaciones. En invierno la temperatura media registrada fue de 13.54 ± 0.07 °C y en verano la temperatura media fue de 27.87 ± 0.07 °C (Figura 32). Sin embargo, se observaron cuatro periodos con valores de salinidad igual o inferior a 39.7 (salinidad que permite la infección por *H. pinnae*). El primer período se produjo en marzo de 2017 y duró hasta mayo de 2017; en este momento, el valor medio de salinidad fue de 37.80 ± 0.16 y la temperatura media fue de 18.66 ± 0.14 °C. El segundo periodo duró de septiembre de 2019 a octubre de 2019; en este momento la salinidad media fue de 39.40 ± 0.04 y la temperatura media fue de 24.93 ± 0.08 °C. El tercer período ocurrió entre diciembre 2019 y junio de 2020, observándose valores medios de salinidad de 38.73 ± 0.04 y valores medios de temperatura de 17.04 ± 0.30 °C. El último período ocurrió entre abril y mayo de 2022, la salinidad media observada era de 39.45 ± 0.02 y la temperatura media observada fue de 19.27 ± 0.43 °C (Figura 32).

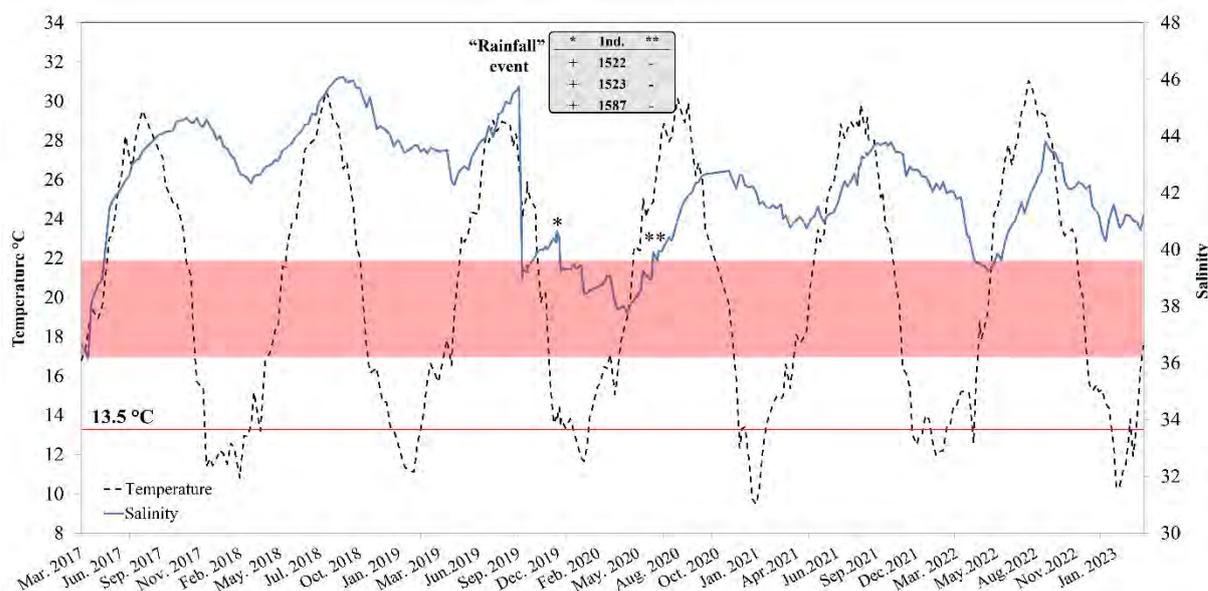


Figura 32. Series temporales de los valores de salinidad y temperatura registrados desde el 22 de marzo de 2017 hasta el 22 de marzo de 2023 en el Mar Menor. (*) corresponde a la primera vez que se biopsiaron individuos de *P. nobilis* (noviembre de 2019); (**) corresponde a la segunda vez que se biopsiaron individuos de *P. nobilis* (junio de 2020). Ind., Individuos biopsiados las dos veces. La franja roja corresponde al rango de valores de salinidad a los que *H. pinnae* es efectivo (36.5-39.7; Cabanellas-Reboredo et al., 2019); la línea roja corresponde al límite de temperatura por debajo del cual *H. pinnae* no afecta (13.5°C). Fuente: Servidor de Datos Científicos del Mar Menor (SDC) (<https://marmenor.upct.es/charts/>).

4.1.7. Evaluación de la conectividad y diversidad genética de la población

A partir del análisis molecular realizado con las muestras obtenidas de los 317 ejemplares biopsiados, se han identificado un total de 319 alelos distintos en la población de *P. nobilis* del Mar Menor, con un número de alelos que oscilaba entre 6 y 28 por locus y una media de 15.19 alelos por locus (Tabla 7).

Cabe mencionar que 4 de los 26 loci mostraron frecuencias alélicas nulas significativas con frecuencias superiores a 0.09; estos 4 loci se eliminaron de los análisis posteriores. Los 22 loci restantes no mostraron indicios de otros problemas técnicos, como un abandono sustancial de alelos o errores de puntuación debidos al stuttering. Cabe destacar que el loci 15006 sólo expresaba un único alelo y también se eliminó de los análisis posteriores, ya que no era informativo. Los datos perdidos por locus oscilaron entre el 0% y el 4,98% (Tabla 7). En el proceso de cribado se excluyó a 25 de los 309 individuos inicialmente cribados. Estas exclusiones se realizaron porque se identificaron como clones o porque faltaban al menos 5 loci. Como resultado, el conjunto de datos se refinó para incluir 21 loci y 284 individuos (Tabla 8).

Tabla 7. Caracterización de los 26 loci microsatélites utilizados para la población del Mar Menor. TA: temperatura de hibridación del primer, Null allele freq.: frecuencias de alelos nulos por locus F_{IS} : coeficiente de endogamia. N: número de individuos con amplificación fiable, Na: número de alelos. *valor $p < 0,05$, **valor $p < 0,01$, ***valor $p < 0,001$. Negrita: alta frecuencia de alelos nulos (Gonzalez-Wanguemert et al. 2015).

Multiplex	Locus	Primer sequences	Repeat type	TA (°C)	Size range (bp)	Null allele freq.	F_{IS}	N	Na	Missing data
1	15415	F: ACC ACT ACT CAT GCC TCA CC R: AAC GAA GGT CGG CTA TAA CG	(AC) ₁₆	53°C	237–261	0.01	0.0302	280	16	0.36
	11847	F: ACA CTC CAG TAC AAG TCA CAA ATG R: AGA ATG CCT GAG TGG GAC AG	(TGT) ₁₈	53°C	72–153	0.00	-0.0007	279	28	0.71
	3.2a	F: CCG AGG TCC CGT ATC ACA G R: TGC CCT TTG TGT CAT TAT TTCG	(ACC) ₁₂	53°C	194–248	0.02	0.049*	281	17	0.00
	10059	F: TTC TCC TCC GAA CCC TTC R: ATA AAT ACC CTT GCC GAC CT	(CA) ₁₃	53°C	101–131	0.14	0.28***	269	22	4.27
	6980	F: AGT CTG CAT AAC TTC CAC TGC R: GGC CAC CAG TAA GCT CTT TG	(ACC) ₁₀	53°C	190–245	0.02	0.0346	281	15	0.00
	1490	F: CTT CTG ATT GAC CGT AAG TG R: AAA CTC AGA CAA CGA GAC AA	(AAC) ₁₁	53°C	179–212	0.00	0.0084	281	13	0.00
2	12107	F: TGC ATC TGC ATC GTG AGG R: TGG TGG TCA AGT GGG ATG AC	(CAT) ₈	55°C	110–119	-0.04	-0.0642	277	6	1.42
	15584	F: TGA GGT GGA CGT CGC TTA AC R: GTC GAA GTC TCG TGC GAA AG	(TGT) ₁₃	55°C	221–272	0.01	0.0278*	281	18	0.00
	9902	F: TCT AAG GTG CTT GAT GTG GA R: TTA GAC GGA AAC CAT GTG TG	(GTCT) ₁₂	55°C	215–243	0.05	0.0893*	281	10	0.00
	4482	F: TAT CCA GCA AGA GCA CCA GC R: TGA CTT GGG TAC TGG GTT CG	(CAA) ₉	55°C	186–204	0.03	0.0553	281	8	0.00
3	15393	F: TTGAGTGGGACGTTAAACAA R: ACGCTCCTGTTTTGTCTCT	(CAA) ₁₂	57°C	174–225	0.02	0.0558***	267	14	4.98
	15096	F: AGT GCG TTG TTT CAA TTT CA R: TAG GCA AAT TTT CTC GCT CT	(GT) ₁₂	57°C	166–192	0.01	0.013	279	17	0.71

	15006	F: AACAAACAGCAACTGCACATC R: ATGCTTGGCACTAATGGTCT	(CAA) ₁₂	57°C	192-207	NA	NA	275	1	2.14
	14331	F: ATCGGAAATCGGATAGGCTG R: TAATGTGAGTTGTGTGGCGG	(GT) ₁₆	57°C	82-134	0.01	0.0452	276	21	1.78
	8995	F: AGT GGA AGA GAA GCC ATA CG R: TAC TTG ACG GAA ACC ATG TG	(GTCT) ₁₄	57°C	226-290	-0.01	-0.0227	280	18	0.36
4	5017	F: ACC GAA GTC GAG ATG GTT GG R: CTT CAC TGG CAC ACG ATG C	(GTT) ₁₀	60°C	207-231	0.03	0.0538	280	14	0.36
	4664	F: ACA TGC ATA CAT ACA AAC AAG TGC R: CCT TTC TGC CCG ACC TCT C	(ACAT) ₉	60°C	134-171	0.04	0.0727	281	18	0.00
	5.2a	F: TTG CAT GTG CCA CCA TAA TC R: TTC ATA CCG ATG AGC CAA ATG	(ATAGT) ₁₁	60°C	182-217	0.05	0.0756	280	9	0.36
	13402	F: TCG TCA TCG TCA TCA TCG R: CTA ATG ATG CCC ATG GTT CT	(CAT)	60°C	163-214	0.09	0.1831***	267	26	4.98
	6477	F: AAT CTC TTC CAG CAT CCA AG R: AGC GGT ACA CTC ACA CGT AA	(CAA) ₁₈	60°C	124-163	0.18	0.3616***	276	13	1.78
	4.3a	F: TGG ATC TAG ACT CTT TGT TTG TCT TC R: ACA GTG CCA TGC TAT GTT GC	(ATTT) ₁₇	60°C	238-322	0.06	0.119***	280	26	0.36
5	14763	F: AGC ATC TGG TAA CAC GAC GG R: TGG CGG CTC TAG AAA GAT TG	(TTG) ₁₄	63°C	146-185	0.01	0.0289*	281	17	0.00
	3.5a	F: CCT AGC CTA CAT TCC ATA TGTGC R: TCA TGT CTA TGT CAA ATG AAC TCG	(AAT) ₁₃	63°C	149-182	0.04	0.0932*	269	11	4.27
	9918R2	F: GTC TTT CTG TGC CGA TGT CTG R: GGA CGG GCC GAC CTA TCT	(ATCT) ₇	63°C	226-254	-0.01	-0.0261	281	9	0.00
	2287F1R1	F: AGG TCG AAT AGC AAT AAC AACAA R: GGC GTG GAG GTA AGA GTC AA	(ACA) ₁₂	63°C	89-122	0.00	0.0021	279	14	0.71
	9865	F: TCA GGG TTA GGG TTC CTC CT R: TTT GAC ACA GCG TGA CGT TT	(GTT) ₇	63°C	202-208	0.22	0.5104***	268	6	4.63

Se ha estimado la diversidad genética entre las 5 localidades de muestreo, los resultados muestran que la Isla del Barón presentó el mayor número medio de alelos (12.95), mientras que Pueblo Cálido mostró el valor más bajo (9.71). Los valores de riqueza alélica estandarizada (A_r) fueron bastante consistentes entre los sitios de muestreo, oscilando entre 9.58 (Isla del Barón) y 9.93 (Pedruchillo-Galán). El número de alelos privados (A_p) fue mayor en la Isla del Barón (con 21 alelos privados), que es también el lugar más muestreado. Sin embargo, cuando se estandarizaron los valores de alelos privados, los valores fueron notablemente similares entre los sitios de muestreo, oscilando entre 0.45 (Isla del Barón) y 0.60 (Isla Perdiguera). La heterocigosidad observada (H_o) y la esperada (H_e) oscilaron entre 0.689 y 0.727 y entre 0.716 y 0.737, respectivamente (Tabla 8). En general, el número de alelos y los valores de heterocigosidad fueron muy homogéneos entre los sitios de muestreo.

Tabla 8. Estima de la diversidad genética de las 5 localidades muestreadas con *Pinna nobilis*. n: número de individuos muestreados; A: número total de alelos por sitio de muestreo; N_A : número medio de alelos; A_p : número de alelos privados; A_r : riqueza alélica estandarizada; A_{pr} : riqueza alélica privada estandarizada; H_o : heterocigosidad observada; H_e : heterocigosidad esperada; F_{IS} : coeficiente de endogamia. * $p < 0.05$.

Localidades	n	A	N_A	A_r	A_p	A_{pr}	H_o	H_e	F_{IS}
El Pedrucho	51	240	11.43	9.79	8	0.59	0.722	0.736	0.02*
Isla del Barón	114	272	12.95	9.58	21	0.45	0.708	0.733	0.04*
Isla Perdiguera	29	206	9.81	9.78	6	0.6	0.693	0.716	0.03
Pedruchillo-Galán	58	242	11.52	9.93	8	0.55	0.727	0.737	0.05*
Pueblo Cálido	32	204	9.71	9.75	5	0.36	0.689	0.720	0.05
Media	57	233	11.1	9.77	9.60	0.51	0.708	0.729	0.04

El análisis de coordenadas principales (PCoA) de los datos individuales no mostró ninguna estructura poblacional distintiva, los individuos de todas las localidades no mostraron ninguna agrupación concreta (Figura 33A). No obstante, al considerar los lugares de muestreo, los individuos de Isla del Barón y El Pedrucho eran más parecidos entre sí que a los de los otros tres lugares de muestreo (Figura 33B).

La diferenciación genética por pares entre los lugares de muestreo, estimada mediante el índice F_{ST} , fue coherente con los resultados de la Figura 33A, y no reveló ninguna diferenciación significativa entre los lugares de muestreo (antes y después de la corrección FDR). En general, los valores de F_{ST} fueron bajos, variando entre -0.0014 y 0.0015 (

Tabla 9).

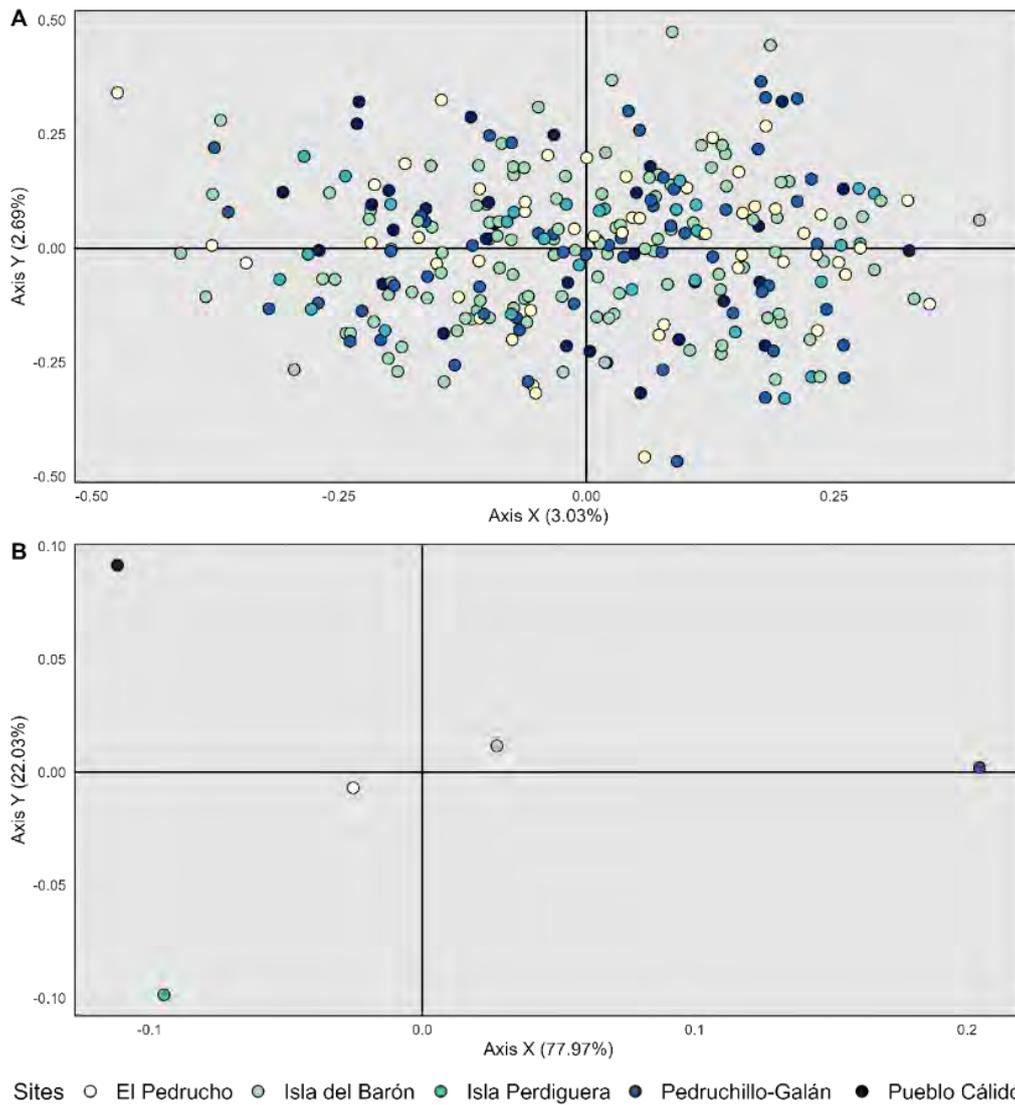


Figura 33. Análisis de componentes principales A) sobre los 284 individuos de *Pinna nobilis* del Mar Menor procedentes de 5 localidades de muestreo. B) sobre los cinco sitios de muestreo analizados con marcadores microsatélites.

Tabla 9. Estimaciones por pares de F_{ST} entre las 5 localidades muestreadas con *P. nobilis* vivas en la laguna del Mar Menor. Ninguno de los valores fue significativo.

	Isla del Barón	El Pedrucho	Pedruchillo-Galán	Pueblo Cálido
El Pedrucho	-0.0005			
Pedruchillo-Galán	0.0002	0		
Isla Perdiguera	-0.0005	0.0015	-0.0014	
Pueblo Cálido	0	-0.001	0.0006	-0.0003

4.1.8. Evaluación del impacto del procedimiento de extracción de muestras en la supervivencia de ejemplares

Para evaluar si el procedimiento de extracción de muestras de manto (biopsias) causaban mortalidad adicional en los individuos de *P. nobilis*, se realizó el seguimiento de un total

de 193 individuos hasta 2023, de los cuales 99 se habían biopsiado entre 2019 y 2021, y 94 de ellos no han sido biopsiados. Los ejemplares están distribuidos entre las cinco localidades de muestreo, y representan un tercio de los individuos totales muestreados.

Los resultados del seguimiento mostraron que en términos generales entre las cinco localidades no se encontraron diferencias en términos de mortalidad asociada al procedimiento en el periodo de estudio. En el caso de los individuos biopsiados el $30 \pm 4,6\%$ de los ejemplares han muerto en este periodo, frente al $39 \pm 13,5\%$ de ejemplares muertos en el periodo en el caso de las nacras no biopsiadas (Figura 34).

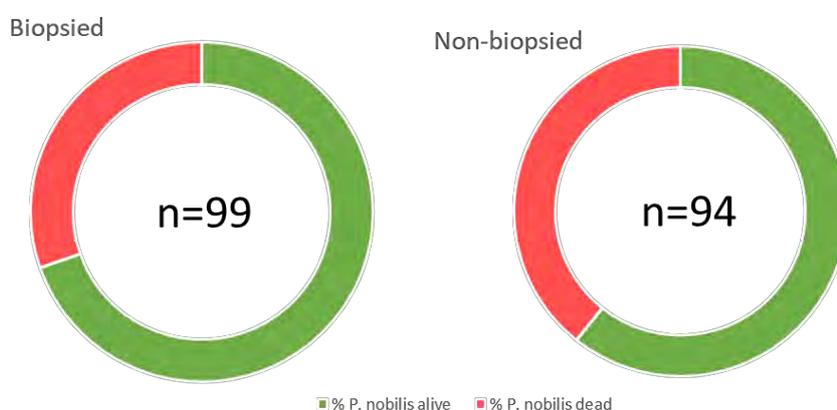


Figura 34. Seguimiento del impacto del procedimiento de extracción de muestras de manto (biopsia) en ejemplares de *Pinna nobilis* entre 2019-2022.

4.2. Determinación de la viabilidad de recuperación de la población

4.2.1. Demografía

Se ha realizado el seguimiento de 172 ejemplares de *P. nobilis* para todos los sitios monitorizados distribuidos en distintas parcelas, concretamente se han monitorizado 55 individuos en Isla del Barón, 24 en Pueblo Cálido, 32 en El Pedrucho, 50 en Pedruchillo-Galán y 11 en Isla Perdiguera. Para todos los sitios se ha hecho un seguimiento de los individuos pasados 152-156 días (T0-T1), 232-239 días (T1-T2) y 386-393 días (T0-T2). A lo largo de los tres periodos de seguimiento, el análisis de resultados del seguimiento demográfico de la población muestra elevadas mortalidades en 4 de las 5 localidades, las tasas de mortalidad medias por sitio fueron siempre positivas, variando entre 0.12 y 0.14 en El Pedrucho, entre 0.08 y 0.14 en Isla del Barón, entre 0.04 y 0.20 en Pedruchillo-Galán y entre 0.06 y 0.17 en Pueblo Cálido. Además, no se observó reclutamiento en ninguno de los sitios monitorizados obteniendo tasas de reclutamiento de 0 para cada sitio y periodo. En consecuencia, la tasa de crecimiento neto de la población para cada sitio fue negativa, variando desde -0.06 (Pueblo Cálido, T1-T2) hasta -0.20 (Pedruchillo-

Galán, T0-T1) (Figura 35). A diferencia del resto de localidades, la Isla Perdiguera no mostró crecimiento al no presentar mortalidades ni reclutamiento.

A nivel de metapoblación (considerando los 172 individuos independientemente del sitio), a tiempo T0 la población monitorizada estaba formada por 172 individuos vivos, en el siguiente periodo quedaban 162 individuos y en el último periodo 153 individuos permanecían vivos. Estos valores reflejan un porcentaje de mortalidad entre T0 y T2 del 11.05%. Respecto las tasas demográficas de la población, ésta presenta tasas de mortalidad positivas con valores de 0.14 (T0-T1), 0.09 (T1-T2) y 0.11 (T0-T2), reclutamiento cero y tasas de crecimiento negativo con valores de -0.14 (T0-T1), -0.09 (T1-T2) y -0.11 (T0-T2).

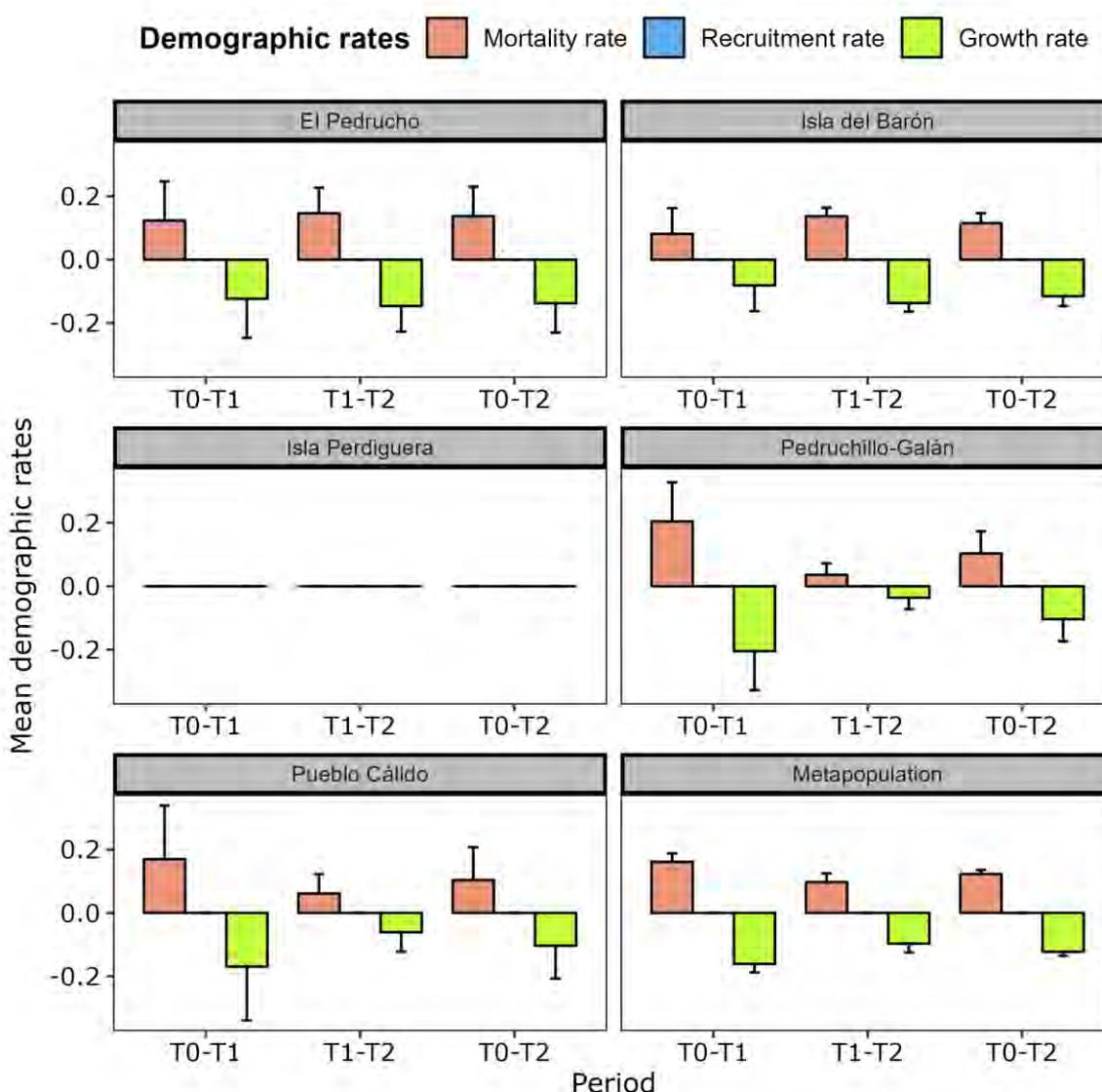


Figura 35. Promedio de tasas demográficas (año⁻¹) por localidad y para el conjunto de la población de la laguna del Mar Menor durante el periodo 2021-2022: tasa de mortalidad anual, tasa de reclutamiento anual y tasa de crecimiento neto

de la población. Tiempo total de monitoreo: 393 días. Tiempo entre visitas: T0-T1: 152-256 días, T1-T2: 232-239 días y T2-T3: 386-393 días.

4.2.2. Análisis de viabilidad poblacional

El análisis de viabilidad poblacional llevado a cabo en la población del Mar Menor se ha realizado por un lado considerando las condiciones biológicas actuales, Escenario 1 (9 años de esperanza de vida y 99% de mortalidad de juveniles), y con las condiciones ambientales actuales donde se producen eventos de eutrofización, eventos de tormentas fuertes (DANA) e impacto por fondeo de embarcaciones. Para este escenario los resultados indican que para cada población analizada y la metapoblación hay una probabilidad de extinción del 100% con un tiempo medio hasta la extinción de **7 años** (Figura 36).

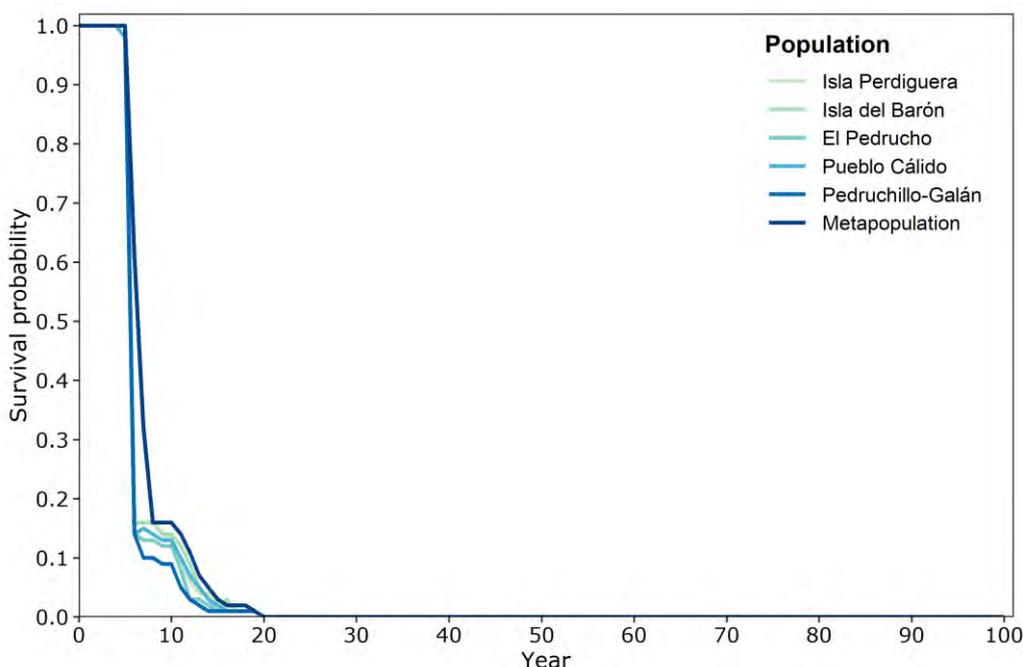


Figura 36. Probabilidad de supervivencia de cada población y metapoblación en las condiciones actuales (Escenario 1).

A continuación, la simulación se ha realizado considerando las mismas condiciones biológicas y ambientales que las anteriores, pero realizando una suplementación a la población añadiendo 100 individuos durante 1, 5 y 10 años, Escenario 2. En este caso la probabilidad de supervivencia aumenta ligeramente, pero sigue alcanzado una probabilidad de extinción del 100% con un tiempo medio hasta la extinción de **7 años** (Figura 37).

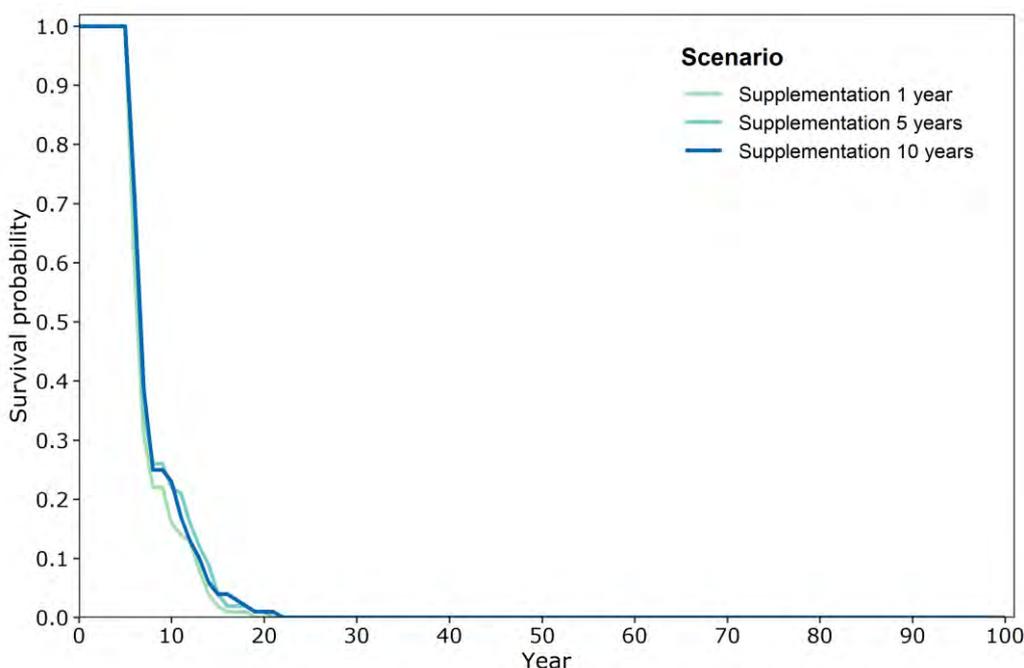


Figura 37. Probabilidad de supervivencia de la metapoblación añadiendo 100 individuos durante 1, 5 y 10 años (Escenario 2).

También se han realizado análisis de viabilidad poblacional según los 5 distintos escenarios propuestos en los que se han variado los parámetros biológicos y ambientales (5 escenarios), y muestran diferentes resultados en la probabilidad de supervivencia, el año de extinción y el censo poblacional. Así los parámetros biológicos que se han considerado han sido la tasa de mortalidad larvaria (actual del 99% y en condiciones observadas en AMP del 90%) y la esperanza de vida de los ejemplares (actual de 9 años, 15 y 30 años).

En el primer escenario (All catastrophes) se considera que siguen ocurriendo todas las catástrofes ambientales actuales y se simula lo que le ocurriría a la población si tuvieran una esperanza de vida de 9, 15 o 30 años, y un porcentaje de mortalidad larvaria del 90% o 99%. Bajo estas condiciones en ninguno de estos escenarios la probabilidad de supervivencia es 1 (Figura 38), la población se extinguiría a corto plazo (Figura 39) y el censo poblacional no aumenta (Figura 40).

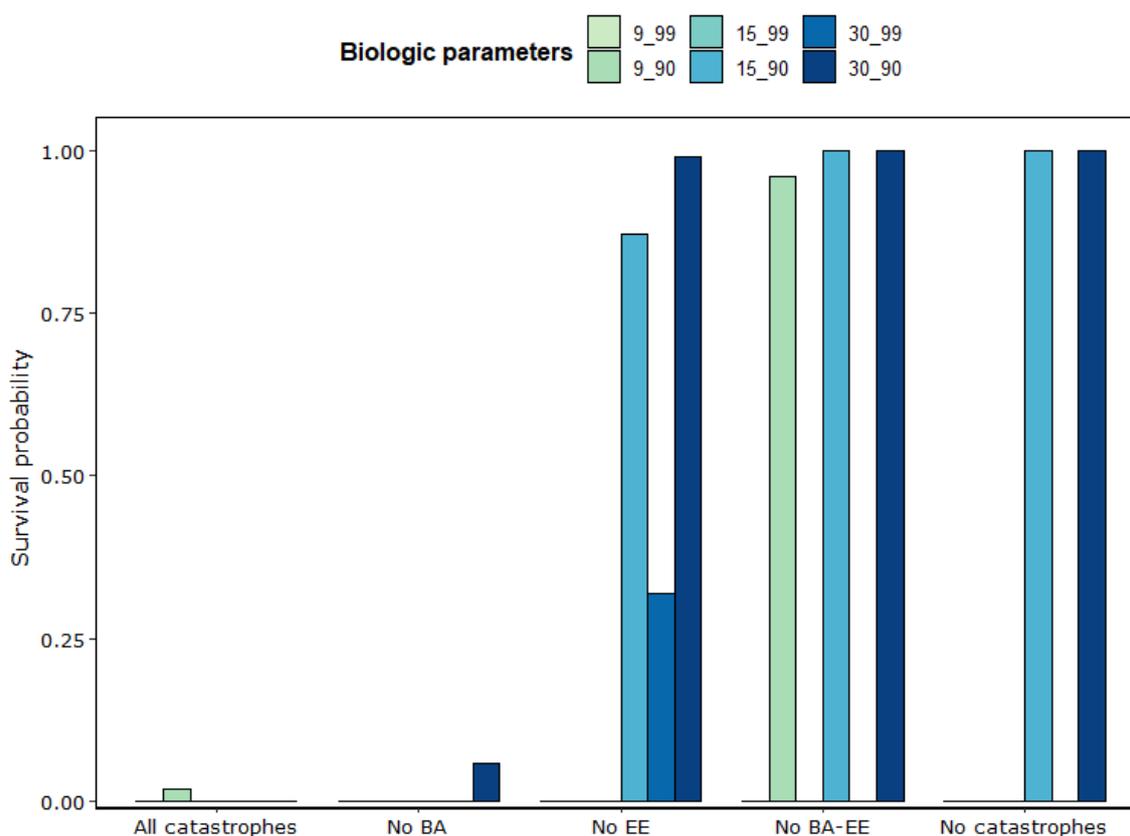


Figura 38. Probabilidad de supervivencia de la metapoblación en función de las condiciones biológicas y ambientales. Tasa de mortalidad larvaria del 99% (colores más claros) y 90% (colores oscuros). Esperanza de vida: 9 (verde claro y verde medio), 15 (turquesa y azul claro) y 30 años (azules oscuros). Catastrophes: catástrofes, BA: boat anchoring (fondeo embarcaciones) y EE: eutrophic events (eventos eutróficos).

En el segundo escenario (No BA) se elimina el impacto por el fondeo y se sigue simulando lo que le ocurriría a la población con una esperanza de vida de 9, 15 o 30 años, y un porcentaje de mortalidad larvaria del 90% o 99%. En estos escenarios, los resultados muestran que la probabilidad de supervivencia sigue siendo baja o cero (Figura 38), el año de extinción aumenta ligeramente con respecto al escenario anterior (Figura 39), pero el censo poblacional sigue sin aumentar (Figura 40).

En la tercera simulación (No EE), teniendo en cuenta un escenario sin el impacto producido por los eventos de eutrofización vemos que la probabilidad de supervivencia de la población aumenta siempre y cuando la esperanza de vida sea de mínimo 15 años y la mortalidad larvaria sea como máximo del 90% (Figura 38). Bajo estas condiciones la población no se extinguiría (Figura 39) y el censo poblacional aumentaría sobre todo con una esperanza de vida de mínimo 30 años (Figura 40).

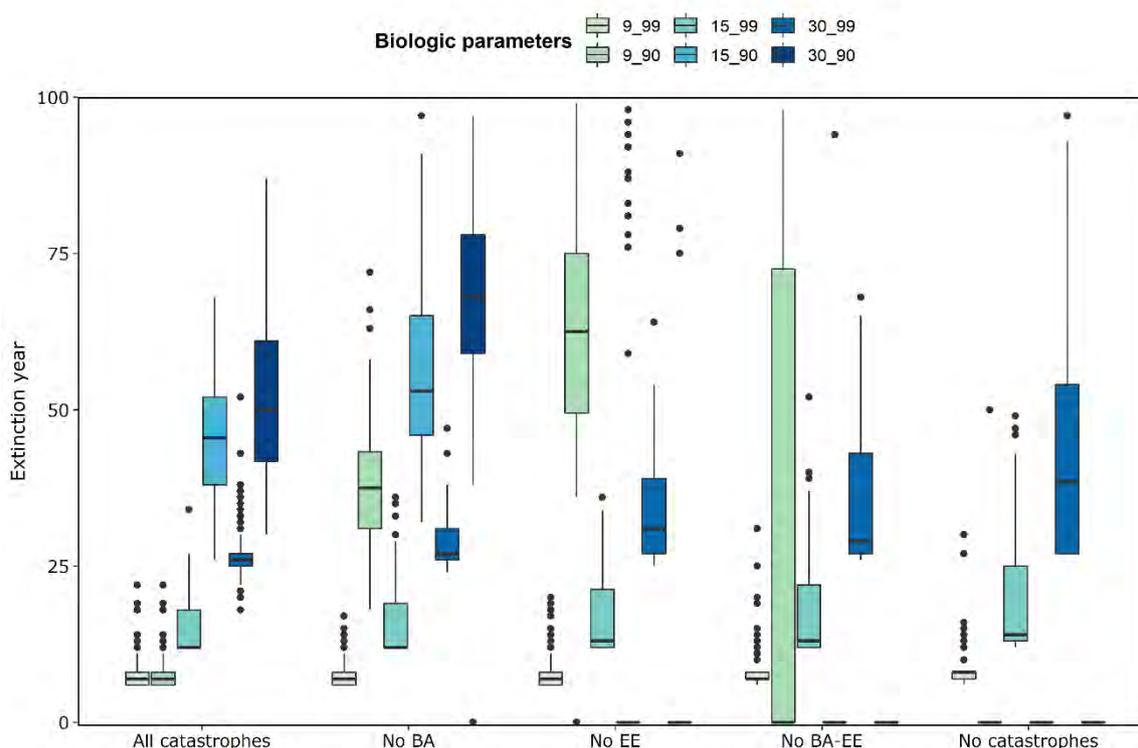


Figura 39. Año de extinción medio de la metapoblación en función de las condiciones biológicas y ambientales. Tasa de mortalidad larvaria del 99% (colores más claros) y 90% (colores oscuros). Esperanza de vida: 9 (verde claro y verde medio), 15 (turquesa y azul claro) y 30 años (azules oscuros). Catastrophes: catástrofes, BA: boat anchoring (fondeo embarcaciones) y EE: eutrophic events (eventos eutróficos).

En la cuarta simulación (No BA-EE), se elimina el impacto por fondeo y los eventos de eutrofización y se sigue simulando lo que le ocurriría a la población con una esperanza de vida de 9, 15 o 30 años, y un porcentaje de mortalidad larvaria del 90% o 99%. Los resultados de esta simulación muestran que el porcentaje de mortalidad larvaria es clave para la supervivencia de la población. Bajo estas condiciones la población tendría mayores probabilidades de supervivencia con esperanza de vida de mínimo 9 años, pero siempre con mortalidades larvarias inferiores al 90% (Figura 38). El año de extinción disminuiría en estos casos (Figura 39); y habría un aumento en el tamaño poblacional sobre todo si la esperanza de vida fuera de mínimo 15 años (Figura 40).

Por último, considerando una población libre de impactos (No catastrophes) se observa que la probabilidad de supervivencia será de 1 solo en los casos que la esperanza de vida sea de 15 años como mínimo y la mortalidad del 90% como máximo (Figura 38). Bajo estas condiciones la población nunca se extinguiría (Figura 39) y habría un aumento considerable del tamaño de la población alcanzando de media más de 30,000 individuos en 100 años (Figura 40).

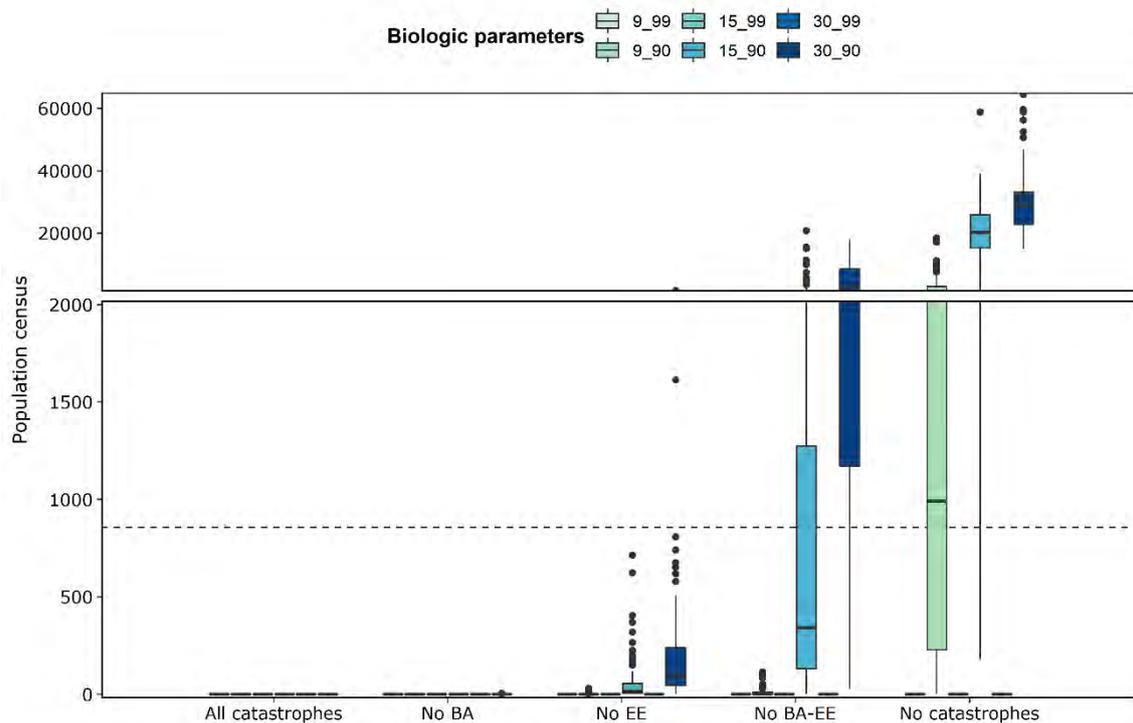


Figura 40. Censo poblacional de la metapoblación de la laguna del Mar Menor en función de las condiciones biológicas y ambientales. Tasa de mortalidad larvaria del 99% (colores más claros) y 90% (colores oscuros). Esperanza de vida: 9 (verde claro y verde medio), 15 (turquesa y azul claro) y 30 años (azules oscuros). Catastrophes: catástrofes, BA: boat anchoring (fondeo embarcaciones) y EE: eutrophic events (eventos eutróficos).

De manera adicional se ha explorado mediante simulaciones como variaría el tamaño de la población en 100, 200, 500 y 1000 años considerando por un lado que no hay impactos por fondeo ni eventos de eutrofización, y, por otro lado, sin ninguna catástrofe ambiental (Figura 41). En el primer caso se ve como la población aumenta en los primeros 100 años hasta alcanzar un tamaño de entre 5,000 y 10,000 individuos que se mantiene estable hasta los 10000 años simulados (Figura 41A). En el segundo caso, considerando una población ideal, sin catástrofes, la simulación mostró que el tamaño de la población en 100 años aumenta hasta valores de más de 32,000 individuos, y que a lo largo de los años puede llegar hasta valores de casi 40,000 individuos al cabo de 1,000 años (Figura 41B).

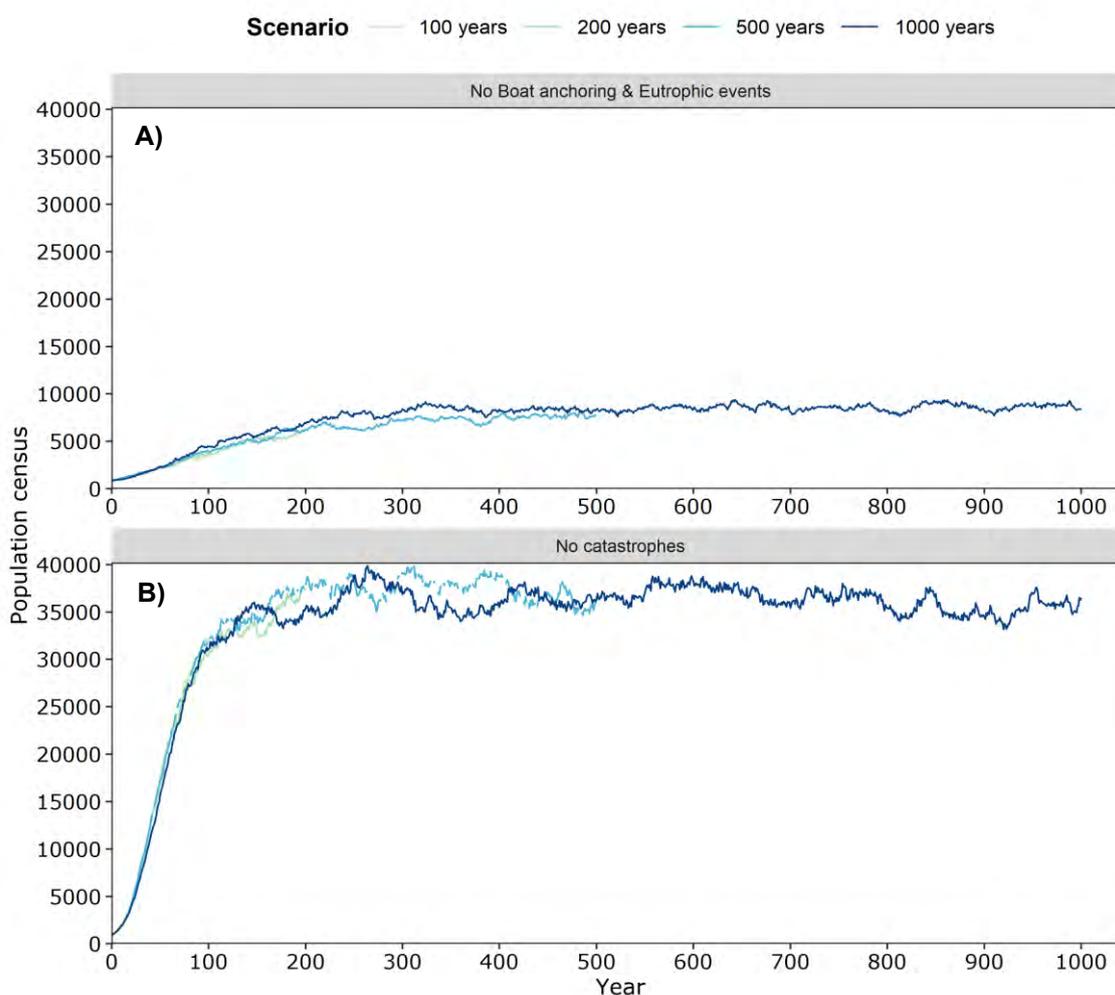


Figura 41. Evolución del censo poblacional de la población a 100, 200, 500 y 1000 años. A) Eliminado el impacto por fondeo y eventos de eutrofización. B) eliminando todas las catástrofes.

5. Discusión

5.1. Evaluación del estado de conservación de la población

5.1.1. Evolución de la población de *P. nobilis* desde 2014 al 2019

El estudio previo llevado a cabo los años 2014 y 2017, demostró como una población ampliamente distribuida y estable con estimaciones de densidad de entre $1,825,543 \pm 109,619$ y $1,609,943 \pm 3,309$ individuos en 2013- 2014 (Giménez-Casaldueiro et al. 2020) sufrió un fuerte declive en un periodo de 3 años (Nebot-Colomer et al. 2022).

En **2014** la población de *P. nobilis* se encontraba distribuida por toda la laguna y presentaba individuos de todas las clases de tallas y edades (Nebot-Colomer et al. 2022). Las densidades máximas previas registradas en 2014 se encontraban en zonas cercanas a los canales que conectan la laguna con el Mar Mediterráneo, observándose valores de densidad similares a los registrados en áreas marinas protegidas del Mediterráneo

(Deudero et al. 2015). Estos valores ponen de relieve la importancia de los canales de El Estacio y Encañizadas como las principales vías de entrada en el proceso de colonización de *P. nobilis* desde el Mediterráneo a la laguna (Giménez-Casalduero et al. 2020). En (Nebot-Colomer et al. 2022), se contempla la posibilidad de que la población de *P. nobilis* de la laguna del Mar Menor se haya sustentado mayoritariamente gracias a las aportaciones larvarias que llegarían desde el área marina protegida de Isla Grosa, área que presentaba la mayor densidad de población de *P. nobilis* registrada en la región (30 individuos por 100 m²; (Moreno et al 2017). Los valores de densidad media registrados en 2014 (Nebot-Colomer et al. 2022) fueron bajos comparándolos con otros estudios llevados a cabo en otras lagunas cuya metodología de muestreo es diferente y no comparable. Sin embargo, estos valores son similares a los encontrados en otros estudios llevados a cabo en praderas de *Posidonia oceanica*, hábitat prioritario de la especie (Coppa et al. 2010, Hendriks et al. 2013b, Vázquez-Luis et al. 2014, Deudero et al. 2015). En estos estudios, los autores describieron la falta de impactos por fondeo de embarcaciones y el nivel de protección de la zona como los principales factores que influyen en las densidades de población de *P. nobilis*. En la laguna del Mar Menor se realizan multitud de actividades y se congregan una amplia variedad de impactos antrópicos (pesca artesanal intensiva, impacto por embarcaciones de recreo, recolección ilegal, etc.) provocando posiblemente a su vez una disminución de las densidades de *P. nobilis* en la laguna (Nebot-Colomer et al. 2022).

Por otro lado, la disminución en la densidad, distribución y estructura de tallas observada en **2017** se produjo como resultado de un evento de eutrofización grave (Nebot-Colomer et al. 2022). A mitad de 2015, tras décadas de aportes de nutrientes y fitosanitarios procedentes de las actividades agrícolas cercanas, la laguna empezó a sufrir un colapso medioambiental experimentando floraciones masivas de algas nocivas que provocaron un grave evento de eutrofización en la primavera de 2016 (Pérez-Ruzafa et al. 2019, Ruíz et al. 2020, Mercado et al. 2021). La alta concentración de fitoplancton impedía que la luz llegara a las zonas más profundas de la laguna, limitando la fotosíntesis en estas zonas (CACMM 2017). Como consecuencia, la vegetación por debajo del nuevo umbral fótico murió, y la materia orgánica que se acumuló en el fondo causó hipoxia. La ausencia de oxígeno provocó la muerte de la mayoría de las comunidades faunísticas que se encontraban más allá de los 2.5-3 m de profundidad, incluyendo la mayoría de los individuos de *P. nobilis* (Giménez-Casalduero et al. 2020, Nebot-Colomer et al. 2022).

Tras este evento la laguna mostró signos leves de recuperación de su estado ecosistémico (Pérez-Ruzafa et al. 2019), éste podría haber aumentado las posibilidades

de recuperación de *P. nobilis* a corto plazo, pero dicha recuperación no se mantuvo a largo plazo (Ruíz et al. 2020, Mercado et al. 2021) afectando así otra vez al estado de conservación de la especie en la laguna. En el verano de 2019 se produjo otro pico de clorofila *a* y turbidez (Ruíz et al. 2020), y en septiembre de 2019 se produjo un evento de lluvias extremas, un importante fenómeno meteorológico característico de la costa mediterránea española conocido coloquialmente como "gota fría", que consiste en un sistema de baja presión o depresión en los niveles altos de la atmósfera (DANA), que puede dar lugar a lluvias fuertes e inundaciones (Ruíz et al. 2020) (Figura 17A). Dicho evento, provocó una entrada masiva de agua dulce, materia orgánica, sedimentos y nutrientes a la laguna (Ruíz et al. 2020). En consecuencia, la salinidad descendió casi 14 unidades, de 46.1 a 33.9 (Figura 32) a una profundidad de 3-4 m, y el oxígeno se agotó en las zonas más profundas durante 3 semanas consecutivas (Ruíz et al. 2020).

5.1.2. Evolución del estado de conservación de la población de *P. nobilis* 2019-2022

Con la puesta en marcha de esta subacción (C1.1), en noviembre de 2019 se llevó a cabo la primera campaña del proyecto con intención de comparar las densidades y estructura de tallas de la población de *P. nobilis* respecto las obtenidos en 2014 y 2017, así como evaluar si la población se había recuperado del evento de eutrofización y valorar como se había visto afectada por la DANA sufrida en septiembre de 2019. Los resultados obtenidos muestran como la abundancia total de *P. nobilis* aumentó ligeramente al encontrar nuevos sitios con individuos vivos, registrándose valores de densidad media ligeramente superiores a 2017, aunque dichos valores seguían siendo muy bajos comparados con otras poblaciones de nacra en otras lagunas (Peyran et al. 2022b). Respecto la distribución espacial y batimétrica, los resultados mostraron la presencia de individuos de *P. nobilis* solo en 4 sitios poniendo de manifiesto la total desaparición de individuos por debajo de los 3 m de profundidad. Dicha distribución espacial y batimétrica pudo verse afectada por el impacto producido por el evento de gota fría o DANA. Por un lado, la anoxia sufrida en cotas por debajo de los 3 m pudo haber afectado a los pocos individuos que seguían habitando en esas profundidades en 2017, y por otro, se sospecha que algunos individuos habitaban en sitios poco profundos en la cubeta norte y oeste de la laguna, pudieron haber sido enterrados como resultado de la cantidad de agua y sedimentos transportados a través de los cursos de agua en septiembre de 2019 (*observación personal*).

Cabe destacar que las lluvias torrenciales causaron un descenso de casi 14 unidades en la salinidad, alcanzando valores medios tan bajos como 33.9 en los primeros cuatro

metros de profundidad (Ruíz et al. 2020, Nebot-Colomer et al. 2022) y de 38.96 para toda la columna de agua. Dicho descenso en la salinidad probablemente facilitara a su vez la entrada del patógeno *H. pinnae* en la laguna. En los días siguientes, la laguna experimentó una rápida recuperación de los valores de salinidad, alcanzando valores de hasta 38.2 (0-4 m, Ruiz et al. 2021) y de 39.21 (para toda la columna de agua), que no fueron lo suficientemente altos para evitar la intrusión del patógeno, cuyo límite superior de viabilidad se ha estimado en 39.7 (Cabanellas-Reboredo et al. 2019). Estas condiciones ambientales óptimas para el patógeno se mantuvieron hasta mediados de octubre, permitiendo así su intrusión y propagación, afectando primero y con mayor prevalencia a los individuos más cercanos a los canales de conexión con el Mar Mediterráneo, seguidos por los individuos de Isla del Barón e Isla Perdiguera. Otros tres eventos extremos de precipitación ocurrieron en diciembre de 2019, enero de 2020 y marzo de 2020 (Ruíz et al. 2020), contribuyendo a mantener los efectos del primer evento pluviométrico hasta junio de 2020. Debido a estos eventos se mantuvieron casi 5 meses las condiciones óptimas de salinidad (<39.7) y temperatura para *H. pinnae*. Estas condiciones podrían haber facilitado su propagación e infección, resultando en un aumento del porcentaje de individuos de *P. nobilis* muertos en estos sitios ya infectados en noviembre de 2019. Además, es importante señalar que los valores medios de salinidad reportados en este estudio podrían no reflejar la variabilidad local y que los patrones de salinidad en Pueblo Cálido, la localidad más cercana a los canales de entrada, podrían diferir de la media de la laguna. De hecho, según Ruíz et al. (2020), Pueblo Cálido experimenta fuertes gradientes de salinidad debido a su proximidad al canal de El Estacio, que es una de las principales vías de entrada del mar Mediterráneo. Por tanto, es razonable pensar que estos individuos podrían haber sufrido una continua exposición a *H. pinnae* antes del periodo de muestreo y después de los eventos de gota fría extremos.

En consecuencia, la acumulación de impactos provocada por ambas catástrofes ambientales ha hecho que la población de nacra de la laguna presente un fuerte declive en su estructura de tallas en 2019 respecto 2014. Durante el muestreo no se observaron individuos con una anchura máxima inferior a 10 cm o superior a 21.9 cm, resultado que remarca la inestabilidad de la población. La falta de individuos juveniles de *P. nobilis* podría deberse a la presencia de depredadores naturales, como *Hexaplex trunculus*, una especie comúnmente encontrada en altas densidades en la laguna durante los muestreos del presente proyecto -tanto en el medio como en los DAL- y también observado por otros autores (Sandonnini et al. 2021a). *H. trunculus* es un molusco conocido por depredar

juveniles de *P. nobilis* en las Islas Columbretes (Kersting & García-March 2017) y en el Parque Nacional de Cabrera (*observación personal*). Cabe destacar que la falta de ejemplares de talla pequeña puede señalar una falta de éxito reproductivo de la población en la laguna, con importantes consecuencias para la conservación de la especie en este entorno. Por otro lado, la falta de individuos grandes de *P. nobilis* podría deberse a la presencia de contaminantes químicos en la laguna del Mar Menor, que podrían limitar su esperanza de vida, como sugieren (García-March et al. 2020, Prado et al. 2021). Dicha falta de individuos adultos a su vez incide negativamente en la capacidad reproductora de la población como refleja la edad estimada de los individuos encontrados basándonos en la ecuación de crecimiento propuesta por (García-March et al. 2019), donde se espera que los pocos individuos encontrados en 2019 fueran jóvenes con una edad estimada de 2.5 años, y en su mayoría con maduración gonadal masculina (Deudero et al. 2017).

En conclusión, el impacto conjunto del evento de eutrofización y la DANA de 2019 afectaron muy negativamente a la población de nacra presente en la laguna del Mar Menor. La población evaluada en 2019 presentaba grandes deficiencias en términos de indicadores poblacionales como densidad, distribución y estructura de tallas, resultados que demostraban la vulnerabilidad de la población y un posible riesgo de extinción.

A lo largo del proyecto desde 2019 hasta 2022 se ha monitorizado la población de *P. nobilis* de la laguna del Mar Menor. Se ha evaluado la evolución de la infección por *H. pinnae*, sus densidades, su estructura de tallas y además se ha evaluado su capacidad y éxito reproductivo.

Respecto la **infección por *H. pinnae*** observada en noviembre de 2019. Los análisis moleculares realizados en junio de 2020 revelaron la recuperación de tres individuos que habían sido infectados previamente, lo cual es de gran importancia para la conservación de *P. nobilis*. Según los datos consultados, los valores de salinidad estaban en el límite del rango de infección de *H. pinnae* durante los días de muestreo (19 y 24 de junio), oscilando entre 38.92 (8 días antes) a 39.94 (3 días después) para toda la columna de agua. Es importante señalar que los valores de salinidad podrían haber sido incluso más bajos en Pueblo Cálido teniendo en cuenta los fuertes gradientes de salinidad que este sitio experimenta (Ruíz et al. 2020). Por lo tanto, otros factores como la interacción y los efectos sinérgicos entre los factores ambientales adversos y el parásito podrían explicar la recuperación de estos individuos.

Los resultados del monitoreo de **densidades y estructura de tallas** realizado en Pueblo Cálido e Isla del Barón demuestran como la población ha podido mantener valores de

densidad similares a lo largo de los años desde 2019 y se observa un crecimiento positivo con relación a la talla (anchura) de los individuos vivos de la laguna. Sin embargo, se siguen detectando deficiencias en las clases de tallas observadas. Los individuos han crecido hasta 3 cm desde 2019 a 2022, mejorando posiblemente el porcentaje de hembras, aumentando así su capacidad reproductora. No obstante, durante los censos y búsquedas *in situ* no se ha detectado ningún individuo menor de 9 cm de anchura, resultado que indica ausencia completa de reclutamiento en este periodo. Este dato hace pensar en algún problema en la detección de reclutas, y en la capacidad y/o éxito reproductivo de la especie en la laguna. No obstante, el equipo de trabajo ha realizado numerosos muestreos de *P. nobilis* durante más de una década y aunque la capacidad de detectar reclutas es inferior a la detección de adultos (Hendriks et al. 2012), siempre se han observado reclutas en los muestreos, y dado que se han realizado el mismo tipo de muestreo en la laguna, este resultado parece reflejar una deficiencia en el reclutamiento. Patrones y deficiencias similares se han observado en otras poblaciones remanentes de *P. nobilis* en el Mar Mediterráneo. Por ejemplo, en 2020 la población de nacra del lago de Faro en Sicilia presentaba 31 individuos vivos con un rango de anchuras y deficiencias similares a las observadas en la laguna del Mar Menor (11.5-22 cm, (Donato et al. 2021).

Respecto la **detección de reclutas en el medio**, en varios sitios de muestreo de las lagunas de Thau y Leucate en Francia se ha observado una amplia gama de clases de tallas de diferentes longitudes totales formada por juveniles e individuos adultos (Peyran et al. 2022b). Sin embargo, los autores solo pudieron detectar dos reclutas de *P. nobilis*, considerados como individuos menores de 6 cm de longitud. Entre las posibles explicaciones por la falta de reclutas en dichas lagunas, los autores recalcan que las densas praderas marinas podrían dificultar la visualización de éstos (Peyran et al. 2022b). Esta dificultad no es anecdótica, ha ocurrido comúnmente en otros estudios (Rabaoui et al. 2010, Basso et al. 2015). En cuanto a nuestros resultados, la falta de observaciones de reclutas también podría estar asociada a la dificultad de detectarlos dentro de las densas praderas de *Caulerpa prolifera* que cubren el sustrato del Mar (Ruíz et al. 2020). Sin embargo, la falta de reclutamiento observado en los colectores larvarios desacredita esta opción y apoya la hipótesis de la falta de reclutamiento larvario por problemas en la capacidad y/o éxito reproductivo de la especie.

Respecto a la **capacidad reproductiva** de la especie a **nivel del mar Mediterráneo**, los EMM han provocado una falta de reclutamiento generalizada de la especie en la cuenca occidental (Kersting et al. 2020). Dichos EMM han diezmando importantes poblaciones que

quizás actuaban como población fuente en la laguna del Mar Menor. Por ejemplo, antes del EMM una densa población de *P. nobilis* habitaba en el área especial de conservación de Isla Grosa (30 individuos por 100 m²; Moreno et al 2017), isla cercana al canal del Estacio, canal principal que conecta la laguna del Mar Menor con el mar Mediterráneo. Probablemente, esta población actuaba como fuente de larvas para la laguna (Nebot-Colomer et al. 2022); por tanto, su desaparición total como la de otras poblaciones que quizás actuaban como poblaciones fuente, puede haber afectado al reclutamiento del Mar Menor. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis sería necesario llevar a cabo más estudios hidrodinámicos y genéticos para entender los patrones de conectividad de las poblaciones extintas del mar Mediterráneo con la población remanente de la laguna del Mar Menor.

Por otro lado, respecto la **capacidad de auto reclutamiento** dentro de la laguna, según nuestros resultados, se espera que en la laguna del Mar Menor vivan cientos de individuos reproductivamente activos. Basándonos en la anchura mínima de valva observada en individuos reproductivamente activos (13.8 cm), al menos el 48.94%, 71.95%, 83.62% y 93.94% de todos los individuos vivos medidos cada año (2019-2022) fueron probablemente capaces de reproducirse. Sin embargo, a pesar de estos porcentajes tan elevados, no se han detectado reclutas de *P. nobilis in situ* ni en ninguno de los colectores larvarios instalados tanto dentro como fuera de la laguna del Mar Menor durante estos años.

La **viabilidad de los dispositivos de asentamiento larvario** instalados no se cuestiona en el presente estudio, ya que el diseño del colector larvario instalado seguía las mismas o similares características que otros colectores larvarios exitosos (Cabanellas-Reboredo et al. 2009, Kersting & García-March 2017). Además, otras especies de moluscos similares han sido capaces de reclutar en ellos, como *O. stentina* y *P. rudis*, apoyando así su eficacia. En consecuencia, otros factores bióticos y/o abióticas de la laguna podrían estar afectando el éxito reproductivo de la especie.

Se ha corroborado que las duras condiciones de los hábitats cerrados o semicerrados como es la laguna del Mar Menor y el Delta del Ebro pueden acortar la esperanza de vida de estas poblaciones (García-March et al. 2020). Las condiciones más extremas características de estos hábitats podrían explicar por qué el reclutamiento en esos hábitats ha mostrado una alta variabilidad con largos periodos entre eventos de reclutamiento exitosos (Prado et al. 2020) en comparación con mar abierto (Kersting & García-March 2017). Entre los diversos factores bióticos y/o abióticos de la laguna, por

ejemplo, las altas temperaturas que alcanza durante los meses de verano podrían favorecer la mortalidad causada por epibiontes, depredadores y parásitos (Gargouri Ben Abdallah et al. 2013) así como causar hipoxia, variable que se ha visto asociado a una menor presencia de larvas de bivalvos (Thomas et al. 2012), e incluso inducir a una situación de estrés causando la muerte (Hernandis et al. 2023). Sin embargo, la capacidad de auto reclutamiento en este tipo de hábitats con condiciones extremas no se ha visto completamente afectada. Afortunadamente, todavía se observan eventos de reclutamiento dentro de esos hábitats, como es en las lagunas de Francia y Delta del Ebro (Prado et al. 2020, Peyran et al. 2022b), incluso después de que los EMMs hayan extinguido cualquier población en mar abierto que pudiera actuar como fuente larvaria. Esto indica que en esos ambientes se produce auto reclutamiento y plantea la cuestión sobre la ausencia de éste en la laguna del Mar Menor, aunque cabe mencionar que se ha observado en dos ocasiones de manera completamente anecdótica, en 2017 (Kersting & García-March 2017) y en abril de 2021 (<https://www.laverdad.es/lospiesenlatierra/noticias/nace-nacra-20210409181525-nt.html>). En este sentido, es difícil analizar esta cuestión sin tener en cuenta el conjunto de catástrofes ambientales que han afectado a la laguna y el actual proceso de eutrofización. Esta circunstancia podría estar agravando los ya de por sí elevados estresores naturales de estos hábitats cerrados y reducir el éxito reproductivo de *P. nobilis*, afectando tanto al bienestar de los adultos reproductores como al éxito larvario.

Basado en estudios realizados en condiciones previas al EMM, *P. nobilis* se caracterizaba por presentar una fase larvaria plantónica. Durante la época de reproducción (junio y agosto; (De Gaulejac et al. 1995), después de producirse un cambio en la temperatura del agua (Deudero et al. 2017), los ejemplares adultos emiten gametos femeninos y masculinos en la columna de agua. Tras la fecundación, los huevos pelágicos se transforman primero en larvas pelágicas-D, más tarde en larvas trocóforas y finalmente en larvas velígeras, al igual que ocurre con otras especies de bivalvos (Helm et al. 2004, Trigos et al. 2018). Se considera que la duración de la fase larvaria es de hasta un mes (Deudero et al. 2017, Kersting & García-March 2017, Trigos et al. 2018), y al final de esta fase, los individuos que encuentran un sustrato adecuado sufren una metamorfosis y se asientan en hábitats apropiados de fondos blandos (Butler et al. 1993).

Considerando el método de reproducción de la especie, durante el desove, la depredación natural puede estar afectando parcialmente a su éxito reproductivo. Durante nuestra campaña de mayo de 2022, fuimos testigos de la **depredación directa** de ovocitos por parte de peces de la especie *Liza aurata* (Figura 42), disminuyendo así el

porcentaje de ovocitos disponibles para la fecundación. Además, *Hexaplex trunculus*, un depredador natural de juveniles de *P. nobilis* (Kersting & García-March 2017) se encuentra comúnmente en altas densidades en la laguna costera del Mar Menor (Sandonnini et al. 2021b), posiblemente afectando al desarrollo de reclutas recientemente asentados.



Figura 42. Ejemplar de *Pinna nobilis* en puesta, expulsando ovocitos que son depredados por *Liza aurata*.

Por otro lado, el **bienestar del adulto** reproductor juega un papel muy importante en el éxito del embrión, y en consecuencia en la calidad de la puesta. Por tanto, el colapso de la laguna podría estar deteriorando las condiciones de los ejemplares de *P. nobilis* y provocando la liberación de gametos inviables, además de afectar a las larvas obtenidas de desoves viables. Por ejemplo, las **condiciones del sustrato** con grandes zonas fangosas ricas en materia orgánica suelen estar más sujetas a anoxia cuando la hidrodinámica es baja, lo que puede potenciar la producción de sulfuro de hidrógeno, provocando la muerte de los individuos (Prado et al. 2014, Basso et al. 2015). De hecho, en la laguna del Mar Menor se han observado niveles hipóxicos y anóxicos, especialmente en periodos de altas temperaturas durante el verano, cuando se produce el periodo de asentamiento de *P. nobilis* y durante las horas nocturnas en las que no se produce fotosíntesis (Ruíz et al. 2020).

Además, la elevada presencia de la macroalga ***Caulerpa prolifera*** (Ruiz et al. 2020) también podría estar influyendo en el éxito reproductivo de la especie en la laguna. Tras el evento de eutrofización iniciado en 2015, toda la vida bentónica por debajo de los 3 m desapareció en 2016 creando condiciones eutróficas que han propiciado la expansión de la especie oportunista *C. prolifera* (Ruíz et al. 2020). Bajo las condiciones actuales, *C. prolifera* ha mostrado altas tasas de crecimiento pudiendo ser capaz de cubrir completamente a los ejemplares adultos de nacra a lo largo de un año (*observación personal*), aumentando el estrés (Box et al. 2009) y la asfixia de los individuos al reducir su tasa de filtración, tal y como se ha descrito para otras especies de macroalgas

(Banach-Esteve et al. 2015). Este efecto podría ser especialmente crítico durante el verano, cuando debido a las altas temperaturas la especie sufre estrés térmico y en consecuencia tiene una mayor demanda de oxígeno del metabolismo aeróbico a la que puede ser incapaz de satisfacer debido al recubrimiento por *C. prolifera* (Hernandis et al. 2023). Por lo tanto, el efecto de *C. prolifera* podría ser letal para el asentamiento de las larvas, al ser incapaces de crecer y elevarse por encima de la densa pradera marina. Sin embargo, la falta de individuos reclutas no se acaba de justificar completamente por el efecto de *C. prolifera* ya que actualmente en la laguna aún existen zonas de arena viables para el asentamiento larvario, que podrían ajustarse a los requerimientos de la nacra. Además, los colectores larvarios no se ven afectados por la presencia de *C. prolifera*. Esto podría indicar que efectivamente existe un problema con la viabilidad de los gametos o el desarrollo y asentamiento larvario.

Otra consideración importante a tener en cuenta en la laguna del Mar Menor es la **contaminación por metales pesados**. Se han detectado concentraciones máximas de 8000 mg kg⁻¹ de Zn, 12000 mg kg de Pb, y 100 mg kg de As en los primeros 10 cm del sedimento (Álvarez-Rogel et al. 2020). Dichas concentraciones son muy elevadas al compararse con otras zonas costeras como el Golfo de Cádiz, donde se encontraron concentraciones menores <100 mg kg⁻¹ para el Pb y < 300 mg kg⁻¹ para el Zn (Hanebuth et al. 2018) o el litoral asturiano en el norte de España (Sanz-Prada et al. 2020). En consecuencia, debido a procesos de resuspensión de sedimentos, estos metales pesados podrían llegar a la columna de agua, y consecuentemente dependiendo de la concentración, podrían ser letales para las larvas de bivalvos (Calabrese et al. 1973, 1977).

Por otro lado, la **sobrecolonización** de los colectores larvarios por parte de otras especies también podría ser un factor limitante para el éxito del reclutamiento en estos sistemas. En ese caso, los reclutas de *P. nobilis* de 2020 y 2021, podrían haber tenido problemas para asentarse y crecer en tales circunstancias de competencia por el espacio y depredación. No obstante, para responder razonablemente a esta hipótesis, en 2022 se instalaron tres colectores larvarios en el momento exacto de la reproducción y se recuperaron tras 56 días (mucho antes que otros años) para evitar la sobrecolonización. A pesar de implementar esta prueba, tampoco se observaron reclutas de *P. nobilis* en 2022.

Es importante señalar que se tiene constancia de la baja flotabilidad de los ovocitos de *P. nobilis* en condiciones controladas (Trigos et al. 2018), y se ha planteado la hipótesis de

que este comportamiento también podría ocurrir en ambientes cerrados con **bajo hidrodinamismo** como es la laguna del Mar Menor, produciendo así una baja dispersión larvaria (Prado et al. 2022). En consecuencia, esta baja dispersión larvaria podría disminuir el éxito del evento reproductivo ya que los ovocitos podrían caer directamente en las densas praderas de *C. prolifera* del Mar Menor una vez liberados, impidiendo la fecundación o el desarrollo y dispersión de las larvas.

Los resultados observados sugieren que la concurrencia de varios factores favorables podría ser necesaria para que los ambientes cerrados obtengan un auto reclutamiento exitoso (Prado et al. 2020). Pero para el Mar Menor, esta pequeña ventana podría no existir debido al actual colapso ambiental de la laguna. Por lo tanto, bajo unas condiciones ambientales más óptimas quizás *P. nobilis* sería capaz de reclutar exitosamente en la laguna. Considerando esta posibilidad, basándonos en los patrones de reclutamiento observados en *O. stentina* se podría esperar que los reclutas de *P. nobilis* dentro la laguna siguieran patrones similares de reclutamiento, así observando mayores densidades de reclutas en la zona noroeste y centro oeste de la laguna.

5.1.3. Evaluación de la conectividad y diversidad genética de la población

Este estudio proporciona información crucial para la conservación de *P. nobilis* en la laguna del Mar Menor. Los resultados obtenidos indican una diversidad genética uniforme y una ausencia de estructura genética relacionada con los sitios de muestreo, por lo que la población remanente de *P. nobilis* es genéticamente homogénea en toda la laguna, sugiriendo una única población en lugar de subpoblaciones distintas. Es probable que esta homogeneización se deba a los patrones de dispersión de las larvas dentro de la laguna (Nebot-Colomer et al. 2024a), y es coherente con la homogeneización genética de la especie observada a escalas mayores (Wessermann et al. 2018, Peyran et al. 2021).

Además, estudios recientes realizados por el equipo de investigación han comparado la diversidad genética de la población de *P. nobilis* del Mar Menor con la ya desaparecida población del Parque Nacional de Cabrera en Baleares, y los resultados muestran que ambas poblaciones comparten una homogeneidad genética similar. Más concretamente la población del Mar Menor conserva un 80% de la diversidad genética del PN de Cabrera, preservando así un alto nivel de diversidad genética para esta especie (Nebot-Colomer et al. 2024a, 2024b *under review*).

A pesar del considerable declive en el tamaño de la población, de 1.6 – 1.8 millones de individuos a 1500 individuos (Belando et al. 2014, Giménez-Casaldueiro et al. 2020, Cortés-Melendreras et al. 2022) causado por graves eventos ambientales catastróficos

en la laguna junto con los EMM sufridos en todo el Mar Mediterráneo, la población de *P. nobilis* del Mar Menor no ha mostrado cuellos de botella recientes a nivel genético, el tamaño de la población sigue siendo lo suficientemente grande como para mantener la diversidad genética. Estos resultados están en línea con los encontrados en para la diversidad genética global. Los valores observados en la población de la laguna del Mar Menor corroboran los encontrados en otras poblaciones relictas aisladas en lagunas costeras, como las lagunas de Thau y Leucate (Peyran et al. 2021)

Es importante tener en cuenta que, a pesar de que no se ha detectado ningún impacto genético significativo en esta población remanente de *P. nobilis*, existe incertidumbre sobre su futuro. La homogeneidad genética global observada entre poblaciones de *P. nobilis*, incluidas las de las costas española y francesa (Wesselmann et al. 2018, Peyran et al. 2021), probablemente se ha mantenido gracias al intercambio de larvas entre poblaciones adyacentes (Feria-Rodríguez et al. 2024). Sin embargo, con el reciente declive de las poblaciones de *P. nobilis*, esta estructura genética homogénea está en peligro. La desaparición de muchas poblaciones interrumpe esta conectividad, lo que puede conducir a un mayor aislamiento genético de las poblaciones restantes. En consecuencia, a lo largo de varias generaciones, las poblaciones aisladas pueden divergir genéticamente, lo que se traduce en una pérdida de la homogeneidad genética observada anteriormente. Este cambio podría tener implicaciones significativas para la conservación y gestión de *P. nobilis*, enfatizando la necesidad de estrategias que promuevan el intercambio genético y la conectividad entre las poblaciones supervivientes para mantener su salud genética y su resistencia.

5.2. Determinación de la viabilidad de recuperación de la población

Bajo las condiciones actuales de la laguna donde se producen varios impactos antrópicos (impactos por fondeo, pesca artesanal, extracción ilegal, etc.) y se producen reiteradamente catástrofes ambientales de eutrofización y eventos extremos de gota fría, la población se encuentra con unos parámetros biológicos muy poco óptimos para favorecer la recuperación de la población. Actualmente, utilizando valvas de individuos recolectados antes del evento de eutrofización de 2016 se ha estimado que la esperanza de vida máxima de la población es de 9 años (García-March et al. 2020) y según los resultados obtenidos en los colectores larvarios de este proyecto y estudios previos (Kersting et al. 2020) se estima que hay un 99% de mortalidad de individuos reclutas.

Los resultados del monitoreo llevado a cabo en 13 parcelas dentro de la laguna ponen de manifiesto este problema; las poblaciones a nivel de sitio y a nivel lagunar

(metapoblación), sufren tasas de mortalidad positivas entre 0.12-0.2 y una mortalidad del 11.05% en todo el periodo, sin observarse reclutamiento alguno, en consecuencia, la población no crece y sus valores de crecimiento neto son negativos (-0.12 a -0.2 año⁻¹). Estudios llevados a cabo con anterioridad al EMM en poblaciones climácicas como el Parque Nacional de Cabrera, registran valores de mortalidad anual que varían entre 3.94-10.19% en 4 años de monitoreo (2011-2014), valores inferiores a los registrados en la laguna y que, además se veían compensados por el reclutamiento anual que variaba entre 2.69-20.97% (Claramonte et al. 2024). Los valores umbrales propuestos por Vazquez-Luis et al. (2017) para establecer el buen estado ambiental de las poblaciones de *P. nobilis*, señalan como poblaciones con tendencias negativas aquellas con valores de crecimiento neto inferiores a -0.2 año⁻¹, valores similares a los encontrados en la laguna que reflejan la tendencia negativa de la población.

En este sentido, basándonos en los resultados del análisis de viabilidad poblacional, si se sigue con este escenario las poblaciones y metapoblación de nacra del Mar Menor el modelo estima que se podrían extinguir en un plazo medio estimado de 7 años a contar desde el inicio del monitoreo de las parcelas en abril de 2021. Entre las tres catástrofes simuladas se observa como los eventos de eutrofización es el factor que afecta más a la supervivencia de la especie en la laguna. Los eventos de eutrofización recurrentes que sufre la laguna del Mar Menor se contextualizan en el proceso de eutrofización que la laguna viene experimentando a lo largo de las últimas décadas como consecuencia de los aportes masivos y casi continuos de nutrientes (nitrógeno y fósforo) procedentes de la actividad humana que entran en la laguna por varias vías, tales como escorrentía superficial a través de las ramblas, aguas subterráneas de los acuíferos, durante lluvias torrenciales etc. (Ruiz et al. 2020, 2021). En el contexto de la conservación y viabilidad de recuperación de la nacra, es imprescindible que este proceso de eutrofización de la laguna cese. Aun así, según los resultados obtenidos del análisis de viabilidad poblacional, para observar un aumento ligero del censo poblacional y evitar su extinción no solo haría falta que no ocurrieran estos procesos de eutrofización, si no que la esperanza de vida de la especie debería ser de al menos 15 años y a la vez el porcentaje de mortalidad de reclutas debería disminuir del 99% al 90%. Sin embargo, para que la población alcanzara valores superiores a la abundancia total actual, también deberían cesar los impactos por fondeo.

Por otro lado, en el único escenario donde la población no se extinguiría y aumentara a valores superiores a la población actual manteniendo la esperanza de vida actual (9 años) sería si todas las catástrofes cesaran y hubiera un reclutamiento efectivo del 10%. Como

se observa, el cese de las catástrofes no garantiza la recuperación de la población sin tener una disminución de la mortalidad de individuos reclutas. Sin embargo, ambos factores están directamente relacionados. Como se ha discutido anteriormente, el colapso ambiental de la laguna (contaminación por metales pesados, eutrofización, etc.) probablemente está afectando al éxito reproductivo de la especie. Por lo tanto, cabe esperar que una mejora del estado ambiental de la laguna favoreciera el auto reclutamiento de la especie y así su recuperación. También sería conveniente evaluar la esperanza de vida actual de las nacras en la laguna, ya que el estudio previo realizado por (García-March et al. 2019) ha estimado una esperanza de vida de 9 años a partir de valvas recogidas antes de las altas mortalidades observadas entre 2014 y 2017. Por otro lado, hay que tener en cuenta que los AVP son modelos donde determinados parámetros pueden tener cierta incertidumbre y que los resultados hay que interpretarlos con cautela en términos relativos y no absolutos.

Lo ideal sería que las evaluaciones de conservación se basaran en datos de alta calidad. Aunque existe un debate en curso sobre la precisión de los AVP a la hora de predecir trayectorias poblacionales precisas, cada vez hay más consenso en que son valiosos para identificar tendencias poblacionales e informar sobre estrategias de gestión, especialmente cuando se dispone de datos demográficos fiables (Ball & Lindenmayer, Brook et al. 2000). La biología, la ecología y los impactos sobre las poblaciones de *P. nobilis* se han estudiado ampliamente en entornos de mar abierto desde la década de 2000, pero la evidencia de entornos confinados como la laguna del Mar Menor es limitada. A pesar de ello, los modelos demográficos ofrecen flexibilidad para probar escenarios, evaluar incertidumbres en los parámetros y predecir cambios, lo que puede orientar la toma de decisiones incluso cuando los datos son escasos. Sin embargo, es esencial evaluar cuidadosamente los supuestos y la calidad de los datos utilizados en los AVP (Coulson et al. 2001). Además, es importante destacar las recientes medidas de gestión, impulsadas por el gobierno de la Región de Murcia, para prohibir el fondeo en la zona y balizar las localidades con nacras de la laguna (BORM-240-5926, Resolución del 7 de septiembre de 2023), concretamente la isla del Barón, la isla de Perdiguera, y la zona del Pedrucho y Pedruchillo-Galán. Estas zonas van a ser balizadas y se ha prohibido el fondeo de embarcaciones, medidas que en base a las observaciones realizadas se espera tengan efectos muy positivos para la población de *Pinna nobilis* de la laguna eliminando la mortalidad asociada a los impactos físicos. Por tanto, se espera que a corto plazo la mortalidad asociada al fondeo puede verse reducida considerablemente.

En el análisis de viabilidad realizado, se han utilizado los mejores datos disponibles sobre la biología de la especie, aunque no todos procedían de la población de *P. nobilis* de la laguna del Mar Menor. La mayor incertidumbre existe sobre todo en la gravedad de las catástrofes analizadas. Para tenerlo en cuenta, adoptamos hipótesis conservadoras en nuestras simulaciones, asegurándonos de que las proyecciones de población reflejen los escenarios «más favorables». Este enfoque proporciona una mayor confianza en nuestra conclusión de que la población está en grave declive. Aunque este estudio se centra en los tres factores principales que determinan la mortalidad, en el modelo no se tuvieron en cuenta otras amenazas como las colisiones con hélices de embarcaciones (Prado et al. 2014), la caza furtiva (Katsanevakis & Thessalou-Legaki 2009), la contaminación (Sureda et al. 2013b a) y el enredo con artes de pesca. Se espera que estos factores aumenten aún más las tasas de mortalidad. Aunque existen incertidumbres en los datos, pueden cuantificarse y reevaluarse a medida que se disponga de nueva información, lo que permitirá realizar predicciones de población más precisas mediante la modelización futura.

6. Conclusiones y recomendaciones

- La conservación de las poblaciones santuario es uno de los objetivos más importantes para la preservación de la especie a nivel Mediterráneo. Las poblaciones santuario existentes en España del Mar Menor y el Delta del Ebro se encuentra en una situación crítica, con un riesgo muy elevado de extinción. Por todo ello es fundamental que las acciones de gestión y conservación estén centradas en aumentar la supervivencia de los ejemplares existentes y su esperanza de vida, eliminando la tasa de mortalidad no natural.
- La población de *Pinna nobilis* del Mar Menor puede ser considerada como reservorio genético crucial para la diversidad de especies, manteniendo más del 80% de la variación genética de la especie.
- Los resultados del seguimiento realizado en la población del Mar Menor revelan unas tasas de pérdidas anuales elevadas e inasumibles para el mantenimiento de la población en el futuro ya que no son revertidas por ningún aporte puesto que no se ha detectado reclutamiento efectivo hasta el momento.
- La recuperación de la especie depende de la capacidad de recuperación de la población y de la capacidad de la especie para reproducirse eficazmente en la laguna del Mar Menor.

- Para la recuperación de la especie es imprescindible poner fin a las perturbaciones ambientales, establecer medidas para su conservación y eliminar la mortalidad de ejemplares debidas al fondeo, la extracción ilegal y las interacciones con las artes de pesca.
- Para favorecer la recuperación de la especie también deben llevarse a cabo iniciativas para la restauración del ecosistema con objeto de mejorar la calidad general del agua y del sustrato.

7. Agradecimientos

Este proyecto ha contado con todos los permisos necesarios para el trabajo con la especie protegida y los espacios marinos protegidos obtenidos por parte del Gobierno Regional de Murcia (Dirección General del Medio Natural y la Dirección General de Ganadería, Pesca y Acuicultura) y las autoridades nacionales (MITECO). Además, agradecemos el apoyo proporcionado por el Presidente y Personal de los puertos Club Náutico Lo Pagán, Club Náutico La Puntica y Centro de Actividades Náuticas (San Pedro del 515 Pinatar, Murcia, España). También estamos muy agradecidos con todo el equipo científico y patrones participantes en las campañas y al Centro Oceanográfico de Murcia (IEO) por todo el apoyo logístico recibido, especialmente a Juanma Ruíz a través del proyecto DEMM y Marina Albentosa.

Además, se quiere agradecer a todo el personal que ha colaborado en las campañas: Elvira Álvarez Pérez, Mercé Morató, Lydia Png, Francesco Maresca, Marina Sanz Martin, Paula María Salgado Hernanz, Alessia Lunetta, Gemma Donato, Salud Deudero Company, Carmen Alomar Mascaró, Xavier Capó Fiol, Sebastián Hernandis y Lolita Maurés; y por último a los patrones de las embarcaciones del COMU Javier Ferrer y Jon Lemona Escobal.

8. Referencias

Legislación

Orden TEC/1078/2018, de 28 de septiembre, por la que se declara la situación crítica de *Cistus heterophyllus* subsp. *carthaginensis*, *Lanius minor*, *Margaritifera auricularia*, *Marmaronetta angustirostris*, *Mustela lutreola*, *Pinna nobilis* y *Tetrao urogallus cantabricus* en España, y se declaran de interés general las obras y proyectos encaminados a la recuperación de dichos taxones.

Orden TEC/596/2019, de 8 de abril, por la que se modifica el anexo del Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas.

BOE-4-2023-344, de 5 de enero de 2024, Disposición 344. Resolución de 20 de diciembre de 2022, de la Dirección General de Biodiversidad, Bosques y Desertificación, para la aprobación de la Estrategia de Conservación de la nacra (*Pinna nobilis*) en España, de la Estrategia para la Conservación de la tortuga común (*Caretta caretta*) y otras especies de tortugas marinas en España, del Protocolo Nacional de Actuación ante varamientos de tortugas marinas y del Protocolo Nacional de Actuación ante varamientos de cetáceos. Págs. 2092-2093

BORM-240-5926. Resolución de 7 de septiembre de 2023, de la Capitanía Marítima de Cartagena, por la que se prohíbe el fondeo de buques y embarcaciones en cuatro zonas del Mar Menor para la protección de la nacra común (*Pinna nobilis*).

Artículos científicos e informes técnicos.

Addis P, Secci M, Brundu G, Manunza A, Corrias S, Cau A (2009) Density, size structure, shell orientation and epibiontic colonization of the fan mussel *Pinna nobilis* L. 1758 (Mollusca: Bivalvia) in three contrasting habitats in an estuarine area of Sardinia (W Mediterranean). *Sci Mar* 73:143–152.

Álvarez E., Maresca F., Vázquez-Luis M. (2024) Evolución en el tiempo de los indicadores poblacionales básicos de las poblaciones santuario de *Pinna nobilis* C2A5T3: Entregable 6, Estrategias Marinas. Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, Dirección General de la Costa y el Mar, Subdirección General de Protección del Mar. . Palma de Mallorca.

Alvarez E, Vazquez-Luis MT, Deudero S (2017) Protocolo metodológico para la evaluación del estado de conservación de *Pinna nobilis* y el monitoreo de sus poblaciones en relación al evento de mortalidad masiva 2016-2017. Palma de Mallorca.

- Álvarez-Rogel J, Barberá GG, Maxwell B, Guerrero-Brotons M, Díaz-García C, Martínez-Sánchez JJ, Sallent A, Martínez-Ródenas J, González-Alcaraz MN, Jiménez-Cárceles FJ, Tercero C, Gómez R (2020) The case of Mar Menor eutrophication: State of the art and description of tested Nature-Based Solutions. *Ecol Eng* 158:106086.
- Arzul I, Carnegie RB (2015) New perspective on the haplosporidian parasites of molluscs. *J Invertebr Pathol* 131:32–42.
- Ball SJ, Lindenmayer DB (no date) The predictive accuracy of population viability analysis: a test using data from two small mammal species in a fragmented landscape.
- Banach-Esteve G, Vázquez-Luis M, Deudero S (2015) Temporal trends in sessile epibionts of the endemic bivalve *Pinna nobilis*: variability in *Lophocladia lallemandii* colonization. *An International Journal of Marine Sciences* 31:19–29.
- Basso L, Vázquez-Luis M, García-March JR, Deudero S, Alvarez E, Vicente N, Duarte CM, Hendriks IE (2015) The pen shell, *Pinna nobilis*: A review of population status and recommended research priorities in the Mediterranean Sea. *Adv Mar Biol* 71:109–160.
- Belando MD, Bernardeau-Esteller J, García-Muñoz R, Ramos-Segura A, García-Moreno, Jiménez-Casero J, Pérez-Armand E, P, Cerezo-Alemán I RJM (2018) Cartografía de los macrófitos bentónicos de la laguna costera del Mar Menor 2017. Informe del Instituto Español de Oceanografía y la Asociación de Naturalistas del Sureste (IEO), Murcia.
- Belando MD, Bernardeau-Esteller J, García-Muñoz R, Ramos-Segura A, Santos-Echeandía J, García-Moreno P, Ruiz JM (2017) Evaluación del Estado de Conservación de las Praderas de *Cymodocea nodosa* en la Laguna Costera del Mar Menor. 2014-2016.
- Belando MD, García-Muñoz MR, Ramos-Segura A, Franco-Navarro IJ, García-Moreno P, Ruiz-Fernández JM (2014) Distribución y Abundancia de las Praderas de MACRÓFITOS bentónicos y las Poblaciones de *Nacra* (*Pinna nobilis*) en el Mar Menor.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05, Population genetics software for Windows TM. Montpellier.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple.
- Boddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blocker H, Bottger EC (1990) Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 28:1751–1759.
- Box A, Capó X, Tejada S, Catanese G, Grau A, Deudero S, Sureda A, Valencia JM (2020) Reduced Antioxidant Response of the Fan Mussel *Pinna nobilis* Related to the Presence of *Haplosporidium pinnae*. *Pathogens* 9:932.
- 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 Part C: Toxicology & Pharmacology* 149:456–460.

- Brook BW, O'Grady JJ, Chapman AP, Burgman; M.A., Akçakaya HR, Frankham R (2000) Predictive of population viability analysis in conservation biology. *Nature* 404:385–387.
- Butler A, Vicente N, De Gaulejac B (1993) Ecology of the pterioid bivalves *Pinna bicolor* Gmelin and *Pinna nobilis* L. *Marine Life* 3:37–45.
- Cabanellas-Reboredo M, Deudero S, Alós J, Valencia JM, March D, Hendriks IE, Álvarez E (2009) Recruitment of *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) on artificial structures. *Mar Biodivers Rec* 2.
- Cabanellas-Reboredo M, Vázquez-Luis M, Mourre B, Álvarez E, Deudero S, Amores Á, Addis P, Ballesteros E, Barrajon A, Coppa S, García-March JR, Giacobbe S, Giménez-Casalduero F, Hadjioannou L, Jiménez-Gutiérrez S, Katsanevakis S, Kerstind Diego MV, Mavrič B, Paolo Patti F, Planes S, Prado P, Sánchez J, Tena-Medialdea J, de Vaugelas J, Vicente N, Zohra Belkhamssa F, Zupan I, Hendricks IrisE (2019) Tracking a mass mortality outbreak of pen shell *Pinna nobilis* populations: A collaborative effort of scientists and citizens. *Sci Rep* 9:1–11.
- Calabrese A, Collier RS, Nelson DA, MacInnes JR (1973) The toxicity of heavy metals to embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar Biol* 18:162–166.
- Calabrese A, MacInnes JR, Nelson DA, Miller JE (1977) Survival and growth of bivalve larvae under heavy-metal stress. *Mar Biol* 41:179–184.
- Calvín JC, Ballester R, Franco Navarro I, Martínez Ingles AM, Marin A, Belmonte A, Zamora P (1999) El litoral sumergido de la Región de Murcia. *Cartografía bionómica y valores ambientales*. DG del Medio Natural. Comunidad de Murcia.
- Carella F, Aceto S, Pollaro F, Miccio A, Iaria C, Carrasco N, Prado P, Vico G De (2019) A mycobacterial disease is associated with the silent mass mortality of the pen shell *Pinna nobilis* along the Tyrrhenian coastline of Italy. *Sci Rep* 9.
- Catanese G, Grau A, Valencia JM, García-March JR, Vázquez-Luis M, Alvarez E, Deudero S, Darriba S, Carballal MJ, 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. *J Invertebr Pathol* 157:9–24.
- Claramonte L, Álvarez E, Hidalgo M, Deudero S, Vázquez-Luis M (2024) Demographic regulation processes in *Pinna nobilis* population subunits: Implications for restocking. *Estuar Coast Shelf Sci* 306:108894.
- Coppa S, Guala I, de Lucia GA, Massaro G, Bressan M (2010) Density and distribution patterns of the endangered species *Pinna nobilis* within a *Posidonia oceanica* meadow in the Gulf of Oristano (Italy). *Marine Biological Association of the United Kingdom Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 90:885.
- Cortés-Melendreras E, Gomariz-Castillo F, Alonso-Sarría F, Giménez Martín FJ, Murcia J, Canales-Cáceres R, Ramos Esplá AA, Barberá C, Giménez-Casalduero F (2022) The relict population of *Pinna nobilis* in the Mar Menor is facing an uncertain future. *Mar Pollut Bull* 185.

- Coulson T, Mace GM, Hudson E, Possingham H (2001) The Use And Abuse Of Population Viability Analysis.
- Darriba S (2017) First haplosporidan parasite reported infecting a member of the Superfamily Pinnoidea (*Pinna nobilis*) during a mortality event in Alicante (Spain, Western Mediterranean). *J Invertebr Pathol* 148:14–19.
- Deudero S, Grau A, Vázquez-Luis M, Álvarez E, Alomar C, Hendriks IE (2017) Reproductive investment of the pen shell *Pinna nobilis* Linnaeus, 1758 in Cabrera National Park (Spain). *Mediterr Mar Sci* 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.
- Donato G, Vázquez-Luis M, Nebot-Colomer E, Lunetta A, Giacobbe S (2021) Noble fan-shell, *Pinna nobilis*, in Lake Faro (Sicily, Italy): Ineluctable decline or extreme opportunity? *Estuar Coast Shelf Sci* 261:107536.
- Espín Sánchez D, García Lorenzo R, Ruiz Álvarez V, Conesa García C (2017) Las lluvias torrenciales e inundaciones de los días 17 y 18 de diciembre de 2016 en la Región de Murcia con particular incidencia en el área vertiente del Mar Menor. *Ingeniería del agua* 21:213.
- Feria-Rodríguez A, March D, Mourre B, Hendriks IE, Vázquez-Luis M (2024) Sink-source connectivity for restocking of *Pinna nobilis* in the western Mediterranean Sea. *Mar Environ Res* 197.
- Foulquie M, Dupuy de la Grandrive R, Dalías N, Vicente N (2020) Inventaire et état de santé des populations de *Pinna nobilis* (L . 1758) dans l'étang de Thau (Hérault, France). *Marine Life Revue* July:1–25.
- Fraille-Nuez E, Machín F, Santana-Casiano JM, Gonzalez-Davila M, Dominguez-Yanes JF, Mercado J, others (2018) Estudio oceanográfico integral de alta resolución de la laguna costera del Mar Menor, Murcia.
- García-March JR (2003) Contribution to the knowledge of the status of *Pinna nobilis* (L.) 1758 in Spanish coasts. *Mem Inst Oc Paul Ricard*:29–41.
- García-March JR, García-Carrascosa AM, Peña Cantero AL, Wang YG (2007a) Population structure, mortality and growth of *Pinna nobilis* Linnaeus, 1758 (Mollusca, Bivalvia) at different depths in Moraira bay (Alicante, Western Mediterranean). *Mar Biol* 150:861–871.
- García-March JR, 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. *Mar Environ Res* 153:104795.
- García-March JR, Pérez-Rojas L, García-Carrascosa AM (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. *J Exp Mar Biol Ecol* 342:202–212.

García-March JR, Tena J, Henandis S, Vázquez-Luis M, López D, Téllez C, Prado P, Navas JI, 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 JL, Valencia JM, 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? *Biol Conserv* 243:108498.

Gargouri Ben Abdallah L, Chargui T, Abidli S, Trigui El Menif N (2013) Associated and digenean fauna of the mussel *Mytilus galloprovincialis* cultured on shellfish tables in the lagoon of Bizerta (Tunisia). *Transit Water Bull* 6:20–33.

De Gaulejac B (1995) Successive hermaphroditism with asynchronous maturation of *Pinna nobilis* (L.)(Bivalvia: Pterioidea). *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences-Serie III-Sciences de la Vie* 318:99–104.

De Gaulejac B, Henry M, Vicente N (1995) An Ultrastructural study of gametogenesis of the marine bivalve *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758)I. Oogenesis. *Journal of Molluscan Studies* 61:375–392.

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. Grand forum de la malacologie et Symposium int. d'écophysiologie des mollusques. Société française de Malacologie. *Île des. Haliotis* 10:83.

Giménez-Casalduero F, Gomariz-Castillo F, Alonso-Sarría F, Cortés E, Izquierdo-Muñoz A, Ramos-Esplá AA (2020) *Pinna nobilis* in the Mar Menor coastal lagoon: A story of colonization and uncertainty. *Mar Ecol Prog Ser* 652:77–94.

Gonzalez-Wanguemert M, Costa J, Basso L, Duarte CM, Serrão E, Hendriks I (2015) Highly polymorphic microsatellite markers for the Mediterranean endemic fan mussel *Pinna nobilis*. *Mediterr Mar Sci* 16:31–35.

Grau A, Villalba A, Navas JI, Hansjosten B, Valencia JM, García-March JR, Prado P, Follana-Berná G, Morage T, Vázquez-Luis M, Álvarez E, Katharios P, Pavloudi C, Nebot-Colomer E, Tena-Medialdea J, Lopez-Sanmartín M, Peyran C, Čížmek H, Sarafidou G, Issaris Y, Tüney-Kizilkaya I, Deudero S, Planes S, Catanese G (2022) Wide-Geographic and Long-Term Analysis of the Role of Pathogens in the Decline of *Pinna nobilis* to Critically Endangered Species. *Front Mar Sci* 9:303.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98.

Hanebuth TJJ, King ML, Mendes I, Lebreiro S, Lobo FJ, Oberle FK, Antón L, Ferreira PA, Reguera MI (2018) Hazard potential of widespread but hidden historic offshore heavy metal (Pb, Zn) contamination (Gulf of Cadiz, Spain). *Science of The Total Environment* 637–638:561–576.

Helm MM, Bourne N, Lovatelli A (2004) Hatchery culture of bivalves: a practical manual.

Hendriks IE, Deudero S, Tavecchia G (2012) Recapture probability underwater: Predicting the detection of the threatened noble pen shell in seagrass meadows. *Limnol Oceanogr Methods* 10:824–831.

Hendriks IE, Tenan S, Tavecchia G, Marbà N, Jordà G, Deudero S, Álvarez E, Duarte CM (2013a) Boat anchoring impacts coastal populations of the pen shell, the largest bivalve in the Mediterranean. *Biol Conserv* 160:105–113.

Hendriks IE, Tenan S, Tavecchia G, Marbà N, Jordà G, Deudero S, Álvarez E, Duarte CM (2013b) Boat anchoring impacts coastal populations of the pen shell, the largest bivalve in the Mediterranean. *Biol Conserv* 160:105–113.

Hernandis S, Ibarrola I, Tena-Medialdea J, Albentosa M, Prado P, Vázquez-Luis M, García-March JR (2023) Physiological responses of the fan mussel *Pinna nobilis* to temperature: ecological and captivity implications. *Mediterr Mar Sci* 24:259–271.

Kalinowski ST (2005) HP-RARE 1.0: A computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Mol Ecol Notes* 5:187–189.

Katsanevakis S (2009) Population dynamics of the endangered fan mussel *Pinna nobilis* in a marine lake: a metapopulation matrix modeling approach. *Mar Biol* 156:1715–1732.

Katsanevakis S (2004) Population ecology of the endangered fan mussel *Pinna nobilis* in a marine lake. *Endanger Species Res* 1:51–59.

Katsanevakis S, Carella F, Çinar ME, Čížmek H, Jimenez C, Kersting DK, Moreno D, Rabaoui L, Vicente N (2021) The fan mussel *Pinna nobilis* on the brink of extinction in the Mediterranean.

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. *Mediterr Mar Sci* 12:429–438.

Katsanevakis S, Thessalou-Legaki M (2009) Spatial distribution, abundance and habitat use of the protected fan mussel *Pinna nobilis* in Souda Bay, Crete. *Aquat Biol* 8:45–54.

Kersting D, Benabdi M, Čížmek H, Grau A, Jimenez C, Katsanevakis S, Öztürk B, Tuncer S, Tunesi L, Vázquez-Luis M, Vicente N, Otero Villanueva M (2019) *Pinna nobilis*. The IUCN red list of threatened species:2013–2019.

Kersting DK, García-March JR (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). *Mar Environ Res* 130:282–292.

Kersting DK, Vázquez-Luis M, Mourre B, Belkhamssa FZ, Álvarez E, Bakran-Petricioli T, Barberá C, Barrajón A, Cortés E, Deudero S, García-March JR, Giacobbe S, Giménez-Casalduero F,

- González L, Jiménez-Gutiérrez S, Kipson S, Llorente J, Moreno D, Prado P, Pujol JA, Sánchez J, Spinelli A, Valencia JM, Vicente N, Hendriks IE (2020) Recruitment Disruption and the Role of Unaffected Populations for Potential Recovery After the *Pinna nobilis* Mass Mortality Event. *Front Mar Sci* 7.
- Künili İE, Ertürk Gürkan S, Aksu A, Turgay E, Çakir F, Gürkan M, Altınağaç U (2021) Mass mortality in endangered fan mussels *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758) caused by co-infection of *Haplosporidium pinnae* and multiple *Vibrio* infection in Çanakkale Strait, Turkey. *Biomarkers* 26:450–461.
- Lacy RC (1993) VORTEX: a computer simulation model for population viability analysis. *Wildlife Research* 20:45–65.
- Lacy RC, Pollak JP (2022) Vortex: A stochastic simulation of the extinction process. Version 10.5.6. Chicago Zoological Society.
- López-Sanmartín M, Catanese G, Grau A, Valencia JM, García-March JR, Navas JI (2019) Real-Time PCR based test for the early diagnosis of *Haplosporidium pinnae* affecting fan mussel *Pinna nobilis*. *PLoS One* 14:1–12.
- Lunetta A, Albentosa M, Nebot-Colomer E, Pardo BG, Martínez P, Villalba A, Donato G, Akinyemi MI, Vázquez-Luis M (2023) Assessment of *Ostrea stentina* recruitment and performance in the Mar Menor lagoon (SE Spain). *Reg Stud Mar Sci* 58:102760.
- Martínez-López J, Carreño MF, Martínez-Fernández J, Esteve MA (2014) Wetland and landscape indices for assessing the condition of semiarid Mediterranean saline wetlands under agricultural hydrological pressures. *Ecol Indic* 36:400–408.
- Mercado JM, Cortés D, Gómez-Jakobsen F, García-Gómez C, Ouassa S, Yebra L, Ferrera I, Valcárcel-Pérez N, López M, García-Muñoz R, Ramos A, Bernardeau J, Belando MD, Fraile-Nuez E, Ruíz JM (2021) Role of small-sized phytoplankton in triggering an ecosystem disruptive algal bloom in a Mediterranean hypersaline coastal lagoon. *Mar Pollut Bull* 164:111989.
- Moreno D, et al (2017) Nº 67 - 2017. Noticiario Sociedad Española Malacología.
- Nebot-Colomer E, Álvarez E, Belando MD, Deudero S, Catanese G, Bernardeau-Esteller J, García-Muñoz R, Ramos-Segura A, Ruiz JM, Vázquez-Luis M (2022) Living under threat: Will one of the last *Pinna nobilis* populations be able to survive? *Aquat Conserv* 32:1–13.
- Nebot-Colomer E, Hernandis S, Mourre B, Fraile-Nuez E, Álvarez E, Deudero S, Albentosa M, Vázquez-Luis M (2024a) No recruits for an ageing population: First signs of probable population extinction in one of the last reservoirs of the Critically Endangered species *Pinna nobilis*. *J Nat Conserv* 79.
- Nebot-Colomer E, Peyran C, Deudero S, Boissin E, Vázquez-Luis M, Planes S (2024b) The mass mortality of *Pinna nobilis* throughout the Mediterranean Sea has not yet affected the genetic diversity of the species in one of the last genetics reservoir. Under review.

- Öndes F, Kaiser MJ, Güçlüsoy H (2020) Human impacts on the endangered fan mussel, *Pinna nobilis*. *Aquat Conserv* 30:31–41.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288–295.
- Perez-Ruzafa A, Campillo S, Fernández-Palacios JM, Garcia-Lacunza A, Garcia-Oliva M, Ibanez H, Navarro-Martinez PC, Perez-Marcos M, Perez-Ruzafa IM, Quispe-Becerra JI, others (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. *Front Mar Sci*:26.
- Pérez-Ruzafa A, Campillo S, Fernández-Palacios JM, García-Lacunza A, García-Oliva M, Ibañez H, Navarro-Martínez PC, Pérez-Marcos M, Pérez-Ruzafa IM, Quispe-Becerra JI, Sala-Mirete A, Sánchez O, Marcos C (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. *Front Mar Sci* 6:26.
- 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). *Sci Rep* 11:1–12.
- Peyran C, Boissin E, Morage T, Nebot-Colomer E, Iwankow G, Planes S (2022a) Investigating population dynamics from parentage analysis in the highly endangered fan mussel *Pinna nobilis*. *Ecol Evol* 12:e8482.
- Peyran C, Morage T, Nebot-Colomer E, Iwankow G, Planes S (2022b) Unexpected residual habitats raise hope for the survival of the fan mussel *Pinna nobilis* along the Occitan coast (Northwest Mediterranean Sea). *Endanger Species Res* 48:123–137.
- Peyran C, Planes S, Tolou N, Iwankow G, Boissin E (2020) Development of 26 highly polymorphic microsatellite markers for the highly endangered fan mussel *Pinna nobilis* and cross-species amplification. *Mol Biol Rep* 47:2551–2559.
- Prado P, Andree KB, Trigos S, Carrasco N, Caiola N, García-March JR, Tena J, Fernández-Tejedor M, Carella F (2020) Breeding, planktonic and settlement factors shape recruitment patterns of one of the last remaining major population of *Pinna nobilis* within Spanish waters. *Hydrobiologia* 847:771–786.
- Prado P, Ángel López M, Cermeño P, Bertomeu F, Rafael García-March J, Hernandis S, Tena-Medialdea J, Cortés E, Giménez-Casalduero F (2022) Point pattern analysis as a tool for assessing disease spread and population features in remaining sanctuaries of the critically endangered bivalve *Pinna nobilis*. *J Nat Conserv* 68.

- Prado P, Caiola N, Ibáñez C (2014) Habitat use by a large population of *Pinna nobilis* in shallow waters. *Sci Mar* 78:555–565.
- Prado P, Grau A, Catanese G, Cabanes P, Carella F, Fernández-Tejedor M, Andree KB, Añón T, Hernandis S, Tena J, García-March JR (2021) *Pinna nobilis* in suboptimal environments are more tolerant to disease but more vulnerable to severe weather phenomena. *Mar Environ Res* 163:105220.
- R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. . Foundation for Statistical Computing.
- Rabaoui L, Mejri R, Tlig-Zouari S, Bahri L, Hassine OK Ben, Tsigenopoulos CS (2011) Genetic variation among populations of the endangered fan mussel *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) along the Tunisian coastline. *Hydrobiologia* 678:99–111.
- Rabaoui L, Tlig-Zouari S, Katsanevakis S, Ben Hassine OK (2010) Modelling population density of *Pinna nobilis* (Bivalvia) on the eastern and southeastern coast of Tunisia. *Journal of Molluscan Studies* 76:340–347.
- Richardson CA, Kennedy H, Duarte CM, Kennedy DP, Proud S V (1999) Age and growth of the fan mussel *Pinna nobilis* from south-east Spanish Mediterranean seagrass (*Posidonia oceanica*) meadows. *Mar Biol* 133:205–212.
- Rodriguez Babio C, Navarro Tárrega JC (1983) Aportaciones al estudio del zoobentos del Mar Menor (Murcia). 9. In: *Mollusca. Libro de resúmenes. VI Congreso Bienal de la Real Sociedad Española de Historia Natural, Real Sociedad Española de Historia Natural, Santiago de Compostela*.
- 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). *Sci Rep Port-Cros Natl Park* 29:209–222.
- Rousset F (2008) GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8:103–106.
- RStudio Team (2022) RStudio: Integrated Development Environment for R.
- Ruíz JM, Albetosa M, Aldegue B, Álvarez-Rogel J, Antón J, Belando MD, Bernardeau J, Campillo JA, Dominguez JF, Ferrera I, Fraile-Nuez E, García R, Gómez-Ballesteros M, Gómez F, González-Barberá G, Gómez-Jakobsen F, León VM, López-Pascual C, Marín-Guirao L, Martínez-Gómez C, Mercado JM, Nebot-Colomer E, Ramos A, Rubio E, Santos J, Santos F, Vázquez-Luis M, Yebra L (2020) Informe de evolución y estado actual del Mar Menor en relación al proceso de eutrofización y sus causas.
- Russo P (2017) Lagoon malacofauna: results of malacological research in the Venice Lagoon. *Boll Malacol* 53:30–36.

- Russo P (2012) Segnalazione di una grande colonia di *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758) nella Laguna di Venezia. *Contributi Notiziario SIM* 31:31–34.
- Sandonnini J, Del Pilar Ruso Y, Cortés Melendreras E, Barberá C, Hendriks IE, Kersting DK, Giménez Casalduero F (2021a) The emergent fouling population after severe eutrophication in the Mar Menor coastal lagoon. *Reg Stud Mar Sci* 44:101720.
- Sandonnini J, Del Pilar Ruso Y, Cortés Melendreras E, Barberá C, Hendriks IE, Kersting DK, Giménez Casalduero F (2021b) The emergent fouling population after severe eutrophication in the Mar Menor coastal lagoon. *Reg Stud Mar Sci* 44:101720.
- Sanz-Prada L, García-Ordiales E, Roqueñí N, Grande Gil JA, Loredó J (2020) Geochemical distribution of selected heavy metals in the Asturian coastline sediments (North of Spain). *Mar Pollut Bull* 156:111263.
- 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.
- Scarpa F, Sanna D, Azzena I, Mugetti D, Cerruti F, Hosseini S, Cossu P, Pinna S, Grech D, Cabana D, Pasquini V, Esposito G, Cadoni N, Atzori F, Antuofermo E, Addis P, Sechi LA, Prearo M, Peletto S, Mossa MA, Saba T, Gazale V, Casu M (2020) Multiple Non-Species-Specific Pathogens Possibly Triggered the Mass Mortality in *Pinna nobilis*. *Life* 10.
- Simide R, Couvray S, Vicente N (2019) Présence de *Pinna nobilis* (L. 1758) dans l'étang littoral de Diana (Corse). *Marine Life*:1–4.
- Sureda A, Natalotto A, Álvarez E, Deudero S (2013a) Increased antioxidant response and capability to produce ROS in hemocytes of *Pinna nobilis* L. exposed to anthropogenic activity. *Environmental Pollution* 181:321–324.
- Sureda A, Tejada S, Box A, Deudero S (2013b) Polycyclic aromatic hydrocarbon levels and measures of oxidative stress in the Mediterranean endemic bivalve *Pinna nobilis* exposed to the Don Pedro oil spill. *Mar Pollut Bull* 71:69–73.
- Templado J (2001) *Pinna nobilis* Linnaeus, 1758.
- Thomas Y, Garen P, Bennett A, Le Pennec M, Clavier J (2012) Multi-scale distribution and dynamics of bivalve larvae in a deep atoll lagoon (Ahe, French Polynesia). *Mar Pollut Bull* 65:453–462.
- Trigos S, García-March JR, Vicente N, Tena J, Torres J (2014) Utilization of muddy detritus as organic matter source by the fan mussel *Pinna nobilis*. *Mediterr Mar Sci* 15:667–674.
- Trigos S, Vicente N, Prado P, Espinós FJ (2018) Adult spawning and early larval development of the endangered bivalve *Pinna nobilis*. *Aquaculture* 483:102–110.
- Vautier M, Vasselon V, Chardon C, Rimet F, Bouchez A, Domaizon I (2020) DNA extraction from environmental biofilm using the NucleoSpin® Soil kit (MACHEREY-NAGEL).

- Vázquez-Luis M, Álvarez E, Barraón A, García-March JR, Grau A, Hendriks IE, Jiménez S, Kersting D, Moreno D, Pérez M, Ruiz JM, Sánchez J, Villalba A, Deudero S (2017) SOS *Pinna nobilis*: a mass mortality event in western Mediterranean Sea. *Front Mar Sci* 4:220.
- Vázquez-Luis M, Borg JA, Morell C, Banach-Esteve G, Deudero S (2015a) Influence of boat anchoring on *Pinna nobilis*: a field experiment using mimic units. *Mar Freshw Res* 66:786–794.
- Vázquez-Luis M, Borg JA, Morell C, Banach-Esteve G, Deudero S (2015b) Influence of boat anchoring on *Pinna nobilis*: a field experiment using mimic units. *Mar Freshw Res* 66:786–794.
- Vázquez-Luis M, March D, Alvarez E, Alvarez-Berastegui D, Deudero S (2014) Spatial distribution modelling of the endangered bivalve *Pinna nobilis* in a Marine Protected Area. *Mar Sci* 15:626–634.
- Vázquez-Luis M, Morató M, Campillo JA, Guitart C, Deudero S (2016) High metal contents in the fan mussel *Pinna nobilis* in the Balearic Archipelago (western Mediterranean Sea) and a review of concentrations in marine bivalves (Pinnidae). *Sci Mar* 0.
- Velasco J, Lloret J, Millan A, Marin A, Barahona J, Abellan P, Sanchez-Fernandez D (2006) Nutrient and particulate inputs into the Mar Menor lagoon (Se Spain) from an intensive agricultural watershed. *Water Air Soil Pollut* 176:37–56.
- Weir BS, Clark C (1984) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure.
- Wesselmann M, González-Wangüemert M, Serrão EA, Engelen AH, Renault L, García-March JR, Duarte CM, Hendriks IE (2018) Genetic and oceanographic tools reveal high population connectivity and diversity in the endangered pen shell *Pinna nobilis*. *Sci Rep* 8.
- Zakhama-Sraieb R, Sghaier YR, Omrane A, Charfi-Cheikhrouha F (2011) Density and Population Structure of *Pinna Nobilis* (Mollusca, Bivalvia) in the Ghar El Melh Lagoon (N-E Tunisia). *Bull Inst Natn Scien Tech Mer de Salammbó* 38:65–71.
- Zavodnik D (1967) Contribution to the ecology of *Pinna nobilis* L. (Moll., Bivalvia) in the northern Adriatic. *JAZU*.
- Zavodnik D, Hrs-Brenko M, Legac M (1991) Synopsis on the fan shell *Pinna nobilis* L. in the eastern Adriatic Sea. *Les Espèces Marines a Proteger en Mediterranee*:169–178.
- Zotou M, Gkrantounis P, Karadimou E, Tsirintanis K, Sini M, Poursanidis D, Azzolin M, Dailianis T, Kytinou E, Issaris Y, Gerakaris V, Salomidi M, Lardi P, Ramfos A, Akrivos V, Lattos A, Giantsis IA, Michaelidis B, Vassilopoulou V, Miliou A, Katsanevakis S (2020) *Pinna nobilis* in the Greek seas (NE Mediterranean): on the brink of extinction? *Mediterr Mar Sci* 21:575–591.