



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Salmón atlántico vs. trucha común: la idoneidad como hospedadores en la conservación *ex situ* de *M. margaritifera* (L.).

Antoine Emile Latour

Grado en Veterinaria
Año 2024

Modalidad del Trabajo: Experimental

Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Antoine Emile Latour y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional”.



ÍNDICE

RESUMEN	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS	17
3.1. LOCALIZACIÓN DE LAS INSTALACIONES	17
3.2. MATERIAL UTILIZADO.....	17
3.3. SELECCIÓN DE PECES	17
3.4. SELECCIÓN DE GLOQUIDIOS	17
3.5. INFESTACIÓN	19
3.6. CRÍA DE PECES.....	19
3.7. CONTROL DE INFESTACIÓN	21
3.8. RECOLECCIÓN DE JUVENILES DE <i>M. MARGARITIFERA</i>	23
3.9. CRÍA DE JUVENILES	23
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
4. RESULTADOS	26
4.1. DESCRIPCIÓN DE LAS CONDICIONES DEL PERIODO DE PARASITACIÓN	26
4.2. REPERCUSIÓN DE LA INFESTACIÓN SOBRE LOS PECES HOSPEDADORES.....	27
4.3. COMPARATIVA SOBRE LA PARASITACIÓN EN TRUCHAS Y SALMONES	29
4.4. PRODUCCIÓN Y VIABILIDAD DE LOS JUVENILES	32
5. DISCUSIÓN	36
5.1. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA PARASITACIÓN	36
5.2. EFECTO DE LA PARASITACIÓN SOBRE LOS PECES.....	37
5.3. PREVALENCIA Y TASA DE INFESTACIÓN.....	39
5.4. CRECIMIENTO DE LOS QUISTES	39
5.5. RESULTADOS EN LA PRODUCCIÓN DE JUVENILES	40
6. CONCLUSIONES	41
7. BIBLIOGRAFÍA	42

RESUMEN

La náyade o mejillón de río *Margaritifera margaritifera* (Linneo, 1758) es una de las especies más amenazadas a nivel mundial. Tiene un ciclo de vida complejo, con una fase parasitaria obligatoria donde sus larvas, denominadas gloquidios, permanecen en las branquias de peces salmónidos: *Salmo salar* (Linneo, 1758) y *Salmo trutta* (Linneo, 1758), tanto en su variante residente, la trucha común, como en la migradora, el reo. Sin embargo, la especie de hospedador más adecuado para que *M. margaritifera* complete su ciclo parece variar en función de la localización geográfica y de la población considerada.

El noroeste de la península ibérica constituye el límite sur de la distribución de esta náyade encontrándose las poblaciones más importantes en Galicia y en el norte de Portugal, evidenciando este territorio una crucial importancia para la conservación de la especie. En este sentido, actualmente se están desarrollando en esta área planes de mejora del hábitat y de cultivo *ex situ*, existiendo, sin embargo, una notable ausencia de conocimiento sobre la relación parásito-hospedador que mantienen estas poblaciones con las especies *Salmo salar* y *Salmo trutta*.

Para intentar aportar información adicional sobre este punto, se infestaron 250 salmones y 250 truchas 0+ procedentes del río Ulla (Galicia) con gloquidios de *M. margaritifera* de la misma cuenca, y se estudiaron las características del período parasitario y postparasitario, analizando datos de prevalencia, tasa de infestación, tamaño y supervivencia de los quistes parasitarios y de los mejillones juveniles.

Teniendo en cuenta las variables estudiadas, *S.salar* resultó ser el hospedador más adecuado para ser utilizado en el cultivo de la población de *M. margaritifera* considerada, aunque la infestación en *S. trutta* también permite completar el ciclo y produce juveniles viables. Los resultados y la información obtenidos pueden ser útiles para optimizar el diseño de planes de conservación *ex situ* y para realizar la liberación de peces infestados en los ríos de esta zona como método de refuerzo poblacional, e ilustra la necesidad de la identificación del hospedador principal en función de la zona y población considerada si se pretende desarrollar estrategias de conservación óptimas.

RESUMO

A náide ou mexillón de río *Margaritifera margaritifera* (Linneo, 1758) é unha das especies máis ameazadas a nivel mundial. Ten un ciclo de vida complexo, cunha fase parasitaria obrigatoria onde as súas larvas, denominadas gloquidios, permanecen nas branquias de peixes salmónidos: *Salmo salar* (Linneo, 1758) e *Salmo trutta* (Linneo, 1758,) tanto na súa variante residente, a troita común, como na migradora, o reo. Con todo, a especie de hospedador máis axeitada para que *M. margaritifera* complete o seu ciclo parece variar en función da localización xeográfica e da poboación considerada.

O noroeste da península ibérica constitúe o límite sur da distribución desta náide, atopándose as poboacións máis importantes en Galicia e no norte de Portugal, evidenciando a crucial importancia deste territorio para a conservación da especie. Neste sentido, actualmente estanse desenvolvendo nesta área plans de mellora do hábitat e de cultivo *ex situ*, existindo, con todo, unha notable ausencia de coñecemento sobre a relación parasito-hospedador que manteñen estas poboacións coas especies *Salmo salar* e *Salmo trutta*.

Para tentar achegar información adicional sobre este punto, inzáronse 250 salmóns e 250 troitas 0+ procedentes do río Ulla (Galicia) con gloquidios de *M. margaritifera* da mesma bacía, e estudáronse as características do período parasitario e postparasitario, analizando datos de prevalencia, taxa de infestación, tamaño e supervivencia dos quistes parasitarios e dos mexillóns xuvenís.

Tendo en conta as variables estudadas, *S. salar* resultou ser o hospedador máis axeitado para o cultivo da poboación de *M. margaritifera* considerada, aínda que a infestación en *S. trutta* tamén permite completar o ciclo e produce xuvenís viables. Os resultados e a información obtidos poden ser útiles para optimizar o deseño de plans de conservación *ex situ* e para realizar a liberación de peixes infestados nos ríos desta zona como método de reforzo poboacional, e ilustra a necesidade da identificación do hospedador principal en función da zona e poboación considerada se se pretende desenvolver estratexias de conservación óptimas.

ABSTRACT

The naiad or river mussel *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758) is one of the world's most endangered species worldwide. Its life cycle is complex, with an obligatory parasitic phase in which its larvae, called glochidia, remain in the gills of salmonids: *Salmo salar* (Linnaeus, 1758) and *Salmo trutta* (Linnaeus, 1758), both its resident variant, the brown trout, and its migratory variant, the sea trout. However, the most appropriate host species for *M. margaritifera* to complete its cycle seems to vary according to geographical location and population.

The north-west of the Iberian Peninsula constitutes the southern limit of this naiad's distribution, with the largest populations in Galicia and northern Portugal, making this territory is of crucial importance for the species' conservation. In this sense, habitat improvement and *ex situ* culture plans are currently being developed in this area, although there is a notable lack of knowledge about the parasite-host relationship these populations have with *Salmo salar* and *Salmo trutta* species.

In an attempt to provide further information on this point, 250 salmon and 250 0+ trout from the Ulla River (Galicia) were infested with *M. margaritifera* glochidia from the same basin, and the characteristics of the parasitic and post-parasitic period were studied, analyzing data on prevalence, infestation rate, size and survival of parasitic cysts and juvenile mussels.

In view of the variables studied, *S. salar* proved to be the most suitable host for culturing the *M. margaritifera* population under consideration, although infestation with *S. trutta* also enabled the cycle to be completed and viable juveniles to be produced. The results and information obtained may be useful for optimizing the design of *ex situ* conservation plans and for releasing infested fish into rivers in this area as a method of population enhancement and illustrate the need to identify the main host according to the area and population considered if optimal conservation strategies are to be developed.

1. INTRODUCCIÓN

El agua dulce superficial constituye el 0,01% del agua total del planeta y cubre solamente 0,8% de su superficie. Sin embargo, en esas aguas viven cerca del 6% de todas las especies animales (Dudgeon *et al.*, 2006), dentro de las cuales los moluscos constituyen uno de los grupos más diversificados a nivel mundial (Lydeard *et al.*, 2004).

Dentro de este filo animal, los bivalvos de agua dulce del orden Unionida (Gray 1854), conocidos como almejas, mejillones de río o náyades constituyen uno de los grupos más amenazados del planeta (Lopes-Lima *et al.*, 2017). El hecho de que hoy en día se asocie a los bivalvos con el ecosistema marino está justificado por el gran número de especies de agua dulce que han desaparecido de los ríos y lagos. Sin embargo, existen importantes evidencias de su utilización por nuestros antepasados, no únicamente para la alimentación sino también para la confección de artesanía a partir de su nácar o perlas (Fig. 1.1), la decoración de tumbas, el pavimento de caminos y la alimentación de animales domésticos (Haag, 2012).

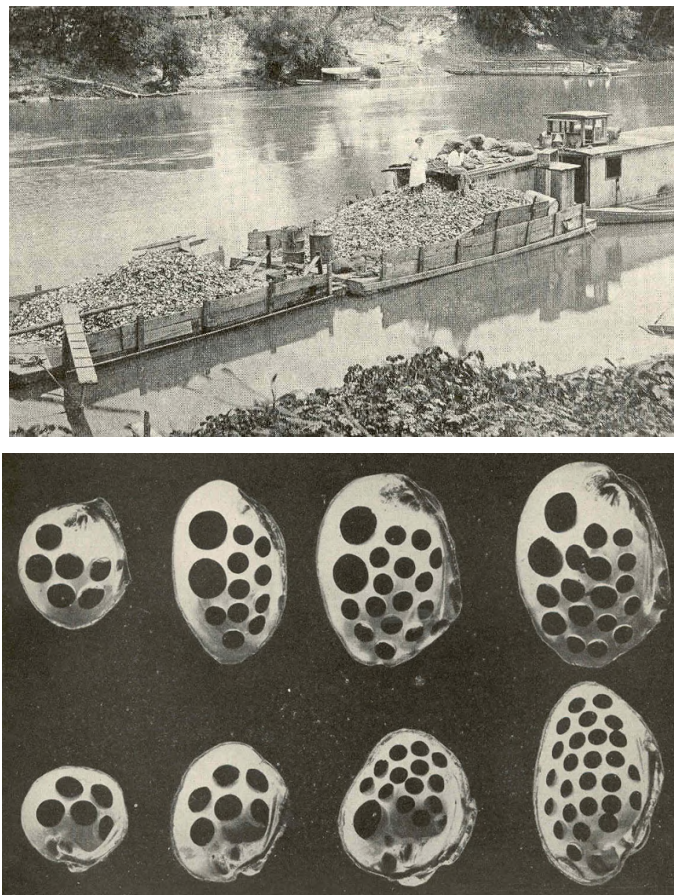


Figura 1.1- Utilización de bivalvos de agua dulce para la confección de botones de nácar en Estados Unidos al principio del siglo XX. Fuente: Freshwater and Marine Image Bank (University of Washington).

Margaritifera margaritifera (Linneo, 1758) es un bivalvo dulceacuícola perteneciente a la familia Margaritiferidae que, junto con la familia Unionidae, se incluye dentro del orden Unionida. Hasta principios del siglo pasado, esta especie se encontraba presente en grandes densidades en los ríos que vierten al Atlántico norte, cubriendo a menudo con densas capas el lecho fluvial, pero hoy en día se calcula que aproximadamente un 90% de sus poblaciones han desaparecido (Young *et al.*, 2001). En esta línea, varios autores la consideran junto a *Pseudunio auricularius* (Spengler, 1793) como una de las especies de náyades más amenazados del planeta (Geist, 2010).

Morfológicamente, *M. margaritifera* posee una concha alargada, de color negro mate en su forma adulta, que puede alcanzar los 16 cm de largo y entre 40 y 50 mm de ancho (Smith, 1995). Está compuesta por carbonato cálcico y proteínas, y constituye la principal defensa contra los elementos exteriores a la vez que proporciona soporte para el cuerpo (Haag, 2012).

En la concha se pueden apreciar líneas de crecimiento que permiten, junto al tamaño del ejemplar, determinar con cierta precisión la edad de los individuos, además de aportar indicaciones sobre la condiciones previas de su desarrollo (Miguel *et al.*, 2004; Helama y Valovirta, 2008) (Fig. 1.2).



Figura 1.2.- Valva derecha de *M. margaritifera*. Superficie externa (a) e interna (b). COPEMOL

Es una especie sedentaria que vive semienterrada en el lecho de los ríos, aunque es capaz de desplazarse activamente en determinadas situaciones, como por ejemplo en caso de bajada del nivel de agua. Vive preferentemente en aguas frías, claras y con corriente, de poca profundidad y pobres en nutrientes, con lecho estable y heterogéneo compuesto por rocas, grava y arena (Prié *et al.*, 2011). Los adultos pueden tolerar hábitats relativamente limosos, sin embargo, no se suelen encontrar juveniles en tales hábitats (Hastie *et al.*, 2000).

Vive semienterrada y en posición vertical, gracias a un pie musculoso muy desarrollado que le permite desplazarse y fijarse firmemente en el sedimento, manteniendo en la interfase entre el sedimento y la columna de agua dos sutiles sifones: uno inhalante rodeado de papilas marrones con forma arborescente, y otro exhalante con borde liso (Vaughn *et al.*, 2008) (Fig. 1.3). Los sifones hacen circular el agua a través de las branquias, donde el oxígeno se disuelve en la hemolinfa y el alimento, constituido de bacterias, algas, zooplancton y partículas orgánicas, es llevado hasta la boca gracias al epitelio ciliado de las branquias (Vaughn *et al.*, 2008; Haag, 2012). Los juveniles de menos de un año poseen alimentación pedal (Belamy, 2021).



Figura 1.3.- Ejemplares adultos de *M. margaritifera* en su entorno natural. Autores: J. Miguens (a); COPEMOL (b).

M. margaritifera tiene un ciclo de vida complejo, caracterizado por una fase parásita obligatoria en las branquias de dos especies de salmónidos: el salmón atlántico (*Salmo salar* L.) y la trucha (*Salmo trutta* L.), tanto en su variante ecológica residente como en la anádroma (Clements *et al.*, 2018). Este ciclo se divide en 3 fases de desarrollo: adulta, parasitaria y juvenil (Fig. 1.4).

M. margaritifera vive entre 35 y 167 años (Prié *et al.*, 2011), lo que es un caso de longevidad excepcional dentro de los invertebrados. Los especímenes del sur de su área de distribución tienen un crecimiento más rápido y una longevidad menor (Miguel *et al.*, 2004).

Es considerado adulto cuando alcanza la madurez sexual, lo que ocurre entre los 7 y 15 años de edad (Prié *et al.*, 2011). Se considera de forma general una especie dioica y sin dimorfismo sexual, sin embargo, en las poblaciones que ven alterada su densidad con un bajo número de individuos, las hembras pueden transformarse en hermafroditas, predominando entonces la auto-fecundación (Skinner *et al.*, 2003; Bauer, 1987). En España, donde las densidades poblacionales son más bajas en comparación con el norte de Europa, el hermafroditismo parece ser más frecuente y alcanza valores de hasta 50% (Araujo *et al.*, 2001).

El período de reproducción varía en función del gradiente latitudinal, pero de forma general se sitúa entre los meses de junio y julio, cuando el esperma liberado en la columna de agua es inhalado por las hembras a través de sus sifones y alcanzan las branquias, donde se encuentran los óvulos y tiene lugar la fertilización. Los huevos fertilizados, son incubados en marsupios presentes en las branquias. Entre los meses de julio y septiembre tiene lugar la eclosión y expulsión en la columna de agua de las larvas denominadas gloquidios, con tamaños entre 60-70 μm (Araujo y Ramos, 1998) (Fig. 1.4). Cada hembra puede liberar hasta 4 millones de gloquidios en cada ciclo (Hastie y Young, 2003), lo que supone un total de 200×10^6 a lo largo de una vida reproductiva que supera los 75 años. Esta cifra puede parecer impresionante, pero se estima que de cada 1.000 millones de gloquidios liberados al medio, solamente 10 darán lugar a un mejillón adulto (Bauer, 1987).

Los gloquidios, que permanecen infestantes solamente durante unos días, son transportados por la corriente en la columna de agua, y sólo aquellos que son inhalados por un hospedador adecuado tienen la oportunidad de completar el ciclo vital (Geist, 2010) (Fig. 1.4). En contraste con el corto período de incubación, los pequeños gloquidios presentan una de las fases parasitarias más largas, pasando el invierno enquistados en las branquias de los peces, desde finales del verano hasta la primavera siguiente (Castrillo *et al.*, 2022). La liberación de las postlarvas (Fig. 1.4) suele producirse cuando han incrementado cinco veces su tamaño inicial, y parece influenciada por eventos térmicos o hidrológicos (Hastie y Young, 2003). Los juveniles pueden enterrarse en el lecho fluvial hasta 20cm de profundidad donde permanecen entre 7 y 15 años, edad a la cual alcanzan la madurez sexual (Prié *et al.*, 2011), y afloran parcialmente en el lecho fluvial.

M. margaritifera tiene una distribución holártica, y sus poblaciones se distribuyen entre los ríos de la vertiente atlántica de Europa y Rusia y el noreste de Estados Unidos y Canadá. En Europa, el noroeste de la península ibérica constituye el límite sur de su área de distribución (Fig. 1.5), descubriéndose recientemente poblaciones relativamente importantes y actualmente reproductivas en este territorio (Reis, 2003; Outeiro *et al.*, 2008, Sousa *et al.*, 2015).

Las náyades tienen una gran influencia en ecosistemas fluviales. En un día un solo ejemplar de *M. margaritifera* puede filtrar hasta 50 L de agua (Mamun y Khan, 2011). La filtración provoca una disminución de la turbidez del agua del río, lo que permite una mayor penetración de la luz solar, favoreciendo al fitoplancton en la columna de agua y el desarrollo de plantas macrófitas. Estas plantas sirven a su vez de hábitat y alimento a numerosos organismos acuáticos (Welker y Walz, 1998; Geist, 2010). Además, las heces de las náyades aportan materia orgánica que puede ser aprovechada por otros organismos (Vaughn y Hakenkamp, 2001)

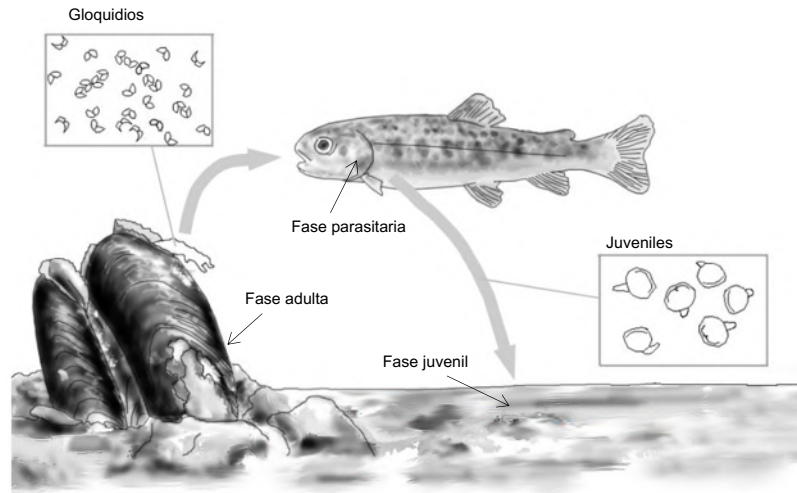


Figura 1.4.- Ciclo vital de *M. margaritifera*. Fuente: COPEMOL.

La presencia de un número suficiente de náyades permite estabilizar el lecho de los ríos y sus valvas constituyen un hábitat idóneo para otros organismos acuáticos (Gutiérrez *et al.*, 2003). Por ello, se encuentra más diversidad de invertebrados en los tramos de ríos con más densidad de unionidos (Aldridge *et al.*, 2007).

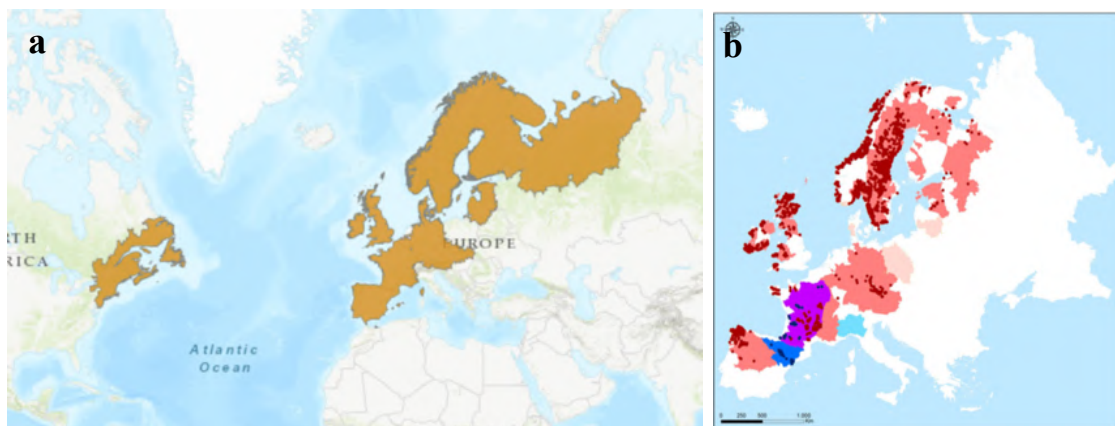


Figura 1.5.- (a): distribución mundial de *M. margaritifera*. Fuente: UICN; (b): distribución europea de *M. margaritifera* (puntos rojo oscuro) y de *P. auricularius* (puntos azules). Las manchas de color representan la distribución histórica. Fuente: Lopes lima (2017).

Esta capacidad para modificar su entorno, y asegurar el mantenimiento de la biodiversidad y salud del ecosistema donde vive, indica que su desaparición puede tener consecuencias graves sobre toda la cadena trófica de los ríos. A la inversa, su conservación permitiría proteger indirectamente todas las especies que dependen de ella (Belamy, 2021). Por estos motivos, en términos de biología de la conservación se le ha asignado el papel de especie ingeniera del ecosistema, paraguas, bandera y clave (Geist, 2010).

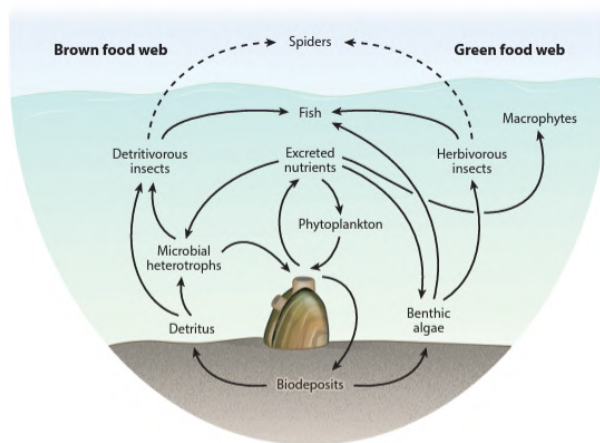


Figura 1.6.- Flujos asociados a las náyades en las redes tróficas fluviales. Los ejemplares se alimentan, excretan y depositan nutrientes que estimulan la producción autótrofa y heterótrofa. El resultado es un aumento de insectos herbívoros, detritívoros y depredadores ribereños (extraído de Vaughn y Hoellein, 2018).

Como hemos visto, *M. margaritifera* es una especie altamente especializada y con un ciclo de vida complejo, lo que la hace particularmente sensible en todas sus fases de su desarrollo a perturbaciones del ecosistema. Entender e identificar estas amenazas es el primer paso para desarrollar estrategias de conservación adecuadas (Österling, 2015; Denic y Geist, 2017).

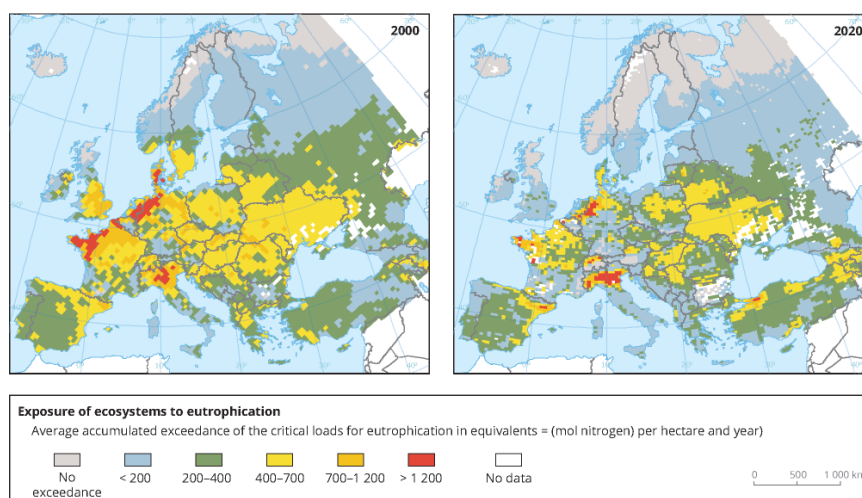


Figura 1.7.- Estado de la eutrofización de las aguas en Europa en los años 2000 y 2020. Fuente: European Environment Agency.

La eutrofización provocada principalmente por el aporte de fósforo y nitrógeno derivado de la actividad urbana, ganadera y agrícola es una causa importante de mortalidad tanto de juveniles como de adultos (Fig. 1.7), manifestándose los os juveniles especialmente sensibles al aumento de la concentración de nitratos (Belamy *et al.*, 2022). Otras afecciones incluyen el deterioro del bosque de ribera, la introducción de especies exóticas, la fragmentación del hábitat, el calentamiento global y la modificación de las condiciones hidrológicas de los ríos (Prié, 2011).

En la actualidad, la náyade muestra pirámides poblacionales invertidas en casi todos los ríos (Fig. 1.8). La falta de relevo generacional provoca que se encuentren muchos más individuos de edad avanzada que jóvenes, lo que indica falta o ausencia de reclutamiento y provoca un lento pero inexorable descenso poblacional (Young *et al.*, 2001). Debido a su longevidad esta situación puede mantenerse temporalmente, pero una baja tasa de reproducción combinada con una disminución en el número de individuos puede tener consecuencias graves y producir la extinción de la especie a largo plazo (Österling *et al.*, 2008). Actualmente la mayoría de las poblaciones no se está reproduciendo adecuadamente lo que ha llevado a poblaciones antiguamente densas y unidas a fragmentarse (Geist, 2010).

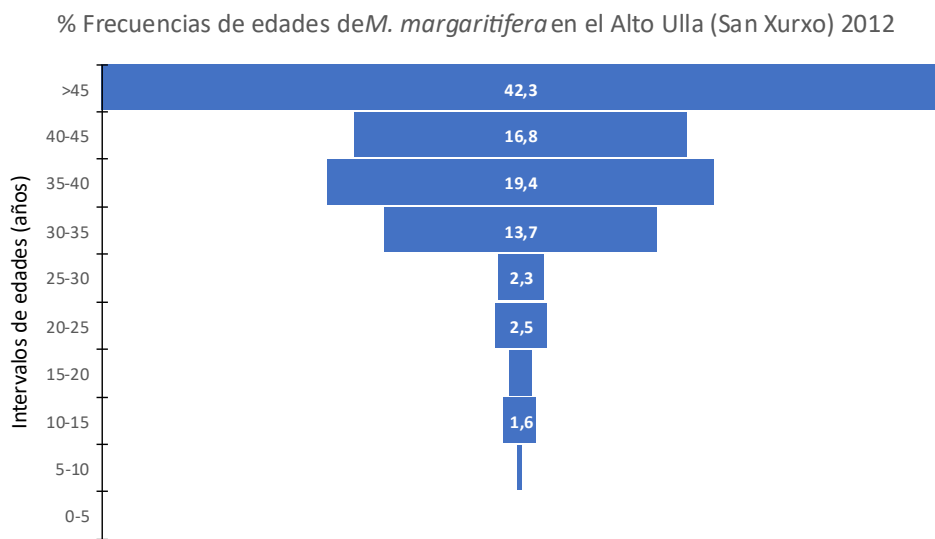


Figura 1.8.- Representación de la pirámide poblacional de *M. margaritifera* en una localidad del río Ulla en el año 2012. Las barras muestran el porcentaje de ejemplares que presenta cada intervalo de edad.
Datos fuente: COPEMOL.

Por otro lado, la capacidad reproductiva de los adultos se mantiene en poblaciones aisladas o disminuidas, incluso en ríos contaminados y todo apunta a que la ausencia de relevo generacional se debe principalmente a una excesiva mortalidad durante la fase parasitaria y/o juvenil, considerándose esta última la más crítica (Fig. 1.8). Los juveniles requieren unas condiciones de sustrato óptimas, mostrándose muy sensibles a la presencia de limo y contaminación orgánica, hasta el punto de que Geist y Auerswald (2007) utilizaron su presencia y tasa de supervivencia como un bioindicador de la calidad del lecho fluvial.

M. margaritifera mantiene una relación muy específica con los hospedadores, presentando solamente dos especies adecuadas para su desarrollo. Además de ser necesaria para su desarrollo, la fase parasitaria constituye la principal forma de dispersión de la náyade (Prié, 2011).

La fase parásita causa un perjuicio temporal y reversible a los peces, reduciendo su capacidad para alimentarse y disminuyendo ligeramente su ganancia de peso (Chowdhury *et al.*, 2021; Österling *et al.*, 2014). Sin embargo, la relación entre *M. margaritifera* y los salmónidos no se limita al parasitismo. Los peces se benefician de la presencia de las náyades en los ríos, ya que reducen la materia orgánica en suspensión en el agua. Además, la presencia de náyades adultas en el lecho proporcionan un entorno ideal para la freza, para el desarrollo de los juveniles de los salmónidos, y para los invertebrados de los cuales se alimentan (Geist, 2010). Por lo tanto, podría considerarse que hay una interacción simbiótica entre peces y náyades (Ziuganov *et al.*, 1994).

Los peces pueden desarrollar inmunidad frente a los gloquidios de los unionidos, lo que hace que la infestación sea más eficiente en peces jóvenes o en adultos que no hayan sido parasitados previamente (Dodd *et al.*, 2006).

La conciencia creciente sobre la importancia de esta náyade para el entorno fluvial, y la pérdida catastrófica de sus poblaciones, ha impulsado la investigación científica y el desarrollo de planes de recuperación en los últimos años (Thomas *et al.*, 2010). *M. margaritifera* está considerada en Europa “en peligro crítico de extinción” por la IUCN (Moorkens *et al.*, 2017) y está protegida por la Convención de Bern (1992) y la Directiva Europea para Hábitats (92/43/ECC), que la define como una “especie de interés para la comunidad requiriendo el desarrollo de áreas específicas de conservación”. En España se considera “en peligro de extinción” tanto en Catálogo Español de Especies Amenazadas (RD 139/2011) como en el Gallego (Decreto 88/2007). Sin embargo, estos instrumentos legales, aunque necesarios, tienen que ser respaldados y actualizados por evidencia científica para desarrollar planes de conservación adecuados (Bouchet *et al.*, 1999). En poblaciones amenazadas los esfuerzos de conservación deben dirigirse hacia la restauración de los ecosistemas acuáticos, y en el cultivo *ex situ* para posterior propagación artificial. En Europa, dentro del programa LIFE+, un instrumento de financiación para la aplicación de medidas en el medioambiente, se han desarrollado 28 proyectos dedicados a la conservación de los uniónidos, 21 de los cuales estaban enfocados a la conservación de *M. margaritifera* (Lopes-Lima *et al.*, 2017).

Los esfuerzos de restauración de los hábitats dulceacuícolas supone una cooperación entre científicos y políticos, y una toma de conciencia de la población en general (Thomas *et al.*, 2010), ya que requiere encontrar un equilibrio entre la conservación de la biodiversidad, la gestión del

ecosistema y la vida humana que depende de él (Dudgeon *et al.*, 2006). Es por lo tanto una tarea difícil, y en Europa se encuentran pocos ejemplos de mejora de poblaciones de *M. margaritifera* a partir de acciones en el ecosistema: en el río Lutter (Alemania), se observó una recuperación del reclutamiento de juveniles tras la reducción de los niveles de sedimentación (Geist, 2010), o la supresión de 4 presas en el río Biala (Polonia) produjo un aumento en la migración de peces y permitió la recolonización de tramos de río por unionidos (Zajac *et al.*, 2015).

Las técnicas de reproducción y cultivo artificial pueden ayudar a la recuperación de poblaciones de *M. margaritifera* (Geist, 2010), ya que permite tener un control sobre las fases más críticas del ciclo, asegurando en la medida de lo posible la parasitación de los peces, la supervivencia de los juveniles y, en último lugar, su liberación al medio (Thomas *et al.*, 2010). En Europa, se han reportado 46 planes de cultivo *ex situ* de náyades en los últimos 30 años, repartidos 16 países distintos, que emplean estrategias muy diversas en cuanto a la intensidad, tamaño, especies y número de juveniles producidos, y el momento de su liberación. La falta de financiación suele ser el mayor problema de estos programas, ya que la mayoría son apoyados por fondos nacionales y europeos con una duración máxima de 3-6 años, lo que es insuficiente con especies como *M. margaritifera* que alcanza la madurez sexual alrededor de los 10-15 años (Geist *et al.*, 2023).

El noroeste de la península ibérica es muy importante para la conservación de *M. margaritifera*, y Galicia constituye alrededor del 70% de su distribución histórica (Lois *et al.*, 2014). En el año 2010, se inició un plan conjunto de mejora del hábitat en la cuenca del río Ulla (Galicia) y de cultivo *ex situ* de la especie, el primero de su tipo en España (Castrillo *et al.*, 2022) y que se mantiene en activo actualmente (Rodríguez-Larrinaga *et al.*, 2015).

Es primordial diseñar correctamente estos planes de conservación *ex situ*, ya que requieren de tiempo y medios considerables (Österling, 2015), y la identificación de hospedadores idóneos en función de la zona considerada es un paso obligatorio, sin el cual los esfuerzos de conservación pueden resultar vanos (Taeubert y Geist, 2017; Clements *et al.*, 2018; Thomas *et al.*, 2010). En este sentido, la relación que mantienen las náyades con las dos especies de peces hospedadores no suele ser bien conocida, y frecuentemente se encuentran en la literatura resultados contradictorios.

En poblaciones centroeuropeas se ha identificado a la trucha común como único hospedador, mientras que en el norte de su área de distribución se describen otras que parasitan casi exclusivamente los salmones (Ieshko *et al.*, 2016; Osterling, 2015). A su vez, se han observado poblaciones que son capaces de parasitar a ambas especies de salmónidos mostrando diferencias en el éxito de la fase parasitaria en función del hospedador, lo que parece estar asociado a su

convivencia histórica en los ríos (Salonen *et al.*, 2017). En estas poblaciones, se ha identificado típicamente una especie como hospedador principal, generalmente a partir del estudio de la tasa de infestación, de la prevalencia y del crecimiento de los gloquidios (Marwaha *et al.*, 2021).

En la península ibérica, a pesar de su importancia, sigue existiendo falta de conocimiento sobre esa relación parásito-hospedador. Con este punto de partida, el objetivo principal de este trabajo ha sido tratar de identificar si alguna de las dos especies de hospedadores posibles, *Salmo salar* o *Salmo trutta*, se comportan con mayor o menor idoneidad para el desarrollo de la fase larvaria de las poblaciones de *M. margaritifera* del río Ulla con el fin de optimizar el cultivo *ex situ* de la especie en Galicia.

2. OBJETIVOS

Se definen como objetivos de este trabajo:

1. Ampliar el conocimiento sobre la fase parasitaria de *M. margaritifera*, con el fin de mejorar las estrategias de conservación *ex situ*.
2. Evaluar las características de la infestación artificial por gloquidios de *M. margaritifera* en dos especies de salmónidos: trucha común (*Salmo trutta*) y salmón atlántico (*Salmo salar*), mediante el análisis de la prevalencia, la tasa de infestación y el tamaño de los quistes en las branquias de los peces hospedadores.
3. Evaluar la eficacia del salmón atlántico frente a la trucha común como hospedadores de *M. margaritifera* en la conservación *ex situ* e *in situ*.
4. Análisis del impacto de la infestación artificial sobre los peces a lo largo de la parasitación a través de la evolución de su factor de condición.
5. Evaluar si la procedencia de los juveniles que completen su ciclo parasitario en diferente pez hospedador tiene influencia en los resultados del cultivo mediante el análisis de su supervivencia y crecimientos a los seis meses.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Localización de las instalaciones

El procedimiento experimental tuvo lugar entre septiembre de 2021 y noviembre de 2022 en las instalaciones del “Centro ictiológico de O Veral” (Lugo, España), que está dedicado al cultivo de salmónidos para repoblación en los ríos gallegos, y en el que se ubica una estación de cría de *M. margaritifera*.

3.2. Material utilizado

Para el desarrollo del protocolo experimental, se utilizaron 4 tanques de 500 litros con circuito de agua abierto para el cultivo de peces y 4 tanques de 500 litros con sistema de recirculación (RAS) para la obtención de juveniles de *M. margaritifera*. El agua de los circuitos RAS es previamente tratada por un sistema de UV y cada tanque posee un sistema de biofiltración y termorregulación.

Para la cría de juveniles de *M. margaritifera* se contó con una cámara acondicionada a una temperatura constante a 17°C.

Para la obtención de imágenes se utilizó un equipo óptico compuesto por una lupa Leica ® M125 acoplada a una cámara Leica ® M170HD y un microscopio Leica ® DM750 acoplado a una cámara Leica ® (RR) ICC50HD.

El procedimiento fue aprobado por los comités de bioética de la Universidad de Santiago de Compostela y de la Xunta de Galicia, y se realizó según la Directiva Nacional para la Experimentación Animal (RD 53/2013 y Ley 6/2013) e Internacional (Directive 2010/63/EU).

3.3. Selección de peces

Todos los peces empleados para el experimento eran descendientes de ejemplares salvajes capturados en el río Ulla (Galicia) (Fig. 3.1a) nacidos en la piscifactoría, asegurando la ausencia de contacto previo con gloquidios de *M. margaritifera*.

3.4. Selección de gloquidios

En el mes de septiembre de 2021, se recolectaron gloquidios procedentes de varios ejemplares adultos de *M. margaritifera* en el río Ulla (Fig. 3.1a). Para conseguirlos se realizó un muestreo para localizar individuos fecundados. El proceso consiste en separar ligeramente sus valvas con unas pinzas invertidas para comprobar si sus branquias tenían marsupios con gloquidios en incubación (Fig. 3.1d). A continuación, se examinaron los gloquidios con un microscopio de campo para estimar qué proporción se encontraban en fase infestante (Fig. 3.2b). Los ejemplares

grávidos se introdujeron en una bolsa de plástico con agua de río, lo que suele provocar la expulsión espontánea de los gloquidios (Hastie y Young 2003) (Fig. 3.2a).



Figura 3.1.- (a) recorrido del río Ulla en Galicia; (b) Búsqueda de ejemplares grávidos de *Margaritifera margaritifera*; (c) Ejemplares adultos de *M. margaritifera* en el lecho fluvial; (d) Separación cuidadosa de valvas de ejemplares adultos para el examen de sus branquias.

De los 227 individuos examinados, 9 resultaron positivos, y solo dos fueron seleccionados (códigos C-149 y C-150) para su traslado a la estación de cultivo. En el laboratorio se determinó la vitalidad de los gloquidios bajo microscopio exponiéndolos a cambios repentinos de intensidad de luz (Fig. 3.2b). Se espera que los viables reaccionen a este estímulo abriendo y cerrando rápidamente sus valvas. Para estimar el número total de gloquidios disponibles se realizaron varios recuentos bajo microscopio utilizando una cámara de Neubauer.

3.5. Infestación

Dos grupos compuestos por 250 truchas y 250 salmones juveniles con edades 0+ se introdujeron en dos cubetas con agua de río a 15°C. Sobre ellos se vertió una suspensión de infestación con una concentración de 30.000 gloquidios/litro (Fig. 3.2d,e) resultante en una dosis de 1.000 gloquidios/pez tras ajustarla al número de peces y al volumen de agua de la cubeta.

Las cubetas contaban con aireadores y se fueron removiendo para asegurar la suspensión de los gloquidios a lo largo del proceso de infestación, que duró 30 minutos (Fig. 3.2).

3.6. Cría de peces

Después de la exposición a los gloquidios, cada lote de peces se trasladó a un tanque de 500L (Tab. 3.1; Figs. 3.3a,b) (densidad: 0,5 peces/L), y tras 49 días se hizo un desdoble del contenido de cada tanque (Tab. 3.2), resultando al final 4 tanques con peces infestados: T3 y T4 con salmones, y T5 y T6 con truchas. Todos los tanques contaban con un sistema de circulación de agua en circuito abierto, con una tasa de 9 a 12 renovaciones/día.

Durante todo el tiempo de desarrollo de los gloquidios en las branquias, ambos grupos de peces fueron alimentados 5 días a la semana con pienso seco (Nutre HP, Skretting®), con una dosis que se fue ajustando para que correspondiera a 1% del peso corporal de los peces. La temperatura del agua fue medida cada 3 horas con un termógrafo (UX100, Onset HOBO®), lo que permitió calcular los grados-día acumulados [$\Sigma(T^{\circ}\text{C máxima día} + T^{\circ}\text{C mínima día})/2$]. Se revisaron los tanques diariamente para controlar su estado físico y retirar los potenciales ejemplares muertos, y se monitorizó la calidad del agua midiendo valores totales de nitrito, nitrato y amonio con un espectrofotómetro (HI 83203, HANNA instruments®) (Fig 3.3c,d).



Figura 3.2.- Proceso de infestación de truchas y salmones. (a) ejemplar adulto salvaje de *M. margaritifera* en una bolsa de plástico para la obtención de gloquidios; (b) Determinación de la vitalidad de los gloquidios bajo microscopio; (c) preparación de los barreños con agua de río para la infestación artificial, con aireación artificial y control de temperatura; (d) barreño conteniendo agua de río y peces para la infestación; (e) incorporación de la suspensión de gloquidios a los barreños conteniendo los peces.



Figura 3.3.- Cría de peces y monitorización de la calidad del agua. (a) Sistema de tanques en circuito abierto (b) detalle de un tanque con peces infestados durante la revisión diaria; (c) Detalle del espectrofotómetro utilizado para el análisis del agua; (d) análisis semanal de los derivados nitrogenados en el agua

3.7. Control de infestación

Para el seguimiento de la parasitación en salmones y truchas, se retiraron de forma aleatoria 10 peces de cada lote en los días 1, 49, 122 y 207 postinfestación (PI) (Tab. 3.1 y 3.2). Esos peces se anestesiaron y eutanasiaron individualmente por sobredosis anestésica, introduciéndolos en una cubeta que contenía 200mg/L de metanosulfonato de triclaína (MS-222, Sigma Aldrich®) tamponado con 400 mg/L de bicarbonato sódico. Se confirmaron las muertes mediante la sección de la médula espinal. En cada control se determinó el peso ($\pm 0,1g$) y longitud ($\pm 0,1cm$) de cada pez sacrificado, y se calculó el factor de condición de Fulton ($\text{peso} \times 100/\text{longitud}^3$), que permite expresar numéricamente variaciones del estado de salud o bienestar de los peces (Fig. 3.4c).

A continuación, se diseccionaron los cuatro arcos branquiales izquierdos de cada pez sacrificado. Los arcos se examinaron al microscopio de manera consecutiva, haciendo 8 recuentos de quistes por pez (un recuento por cada lado en cada hemibranchia) (Fig. 3.4a,b).

Especie, procedencia	Mejillones (etiquetas, río, localidad)	Tanque	Nº peces el 23/09/2021	Controles de infestación
Salmón, Ulla	C-149, C-150	T3	250	24/09/21 (día 1 PI)
Trucha, Ulla	Ulla, Basadre	T6	250	11/11/21 (día 49 PI)

Tabla 3.1.- Resumen de las actividades en los tanques de peces desde la infestación (23/09/2021) hasta el día 49 PI (11/11/21).

Especie, procedencia	Mejillones (etiqueta, río, localidad)	Tanque original	Desdoble (día 49 PI)	Nº peces (día 49 PI)	Controles infestación	Nº peces infestados a 19/04/2022
Salmón, Ulla	C-149, C-150 Ulla, Basadre	T3	T3	115	24/01/22 (día 122 PI)	70
			T4	115		61
Trucha, Ulla		T6	T5	104	18/04/22 (día 207 PI)	45
			T6	105		43

Tabla 3.2.- Resumen de las actividades en los tanques de peces a partir del desdoble del día 49 PI (11/11/21) y hasta el día 208 PI (19/04/2022).

La tasa de infestación se calculó multiplicando por dos el número de quistes contabilizados, asumiendo que su número sería similar en los arcos branquiales del lado derecho. También se calculó la tasa de infestación estandarizada por peso (número quistes/gr), y la prevalencia se determinó dividiendo el número de individuos infestados por el número total de peces examinados.

Se tomaron fotografías bajo microscopio de los arcos branquiales. Esto sirvió para medir la longitud del eje mayor de los quistes, como indicador de tamaño, con el programa ImageJ v.1.52a. Se midieron un mínimo de 40 quistes de cada grupo de peces en cada control, lo que permitió calcular el crecimiento medio diario de los quistes entre los controles $[(\text{Tamaño final} - \text{Tamaño inicial}) / \text{número de días entre controles}]$ ($\mu\text{m}/\text{día}$).

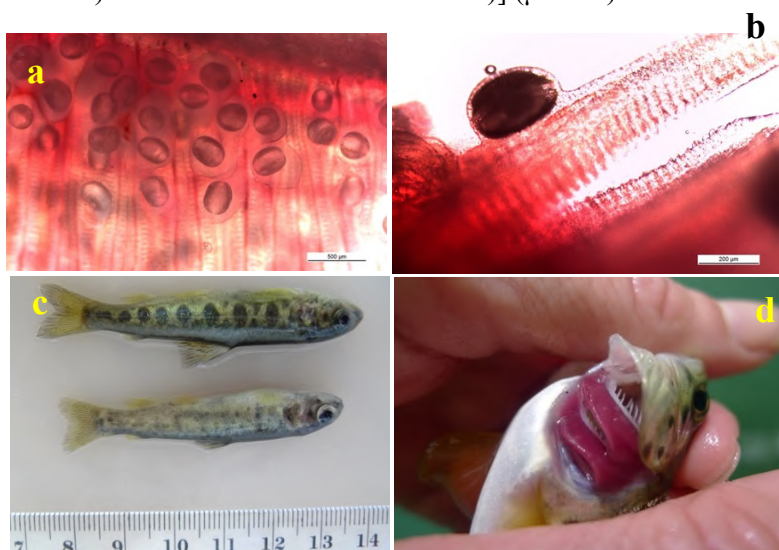


Figura 3.4.- Controles de infestación y triaje de peces. (a) Quistes en las branquias de un salmón; (b) Detalle de un quiste en fase avanzada en la branquia. (c) Toma de medida de los peces sacrificados; (d) Examen de las branquias de un pez durante el triaje.

3.8. Recolección de juveniles de *M. margaritifera*

El día 19 de abril de 2022 (día 208 PI), se realizó un triaje de todos los peces para separar los infestados de los no infestados (Fig. 3.4d), obteniéndose 131 salmones y 88 truchas infestadas que fueron utilizados para la recolección de juveniles. Para este proceso se introdujo cada lote de peces en un sistema de circulación de agua en circuito cerrado (RAS) (Fig. 3.5a,b) durante 33 días (20 de abril a 23 de mayo de 2022). Para favorecer y sincronizar el desprendimiento de los juveniles de las branquias, se incrementó la temperatura del agua 1°C por día, hasta alcanzar los 17°C, manteniéndose constante hasta el final de la cosecha.

Los juveniles fueron recogidos diariamente en unos tamices con una malla de 150µm, y se contaron, fotografiaron y seleccionaron según criterios de tamaño, color, forma y actividad (Fig. 3.5c), desechando aquellos que se consideraban inmaduros o inviábiles.

Al final del proceso se recolectaron 78.606 semillas procedentes de truchas, de las cuales 32.646 eran viables. En salmones se recolectaron 175.380 semillas, de las cuales 69.901 eran viables.

3.9. Cría de juveniles

Los juveniles seleccionados se separaron en lotes de 200 individuos y se introdujeron en cajas de poliuretano cerradas de 500 mL de volumen y 200 cm² de superficie de fondo, mantenidas a una temperatura de 18°C en una cámara incubadora (Fig. 3.6a). Todo el material es lavado y esterilizado diariamente, incluidas las cajas de cultivo. El medio de cultivo consistió en agua de río tratada (filtrada y atemperada), un preparado comercial de algas (Nanno 3600 y Shellfish Diet 1800 de Reed Mariculture®) y un filtrado de 100µm de detrito de prado húmedo, y fue renovado cada semana. La cantidad de algas y de detrito se ajustó a lo largo del proceso de cría (Tab. 3.3).

Juveniles	Algas (/10 L de agua de río)	Detrito (ml/10 L de agua de río)
Caída -> 1 mes	120 µl Shellfish 1800 4 gotas Nanno 3600	10 ml
1 mes -> 1mm	240 µl Shellfish 1800 8 gotas Nanno 3600	15 ml
+1mm	360 µl Shellfish 1800 12 gotas Nanno 3600	25ml

Tabla 3.3.- Suministro de alimento semanal en cada cajas con juveniles, en función de su edad y tamaño.

Para el seguimiento del experimento se utilizaron 1600 ejemplares divididos en 8 cajas, 4 con los procedentes de salmones y 4 de truchas. Cada caja fue revisada semanalmente, con el cambio de dieta, y los ejemplares contados (Fig 3.6b,c), extrayendo los ejemplares muertos. En los días 1, 85 y 182 se tomaron fotografías bajo lupa, que fueron analizadas con el programa ImageJ v.1.53a para medir el eje mayor de al menos 40 juveniles de cada caja (Fig. 3.6d) y evaluar el crecimiento.

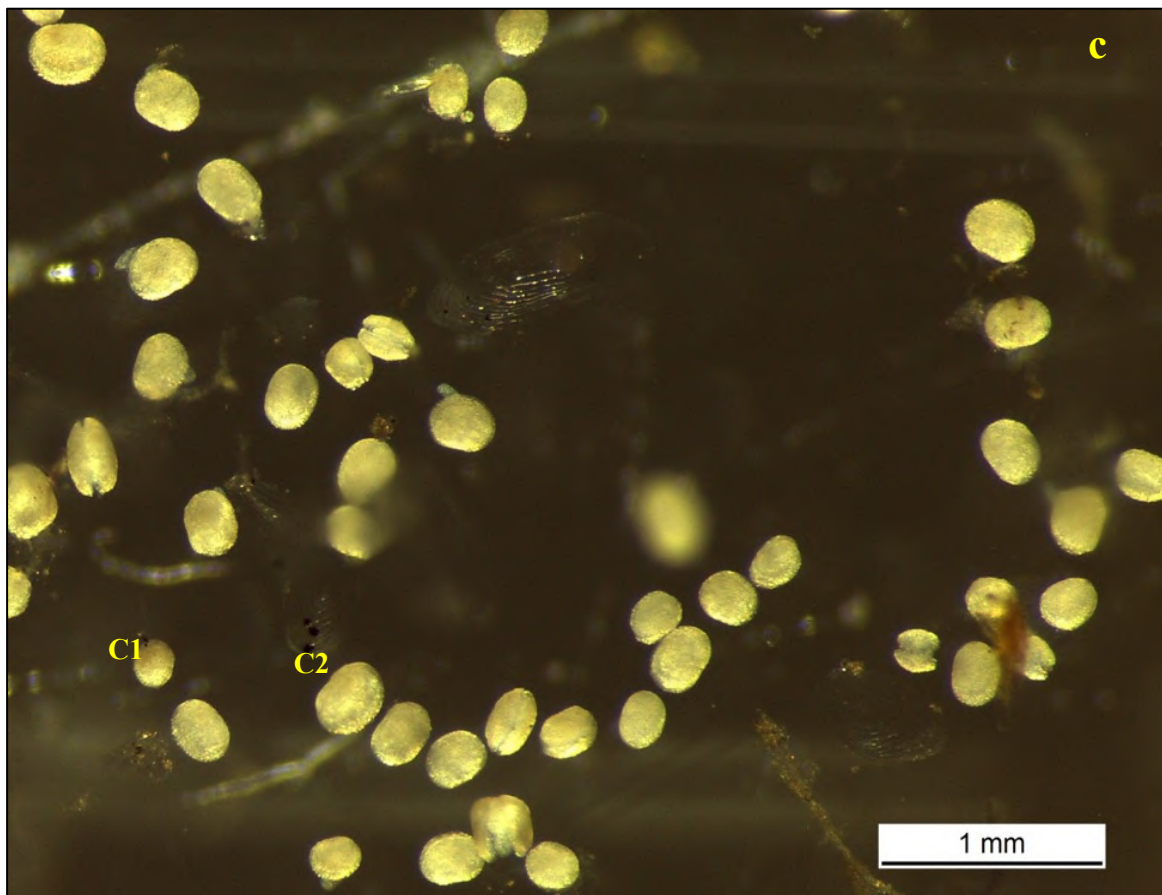
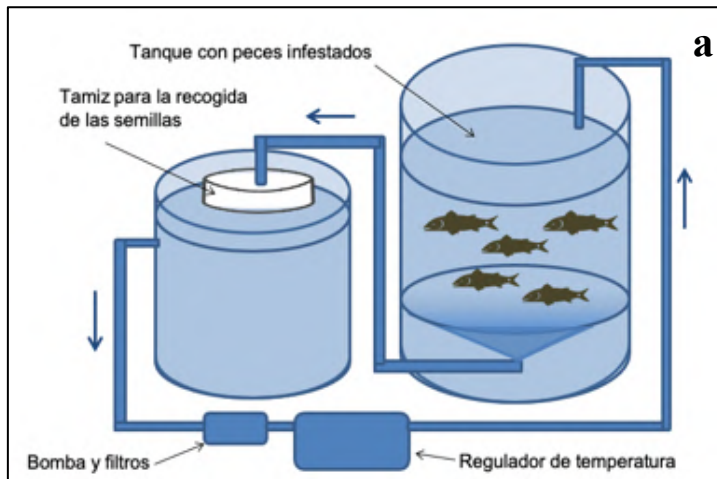


Figura 3.5.- Proceso de recolección y selección de las semillas. (a) esquema del sistema de circulación de agua en circuito cerrado (RAS); (b) foto del RAS; (c) selección de semillas recolectadas según criterios de vitalidad. C1: ejemplo de una semilla considerada no viable (tamaño pequeño, forma redonda); C2: ejemplo de una semilla considerada viable (tamaño adecuado, forma arriñonada).



Figura 3.6.- (a) cámara de incubación a temperatura constante para la cría de juveniles; (b) Revisión semanal bajo lupa de los tápers conteniendo las semillas; (c,d) Control fotográfico para el cálculo de crecimiento.

3.10. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa PAST4. Para cada variable se realizaron pruebas de normalidad (prueba de Shapiro-Wilk) y de homocedasticidad (prueba de Bartlett) para determinar la prueba estadística adecuada con un intervalo de confianza de 0,95 (nivel de significación 0,05).

La tasa de infestación de los peces, su factor de condición, el tamaño de los quistes y de los juveniles no se ajustó a los criterios paramétricos, y por lo tanto se aplicó la prueba de rangos de Wilcoxon para su comparación entre ambas especies, con un nivel de significación de 0,05.

Para determinar la correlación entre la tasa de infestación y el factor de condición se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman, también con un nivel de significación de 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Descripción de las condiciones del periodo de parasitación

La temperatura media del agua de los tanques de peces infestados disminuyó en los meses más fríos del período de parasitación. La temperatura media mínima de 8,6°C se registró entre el segundo y el tercer control. Tal y como se puede observar en la figura 4.1, la temperatura máxima registrada ocurrió el día 22 postinfestación (15°C), y la mínima el día 82 postinfestación (5,5°C).

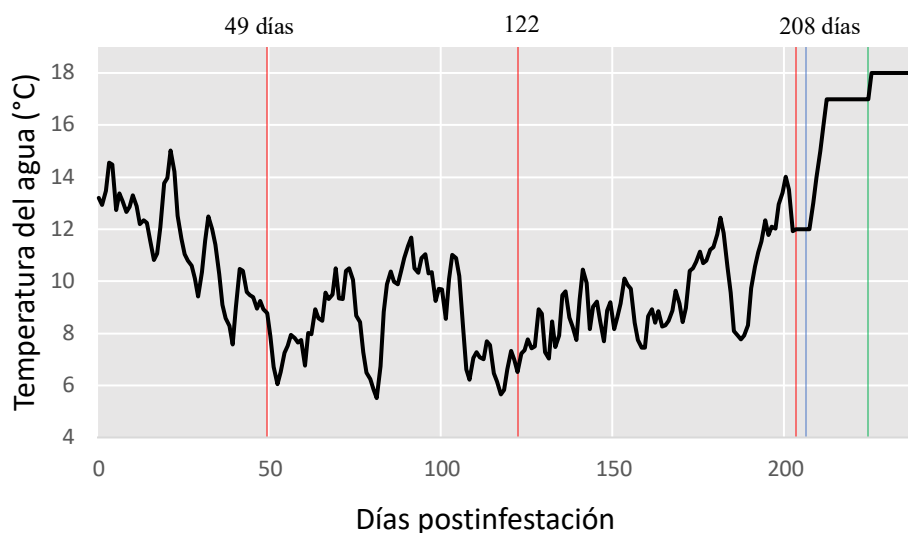


Figura 4.1.- Temperatura diaria del agua a lo largo del proceso de cría (°C). Líneas rojas : controles de infestación realizados; Línea azul : inicio de la recolección de los juveniles; Línea verde : inicio de la cría en boxes; Valores : temperatura media (°C) entre controles.

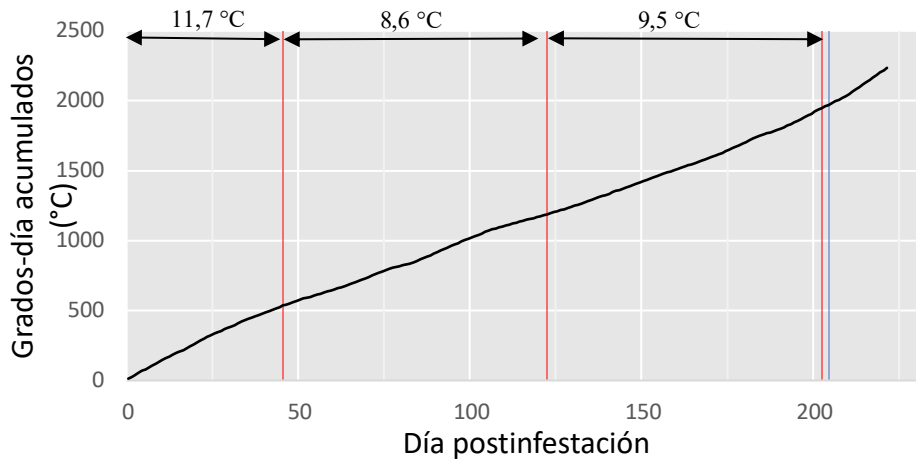


Figura 4.2.- Grados-día acumulados a lo largo del período de infestación. Líneas rojas : distintos controles de infestación realizados. Línea azul : inicio de la recolección de los juveniles.

En la figura 4.2 se puede observar el incremento constante de los grados-día acumulados (°C). En el momento de recolección de los juveniles, se habían acumulados 1947 grados-día.

4.2. Repercusión de la infestación sobre los peces hospedadores

Se utilizaron tres parámetros para evaluar la repercusión que tuvo la parasitación sobre las truchas y sobre los salmones fueron el peso medio, la longitud y el factor de condición de los peces.

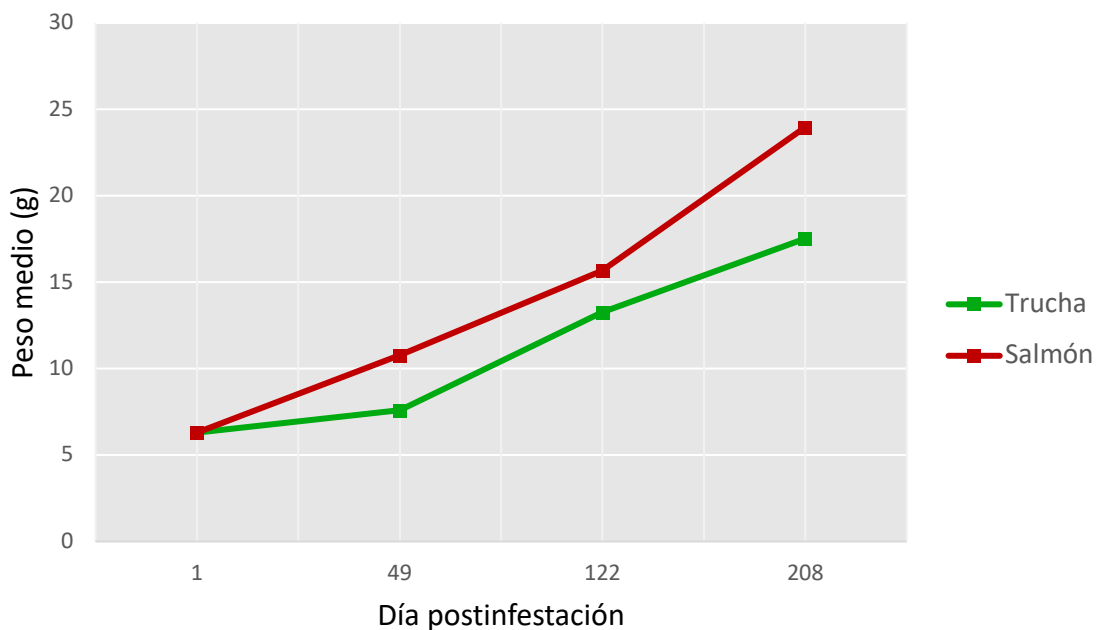


Figura 4.3.- Evolución del peso medio en gramos de los peces a lo largo del período de parasitación.

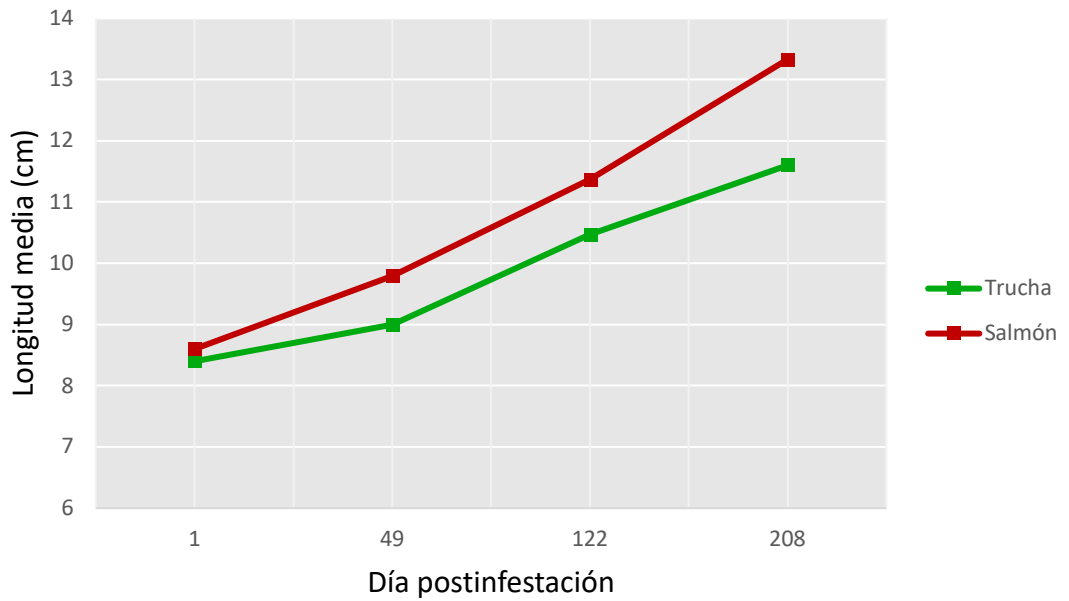


Figura 4.4.- Evolución de la longitud media (cm) de los peces a lo largo del período de parasitación.

En las figuras 4.3 y 4.4 se pone de manifiesto que tanto el incremento del peso como la longitud media evolucionaron de forma similar entre ambas especies de peces. También se evidencia que en el periodo inicial (de 1 a 49 días), la parasitación afectó más a las truchas, que apenas incrementaron su peso y longitud. Posteriormente, parecen recuperarse, aunque los salmones mostraron en todo momento un crecimiento superior.

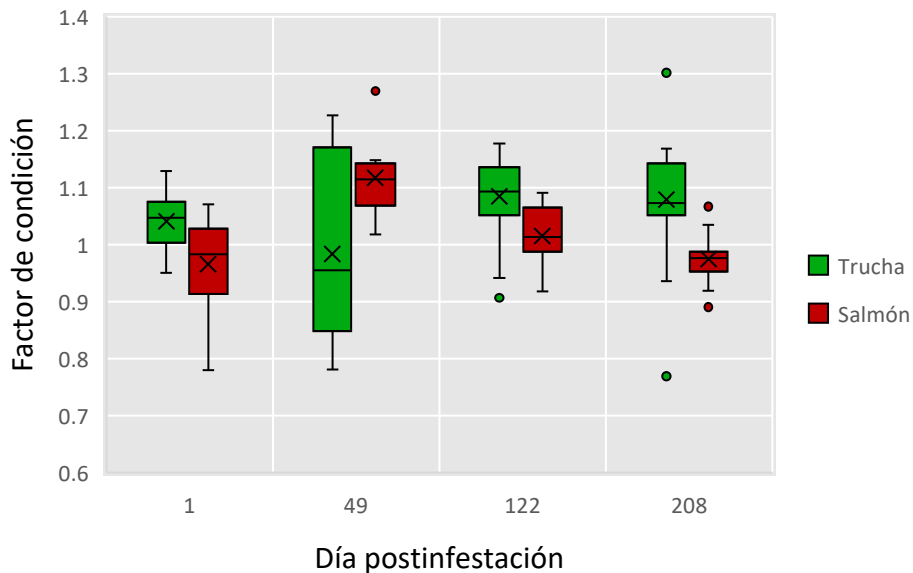


Figura 4.5.- Valores del factor de condición de los peces en cada control realizado durante el período de parasitación (la X indica la media).

Tal y como se puede apreciar en la figura 4.5, se produjeron diferencias en la evolución del factor de condición de los peces de ambas especies a lo largo del experimento. A día 1, las truchas tenían un factor de condición significativamente superior al de los salmones ($p=0,0312$). En los siguientes 49 días disminuye, hasta situarse por debajo del de los salmones. A partir del día 49, las truchas vuelven a mostrar valores de factor de condición por encima del valor óptimo 1, mientras que el de los salmones, que tuvieron una mayor ganancia en longitud que en peso en este período (Figs. 4.3 y 4.4), disminuye hasta ser significativamente inferior el día 208 ($p=3,72e-05$) (Fig. 4.5). En cada uno de los controles realizados, el valor medio del factor de condición se mantuvo entre 1,0 y 1,1, con valores oscilando entre 0,77 como mínimo y 1,3 como máximo (Fig. 4.5).

4.3. Comparativa sobre la parasitación en truchas y salmones

A lo largo de la parasitación se sacrificaron 10 truchas y 10 salmones en cada control, y a partir del examen de sus branquias se calculó la prevalencia de quistes de las dos especies (salvo en el control de los 208 días, donde se utilizaron los resultados del triaje porque permite revisar todos los peces y no una muestra), la tasa de infestación normalizada por peso del pez (nº de quistes/g de pez), y el tamaño de los quistes que portaban.

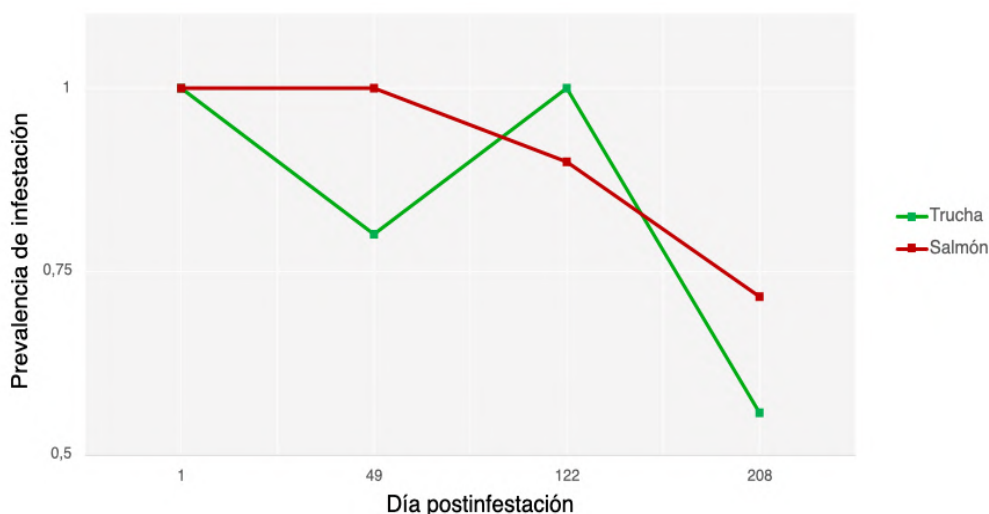


Figura 4.6.- Prevalencia de la infestación en la dos especies de peces durante el período de parasitación. Los datos de los días 1, 49 y 122 provienen de las muestras de 10 peces sacrificados en cada control. Los datos del día 208 proceden del triaje de los peces realizado al final del periodo parasitario.

En la figura 4.6 se puede seguir la evolución de la prevalencia para ambos hospedadores, que va disminuyendo a medida que avanza la fase parasitaria. Así podemos observar que, en el primer día tras la infestación, ambos hospedadores mantuvieron una prevalencia del 100 %. En el segundo control (día 45) la prevalencia en truchas disminuyó, mientras que los salmones mantuvieron el 100% de prevalencia hasta el tercer control (día 122). En el cuarto control, que

contó con datos del triaje completo de los peces, siendo los valores de prevalencia de un 72% en salmones y un 56% en truchas.

La figura 4.7 muestra que en ambos hospedadores se produce un notable descenso de la tasa de infestación normalizada (quistes/g de pez) a lo largo del periodo de parasitación. Este descenso es más abrupto en los salmones, mientras que las truchas mantuvieron tasas medias superiores en todos los controles, siendo significativas las diferencias a los 49 y 122 días (Tab. 4.1). En el último control (a los 208 días), las tasas de los dos hospedadores son muy bajas y próximas entre sí y, aunque sigue siendo más alta la de las truchas, no presenta diferencias significativas con respecto a la de los salmones (Tab. 4.1).

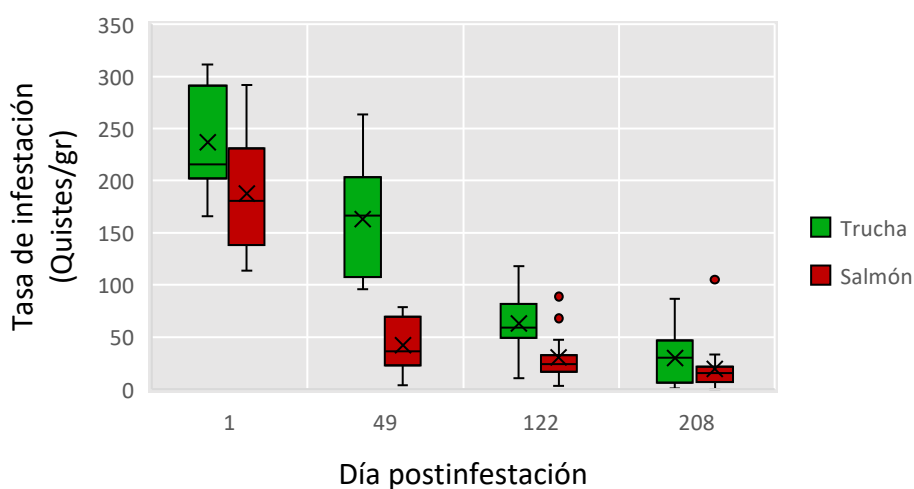


Figura 4.7.- Valores de la tasa de infestación normalizada (quistes/g) de los peces en cada control del periodo de infestación (la X indica la posición de la media)

Para determinar el efecto de la tasa de infestación sobre los peces, se analizó la relación entre la tasa de infestación normalizada (quistes/g de pez) y el factor de condición.

En las figuras 4.8 y 4.9 se observa un descenso en el factor de condición de los peces de ambas especies cuando incrementa la tasa de infestación. En las truchas, esa correlación fue significativa ($R^2= 0,214$; $p= 0,00042$), mientras que en los salmones no se encontró una correlación significativa ($R^2= 0,052$; $p= 0,0926$).

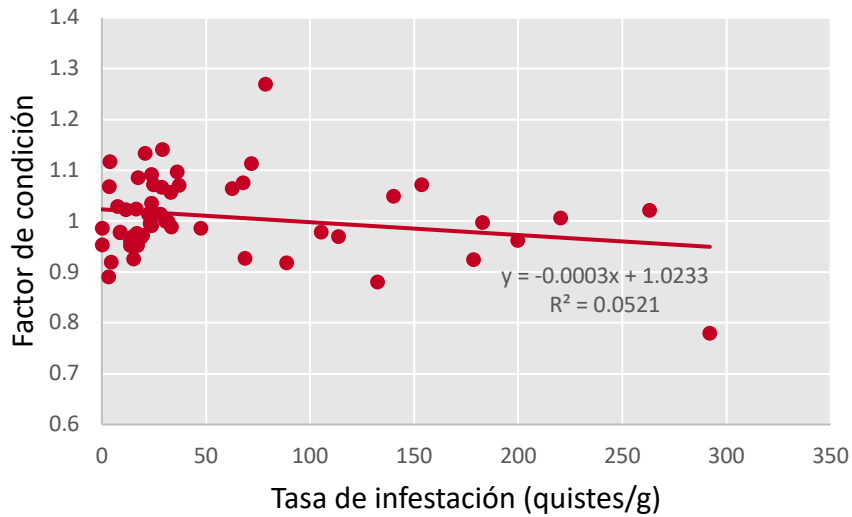


Figura 4.8.- Correlación entre el factor de condición y la tasa de infestación normalizada de los salmones (quistes/g).

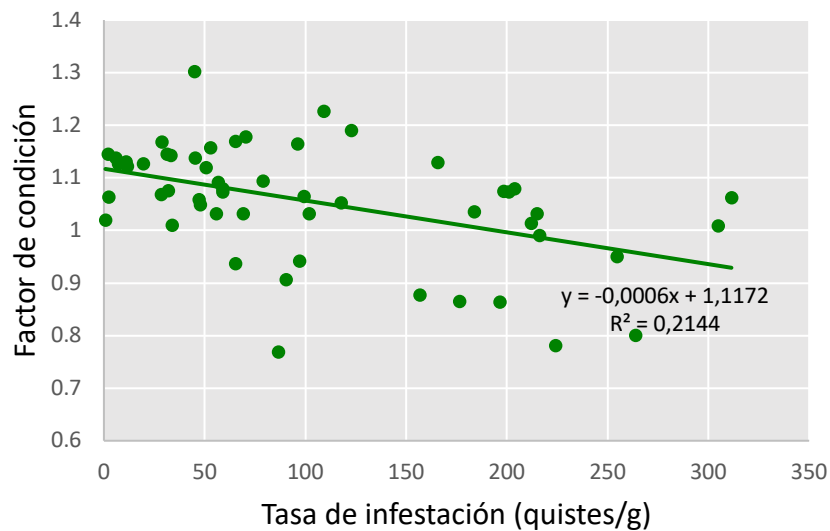


Fig. 4.9.- Correlación entre el factor de condición y la tasa de infestación normalizada de las truchas (quistes/g)

A partir de los datos resultantes de las mediciones de los quistes realizadas en cada control, se elaboró la gráfica de la figura 4.10. En ella se observa un aumento progresivo del tamaño de los quistes, más acusado en el caso de los salmones, de modo que a partir de los 45 días de parasitación estos muestran diferencias significativas con respecto al tamaño de los quistes de las truchas, incrementándose esa diferencia en los controles posteriores (Tab. 4.1).

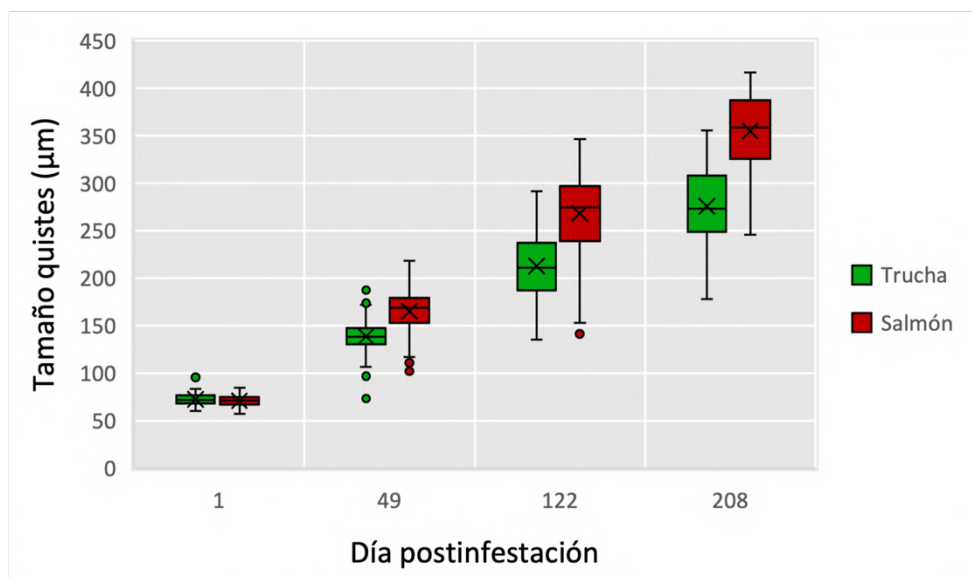


Figura 4.10.- Tamaño de los quistes en las branquias de truchas y salmones en cada uno de controles realizados durante el periodo de parasitación.

Día	Especie	Prevalencia (%)	Tasa infestación (quistes/g de pez)	Wilcoxon (p)	Tamaño quistes (µm)	Wilcoxon (p)
1	Trucha	100	237 ± 50	0,064	72 ± 6	0,262
	Salmón	100	188 ± 58		71 ± 6	
45	Trucha	80	163 ± 56	0,00044***	139 ± 16	2.95E-20***
	Salmón	100	58 ± 53		165 ± 23	
122	Trucha	100	63 ± 27	0,00065***	213 ± 33	5.79E-19***
	Salmón	90	30 ± 22		268 ± 40	
208	Trucha	56	32 ± 26	0,188	276 ± 40	7,92e-19***
	Salmón	72	20 ± 24		355±38	

Tabla 4.1.- Prevalencia de quistes en las branquias (%), tasa de infestación normalizada (quistes/g de pez) y tamaño medio de los quistes (µm) en los controles sucesivos, en función de la especie. Comparación mediante el test de Wilcoxon de la tasa de infestación y del tamaño medio de los quistes de trucha y salmón (** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$).

4.4. Producción y viabilidad de los juveniles

En este apartado se expondrán los resultados sobre el número de juveniles de *M. margaritifera* que se produjeron con los dos hospedadores, y la viabilidad de esos juveniles. Para esto último se analizarán los tamaños iniciales, su ritmo de crecimiento y tasa de supervivencia que mostraron durante los primeros 182 días tras el desenquistamiento.

Tras 7 meses como parásitos de los peces (208 días desde la infestación), se inició el proceso de recolección, contaje y cultivo de los juveniles de *M. margaritifera* desprendidos de las branquias. El resultado del triaje previo de los peces fue el siguiente: 88 truchas y 131 salmones presentaban

quistes en las branquias (Tab. 4.2). La prevalencia fue de 56% en truchas y 72% en salmones (Fig. 4.6).

Tal y como se muestra en la figura 4.11 el periodo de recolección fue de 30 días en el caso de las truchas y de 37 en el caso de los salmones. Además, en los salmones el pico de recolección tuvo lugar más tarde que en las truchas, y fue mucho más patente.

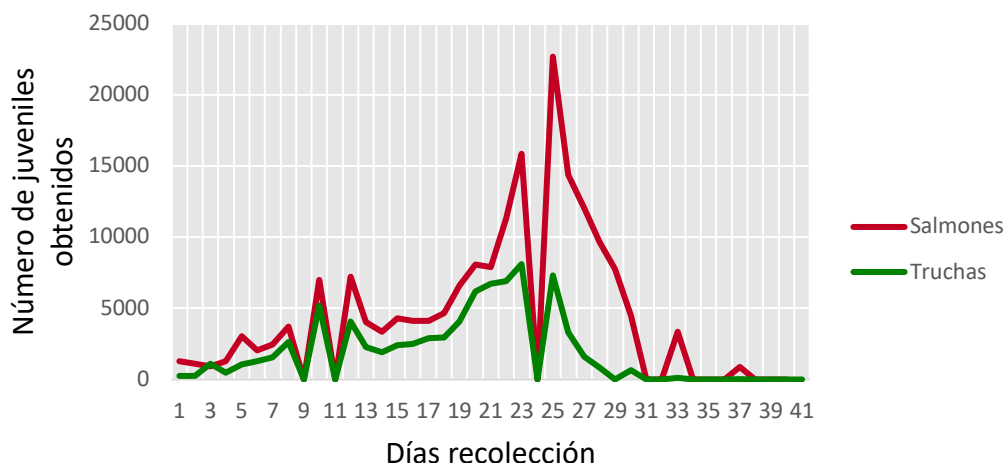


Figura 4.11.- Número juveniles recolectados cada día a lo largo del período de recolección.

El número de juveniles de *M. margaritifera* recolectados fue notablemente mayor cuando se utilizaron los salmones (175.380 juveniles) que las truchas (78.606 juveniles) (Tabla 4.2 y Fig. Fig. 4.12). Esto no solo se debió a que fue mayor el número de salmones que mantuvieron los quistes hasta el final del periodo de parasitación (131 salmones frente a 88 truchas) (Tab. 4.2), sino también porque cada salmón retuvo un mayor número de quistes. Solamente cuando se considera el número de juveniles viables con relación al peso de los peces, los resultados de truchas y salmones se aproximan, tal y como se puede observar en la Tabla 4.2.

Especie	Número de peces	Juveniles totales	Juveniles viables	Juveniles totales/pez	Juveniles viables/pez	Juveniles viables/g de pez
Trucha	88	78.606	32.646	893,25	370,98	21,16
Salmón	131	175.380	69.901	1.338,78	533,60	22,25

Tabla 4.2.- Número total de peces con quistes tras 208 días desde de la infestación; número total de juveniles de *M. margaritifera* recolectados; número total de juveniles viables; número total de juveniles con relación al peso medio de los peces; número de juveniles viables con relación al número de peces; número de juveniles viables con relación al peso de peces.

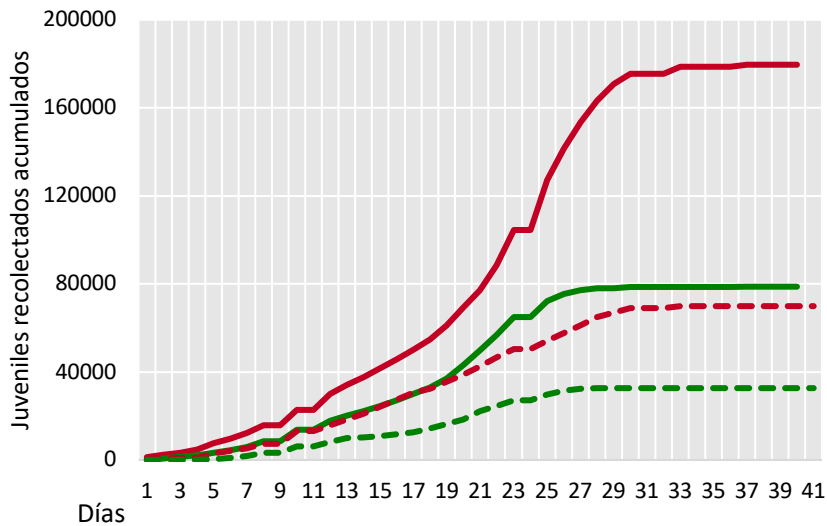


Figura 4.12.- Número acumulado de juveniles recolectados a lo largo del período de recolección. Rojo : salmónes ; Verde: truchas ; Línea: juveniles totales; Punteado: juveniles considerados viables.

Se calculó el porcentaje de supervivencia de los juveniles procedentes de hospedadores trucha y salmón tras 85y 182 días de cultivo en cajas, y tal, y como se puede observar en la figura 4.13, que los juveniles procedentes de truchas tuvieron un porcentaje de supervivencia inferior al de los salmónes. Tras 26 semanas de crecimiento en cajas, los salmónes mantuvieron un porcentaje de supervivencia superior a 95%, mientras que en las truchas disminuyó hasta menos del 82%.

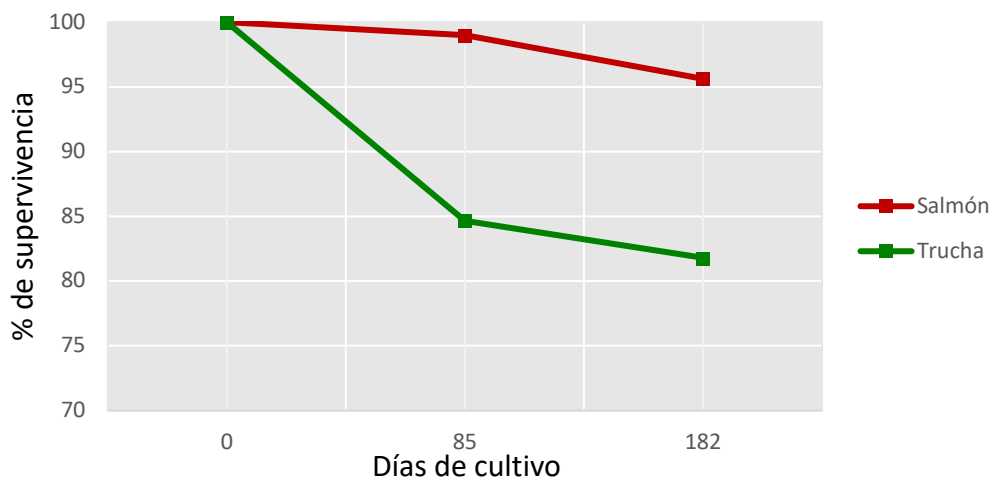


Figura 4.13.- Porcentaje de supervivencia de los juveniles con hospedador trucha y salmón en dos controles durante su cultivo en cajas.

En lo que se refiere al tamaño, en la figura 4.14 es patente que, en el momento del desprendimiento de las branquias, los juveniles que tuvieron como hospedadores a los salmones eran más grandes que los de las truchas. Las diferencias de tamaño fueron significativas ($p= 5,53e-27$), y siguieron siéndolo tras 85 días de cultivo ($p= 0,000115$). Solo tras 182 días de cultivo los tamaños de los juveniles se igualan y sus diferencias dejan de ser significativas. ($p= 0,7608$ n.s.).

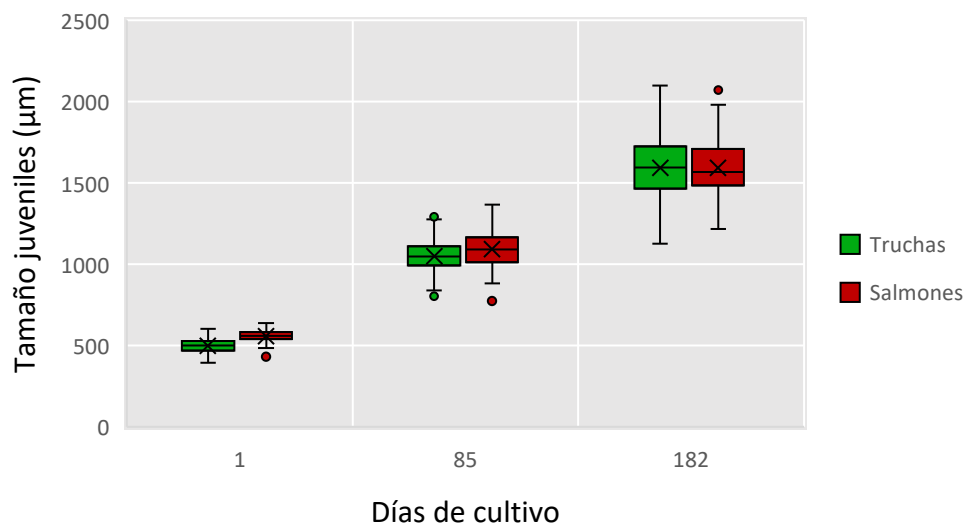


Figura 4.14.- Tamaño de los juveniles en función de su especie hospedadora, en tres controles durante el período de cultivo en cajas.

El ritmo de crecimiento diario, expresado como $\mu\text{m}/\text{día}$, ha tenido variaciones a lo largo del proceso de cultivo. A partir del día 49 de enquistamiento en las branquias tuvo lugar una disminución del mismo en las dos especies, más marcado en los adheridos a truchas. A partir del desprendimiento de las postlarvas, el ritmo de crecimiento se incrementó de manera muy importante en los juveniles procedentes de ambas especies, y se mantuvo durante los 85 primeros días de cultivo. Entre los días 85-182, el ritmo volvió a disminuir ligeramente (Tab. 4.3).

Período (días)	Quistes			Juveniles	
	0-49	49-122	122-207	0-85	85-182
CMD Truchas ($\mu\text{m}/\text{día}$)	1,38	0,97	0,75	6,59	5,56
CMD Salmones ($\mu\text{m}/\text{día}$)	2,14	1,52	1,18	6,27	5,13

Tabla 4.3.- Crecimiento diario medio ($\mu\text{m}/\text{día}$) entre cada control de los quistes en las branquias y de los juveniles en boxes en función de la especie de salmónido.

En la figura 4.15 se puede ver que existe una relación directamente proporcional entre la temperatura del agua y el ritmo de crecimiento de los ejemplares de *M. margaritifera*, tanto

durante la fase parasitaria como durante el crecimiento en boxes. El crecimiento fue mayor en los períodos donde la temperatura media del agua era más caliente en comparación con los períodos más fríos.

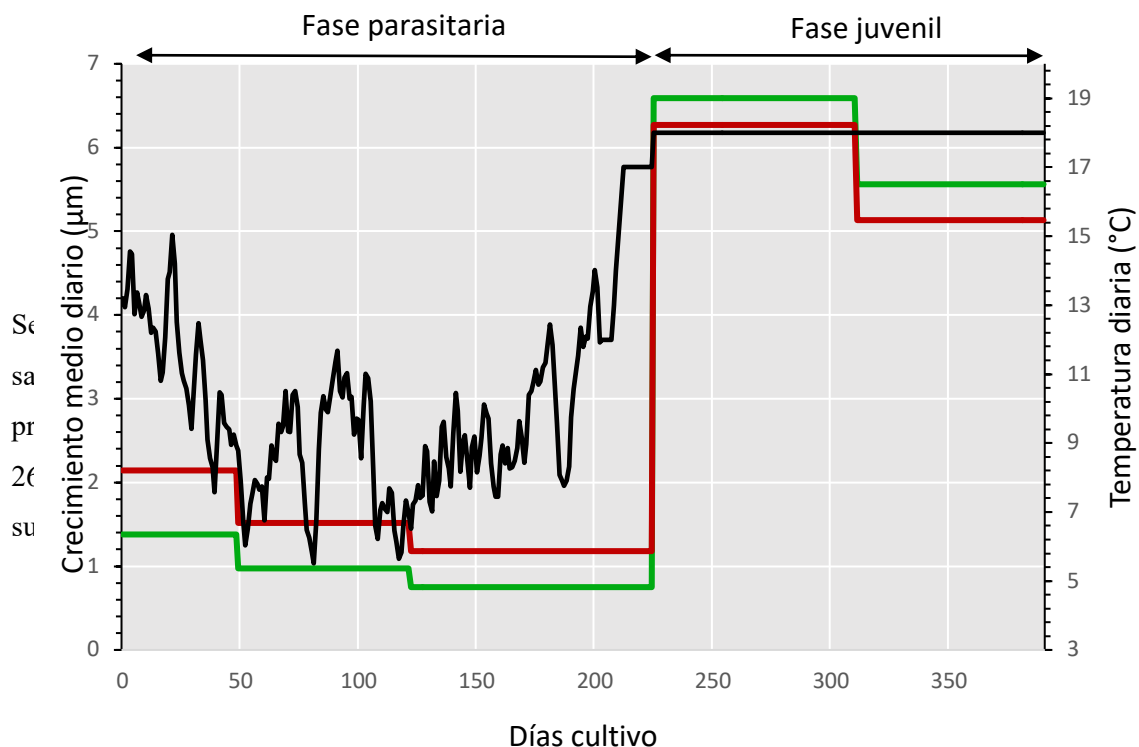


Figura 4.15.- Temperatura diaria (°C) y crecimiento medio diario ($\mu\text{m}/\text{día}$) de los quistes y de los juveniles en función de la especie de hospedador a lo largo del experimento. Línea negra: temperatura del agua; Línea roja: crecimiento medio diario (μm) de los quistes/juveniles de *M. marginifera* procedentes de salmones; Línea verde: crecimiento medio diario (μm) de los procedentes de truchas.

5. DISCUSIÓN

5.1. Influencia de la temperatura sobre la parasitación

Los grados-día permiten conocer los requerimientos de *M. marginifera* en cuanto a temperatura para completar su desarrollo parasitario en las branquias del hospedador. Taeubert *et al.* (2013) en un estudio donde los peces parasitados se mantuvieron a temperatura constante, encontraron que la caída de los juveniles de ocurría entre 1700 y 3400 grados-días tras la infestación, lo que indica una gran variabilidad individual del tiempo de desarrollo de los gloquidios. En nuestro experimento, se incrementó artificialmente la temperatura hasta alcanzar los 17°C para provocar el desprendimiento de los juveniles (Fig. 4.1), y se habían acumulado 1947 grados días en el momento de la recolección (Fig. 4.2). Como era esperable, la cantidad de juveniles recolectados por día aumentó paulatinamente junto con la temperatura de los tanques (Figs. 4.11 y 4.12) hasta

alcanzar un máximo alrededor del día 20 para ambas especies, lo que concuerda con los resultados encontrados por Scheder *et al.*, (2014) en un experimento donde los juveniles empezaron a desprenderse cuando la temperatura del agua alcanza 18°C.

La temperatura tiene una influencia sobre el crecimiento tanto de los quistes como de los juveniles (Young y Williams, 1984). Durante la fase parasitaria, el crecimiento medio diario máximo para ambas especies se situó entre los días 0 y 49 (Tab. 4.3; Fig. 4.15), lo que corresponde con el período con temperatura media y puntual máxima registrada (Fig. 4.1). Posteriormente y durante todo el período final de la fase parasitaria, la temperatura media no volvió a subir de 10 °C, y el crecimiento de los quistes disminuyó en ambas especies (Tab. 4.3; Figs. 4.1 y 4.15). Distintos autores encontraron una relación entre el descenso invernal de las temperaturas y un período de menor crecimiento de los quistes de *M. margaritifera* (Young y Williams, 1984), llegando a producirse una diapausa cuando la temperatura desciende por debajo de 8°C o 6°C (Murzina *et al.*, 2017) y durante la que el crecimiento de los quistes es casi nulo (Scheder *et al.*, 2014),.

Nuestros resultados concuerdan con los de la literatura, sin embargo, es posible que, en el río Mera en el que estas temperaturas han sido puntuales y no se han mantenido de forma sostenida, los quistes no entren en un período de diapausa completa, pero sigan creciendo a un ritmo más bajo. Para confirmar este resultado sería necesario efectuar controles más precisos del crecimiento de los quistes cuando la temperatura del agua está mínima, en nuestro caso entre el final del mes de noviembre y la primera mitad del mes de enero.

Es altamente probable que al final del período parasitario, cuando la temperatura del agua aumentó de manera importante, los quistes tuvieron un ritmo de crecimiento más alto, sin embargo, no se realizaron controles de crecimiento hasta la caída de los juveniles y el inicio de su cultivo en cajas, momento en el que se encontraron las tasas de crecimiento más altas de todo el experimento (6,59 $\mu\text{m}/\text{día}$ para las truchas y 6,27 $\mu\text{m}/\text{día}$ para los salmones), cuando los juveniles estaban a una temperatura constante de 18°C. Esta subida brusca del ritmo de crecimiento en el principio de la vida libre de las náyades concuerda con lo encontrado en la literatura (Eybe *et al.*, 2015; Marwaha *et al.*, 2017; Scheder *et al.*, 2014).

5.2. Efecto de la parasitación sobre los peces

El factor de condición establece una relación entre la longitud y el peso de los peces, y permite expresar numéricamente variaciones de su estado de salud o bienestar, a partir de la suposición de que, para una longitud determinada, los peces con más peso son los más sanos (Froese, 2006).

Taeubert *et al.* (2010) en un trabajo en el que testan hospedadores apuntan que el factor de condición no mostró diferencias significativas entre las tres cepas de trucha común estudiadas ($fc=0,91$; $fc=0,93$ y $fc=0,91$), pero fue significativamente inferior en el salmón del Danubio ($fc=0,62$, $P<0,0001$). En nuestro estudio, ambos grupos de peces tenían pesos y longitud medios muy similares el día 1 de infestación. Posteriormente, los salmones tuvieron un peso y longitud mayor que las truchas a lo largo del período de parasitación, sin embargo, las truchas mostraron un factor de condición significativamente superior en todos los controles menos en el segundo, lo que concuerda con los resultados de Taeubert (2010).

Sin embargo, hay que tener presente que el factor de condición varía en función de la especie considerada, debido a diferencias intrínsecas en longitud y peso, por lo que es recomendable utilizarlo para monitorizar la evolución entre grupos de una misma especie de peces, y no tanto para la comparación interespecífica (Williams, 2000).

En las truchas, se observó una disminución del factor de condición en el segundo control, seguido de una recuperación en los dos últimos (Fig. 4.5). Esto es lo esperable, ya que la parasitación puede haber afectado al crecimiento normal en un inicio, mientras que, en la segunda mitad del período, la tasa de infestación disminuyó notablemente y las truchas se recuperaron, volviendo a mostrar valores de factor de condición normales (Figs. 4.5 y 4.7).

Por otro lado, el factor de condición de los salmones aumentó entre los días 1 y 49 (Fig. 4.5). Esto podría estar relacionado con el desprendimiento importante de quistes que experimentaron durante este período (Fig. 4.7). En los controles siguientes, los salmones mantuvieron su carga parasitaria, y su factor de condición disminuyó progresivamente.

Se encontró una correlación negativa significativa entre la intensidad de la parasitación y el factor de condición en las truchas, mientras que en los salmones no se encontró esa asociación (Figs. 4.8 y 4.9). Esto parece indicar que los salmones son más adecuados para resistir altas cargas parasitarias que las truchas, sin embargo, hay que matizar estos resultados ya que debido a la aleatoriedad de los peces controlados obtuvimos pocos datos de salmones con alta carga parasitaria, y podrían resultar más afectados de lo representado en la figura 4.8. Para obtener datos más precisos del factor de condición de los peces, Froese (2006) recomienda determinarlo en varios grupos de la misma muestra, sacrificando por ejemplo 10 peces pequeños, 10 medianos y 10 grandes, lo que evidentemente no es posible realizar en nuestro experimento por no poder sacrificar una proporción tan importante de los peces totales en cada control.

En la bibliografía, se encuentran resultados contradictorios sobre el efecto de la parasitación en los hospedadores, si bien, se considera que la intensidad de la parasitación parece tener especial

importancia (Rock *et al.*, 2022). Así, Chowdhury *et al.* (2021) reportaron un efecto negativo de la parasitación sobre el crecimiento de peces infestados con ~5.000 gloquidios/pez, sin encontrar efectos sobre su supervivencia. Treasurer *et al.* (2006) no encontraron diferencias significativas sobre el factor de condición de salmones infestados con ~1000 gloquidios/pez en comparación con el de peces no infestados. Por otro lado, Marwaha *et al.* (2019) reportaron una influencia importante de la edad de los peces infestados, encontrando una relación negativa entre la tasa de parasitación y el factor de condición en peces de edad 0+, pero no en peces de edad 1+. Los peces parasitados pueden no mostrar signos clínicos, y recuperan rápidamente la morfología normal de sus branquias después del desprendimiento de los juveniles, indicando un efecto mínimo en su salud (Castrillo *et al.* 2020; Castrillo *et al.*, 2021).

5.3. Prevalencia y tasa de infestación

La prevalencia de salmones parasitados se mantuvo al 100% entre los días 1 y 49, pero posteriormente disminuyó hasta el final del período de parasitación. En las truchas, tuvo lugar un descenso marcado de prevalencia entre los días 1 y 49, seguido de un resultado anómalo en el control del día 122, donde volvieron a mostrar una prevalencia del 100%. Esto se podría explicar por el escaso número de peces revisados en cada control y la variabilidad individual de la prevalencia en el grupo de peces. Se obtuvieron datos de prevalencia más fiables en el último control (día 208), al hacer una triaje de la totalidad de los peces. En ese control se observó que la prevalencia en las truchas volvió a disminuir hasta presentar un valor muy inferior a la de los salmones (56% frente a 72% para los salmones) (Fig. 4.6).

La tasa de infestación normalizada por peso, como era esperable, disminuyó a lo largo del período de parasitación. El desprendimiento de quistes más acusado tuvo lugar entre los días 1 y 49 para los salmones, mientras que para las truchas ocurrió entre los días 49 y 122. Además, las truchas mostraron una tasa de infestación superior a los salmones en todos los controles (Fig. 4.7), si bien, hay que tener en cuenta que la tasa de infestación normalizada está afectada por el hecho de que los salmones incrementaron su peso más que las truchas durante el período parasitario (Fig. 4.3). En el último control (día 208), la tasa de infestación de ambas especies tiene valores muy parecidos (Fig. 4.7), con una leve ventaja a favor que la trucha que, en todo caso, no fue significativa (Tab. 4.1).

5.4. Crecimiento de los quistes

A partir del control del día 49 y hasta el final del período parasitario, los quistes adheridos a los salmones tuvieron un tamaño significativamente superior a los adheridos a truchas (Fig. 4.10; Tab. 4.1), lo que concuerda con los resultados encontrados por Salonen *et al.* (2017), y parece

indicar que existe una mayor especificidad entre los gloquidios de la población de *M. margaritifera* del río Ulla y *Salmo salar*. Según Eybe *et al.* (2015), los juveniles que tienen un mayor tamaño en el momento del desenquistamiento tienen más probabilidad de supervivencia, lo que es muy importante a la hora de elegir un hospedador para el cultivo *ex situ* de ejemplares destinados al refuerzo de poblaciones naturales.

5.5. Resultados en la producción de juveniles

En el momento de la recolección, se obtuvieron muchos más juveniles procedentes de los salmones que de las truchas (175.380 juveniles frente a 78.606) (Tab. 4.2), lo que aparentemente es contradictorio con respecto a los resultados de la tasa de infestación en el último control, que resultó ligeramente superior en las truchas (Fig. 4.7). No obstante, hay que tener en cuenta que se utilizó una tasa de infestación normalizada por peso, y que los salmones en el control del día 208 tenían un peso medio significativamente superior al de las truchas, por lo que la cantidad real de quistes adheridos a cada salmón fue superior. Además, la tasa de prevalencia era mucho menor en las truchas, y que sufrieron también una mayor mortalidad durante la fase parasitaria, sobreviviendo al final del experimento únicamente 88 infestadas, frente a 131 salmones (Tab. 4.2).

Los juveniles procedentes de truchas tuvieron tamaños iniciales menores (Fig. 4.14), y una mortalidad mayor entre los días 1 y 85 de cultivo, en comparación con los procedentes de salmones (supervivencias del 15% y 2% respectivamente) (Fig. 4.13). Este resultado concuerda con lo señalado por Eybe *et al.* (2015) quienes pronostican una mayor supervivencia cuanto mayor sea el tamaño de los juveniles. (Fig. 4.14). Entre los 85 y 182 de crecimiento en cajas, cuando los juveniles procedentes de ambas especies alcanzaron un tamaño parecido (Fig. 4.14), la tasa de supervivencia de ambos grupos de juveniles fue similar (Fig. 4.13).

Nuestros resultados indican que, al inicio del cultivo, los juveniles procedentes de los salmones poseían tamaños mayores que los procedentes de las truchas. Estas diferencias disminuyeron a lo largo del proceso de cultivo, de modo que tras 182 días los tamaños de ambos grupos se igualaron. Esto se debe en parte a que los juveniles obtenidos de las truchas crecieron a mayor ritmo que los de los salmones (Tab. 4.3), pero también a que sufrieron una mayor tasa de mortalidad (Fig. 4.13) que afectó a los juveniles de talla más pequeña.

Para finalizar y a modo de resumen, los resultados de este trabajo indican que tanto la trucha como el salmón han mostrado ser hospedadores válidos para *M. margaritifera* en el Ulla, ya que los quistes procedentes de ambas especies consiguieron completar su ciclo, y después de unos meses de crecimiento los juveniles tenían tamaños parecidos, independientemente de la especie de hospedador. El hecho que los salmones muestren más prevalencia y sean menos afectados por la parasitación que las truchas, y que sus juveniles tengan mayor tamaño y tasa de supervivencia iniciales, lo hace más eficiente a la hora de utilizarlo para el cultivo *ex situ* de *M. margaritifera*. Sin embargo, las truchas pueden seguir siendo interesantes para la liberación de hospedadores infestados, ya que este método no puede utilizarse en salmones por la presencia de una presa en el río Ulla, que no serían capaces de sobrepasar.

Este resultado solo es aplicable a la población de *M. margaritifera* del Ulla, ya que las poblaciones de otras cuenca, incluso cercanas, pueden mostrar adaptaciones locales distintas, y cambiar su relación con los dos hospedadores (Clements *et al.*, 2018; Salonen *et al.*, 2017; Taeubert y Geist, 2017).

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. La infestación artificial tuvo un leve efecto negativo sobre el factor de condición de los peces, más marcado en las truchas que en los salmones.
2. Los salmones mostraron una prevalencia de infestación superior a las truchas al final del período parasitario.
3. La tasa de infestación normalizada por peso fue mayor en las truchas que en los salmones, con una diferencia más marcada al principio del período parasitario.
4. Los quistes adheridos a salmones tuvieron un ritmo de crecimiento mayor a lo largo del período parasitario y alcanzaron un mayor tamaño en el momento de su desprendimiento.
5. Los juveniles procedentes de salmón tenían un tamaño mayor en el momento de su desprendimiento, sin embargo, después de 6 meses de crecimiento en boxes, ya no se

encontraron diferencias significativas entre los tamaños de los quistes procedentes de ambas especies.

6. La supervivencia de los juveniles procedentes de salmón fue superior a la de los procedentes de truchas.
7. El crecimiento de los quistes y de los juveniles fue influenciado por la temperatura del agua, observándose un crecimiento mayor en períodos más cálidos en comparación con los más fríos.
8. Basándonos en lo anterior, concluimos que el salmón atlántico (*Salmo salar*) resulta un hospedador más eficaz que la trucha común (*Salmo trutta*) para el programa de conservación *ex situ* de *M. margaritifera* en el río Ulla.
9. Las truchas son capaces de producir juveniles viables, lo que les convierte en una herramienta útil para el reforzamiento poblacional mediante la liberación de peces infestados en el río Ulla. Esto puede resultar especialmente beneficioso en los tramos a los que el salmón no tiene acceso.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aldridge, D. C., Fayle, T. M., Jackson, N. (2007). Freshwater mussel abundance predicts biodiversity in UK lowland rivers. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 17(6), 554–564. <https://doi.org/10.1002/aqc.815>
- Araujo, R., Grande, C., Ramos, M. Á. (2001). *The Gonads of Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793) and *M. margaritifera* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Unionoidea). <https://doi.org/10.1093/mollus/67.1.27>
- Araujo, R., Ramos, M. A. (1998). Description of the Glochidium of *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793) (Bivalvia, Unionoidea). *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 353(1375), 1553–1559.
- Bauer, G. (1987). Reproductive Strategy of the Freshwater Pearl Mussel *Margaritifera margaritifera*. *Journal of Animal Ecology*, 56(2), 691–704. <https://doi.org/10.2307/5077>

- Bauer, G. (1988). Threats to the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. in Central Europe. *Biological Conservation*, 45(4), 239–253. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(88\)90056-0](https://doi.org/10.1016/0006-3207(88)90056-0)
- Belamy, T. (2021). *Étude de la sensibilité des juvéniles de moule perlière (Margaritifera margaritifera) à une contamination métallique, aux nutriments et à la température* Phd thesis, Université de Bordeaux. 255 pp. <https://theses.hal.science/tel-03910296>.
- Belamy, T., Baudrimont, M., Cordier, M.-A., Dassie, É., Gourves, P.-Y., Legeay, A. (2022). Sensitivity of newly transformed juveniles of the freshwater pearl mussel: *Margaritifera margaritifera* to acute toxicity of a wide range of contaminants. *Hydrobiologia*, 849(9), 2029–2041. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04827-7>
- Bouchet, P., Falkner, G., Seddon, M. B. (1999). Lists of protected land and freshwater molluscs in the Bern Convention and European Habitats Directive: Are they relevant to conservation? *Biological Conservation*, 90(1), 21–31. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(99\)00009-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(99)00009-9)
- Castrillo, P. A., Bermudez, R., Varela-Dopico, C., Quiroga, M., Ondina, P. (2022). The parasitic travel of *Margaritifera margaritifera* in Atlantic salmon gills: From glochidium to post-larva. *Aquaculture Reports*, 27, 101340. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101340>
- Castrillo, P. A., Varela-Dopico, C., Bermúdez, R., Ondina, P., Quiroga, M. I. (2021). Morphopathology and gill recovery of Atlantic salmon during the parasitic detachment of *Margaritifera margaritifera*. *Journal of Fish Diseases*, 44(8), 1101–1115. <https://doi.org/10.1111/jfd.13372>
- Castrillo, P. A., Varela-Dopico, C., Ondina, P., Quiroga, M. I., Bermúdez, R., Castrillo, P. A., Varela-Dopico, C., Ondina, P., Quiroga, M. I., Bermúdez, R. (2020). Early stages of *Margaritifera margaritifera* glochidiosis in Atlantic salmon: Morphopathological characterization. *Journal of Fish Diseases*, 43(1), Article 1. <https://doi.org/10.1111/JFD.13100>
- Chowdhury, M. M. R., Marjomäki, T. J., Taskinen, J. (2021). Effect of glochidia infection on growth of fish: Freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* and brown trout *Salmo trutta*. *Hydrobiologia*, 848(12–13), 3179–3189. <https://doi.org/10.1007/s10750-019-03994-4>
- Clements, E. A., Thomas, R., Adams, C. E. (2018). An investigation of salmonid host utilization by the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in north-west Scotland. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28(3), 764–768. <https://doi.org/10.1002/aqc.2900>.

- Denic, M., Geist, J. (2017). The freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* in Bavaria, Germany—Population status, conservation efforts and challenges. *Biology Bulletin*, 44(1), 61–66. <https://doi.org/10.1134/S1062359017010034>
- Dodd, B. J., Barnhart, M. C., Rogers-Lowery, C. L., Fobian, T. B., Dimock, R. V. (2006). Persistence of host response against glochidia larvae in *Micropterus salmoides*. *Fish and Shellfish Immunology*, 21(5), 473–484. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.02.002>
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D. J., Lévêque, C., Naiman, R. J., Prieur-Richard, A.-H., Soto, D., Stiassny, M. L. J., Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 81(2), 163–182. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>
- Eybe, T., Thielen, F., Bohn, T., Sures, B. (2015). Influence of the excystment time on the breeding success of juvenile freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 25(1), 21–30. <https://doi.org/10.1002/aqc.2471>
- Froese, R. (2006). Cube law, condition factor and weight–length relationships: History, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 22(4), 241–253. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x>
- Geist, J. (2010). Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): A synthesis of Conservation Genetics and Ecology. *Hydrobiologia*, 644(1), 69–88. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0190-2f>
- Geist, J., Auerswald, K. (2007). Physicochemical stream bed characteristics and recruitment of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*). *Freshwater Biology*, 52(12), 2299–2316. [doi:10.1111/j.1365-2427.2007.01812.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01812.x)
- Geist, J. *et al.* (2023). Captive breeding of European freshwater mussels as a conservation tool: A review. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 33(11), 1321–1359. <https://doi.org/10.1002/aqc.4018>
- Gutiérrez, J. L., Jones, C. G., Strayer, D. L., Iribarne, O. O. (2003). Mollusks as ecosystem engineers: The role of shell production in aquatic habitats. *Oikos*, 101(1), 79–90. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2003.12322.x>
- Haag, W. R. (2012). *North American Freshwater Mussels: Natural History, Ecology, and Conservation*. Cambridge University Press. <http://ebookcentral.proquest.com/lib/busdsp/detail.action?docID=989146>
- Hastie, L. C., Boon, P. J., Young, M. R. (2000). Physical microhabitat requirements of freshwater pearl mussels, *Margaritifera margaritifera* (L.). *Hydrobiologia*, 429(1), 59–71. <https://doi.org/10.1023/A:1004068412666>

- Hastie, L., Young, M. (2003). Timing of spawning and glochidial release in Scottish freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) populations. *Freshwater Biology*, 48, 2107–2117. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01153.x>
- Helama, S., Valovirta, I. (2008). Ontogenetic morphometrics of individual freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* (L.)) reconstructed from geometric conchology and trigonometric sclerochronology. *Hydrobiologia*, 610(1), 43–53. <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9421-1>
- Ieshko, E. P., Geist, J., Murzina, S. A., Veselov, A. E., Lebedeva, D. I., Ziuganov, V. V. (2016). The characteristics of the infection of juvenile Atlantic salmon with glochidia of the freshwater pearl mussel in rivers of Northwest Russia. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 417, 6. <https://doi.org/10.1051/kmae/2015039>
- Lois, S., Ondina, P., Outeiro, A., Amaro, R., San Miguel, E. (2014). The north-west of the Iberian Peninsula is crucial for conservation of *Margaritifera margaritifera* (L.) in Europe. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 24, 35–47. <https://doi.org/10.1002/aqc.2352>
- Lopes-Lima, M., et al (2017). Conservation status of freshwater mussels in Europe: State of the art and future challenges. *Biological Reviews*. 92 (1): 572–607
- Lydeard, C., Cowie, R. H., Ponder, W. F., Bogan, A. E., Bouchet, P., Clark, S. A., Cummings, K. S., Frest, T. J., Gargominy, O., Herbert, D. G., Hershler, R., Perez, K. E., Roth, B., Seddon, M., Strong, E. E., Thompson, F. G. (2004). The Global Decline of Nonmarine Mollusks. *BioScience*, 54(4), 321–330. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0321:TGDONM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0321:TGDONM]2.0.CO;2)
- Mamun, A., Khan, M. A. (2011). Freshwater Mussels (*Margaritifera margaritifera*): Bio-filter Against Water Pollution. *World Applied Sciences Journal*, 12, 580–585.
- Marwaha, J., Aase, H., Geist, J., Stoeckle, B. C., Kuehn, R., Jakobsen, P. J. (2019). Host (*Salmo trutta*) age influences resistance to infestation by freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) glochidia. *Parasitology Research (1987)*, 118(5), 1519–1532. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06300-2>
- Marwaha, J., Jakobsen, P. J., Karlsson, S., Larsen, B. M., Wacker, S. (2021). Higher mortality of the less suitable brown trout host compared to the principal Atlantic salmon host when infested with freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) glochidia. *Parasitology Research*, 120(7), 2401–2413. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07145-4>
- Marwaha, J., Jensen, K. H., Jakobsen, P. J., Geist, J. (2017). Duration of the parasitic phase determines subsequent performance in juvenile freshwater pearl mussels (*Margaritifera*

- margaritifera*). *Ecology and Evolution*, 7(5), 1375–1383. <https://doi.org/10.1002/ece3.2740>
- San Miguel, E., Monserrat, S., Fernández, C., Amaro, R., Hermida, M., Ondina, P., Altaba, C. R. (2004). Growth models and longevity of freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*) in Spain. *Canadian Journal of Zoology*, 82(8), 1370.
- Moorkens, E., Cordeiro, J., Seddon, M.B., von Proschwitz, T., Woolnough, D. 2017. *Margaritifera margaritifera* (errata version published in 2018). *The IUCN Red List of Threatened Species* 2017: e.T12799A128686456. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T12799A508865.en>. Consultado el 10 de enero de 2024.
- Murzina, S. A., Ieshko, E. P., Zotin, A. A. (2017). The freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L.: Metamorphosis, growth, and development dynamics of encysted glochidia. *Biology Bulletin*, 44(1), 6–13. <https://doi.org/10.1134/S106235901701006X>
- Österling, M. (2015). Timing, growth and proportion of spawners of the threatened unionoid mussel *Margaritifera margaritifera*: Influence of water temperature, turbidity and mussel density. *Aquatic Sciences*, 77(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00027-014-0366-3>
- Österling, M., Ferm, J., Piccolo, J. J. (2014). Parasitic freshwater pearl mussel larvae (*Margaritifera margaritifera* L.) reduce the drift-feeding rate of juvenile brown trout (*Salmo trutta* L.). *Environmental Biology of Fishes*, 97(5), 543–549. <https://doi.org/10.1007/s10641-014-0251-x>
- Österling, M., Greenberg, L. A., Arvidsson, B. L. (2008). Relationship of biotic and abiotic factors to recruitment patterns in *Margaritifera margaritifera*. *Biological Conservation*, 141(5), 1365–1370. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.03.004>
- Outeiro, A., Ondina, P., Fernández, C., Amaro, R., Miguel, E. S. (2008). Population density and age structure of the freshwater pearl mussel, *Margaritifera margaritifera*, in two Iberian rivers. *Freshwater Biology*, 53(3), 485–496. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01913.x>
- Prié, V., Philippe, L., Cochet, G. (2011). *Plan National d'Actions en faveur de la Mulette Perlière Margaritifera margaritifera—2012-2017*.
- Reis, J. (2003). The freshwater pearl mussel [*Margaritifera margaritifera* (L.)] (Bivalvia, Unionoida) rediscovered in Portugal and threats to its survival. *Biological Conservation*, 114(3), 447–452. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(03\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(03)00086-7)
- Rock, S. L., Watz, J., Nilsson, P. A., Österling, M. (2022). Effects of parasitic freshwater mussels on their host fishes: A review. *Parasitology*, 149(14), 1958–1975. <https://doi.org/10.1017/S0031182022001226>

- Rodríguez-Larrinaga, A., Santamaría, J., Ondina, P. (2015). ¿Podemos tener ríos propicios para el mejillón de río y el desmán ibérico? *Quercus*, 357, 22–29.
- Salonen, J. K., Luhta, P.-L., Moilanen, E., Oulasvirta, P., Turunen, J., Taskinen, J. (2017). Atlantic salmon (*Salmo salar*) and brown trout (*Salmo trutta*) differ in their suitability as hosts for the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in northern Fennoscandian rivers. *Freshwater Biology*, 62(8), 1346–1358. <https://doi.org/10.1111/fwb.12947>
- Scheder, C., Lerchegger, B., Jung, M., Csar, D., Gumpinger, C. (2014). Practical experience in the rearing of freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*): Advantages of a work-saving infection approach, survival, and growth of early life stages. *Hydrobiologia*, 735(1), 203–212. <https://doi.org/10.1007/s10750-013-1516-7>
- Skinner, A., Young, M., Hastie, L. (2003). *Ecology of the Freshwater Pearl Mussel* (Vol. 2).
- Smith, D. G. (1995). The Freshwater Pearl Mussels and Their Relationships with Salmonid Fish. Valery Ziuganov , Alexey Zotin , Leonid Nezlin , Valery Tretiakov. *The Quarterly Review of Biology*, 70(2), 233–234. <https://doi.org/10.1086/419023>
- Sousa, R., Amorim, A., Froufe, E., Varandas, S., Teixeira, A., Lopes-Lima, M. (2015). Conservation status of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* in Portugal. *Limnologica*, 50, 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2014.07.004>
- Taeubert, J.-E., Denic, M., Gum, B., Lange, M., Geist, J. (2010). Suitability of different salmonid strains as hosts for the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 20, 728–734. <https://doi.org/10.1002/aqc.1147>
- Taeubert, J.-E., Geist, J. (2017). The relationship between the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) and its hosts. *Biology Bulletin*, 44(1), 67–73. <https://doi.org/10.1134/S1062359017010149>
- Taeubert, J.-E., Gum, B., Geist, J. (2013). Variable development and excystment of freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) at constant temperature. *Limnologica*, 43(4), 319–322. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2013.01.002>
- Thomas, G., Taylor, J., Garcia de Leaniz, C. (2010). Captive breeding of the endangered freshwater pearl mussel, *Margaritifera margaritifera* (L.). *Endangered Species Research*, 12, 1–9. <https://doi.org/10.3354/esr00286>
- Treasurer, J. W., Hastie, L. C., Hunter, D., Duncan, F., Treasurer, C. M. (2006). Effects of (*Margaritifera margaritifera*) glochidial infection on performance of tank-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 256(1–4), 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.031>

- Vaughn, C. C., Hakenkamp, C. C. (2001). The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology*, 46(11), 1431–1446. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2001.00771.x>
- Vaughn, C. C., Hoellein, T. J. (2018). Bivalve impacts in freshwater and marine ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 49(1), 183–208. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110617-062703>
- Vaughn, C. C., Nichols, S. J., Spooner, D. E. (2008). Community and foodweb ecology of freshwater mussels. *Journal of the North American Benthological Society*, 27(2), 409–423. <https://doi.org/10.1899/07-058.1>
- Welker, M., Walz, N. (1998). Can mussels control the plankton in rivers?—A planktological approach applying a Lagrangian sampling strategy. *Limnology and Oceanography*, 43(5), 753–762. <https://doi.org/10.4319/lo.1998.43.5.0753>
- Williams, E. 2000. The Coefficient of Condition of Fish. Chapter 13 in Schneider, James C. (ed.) 2000. *Manual of fisheries survey methods II: with periodic updates*. Michigan Department of Natural Resources, Fisheries Special Report 25, Ann Arbor.
- Young, M. R., Cosgrove, P. J., Hastie, L. C. (2001). The Extent of, and Causes for, the Decline of a Highly Threatened Naiad: *Margaritifera margaritifera*. In G. Bauer and K. Wächtler (Eds.), *Ecology and Evolution of the Freshwater Mussels Unionoida* (Vol. 145, pp. 337–357). Springer Berlin Heidelberg.
- Young, M., Williams, J. (1984). The reproductive biology of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (Linn.) in Scotland. II: Laboratory studies. *Archiv Fur Hydrobiologie*. Vol 99, Num 4, pp 405-422
- Zajac, K., Zajac, T., Adamski, P., Bielanski, W., Cmiel, A., Lipinska, A. (2015). Reconstruction of a population of *Unio crassus* in the Biala Tarnowska river. *Folia Malacologica*, 23(1). <https://doi.org/10.12657/folmal.023.001>
- Ziuganov, V., Zotin, A., Nezlin, L., Tretiakov, V. (1994). *The freshwater pearl mussels and their relationships with salmonid fish*. Moscow (Russian Federation) Moscow : VNIRO, Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography. 104 pp.

Legislación

Decisión 82/72/EEC del consejo europeo del 3 de diciembre de 1981 referente a la celebración del Convenio relativo a la conservación de la vida silvestre y del medio natural de Europa. *Diario oficial de la Unión europea*, 038, de 10 de febrero de 1982. <http://data.europa.eu/eli/dec/1982/72/oj>

Decreto 88/2007, de 19 de abril, por el que se regula el Catálogo gallego de especies

- amenazadas. *Diario Oficial de Galicia*, 89, de 09 de mayo de 2007.
https://www.xunta.gal/dog/Publicados/2007/20070509/Anuncio12742_es.html
- Directiva 92/43/EEC del consejo europeo del 21 de mayo de 1992 sobre la conservación del hábitat natural de la fauna y flora salvaje. *Diario Oficial de la Unión europea*, 206, de 22 de julio de 1992.
<https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/ALL/?uri=celex:31992L0043>
- Directiva 2010/63/UE del parlamento europeo y del consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. *Diario Oficial de la Unión europea*, 276, de 20 de octubre de 2010.
<http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>
- Ley 6/2013, de 11 de junio, de modificación de la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. *Boletín Oficial del Estado*, 140, de 12 de junio de 2013. <https://www.boe.es/eli/es/l/2013/06/11/6>
- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial del Estado*, 34, de 8 de febrero de 2013. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2013/02/01/53>
- 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. *Boletín Oficial del Estado*, 46, de 23 de febrero de 2011.
<https://www.boe.es/eli/es/rd/2011/02/04/139>