



Universitat
de les Illes Balears



**Govern
de les Illes Balears**

Conselleria de Medi Ambient,
Agricultura i Pesca
Direcció General de Pesca i
Medi Marí

**TESI DOCTORAL
2015**

**PARÀSITS DE MOL·LUCSC BIVALVES A LES
ILLES BALEARS: DETECCIÓ DE *MARTEILIA
REFRINGENS* I *PERKINSUS MEDITERRANEUS*
MITJANÇANT TÈCNIQUES MOLECULARS.**

José María Valencia Cruz



Universitat
de les Illes Balears



**Govern
de les Illes Balears**

Conselleria de Medi Ambient,
Agricultura i Pesca
Direcció General de Pesca i
Medi Marí

**TESI DOCTORAL
2015**

Programa de Doctorat de Biologia

**PARÀSITS DE MOL·LUCSC BIVALVES A LES
ILLES BALEARS: DETECCIÓ DE *MARTEILIA
REFRINGENS* I *PERKINSUS MEDITERRANEUS*
MITJANÇANT TÈCNIQUES MOLECULARS.**

José María Valencia Cruz

**Director: José Aurelio Castro Ocón
Directora: Cori Ramon Juanpere**

Doctor per la Universitat de les Illes Balears



Dr. José Aurelio Castro Ocón i Dra. Cori Ramon Juanpere, ambdós Catedràtics de Genètica de la Universitat de les Illes Balears,

DECLAREM,

Que la tesi doctoral "**Paràsits de mol·luscs bivalves a les Illes Balears: Detecció de *Marteilia refringens* i *Perkinsus mediterraneus* mitjançant tècniques moleculars**", presentada per José Maria Valencia Cruz per a l'obtenció del títol de Doctor en Biologia, ha estat desenvolupada per ell, sota la nostra supervisió, al àrea de Genètica de la Universitat de les Illes Balears.

I per a que quedi constància, signem aquest document

Palma de Mallorca, 3 de desembre de 2015

Dr. José Aurelio Castro Ocón

Dra. Cori Ramon Juanpere

Autor: José María Valencia Cruz

A la meva família.

ACRÒNIMS I ABREVIATURES.

ADN: Àcid Desoxirribonucleic.

ADNr: Àcid Desoxirribonucleic ribosòmic.

AMOVA: Anàlisi de la Variància Molecular.

ARNr: Àcid Ribonucleic ribosòmic.

APROMAR: Associació Empresarial de Productors de Cultius Marins d'Espanya.

BLAST: En anglès: *Basic Local Alignment Search Tool* (Eina de recerca bàsica d'alineament local).

CC.AA.: Comunitats Autònomes.

CEE: Comunitat Econòmica Europea.

CPUE: Captura per unitat d'esforç.

CV: Components de la Variància.

DME/Ham's F-12: En anglès: *Dulbecco's Modified Eagle's medium Ham's Nutrient Mixture F-12*.

DIG: Digoxigenina.

EMBL: En anglès: *European Molecular Biology Laboratory* (Laboratori Europeu de Biologia Molecular).

FAO: En anglès: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organització de les Nacions Unides per a l'Alimentació i l'Agricultura).

F_{st}: Índex de fixació.

HinfI: Endonucleasa de restricció I d'*Haemophilus influenzae*.

IGS: En anglès: *Inter Genic Spacer* (espaiador intergènic).

ITS: En anglès: *Internal Transcribed Spacer* (Espaiador transcrit intern).

ISH: En anglès: *In situ hybridization*. (hibridació *in situ*).

JACUMAR: Junta Assessora de Cultius Marins.

LIMIA: Laboratori d'Investigacions Marines i Aqüicultura.

LNREMB: En castellà: *Laboratorio Nacional de Referencia de las Enfermedades de los Moluscos Bivalvos* (Laboratori Nacional de Referència de les Malalties dels Mol·luscs Bivalves).

MAGRAMA: Ministeri d'Agricultura, Alimentació i Medi Ambient.

NCBI: En anglès: *National Center for Biotechnology Information* (Centre Nacional per a la Informació Biotecnològica).

NTB/BCIP: En anglès: *Nitroblue Tetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate* (Nitroblau de tetrazoli/5-Brom-4Clor-3-Indolil-Fosfat).

O.I.E.: En francès: *Office International des Epizooties* (Oficina Internacional de les Epizooties).

pb: Parells de bases.

PBS: En anglès: *Phosphate Buffered Saline* (Tampó fosfat salí).

PCR: En anglès: *Polymerase Chain Reaction* (Reacció en Cadena de la Polimerasa).

RASVE: En castellà: *Red de Alertas Sanitarias Veterinarias* (Xarxa d'Alertes Sanitàries Veterinàries).

RFLP: En anglès: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfisme de Longitud dels Fragments de Restricció).

RsaI: Endonucleasa de restricció I de *Rhodopseudomonas sphaeroides*.

RTFM: En anglès: *Ray's Fluid Thioglicollate Medium* (Medi Tioglicolat Fluit de Ray).

SSC: En anglès: *Saline Sodium Citrate* (Tampó citrat sòdic i clorur sòdic).

SSD: Suma de desviacions quadràtiques.

SSU: En anglès: *Small Subunit* (Subunitat petita).

TAE: Tampó Tris-Acetato EDTA.

Tris: Tampó tris(hidroximetil)aminometà.

Twen20: En anglès: *Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate* (Polioxietilen (20) sorbitan monolaurat).

UE: Unió Europea.

USA: Estats Units d'Amèrica.

UV: Ultraviolat.

WAHID: En anglès: *World Animal Health Information Database* (Base de Dades d'Informació Sanitària Veterinària Mundial).

Publicacions derivades de la Tesi.

- López-Flores, I., Robles, F., Valencia, J. M., Grau, A., Villalba, A., de la Herrán, R., Garrido-Ramos, M. A., Ruíz-Rejón, C., Ruíz-Rejón, M. i Navas, J. I. 2008. Detection of *Marteilia refringens* using nested PCR and in situ hybridisation in *Chamelea gallina* from the Balearic Islands (Spain). *Diseases of aquatic organisms*, **82**(1), 79–87.
- Valencia, J. M. i Massutí, E. 2004. Comunitat dels fons d'arenas fines de la platja de Palma (Mallorca, Illes Balears). *Bolletí de la Societat d'Història Natural de les Balears*, **47**, 31–35.
- Valencia, J.M. 2010. Second record of *Perkinsus mediterraneus* in Balearic Islands, Spain, Western mediterranean. *Aquaculture Europe 2010*, 1326–1327.
- Valencia, J. M., Bassitta, M., Picornell, A., Ramon, C. i Castro, J. A. 2014. New data on *Perkinsus mediterraneus* in the Balearic Archipelago: locations and affected species. *Diseases of aquatic organisms*, **112**(1), 69–82.

Altres publicacions relacionades amb mol·luscs.

- Cabanellas-Reboredo, M., Deudero, S., Alós, J., Valencia, J. M., March, D., Hendriks, I. E. i Álvarez, E. 2009. Recruitment of *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) on artificial structures. *Marine Biodiversity Records*, **2**, e126.
- Deudero, S., Box, A., March, D., Valencia, J. M., Grau, A. M., Tintore, J. i Benedicto, J. 2007. Temporal trends of metals in benthic invertebrate species from the Balearic Islands, Western Mediterranean. *Marine pollution bulletin*, **54**(9), 1545–1558.
- Deudero, S., Box, A., March, D., Valencia, J. M., Grau, A. M., Tintore, J., Calvo, M. i Caixach, J. 2007. Organic compounds temporal trends at some invertebrate species from the Balearics, Western Mediterranean. *Chemosphere*, **68**(9), 1650–1659.
- Deudero, S., Blanco, A., Tor, A., Alomar, C., Valencia, J. M. i Sarriera, P. (2011). Integrated multitrophic aquaculture: filter feeders bivalves as efficient reducers of wastes derived from coastal aquaculture assessed with stable isotope analyses. *INTECH Open Access Publisher*.
- Ramilo, A., Carrasco, N., Reece, K. S., Valencia, J. M., Grau, A., Aceituno, P., Rojas, M., Gairin, I., Furomes, M. D., Abollo, E. i Villalba, A. 2015. Update of information on perkinsosis in NW Mediterranean coast: Identification of *Perkinsus* spp.(Protista) in new locations and hosts. *Journal of invertebrate pathology*, **125**, 37–41.
- Valencia, J. M., Grau, A. M. i Grau, A. (1997). Crecimiento de semilla de escupiña, *Venus verrucosa* (L.) en parques de cultivo. *Actas VI Congreso Nacional de Acuicultura*, 9–11.

ACRÒNIMS I ABREVIATURES.	9
PUBLICACIONS.....	11
Publicacions derivades de la Tesi.	11
Altres publicacions relacionades amb mol·luscs.	11
Índex.....	13
AGRAÏMENTS.....	15
RESUM.....	17
RESUMEN.	19
ABSTRACT.....	21
INTRODUCCIÓ GENERAL.	23
OBJECTIUS.	35
OBJECTIU GENERAL.	37
OBJECTIUS SECUNDARIS.....	37
MATERIALS I MÈTODES.	39
Obtenció de mol·luscs.	41
Biocenosi i estudi biològic del banc de rossellona.	42
Anàlisi histopatològic.....	44
Extracció d'ADN de les mostres.	45
Detecció dels patògens: PCR i PCR niada.	45
Seqüenciació.	47
Comparació de les seqüències purificades de bivalves. Anàlisi filogenètic.	48
Anàlisi de restricció.	50
Hibridació <i>in situ</i> per a <i>Marteilia refringens</i>	51
Assaigs RFTM per a <i>Perkinsus</i> spp.....	52
Determinació mortalitat de <i>Mimachlamys varia</i>	53
CAPÍTOL I: Antecedents parasitològics a bivalves a les Illes Balears.....	55
INTRODUCCIÓ.	57
RESULTATS.	60
DISCUSSIÓ.	62
CAPÍTOL II: <i>Marteilia</i> en rossellona.....	67
INTRODUCCIÓ.	69
<i>Marteilia refringens</i>	73
Transmissió i cicle vital.	75
Mètodes de diagnòstic per a <i>Marteilia refringens</i>	77
RESULTATS.	80
Biocenosi i biologia del banc de rossellona.....	80
Estructura de la població.....	83
Evolució de la població.....	85
Detecció de l'agent patològic.....	88
Anàlisi histopatològic.	88

Detecció molecular de <i>Marteilia refringens</i>	89
PCR.....	89
PCR niada.....	90
Hibridació <i>in situ</i>	91
DISCUSSIÓ.....	93
Biocenosi i biologia del banc de rossellona.....	93
Biometria.....	94
Estructura i evolució de la població.....	94
Detecció de l'agent patològic.....	95
Anàlisi histopatològic.....	95
Detecció de <i>Marteilia refringens</i>	98
CAPÍTOL III: <i>Perkinsus mediterraneus</i> a les Illes Balears.....	101
INTRODUCCIÓ.....	103
Transmissió i cicle vital de <i>Perkinsus</i> spp.....	106
Cicle vital.....	107
Fase de multiplicació vegetativa.....	107
Fase de creixement.....	108
Fase de proliferació.....	108
Mètodes de diagnòstic per a <i>Perkinsus</i> spp.....	108
RESULTATS.....	111
Assaigs RFTM.....	111
Estacionalitat.....	113
Determinació de les mortalitats durant l'engreix de <i>Mimachlamys varia</i>	116
Histologia.....	117
Amplificació per PCR i anàlisi de restricció.....	119
Anàlisi de seqüències.....	120
DISCUSSIÓ.....	126
DISCUSSIÓ GENERAL.....	131
Anàlisi histopatològic.....	133
Tècniques moleculars:.....	135
<i>Marteilia refringens</i>	135
<i>Perkinsus mediterraneus</i>	138
Co-infecció per <i>M. refringens</i> i <i>P. mediterraneus</i>	140
CONCLUSIONS.....	143
BIBLIOGRAFIA.....	147
Annexos.....	171
Annex fotogràfic.....	173
Seqüències obtingudes.....	183
<i>Marteilia refringens</i>	183
<i>Perkinsus mediterraneus</i>	183

AGRAÏMENTS.

“De desagraïts, l’infern n’és ple”, diuen per Mallorca. No voldria que ningú m’enviés amb els dimonis, així que, ara que ja està acabada aquesta tesi, he de donar gràcies a tothom. Vagi per endavant que si em deix a qualsevol, no ha estat per malícia, sinó per oblit.

En primer lloc, he de donar gràcies a na Catalina, n’Ester Maria i en Pere Joan, als quals els he manllevat temps de dedicació. En segon lloc, a l’altre família que són els companys de feina, tant els del Laboratori d’Investigacions Marines I aqüicultura com els de la Direcció General de Pesca i Medi Marí.

En tercer lloc, no em puc deixar al Dr. José A. Castro i a la Dra. Cori Ramon, els directors de la Tesi. Qui m’hauria dit que arrel d’una passejada per s’Arenal hauria sortit una Tesi Doctoral?

He de fer un agraïment especial a en Quique, n’Oliver, en Pedro i en Jaume. Ells varen fer possible molts dels mostrejos, tant a s’Arenal com a altres indrets. També el faig extensiu als companys del Laboratori de Genètica de la UIB, sobretot a Marta Bassitta, a la Dra. Marina Matas i, especialment, a la Dra. Antònia Picornell. També als vigilants de les Reserves Marines, als mariscadors de Menorca, amb un record per en Manolo Cabrera, que ens va deixar, i a qualsevol altre que m’hagi ajudat en aquestes feines.

Finalment, en quant a les institucions, sinó hagués estat per la Conselleria de Medi Ambient, Agricultura i Pesca, no hauria arribat a port aquest treball. També he d’agrair l’acció especial “Actuació concertada per a l’estudi de paràsits en mol·luscs” (AEE010/2012), de la Direcció General d’Innovació i Recerca de la Vicepresidència i Conselleria d’Innovació, Recerca i Turisme, que va ajudar i molt, a finalitzar l’estudi sobre *Perkinsus mediterraneus*. També a JACUMAR (MAGRAMA), que va finançar el “Pla Nacional de Cultius Marins mapa zoosanitari dels cultius de bivalves (*O. edulis*, *M. galloprovincialis* i *V. verrucosa*) al Port de Maó (Menorca)” i a la Direcció General d’Investigació del Ministeri d’Educació i Ciència, que va finançar el projecte “La perkinsosi al litoral espanyol: caracterització de les variants taxonòmiques del paràsit, del seu cicle de vida i de la resposta immune de l’hoste”.

Una de les principals limitacions a la que s'enfronta la producció de mol·luscs bivalves és la prevenció i control de malalties, que es dispersen, principalment, pel moviment d'estocs.

A les Balears, hem trobat paràsits de bivalves poc patogènics com *Bucephalus haimeanus*, *Mytilicola intestinalis*, i metacercàries de tremàtodes. També altres que suposen un risc per a la producció, com *Marteilia refringens*, *Perkinsus mediterraneus* i *P. olseni*.

La presència de *M. refringens* és una greu amenaça, doncs produeix desordres fisiològics que poden matar l'hoste. Probablement, als anys 80, la desaparició dels bancs ostrícoles va ser causada per aquesta malaltia. Els musclos també són susceptibles a la infecció per *M. refringens*, però són resistent a la malaltia.

L'any 2004, es va detectar una mortalitat al banc de la rossellona (*Chamelea gallina*) de s'Arenal de Palma de Mallorca. Per detectar l'espècie causant de la malaltia es va recórrer a tècniques histològiques, hibridació *in situ*, PCR i PCR niada. La seqüència obtinguda a partir d'un bloc de parafina va mostrar un 99,1 % de similitud amb les *M. refringens* tipus O. D'aquesta manera es va concloure que l'agent etiològic era *M. refringens* i posteriorment que la prevalença era del 55,1%.

La ubicació específica de les cèl·lules de *Marteilia refringens* en els teixits de la rossellona es va determinar per hibridació *in situ*, trobant totes les fases conegudes, inclosa la d'esperulació, el que demostra que el paràsit completa la infecció a la rossellona.

Perkinsus mediterraneus infecta a una gran varietat de mol·luscs bivalves a l'arxipèlag balear: *Ostrea edulis*, *Mimachlamys varia*, *Arca noae*, *Chamelea gallina*, *Pinna nobilis* i *Venus verrucosa*, sense mortalitats associades a aquest paràsit. *Perkinus olseni* sols s'ha detectat en *V. verrucosa*, però en el present estudi no l'hem trobat. La recerca de *Perkinsus* spp. s'ha realitzat mitjançant RFTM i la determinació de l'espècie per PCR-RFLP i seqüenciació.

La prevalença de *P. mediterraneus* ha estat semblant a la d'altres espècies de *Perkinsus* i la dinàmica de la seva infecció es semblant a la de *P. marinus* en la badia de

Chesapeake, amb valors màxims de detecció del paràsit al setembre i octubre, després del màxim estival de temperatura, i regressió de la infecció a l'hivern.

Hem trobat 12 haplotips de *P. mediterraneus* amb una elevada similitud genètica. Les diferències es fan majors en incloure seqüències procedents de la bases de dades del GenBank, augmentant el nombre d'haplotips a 24.

Les anàlisis filogenètiques han detectat, en conjunt, tres grups diferents d'*O. edulis* de Menorca, que es diferencien d'altres llinatges coespecífics. Les anàlisis recolzen aquesta diferenciació entre les poblacions de Menorca i Mallorca, la qual sembla, en bona part deguda a l'aïllament geogràfic del port de Maó. Malgrat això, altres factors, com la variabilitat ambiental, diferents localitats i dates de detecció, la translocació d'animals, l'activitat humana, etc, poden tenir certa influència.

Al Mediterrani occidental es troben tres espècies de *Perkinsus*. Malgrat que es coneix que es produeixen co-infeccions a l'escopinya gravada del port de Maó amb *P. olseni* i *P. mediterraneus*, no hem trobat cap cas, ni tampoc bivalves afectats per *P. chesapeakei*, espècie que s'ha trobat al delta de l'Ebre.

A diferents mostreigs de *C. gallina* hem detectat la presència de *M. refringens* i *P. mediterraneus*. Encara que no hem trobat co-infecció, aquesta no es pot descartar, perquè els individus són molt joves i possiblement ambdós patògens estiguin a fases inicials d'infecció. Tenint en compte que l'esperulació de *M. refringens* s'inicia quan la temperatura de l'aigua és de 17°C (mes de maig), que les zoospores de *P. mediterraneus* apareixen més tard (setembre-octubre) i que les mortalitats es detecten al juny-juliol, és més probable que la causa de la mortalitat sigui la marteiliosi.

Una de las principales limitaciones a la que se enfrenta la producción de moluscos bivalvos es la prevención y control de enfermedades, dispersadas, principalmente, por movimiento de partidas.

En las Baleares, hemos encontrado parásitos de bivalvos poco patogénicos como *Bucephalus haimeanus*, *Mytilicola intestinalis* y metacercarias de tremátodos. También otros que suponen un riesgo para la producción, como *Marteilia refringens*, *Perkinsus mediterraneus* y *P. olseni*.

La presencia de *M. refringens* es una grave amenaza, pues produce desórdenes fisiológicos que pueden matar al huésped. Probablemente, en los años 80, la desaparición de los bancos ostrícolas fue causada por esta enfermedad. Los mejillones también son susceptibles a la infección por *M. refringens*, pero son resistentes a la enfermedad.

En 2004, se detectó una mortalidad en el banco de la chirla (*Chamelea gallina*) de s'Arenal de Palma de Mallorca. Para detectar la especie causante de la enfermedad se recurrió a técnicas histológicas, hibridación *in situ*, PCR y PCR anidada. La secuencia obtenida a partir de un bloque de parafina mostró un 99,1% de similitud con *M. refringens* tipo O. De esta manera se concluyó que el agente etiológico era *M. refringens* y posteriormente, que la prevalencia era del 55,1%.

La ubicación específica de las células de *Marteilia refringens* en los tejidos de la chirla se determinó por hibridación *in situ*, encontrando todas las fases conocidas, incluida la de esporulación, lo que demuestra que el parásito completa la infección en la chirla.

Perkinsus mediterraneus infecta a una gran variedad de moluscos bivalvos en el archipiélago balear: *Ostrea edulis*, *Mimachlamys varia*, *Arca noae*, *Chamelea gallina*, *Pinna nobilis* y *Venus verrucosa*, sin mortalidades asociadas a este parásito. *Perkinsus olseni* sólo se ha detectado en *V. verrucosa*, pero en el presente estudio no lo hemos encontrado. La búsqueda de *Perkinsus* spp. se ha realizado mediante RFTM y la determinación de la especie por PCR-RFLP y secuenciación.

La prevalencia de *P. mediterraneus* ha sido similar a la de otras especies de *Perkinsus* y la dinámica de su infección es similar a la de *P. marinus* en la bahía de Chesapeake, con

valores máximos de detección del parásito en septiembre y octubre, después del máximo estival de temperatura, y regresión de la infección en invierno.

Hemos encontrado 12 haplotipos de *P. mediterraneus* con una elevada similitud genética. Las diferencias se hacen mayores al incluir secuencias procedentes de la bases de datos del GenBank, aumentando el número de haplotipos a 24.

Los análisis filogenéticos han detectado, en conjunto, tres grupos diferentes de *O. edulis* de Menorca, que se diferencian de otros linajes coespecíficos. Los análisis apoyan esta diferenciación entre las poblaciones de Menorca y Mallorca, la cual parece, en buena parte debida al aislamiento geográfico del puerto de Mahón. Sin embargo, otros factores, como la variabilidad ambiental, diferentes localidades y fechas de detección, la translocación de animales, la actividad humana, etc, pueden tener cierta influencia.

En el Mediterráneo occidental se encuentran tres especies de *Perkinsus*. Aunque se conoce que se producen coinfecciones en la escupiña grabada del puerto de Mahón con *P. olseni* y *P. mediterraneus*, no hemos encontrado ningún caso, ni tampoco bivalvos afectados por *P. chesapeaki*, especie que se ha detectado en el delta del Ebro.

En diferentes muestreos de *C. gallina* hemos detectado la presencia de *M. refringens* y *P. mediterraneus*. Aunque no hemos encontrado coinfección, ésta no se puede descartar, porque los individuos són muy jóvenes y posiblemente ambos patógenos estén en las fases iniciales de infección. Teniendo en cuenta que la esporulación de *M. refringens* se inicia cuando la temperatura del agua es de 17°C (mes de mayo), que las zoosporas de *P. mediterraneus* aparecen más tarde (septiembre-octubre) y que la mortalidad se detecta en junio-julio, lo más probable es que la causa sea la marteiliosis.

ABSTRACT.

One of the main issues in bivalve mollusc production is the prevention and control of diseases, scattered mainly by stock movements.

In the Balearic Islands, we found low pathogenic bivalve parasites as *Bucephalus haimeanus*, *Mytilicola intestinalis* and trematode metacercariae. Furthermore, we found others that are a threat for their welfare, like *Marteilia refringens*, *Perkinsus mediterraneus* and *P. olseni*.

M. refringens is a serious threat, because it causes physiological disorders that could kill the host. Presumably, in the 80s, this disease was the agent of oyster banks die out. Mussels are susceptible to the infection, but they are resistant to the disease.

Mass mortality was detected in 2004 at the striped Venus shell (*Chamelea gallina*) bed in S'Arenal beach. We use histological techniques, *in situ* hybridization, PCR and nested PCR to detect the disease agent. From a paraffin block we retrieved a sequence which showed 99.1% similarity with *M. refringens* type O. Thus, it was concluded that the aetiological agent was *M. refringens*. Subsequently, we found a prevalence of 55.1%.

Marteilia refringens specific location in striped Venus shell tissues was determined by *in situ* hybridization. We observed all known stages, including sporulation, thus this parasite could complete its vital cycle in *C. gallina*, and so striped Venus shell should be considered as a new host of *M. refringens*.

A wide bivalve mollusc variety is infected by *Perkinsus mediterraneus* in Balearic Islands: *Ostrea edulis*, *Mimachlamys varia*, *Arca noae*, *Chamelea gallina*, *Pinna nobilis* and *Venus verrucosa*, but they are not killed by this parasite. *Perkinsus olseni* has only been detected in *V. verrucosa* from Mahon harbour, although we have not detected it in another bivalve species. *Perkinsus* spp. search was performed using RFTM and species was established by PCR-RFLP and sequencing.

P. mediterraneus prevalence was similar to other *Perkinsus* species and their infection dynamics is like *P. marinus*' in Chesapeake Bay, with maximum detection values in

September and October, after summer peak temperature with infection regression in winter.

We have found 12 *P. mediterraneus* haplotypes, all of them sharing a high similarity. Differences grow up when we added GenBank sequences. Then, the haplotype number raised 24.

Three groups of *O. edulis* from Minorca were revealed by phylogenetic analyses which are different from other co-specifics lineages. Analysis supported this differentiation among populations from Minorca and Majorca. This differentiation could be due to Mahon harbour geographic isolation. Nevertheless, another factors, such environmental variability, different detection locations and dates, animal translocations, human activity, etc., might also have some influence.

There are three *Perkinsus* species at the western Mediterranean. Although it is known that co-infections between *P. olseni* and *P. mediterraneus* can happen in warty Venus shell from Mahon harbour, we have not found any occurrence. Furthermore, we have not detected infection by *P. chesapeaki*, although it has been found in the Ebro delta.

We have found out *M. refringens* and *P. mediterraneus* presence in different *C. gallina* samples. Although coinfection has not been found, we cannot discard it, because individuals are very young and perhaps both pathogens are in early infection stages. Given that *M. refringens* sporulation starts when water temperature is 17°C (May), *P. mediterraneus* zoospores appear later (September-October) and mortality is detected in June-July, in this way, marteiliosis might be the candidate.

INTRODUCCIÓ GENERAL.

La producció aquàtica (pesca i aqüicultura) mundial ha crescut de forma contínua durant les cinc últimes dècades a un ritme del 3,2% anual, superant el ritme de creixement de la població mundial que és de l'1,6%. El consum per càpita mundial de productes aquàtics ha passat dels 9,9 kg per persona i any en 1960 a 19,2 kg el 2012. Això ha estat possible gràcies a la combinació de creixement de la població amb l'increment de renda disponible, la facilitat per l'increment de la producció de productes aquàtics, les millores en les tècniques de conservació del peix i uns canals de distribució més eficients.

Els productes aquàtics són actualment una de les més importants fonts de proteïna animal del món, representant el 30% del total de la proteïna consumida en els països en vies de desenvolupament i el 15% a Europa i Amèrica del Nord (FAO 2012).

Les estimacions de la FAO apunten a que la producció mundial de productes pesquers podria superar els 160 milions de tones el 2013 (Fig. 1), amb un lleuger increment tant de la pesca extractiva després d'un 2012 amb xifres negatives a causa del fenomen del Nen, i un augment de la producció aqüícola de gairebé 4 milions de tones (+ 5,6%).

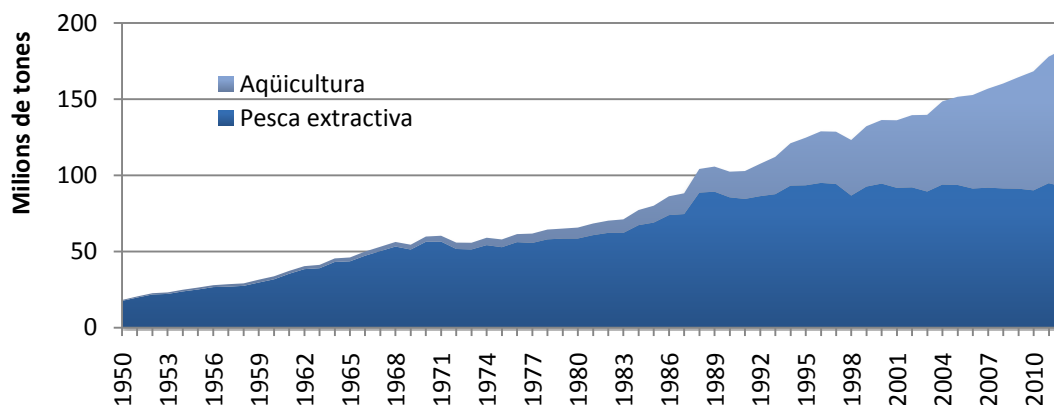


Figura 1. La producció aqüícola mundial va superar els 180 milions de tones l'any 2012, dels quals 92,4 corresponen a la pesca extractiva i 90,4 a l'aqüicultura (incloent algues) (segons FAO 2012).

Al món, la producció de l'aqüicultura gairebé representa el 50% de la producció aqüícola, a l'UE i a Espanya aquesta proporció és menor, del 21,2% i 22,1% respectivament.

De la mateixa manera que a la resta d'Europa, a Espanya es produeixen principalment peixos i mol·luscs, sent les produccions d'algues, crustacis i cefalòpodes testimonials respecte de l'aqüicultura. Al conjunt de l'UE, la producció de peix i de mol·luscs és del

52,4% i 47,6% respectivament, mentre que a Espanya, la major part de la producció de l'aqüicultura es basa als mol·luscs bivalves, que representen aproximadament el 84% de la producció (Fig. 2).

La producció total d'aqüicultura (peixos i mol·luscs, exceptuant les produccions d'alevins i de llavors de mol·luscs) a Espanya l'any 2012 va ser d'un total de 264.161 t, segons MAGRAMA-JACUMAR. Aquesta producció va tenir un valor en la seva primera venda d'aproximadament 395 milions d'euros.

La importància de l'aqüicultura en la producció de mol·luscs es pot comprovar tenint en compte que aquesta va ser de 235.060 tones vers l'extracció de mol·luscs que va ser de 12.415 tones (MAGRAMA-JACUMAR). La principal espècie produïda va ser el musclo (*Mytilus galloprovincialis* i *M. edulis*), amb una producció de 231.754 tones, amb un valor de primera venda de 107,8 milions d'euros, seguida de 1.756 tones d'ostres (*Ostrea edulis* i *Crassostrea gigas*) amb un valor de 4,4 milions d'euros i 1.474 de copinyes (*Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum* i *Venerupis pullastra*), amb un valor de 15 milions d'euros (APROMAR 2014).

Aqüicultura marina a Espanya 2012

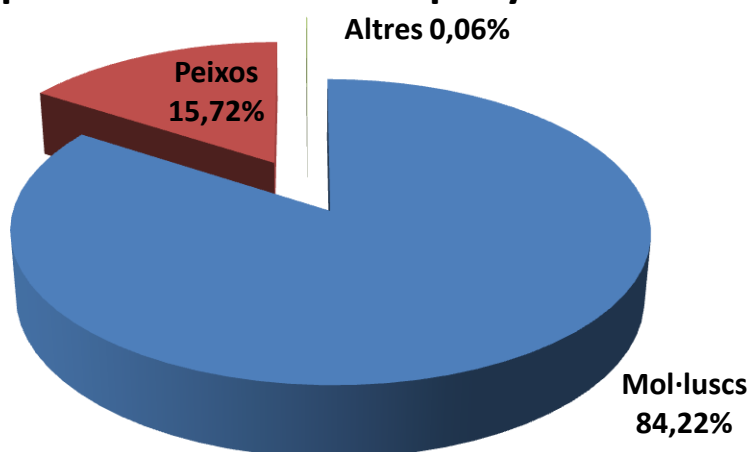


Figura 2. La producció de l'aqüicultura espanyola va ser de 264.161 tones l'any 2012, de les quals més de 84% corresponen als mol·luscs i pràcticament la resta a peixos (segons MAGRAMA-JACUMAR).

Respecte de la producció per comunitats autònomes (Fig. 3), l'any 2012, Galícia concentra el 85% de la producció espanyola, basada en el cultiu del musclo (*Mytilus*

galloprovincialis), seguida per la comunitat Valenciana, Murcia, Andalusia i Canàries, que produeixen principalment llop (*Dicentrarchus labrax*) i orades (*Sparus aurata*). No obstant això, també es produeixen mol·luscs, principalment musclo a Catalunya (2.843 tones), Andalusia (1.116 tones), València (384 tones) i Illes Balears (178 tones).

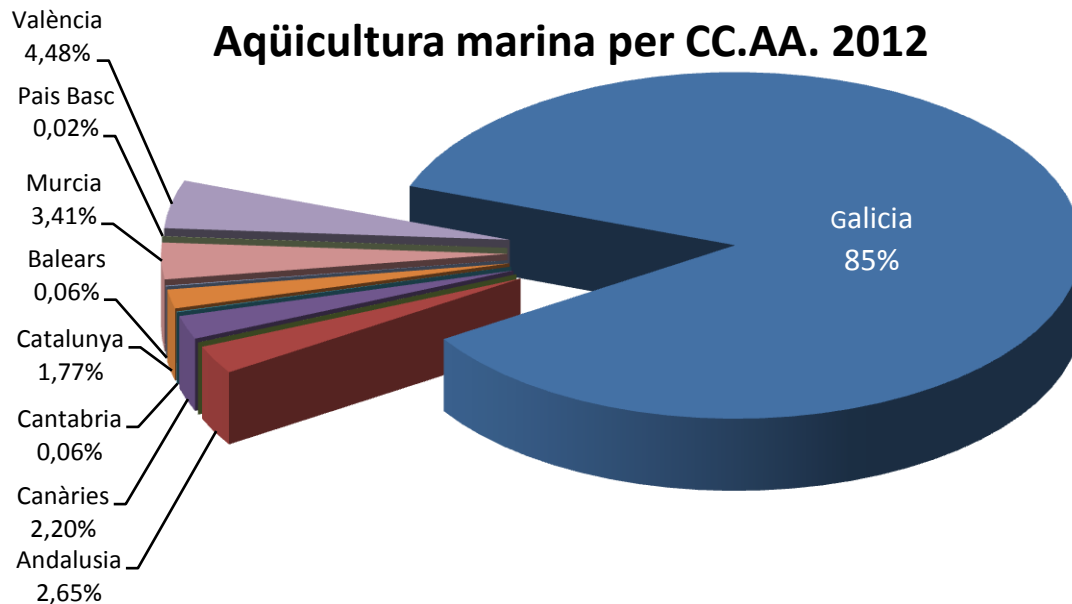


Figura 3. Distribució de la producció espanyola de l'aqüicultura marina en volum per CC.AA. durant 2012. No s'han tingut en compte les produccions d'alevins ni de llavors de mol·luscs (segons MAGRAMA-JACUMAR).

L'evolució de l'aqüicultura a les Illes Balears ha passat d'estar basada en l'engreix de peixos a la producció d'alevins, que són engreixats a altres comunitats autònomes. Per aquest motiu, la producció, a partir de 2009 és exclusivament de mol·luscs (Fig. 4).

La nostra comunitat autònoma presenta, respecte d'altres comunitats, una producció de mol·luscs discreta, basada principalment en el cultiu de musclo (*M. galloprovincialis*), amb una producció l'any 2014 de 112 tones.

Un dels principals reptes als quals s'enfronta la producció de mol·luscs bivalves és la prevenció i el control de les malalties. Tant els bancs naturals com els cultius extensius, que mantenen una baixa densitat d'organismes en el cultiu, són menys susceptibles a les malalties, encara que en ocasions es produeixen. Però sobretot els cultius intensius, amb elevades densitats d'organismes, que en principi estan orientats a generar un major benefici econòmic, estan molt més exposats a l'aparició i desenvolupament de diferents malalties, com a conseqüència de l'augment en l'estrès de l'animal i de la facilitat per a

la transmissió de l'agent patògen. És important limitar l'aparició de les malalties o controlar el seu desenvolupament en les explotacions aquícoles, ja que de poc serveix una espècie de bon creixement o alt valor comercial si aquesta espècie es mor o desenvolupa malformacions.

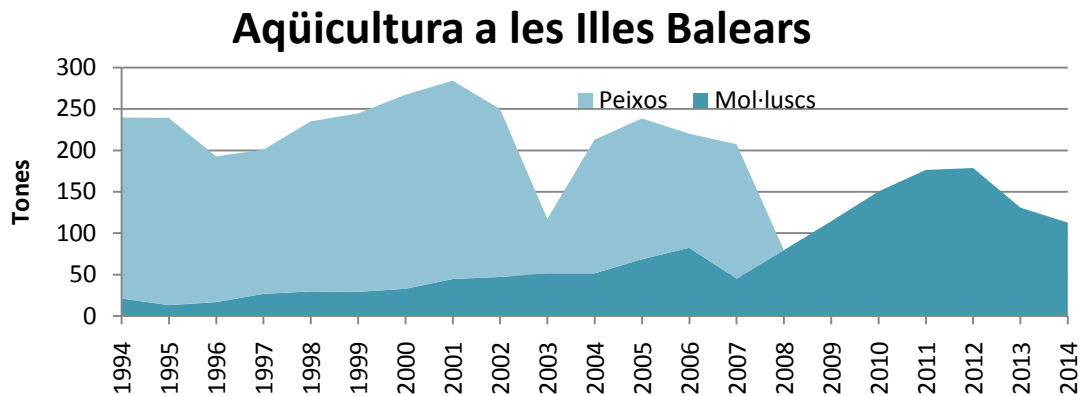


Figura 4. Evolució de l'aqüicultura a les Illes Balears. La producció principal fins l'any 2008 va ser de peixos, especialment orada (*Sparus aurata*) i posteriorment, llop (*Dicentrarchus labrax*). El tancament de centres d'engreix de peixos i la millora de les muscleres en Maó, han fet que a partir de 2008, la producció de l'aqüicultura balear sigui pràcticament de musclo, donat que els alevins de llop i orada que es produeixen s'engreixen a altres CC.AA.

En ocasions, aquestes malalties poden produir pèrdues econòmiques recurrents, a causa de condicions ambientals estacionals o la superació d'un llindar d'estrès en els hostes. Conèixer el desenvolupament de la malaltia, així com un ràpid diagnòstic de la mateixa és vital en la producció aquícola. A partir d'un bon coneixement de l'epidemiologia es pot preveure quins nivells de malaltia produiran una mortalitat o una minva en la qualitat del producte. Per tant, mitjançant un seguiment de les malalties presents i la seva intensitat es podrà aconsellar la retirada immediata de la producció de mol·luscs.

La identificació i l'estudi del desenvolupament de la malaltia pot ajudar a controlar la dispersió de la mateixa, limitant les pèrdues degudes a mortalitat o morbiditat ja que en determinades situacions, el desenvolupament d'una malaltia que no mata a l'hoste pot originar la pèrdua de valor comercial del mateix com a conseqüència de les malformacions produïdes.

Els mol·luscs, com tots els invertebrats disposen d'eines cel·lulars i moleculars per reconèixer el material estrany i eliminar-lo. El sistema de defensa contra els patògens sembla restringit a una immunitat innata o natural (Medzhitov 2001). El sistema immune dels mol·luscs està localitzat preferentment a la hemolinfa, perquè n'és el medi

ideal per mobilitzar-se i arribar on n'és necessari. Els mecanismes de defensa humoral estan basats en proteïnes dissoltes a l'hemolinfa mentre que el component de la immunitat cel·lular està mediat per cèl·lules sanguínies o hemòcits (Feng 1988). Aquests components ja són presents abans del contacte amb el patògen, i no incrementen la seva presència després de la interacció amb el mateix. La immunitat innata no discrimina entre distints agents estranys encara que pot reconèixer patrons moleculars associats a patògens presents a la superfícies de diferents microorganismes (Medzhitov i Janeway 1997).

Per la manca d'immunitat adquirida o adaptativa no és possible dur a terme immunitzacions mitjançant vacunes, i les estratègies utilitzades per superar les malalties han estat:

- cria selectiva per obtenir individus resistents (Naciri-Graven *et al.* 1998, Culloty *et al.* 2001, Tinajero *et al.* 2002, Ragone-Calvo *et al.* 2003a, Degremont 2011),
- canvis en les pràctiques generals de cria, com per exemple, cultiu en suspensió (Lama i Montes 1993), menor densitat de sembra (Grizel *et al.* 1998, Cranfield *et al.* 2005), sembres mixtes amb espècies resistents (Grizel 1985, Carnegie i Cochenec-Laureau 2004),
- sembres de llavors produïdes a vivers (*hatcheries*) (Conchas *et al.* 2003),
- repoblació amb espècies resistents (Ragone Calvo *et al.* 2003a),
- quimioteràpia (Calvo i Burreson 1994, Faisal *et al.* 1999, La Peyre *et al.* 2003, Elandalloussi *et al.* 2005, Friedman *et al.* 2007, Rosenblum *et al.* 2008),
- desinfecció de larves i llavors (Delaney *et al.* 2003).

Toti i això que aquestes estratègies han permès reduir les pèrdues en cap cas han eradicat les malalties. A més s'han de tenir en compte que alguna d'aquestes estratègies és viable a *hatcheries*, com l'ús de substàncies quimioterapèutiques, però no és adequada pel medi natural. D'altres són recomanables a determinats indrets on la malaltia té una prevalença molt elevada, com ha estat el cas de l'ús de cria selectiva de *Crassostrea virginica* tolerant a la infecció per *Perkinsus marinus* a la badia de Chesapeake.

De vegades, l'aparició d'una malaltia en un cultiu és posterior a la importació d'animals procedents d'un altre lloc del món, bé com a conseqüència d'intents de restaurar un

cultiu disminuït com a conseqüència d'una malaltia o d'introduir una espècie nova d'elevat interès comercial i ràpid creixement, que millori les característiques biològiques de les espècies autòctones. Un clar exemple d'aquest últim succés és la introducció del paràsit *Perkinsus olseni* a les costes gallegues juntament amb exemplars d'escopinya japonesa, *Ruditapes philipinarum*, de valor comercial una mica menor que l'autòctona escopinya fina, *Ruditapes decussatus*, però de major resistència i superior taxa de creixement, o la introducció del patògen *Xenohalotis californiensis* mitjançant la importació de llavors d'orella de mar, *Haliotis tuberculata*, d'hatcheries irlandeses.

Les malalties dels mol·luscs bivalves poden estar causades per virus, bacteris, fongs, protozous i metazous, essent els virus, possiblement el grup biològic menys estudiat en la patologia de mol·luscs fins ara; més per les limitacions tècniques i la no existència de línies cel·lulars estables de mol·luscs, que permetin la replicació *in vitro* d'aquests agents patògens, que per una resistència dels mol·luscs bivalves a una infecció vírica.

En el cas de les malalties de mol·luscs bivalves causades per bacteris, aquestes són motivades principalment per lesions o altres formes d'estrès (Elston 1989). Generalment són considerades de menor importància que, per exemple, les causades per protozous. La majoria de les malalties bacterianes en mol·luscs s'han descrit en estadis larvaris i han estat associades amb altes mortalitats en vivers (Lauckner 1983). Una correcta higiene de les instal·lacions pot ser el mètode de control més eficaç per eradicar les malalties d'aquest tipus.

Respecte dels fongs, la majoria de les malalties de mol·luscs bivalves es limiten a provocar malformacions en les valves dels mateixos. Els fongs tenen un paper important en les xarxes tròfiques dels ecosistemes com a degradadors dels substrats calcaris i de vegades poden emprar com a aliment les petxines dels mol·luscs, tant vius com morts (Lauckner 1983), provocant malformacions que limiten el seu valor comercial. Hi ha diferents espècies de fongs que poden créixer en les copinyes tant de mol·luscs morts com vius, degradant la matèria orgànica i utilitzant els diferents components com a elements nutritius (Cavaliere i Alberte 1970).

Els metazous, habitualment, no són causa de fortes mortalitats en mol·luscs, i en moltes ocasions, si aquestes es produeixen, són derivades de la menor capacitat d'adaptació del mol·lusc parasitat als canvis ambientals.

A Europa, la producció d'ostra plana (*O. edulis*) va caure des dels anys 60 per les successives epidèmies de *Marteilia refringens* i *Bonamia ostreae*. La producció total d'ostra plana a Europa va passar de pràcticament 99.914 t en la primera meitat de la dècada dels 70, just abans que es presentés el problema de la marteiliasis, fins 38. 843 t. en la segona meitat dels anys 90 (FAO Fisheries Department 2003). En quant a la producció d'escopinyes a Europa, es pot apreciar una estabilització en el creixement de la producció a la Península Ibèrica, que podria estar influenciada per la presència del patògen *P. olseni* associat a mortalitats d'escopinya llisa (*Ruditapes decussatus*) a Portugal i Espanya a finals dels anys 80 (González Herrero *et al.* 1987, Azevedo 1989). Quant a la producció europea de les dues principals espècies de musclo no s'ha vist, de moment, afectada per cap mortalitat d'importància, ja que si bé *M. refringens* està present en musclos cultivats, la seva presència en aquesta espècie no origina mortalitats.

Per altre banda, el marisqueig ha sofert a les Balears problemes greus, com les mortalitats d'ostra (*Ostrea edulis*) els anys 80, la prohibició de la captura de dàtil de mar (*Lithophaga lithophaga*) per l'aplicació de la directiva Hàbitats (Unió Europea 1992) i l'exhauriment del banc de rossellona (*Chamelea gallina*) de la badia de Palma.

Com ja hem comentat abans, una de les principals limitacions de l'aqüicultura és la presència de malalties. La Unió Europea ha editat diverses Decisions i Directives, l'última a l'any 2006 (Unió Europea 2006) que recopilen tota la informació sobre aquest tema, estableixen una normativa pel control d'aquestes malalties, i enumeren una sèrie d'elles com de "declaració obligatòria" al territori de la Unió Europea (annex V Part II), entre les quals, *Bonamia ostreae* i *Marteilia refringens* (que afecten tant al musclo com a l'ostra) i altres malalties absents en el territori Europeu (Annex V Part I) entre les que es troba *Mikrocytos mackini* (que afecta ostres a la costa Oest dels Estats Units), *Perkinsus marinus* (que afecta ostres a la costa est de USA i Mèxic) i *Bonamia exitiosa* (que afecta ostres d'Austràlia i Nova Zelanda). Encara que, recentment, també s'ha detectat, gràcies a les tècniques moleculars, la presència d'aquests patògens considerats fins al moment com "exòtics" a Europa: *Bonamia exitiosa* a l'ostra plana (*Ostrea edulis*) (Abollo *et al.* 2008, Carrasco *et al.* 2012) i de *Mikrocytos mackini*-like en escopinyes (*Ruditapes philipinarum*) a Galícia (Ramilo *et al.* 2014).

Aquesta normativa té en compte l'evidència de que la principal causa de dispersió de patògens és el moviment d'estocs, tant de llavor per a cria, com la introducció de noves espècies, i presenta una política de zonificació estricta basada en la presència o absència

d'aquestes malalties, que limita el flux comercial i condiona les importacions i exportacions. A més obliga a inspeccions sanitàries i a la investigació de mortalitats anòmales.

Per dur a terme el control i la vigilància de les infeccions parasitàries en animals aquàtics en general, és imprescindible comptar amb tècniques de diagnòstic apropiades que permetin detectar i identificar els agents patògens de forma fiable i ràpida.

Tradicionalment, en mol·luscs bivalves, s'han emprat tècniques histològiques (microscòpia òptica), per tal d'observar les estructures pròpies dels paràsits en els teixits de l'hoste. Aquesta tècnica permet a més conèixer els òrgans o teixits que es veuen afectats i apreciar els danys associats a la malaltia. L'anàlisi histològic permet també obtenir informació sobre l'inici i desenvolupament de la infecció i la detecció de nous patògens. No obstant això, aquesta metodologia exigeix la formació d'observadors experimentats i l'estudi previ de la histologia normal de l'hoste. Fins i tot amb aquests coneixements, alguns patògens són difícils de detectar en infeccions lleus o en fases que no comporten lesions histològiques. Un altre desavantatge d'aquesta metodologia és la manca d'especificitat, ja que la simple observació del paràsit, en moltes ocasions, no permet la discriminació i identificació entre espècies relacionades en base únicament a les característiques morfològiques. Finalment, són tècniques que consumeixen molt de temps.

Com alternativa a la histologia, el cultiu del paràsit pot ser útil quan es tracta d'infeccions bacterianes, però no tant pel que fa a protozous, que són els principals causants de malalties a bivalves, perquè sols es poden cultivar algunes espècies de *Perkinsus*, i a més, no permeten una classificació taxonòmica estricta i consumeixen molt de temps.

A la dècada dels 80, es varen començar a utilitzar tècniques immunològiques mitjançant l'ús d'anticossos específics, per a *Bonamia ostreae* (Rogier *et al.* 1991), *Marteilia* spp. (Robledo *et al.* 1994a) o per *Perkinsus olseni* (Goggin *et al.* 1991), encara que tenen una limitada utilitat, especialment per les diferències serològiques entre soques (Carnegie i Cochenec-Laureau 2004).

Als 90 es van començar a aplicar a l'estudi d'aquestes malalties, tècniques molt sensibles de biologia molecular, com ara la hibridació *in situ*, la reacció en cadena de la

polimerasa (PCR) i la seqüenciació de l'ADN, principalment del gen 18S ribosòmic i de la regió ITS.

La PCR està revolucionant el diagnòstic, per la seva sensibilitat, especificitat i rapidesa, encara que sols confirma la presència del paràsit a la mostra, sense aportar informació sobre la viabilitat del mateix. Malgrat això, el diagnòstic mitjançant PCR facilita la monitorització d'agents infecciosos en un elevat nombre de mostres i permet realitzar anàlisis de variació genètica entre poblacions.

La hibridació *in situ* és també una eina valuosa per al diagnòstic, però presenta l'inconvenient de ser una tècnica lenta. La combinació d'aquestes tres tècniques és la metodologia més completa per al diagnòstic de paràsits de bivalves.

Les tècniques moleculars han permès la detecció de patògens exòtics que tradicionalment es considerava que no es trobaven a Europa. La malaltia associada a *Bonamia exitiosa* és responsable de mortalitats massives en l'hemisferi sud (Nova Zelanda) que afecta de manera natural a ostres (*O. chilensis* i *O. Angasi*). No obstant això, es va detectar la presència d'aquest patògen en ostres, *O. edulis*, al setembre de 2007 (Abollo *et al.* 2008) per primera vegada a Europa. Durant la inspecció histològica de les ostres analitzades es podien observar dos tipus de microcèl·lules: el tipus més petit que mostrava el nucli en posició perifèrica i un citoplasma molt escàs corresponent a *B. ostreae* i el tipus més gran que mostrava el nucli en posició central, de vegades subcentral però rarament perifèric, i major quantitat de citoplasma que el tipus anterior corresponent a *B. exitiosa*. Aquestes diferències a nivell histològic de totes formes són molt complicades de determinar i, per això, la forma de distingir entre les dues espècies és dur a terme diferents tècniques de biologia molecular (PCR seguit d'una anàlisi de restricció i/o seqüenciació).

Els mètodes tradicionals, com la histologia, són estàtics i consumeixen temps però, a canvi ofereixen una visió de conjunt, permeten determinar la interacció del patògen amb l'hoste i permet detectar-ne de nous. Les tècniques moleculars són ràpides, específiques i sensibles però necessiten ser validades per determinar l'existència de falsos positius i negatius i correlacionar els resultats amb els obtinguts amb les tècniques tradicionals.

OBJECTIUS.

OBJECTIU GENERAL.

Identificació dels principals patògens que afecten als mol·luscs bivalves en les Illes Balears.

OBJECTIUS SECUNDARIS.

Per aconseguir aquest objectiu principal, s'han considerat els següents objectius secundaris:

1. Realització d'una investigació epidemiològica mitjançant tècniques histològiques.
2. Detecció de la presència de *Perkinsus* spp. al port de Maó.
3. Investigació de les causes de la desaparició del banc natural de rossellones de la badia de Palma.
4. Presència de paràsits com *Marteilia* spp. i *Perkinsus* ssp. mitjançant tècniques histològiques i genètic-moleculars.
5. Distribució de *Perkinsus mediterraneus* a les Illes Balears.
6. Filogènia de les diferents espècies de *Perkinsus*.

MATERIALS I MÈTODES.

Obtenció de mol·luscs.

Es varen obtenir mostres d'escupinya gravada (*Venus verrucosa*), ostra (*Ostrea edulis*), musclo (*Mitylus galloprovincialis*), rossellona (*Chamelea gallina*), romera (*Mimachlamys varia*), nacra (*Pinna nobilis*), dàtil de mar (*Lithophaga lithophaga*) i peu de cabrit (*Arca noae*) de 8 diferents localitats del litoral de les Illes Balears (Fig. 5). La nacra és una espècie protegida i les mostres es van obtenir amb un permís especial de la Conselleria de Medi Ambient, Agricultura i Pesca.

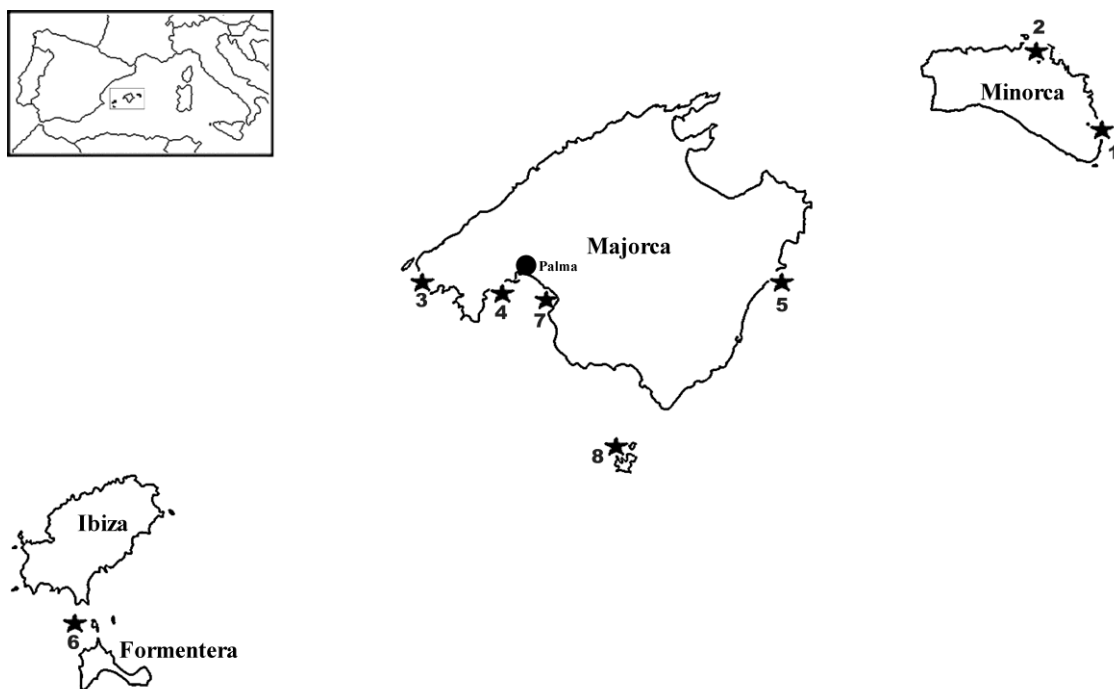


Figura 5. Localitats on es van recollir mostres de mol·luscs bivalves. 1 Port de Maó, 2 Badia de Fornells, 3 Port d'Andratx, 4 Palmanova, 5 Porto Cristo, 6 Freus de Formentera, 7 s'Arenal, 8 Cabrera.

A totes les mostres es va determinar el pes de cada individu, amb una bàscula de precisió de 0,01 g i la talla màxima, amb un peu de rei amb una precisió d'una dècima de mil·límetre (Fig. 7 i 8).

En el cas de les mostres adreçades a la detecció de les diferents espècies de *Perkinsus*, una de les brànquies es va extraure per realitzar l'anàlisi RFTM i l'altre brànquia es va conservar en 95 % (v/v) d'etanol per a l'extracció de l'ADN i anàlisi mitjançant PCR. La resta del cos es va conservar per a l'examen histològic. En el cas de *Chamelea gallina*, els individus eren molt petits, i per aquesta raó, una quarta part del cos es va emprar per

a l'anàlisi RFTM, l'altre quart per a l'extracció d'ADN i la resta per a examen histològic.

Biocenosi i estudi biològic del banc de rossellona.

Des de l'inici del seguiment es van establir mostreigs mitjançant pesques d'arrossegament amb rastrell i posteriorment amb bussejadors que prenen de 10 a 20 mostres (recollint tota la fauna bentònica) delimitades per quadres de 50 x 50cm (0,25 m²) col·locats directament damunt el fons.

Aquests mostreigs es feien a tres zones: C.N. s'Arenal (39° 30' 336N – 2° 44' 440E), zona de Les Meravelles (39° 30' 083N – 2° 44' 172E) i zona de les Fontanelles (39° 31' 365N – 2° 43' 496).

Al 1999, es va descobrir que el banc tenia una extensió superior. Per aquest motiu, es va incrementar el nombre de zones del banc a 5, que estan representats a la Fig. 6, amb 5 estacions de mostreig. Les zones 2, 3 i 4 coincideixen respectivament amb la zona de les Fontanelles, zona de les Maravelles i zona del C.N. s'Arenal.

Aquest banc es mostrejava durant tot l'any seguint l'esquema següent:

Censos trimestrals. A cada zona existia una estació de mostratge. Els censos, efectuats per bussejadors consistiren en l'extracció manual i registre de tota la fauna macroscòpica en un quadre de 0,25 m², del qual es feren 20 rèpliques (5m²) per zona, excepte des de 1997 a 1999 per motius logístics de la D.G. de Pesca i Medi Marí. També s'anotà la presència d'espècies observades durant l'extracció. Les dades que es determinaren són: espècie, talla màxima i pes de cada individu (Fig. 7 i 8).

Pesques d'arrossegament. Al setembre s'efectuaren pesques amb embarcacions professionals, emprant rastrells reglamentaris (Unió Europea 1984).

Per a cada pesca es registraren: posició inicial i final, distància arrossegada, temps d'arrossegament, nombre de rastrells i mida de la boca, espècies presents, talla màxima (o longitud de l'eix antero-posterior, longitud màxima o diàmetre màxim), altura, gruixa (mitjançant calibre amb una precisió d'una dècima de mil·límetre) i pes de cada individu d'una mostra de 500 g de rossellona (en el cas que s'hagués obtingut una quantitat menor, es mostrejava tota la pesca) (Fig. 7 i 8).



Figura 6. Divisió del banc de rosellona de s'Arenal en cinc zones per tal de realitzar els mostreigs establerts al pla de seguiment del banc de rosellona. A cada una de les zones es realitzen el mes de setembre 3 operacions de pesca amb rastrell amb el "Pedaç" de la Direcció General de Pesca i Medi Marí amb embarcacions professionals. A cada operació de pesca s'anoten el temps de pesca efectiva i el punt inicial i final. A més, cada trimestre es realitzaven censos amb bussejadors, que prenen de 10 a 20 mostres (recollint tota la fauna bentònica) delimitades per quadres de 50 x 50 cm (0,25 m²) col·locats directament damunt el fons. Els punts de mostratge són els que se representen amb un punt vermell.

En tots els casos se determinen les espècies segons les claus d'identificació (Rield 1986, Fisher *et al.* 1987, Poppe i Goto 1991, 1993, Falciae i Minervini 1995, Zenetos *et al.* 2003).

Materials i mètodes

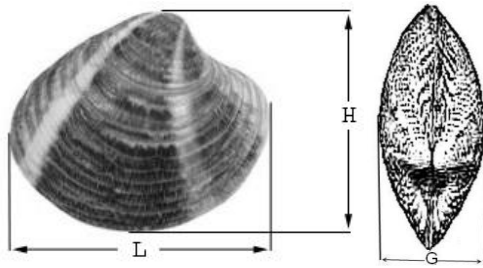


Figura 7. Esquema de presa de paràmetres biològics (H, altura; L, talla màxima; G, gruixa.)

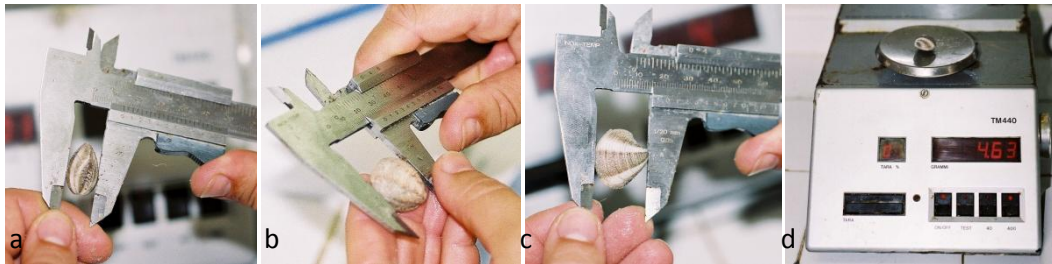


Figura 8. Presa de dades biomètriques: a: Gruixa, b, Talla màxima, c, Altura, d Pes

Anàlisi histopatològic.

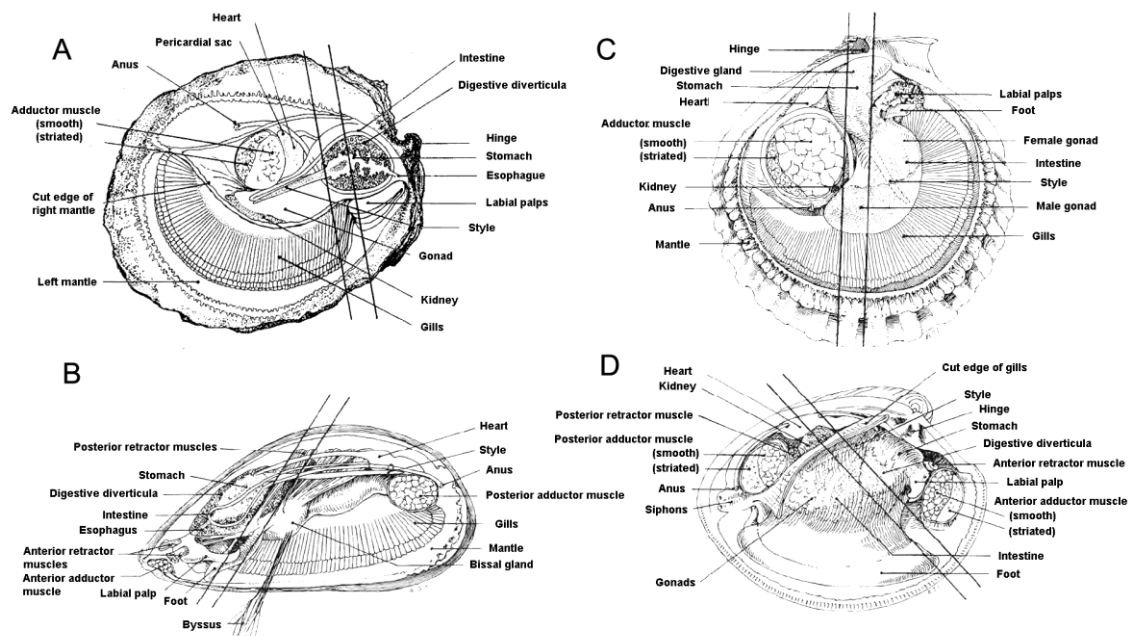


Figura 9. Anatomia de (A) ostra, (B) romera, (C) musclo i (D) rossellona. Les dues línies paral·leles mostren on s'ha de realitzar el tall per a les mostres histològiques (Howard i Smith 2004).

Els cossos dels mol·luscs obtinguts varen ser fixat en formol tamponat al 10% durant una setmana. Una secció longitudinal d'aproximadament 5 mm de gruix es va tallar de

la part mitjana del cos incloent mantell, gònades, glàndula digestiva, ronyó i peu. El tall es va fer segons Howard i Smith (2004) (Fig. 9). Aquestes seccions es van deshidratar en sèries d'etanol, embegudes en paraplast i tallats a 4 micres. La preparació histològica es va tenyir amb hematoxilina eosina de Harris i es va examinar sota microscopi òptic (Audemard *et al.* 2002).

Extracció d'ADN de les mostres.

Per a la detecció de *Marteilia refringens*, l'ADN genòmic fou obtingut a partir de 20 talls de 5 µm de cada un dels blocs de paraplast de rossellones infectades. Els talls foren introduïts cada un a un tub de microcentrifuga i es varen desparafinar de la manera següent: Es va afegir 1 ml d'aigua estèril ultra pura als talls, es van agitar mitjançant vòrtex i es van incubar durant una nit a 60°C. Després de centrifugar a 5000g durant 5 minuts, s'eliminà la paraplast sòlida de la capa superior i es va repetir el procediment amb un període d'incubació a 65°C més curt (2 hores). El pellet es va processar com si fos un teixit, emprant *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche) d'acord amb les instruccions del fabricant.

Per a la detecció de *M. refringens* en rossellones conservades congelades, de mostreigs posteriors i per a la detecció de *Perkinsus* spp., les extraccions d'ADN dels teixits es van realitzar mitjançant el kit *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel) d'acord amb les instruccions del fabricant. La qualitat i quantitat d'ADN es va comprovar mitjançant un espectrofotòmetre *Nanodrop® ND-1000* (NanoDrop Technologies, Inc).

Detecció dels patògens: PCR i PCR niada.

Per a la detecció de *Marteilia refringens*, les seqüències i localització dels encebadors emprats per la primera PCR i la PCR niada es mostren a la Taula 1 i Fig. 10. Ambdues PCR es feren en un volum final de 50 µl emprant 100 ng de cada encebador (MT-1 i MT-2 per la primera PCR i MT-1B i MT-2B per la PCR niada) i *Ready-to-go PCR beads* (Amersham Biosciences), seguint les recomanacions del fabricant. S'empraren diferents quantitats de l'ADN extret en la primera amplificació (100 ng a 200 pg). Les condicions d'amplificació varen ser: 94°C durant 5 minuts, 30 cicles de 94°C durant un minut, 55°C durant 1 minut i 72°C durant 1 minut i finalment 10 minuts a 72°C. Per a la PCR niada, les condicions d'amplificació varen ser: 94°C durant 5 minuts, 25 cicles de

94°C durant 30 segons, 60°C durant 30 segons i 72°C durant 30 segons i finalment 5 minuts a 72°C. En cada PCR (primera i niada) s'empraren controls negatius: aigua estèril i ADN genòmic de *Chamelea gallina* no infectada (comprovat per tècniques histològiques i per anàlisi de PCR).

Taula 1. Descripció dels encebadors i dels seus usos.

Encebador	Seqüència (5'→3')	Ús	Mida(bp)	Referència
MT-1	GCCAAAGACACGCCTCTAC	Primera PCR, <i>Marteilia</i>	525	López-Flores <i>et al.</i> 2004.
MT-2	AGCCTTGATCACACGCTTT			
MT-1B	CGCCACTACGACCGTAGCCT	PCR niada, síntesis sonda ISH <i>Marteilia</i>	358	López-Flores <i>et al.</i> 2004.
MT-2B	CGATCGAGTAAGTGCATGCA			
SS2	CCGGTGCCAGGTATATCTCG	síntesis sonda ISH <i>Marteilia</i>	265	Le Roux <i>et al.</i> 1999.
SAS1	TTCGGGTGGTCTTGAAAGGC			
ITS4	CCGCACACGTTCTTCACTCC	Cribat <i>Marteilia</i>	412	Le Roux <i>et al.</i> 2001
ITS5	CTCGCGAGTTTCGACAGACG			
PerkITS85	CCGCTTTGTTTGGA/CTCCC	Detecció Perkinsus	643	Abollo <i>et al.</i> 2006
PerkITS750	ACATCAGGCCTTCTAATGATG			

En el cas de rossellones obtingudes a mostreigs posteriors, les PCR es feren en un volum de 20 µl que contenia 1 µl d'ADN genòmic (40-50 ng), 10 µl de *Taq Kapa Ready Mix* ADN polimerasa (KapaBiosystems), 0,8 µl (20 mM) de cada encebador (ITS4 i ITS5) i aigua per completar el volum final. Les condicions d'amplificació varen ser: 94°C durant 5 minuts, 30 cicles de 94°C durant un minut, 55°C durant 1 minut i 72°C durant 1 minut i finalment 10 minuts a 72°C. Les reaccions d'amplificació es van dur a terme en un termociclador de gradient *Multigene* (Labnet). Com a controls negatius es varen emprar aigua destil·lada i ADN genòmic de *C. gallina* no infectada. Com a controls positius es va emprar ADN del ITS de *Marteilia refringens* tipus O i tipus M, proporcionat pel LNREMB (laboratori Nacional de Referència de Malalties de Mol·luscs Bivalves).

Per a la detecció de *Perkinsus* spp., les seqüències i localització dels encebadors emprats per la PCR es mostren a la Taula 1 i Fig. 10. Es va amplificar la regió ITS del gen d'ARN ribosòmic (ARNr) (incloent ITS1, 5.8S i ITS2) a partir de l'ADN aïllat

mitjançant amplificació per PCR utilitzant els encebadors específics de la regió ITS de *Perkinsus* (Casas *et al.* 2002b, 2004).

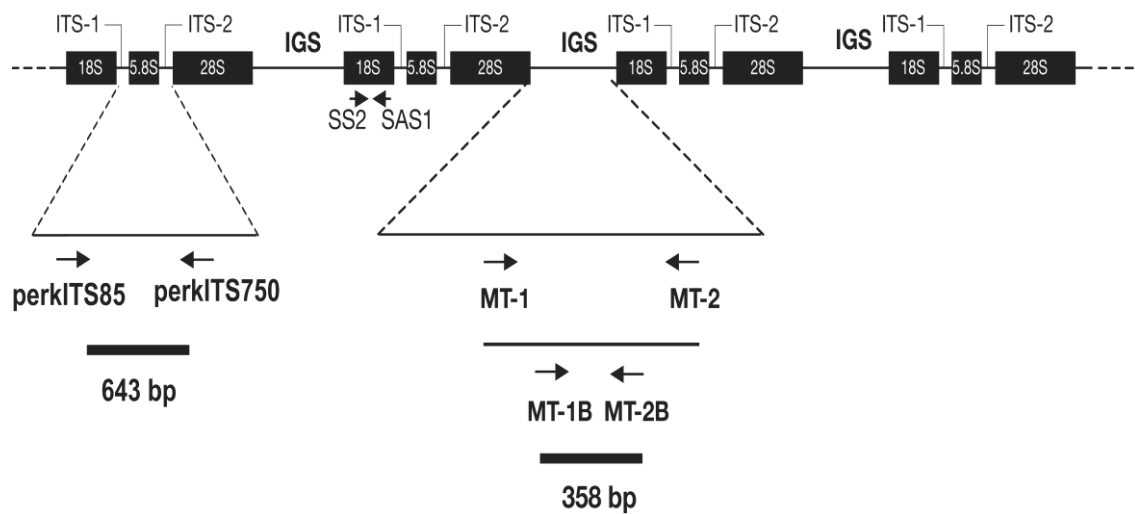


Figura 10. Representació esquemàtica del complex genètic del RNA ribosomal, que conté els gens que codifiquen rRNA i les regions espaiaadores. Es mostren les localitzacions dels encebadors emprats.

Les reaccions de PCR es van realitzar en un volum total de 20 µl que contenia 1 µl d'ADN genòmic (80 ng), 10 µl de *Taq Kapa Ready Mix DNA polimerase* (KapaBiosystems), 0,8 µl (20 mM) de cada encebador i aigua per completar el volum final en un termociclador de gradient *Multigene* (Labnet).

Les condicions d'amplificació per la regió ITS de *Perkinsus* va ser: 94°C durant 5 minuts, 35 cicles de 94°C durant 45 s, 55°C durant 45 s i 72°C durant 1 min, seguit per 72°C durant 10 min. Un control negatiu i un control positiu (ADN d'una ostra infectada amb *P. mediterraneus* del port d'Andratx) es van incloure a totes les reaccions de PCR.

Els productes de la PCR foren visualitzats després d'electroforesi en gel d'agarosa al 1% o 2% amb tampó TAE i amb bromur d'etidi al 1% (p/v) o amb *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium) mitjançant llum ultraviolada.

Seqüenciació.

***Marteilia refringens*:** Tres fragments de l'amplificació a partir de les extraccions de les mostres en paraplast, van ser extrets del gel i purificats emprant *GFX™ PCR-ADN i Gel Band Purification kit* (Amersham Biosciences).

Perkinsus spp.: Els fragments positius extrets dels gels varen ser purificats emprant *Nucleospin Extract II PCR clean-up Gel extraction* (Macherey-Nagel).

En ambdós casos, les seqüències es van obtenir emprant un *ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), usant el Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) i un *ABI Prism 3130XL*.

Comparació de les seqüències purificades de bivalves. Anàlisi filogenètic.

Marteilia refringens: Per avaluar l'afinitat genètica de les seqüències obtingudes del rADN IGS de *Marteilia refringens* se descarregaren del GenBank seqüències de treballs previs i s'empraren en un anàlisi comparatiu.

Els nombres d'accés de les seqüències es presenten a la Taula 2.

Taula 2. Seqüències incloses a les anàlisis filogenètiques.

Hoste	Nombre de seqüència
<i>Ostrea edulis</i>	AJ629352-AJ629356
<i>M. galloprovincialis</i>	AJ629357-AJ629376 AM748042 AM748043
<i>S. marginatus</i>	AM748037-AM748041

Es va realitzar un alineament múltiple de seqüències mitjançant el paquet ADN del programari MegAlign (Lasergene). La variabilitat de les seqüències dins i entre espècies hostes va ser calculada amb el model matricial de distàncies de dos paràmetres de Kimura (Kimura 1980) usant el paquet MEGA (Kumar *et al.* 2004).

Perkinsus spp.: Per determinar la filiació taxonòmica dels *Perkinsus* spp. aïllats dels bivalves, les seqüències obtingudes van ser analitzades utilitzant l'eina bàsica de cerca local d'alineació (BLAST), del Centre Nacional d'Informació Biotecnològica (NCBI) i es van alinear juntament amb les seqüències disponibles per *Perkinsus* spp. a la base de dades GenBank utilitzant l'algoritme CLUSTAL-W (Thompson *et al.* 1994) del paquet de programari BioEdit 7.1.3.0 (Hall 1999). El nombre d'haplotips i la diversitat nucleotídica es van calcular utilitzant el programari DnaSP 5 (Librado i Rozas 2009).

A les anàlisis filogenètiques es van incloure les seqüències obtingudes de GenBank (N=53, Taula 3).

Taula 3. Seqüències incloses a les anàlisis filogenètiques.

<i>P. marinus</i>				<i>P. olseni</i>			
AY295184				AF140295			
U07700	USA	<i>Crassostrea virginica</i>		AF369969	Espanya		<i>Ruditapes</i>
DQ370474				U07697	Austràlia		<i>decussatus</i>
JQ266236				AF509333	Portugal		
JQ266240	Mèxic	<i>Crassostrea corteziensis</i>		DQ194979	Japó		
JX144357	Brasil	<i>Crassostrea rhizophorae</i>		FJ481986	Espanya		<i>Ruditapes</i>
				AF473840	Corea		<i>philippinarum</i>
<i>P. mediterraneus</i>				<i>P. honshuensis</i>			
DQ370482				U07701	Austràlia		<i>Haliotis laevigata</i>
–				EF204081	Nova Zelanda		<i>Astrovenus</i>
DQ370492	Espanya	<i>Ostrea edulis</i>		EU293848			<i>stuthbury</i>
AY487834				<i>P. honshuensis</i>			
–				DQ516696			
AY487843				DQ516697			
<i>P. qugwadi</i>				DQ516698	Japó		<i>Ruditapes</i>
AF151528	Canada	<i>Patinopecten yessoensis</i>		DQ516700			<i>philippinarum</i>
<i>P. beihaiensis</i>				DQ516702			
EU068080				<i>P. chesapeaki</i>			
EU068083				AF102171			
EU068090	Xina	<i>Crassostrea hongkongensis</i>		AY305326	USA		<i>Macoma</i>
EU068095				AY876302			<i>balthica</i>
EU068107				DQ370504			

Els arbres filogenètics van ser arrelats respecte a la seqüència d'un dinoflagelat, *Dinophysis sacculus* (AY040583), perquè les dades moleculars donen suport a una estreta afinitat entre els dinoflagel·lats i les espècies del filum *Perkinsus* (Reece *et al.* 1997, Siddall *et al.* 1997, de la Herrán *et al.* 2000, Murrell *et al.* 2002, Saldarriaga *et al.* 2003).

L'arbre filogenètic basat en el mètode estadístic Neigbor–Joining (NJ) es va realitzar utilitzant el programari MEGA 5.05 (Tamura *et al.* 2011) amb 10.000 replicacions de *bootstrap* i valor de tall per a l'arbre de consens del 60%.

La distància genètica corresponent al nombre de substitucions de bases per lloc, fent la mitjana de totes els parells de seqüències es va calcular utilitzant el model de Tajima-Nei (Tajima i Nei 1984) dins el programari MEGA v 5.05.

Es va realitzar també la inferència bayesiana, mitjançant el programari MrBayes versió 3.2 (Huelsenbeck *et al.* 2001) d'acord amb el model de millor ajustament i paràmetres obtinguts amb jModelTest v 2.1.4 (Darriba *et al.* 2012).

Una xarxa de parsimònia estadística (amb un límit de connexió del 95%) es va construir utilitzant les seqüències ITS de tots els *P. mediterraneus* mitjançant el programa TCS v.1.21 (Clement *et al.* 2000), per tal d'examinar les relacions entre les seqüències.

L'Anàlisi de la Variància Molecular (AMOVA) es va realitzar usant el programari Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.* 2010) agrupant els haplotips per illes.

Anàlisi de restricció.

Una vegada coneguda la seqüència i amb finalitat de poder realitzar el diagnòstic d'una forma més ràpida, la determinació de l'espècie de *Perkinsus* que infecta al mol·lusc es va realitzar mitjançant PCR-RFLP (Abollo *et al.* 2006) (Fig. 11).

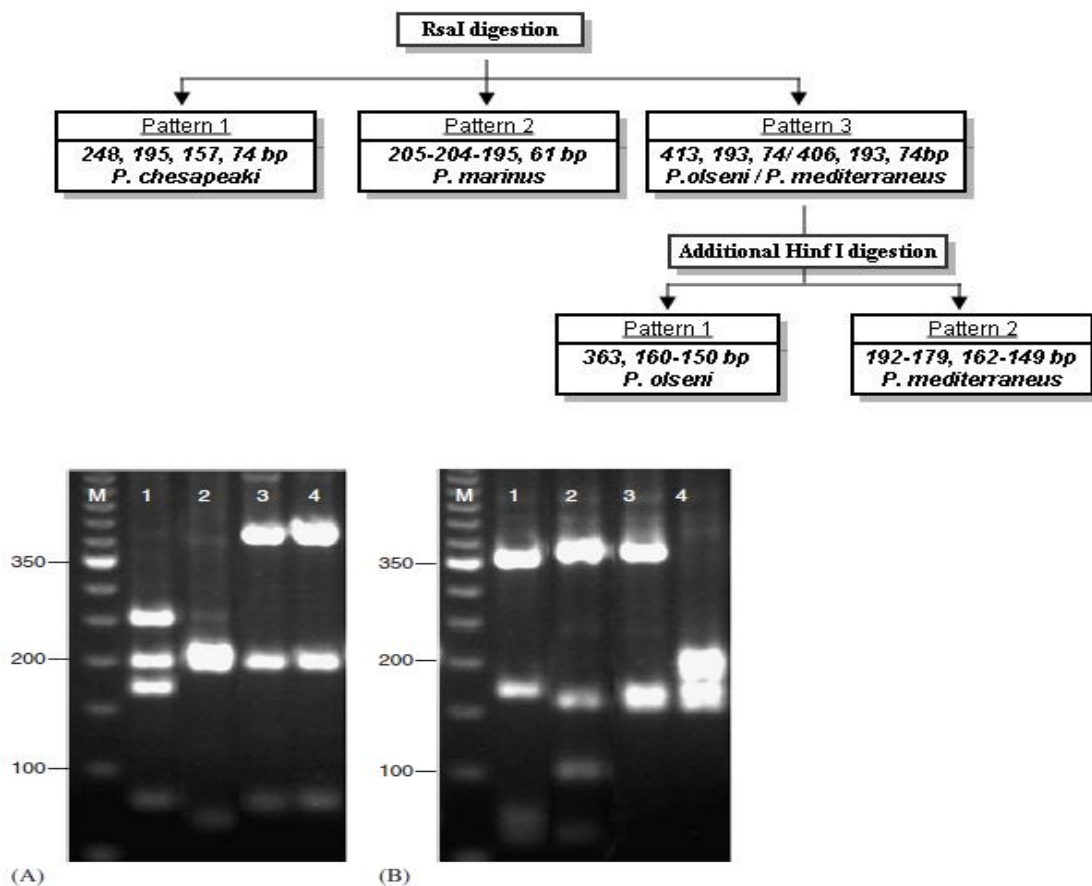


Figura 11. Clau taxonòmica generada mitjançant digestió amb endonucleases de restricció per a la discriminació de les diferents espècies de *Perkinsus*. (A) Patrons de RFLP dels productes de PCR després de la digestió amb *RsaI* (A) i *HinfI* (B) de diferents espècies de *Perkinsus*. Línia 1: *P. chesapeaki*; 2, *P. marinus*; 3, *P. olseni*; 4, *P. mediterraneus*; M, marcador molecular de 50 bp, segons Abollo *et al.* 2006.

L'anàlisi de restricció es va dur a terme en dues passes. La primera, en un volum final de 20 µl que contenia 10 µl del producte de la PCR (ADN obtingut en l'amplificació de l'ITS), 2 µl de tampó d'enzim, 1 µl d'enzim de restricció (*RsaI*, Promega) i 7 µl d'aigua destil·lada esterilitzada. En la segona reacció, es va utilitzar 10 µl de la reacció anterior, 2 µl de tampó d'enzim, 1 µl d'enzim de restricció (*HinfI*, Promega) i 7 µl d'aigua destil·lada esterilitzada. Les reaccions de digestió es van dur a terme durant 2 h a 37°C amb posterior inactivació de l'enzim a 65°C durant 20 minuts.

Per visualitzar els productes de la PCR i els patrons de restricció, alíquotes de 4 µl dels productes de la PCR i 4 µl de les mostres digerides es barregen amb 1 µl de tampó de càrrega i van ser sotmeses a electroforesi en un gel d'agarosa al 2% (agarosa Tipus I PB estàndard) amb *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium) a 100 V durant 25 a 30 minuts. Un marcador de pes molecular (Roche marcador de pes molecular XIII o *Norgen MiniSizer 50 pb ADN Ladder*) es va incloure. Tots els productes de la PCR i restriccions es van visualitzar sota llum UV.

Hibridació in situ per a *Marteilia refringens*.

La sonda per a *M. refringens* es va generar mitjançant els encebadors MT-1B i MT-2B (López-Flores *et al.* 2004), de 358 pb de longitud, que es correspon amb el centre de la regió del fragment amplificat amb els encebadors IGS MT-1 i MT 2. La sonda va ser marcada amb digoxigenina per PCR usant el kit *PCR DIG probe synthesis* (Boehringer Mannheim) d'acord amb les instruccions del fabricant, i utilitzant ADN de *M. refringens* purificat d'*O. edulis* com diana per a la reacció d'amplificació. Els encebadors SS2 i SAS1 foren emprats per a la síntesi de la sonda Smart2, localitzada al gen ribosomal 18S del paràsit, genèric per a les espècies paramixees, com descriu Kleeman *et al.* 2002a. (Veure Taula 1 i Fig. 10 per a la seqüència i localització dels encebadors).

Es varen fer talls en sèrie, de 4 µm de grossor, de les mostres incloses en paraplast i es varen col·locar en portaobjectes recoberts amb aminoalquilsilà (SIGMA) i es varen incubar durant 30 minuts a 65°C. Les seccions es van desparafinar amb *Isoparaffin H* (Panreac), rehidratades en una sèrie d'etanol i, a continuació, es va tractar amb 50 µg/ml de proteïnasa K en tampó PBS a 37°C durant 25 min en una cambra humida. La proteòlisi es va aturar mitjançant la incubació dels portaobjectes en un tampó PBS que contenia 0,2% de glicina (v/v) durant 5 minuts a temperatura ambient. Després es va

equilibrar dues vegades en tampó SSC 2x a temperatura ambient. Posteriorment, cada mostra es va prehibridar en 100 ml de tampó de prehibridació (50% formamida, 4x SSC, 5x solució de Denhardt, 500 µg/ml d'ARNt de llevat, 250 mg/ml d'esperma de salmó) en una cambra humida durant 1 hora a 42°C.

A continuació, el tampó de prehibridació es va substituir per 60 ml de tampó d'hibridació (tampó de prehibridació al qual se l'ha afegit 5 ng/ml de la sonda marcada amb digoxigenina). L'ADN es va desnaturalitzar a 95°C durant 15 minuts i es va refredar a 0°C durant 1 minut abans de la incubació durant tota la nit en una cambra humida a 42°C. Després de la hibridació, les seccions es van rentar dues vegades durant 5 minuts a temperatura ambient amb SSC 2x i SSC 1 x i dues vegades durant 10 minuts a 37°C amb SSC 0,5x. La detecció de la sonda marcada amb digoxigenina va ser duta a terme seguint les instruccions del fabricant per al mètode colorimètric (*NBT/BCIP DIG Detection Kit*, Roche). Així, es van rentar breument les seccions amb tampó de rentat (0,1 M àcid malèic, 0,5 NaCl, 0,3% Tween20, pH 7,5), a continuació es van incubar 30 minuts amb la solució bloquejant i posteriorment es van incubar altres 30 minuts amb la solució anticòs antidigoxigenina-AP (1:5000). Seguidament es van rentar dues vegades en tampó de rentat, es van equilibrar en tampó de detecció (0,1 Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) i finalment es van incubar les seccions en NBT/BCIP durant 1 hora en obscuritat.

La reacció colorimètrica es va aturar amb aigua bidestilada i posteriorment es va procedir al contrast amb Bismarck Brown.

Es van incloure en l'anàlisi, com a "control negatiu", mostres incubades sense la sonda marcada amb digoxigenina en el buffer d'hibridació i com a "control negatiu *in situ*", teixit de glàndula digestiva de *Saccostrea commercialis* infectada amb *Marteilia sydneyi*. Els "controls positius" consistien en teixit de la glàndula digestiva d'*Ostrea edulis* infectat amb *Marteilia refringens* i com a "control positiu *in situ*", teixit de glàndula digestiva de *Saccostrea commercialis* infectada amb *Marteilia sydneyi* incubat amb la sonda Smart2.

Assaigs RFTM per a Perkinsus spp.

L'altra peça de les brànquies o la quarta part de tot el cos de *Chamalea gallina* es van incubar individualment en RFTM (Ray 1966a) suplementat amb cloramfenicol i

nistatina durant una setmana a temperatura ambient en fosc per induir la transformació dels trofozoïts del paràsit en prezooporangis de *Perkinsus*.

A continuació, les brànquies o el cos es van triturar parcialment en un portaobjectes amb un bisturí, es van tenyir amb solució de Lugol i s'observaren al microscopi òptic per estimar la intensitat de la infecció per *Perkinsus* spp., d'acord amb la següent escala (Ray 1954, modificat en Andrews i Hewatt 1957):

- Infecció nul·la (0): no es detecten hipnospores de *Perkinsus* spp. en tot el portaobjectes (40x) .
- Infecció molt lleugera (1): d'una a deu hipnospores de *Perkinsus* spp. observades en tot el portaobjectes (40x).
- Infecció lleugera (2): almenys 1 hipnospora de *Perkinsus* spp. observades en cadascun de 10 camps aleatoris per tota la preparació (40x) .
- Infecció moderada (3): almenys 10 hipnospores de *Perkinsus* spp. observades en cadascun de 10 camps aleatoris (40x), escampats per tota la preparació.
- Infecció intensa (4): almenys 10 hipnospores de *Perkinsus* spp. observades en cadascun de 10 camps aleatoris (100x), repartits per tota la preparació.
- Infecció molt intensa (5): almenys 50 hipnospores de *Perkinsus* spp. observades en cadascun dels 10 camps aleatoris (100x), repartits per tota la preparació .

La prevalença de *Perkinsus* spp. es va calcular com el percentatge d'individus infectats en cada mostra. La intensitat mitjana (grau d'infecció) es va calcular com la intensitat mitjana entre els bivalves infectades de cada mostra (Andrews i Hewatt 1957).

Determinació mortalitat de *Mimachlamys varia*.

Es varen realitzar dues experiències controlades d'engreix en tancs troncocònics de 400 litres. Les condicions comunes foren: renovació aigua de mar estèril, 10 l/h; alimentació amb fitoplancton liofilitzat (0,2 gr/dia d'una mescla de *Nanochloopsis gaditana* i *Tetraselmis chui*, Fitoplancton Marino, S.L., dues vegades al dia); 100 individus per tanc i 40 dies d'engreix (Fig. 12).

Materials i mètodes

La primera prova va consistir en fer un engreix en 5 tancs, la temperatura dels quals s'incrementava 3°C entre tancs (estrès tèrmic), mitjançant resistències d'aquariofilia de 150W i evitant que els individus introduïssin una valva entre les valves d'un altre (interferències). Les interferències es produeixen perquè *M. varia* pot fer moviments natoris obrint i tancant les valves, especialment quan són molestades.

La segona va consistir en una prova d'interferència. Per a la qual cosa, es va retirar la reixeta del fons del tanc, fet que afavoria que les romeres s'agrupassin al conus del tanc i introduïssin la vora d'una valva entre les valves d'altre romera, dins a tres tancs a temperatura ambient.

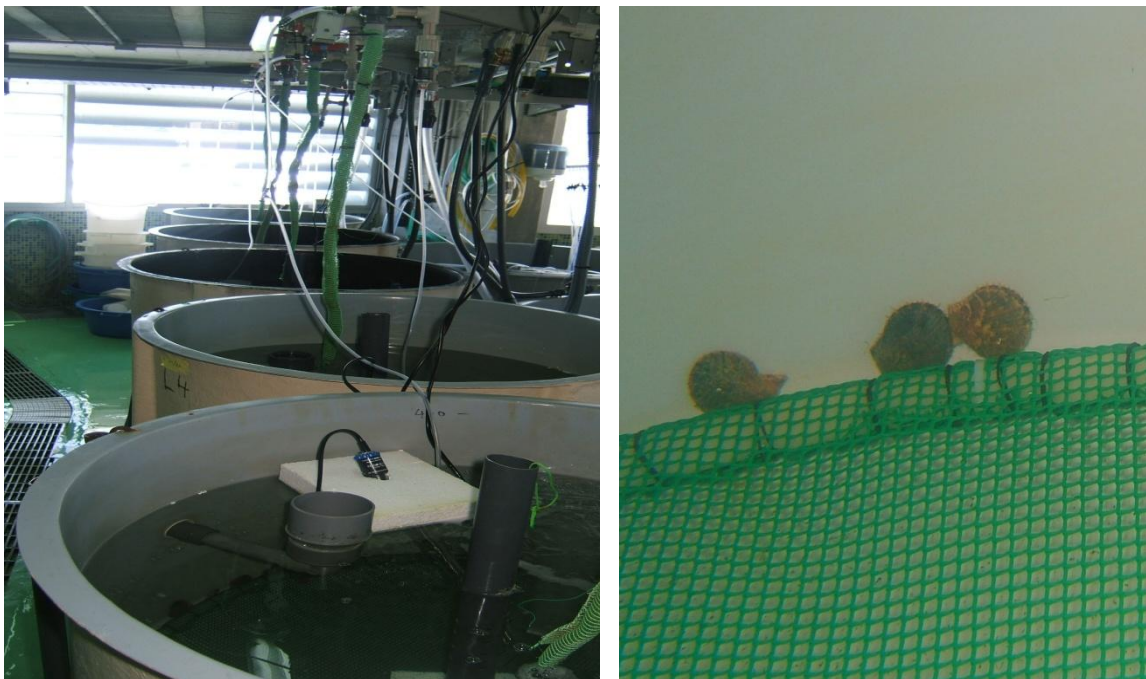


Figura 12. Tancs troncocònics del LIMIA durant les experiències d'engreix de romera i detall de romeres durant la prova de calor.

**CAPÍTOL I: ANTECEDENTS PARASITOLÒGICS A
BIVALVES A LES ILLES BALEARS.**

INTRODUCCIÓ.

L'activitat marisquera a les Illes Balears és molt antiga, i ja els primers pobladors recollien marisc com a complement de la dieta (Ayuso 1996). També hi ha evidències a Pollentia de la pesca d'*Hexaplex trunculus* (una espècie de gasteròpode marí) per la producció de tint púrpura per comerciar amb Roma (Oliver 2015).

La zona més important pel que fa al marisqueig i al cultiu de mol·luscs a les illes Balears és el port de Maó, per les seves especials condicions ecològiques. Al port de Maó, el marisqueig era una activitat professional ben establerta als segles XVIII i XIX (Grau 1989). S'extreien ostres (J. Ramis 1814, citat per Grau 1989), peus de cabrit, corns, diverses escopinyes i pectínids, generalment a peu o en bot amb ostieres. El dàtil de mar (*Lithophaga lithophaga*), espècie molt apreciada, es capturava traient pedres a terra, on es rompien per extreure-los (J. Vargas Ponce 1787, citat per Grau 1989). L'Arxiduc Lluís Salvador de Habsburgo descriu per primera vegada el marisqueig de l'escupinya gravada (*Venus verrucosa*) iniciat per la manca d'ostres, probablement com a conseqüència de la sobrepesca i de malalties desconegudes (Habsburgo 1897).

A finals del segle XIX, devers l'any 1868, es van iniciar els cultius de mol·luscs. Els intents de cultivar ostres van fracasar, tenint èxit el cultiu d'escopinyes gravades (*Venus verrucosa*), l'any 1890. A principi del segle XX (1926), es van iniciar els cultius de musclos i a l'any 1940 ja hi havia 10 muscleres. En aquests anys es van notar els efectes progressius de l'embrutiment de les aigües del port i l'any 1970 es va haver de prohibir la captura de marisc del port de Maó (Grau 1989).

La millora de les condicions higièniques permeteren l'any 1981 reiniciar les pràctiques marisqueres, amb la reintroducció del cultiu d'ostra, el cultiu de la qual va tenir bons resultats durant uns anys, però posteriorment va sofrir un declivi, sent abandonat i substituït pel cultiu d'escupinya gravada. També es va reintroduir el cultiu de musclo en musclera, activitat que és la base de la producció de mol·luscs del port de Maó en l'actualitat.

A dia d'avui, les espècies que es cultiven són el musclo i l'escupinya gravada. El marisqueig es basa en la recollida de llavor d'escupinya gravada per a l'engreix (gravadó), ostra, bogamarí (*Paracentrotus lividus*), ortiga (*Anemonia sulcata*) i cornets (*Hexaplex trunculus* i *Murex brandaris*). Les produccions es mostren a la Taula 4.

Taula 4. Producció de marisqueig i aqüicultura de mol·luscs a les Illes Balears des de 1998 a 2014, en tones.

Any	Marisqueig							Aqüicultura	
	Rossellona	Ostra	Peu de cabrit	Bogamarí	Cornets	Escopinya de gallet	Escopinya llisa	Musclo	Escupinya gravada
1998	40,5	0,02	1,4	0,03				28	1,5
1999	41,8	0,01	2,8	0,09	0,5			26	3
2000	30,4	0,1	2,2	0,2	1,3			30	2,7
2001	23,4	0,5	1,3	0,06	1,5	0,06		43,7	0,8
2002	5,4	0,02	0,5			0,06		46	1
2003		0,01	0,3		1,5		1	49,4	2
2004		0,06	1,2		1,8		1,4	49,8	1,5
2005		0,02	0,03		0,9		0,6	67	1,4
2006		0,02			1,4		0,6	77,8	4,3
2007		0,1			1,8			44,4	0,6
2008		0,05		2,4	1		0,5	78	1,5
2009		0,1		0,1	0,1	6,8	0,3	113	0,7
2010		0,2			2,7	18,1	0,3	149	1
2011								175	1,2
2012		0,06		1,5	0,2			178	0,6
2013		0,2		1,3	0,4		0,03	130	0,8
2014		0,1			2,3		0,02	112	0,5

Pel que fa a la resta de les Balears, no queden mariscadors en actiu. La causa va ser la prohibició de la recol·lecció del dàtil de mar arrel de l'entrada en vigor de la Directiva Hàbitat (Unió Europea 1992), que protegeix estrictament aquesta espècie (annex IV). L'altre activitat marisquera existent va ser la captura de rossellona des d'embarcació, que ha desaparegut per l'exhauriment del banc natural de rossellona a la badia de Palma, que es tracta en el Capítol II.

Durant els anys 80 es va produir una depleció de les poblacions d'ostra plana (*O. edulis*) i d'ostra vermella (*Spondylus gaederopus*), la causa de la qual es creu que va ser la infecció per *Marteilia refringens*. De fet, l'ordre del Conseller d'Agricultura i Pesca de dia 22 de gener de 1987, per la qual es regula la recollida de mariscs en aigües interiors de l'Arxipèlag Balear prohibeix la recollida d'ostra vermella per haver sofert "...una catàstrofe ecològica causada per una epidèmia que n'ha provocat una mortalitat quasi del 100%...".

Per aquest motiu, entre 1992 i 1994 es van realitzar els primers esforços per tenir un coneixement de l'estat epidemiològic dels bivalves a les Illes Balears, amb mol·luscs de la principal zona de producció, el port de Maó. Les espècies investigades van ser

musclos i ostres, obtingudes durant els controls oficials de les zones de producció de mol·luscs bivalves. Aquesta investigació epidemiològica es va basar en tècniques histològiques i va demostrar la presència de *Marteilia refringens* en ostres i musclos. A més, en ostres, es van trobar fases larvàries de tremàtodes, probablement *Bucephalus haimeanus*, protozous ciliats i en un únic tall histològic, *Perkinsus* sp. En musclos, es va trobar *Mytilicola intestinalis* i metacercàries de tremàtodes (Furones *et al.* 1995).

Posteriors investigacions van introduir com a espècie d'interés l'escupinya gravada, a més de les estudiades abans. La troballa més important va ser el descobriment d'una nova espècie de *Perkinsus*, *P. mediterraneus* (Casas *et al.* 2004), afectant a ostres i escopinyes gravades del port de Maó. Els estudis posteriors sobre aquesta espècie se presenten al Capítol III.

RESULTATS.

Els resultats obtinguts durant els anys 1999 i 2000, de l'observació de les preparacions histològiques d'ostres i musclos, així com els resultats dels assaigs RTFM d'ostres, musclos i escupinya gravada del port de Maó es resumeixen en la Taula 5:

Taula 5. Resum de les observacions de preparacions histològiques de musclos i ostres del port de Maó, juntament amb els resultats dels assaigs RTFM en musclo, ostra i escupinya per determinar la presència de *Perkinsus* spp.. **M. r.** *Marteilia refringens*; **P. RTFM** assaigs RTFM per a *Perkinsus*; **P. hist.** *Perkinsus* spp. determinat per histologia; **B. h.** *Bucephalus haimeanus*; **Meta.** Metacercàries de trematodes; **M. i.** *Mytilicola intestinalis*. Els resultats s'expressen en %. – indica que no es va disposar de mostra aquest mes.

	Musclo						Ostra							Escupinya gravada	
	M.r.	P. RTFM	P. hist.	B. h.	Meta.	M.i	M.r.	P. RTFM	P. hist.	B. h.	Meta.	M.i	Ciliats	P. RTFM	Grau infec.
oct-99	-	-	-	-	-	-	0,0	3,3	0,0	16,7	0,0	0,0	0,0	0	0
nov-99	-	-	-	-	-	-	13,3	0,0	0,0	13,3	13,3	13,3	6,7	20,0	0,3
dic-99	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	16,7	0,0	0,0	13,3	13,3	0,0	6,7	6,7	0,06
ene-00	26,7	0,0	0,0	0,0	30,0	6,7	46,7	0,0	0,0	30,0	0,0	3,3	0,0	3,3	0,03
feb-00	6,7	0,0	0,0	0,0	33,3	3,3	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	0,0	6,7	0,13
mar-00	10,0	0,0	0,0	0,0	10,0	26,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	16,7	0,2
abr-00	13,3	0,0	0,0	0,0	26,7	13,3	14,3	3,3	0,0	0,0	16,7	0,0	0,0	13,3	0,2
may-00	20,0	0,0	0,0	0,0	40,0	16,7	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	13,3	0,16
jun-00	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	24,0	70,0	0,0	0,0	0,0	23,3	26,7	0,0	13,3	0,23
jul-00	30,0	0,0	0,0	0,0	20,0	30,0	-	-	-	-	-	-	-	13,3	0,3
ago-00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	13,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3	0,36
sep-00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	0,2
oct-00	-	-	-	-	-	-	0,0	10,0	3,3	13,3	0,0	0,0	0,0	3,3	0,06
nov-00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dic-00	33,3	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7	40,0	0,0	-	13,3	13,3	0,0	3,3	3,3	0,06

Tant les ostres com els musclos estàn infectats per *Marteilia refringens*, practicament durant tot l'any (Fig. 13). En el cas dels musclos no s'ha detectat mortalitat, mentre que els mariscadors ens han comunicat que durant l'estiu troben ostres mortes.

Les ostres i les escupinyes grabades estan infectades amb *Perkinsus* spp (Fig. 13). L'escupinya gravada està infectada tot l'any, presentant la major prevalència i grau d'infecció a finals d'estiu. En el cas de l'ostra, gairebé sols es detecta a principi de tardor. En cap cas s'han detectat mortalitats.

Els esporocists i cercàries de *Bucephalus haimeanus* s'observen exclusivament en ostra plana durant els mesos d'hivern (Fig. 13). També s'han observat ciliats en glàndula digestiva d'ostra durant els mesos d'hivern, sense lesions associades.

En els musclos s'han trobat metacercàries enquistades de tremàtodes al peu durant l'hivern i el copèpod *Mytilicola intestinalis* (Fig. 13) a l'intestí al llarg de tot l'any, sense signes aparents de malaltia. També s'han trobat metacercàries de tremàtodes i *Mytilicola intestinalis* amb menor freqüència en ostres.

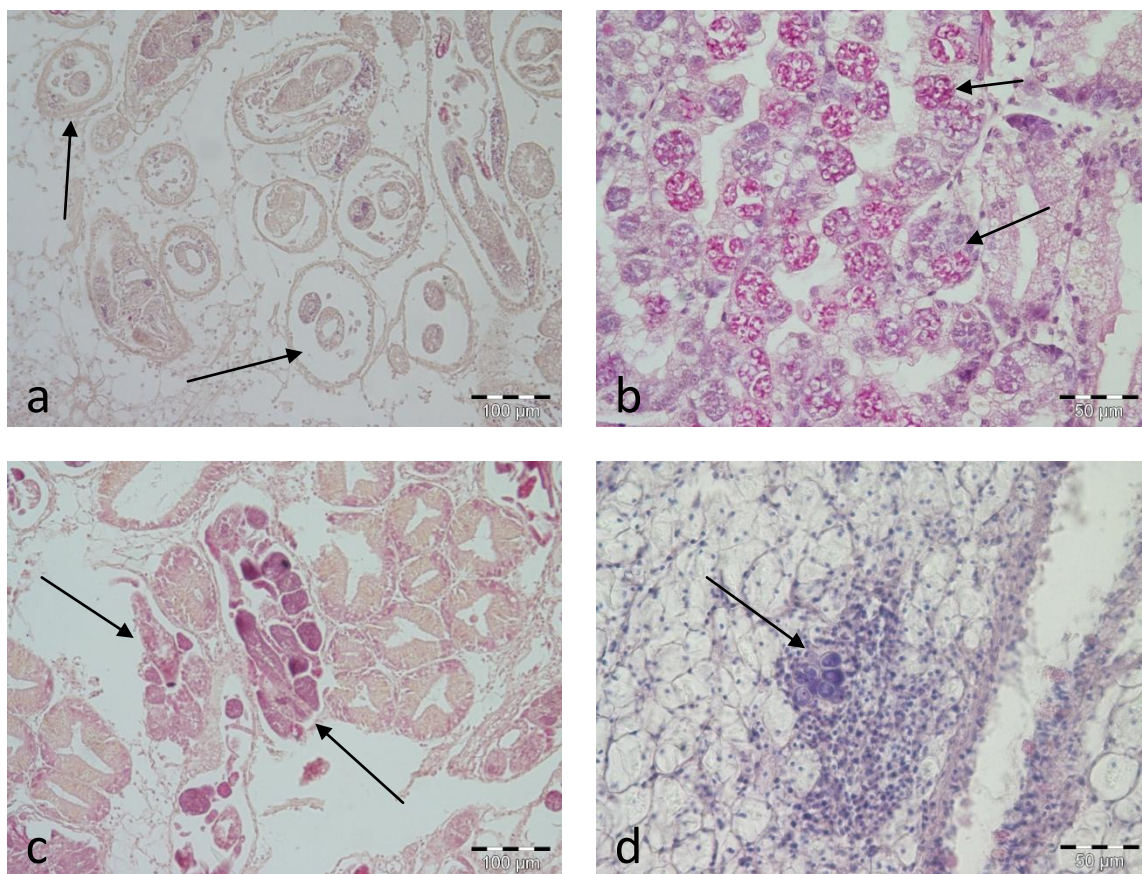


Figura 13. Diferents paràsits de mol·luscs bivalves observats (fletxes). (a) Infecció intensa de *Mytilicola intestinalis* en *Mytilus galloprovincialis*. (b) Infecció intensa de *Marteilia refringens* en *Mytilus galloprovincialis*. (c) *Bucephalus haimeanus* en *Ostrea edulis* i (d) *Perkinsus* sp. a *Ostrea edulis*.

DISCUSSIÓ.

El cicle vital del *Bucephalus haimeanus* (Trematoda, Bucephalidae), passa per diferents hostes. Els seus esporocists i cercàries són específiques de bivalves, tenint en compte que els trematodes digenètics tenen especificitat d'hoste, l'espècie que afecta a les ostres es pot classificar com *B. haimeanus* (Lacaze-Duthiers 1854).

La infestació dels bivalves amb esporocists i metacercàries de bucephàlids causen castració i debilitat (Lauckner 1983). A les ostres observades, no hem trobat lesions d'importància associades a *B. haimeanus*, per la qual cosa no considerem que siguin un risc, tenint en compte que sols s'han observades durant l'hivern. No hem trobat infecció en els musclos examinats, però els musclos poden ser afectats per altres espècies de Bucephalids, com *Prosorhynchus squamatus* i *Rudophinus crucibulum* (Lauckner 1983). Aquestes espècies s'han trobat al nord-oest d'Europa, Gran Bretanya, Canàdia i Estats Units.

Mytilicola intestinalis (Copepoda, Mytilicolidae) sembla estar confinat a les aigües europees, incloses les zones costaneres del mar Adriàtic, el Mar Mediterrani i el Mar del Nord. La distribució al llarg de la costa oest d'Europa i d'Itàlia és irregular amb una alta prevalença a alguns llocs (fins a 100%) i no detectable a altres (Lauckner 1983, Canestri Trotti *et al.* 1998). Parasita als musclos (*M. edulis* i *M. galloprovincialis*) (Grainger 1951), encara que també pot afectar, entre altres espècies, a l'ostra (Baird 1951), tal i com succeeix al port de Maó.

És un copèpod paràsit que causa canvis metaplàsics a l'epiteli intestinal, que implica la substitució de cèl·lules columnars ciliades normals per altres cúbiques sense cilis. L'acumulació d'hemòcits, que n'és generalment la resposta dels bivalves a la malaltia, no n'és evident (Moore *et al.* 1978, Robledo *et al.* 1994b). Però s'ha assenyalat la infiltració hemocítica limitada en l'epiteli intestinal i en el teixit connectiu que envolta als copèpodes (Figueras *et al.* 1991, Villalba *et al.* 1997). L'examen histoquímic del contingut intestinal de *M. intestinalis* va revelar que la dieta del copèpode és principalment herbívora, pel que presumiblement el copèpode s'alimenta dels continguts intestinals de l'hoste i no dels seus teixits (Moore *et al.* 1978). Per això, no considerem que *M. intestinalis* sigui un risc per als bivalves del Port de Maó.

Els efectes de *M. intestinalis* en l'índex de condició i els constituents bioquímics de musclos semblen caure dins de les variacions estacionals generals en aquests paràmetres (Lauckner 1983, Davey i Gee 1988). Als musclos de Maó no hem trobat cap variació als índex de condició.

Les metacercàries de tremàtodes detectades al peu dels musclos són relativament poc patogèniques. No obstant això, la infecció pot causar compressió dels teixits adjacents que resulten en la pèrdua de l'arquitectura normal dels òrgans, reducció de la producció del bisus i la inducció de la formació de perles que poden afectar la comercialització dels musclos d'algunes zones. A més, l'exposició dels musclos a neurotoxines produïdes pel dinoflagel·lat *Alexandrium fundyense*, varen causar un augment significatiu en l'aparició de metacercàries de la família Gymnophallidae en el teixit de l'hoste. Aquesta major incidència es va considerar oportunista, aprofitant l'estat immunològic debilitat induït per la toxina (Galimany *et al.* 2008). No podem descartar que aquest fenomen pugui afectar als musclos de Maó infectats encara que les floracions de dinoflagel·lats nocius són poc freqüents. En el cas de les ostres, les infeccions per tremàtodes són també relativament poc patogèniques excepte en el cas d'infeccions intenses, les quals redueixen la supervivència de les ostres. Per aquests motius, creiem la presència de metacercàries no és una amenaça per a les ostres a Balears.

Marteilia refringens (acetosporea, Marticolidae) és un protozou paràsit del filum dels Paramixea (Berthe *et al.* 2000), que infecta el sistema digestiu de moltes espècies de bivalves i indueix desordres fisiològics que poden matar l'hoste (Alderman 1979, Grizel *et al.* 1974).

Afecta a qualsevol classe d'edat (Grizel 1985), però la prevalència i la intensitat de la infecció és generalment més elevada en individus de 2 o més anys (Villalba *et al.* 1993a, Audemard *et al.* 2001). La infecció amb *Marteilia refringens* és una malaltia mortal per a les ostres (Grizel *et al.* 1974, Alderman 1979, Audemard *et al.* 2001). La mort es produeix durant el segon any després de la infecció inicial (Alderman 1979, Grizel 1985). La prevalença és variable i pot arribar al 98% de les ostres (Alderman 1979, Berthe *et al.* 2004), mentre que la mortalitat pot ser entre el 50 i el 90% i està associada a l'esperulació del paràsit (Grizel 1985, Berthe *et al.* 2004). El disparador de l'esperulació és la pujada de la temperatura de l'aigua a 17°C en primavera (Grizel 1985, Audemard *et al.* 2001, Berthe *et al.* 2004, Carrasco *et al.* 2007a). Probablement, als anys 80, la desaparició gairebé completa dels bancs ostrícoles i de l'ostra vermella

(*Spondylus gaederopus*) a les Illes Balears es deu a aquesta malaltia (Grau, A., comunicació personal).

Els múscols estan menys afectats per la infecció, encara que s'han descrit mortalitats fins al 40% a llocs afectats (Berthe *et al.* 2004, Villalba *et al.* 1993a) i els múscols que no havien tingut contacte previ amb la infecció varen presentar una mortalitat del 100% després de cultivar-los durant 6 mesos en una àrea infectada (Thébault *et al.* 1999). Durant l'estiu de l'any 2005 es va produir una mortalitat anòmala als múscols del port de Maó, però l'examen histològic tant d'individus moribunds com aparentment sans, va descartar la presència de *M. refringens*. En aquest cas, la mortalitat la varem atribuir a les elevades temperatures i a la sembra de múscols provinent d'aigües més fredes (Galícia). Tenint en compte que no hi ha hagut cap mortalitat de múscols associada a *M. refringens*, consideram que no és una greu amenaça per als múscols, encara que cal continuar amb la vigilància. Així, durant la vigilància d'aquesta malaltia, mostres analitzades l'any 2013 al LNREMB varen trobar la presència de *M. refringens* Tipus M als múscols del port de Maó.

La perkinsosis és una malaltia epidèmica dels mol·luscs marins causada pels protozous paràsits del gènere *Perkinsus* (Perkinsea, Perkinsidae) a la qual se l'han associat mortalitats elevades de mol·luscs d'importància comercial (Andrews i Hewatt 1957, Mackin i Hopkins 1962, Lester i Davis 1981, da Ros i Canonzier 1985, Azevedo 1989, Goggin i Lester 1995, Santmartí *et al.* 1995, Burreson i Ragone Calvo 1996, Ford 1996, Soniat 1996, Choi i Park 1997, Bower *et al.* 1998, Park i Choi 2001).

La transmissió de les diferents espècies de *Perkinsus* es produeix directament entre els mol·luscs bivalves sense la necessitat d'hostes intermedis (Ray 1954, Goggin i Lester 1995, Chu 1996, Blackbourne *et al.* 1998). S'ha demostrat experimentalment que tant els trofozoïts, com les hipnospores i les zoospores cursen infeccions en ostres (Goggin *et al.* 1989, Volety and Chu 1994, Rodríguez *et al.* 1994, Chu 1996, Bushek *et al.* 1997b, Chintala *et al.* 2002, Ford *et al.* 2002, Bushek *et al.* 2002a). No obstant això, es desconeix quina és l'etapa més efectiva per transmetre la malaltia al medi natural (Chu 1996, Bushek *et al.* 2002a, Ragone Calvo 2003b).

Els òrgans diana i els teixits infectats són l'epiteli del tub digestiu, teixit conjuntiu de tots els òrgans i els hemòcits (Mackin 1951).

Les espècies més sensibles a *Perkinsus* spp. solen morir entre 1 i 2 anys després de la infecció, durant o poc després del màxim anual de temperatura del mar (Burreson i Ragone Calvo 1996). En el cas de les ostres i escopinyes gravades del Port de Maó, no s'han detectat mortalitats que puguin ser atribuïdes a *Perkinsus* spp.

CAPÍTOL II: *MARTEILIA* EN ROSSELLONA.

INTRODUCCIÓ.

La rossellona, *Chamelea gallina* L. 1758 (Mollusca, Bivalvia), és una espècie d'interès comercial, que va ser l'únic mol·lusc lamelibranqui en explotació per part de la flota pesquera de les Illes Balears des de 1993 fins l'any 2002.

També anomenada copinya maltesa, es troba a una ampla zona que inclou els mars Mediterrani, Negre, Caspi i l'oceà Atlàntic oriental, des de Noruega al Marroc (Fisher *et al.* 1987). A la nostra Comunitat Autònoma és una espècie comuna, però l'única població econòmicament explotable es trobava a s'Arenal de la badia de Palma (Fig. 6), entre es Carnatge (39° 32,40' N / 02° 42,24' E) i la punta Orenol (39° 29,50' N / 02° 44,25' E), entre les isobates de 2 i 15 m. L'existència d'aquest banc es va descobrir a finals de l'any 1992 i l'explotació comercial del mateix es va iniciar l'any 1993.

La rossellona és una espècie freqüent als mercats els mesos de tardor i hivern, on la producció local presentava uns preus superiors a la procedent d'altres localitats (especialment del mar Adriàtic). Això dugué a la necessitat de caracterització i discriminació biològica de poblacions de les rossellones de la badia de Palma, envers de les altres de la Mediterrània (Palmer *et al.* 2004).



Figura 14. *Chamelea gallina*. Resultat d'una operació de pesca.

Chamelea gallina (Fig. 14), és una espècie bentònica filtradora. Presenta una copinya oval-triangular, sòlida, amb nombroses estries concèntriques, serrades i irregulars. La coloració és blanquinosa a marro o grisa, sovint amb motius variats blancs, rosats, violats de ratlles, ziga-zaga o taques irregulars.

Respecte al creixement, hi ha poques dades, encara que generalment els autors consultats opinen que la talla comercial s'assoleix quan els individus tenen entre 1 i 2 anys (Taula 6). A l'Adriàtic central (Frogliola 1975) i a Trieste (Valli i Zecchini-Pinesich 1982), la rossellona té un creixement lent i necessita al voltant de 2 anys per assolir la talla comercial mínima (25 mm de longitud màxima) i un any per arribar a la talla de primera maduresa. En canvi, al Baix Adriàtic, la talla de primera posta és de 23,5 mm (Marano *et al.* 1982), essent la talla mitjana per als individus de cada classe d'edat la següent (Taula 6):

Taula 6. Relació edat-longitud màxima mitjana de la rossellona.

Edat (anys)	Longitud màxima mitjana (mm)
0+	14.75
1+	23.53
2+	30.79
3+	34.59
4+	38.79
5+	42.35

L'espècie, dioica, es pot reproduir durant el primer any de vida, essent la posta variable segons la zona i l'autor: abril-setembre (Adriàtic meridional) (Marano *et al.* 1980), juny-setembre (Adriàtic meridional) (Marano *et al.* 1982), abril-juliol (Adriàtic nord) (Valli *et al.* 1985) màxim en juny-agost però amb un període més llarg (Adriàtic nord) (Valli *et al.* 1981); doble posta: abril-maig i final d'estiu (Adriàtic central) (Frogliola 1975) i golf de Marsella (Guerin 1973); doble posta: mes de juny amb una de menor importància al mes d'agost (banc de San Ginés, Cartagena) (Vizuete *et al.* 1990). Amb totes aquestes dades es pot concloure que, a les Illes Balears, en cap cas hi ha postes abans d'abril ni després de setembre. Així mateix, qualche autor ha assenyalat que es presenta sincronisme amb l'escopinya (*Venus verrucosa*), fent la posta sempre un mes abans (Marano *et al.* 1980, Marano *et al.* 1982, Valli i Zecchini-Pinesich 1982), cosa que permet estimar que la posta a la nostra zona es produeix entre juliol i setembre.

Existeix una gran variabilitat en les relacions entre les dimensions linears i ponderals tant entre poblacions diferents com dins la mateixa població i que han posat de manifest

nombrosos autors a diferents poblacions: baix Adriàtic (Marano *et al.* 1982) i alt Adriàtic (Valli *et al.* 1981), Canal de la Mancha (Ansell 1961), Mazarrón (Vizuetes *et al.* 1993). La població de la Badia de Palma presenta una relació talla-grosor major que la de les poblacions de l'Adriàtic (dades de la D.G. de Pesca i Medi Marí, inèdites).

La pesca de la rossellona a la badia de Palma es feia amb embarcacions d'arts menors (Fig. 15), amb un màxim de 2 rastrells, les característiques dels quals són al Reglament (CEE) núm. 2108/84 (Unió Europea 1984).



Figura 15. Embarcació dedicant-se a la pesca de la rossellona. Al haver solament una persona, sols pesca amb un rastrell, encara que és permès l'ús de dos en el cas d'haver-hi més d'un tripulant registrat i present.

Per efectuar la feina de recollida de la rossellona, el vaixell es fondejava i s'aturava l'hèlix de propulsió, efectuant totes les arrossegades estirant amb un carretell hidràulic. Posteriorment, es separaven les copinyes de les rossellones vives amb un sedàs o classificador (Fig. 16), que retenia les de més de 25 mm de longitud màxima, que és la talla mínima establerta pel Reglament (CE) núm. 1626/94 (Unió Europea 1994).

Les rossellones inferiors a la talla reglamentaria s'havien de tornar a la mar. Aquestes rossellones, al arribar al fons es tornen colgar, excepte les que s'han romput o han sofert danys. En el cas de la draga hidràulica, els individus que presenten danys a les valves

pot superar el 30%, encara que part d'ells –fins un 8%- pot reparar els danys (Moschino *et al.* 2003).

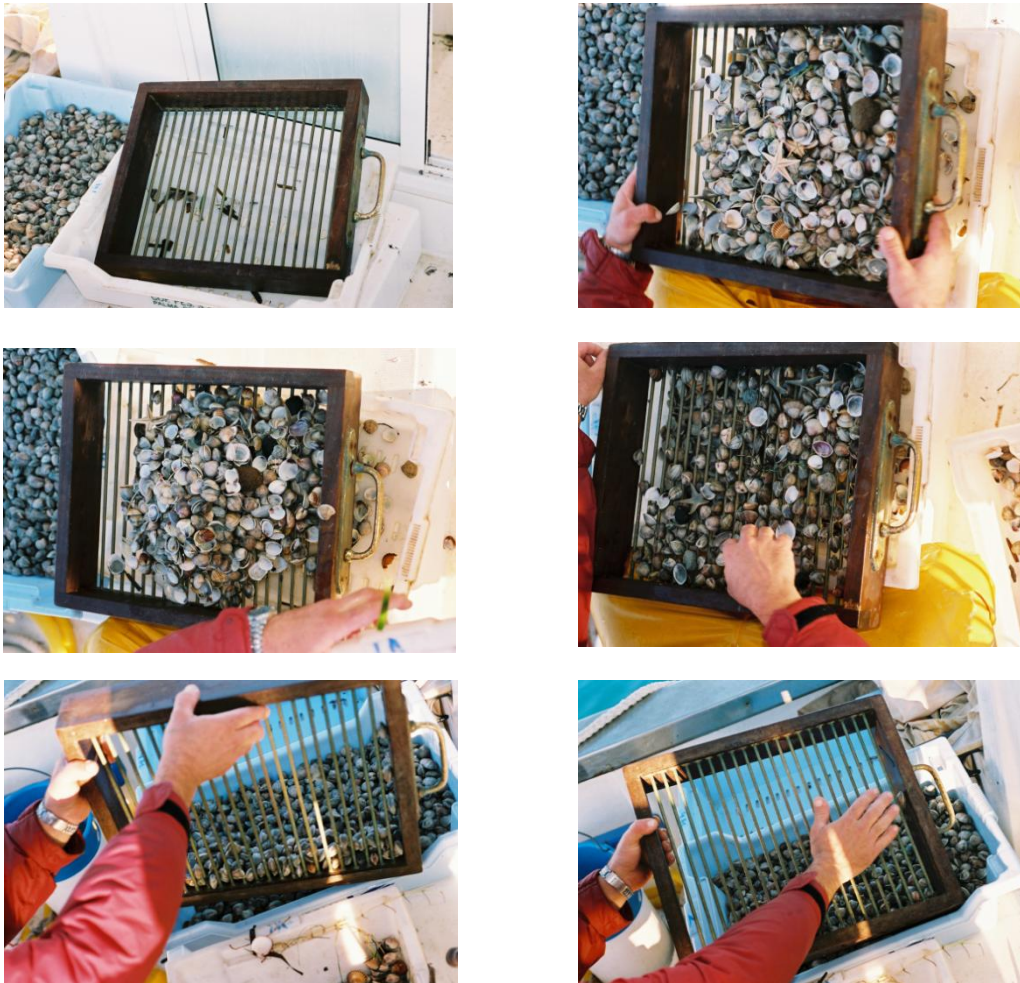


Figura 16. Sedàs emprat per efectuar la classificació i diferents moments del procés de selecció. Per realitzar-la, es posava a dins del sedàs tot el que havia sortit del rastrell (rossellones, copinyes, altres bivalves, etc.) i tot el que passava a través de les vergues, era eliminat i tornat al mar. Del que quedava retingut, es triava el que no era rossellona i també es tornava al mar (o al fons, si era brutícia), i la rossellona se reservava. La separació entre les vergues del sedàs està regulada.

La supervivència dels descartaments de la draga hidràulica és del 95% en sembres realitzades a estancs (Royo 1997). No obstant això, experiments realitzats a aquaris, a temperatures entre 10°C i 20°C demostren que el 50% de les rossellones rebutjades, d'una talla entre 20 i 25 mm, tarden dues hores en tornar-se a colgar dins la sorra. A més, a les quatre hores, resten sense enterrar-se entre el 17 i el 30% dels individus (da Ros *et al.* 2003, Morello *et al.* 2006). A causa de la seva lenta reacció a l'exposició, les rossellones rebutjades poden ser activament depredades. Inspeccions visuals de les rutes

de dragatge revelen que els peixos i invertebrats depredadors inicien l'atac en pocs minuts (Giovanardi *et al.* 1994, Chicharo *et al.* 2002, observacions personals).

Marteilia refringens.

Marteilia refringens és un protozou paràsit que afecta algunes espècies d'invertebrats marins (Taula 7). A Europa, aquest paràsit ha estat responsable de mortalitats d'ostra cultivada (*O. edulis*) (Grizel *et al.* 1974, Villaba *et al.* 1993a, Robledo *et al.* 1994c, Figueras i Montes 1998) i n'és la causa de la malaltia coneguda com la malaltia de la glàndula digestiva o d'Aber (Comps 1970, Grizel *et al.* 1974, Grizel 1979, Comps i Joly 1980, Bougrier *et al.* 1986, Figueras i Montes 1988, Villalba *et al.* 1993b, Robledo *et al.* 1994c).

En el cas dels musclos (*M. edulis* i *M. galloprovincialis*), la malaltia no produeix la mort dels individus, però els causa pèrdua de condició i efectes negatius en la reproducció (Villalba *et al.* 1993b, Camacho *et al.* 1997).

Des dels anys 70, pels efectes perjudicials sobre el cultiu de l'ostra plana europea la infecció per *M. refringens* està inclosa en la llista de malalties notificables de la OIE (Oficina Internacionals d'Epizooties).

Se considerava la presència de dues espècies de *Marteilia* en Europa: *M. refringens* (tipus O), responsable de les infeccions d'ostres i *M. maurini* (tipus M), de les infeccions de musclos (Le Roux *et al.* 2001). Mitjançant estudis mol·leculars s'ha determinat que *M. refringens* i *M. maurini* són conespecífics i es corresponen amb dos tipus (O i M) de la mateixa espècie, *M. refringens*, els quals s'han diferenciat per especiació alogènica (Lopez-Flores *et al.* 2004). Recentment s'ha determinat l'existència d'una nova espècie de *Marteilia* en Europa, *M. cochillia*, que afecta a *Cerastoderma edule* al delta de l'Ebre (Carrasco *et al.* 2013) i a la ria d'Arosa (Villaba *et al.* 2014), causant el col·lapse de les pesqueries de l'escopinya de gallet. Altres autors consideren que es tracta d'un nou tipus de *M. refringens* (tipus C) (Elgharsalli *et al.* 2013, Arzul *et al.* 2014), però les diferències a les fases de desenvolupament (*M. refringens* presenta 8 cèl·lules secundàries i 4 espores, mentre que *M. cochillia* presenta 4 cèl·lules secundàries i 6 espores) i la divergència respecte de les seqüències de l'ITS1 i l'IGS de *M. refringens*, 86% i 83% de similaritat, respectivament, fa pensar que es tracta, més bé d'una espècie relacionada (Carrasco *et al.* 2013, 2015).

Taula 7. Espècies susceptibles a *Marteilia refringens*

Espècies susceptibles	Referència	Classificació
<i>Ostrea edulis</i>	Grizel <i>et al.</i> 1974	Nivell molecular
<i>M. edulis</i>	Le Roux <i>et al.</i> 2001	Nivell molecular
<i>M. galloprovincialis</i>	López-Flores <i>et al.</i> 2004, Novoa <i>et al.</i> 2005, Robledo <i>et al.</i> 1995, Villalba <i>et al.</i> 1993a	Nivell molecular
<i>O. chilensis</i>		
<i>O. puelchana</i>		
<i>O. angasi</i>	Berthe <i>et al.</i> 2004, Martin 1993	Infecció per immersió en àrees infectades.
<i>O. denselamellosa</i>		
<i>Solen marginatus</i>	López-Flores <i>et al.</i> 2008a	Nivel molecular
<i>Chamelea gallina</i>	López-Flores <i>et al.</i> 2008b	Nivel molecular
<i>Xenostrobus securis</i>	Pascual <i>et al.</i> 2010	Nivel molecular
<i>Ostrea stentina</i>	Elgarsalli <i>et al.</i> 2013	Nivel molecular
<i>Cerastoderma edule</i>		
<i>Ruditapes decussatus</i>		
<i>R. philippinarum</i>		
<i>Tapes rhomboides</i>		
<i>T. pullastra</i>	Berthe <i>et al.</i> 2004, López-Flores <i>et al.</i> 2008b	Identificació incerta
<i>Ensis minor</i>		
<i>E. siliqua</i>		
<i>Crassostrea virginica</i>		



Figura 17. Distribució de *Marteilia refringens* a Europa i nord d'Àfrica.

Marteilia refringens s'ha trobat a les costes de l'oceà Atlàntic, des del sud d'Anglaterra (RASVE, WAHID) fins al Marroc (WAHID), incloent Bretanya (França), Galícia i Andalusia (Espanya) i Portugal (Le Roux *et al.* 2001, Lopez-Flores *et al.* 2004, Novoa *et al.* 2005, Lopez-Sanmartin *et al.* 2015). El paràsit s'ha detectat també al Mediterrani: a Catalunya (Novoa *et al.* 2005, Carrasco *et al.* 2007a,b), Illes Balears (Lopez-Flores *et al.* 2008b, RASVE), Tunisia (Elgharsalli *et al.* 2013), Croàcia (Zrncic *et al.* 2001, Le Roux *et al.* 2001), Itàlia (Lopez-Flores *et al.* 2004, Tieri *et al.* 2006, Balseiro *et al.* 2007, Carella *et al.* 2010, Serracca *et al.* 2014), Albània (Pellumb *et al.* 2006), Grècia (Virvilis *et al.* 2003, Balseiro *et al.* 2007, Karagiannis i Angelidis 2007), Turquia (Acarli *et al.* 2010). També s'ha trobat al mar del Nord (Suècia) (RASVE, WAHID) (Fig. 17).

Transmissió i cycle vital.

El cycle vital de *Marteilia refringens* no està totalment descrit. Encara que es varen poder infectar musclos (*M. galloprovincialis*) amb *M. refringens* extrets d'*O. edulis* (Comps i Joly 1980), també és possible la presència d'un hospedador intermediari desconegut (Berthe *et al.* 2004) o l'existència de fases lliures (també desconegudes), que són essencials en el cycle de vida del paràsit. Recerques en llacunes litorals van detectar la presència d'ADN de *M. refringens* en una sèrie d'invertebrats, mitjançant PCR i hibridació *in situ* (Taula 8). Els candidats més prometedors són el copèpod calanoide *Acartia grani* (Audemard *et al.* 2001, 2002) i *Paracartita latisaetosa* (Arzul *et al.* 2014). No obstant això, encara que ha estat possible infectar a *Acartia grani* amb *M. refringens* d'ostres i musclos, no hi ha hagut èxit en la transmissió de *M. refringens* des d'*A. grani* cap a ostres o musclos (Audemard *et al.* 2002, Carrasco *et al.* 2008a). En el medi natural també s'ha comprovat que hi ha transmissió des dels musclos cap al zooplancton, però no a la inversa (Arzul *et al.* 2014).

A més, els patrons d'infecció de *M. refringens* en *A. grani* són diferents segons la via d'infecció. En el cas d'*A. grani* infectat via musclos, sols es detectaven etapes infectives inicials de *M. refringens* en el tracte intestinal, mentre que en la infecció via ostres, la intensitat i prevalència de la infecció era molt superior i es detectà *M. refringens* en tracte intestinal i gonades d'*A. grani* (Carrasco *et al.* 2008a).

Taula 8. Possibles vectors de *M. refringens*.

Possibles vectors	Referència	Detecció
<i>Paracartia grani</i>	Audemard <i>et al.</i> 2002, Boyer <i>et al.</i> 2013	PCR
<i>Paracartia latisaetosa</i>	Carrasco <i>et al.</i> 2007a, Arzul <i>et al.</i> 2014	PCR, ISH
<i>Acartia discaudata</i>	Carrasco <i>et al.</i> 2007a	PCR
<i>A. clausi</i>	Carrasco <i>et al.</i> 2007a	PCR
<i>A. italica</i>	Audemard <i>et al.</i> 2002, Carrasco <i>et al.</i> 2007a	PCR
<i>Othoina sp</i>	Audemard <i>et al.</i> 2002, Carrasco <i>et al.</i> 2007a, b	PCR
<i>Zoeas de braquiuros</i>	Carrasco <i>et al.</i> 2007a	PCR
<i>Lineus gisserensis (Nematoda)</i>	Audemard <i>et al.</i> 2002	PCR
<i>Cereus pendunculatus (Cnidaria)</i>	Audemard <i>et al.</i> 2002	PCR
<i>Euterpina acutifrons</i>	Audemard <i>et al.</i> 2002, Carrasco <i>et al.</i> 2007a	PCR
<i>Paracalanus sp.</i>	Carrasco <i>et al.</i> 2007a	PCR
<i>Centropages sp.</i>	Carrasco <i>et al.</i> 2007a	PCR

Les etapes de desenvolupament de *M. refringens* en bivalves varen ser descrites per Grizel *et al.* (1974), Perkins (1976) i Kleeman *et al.* (2002b) i resumida per Bower (2006).

Les infeccions per *M. refringens* s'inicien presumiblement per una cèl·lula primària o plasmodi (5 a 8 µm de diàmetre) en les cèl·lules epitelials de l'intestí o dels palps labials (Fig. 18). No obstant, s'han detectat infeccions inicials en les brànquies i el mantell de *M. galloprovincialis* utilitzant la tècnica d'hibridació *in situ* (Carrasco *et al.* 2008b).

La cèl·lula primària, uninucleada, desenvolupa una cèl·lula secundària uninucleada en un vacúol dins del seu citoplasma. La cèl·lula secundària es divideix per fissió binària, per produir quatre cèl·lules filles dins de la cèl·lula primària ampliada, i posteriorment, cada cèl·lula filla, mitjançant escissió interna, desenvolupa una altra cèl·lula uninucleada. Aquesta cèl·lula primària degenera alliberant les cèl·lules filles, que es converteixen en noves cèl·lules primàries (plasmodis). En l'intestí, el paràsit penetra a la membrana basal dels acinis de les glàndules digestives i s'estableix a la base de les cèl·lules epitelials. Aquestes cèl·lules donen lloc als esporangis. La esporulació es produeix als esporangis a través d'un procés únic de divisions internes. Durant l'esporulació apareixen cossos d'inclusió refràctils en el citoplasma que envolta les espores. El nom específic de *M. refringens* es deriva d'aquests cossos refringents d'inclusió. Les espores madures s'alliberen al lumen del túbul digestiu, cap al medi marí, i els mol·luscs bivalves infectats poden llançar grans quantitats d'espores abans de morir (Fig. 18).

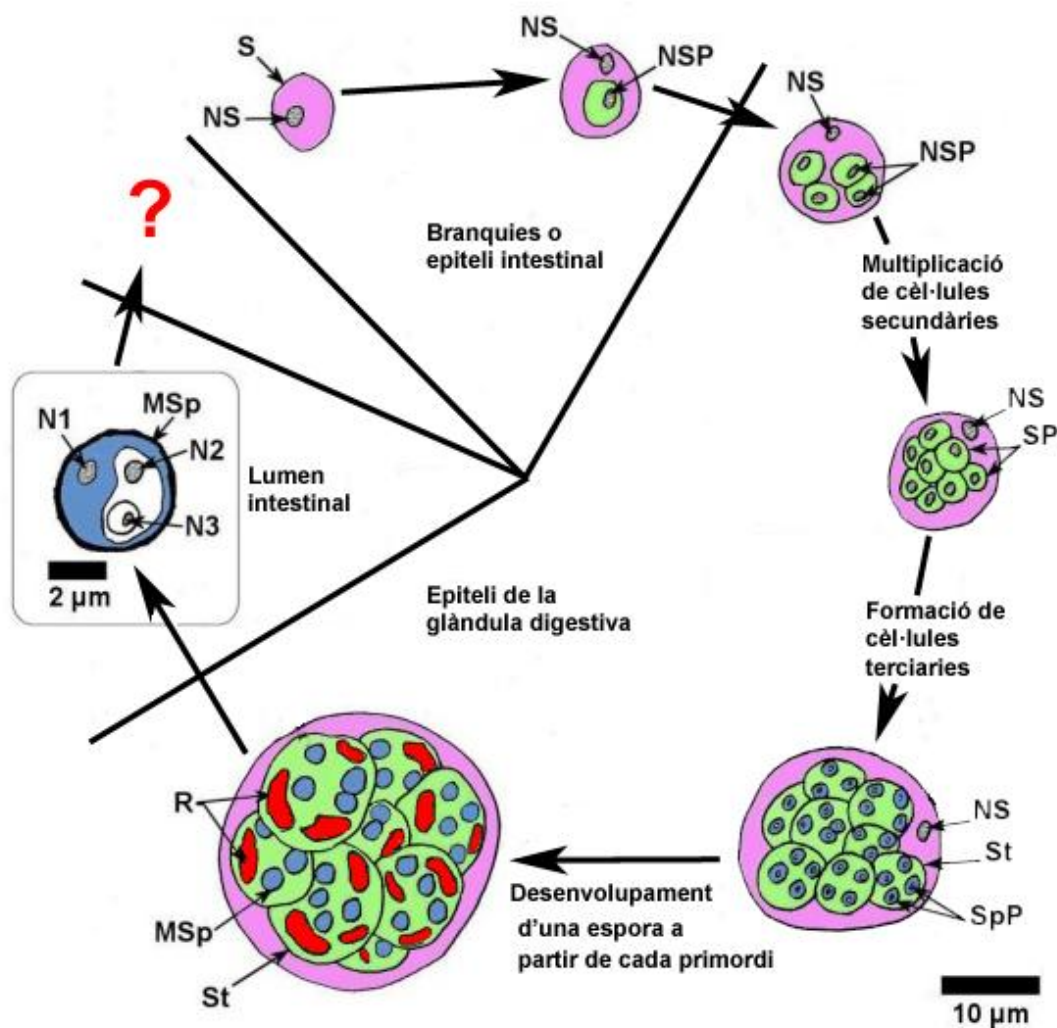


Figura 18. Dibuix esquemàtic a escala del procés d'esperulació de *Marteilia* spp. S = esporangiosorus o cèl·lula primària, citoplasma en rosa, NS = nucli de l'esporangiosorus, SP = primordi esporangial que madurarà a cap a un esporont (cèl·lules secundàries, citoplasma en verd), NSP = nucli del primordi esporangial, St = esporont, SpP = primordi de l'esporel·lació, la qual madurarà en una espora (cèl·lules terciàries, citoplasma en blau), MSp = espora madura, R = cossos refringents, N1 = nuclis de l'esporel·lació més extern, N2 = nuclis de l'esporel·lació intermedi, N3 = nuclis de l'esporel·lació més intern (redibuixat a partir de Bower 2011).

Mètodes de diagnòstic per a *Marteilia refringens*.

Segons el "Manual de Proves de Diagnòstic pels Animals Aquàtics" (OIE 2015) no són recomanables els mètodes de camp (com els signes clínics o alteracions del comportament). Els signes clínics, tal com bivalves morts o moribunds no són específics de la infecció per *M. refringens*. Es pot considerar com un signe clínic la incapacitat per tancar les ostres les seves valves quan s'extreuen de l'aigua. Els signes macroscòpics, com teixit aquós i prim, glàndula digestiva pàl·lida i retracció del mantell també són inespecífics.

Els mètodes directes de detecció poden ser microscòpics, com preparacions humides i improntes de teixit, ambdues emprades amb individus amb infeccions elevades. Aquests mètodes tenen una especificitat i sensibilitat probablement baixa.

Les tècniques histològiques empren talls de teixit fixat incloent brànquies, glàndula digestiva, mantell i gònades. L'especificitat i sensibilitat estimats per a la histologia està entre el 99% i el 70% respectivament i es tracta d'un dels mètodes de referència (Thébault *et al.* 2005). La tècnica histològica, permet a més, diferenciar entre *M. refringens* i *M. sydneyi*.

La microscòpia electrònica de transmissió, com ho és la histologia clàssica, diferencia *Marteilia refringens* de *M. sydneyi*.

No s'han desenvolupat mitjans de cultiu per *Marteilia*. Per una altra part, s'han aconseguit anticossos monoclonals (Berthe *et al.* 2004), però no s'empen amb finalitat de diagnòstic.

Un dels mètodes confirmatius és la PCR, per a la qual es recomana l'ús d'encebadors dirigits a la regió de l'espaiador transcrit intern (ITS) (Le Roux *et al.* 2001), que amplifiquen exclusivament *M. refringens*. També es disposen d'encebadors dirigits a la subunitat petita (SSU) de l'ARNr del complex gènic d'ARNr, que és específic a nivell de gènere (Le Roux *et al.* 1999, Kleeman *et al.* 2002a). També s'ha desenvolupat una PCR niada amb encebadors dirigits a l'espaiador intergènic de l'ADNr (López-Flores *et al.* 2004). L'especificitat i la sensibilitat de les PCR es consideren altes (Kleeman *et al.* 2002a, Le Roux *et al.* 1999).

S'han establert protocols d'ISH (Berthe *et al.* 2000, Le Roux *et al.* 1999). Es recomana l'ús de sondes dirigides a la SSU del complex gènic d'ARNr, per estar validada vers les tècniques histològiques (Le Roux *et al.* 1999, Thébault *et al.* 2005), encara que aquesta sonda mostra reaccions entrecruades amb *Marteilia sydneyi* i *Marteilioides chungmuensis* (Kleeman *et al.* 2002a). També s'ha desenvolupat una altra ISH dirigida a l'espaiador intergènic de l'ADNr (López-Flores *et al.* 2008a, 2008b), que és més específica però que encara s'ha de validar. L'especificitat és del 90% i la sensibilitat del 99%.

Per al diagnòstic confirmatiu es recomana la seqüenciació. Les regions dianes són l'ADNr de la SSU, l'ITS1 i l'IGS.

Els mètodes actualment disponibles per a la vigilància dirigida i el diagnòstic de *Marteilia refringens* s'indiquen en la Taula 9 (OIE 2015).

Taula 9. Mètodes per a la vigilància dirigida i el diagnòstic de *Marteilia refringens*. a: el mètode és el recomanat per raó de disponibilitat, utilitat i especificitat i sensibilitat diagnòstica; b: mètode estàndard, amb una bona sensibilitat i especificitat diagnòstica; c: el mètode té aplicació en algunes situacions, però el cost, l'exactitud o altres factors limiten la seva aplicació. d: el mètode no es recomana per aquesta finalitat.

Aquestes designacions són subjectives perquè la idoneïtat implica qüestions de fiabilitat, sensibilitat, especificitat i utilitat. Encara que no totes les proves indicades com de categoria a o b han estat objecte d'una estandardització i validació formals, el seu ús habitual i el fet de haver-se emprat àmpliament sense resultats dubtosos les fan acceptables (OIE 2015).

Mètode	Vigilància dirigida				Diagnòstic provisional	Diagnòstic confirmatiu
	Llavors	Fase post-larvaria	Juvenils	Adults		
<i>Signes macroscòpics</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>d</i>
<i>Preparacions humides</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>d</i>
<i>Improntes</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>c</i>
<i>Histopatologia</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
<i>Sondes ADN (ISH)</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>b</i>
<i>PCR</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
<i>Microscopia electrònica (MET)</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>b</i>
<i>Seqüenciació</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>a</i>

RESULTATS.

Biocenosi i biologia del banc de rossellona.

La rossellona és la espècie dominant, amb 29 individus/m². No obstant això, a la biocenosi hi ha més espècies, entre les quals podem destacar *Rudicardium tuberculatum*, *Sphaeronassa mutabilis*, *Mactra corallina* i *Diogenes pugilator* per la seva abundància relativa. La resta de la composició de la biocenosi es presenta a la Taula 10, la qual s'ha confeccionat amb les dades obtingudes durant tots els mostreigs efectuats per part de bussejadors des de l'any 1993 i els mostreigs efectuats a les embarcacions professionals durant la temporada 2001-2002.

Per determinar la relació entre la longitud màxima i el pes es van mesurar un total de 3.107 individus. La talla màxima va variar entre 1,4 mm i 37,1 mm. La mitjana va ser de 21,97±5,301 mm. El pes va variar entre 0 g (no detectable amb bàscula de 0,01 g de precisió) i 15,84 g, amb una mitjana de 4,72±3,052 g. La relació entre talla i pes es representa a la Fig. 19.

Les relacions longitud màxima-altura (Fig. 19) i longitud màxima-gruixa (Fig. 20) s'han obtingut d'un total de 521 individus. La longitud (talla) màxima ha variat entre 9,3 i 37,1 mm (mitjana 23±6,7320); l'altura entre 8,9 i 32,8 mm (20,73±6,939 mm) i la gruixa, entre 5,2 i 19,2 (13,28±3,979 mm). Aquestes relacions són importants des del punt de vista pesquer, doncs permeten establir les característiques tècniques dels ormeigs per tal d'acomplir amb la normativa de talles.

Taula 10. Llistat d'espècies presents. La taula s'ha confeccionat amb les dades obtingudes durant tots els mostreigs efectuats per part de bussejadors des de l'any 1993. Les dades obtingudes permeten calcular el % de presència a cada quadre de mostreig, així com la densitat de població (indicada en nombre d'individus/m²) excepte pels casos d'espècies que no va ser possible capturar. En aquest cas, s'anotaren a una tableta i sols s'indica la presència.

Dels mostreigs efectuats a les embarcacions professionals durant la temporada 2001-2002 sols es va anotar la presència de les diferents espècies capturades i el pes de rossellona comercial i no comercial. Per això, a la Taula s'expressa el % de presència de cada espècie en les pesques. Algunes espècies no es van poder identificar pel que s'indica el gènere.

	Espècie	% presència en censos (1993-2004) (busseig)	% presència en pesques. Temporada 2001-2002	Individus per m ² (censos).
Sipunculidae				
	<i>Phascolosoma sp</i>	---	---	---
	<i>Sipunculus nudus</i> (Linnaeus, 1767)	---	3%	---
Aschelminata				
Nemertea	<i>Cerebratulus marginatus</i> (Renier, 1804)	---	---	---
Mollusca				
Gastropoda	<i>Sphaeronassa mutabilis</i> (Linnaeus, 1758)	4,24%	6%	0,177
	<i>Hexaplex trunculus</i> (Linnaeus, 1758)	---	5%	---
	<i>Naticarius cruentatum</i> (Gmelin, 1791)	---	8%	---
	<i>Murex brandaris</i> (Linnaeus, 1758)	---	2%	---
	<i>Thais haemastoma</i> (Linnaeus, 1767)	---	---	---
	<i>Hinia incrassata</i> (Strom, 1768)	0,31%	---	0,012
	<i>Buccinulum corneum</i> (Linnaeus, 1758)	---	---	---
	<i>Epitonium clathrus</i> (Linnaeus, 1758)	0,16%	---	0,006
Ophistobranchia	<i>Bursatella leachi</i> (de Blainville, 1817)	---	---	---
Bivalvia	<i>Chamelea gallina</i> (Linnaeus, 1758)	97,41%	100%	29,231
	<i>Rudicardium tuberculatum</i> (Linnaeus, 1758)	23%	98%	0,755
	<i>Macra corallina</i> (Linnaeus, 1758)	4,40%	86%	0,211
	<i>Pectunculus violacescens</i> (Lamarck, 1819)	---	44%	0,101
	<i>Tellina nitida</i> (Poli, 1791)	0,16%	22%	0,006
	<i>Ensis minor</i> (Chenu, 1843)	---	19%	---
	<i>Pandora inaequalis</i> (Linnaeus, 1758)	1,10%	13%	0,058
	<i>Tellina incarnata</i> (Linnaeus, 1758)	---	11%	---
	<i>Dosinia lupinus</i> (Linnaeus, 1758)	2,90%	9%	0,104
	<i>Venerupis sp</i>	0,08%	3%	0,003
	<i>Tellina planata</i> (Linnaeus, 1758)	---	2%	---
	<i>Venus verrucosa</i> (Linnaeus, 1758)	---	---	---
	<i>Callista chione</i> (Linnaeus, 1758)	0,39%	---	0,012
	<i>Donax trunculus</i> (Linnaeus, 1758)	1,88%	---	0,076
	<i>Spisula subtruncata</i> (da Costa, 1778)	3,14%	---	0,092
	<i>Laeicardium crassum</i> (Gmelin, 1791)	0,08%	---	0,003
Cephalopoda	<i>Octopus vulgaris</i> (Cuvier, 1797)	---	---	---
	<i>Sepia officinalis</i> (Linnaeus, 1758)	---	---	---
Anellida				
Polychaeta	<i>Halla parthenopeia</i> (Delle Chiaje, 1828)	---	13%	---
	<i>Glycera tridactyla</i> (Schmarda, 1861)	---	---	---
	<i>Sabella pavonina</i> (Savigny, 1820)	---	---	---
Crustacea				
Decapoda	<i>Diogenes pugilator</i> (Roux, 1828)	9,50%	6%	0,556
	<i>Albunea carabus</i> (Linnaeus, 1758)	---	2%	---
	<i>Liocarcinus depurator</i> (Linnaeus, 1758)	---	---	---
	<i>Penaeus kerathurus</i> (Forskål, 1775)	---	---	---
	<i>Portumnus hastatus</i> (Linnaeus, 1767)	---	---	---
Stomatopoda	<i>Squilla mantis</i> (Linnaeus, 1758)	---	---	---
Echinodermata				
Asteroidea	<i>Astropecten johnstoni</i> (Delle Chiaje, 1827)	3,45%	97%	0,15
	<i>Astropecten spinulosus</i> (Philippi, 1837)	0,08%	11%	0,003
	<i>Astropecten bispinosus</i> (Otto, 1823)	---	---	---
Ophiuroidea	<i>Ophiura ophiura</i> (Lamarck, 1816)	---	8%	---
Echinoidea	<i>Echinocardium mediterraneum</i> (Forbes, 1844)	---	---	---
Holothuroidea	<i>Holothuria sp.</i>	---	---	---
	<i>Leptosynastra inhaerens</i> (Muller, 1776)	---	---	---
Osteichthia				
	<i>Ariosoma balearicum</i> (Delaroche, 1809)	---	11%	---
	<i>Lythognathus mormyrus</i> (Linnaeus, 1758)	---	11%	---
	<i>Solea sp</i>	---	3%	---
	<i>Trachinus draco</i> (Linnaeus, 1758)	---	2%	---
	<i>Ophidion sp</i>	---	---	---
	<i>Bothus podas</i> (Delaroche, 1809)	---	---	---
	<i>Dasyatis sp</i>	---	---	---
	<i>Mullus surmuletus</i> (Linnaeus, 1758)	---	---	---

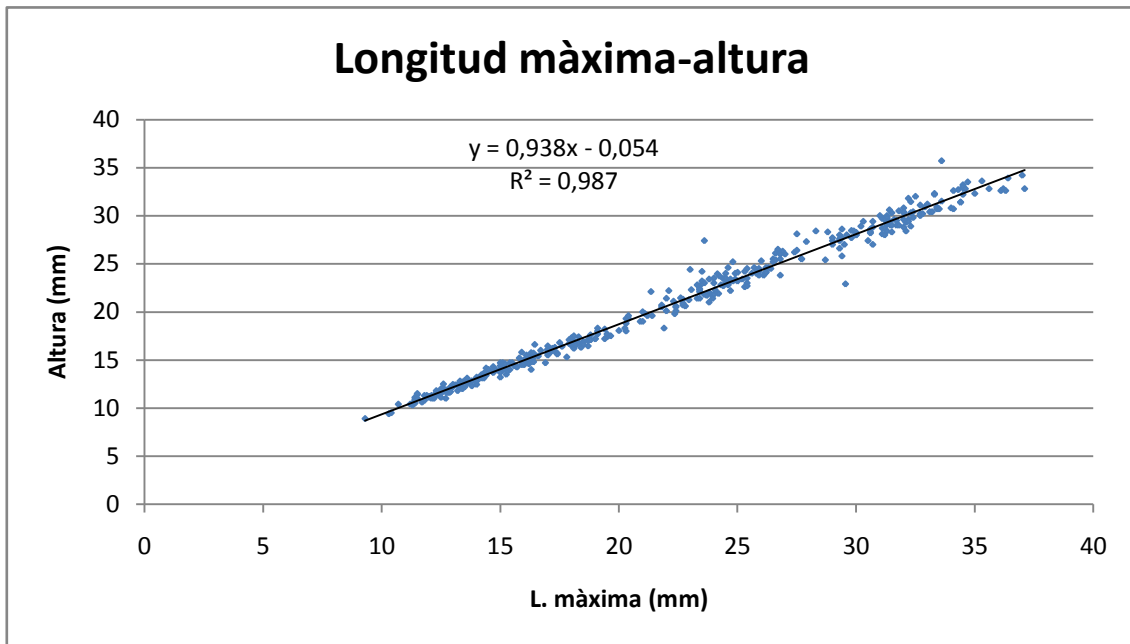


Figura 19. De la relació entre longitud màxima i altura podem determinar que la xarxa de 35 mm de diagonal i les reixetes de ferro de 18x24 mm són les més adequades per a la captura de la rossellona.

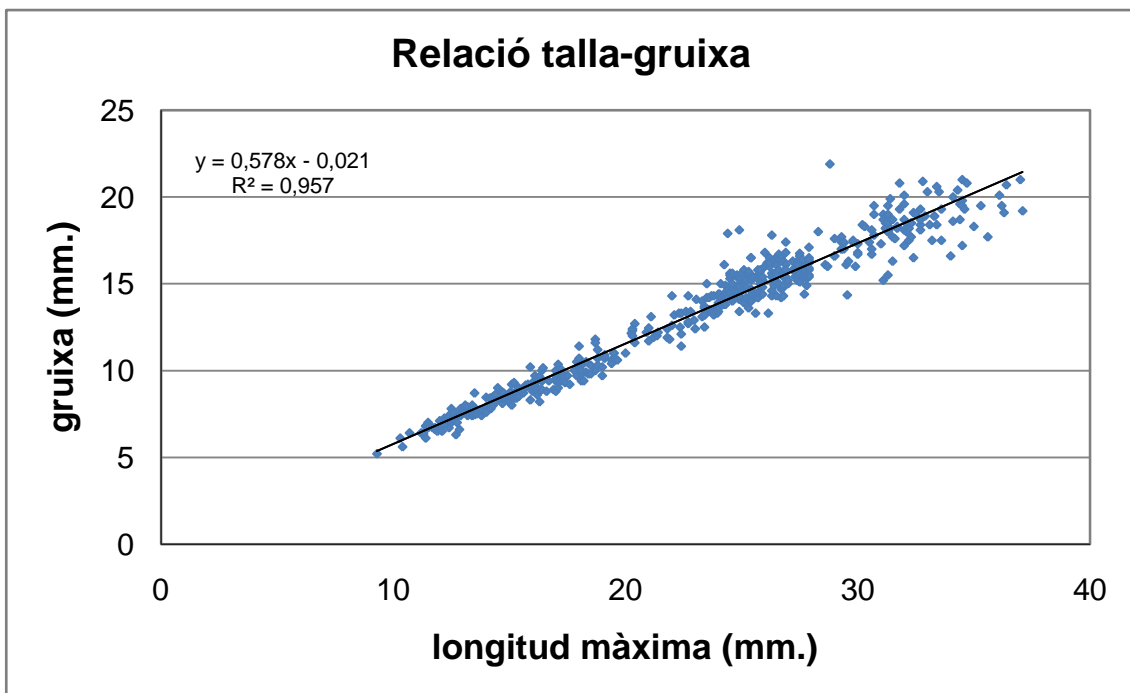


Figura 20. La relació longitud màxima-gruixa és important per poder determinar la separació de les vergues del sedàs. Així, una separació de les vergues de 15 mm pot retenir individus de més de 25 mm de longitud màxima, que són els de talla comercial.

Estructura de la població.

Amb la distribució de les freqüències de talla obtinguda als diferents mostreigs es pot visualitzar l'estructura de la població al llarg del temps.

A la figura 21 es pot comprovar, al mostratge realitzat al mes d'octubre (inici de la temporada de pesca), que la població presenta una distribució bimodal. El primer grup, amb una freqüència màxima entre 9 i 11 mm, es correspon amb la recluta de l'any (R99), i un segon grup amb màxims entre 21 i 25 mm que es correspon amb individus nascuts a anys anteriors (R98+).

Al mes de maig, els individus del grup R98+ han disminuït la seva freqüència per l'explotació a la que s'ha sotmès el banc, del qual s'han extret un gran nombre d'individus de talla comercial (superior a 25 mm de longitud màxima). Al mateix temps, els individus del grup R99 han incrementat la seva talla i se comencen a detectar individus d'una nova recluta (R00).

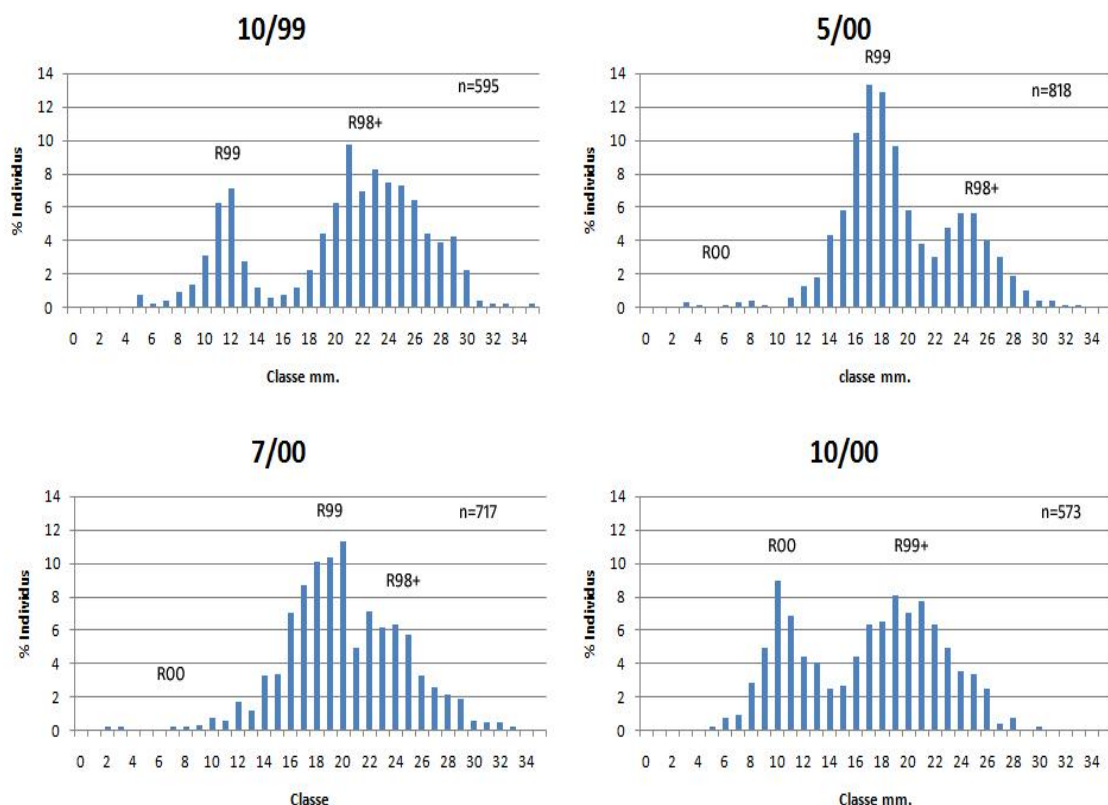


Figura 21. Estructura de la població durant un cicle anual. A les ordenades, es representen les classes de talla (mm) i a les abscises, el tant per cent d'individus de cada classe. A cada gràfica s'indica el nombre d'individus a cada mostratge. R00 es correspon amb la recluta de l'any 2000, R99 amb la de l'any 1999, R98+ és la de l'any 98 i supervivents d'anys anteriors, de la mateixa manera que R99+ és la de l'any 1999 i supervivents d'anys anteriors.

Al juliol, els individus de la classe R99 han incrementat la seva talla, de la mateixa manera que els de la recluta de l'any (R00).

A l'octubre, la distribució torna a ser clarament bimodal, amb un grup de menor talla, amb una freqüència màxima de 10 mm, que es correspon amb la recluta de l'any (R00) i un altre, amb màxims entre 19 i 21mm, que es corresponen amb els individus de la recluta dels anys anteriors (R99+).

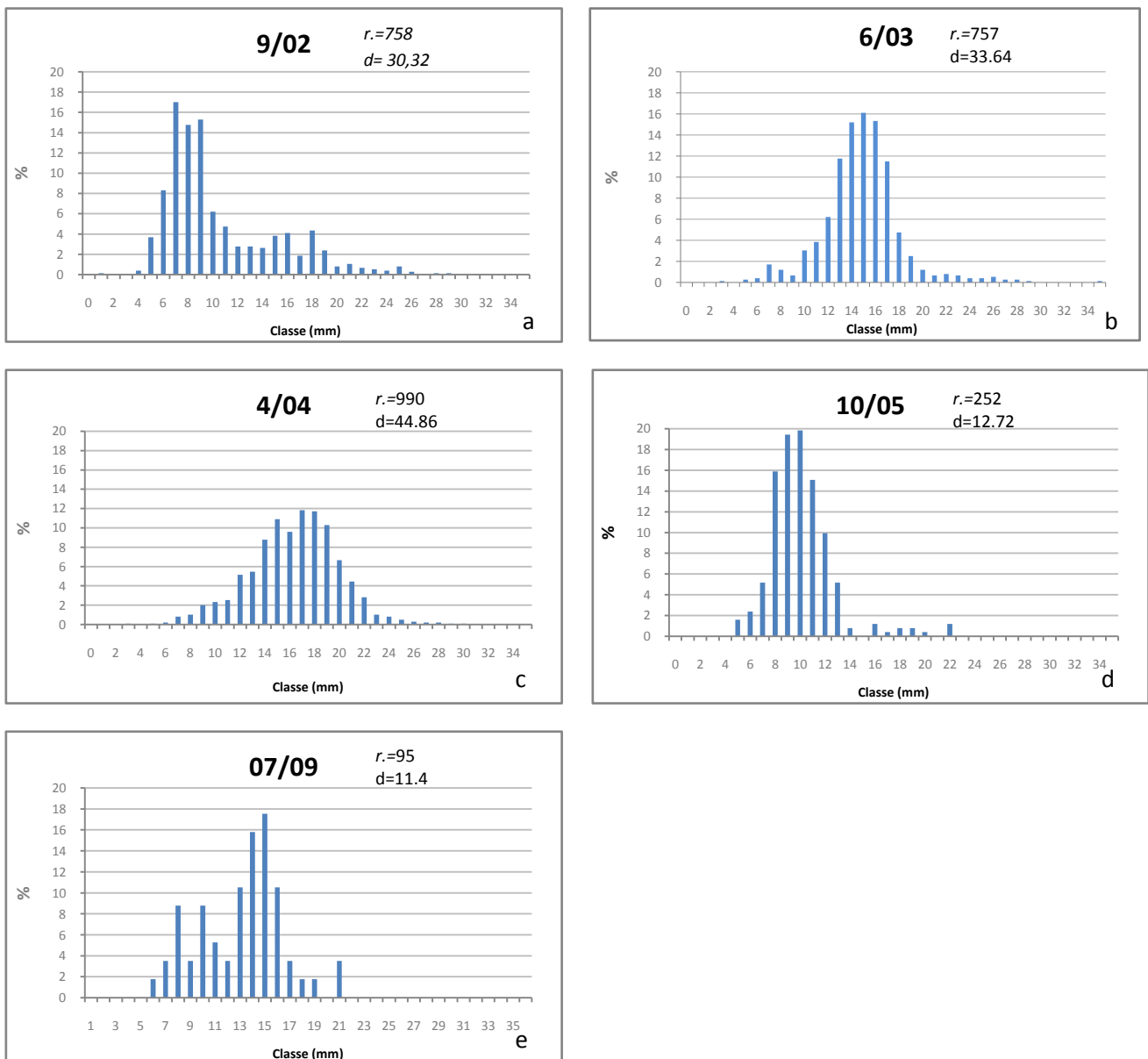


Figura 22. Evolució de l'estructura de la població des de setembre de 2002 a juliol de 2009. A cada gràfic s'indica el nombre de rossellones mostrejades (r.) i el nombre de rossellones per metre quadrat (d).

A partir d'octubre de 2001, l'estructura bimodal se manté, però disminueix el nombre d'individus de talla superior a 20 mm de longitud màxima. El mostratge de setembre de 2002 (Fig. 22a), després del segon episodi de pluges, mostra una elevada reducció dels individus corresponents a la recluta corresponent a l'any 2001, especialment dels individus més grans, que seria la fracció explotable del banc durant la temporada 2002-2003.

L'any 2003 s'aprecia una recuperació del banc, que es reflexa en el creixement dels individus de la recluta de l'any 2002 (Fig. 22b). L'abril de 2004 aquest creixement continua (Fig. 22c) i el nombre de rossellones per metre quadrat torna als valors del mostratge anterior al primer episodi de pluges excepcionals (juliol 2001, 43 rossellones/m²).

Als mostreigs posteriors a abril de 2004 torna a haver una disminució del nombre de rossellones (Fig. 22d i Fig. 22e). A més, hi havia un nombre elevat d'individus morts, enterrats a l'arena, disposats en la mateixa posició que quan estan vius. En concret, el mostratge d'octubre de 2005 indica que el nombre de rossellones és de 12,7/m² i la fracció comercial és de 0/m² i el de juliol de 2009, de 11,4/m² i de 0/m².

Evolució de la població.

A l'inici de l'explotació (anys 93-94) la biomassa era molt elevada, tal com correspon a una situació de no explotació, amb individus de gran talla. Els encebadors mostreigs al banc donaren com a resultat que un 64,71% dels individus eren de talla comercial (> 25 mm de longitud màxima) i representaven un 83,71% de la biomassa. Els individus de més de 30 mm representaven el 24,83% del nombre de rossellones (Fig. 23 i 24).

Posteriorment, des del any 1995 al 2000 es produeixen grans fluctuacions atribuïbles a les diferències entre mortalitat per pesca (minves) i reclutament (recuperacions). Durant la temporada de recollida (tardor i hivern) es produeix una retirada d'efectius (mortalitat per pesca) del banc que es reflecteix en valls a les gràfiques de biomassa, densitat de població i mida màxima mitjana, mentre que a la primavera es produeix un increment dels efectius (reclutament) i un increment de talla que es perllonga fins a final d'estiu i que a les gràfiques esmentades es reflecteix en els pics. (Fig. 23 i 24).

L'any 2000, al mostreig del mateix mes (abril-maig), el percentatge d'individus de talla comercial era del 11,26% i es corresponien al 27,08% de la biomassa (Fig. 23, 24 i 25).

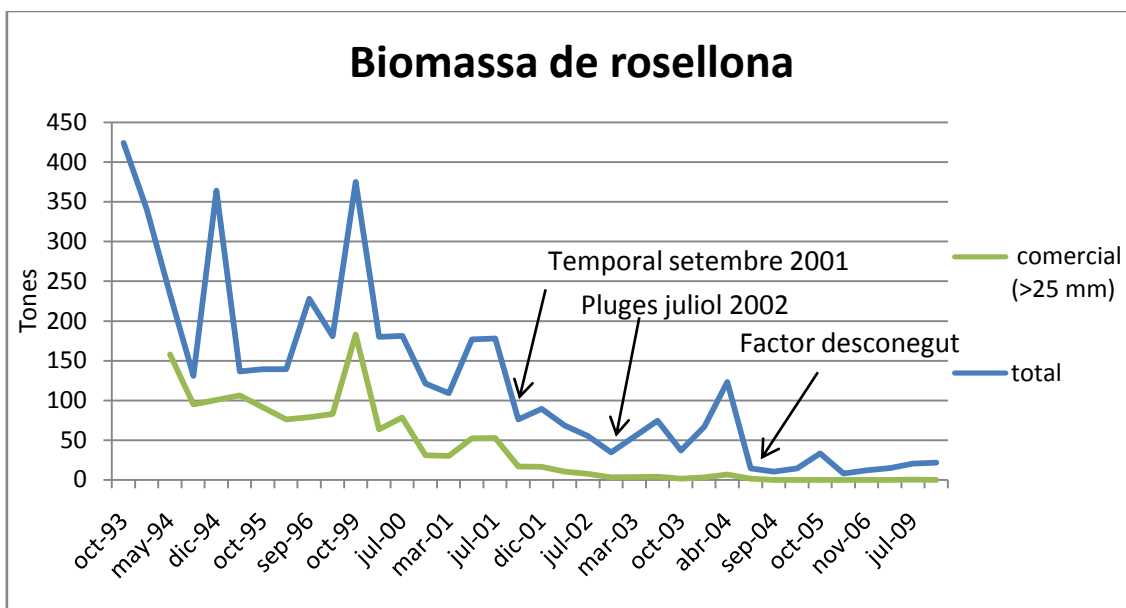


Figura 23. Al gràfic es representa l'evolució de la biomassa de rossellones al banc. S'ha de tenir en compte que des de juny de l'any 1995 al setembre de 1999 els controls de l'estat del banc es realitzaven bàsicament mitjançant pesques amb rastrell. Per aquets motiu, hi ha poques dades durant aquest període. S'han senyalat tres moments on es van produir disminucions anormals de la biomassa. El primer es correspon amb un temporal de pluges intenses durant el setembre de 2001. Uns dies després del temporal es va realitzar un mostratge amb bussejadors del banc i es va comprovar la presència d'una capa mucilaginoso sobre el fons d'uns 5 cm de gruixa, que va afectar les rossellones. Posteriorment, al juliol de 2002 es va repetir aquest fet, i es va detectar una nova disminució de la biomassa. Finalment, des de juny de 2004 un altre factor, aquest desconegut, ha fet que pràcticament hagi desaparegut la fracció comercial del banc.

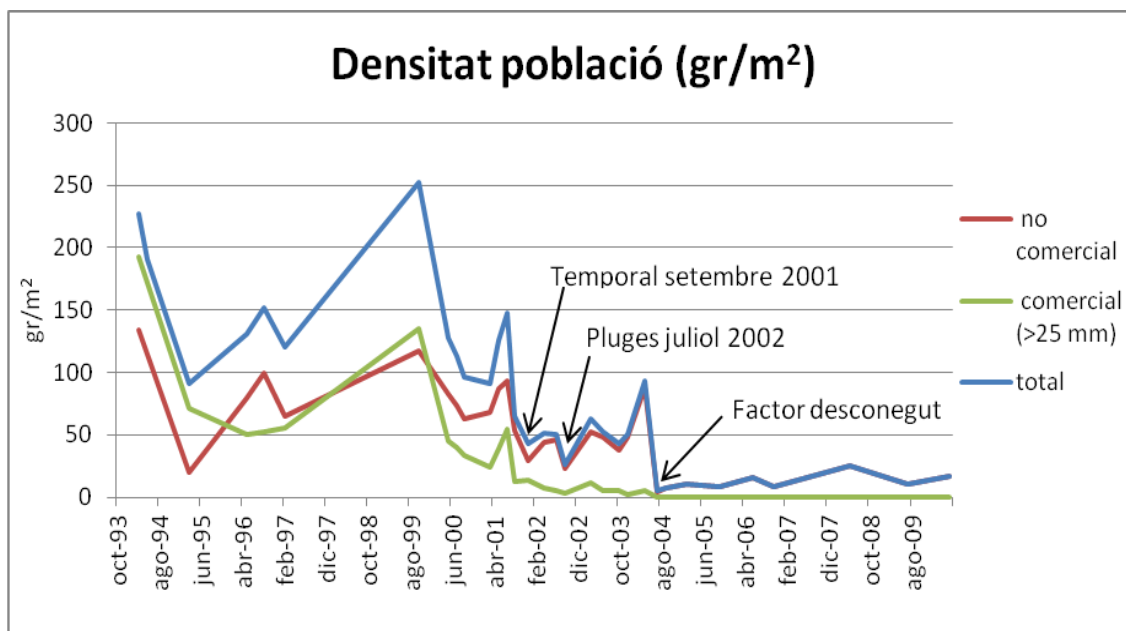


Figura 24 Al gràfic es representa l'evolució de la densitat de població expressada en gr/m². S'ha de tenir en compte que des de juny de l'any 1995 al setembre de 1999 els controls del estat del banc es realitzaven preferentment mitjançant pesques amb rastrell. Per aquets motiu, hi ha poques dades durant aquest període. A partir de setembre de 2001, han afectat negativament al banc tres fenòmens. Dos de pluges intenses, amb disminucions de la densitat

de la població en uns moments en que el normal és un increment de la mateixa, i un darrer, desconegut, que ha provocat una disminució generalitzada de la densitat de població, especialment dels individus de major talla.

A partir de l'any 2001, s'observa una gran mortalitat. Durant el mes de setembre de 2001 un temporal de pluges va afectar negativament el banc, produint-se una descàrrega de sediments des dels torrents, que a la mar, van crear una capa mucilaginosa sobre el fons que va romandre durant setmanes. El mostratge realitzat indicà que el percentatge d'individus de talla comercial va reduir-se fins al 4,78% (15,02% de la biomassa total del banc) (Fig. 23 i 24).

La repetició de pluges intenses a l'estiu de 2002 varen reproduir el mateix fenòmen i la biomassa i el nombre d'individus va reduir-se dramàticament, en especial, afectà als de talla major, que disminuïren la proporció, 11,91% en biomassa i 1,32% en nombre. Aquest mostreig va demostrar la presència d'una gran quantitat de valves buides i un nombre d'individus comercial molt reduït, entre 30,8% i 16,5% de la captura i un pes mitjà per operació de pesca de 209,6 g d'individus de talla comercial. En pesques de l'any 2000, s'obtenia un rendiment entre el 56,9% i el 82,8% en individus de talla comercial, amb un pes mitjà per operació de 1.170,4 g d'individus de talla superior als 25 mm de longitud màxima. Per aquest motiu es va decidir prohibir la pesca.

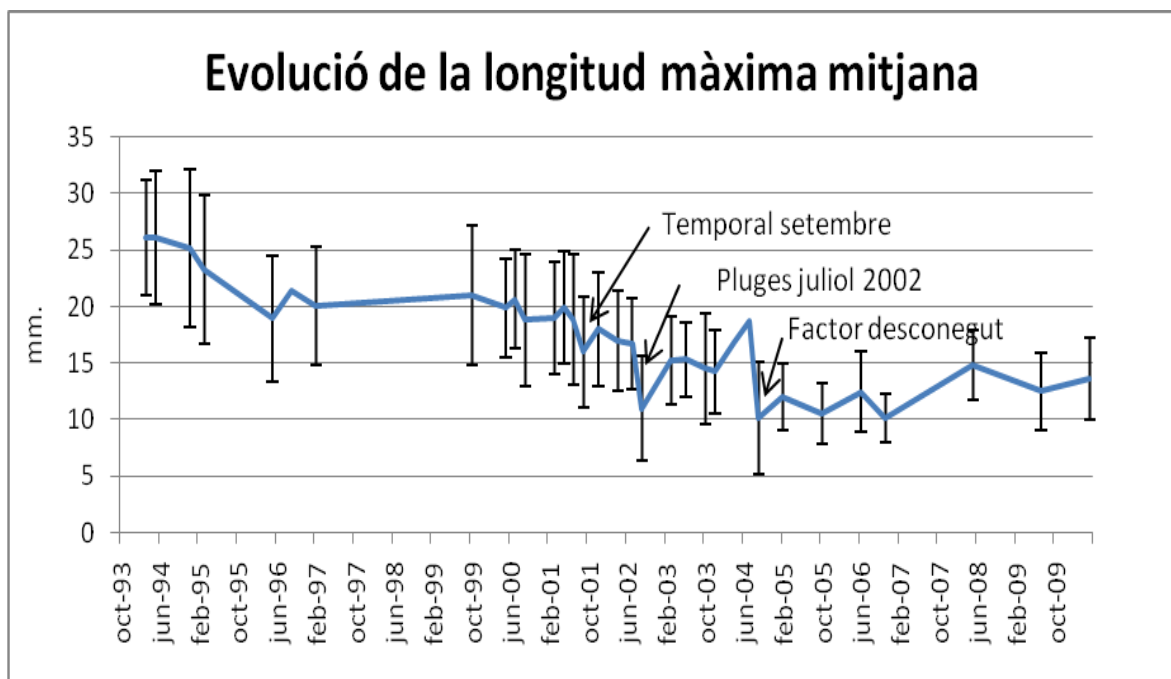


Figura 25. Evolució de la longitud (talla) màxima mitjana. S'ha de tenir en compte que des del juny de l'any 1995 al setembre de 1999 els controls del estat del banc es realitzaven preferentment mitjançant pesques amb rastrell. Per aquets motiu, hi ha poques dades durant aquest període. Des de que es va iniciar l'explotació del banc s'ha produït un descens en la talla màxima, amb oscil·lacions que reflectien les temporades de veda i pesca. A causa dels temporals de setembre de 2001, les pluges intenses de juliol de 2002 i finalment, del factor desconegut de juny de 2004, es va produir un descens brusc i inesperat de la talla mitjana. Les barres indiquen la desviació estàndard.

L'abril de 2004 semblava que la recuperació del banc era satisfactòria, perquè va augmentar el nombre total d'efectius i la biomassa, encara que la població de talla major (comercial) es mantenia als nivells de després de l'estiu de 2002. Els mostreigs posteriors demostraren l'existència d'un factor desconegut que afectà negativament el banc, que feia disminuir els efectius i en especial, els de major talla. (Fig 24 i 25).

L'any 1993, quan es va iniciar l'explotació i el control del banc, la talla mitjana de la població era elevada. Segons s'explota el banc, la talla màxima mitjana disminueix, amb petites oscil·lacions entre les èpoques de veda i pesca. Després del setembre de 2001 es va produir una disminució sobtada, que es va repetir després del juliol de 2002. Després d'ambdós, es va observar una recuperació de la talla màxima mitjana, la tendència dels quals es va estroncar a partir del juny de 2004 (Fig. 25).

La resta de les espècies acompanyants de la rossellona també s'ha vist afectada, però de maneres diferents. En algunes de les espècies que apareixen en major proporció, s'ha produït també una minva de la longitud màxima mitjana. No obstant això, en moltes de les espècies, sembla que hi ha un increment de les poblacions, encara que els individus que componen aquestes poblacions són més petits.

Detecció de l'agent patològic.

Anàlisi histopatològic.

Les rossellones procedents dels mostreigs de juliol i agost de 2004, mostren una longitud màxima mitjana inferior a la comercial. El rang de mesures és de 29,6-17,7 mm, amb un valor promig de $22,44 \pm 3,699$ mm. Es van descartar els individus obtinguts de mesures inferiors per la dificultat de processat histològic.

Els exemplars supervivents eren individus joves, de petit tamany, magres i amb el mant translúcid. Presentaven la coloració de la glàndula digestiva de tonalitat grisàcia o verdosa. No s'observaren malformacions en les valves. Macroscòpicament no s'observaren signes apreciables a les brànquies o ctenidis.

Les rossellones analitzades mostraren la glàndula digestiva, en general, buida, i cèl·lules vesiculars del mantell amb poques reserves. Els exemplars analitzats presentaren les gònades al final de la posta o a l'inici de la postposta. L'única lesió característica que es

repetia en pràcticament totes les mostres observades és la presència d'erosió branquial i la destrucció generalitzada dels hemòcits. Aquests hemòcits es caracteritzaven per presentar lisi citoplàsmica, cariòlisi i cariòrrexis i, en ocasions, nuclis bilobulars. En alguns d'ells era possible observar la presència d'inclusions intracitoplàsmiques similars als acetosporidis del gènere *Bonamia*. També, en ocasions, es detecta la presència en brànquies de quistes de clamidies/*Rickettsies*, sense importància patològica, ja que els quistes són formes benignes no causants d'alteracions. Només en una única mostra es va observar la presència, en glàndula digestiva, d'un paràsit haplosporidi (Fig. 26).

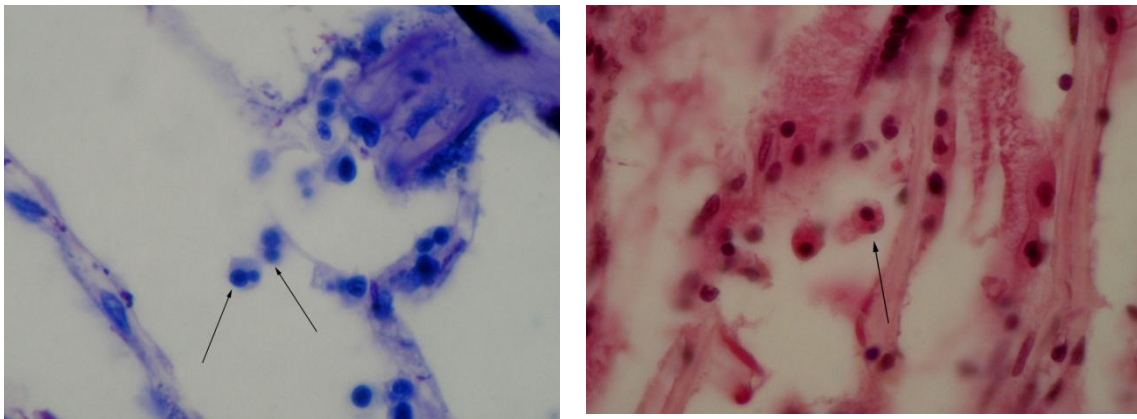


Figura 26. Inclusió intracitoplàsmica als hemòcits presents a les brànquies de rossellones afectades (fletxes).

Detecció molecular de *Marteilia refringens*.

PCR.

Per comprovar la prevalència de la infecció per *M. refringens* en rossellona, es varen utilitzar 49 individus obtinguts a un mostreig el mes de juliol de 2009, conservades congelades. La mida mitjana va ser $10,77 \pm 2,48$ mm, amb una mida màxima de 16,85 mm i mínima de 7,5.

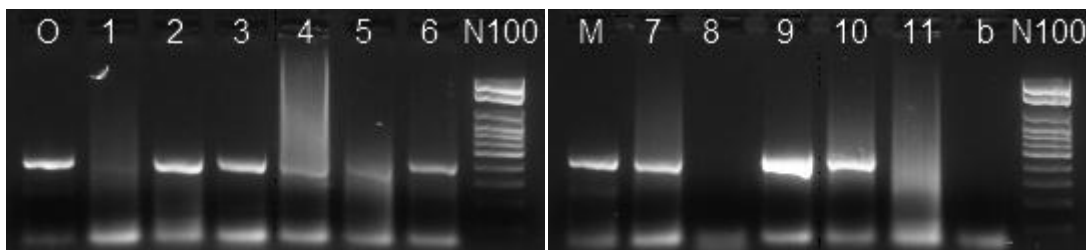


Figura 27. Visualització dels productes de PCR obtinguts de rossellones amb els encebadors específics de l'ITS de *M. refringens*. Productes de PCR: O, Positiu de *M. refringens* tipus O; M, Positiu tipus M; 1-11, extraccions de rossellona. b, control negatiu (aigua destil·lada); N100, marcador de pes molecular de 100 pb (Norgen MiniSizer 100 pb ADN Ladder).

La PCR va proporcionar el producte d'amplificació esperat, d'uns 412 pb, en 27 de les mostres i en els controls positius (controls de *M. refringens* tipus O i M, proporcionats pel Laboratori Nacional de Referència de Malalties dels Mol·luscs Bivalves, LNREMB, de Vigo), mentre que no es va observar cap amplificació als controls negatius (aigua destil·lada o ADN genòmic de *Chamelea gallina* no infectada (Fig. 27).

Part de les anàlisis per a la detecció molecular mitjançant PCR niada i hibridització *in situ* es varen realitzar en el departament de Genètica de la Universidad de Granada i varen esser finançades per el Plan Andaluz de Investigación (Group No. CVI0200), Project No. C03-082 from the IFAPA, Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía i amb una postdoctoral fellowship (IFAPA, Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía) to I.L.F., tal com queda reflectit a la publicació derivada d'aquestes López-Flores *et al.*(2008).

PCR niada.

Els productes amplificats per la primera PCR no es detecten al gel d'agarosa tenyit amb qualsevol de les quantitats d'ADN emprades. No obstant això, la PCR niada va proporcionar el producte d'amplificació esperat (de 358 pb de longitud) a partir de la mostra de *Chamelea gallina*, mentre que no es va observar cap amplificació als controls negatius. La seqüència obtinguda del fragment amplificat va ser comparada amb aquelles incloses en les bases de dades públiques d'infeccions per *Marteilia refringens* sobre els hostes *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis* i *Solen marginatus*.

Taula 11. Divergència (percentatge) entre fragments MT-1B/MT-2B d'infeccions de *Marteilia refringens* en *Ostrea edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Solen marginatus* i *Chamelea gallina*.

	<i>O. edulis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>S. marginatus</i>
<i>O. edulis</i>	1,4		
<i>M. galloprovincialis</i>	2,0	1,0	
<i>S. marginatus</i>	1,8	0,7	0,4
<i>C. gallina</i>	0,9	2,6	2,6

La seqüència de nucleòtids del paràsit obtinguda a partir de *C. gallina* mostraren la màxima semblança amb les seqüències de *Marteilia refringens* aïllades d'*Ostrea edulis* (99,1% d'identitat vs. el 97,4% d'identitat amb seqüències aïllades de *Mytilus galloprovincialis* o de *Solen marginatus*, Taula 11).

La seqüència parcial del IGS de *M. refringens* trobada a *C. gallina* es va introduir a la base de dades de l'EMBL amb el número d'accés AM292652.

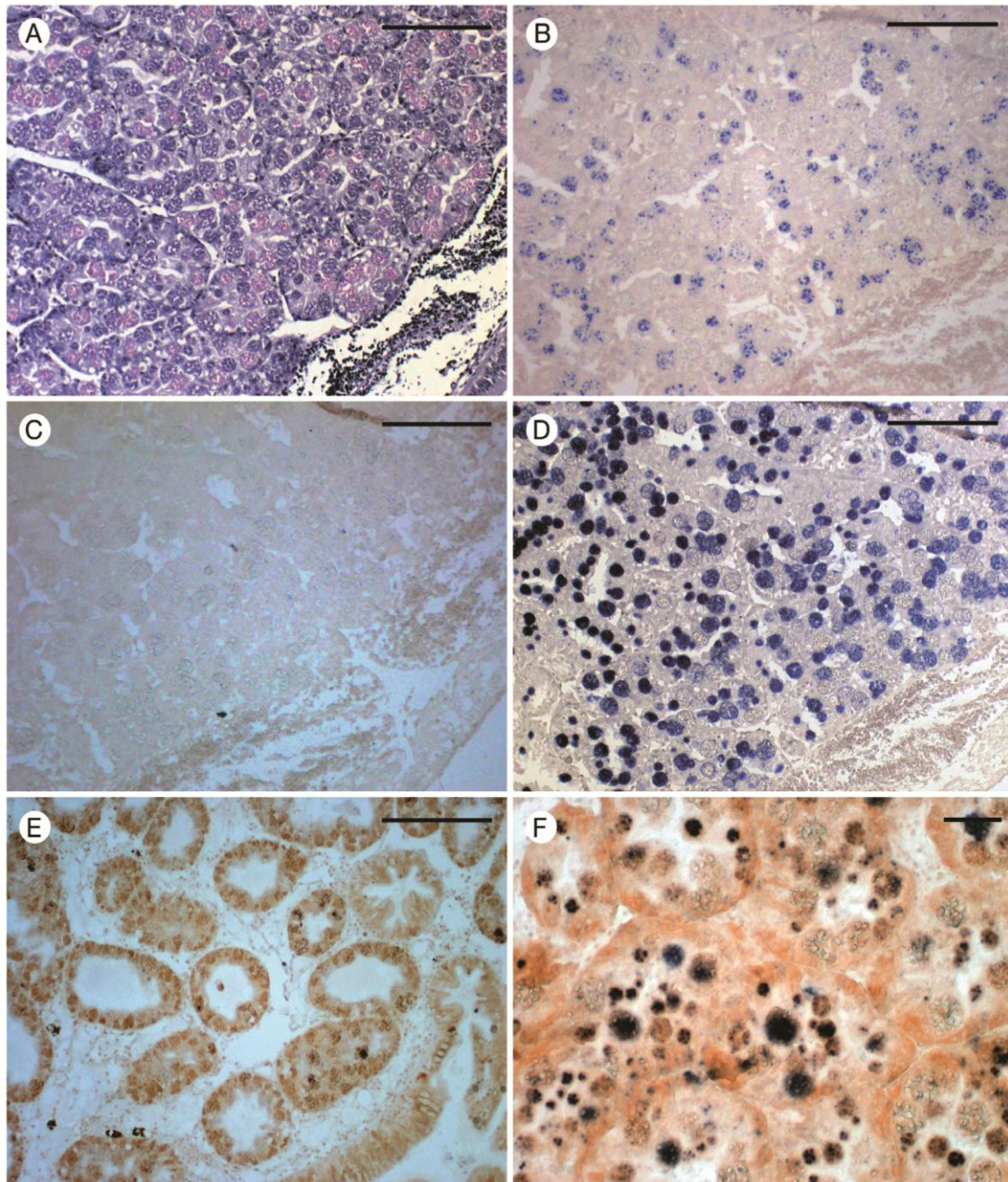
Hibridació in situ.

Figura 28. Talls de la glàndula digestiva de *Chamelea gallina* amb cèl·lules de *Marteilia refringens*. (A) Histologia clàssica amb tinció d'hematoxilina-eosina. (B) Senyal positiu d'hibridació amb la sonda MT-1B/MT-2B marcada amb digoxigenina (Sonda *Marteilia*-IGS). (C) Control negatiu (Falta de sonda marcada amb digoxigenina en el buffer d'hibridació). (D) Control *in situ* amb la sonda marcada amb digoxigenina Smart2 (Sonda genèrica pel gen de la subunitat 18S ribosomal, Kleeman *et al.* 2002b). (E) Teixit de la glàndula digestiva de *Saccostrea commercialis* infectat amb *Marteilia sydneyi* (control negatiu *in situ*). (F) Glàndula digestiva d'*Ostrea edulis* infectada amb *Marteilia refringens* (control positiu *in situ*). Barra d'escala = 200 µm.

Les cèl·lules multinucleades del paràsit foren observades mitjançant tècniques histològiques, emprant talls tenyits amb hematoxilina-eosina de les rossellones. En alguns talls es va observar l'estructura característica de *Marteilia* sp, amb una cèl·lula

dins una altra. Es van trobar diferents fases del cicle vital en l'epiteli dels diverticles digestius: cèl·lules primàries (cèl·lules mare joves) les quals contenen un únic nucli, etapes que contenen una o més cèl·lules secundàries i etapes més avançades que contenen fins a vuit esporonts (cèl·lules secundàries), dins les quals també eren visibles fins a 4 espores (cèl·lules terciàries). A etapes més avançades, els esporonts contenen cossos refringents al citoplasma (Fig. 28a). El paràsit no es va detectar a altres òrgans mitjançant tècniques histològiques (brànquies, mant, gònades o peu).

L'anàlisi *in situ* realitzat amb la sonda per a l'IGS de *Marteilia refringens* va donar senyal d'hibridació amb diferents etapes del paràsit (Fig. 28b). Algunes de les cèl·lules madures del paràsit no mostren senyal d'hibridació o mostren un senyal dèbil.

Un senyal més fort es va obtenir amb la sonda pel gen 18S ribosomal, emprat com a control. Igualment, algunes cèl·lules no van mostrar hibridació (Fig. 28d). El teixit d'*Ostrea edulis* infectat va proporcionar un control positiu per la detecció de *Marteilia refringens in situ* (Fig. 28f). No es va produir hibridació creuada amb el nucli de les cèl·lules hostes. Els controls negatius es varen emprar per assegurar especificitat i no es va detectar senyal ni en els talls que portaven *Marteilia sydneyi* (Fig. 28e) ni en els tall de teixit on no es va afegir sonda (Fig. 28c).

DISCUSSIÓ.

Biocenosi i biologia del banc de rossellona.

La biocenosi dels fons arenosos litorals de la platja de Palma es correspon amb l'esperada basada en la bibliografia sobre bionomia bentònica i n'és la pròpia de fons d'arenes fines, amb predominància de l'espècie *Chamelea gallina* (Vizuetet *et al.* 1990, Calvin 1995)

Les espècies acompanyants més freqüents són: *Rudicardium tuberculatum*, amb una freqüència d'aparició en les pesques del 98%, *Astropecten jonhstoni* (97%), *Maetra corallina* (86%), *Pectunculus violacescens* (44%). *Diogenes pugilator* és l'espècie que apareix més freqüentment a les mostres recollides als censos.

Taula 12. Nombre d'espècies a cada zona. Les zones amb major diversitat es corresponen amb els extrems del banc: la sud-oriental, zones 4 i 5, properes a la Reserva de s'Arenal- Cap Regana, i la zona noroccidental (Carnatge). Això es deu a la proximitat d'aquestes zones a altres comunitats, com praderies de posidònia i d'algues fotòfiles infralitorals. A les zones 4 i 5 és també possible la intervenció de l'efecte reserva.

Zona	nombre d'espècies
1	36
2	31
3	29
4	38
5	45

Les zones amb major diversitat es corresponen amb els extrems del banc: la sud-oriental, zones 4 i 5, properes a la Reserva de s'Arenal- Cap Regana, amb 38 i 45 espècies diferents trobades i la zona noroccidental (Carnatge) amb 36. Això es deu a la proximitat d'aquestes zones a altres comunitats, com praderies de posidònia i d'algues fotòfiles infralitorals. A les zones 4 i 5 és també possible la intervenció de l'efecte reserva (Taula 12).

S'ha apreciat als darrers censos per part de bussejadors a les zones 4 i 5 un augment de la presència d'espècies més fràgils, com ara *Echinocardium mediterraneum*. També s'ha comprovat la recuperació de *Cymodocea nodosa* i sobre ella la presència de *Bunodeopsis strumosa* (Cnidaria). La recuperació d'aquestes espècies es deu probablement a l'aturada de pràctiques d'arrossegament a la zona objecte de pesca (Audemard *et al.* 2002).

Biometria.

La relacions talla màxima mitjana i pes mitjà són superiors a les obtingudes a l'Adriàtic nord (Valli *et al.* 1981, Deval i Oray 1998) i a la costa d'Algarve (Gaspar *et al.* 2001), mentre que la relació longitud (talla) màxima-altura, és lleugerament inferior a l'obtinguda a l'Adriàtic (Marano *et al.* 1982) i al mar de Màrmara (Deval 2001). Respecte a la relació longitud (talla) màxima-altura gruixa, la relació és superior a l'obtinguda a l'Adriàtic (Marano *et al.* 1982).

La reducció en la talla mitjana màxima al llarg de l'explotació és una conseqüència de l'extracció dels individus de talla comercial, que són els més vells de la població (Romanelli *et al.* 2009, Silva 2010).

Altres espècies freqüents com *Rudicardium tuberculatum* i *Dosinia lupinus* presenten una tendència a disminuir la talla mitjana màxima, això indica que els factors que afecten negativament a la rossellona també les afecten directament.

Estructura i evolució de la població.

Fins l'any 2002, l'estructura de la població presenta una distribució bimodal que concorda amb les estructures del banc de san Ginés, Cartagena (Vizuet *et al.* 1990) i la badia de Mazarrón (Vizuet *et al.* 1993).

La rossellona és una espècie que viu a la franja costera litoral, motiu pel qual, és molt sensible als canvis que es produeixen a aquesta, principalment com a conseqüència de factors meteorològics i oceanogràfics. Les fortes pluges produïdes al 6 de setembre de 2001, 55,6 mm en 19 hores (Aemet 2012), van produir una aportació elevada d'aigua dolça i de sediments a través dels torrents de la zona. Com a conseqüència, va augmentar la terbolesa de l'aigua i va aparèixer una capa mucilaginosa sobre el fons que va perdurar setmanes i que va provocar la mort de la majoria de les rossellones, en especial les de major talla. Aquesta situació es va repetir el mes de juliol de 2002, amb una precipitació de 34,7 mm en 14 hores (Aemet 2012). Mortalitats massives similars associades a riades s'han documentat a l'Adriàtic (Froglià i Fiorentini 1989, del Piero i Fornaroli 1998, Paolini *et al.* 1998, Prioli *et al.* 1998). La mortalitat s'explica per l'anòxia induïda als sediments (Froglià *et al.* 1998, del Piero 1998), perquè els sòlids en suspensió no causen problemes de supervivència a la rossellona (Angioni *et al.* 2010).

Aquestes dues torrentades semblava que explicaven la disminució de la biomassa del banc de la rossellona, i per aquest motiu es va establir una veda temporal de dos anys, (Illes Balears 2003), que no va produir el resultat esperat.

Una explicació a la manca de recuperació es basa en l'oligotròfia de les aigües (Masse 1971a, Masse 1971b, Nojima i Russo 1989). No obstant això, aquesta situació no es dona a s'Arenal de Palma, on es produeix una descàrrega difusa de nutrients provinents de l'aquífer del pla de Palma, que afavoreixen una elevada biomassa fitoplanctònica (IMEDEA (UIB-CSIC) 2010, Rodellas *et al.* 2015).

Les elevades temperatures també poden tenir un important paper en l'increment de la mortalitat de la rossellona, produïnt un elevat estrès quan la temperatura de l'aigua supera els 28°C (Froglia 2000, Moschino i Marin 2006). Durant els darrers anys hi ha hagut onades de calor durant les quals, la temperatura de l'aigua ha ultrapassat aquesta temperatura: 28,83° C en 2003 i 28,54°C en 2006 (Marbà i Duarte 2010), 28,07°C en 2004, 28,37°C en 2005, i 28,05°C en 2010 (dades pròpies).

Tots aquests factors i d'altres, com la fallida en el reclutament (Silva 2010) o l'elevat esforç metabòlic associat a la reproducció (Moschino i Marin 2006), no expliquen la disminució de la biomassa i de la pràctica desaparició dels individus de talla comercial. En conjunt podrien haver minvat la immunitat de *C. gallina* afavorint la infecció per qualche agent etiològic, com es creu que va succeir a l'estiu de 1996 a l'Adriàtic (Berrilli *et al.* 2000).

Detecció de l'agent patològic.

Anàlisi histopatològic.

Bonamia ostreae és el paràsit causant de la pràctica desaparició del cultiu d'ostra plana a França i Espanya. Es va detectar per primera vegada a la Bretanya Francesa a finals dels anys 70, i s'ha estès no només per Europa, sinó també per Nova Zelanda i Nord Amèrica. Les zones afectades poden arribar a patir una mortalitat superior al 90% (Cahour 1979, Cahour *et al.* 1980, Comps *et al.* 1980, Pichot *et al.* 1980, Van Banning 1985, Elston *et al.* 1986, Dinamani *et al.* 1987). Afecta fonamentalment a ostres de mida superior als 2 cm i no infecta de forma natural ni experimental a d'altres mol·luscs presents a la zona (Culloty i Mulcahy 1994, Culloty *et al.* 1999). Afecta als hemòcits i les cèl·lules epitelials branquials, causant lesions branquials extenses i del teixit

connectiu i mala condició dels exemplars afectats (Comps *et al.* 1980, Tigé *et al.* 1980, Comps 1982). El paràsit és present i transmissible durant tot l'any, i s'observa, per tant, a les zones afectades, un cicle continu d'infecció i mortalitat (Culloty i Mulcahy 1994). La vulnerabilitat dels individus pareix directament relacionada amb pràctiques que augmenten l'estrès i factors ambientals: maneig inadequat, dragat dels fons marí, temperatura de les aigües, salinitat (Giovanardi *et al.* 1994, Chicharo *et al.* 2002, Moschino *et al.* 2003, da Ros *et al.* 2003, Moschino *et al.* 2008, Romanelli *et al.* 2009). L'estrès de la posta és un altre factor a tenir en compte (Froglia 2000, Moschino i Marin 2006). A França, a les zones afectades, s'han establert mesures per disminuir les taxes d'infecció, l'efectivitat de les quals sembla limitada (le Bec *et al.* 1991, Montes *et al.* 1991, Robert *et al.* 1991, Lama i Montes 1993). Podem destacar les següents: No retornar les ostres inferiors a la talla reglamentària al banc, disminuir la densitat de cultiu, evitar l'estrès dels animals, rentar tots els aparells de pesca abans de tornar a port.

A més a més s'ha descrit, a Nova Zelanda, una altra *Bonamia* que afectaria a l'ostra *Triostrea lutaria* (Dinamani *et al.* 1987), causant elevades mortalitats en poblacions naturals, amb simptomatologia i llesions molt semblants a les descrites en el cas de *Bonamia ostreae*.

Per una altra banda, s'ha descrit la presència d'inclusions intracitoplàsmiques en ostres xineses, causades per *rickettsies*, la infecció de les quals provoca una elevada mortalitat en bancs naturals (Van Banning 1985).

Marteilia refringens és un protozou paràsit del filum dels Paramixea (Berthe *et al.* 2000), que infecta el sistema digestiu de moltes espècies de bivalves i indueix desordres fisiològics que poden matar l'hoste (Alderman 1979, Grizel *et al.* 1974). El seu cicle vital és indirecte i podria incloure *Paracartia grani*, al manco a estanys (Audemard *et al.* 2001 2002) i *P. latisaetosa* (Arzul *et al.* 2014) com a vectors. Altres possibles intermediaris són: *Oithona* sp.; diverses espècies d'*Acartia* i una espècie indeterminada de copèpode harpacticòide (Carrasco 2007a), però el seu paper al cicle vital no s'ha demostrat. Les espècies susceptibles conegudes són: *Ostrea edulis* (Grizel *et al.* 1974), *Mytilus edulis* (Le Roux *et al.* 2001), *M. galloprovincialis* (Villalba *et al.* 1993a, Robledo *et al.* 1995, Lopez-Flores *et al.* 2004, Novoa *et al.* 2005) i *Solen marginatus* (López-Flores *et al.* 2008a). *O. chilensis*, *O. pulchana*, *O. denselamellosa* s'infecten quan s'introdueixen a zones on hi ha infestació (Martin 1993, Berthe *et al.* 2004). No

obstant això, es desconeixia que pogués afectar a *Chamelea gallina*. Posteriorment, s'ha comprovat que afecta també a *Xenostrobus securis* (Pascual *et al.* 2010) i a *Ostrea stentina* (Elgarsalli *et al.* 2013). Afecta a qualsevol classe d'edat (Grizel 1985), però la prevalència i la intensitat de la infecció és generalment més elevada en individus de 2 o més anys (Villalba *et al.* 1993a, Audemard *et al.* 2001). La infecció amb *Marteilia refringens* és una malaltia mortal per les ostres (Grizel *et al.* 1974, Alderman 1979, Audemard *et al.* 2001). La mort es produeix durant el segon any després de la infecció inicial (Alderman 1979, Grizel 1985). La prevalença és variable i pot arribar al 98% de les ostres (Alderman 1979, Berthe *et al.* 2004), mentre que la mortalitat pot ser entre el 50 i el 90% i està associada a l'esperulació del paràsit (Grizel 1985, Berthe *et al.* 2004). El disparador de l'esperulació és la pujada de la temperatura de l'aigua a 17°C en primavera (Grizel 1985, Audemard *et al.* 2001, Berthe *et al.* 2004, Carrasco *et al.* 2007a).

Per tant, aquestes inclusions intracitoplàsmiques podrien ser degudes a un paràsit acetosporidi similar a *Bonamia ostreae*, bé per una infecció rickettsial o bé per *Marteilia refringens*. Les taxes d'infecció i mortalitat, les lesions observades, la localització intracel·lular, i les cèl·lules diana de la infecció, així com la morfologia de les inclusions no fan possible descartar cap de les possibilitats amb microscòpia òptica, la qual cosa fa necessària recórrer a altres tècniques. La mortalitat detectada sembla relacionada amb l'estrès reproductiu (Moschino i Marin 2006), la temperatura de les aigües durant l'estiu (Froglià 2000, Moschino i Marin 2006) i l'augment de l'estrès provocat per l'explotació del banc. És notòria l'afectació, fonamentalment, d'individus de talla superior a 2 cm, segons les observacions de camp. Probablement aquest agent infecciós es trobava de forma natural al banc de s'Arenal, ja que no s'ha importat llavors de mol·luscs a la zona. També sembla que ha contribuït decisivament a la disminució de la resistència dels individus l'episodi d'eutrofització de les aigües succeït l'any 2001 i la conseqüent extensió de la infecció. El retorn dels individus de talla inferior a la mínima, estressats per les pràctiques d'arrossegament, també podria afavorir la dispersió de la malaltia. Les mesures a establir-ne en front de la malaltia, apuntades abans en el cas de *Bonamia* i aplicables als possibles diagnòstics per tal de disminuir l'estrès del banc natural, són de difícil aplicació i d'efectes poc clars, ja que han aconseguit la disminució de la incidència a les zones on es practiquen envers *Bonamia ostreae*, però no l'eliminació de la malaltia. L'única mesura aplicable amb

efectes clars seria la erradicació de la pesca, per tal d'evitar l'estrès en la població causat per l'arrossegament i per la devolució dels individus arrossegats de talla inferior a la mínima.

No obstant això, l'adscripció al patogen causant no està clara mitjançant tècniques histològiques. Per aquest motiu es va recórrer a l'ús de tècniques biomoleculares.

Detecció de *Marteilia refringens*.

El mètode emprat per la detecció del genoma de *Marteilia refringens* inclou una amplificació prèvia i una PCR niada. La PCR prèvia incrementa els llocs d'unió pels encebadors emprats a la segona amplificació. Per tant, la PCR niada aporta una major sensibilitat que la PCR estàndard, doncs el segon parell d'encebadors amplifica una segona diana present dins el producte amplificat de la PCR prèvia. S'ha emprat una combinació de PCR niada i PCR de cadena curta per superar la reducció de l'eficiència d'amplificació a la PCR estàndard, que es deu probablement a l'ampla degradació de l'ADN i la presència d'inhibidors de la PCR, freqüent en aquests tipus de mostres (Greer *et al.* 1991, Wilson 1997).

La identificació del paràsit que infectava a *Chamelea gallina* fou possible després de l'amplificació d'un fragment del genoma del paràsit mitjançant una PCR niada i la comparació de la seva seqüència amb d'altres de *Marteilia refringens*. La seqüència obtinguda a partir del bloc de paraplast va mostrar un 97,4% d'identitat amb les seqüències de *Marteilia refringens* aïllades de *Mytilus edulis* i *Solen marginatus* i d'un 99,1 % de les d'*Ostrea edulis*. Aquests resultats recolzen la presència de *M. refringens* en *C. gallina*. És més, les seqüències aïllades d'*O. edulis* es corresponen al tipus molecular de *M. refringens* que parasita ostres (*M. refringens* tipus O), mentre que les seqüències aïllades de *M. galloprovincialis* i *S. marginatus* es corresponen amb el tipus de paràsit que es troba principalment infectant musclos (Lopez-Flores *et al.* 2004, Lopez-Flores *et al.* 2008a). Això és confirmat per la baixa identificació genètica entre els tipus moleculars (és a dir, 2% de divergència entre *M. refringens* provinent d'ostres i *M. refringens* de musclos, i 1,8% de divergència entre *M. refringens* provinent d'ostres i *M. refringens* provinent de mànecs) que dins del mateix grup (és a dir, 0,7 de divergència entre *M. refringens* de musclos i de mànecs). Per tant, la major identificació de la seqüència del paràsit amplificat de *C. gallina* amb les seqüències aïllades d'*Ostrea*

edulis (0,9% de divergència) indiquen que el perfil molecular de *M. refringens* que infecta a *C. gallina* es correspon amb *M. refringens* tipus O.

La ubicació específica de les cèl·lules de *Marteilia refringens*, en els teixits de *Chamelea gallina* es va determinar per hibridació *in situ*, emprant sondes d'ADN obtingudes a partir de *M. refringens* d'*Ostrea edulis*. La sonda Smart2, localitzada en el gen 18S ribosomal del paràsit, que es considera específica a nivell del gènere *Marteilia* (le Roux *et al.* 1999, Kleeman *et al.* 2002a), es va emprar com a control en l'anàlisi *in situ*, perquè les característiques morfològiques dels paràsits, en les seccions histològiques, es corresponien amb les descrites per al gènere *Marteilia*, confirmant així que el paràsit pertanyia a aquest gènere. L'altra sonda utilitzada va ser els 358 pb del fragment d'IGS de *M. refringens* compresa entre els encebadors MT-1B i MT-2B. El senyal d'hibridació obtingut amb la sonda IGS va ser similar a l'obtinguda amb teixits parasitats d'*O. edulis*, mentre que no va ser observada cap senyal amb les cèl·lules de *M. sydneyi* en *Saccostrea commercialis*. Encara que la seqüència de l'ADNr IGS del genoma de *M. sydneyi* no s'ha caracteritzat, i per tant la divergència interespecífica entre *Marteilia sydneyi* i *M. refringens* no es pot determinar sobre aquesta regió, el resultat dels anàlisis d'hibridació *in situ*, tant en la mostra com als controls va mostrar que la sonda IGS pot ser útil per a la identificació específica de *M. refringens* entre espècies relacionades. Aquest resultat, juntament amb la identitat de la seqüència amplificada mitjançant la PCR niada, ha permès identificar l'espècie del gènere *Marteilia* present en el sistema digestiu de *C. gallina* com *M. refringens*. A més, el senyal feble de la sonda IGS respecte del senyal de la sonda del gen 18S podria explicar-se per la menor disponibilitat de la seqüència diana IGS (un espaiador no transcrit que només és present en l'ADN genòmic) en comparació amb la seqüència del gen 18S (present també en el rRNA transcrit), com ha estat prèviament descrit per a la sonda ITS1 de *M. sydneyi* respecte de la mateixa sonda Smart2 (Kleeman *et al.* 2002a).

La manca d'hibridació de la sonda IGS amb algunes de les cèl·lules dels paràsits podria suggerir la possible presència d'una altra espècie del gènere *Marteilia* en la mostra que no hibriden amb la sonda de *M. refringens* (com va succeir amb les cèl·lules de *M. sydneyi* en el control negatiu). No obstant això, aquesta possibilitat sembla inconsistent, pel fet que la hibridació amb la sonda Smart2, específica a nivell de gènere, també mostra una manca de senyal amb algunes cèl·lules parasitàries. Per tant es considera que aquest resultat ha de ser a causa d'algun problema en el procés de permeabilització

durant el protocol d'hibridació (insuficient tractament enzimàtic proteolític) causant de l'accés parcial de les sondes a la seqüència diana.

Aquesta és la primera vegada que s'identifica *Marteilia refringens* a la rossellona. El mar Mediterrani es considera una àrea enzoòtica de *M. refringens*, de la qual s'ha comunicat que infecta a bivalves en la propera regió del Delta de l'Ebre (Durfort 1994, Bigas *et al.* 2000, Novoa *et al.* 2005, Carrasco *et al.* 2007a). També s'ha identificat, *M. refringens* mitjançant tècniques histològiques, en la glàndula digestiva de l'ostra plana europea *Ostrea edulis* i el músculo *Mytilus galloprovincialis* de la costa de Balears, així com en les mostres de la costa d'Itàlia, Croàcia i Grècia (Zrncic *et al.* 2001, Virvilis *et al.* 2003, Lopez-Flores *et al.* 2004, Tieri *et al.* 2006, Karagiannis i Angelidis 2007, Carella *et al.* 2010, Serracca *et al.* 2014). La presència de diferents etapes conegudes de *M. refringens* a les cèl·lules de *C. gallina*, incloent l'etapa d' esporulació, suggereix que el paràsit és capaç de completar la infecció en aquesta espècie d'escopinya i, per tant, *C. gallina* ha de ser considerat com un nou hoste de *M. refringens*. Amb les mostres incloses en paraplàst no es pot establir una clara associació entre la infecció per *M. refringens* i la mortalitat de *C. gallina* a la Badia de Palma perquè només 3 de les 69 copinyes es van trobar infectades.

Per tal de determinar si l'agent causal de la depleció del banc de la rossellona és *M. refringens*, es varen realitzar PCR amb encebadors específics (Le Roux *et al.* 2001). Al ser individus de mida petita (edat 0+ i 1+), la infecció, presumiblement, es trobava en la fase inicial (Villalba *et al.* 1993b, Audemard *et al.* 2001) i pel fet d'haver-les mantingut congelades, no es va recórrer a tècniques histològiques, ni per tant, a hibridació *in situ*. Tenint en compte que ja s'havia detectat la infecció en rossellona mitjançant histologia amb hibridació *in situ* i que la PCR amb encebadors específics es pot emprar tant per al diagnòstic provisional com pel confirmatiu (OIE 2015), se va optar per aquest mètode. D'aquesta manera s'ha confirmat la presència de *M. refringens* en el 55,1% dels individus analitzats.

CAPÍTOL III: *Perkinsus mediterraneus* a les Illes Balears

INTRODUCCIÓ.

La perkinsosis és una malaltia epidèmica dels mol·luscs marins causada pels protozous paràsits del gènere *Perkinsus*. S'han associat mortalitats elevades de mol·luscs d'importància comercial al golf de Mèxic, al llarg de la costa atlàntica d'Amèrica del Nord (Andrews i Hewatt 1957, Mackin i Hopkins 1962, Burreson i Ragone Calvo 1996, Ford 1996, Soniat 1996), a la Columbia Britànica (Bower *et al.* 1998), al llarg de la costa atlàntica del sud-oest d'Europa (Azevedo 1989), al Mar Mediterrani (da Ros i Canonzier 1985, Santmartí *et al.* 1995), al sud d'Austràlia (Lester i Davis 1981, Goggin i Lester 1995) i al llarg de les costes sud i oest de Corea (Choi i Park 1997, Park i Choi 2001).

Taula 13. Espècies de *Perkinsus*, hostes i referència bibliogràfica.

Espècie	Hoste tipus	Altres hostes	Àrees	Font
<i>Perkinsus marinus</i>	<i>Crassostrea virginica</i>	<i>Crassostrea gigas</i> , <i>C. ariakensis</i> , <i>C. rhizophorae</i> , <i>C. corteziensis</i> , <i>C. gasar</i> , <i>Mya arenaria</i> , <i>Macoma balthica</i> , <i>Saccostrea palmula</i>	USA, Hawaii, Brasil, Mèxic	Villalba <i>et al.</i> 2004, Moss <i>et al.</i> 2007, Dungan <i>et al.</i> 2007a, Caceres-Martínez <i>et al.</i> 2012, da Silva <i>et al.</i> 2013, da Silva <i>et al.</i> 2014, Escobedo-Fregoso <i>et al.</i> 2015.
<i>Perkinsus olsenii</i> (= <i>P. atlanticus</i>)	<i>Haliotis ruber</i>	<i>Ruditapes decussatus</i> , <i>R. philippinarum</i> , <i>Anadara trapezia</i> , <i>Austrovenus stutchburyi</i> , <i>Pitar rudis</i> , <i>Pitar rostrata</i> , <i>Paphia undulata</i> , <i>Tridacna</i> spp., <i>Protothaca jedoensis</i> ; <i>C. ariakensis</i> , <i>C. hongkongensis</i> , <i>C. gigas</i> , <i>C. sikamea</i> , <i>C. gasar</i> ; <i>Pinctada margaritifera</i> , <i>P. martensii</i> ; <i>P. fucata</i> , <i>Haliotis laevigata</i> , <i>H. scalaris</i> , <i>H. cyclobates</i> , <i>H. rubra</i>	Austràlia, Nova Zelanda, Corea, Japó, Xina, Portugal, Espanya, Itàlia, Uruguai, Vietnam, Tailàndia, Índia, França.	Leethochavalit <i>et al.</i> 2004, Villalba <i>et al.</i> 2004, Park <i>et al.</i> 2005, Zhang <i>et al.</i> 2005, Abollo <i>et al.</i> 2006, Park <i>et al.</i> 2006, Dungan <i>et al.</i> 2007b, Moss <i>et al.</i> 2007, Sheppard i Phillips 2008, Sanil <i>et al.</i> 2010, Arzul <i>et al.</i> 2012, da Silva <i>et al.</i> 2014.
<i>Perkinsus chesapeaki</i> (= <i>P. andrewsi</i>)	<i>Mya arenaria</i>	<i>Macoma balthica</i> , <i>M. mitcheli</i> , <i>Mercenaria mercenaria</i> , <i>Tagelus plebeius</i> , <i>Crassostrea virginica</i> , <i>Cerastoderma edule</i> , <i>Ruditapes decussatus</i> , <i>R. philippinarum</i> , <i>Cyrtopleura costata</i>	USA, France, Spain,	Villalba <i>et al.</i> 2004, Pecher <i>et al.</i> 2008, Reece <i>et al.</i> 2008, Arzul <i>et al.</i> 2012, Carrasco <i>et al.</i> 2014.
<i>Perkinsus mediterraneus</i>	<i>Ostrea edulis</i>	<i>Venus verrucosa</i> , <i>Arca noae</i> , <i>Mimachlamys varia</i> , <i>Chamalea gallina</i> , <i>Pinna nobilis</i>	Spain, Italy	Casas <i>et al.</i> 2004, Moss <i>et al.</i> 2008, Ramilo <i>et al.</i> 2010, Valencia <i>et al.</i> 2014.
<i>Perkinsus qugwadi</i>	<i>Patinopecten yessoensis</i>		Canada	Bower <i>et al.</i> 1998.
<i>Perkinsus honshuensis</i>	<i>Ruditapes philippinarum</i>		Japan	Dungan i Reece 2006.
<i>Perkinsus beihaiensis</i>	<i>Crassostrea hongkongensis</i>	<i>C. ariakensis</i> , <i>C. madrasensis</i> , <i>Pinctada margaritifera</i> , <i>P. martensii</i> , <i>Anomalocardia brasiliiana</i>	China, Índia, Brasil	Moss <i>et al.</i> 2008, Sanil <i>et al.</i> 2012, Ferreira <i>et al.</i> 2014.

Diverses espècies de *Perkinsus* s'han descrit als mol·luscs però fins ara, només set han estat reconegudes com a vàlides (Taula 13). La primera espècie descrita va ser trobada

en els anys quaranta als USA, *Perkinsus marinus*, que afecta l'ostra americana, *Crassostrea virginica*, i que causa importants mortalitats (Ray 1966b). La segona espècie descoberta va ser *Perkinsus olseni*, descrita el 1981 a l'orella de mar *Haliotis ruber* a Austràlia i que també va ser la responsable d'importants mortalitats de l'orella de mar *H. laevigata* (Lester i Davis 1981, Goggin i Lester 1995). Es creu que afecta a una gran varietat d'espècies de mol·luscs de la Gran Barrera de Corall (Goggin i Lester 1995). El 1989, es va detectar *Perkinsus atlanticus* a l'escopinya llisa, *Ruditapes decussatus*, arran de mortalitats massives a Portugal (Azevedo 1989). Altres escopinyes i àrees també han mostrat la presència d'aquestes espècies (Villalba *et al.* 2004). Mentrestant, la sistemàtica molecular va demostrar que *P. olseni* i *P. atlanticus* són la mateixa espècie (Murrell *et al.* 2002) i per tant la nomenclatura correcta per aquesta espècie es *P. olseni*, al haver estat citada abans. Altres dues espècies de *Perkinsus* es van demostrar sinònimes basant-se en l'anàlisi molecular: *P. chesapeakei*, paràsit de *Mya arenaria* (McLaughlin *et al.* 2000) i *P. andrewsi*, de l'escopinya *Macoma balthica* (Coss *et al.* 2001). *P. qugwadi*, responsable de la mortalitat de la vieira japonesa *Patinopecten yessoensis* al Canadà, es distingeix de les altres espècies identificades per les seves peculiaritats: no hi ha desenvolupament d'hipnospores al medi fluït de tioglicolat de Ray (RTFM), ni es tenyeix de blau o negre amb Lugol, les seves zoospores es poden desenvolupar dins de l'espai intersticial de l'amfitrió, són infectives a baixes temperatures i les seves característiques moleculars són considerablement diferents de les altres espècies de *Perkinsus* (Bower *et al.* 1998, Blackbourne *et al.* 1998). Actualment, la seva inclusió en el gènere *Perkinsus* és controvertida (Casas *et al.* 2002a). Posteriorment es van caracteritzar altres noves espècies de *Perkinsus*: *P. mediterraneus* a l'ostra plana, *Ostrea edulis*, de les Illes Balears, Espanya (Casas *et al.* 2004), *P. honshuensis* en l'escopinya japonesa, *Ruditapes philippinarum*, al Japó (Dungan i Reece 2006), i *P. beihaiensis* en les ostres *Crassostrea hongkongensis* i *C. ariakensis* del sud de la Xina (Moss *et al.* 2008).

La distribució coneguda de les diferents espècies de *Perkinsus* es mostra a la figura 29.

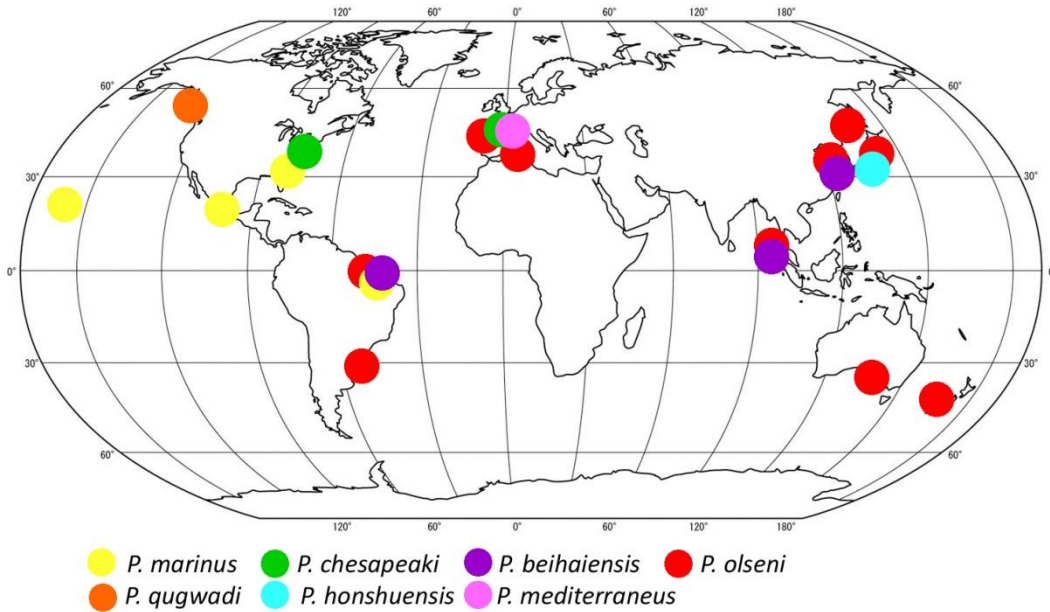


Figura 29. Distribució mundial de les espècies del gènere *Perkinsus*.

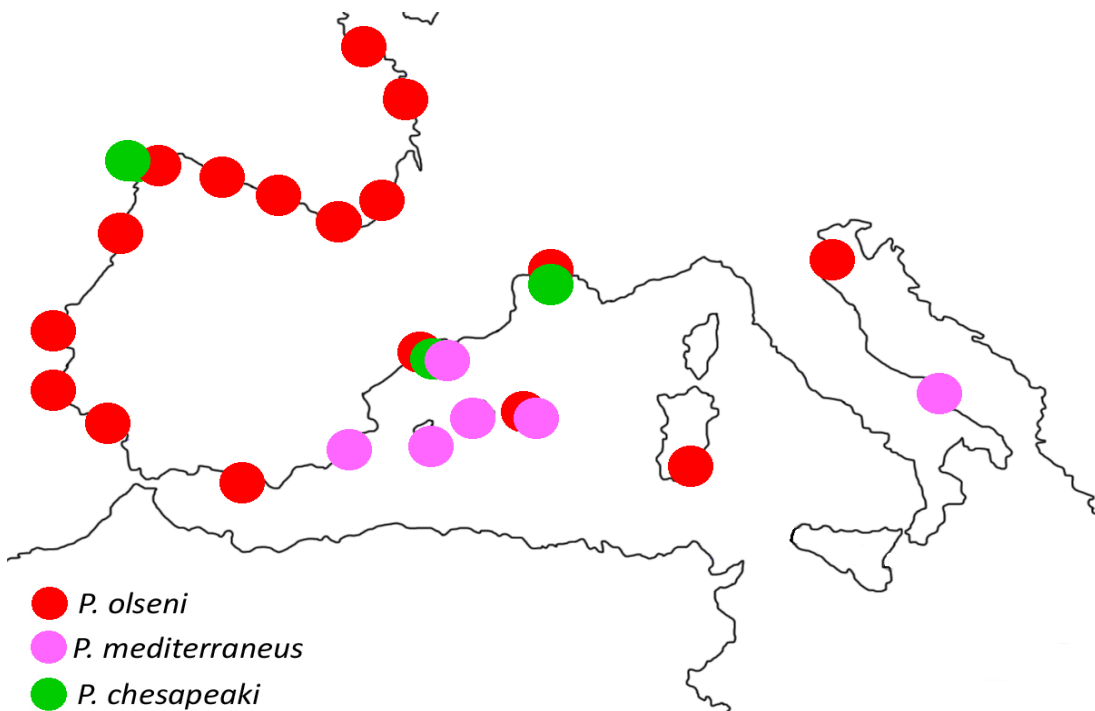


Figura 30. Distribució de les espècies del gènere *Perkinsus* a Europa.

A Europa s'han descrit tres espècies de *Perkinsus* (Fig. 30): *P. mediterraneus* i *P. olseni* (Casas *et al.* 2004, Abollo *et al.* 2006, Elandaloussi *et al.* 2009, Valencia 2010, Ramilo *et al.* 2010, Valencia *et al.* 2014, Ramilo *et al.* 2015) i recentment *P. chesapeakei* (Carrasco *et al.* 2014). Fins a dia d'avui, *P. mediterraneus* sols s'ha localitzat a aigües

del Mediterrani. S'han utilitzat com a eina de diagnòstic diferencial per discriminar les diferents espècies els polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció (PCR-RFLP), la PCR seguida de seqüenciació i la hibridació *in situ* (ISH).

Transmissió i cicle vital de Perkinsus spp.

La transmissió de les diferents espècies de *Perkinsus* es produeix directament entre els mol·luscs bivalves sense la necessitat d'hostes intermedis (Ray 1954, Goggin i Lester 1995, Chu 1996, Blackbourn *et al.* 1998), encara que, al laboratori, paràsits heterotròfics poden facilitar la transmissió (Diamond 2012). S'ha demostrat experimentalment que tant els trofozoïts, com les hipnospores i les zoospores cursen infeccions en ostres (Goggin *et al.* 1989, Volety and Chu 1994, Rodríguez *et al.* 1994, Chu 1996, Bushek *et al.* 1997b, Chintala *et al.* 2002, Ford *et al.* 2002, Bushek *et al.* 2002a). La inoculació de trofozoïts de *P. marinus* a les ostres provoquen un major grau d'infecció que la inoculació amb hipnospores (Volety and Chu 1994). No obstant això, es desconeix quina és l'etapa més efectiva per transmetre la malaltia al medi natural (Chu 1996, Bushek *et al.* 2002a, Ragone Calvo 2003b). Les ostres infectades amb *P. marinus* alliberen cèl·lules viables al medi mitjançant diapedesi i mitjançant els excrements (Scanlon *et al.* 1997, Bushek *et al.* 2002b).

Per tant, els hostes infectats són una font continua de formes infectants (trofozoïts), i una vegada mort, continuen sent infectius, directament mitjançant hipnospores o bé per la formació de zoospores a partir de la maduració d'aquestes. A més, s'ha comprovat que les taxes més elevades d'infecció amb *P. marinus* coincideixen amb les mortalitats causades per aquest paràsit en *C. virginica* (Ragone Calvo *et al.* 2003b)

Les vies d'entrada de les formes infectants de *Perkinsus* als teixits de l'hoste poden ser varies. Les primeres investigacions basades en tècniques histopatològiques van suggerir que les cèl·lules de *P. marinus* eren ingerides i fagocitades pels hemòcits presents al lumen de l'intestí (Mackin 1951, Mackin i Boswell 1956). Més important és l'entrada a través dels epitelis dels òrgans paleals (Perkins 1988, Dungan *et al.* 1996, Bushek *et al.* 1997, Chintala *et al.* 2002). Recentment, s'ha proposat que la principal via d'entrada de *P. marinus* es produeix durant el processat de la pseudofemta, fet que concentra el paràsit (Allam *et al.* 2013). Segons la infecció avança, *P. marinus* es dispersa des dels òrgans paleals a altres òrgans mitjançant l'hemolinfa de l'hoste.

Cicle vital.

El cicle vital de *Perkinsus* spp. presenta tres fases: trofozoït, hipnospora (excepte *P. qugwadi*) i zoospora (Fig. 32). Com s'ha indicat abans, no està clar quin és la forma infectiva al medi natural, però es suposa que la zoospora és la fase infectiva, almenys en el cas de *Perkinsus olseni* (Auzoux-Bordenave *et al.* 1995).

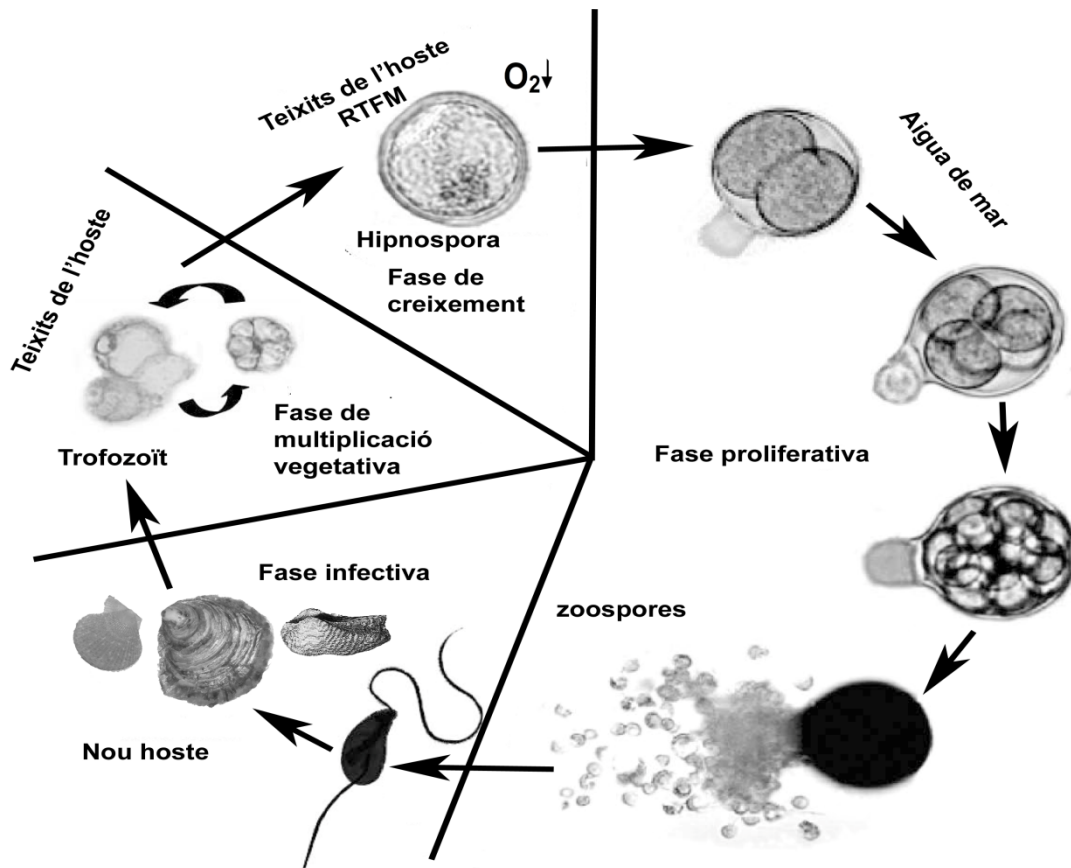


Figura 31. Cicle vital de *P. olseni* (Modificat d'Auzoux-Bordenave *et al.* 1995, Choi *et al.* 2005, Choi i Park 2010).

Fase de multiplicació vegetativa.

Els trofozoïts o meronts resideixen i proliferen al teixit connectiu de l'hoste. El paràsit presenta una forma esfèrica amb un gran vacúol i un nucli en posició perifèrica, el que el dóna un aspecte d'anell, la mida del qual pot variar segons l'espècie, i en qualche cas es pot observar un vacuoplast a l'interior del vacúol (Fig. 31).

Durant la fase de proliferació vegetativa, el paràsit es multiplica per divisions binaries successives (cicles de cariocinesi seguit de citocinesi). Les cèl·lules resten juntes, formant una roseta dins de la paret del paràsit fins que aquesta es romp. Una vegada alliberades, aquests trofozoïts immadurs, creixen i formen un vacúol, transformant-se en trofozoïts madurs (Goggin i Lester 1995, Blackburn *et al.* 1998). Llavors, les cèl·lules

viables de *Perkinsus* s'alliberen des dels animals per diapedesi i excrements (Bushek *et al.* 2002b) i també quan l'hoste mor (Ragone-Calvo *et al.* 2003b) (Fig. 31).

Fase de creixement.

La fase d'hipnospora o prezoosporangia s'observa principalment quan teixits infectats d'hostes amb *Perkinsus* s'incuben en medi tioglicolat de Ray (Ray 1952), excepte en el cas de *P. qugwadi* (Blackbourne *et al.* 1998). També s'ha observat el creixement de trofozoïts en hostes moribunds (Perkins 1968, Valiulis i Mackin 1969) (Fig 31).

En medi RFTM els trofozoïts creixen i desenvolupen una paret gruixada transformant-se en hipnospores. Quan són transferides a aigua de mar, les hipnospores inicien cicles successius de cariocinesi i citocinesi.

Les hipnospores poden sobreviure durant un llarg termini de temps en condicions ambientals adverses i mantenen la possibilitat de zoosporular. Casas *et al.* (2002b), les considera una fase latent.

Fase de proliferació.

Les hipnospores poden sortir de pústules necròtiques o de mol·luscs en descomposició i es desenvolupen cap a zoosporangia en contacte amb l'aigua de mar (Perkins 1968, Valiulis i Mackin 1969). Cicles successius de cariocinesi i citocinesi produeixen centenars de zoospores biflagel·lades i el·lipsoïdals, que deixen el zoosporangi mitjançant un tub de descarrega (en ocasions pot haver-hi dos), que apareix a cada hipnospora abans de les divisions cel·lulars (Perkins i Menzel 1966, Lester and Davis 1981, Azevedo 1989, McLaughlin *et al.* 2000, Casas *et al.* 2002a, 2004) (Fig. 31).

Mètodes de diagnòstic per a *Perkinsus* spp.

Segons el “Manual de Proves de Diagnòstic pels Animals Aquàtics” (2015) no són recomanables els mètodes de camp (signes clínics, alteracions del comportament, signes macroscòpics). Tant els signes clínics, tal com bivalves morts o moribunds amb teixit aquós i prim, tant com les alteracions de comportament, com la lentitud en el tancament de les valves, no són específics de la infecció per *Perkinsus* spp. De la mateixa manera, tampoc són recomanables alguns mètodes clínics, com els frotis i les preparacions humides. No obstant això, els talls histològics de teixits fixats que inclouen glàndula digestiva, brànquies i mantell tenyits amb hematoxilina i eosina són un mètode

presumptiu de baixa especificitat amb bona sensibilitat per a infeccions d'intensitat moderada a alta.

El cultiu en tioglicolat líquid de Ray (RFTM) és una tècnica senzilla, barata i molt sensible. La especificitat és baixa, doncs la tècnica no diferencia entre les distintes espècies de *Perkinsus*, mentre que la sensibilitat és elevada i s'usa com a mètode de vigilància.

Per al cultiu de *Perkinsus* sp s'han desenvolupat diversos mitjans (la Peyre *et al.* 1993, Dungan i Hamilton 1995, Casas *et al.* 2002a) preferint-se el mitjà 1:1 DME/Ham's F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham).

Taula 14. Mètodes per a la vigilància dirigida i el diagnòstic de *Perkinsus*. a: el mètode és el recomanat per raó de disponibilitat, utilitat i especificitat i sensibilitat diagnòstica; b: mètode estàndard, amb una bona sensibilitat i especificitat diagnòstica; c: el mètode té aplicació en algunes situacions, però el cost, l'exactitud o altres factors limiten la seva aplicació. d: el mètode no es recomanat per a aquesta finalitat.

Aquestes designacions són subjectives perquè la idoneïtat implica qüestions de fiabilitat, sensibilitat, especificitat i utilitat. Encara que no totes les proves indicades com de categoria a o b han estat objecte d'una estandardització i validació formals, el seu ús habitual i el fet de haver-se emprat àmpliament sense resultats dubtosos les fan acceptables (OIE 2015).

Mètode	Vigilància dirigida			Diagnòstic provisional	Diagnòstic confirmatiu
	Llavors	Juvenils	Adults		
<i>Signes macroscòpics</i>	d	d	d	d	d
<i>Frotis d'hemolinfa</i>	d	c	c	c	d
<i>Histopatologia</i>	b	b	b	b	d
<i>RFTM, anàlisi de teixit*</i>	d	a	a	b	d
<i>RFTM, anàlisi de tot el cos*</i>	d	c	c	c	d
<i>PCR</i>	a	b	b	a ¹	b ¹
<i>Hibridació in situ</i>	d	b	b	b	a
<i>Seqüenciació</i>	d	d	d	d	b ¹

*la tècnica no es específica per a l'espècie, però pot emprar-se de manera fiable en hostes/zones en les quals solament hi ha present o predomina una espècie de *Perkinsus*; ¹ S'ha d'usar solament si las infeccions es visualitzen mitjançant frotis, RFTM o histologia.

S'han desenvolupat mètodes de detecció de l'antigen basats en anticossos monoclonals i policlonals, però no són específics a nivell d'espècie i, a més l'anticòs policlonal pot tenir reaccions creuades amb algunes espècies de dinoflagel·lats (Bushek *et al.* 2002c).

Per a un diagnòstic confirmatiu de l'espècie s'empren tècniques moleculars, com la PCR, per a la qual està recomanat l'ús de la regió de l'espaiador transcrit intern (ITS) del complex gènic de l'ARNr de *Perkinsus* spp. Posteriorment, les mostres amb

resultats positius s'han d'analitzar amb un anàlisi específic, com per exemple, la seqüenciació del fragment ITS amplificat.

Una altra tècnica és la hibridació *in situ* (ISH), per a la qual s'han desenvolupat sondes dirigides al gen de la subunitat petita (SSU) del complex gènic de l'ARNr (Elston *et al.* 2004, Ramilo *et al.* 2015).

A més, s'ha desenvolupat una PCR per al gènere *Perkinsus* en temps real (Gauthier *et al.* 2006), que només s'ha avaluat per a *P. marinus*, *P. olseni* i *P. chesapeaki*.

Finalment, existeix una anàlisi de PCR-RFLP, que proporciona una clau taxonòmica (Abollo *et al.* 2006) que permet distingir entre *P. chesapeaki*, *P. marinus*, *P. olseni* i *P. mediterraneus*, encara que no està avaluat el seu ús per la OIE.

Els mètodes actualment disponibles per a la vigilància dirigida i el diagnòstic de *Perkinsus* s'indiquen en la Taula 14 (OIE 2015).

RESULTATS.

Assaigs RFTM.

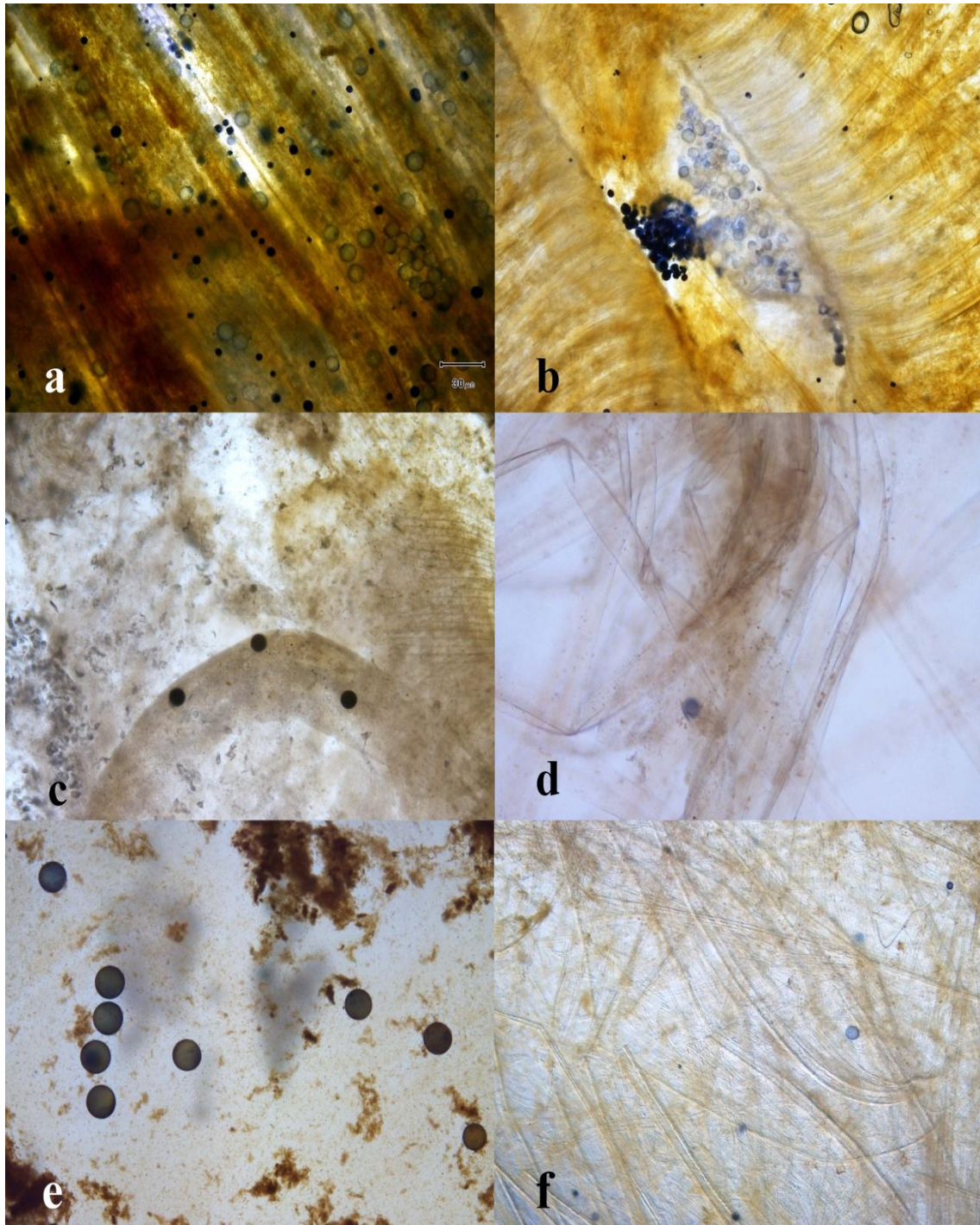


Figura 32. Resultats de l'assaig RFTM: a) Hipnospores de *Perkinsus mediterraneus* en una infecció molt intensa en ostra, b) Hipnospores de *P. mediterraneus* en una infecció molt intensa en romera, c) Hipnospores de *P. mediterraneus* en una infecció lleugera en escupinya gravada, d) Hipnospores de *P. mediterraneus* en infecció lleugera en peu de cabrit, e) Hipnospores de *P. mediterraneus* en una infecció lleugera en nacra i f) Hipnospores de *P. mediterraneus* en una infecció lleugera en rossellona.

Taula 15. Resum dels resultats obtinguts de l'assaig RTFM de les mostres recollides a les Illes Balears.

Localitat	Espècie	Data	Núm.	Prevalença	grau d'infecció	Mida
Andratx	<i>A. noae</i>	09/2011	20	40,0%	1,26	44,55±5,15
Andratx	<i>A. noae</i>	09/2012	30	53,3%	0,80	50,29±5,88
s'Arenal	<i>C. gallina</i>	09/2012	24	25,0%	0,25	20,40±0,82
s'Arenal	<i>C. gallina</i>	06/2013	20	0 %	0,00	17,88±2,16
Andratx	<i>L. lima</i>	09/2013	3	67%	0,67	35,36±14,44
Andratx	<i>L. inflata</i>	09/2013	13	38%	0,38	30,04±6,51
Andratx	<i>M. varia</i> *	09/2011	25	60,0%	0,87	34,52±7,81
Andratx	<i>M. varia</i> *	09/2012	25	84,0%	2,44	33,16±4,71
Andratx	<i>M. varia</i> *	09/2013	30	83,3%	2,40	41,97±6,66
Andratx	<i>M. varia</i> *	10/2013	14	100%	2,36	34,49±4,69
Andratx	<i>M. galloprovincialis</i> *	09/2012	30	0%	0,00	50,29±5,88
Andratx	<i>O. edulis</i>	09/2011	8	62,5%	1,37	74,66±9,960
Andratx	<i>O. edulis</i>	09/2012	6	50,0%	1,75	69,96±18,55
Andratx	<i>O. edulis</i>	09/2013	6	50,0%	0,67	87,40±14,56
Fornells	<i>O. edulis</i>	09/2010	13	53,8%	0,77	86,52±11,98
Eivissa	<i>O. edulis</i>	11/2011	18	61,1%	s/d	84,79±33,83
Maó	<i>O. edulis</i>	09/2007	32	78,1%	2,01	99,14±11,64
Maó	<i>O. edulis</i>	09/2007	30	70,0%	1,43	94,14±11,64
Maó	<i>O. edulis</i>	11/2007	30	43,3%	0,73	88,47±18,89
Maó	<i>O. edulis</i>	02/2008	30	6,7%	0,07	89,46±12,98
Maó	<i>O. edulis</i>	03/2008	30	6,7%	0,07	91,65±5,52
Maó	<i>O. edulis</i>	10/2008	30	50,0%	1,10	84,11±15,53
Maó	<i>O. edulis</i>	11/2008	30	13,3%	0,23	96,56±17,24
Palmanova	<i>O. edulis</i>	09/2010	18	27,8%	1,14	90,67±19,00
Porto Cristo	<i>O. edulis</i>	09/2010	15	60,0%	0,78	33,03±4,23
Andratx	<i>P. nobilis</i>	06/2011	6	66%	1,00	487,55±79,53
Andratx	<i>P. nobilis</i>	10/2011	11	100%	2,00	484,60±91,12
Cabrera	<i>P. nobilis</i>	05/2011	10	0%	0,00	421,98±100,72
Cabrera	<i>P. nobilis</i>	06/2011	10	50%	0,20	395,67±151,77
Cabrera	<i>P. nobilis</i>	07/2011	10	60%	1,10	414,24±128,22
Cabrera	<i>P. nobilis</i>	08/2011	11	60%	0,70	376,84±133,47
Cabrera	<i>P. nobilis</i>	09/2011	10	100%	1,70	408,81±103,63
Cabrera	<i>P. nobilis</i>	10/2011	9	30%	0,40	476,57±70,84
Cabrera	<i>P. nobilis</i>	11/2011	10	0%	0,00	381,71±212,53
Cabrera	<i>P. nobilis</i>	01/2012	10	0%	0,00	425,66±140,79
Cabrera	<i>P. nobilis</i>	01/2012	10	30%	0,33	435,30±151,47
Cabrera	<i>P. nobilis</i>	02/2012	10	30%	0,33	463,90±153,62
Cabrera	<i>P. nobilis</i>	03/2012	10	0%	0,00	429,20±166,05
Magalluf	<i>P. nobilis</i>	06/2011	5	0%	0	273,74±107,08
Magalluf	<i>P. nobilis</i>	10/2011	4	100%	3,25	327,27±89,01
Maó	<i>V. verrucosa</i>	03/2007	30	0,0%	0,00	42,28±4,29
Maó	<i>V. verrucosa</i>	05/2007	40	5,0%	0,08	44,43±2,10
Maó	<i>V. verrucosa</i>	08/2007	30	0,0%	0,00	45,04±2,39
Maó	<i>V. verrucosa</i>	10/2007	27	81,5%	1,41	41,87±2,34
Maó	<i>V. verrucosa</i>	11/2007	30	20,0%	0,27	48,13±3,36
Maó	<i>V. verrucosa</i>	02/2008	30	13,3%	0,13	43,24±1,89
Maó	<i>V. verrucosa</i>	03/2008	30	13,3%	0,13	44,02±2,03
Maó	<i>V. verrucosa</i>	05/2008	30	0,0%	0,00	45,79±2,10
Maó	<i>V. verrucosa</i>	07/2008	29	0,0%	0,00	42,87±2,38
Maó	<i>V. verrucosa</i>	11/2008	30	6,7%	0,07	42,50±4,87

L'examen amb el microscopi òptic de brànquies incubades en RFTM i tenyides amb una solució de Lugol va mostrar esferes negres o blaves, amb unes mides entre 7,9 i 183 micres ($n = 844$, mida mitjana = $59,020 \pm 40,267 \mu\text{m}$, mesurades a les mostres de mol·luscs obtingudes a partir de 2010) de diàmetre, que són hipnospores típiques de *Perkinsus* spp., en *Ostrea edulis*, *Mimachlamys varia*, *Arca noae*, *Chamaelea gallina*, *Venus verrucosa*, *Lima lima*, *Limaria inflata* i *Pinna nobilis* (Fig. 32). No es van detectar hipnospores en *Mytilus galloprovincialis*.

La prevalença va oscilar entre el 0% (*Chamaelea gallina*, *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis*, *Pinna nobilis*, *Venus verrucosa*) i 100 % (*Mimachlamys varia* i *Pinna nobilis*). El grau d'infecció varia de 0 (*Chamaelea gallina*, *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis*, *Pinna nobilis* i *Venus verrucosa*) a 3,25 (*Pinna nobilis*) (Taula 15).

Els resultats de les anàlisis de RTFM es mostren a la Taula 15.

Estacionalitat.

A les Illes Balears, la prevalença i la intensitat (grau d'infecció) de les infeccions de *P. mediterraneus* al medi natural es van determinar a l'escupinya gravada, l'ostra i la nacra a partir de les dades obtingudes dels assaigs RFTM. No es tenen en compte la resta d'espècies perquè, o bé sols s'han pres mostres puntualment (musclo, rossellona) o s'han agafat exclusivament durant els mesos de major prevalença (*M. varia*, *Lima lima* i *Limaria inflata*). El grau d'infecció i la prevalença s'incrementen després del màxim anual de temperatura de l'aigua, principalment per setembre i octubre, per anar desapareixent segons es refreda aquesta (Fig. 33).

L'observació de les preparacions histològiques de romera obtingudes en els mostreigs dels anys 2009 i 2010 recolzen els resultats dels assaigs RFTM (Fig. 34). El nombre d'individus infectats augmenta per setembre i octubre, mentre que la resta de l'any, es troben pocs individus infectats.

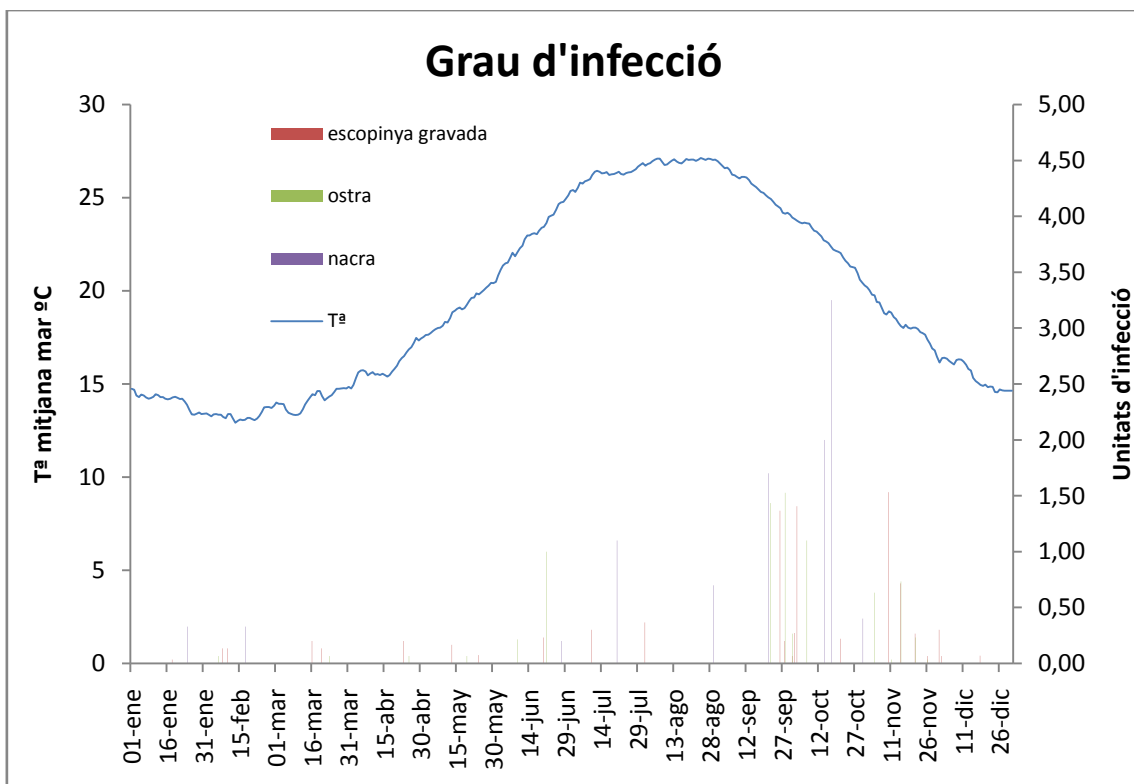
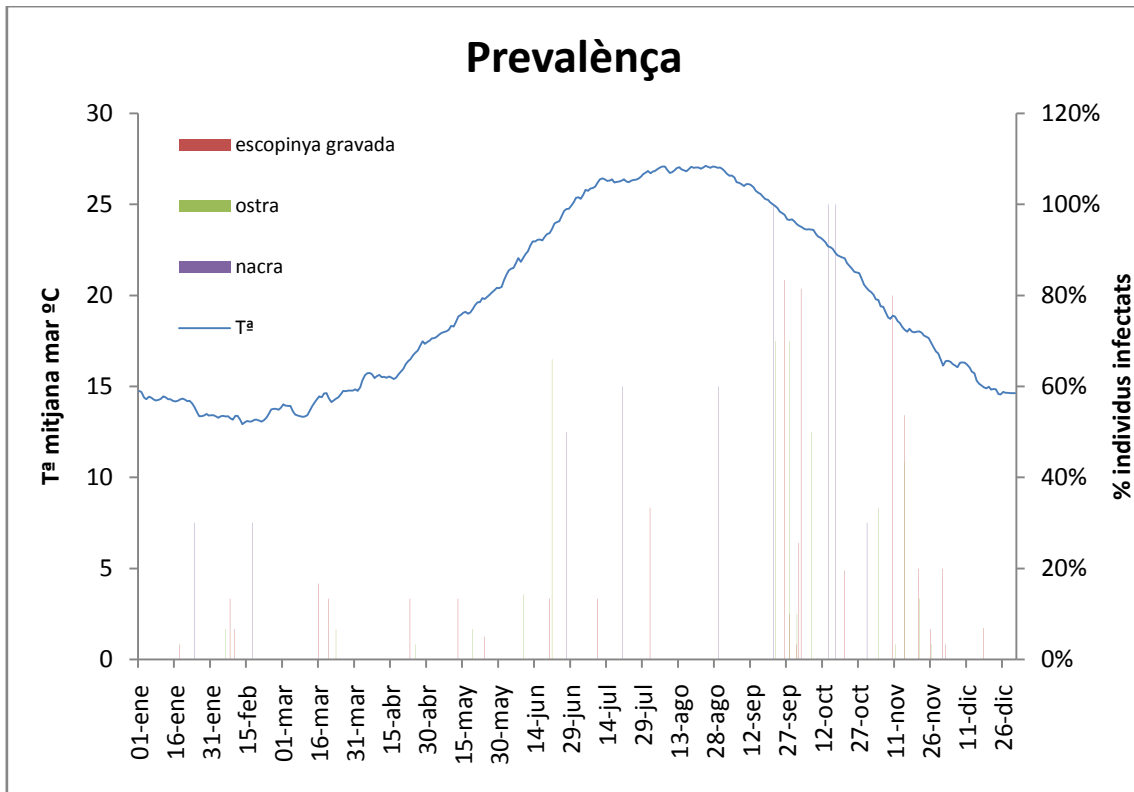


Figura 33. Esquema anual de prevalença d'infecció i grau d'infecció de *P. mediterraneus*, basat en la informació obtinguda dels assaigs RFTM. Es representa a l'eix principal d'ordenades la temperatura mitjana de l'aigua del mar entre 2007 i 2013, mentre que al secundari es representen la prevalença o el grau d'infecció de l'escopinya gravada, l'ostra i la nacra.

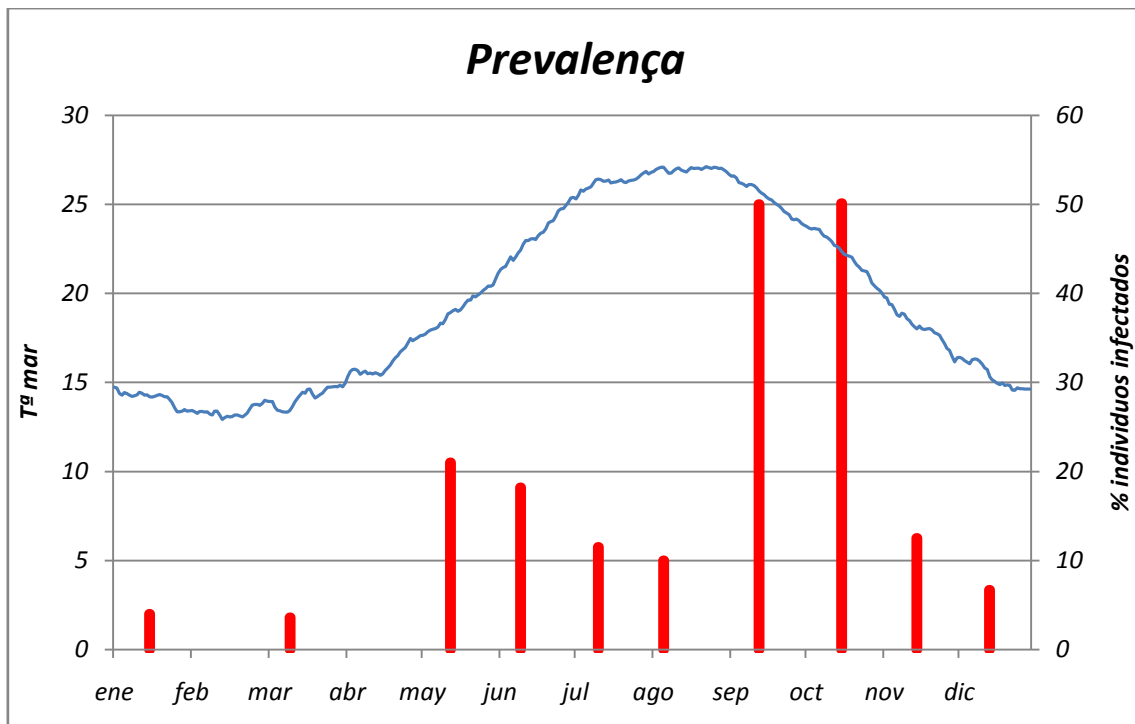


Figura 34. Relació entre la temperatura mitjana del mar (ordenades, eix principal) i el percentatge de romeres infectades(ordenades, eix secundari) basat en l'observació de mostres histològiques.

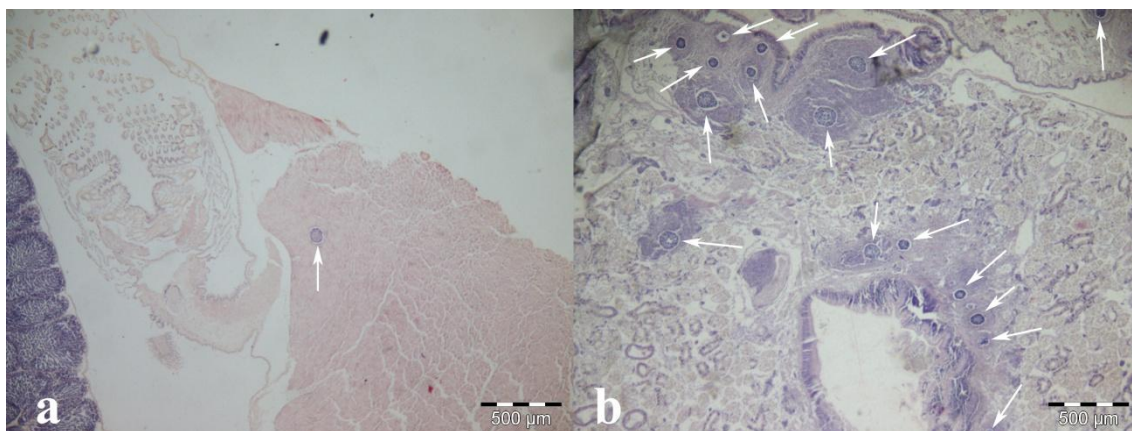


Figura 35. a) Infecció poc intensa de *P. mediterraneus* en *M. varia* (gener). Sols es va observar una roseta a tot l'individu (fletxa). b) Infecció intensa (octubre) on s'observen 15 rosetes (fletxes). A aquesta preparació histològica es van contar 54 rosetes en total.

A més, s'ha observat que els individus infectats en setembre i octubre presenten més rosetes de *Perkinsus mediterraneus* que els infectats en els mesos més freds. Mentre que hem comptat fins a un màxim de 54 rosetes a una preparació histològica de setembre, entre novembre i agost, el màxim de rosetes observades ha estat de 2 per tall histològic (Fig. 35).

Determinació de les mortalitats durant l'engreix de *Mimachlamys varia*.

Durant la prova d'estrès tèrmic es va controlar diàriament que no hi hagués interferències entre els romeres (introducció d'una valva d'un exemplar dins d'un altre). No va ser possible regular la temperatura del tanc núm 2. Les temperatures, finalment van ser: tanc L1, $18,1\pm 1,23^{\circ}\text{C}$; tanc L2, $21,85\pm 0,93^{\circ}\text{C}$; tanc L3, $21,42\pm 0,94^{\circ}\text{C}$; tanc L4, $24,7\pm 1,69^{\circ}\text{C}$ i tanc L5, $27,9\pm 1,83^{\circ}\text{C}$ (Fig. 37). La mortalitat va ser d'un exemplar en el tanc L1 i de dos en el tanc L3 (Fig. 36 i Taula 16). Les diferències de creixement entre els tancs no varen ser significatives, amb un increment mitjà de 1,52 mm de longitud màxima i 1,09 g de pes.

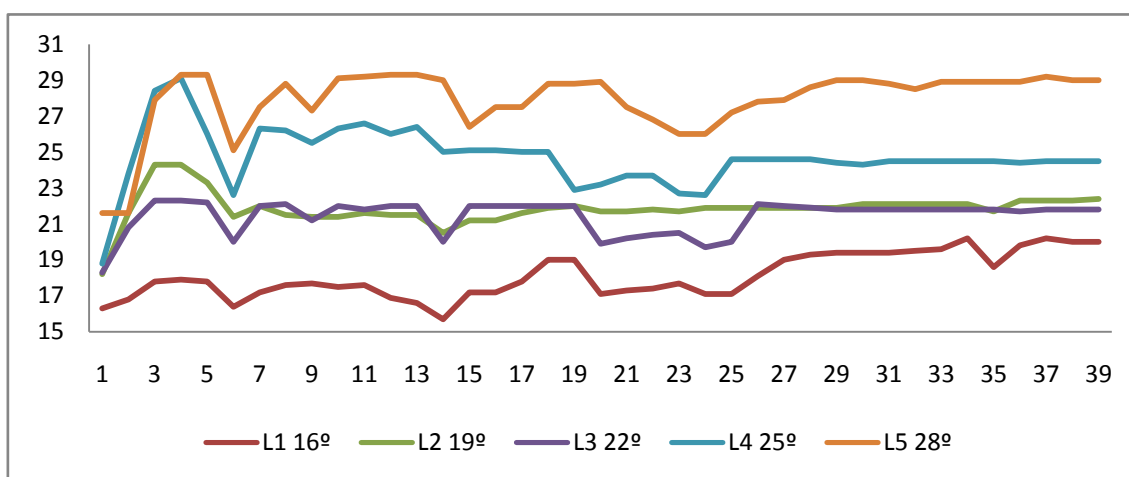


Figura 36. Medicions diàries de temperatura en els tancs d'engreix durant la prova d'estrès tèrmic.

Al final de la prova es van examinar histològicament 30 exemplars de cada tanc de cultiu, havent-hi una proporció directa entre increment de temperatura i prevalència, així com entre temperatura i nombre mitjà de trofozoïts (rosetes) als individus examinats (Taula 16).

Taula 16 Resum de l'experiència d'estrès tèrmic.

	L1	L2	L3	L4	L5
T_a (°C)	18,1±1,2	21,85±0,93	21,42±0,94	24,7±1,69	27,9±1,8
Mortalitat	1%		2%		
Creixement (mm)	1,03	1,06	1,09	1,13	1,12
Prevalença	6,6 %	10%	6,6%	16,6%	53,3%
Núm. trofozoïts per individu	1	1	1	1,42	5,78

En el cas de la prova d'interferència, que es va realitzar a l'hivern, a temperatura ambient ($16,1 \pm 0,51^\circ\text{C}$), el resultat obtingut va ser d'una mortalitat mitjana del $67,3 \pm 13,5\%$. Trenta individus es van examinar histològicament, presentant una prevalença del 3,3% amb un únic trofozoït observat.

Histologia.

De les mostres obtingudes a partir de 2010, setanta-sis preparacions histològiques provinents dels 167 positius a l'assaig RFTM es van observar amb un microscopi òptic (Taula 17). Només les infeccions de moderades a molt altes van ser visibles a les seccions histològiques d'*Ostrea edulis* i *Mimachlamys varia*. En el cas d'*Arca noae* també van detectar-se trofozoïts a les infeccions lleus.

Els trofozoïts van mesurar entre 3,7 i 18,2 μm , amb una mida mitjana de $9,7 \pm 3,69 \mu\text{m}$ ($n = 885$).

Taula 17. Resultats de la revisió histològica dels positius detectats mitjançant incubació en RFTM (medi tioglicolat Fluid de Ray)

Espècie	Localitat	Positius en RFTM	Negatius en histologia	Positius en histologia
<i>Ostrea edulis</i>	Palmanova	4	4	0
	Badia de Fornells	8	7	1
	Port d'Andratx	8	6	2
<i>Mimachlamys varia</i>	Port d'Andratx	26	8	18
<i>Arca noae</i>	Port d'Andratx	22	10	12
<i>Chamelea gallina</i>	S'Arenal	6	6	0
	Total	76	53	23

L'examen histològic d'*Ostrea edulis* infectada va revelar la presència de trofozoïts esfèrics encapsulats al teixit connectiu de l'hoste, amb l'aparença d'anell típic de 4-7 μm de diàmetre, amb un gran vacúol i el nucli en posició perifèrica amb un nuclèol patent, a més d'alguna roseta incipient (Fig. 37a).

A les preparacions d'*Arca noae* i *Mimachlamys varia* infectades, es van veure fases multicel·lulars encapsulades (rosetes) al teixit connectiu de diferents òrgans (glàndula digestiva, brànquies, mant i gònades) envoltats d'hemòcits o per material fibrós (Fig. 37b,d).

Aquestes rosetes poden ser empaquetaments laxos (Fig. 37d), envoltats (Fig. 37c) o no per una paret i en aquest cas, els trofozoïts adopten formes esfèriques o semiesfèriques,

mentre que en empaquetaments densos, els trofozoïts adopten formes allargades (Fig. 37b,d).

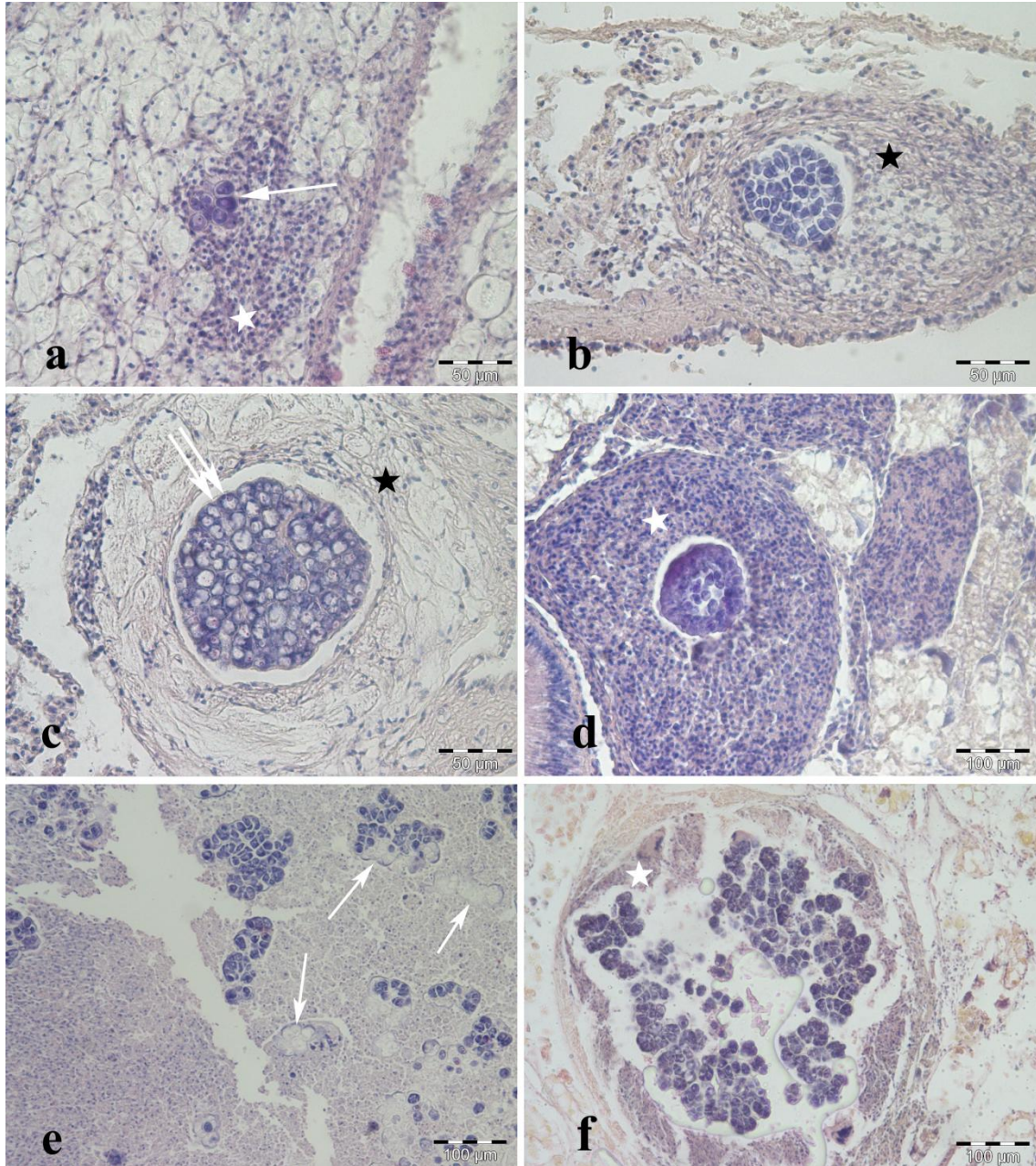


Figura 37. a) Trofozoïts (indicats per una fletxa) de *Perkinsus mediterraneus* en *Ostrea edulis* 40x; b) etapa multicel·lular de *P. mediterraneus*, resultat de la multiplicació vegetativa dels trofozoïts, que donen lloc a una roseta (cist) en *Arca noae* envoltada per material fibrós (estel) 40x; c i d) Cist en *Mimachlamys varia*; la doble fletxa assenjala la paret, l'estel negre l'embolcall de material fibrós i el blanc, un granuloma d'encapsulació 40x i 20x respectivament; e) Infecció intensa en *M. varia*. Les fletxes indiquen trofozoïts moribunds 20x; f) Empaquetament poc dens de *P. mediterraneus* en *M. varia* 20x. Tinció hematoxilina-eosina.

En ambdós casos, els trofozoïts presenten un gran vacúol central, el nucli perifèric amb un nuclèol i en ocasions, es pot apreciar un vacuoplast (Fig. 37). El nombre de trofozoïts

en les rosetes ha estat variable, contant-se més de 135 en una mostra histològica de *M. varia*.

No es van observar trofozoïts o rosetes en les preparacions histològiques de *Chamalea gallina* ni en *Pinna nobilis*.

Amplificació per PCR i anàlisi de restricció.

Els positius obtinguts després del cultiu en medi fluït de tioglicolat de Ray (RFTM) es van amplificar mitjançant PCR. Per determinar l'espècie de *Perkinsus* que infectava els mol·luscs es va emprar la clau taxonòmica descrita en Abollo *et al.* (2006) (Fig. 38). El parell d'encebadors PerkIts van produir amplicons d'aproximadament 700 pb de la regió ITS (Fig. 38a). Per determinar l'espècie de *Perkinsus*, els fragments amplificats es varen digerir amb enzims de restricció.

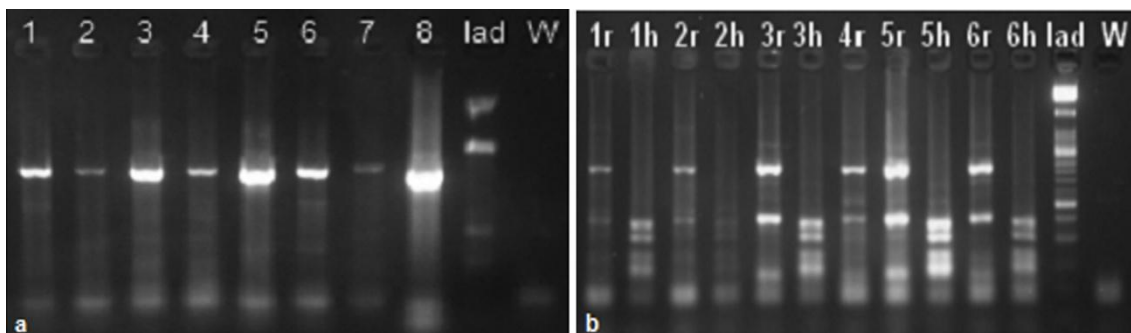


Figura 38. Patrons dels productes de PCR obtinguts d'ostres infectades amb *Perkinsus* spp. a les Balears i de la digestió amb enzims de restricció. (a) Productes de PCR. Línees 1 a 7: Fornells; Línia 8: control positiu de *P. mediterraneus*; lad: Roche molecular weight marker XIII; W: control negatiu. (a) Patrons de RFLP dels productes de PCR obtinguts. Els nombres de les línees es corresponen amb els de (a) r: digestió amb *RsaI*; h: digestió posterior amb *HinfI*.

Els patrons de restricció obtinguts amb l'enzim *RsaI* ens permeten distingir entre *P. cheasapeaki*, *P. marinus* i *P. olseni/P. mediterraneus*. El resultat obtingut a totes les mostres va ser dues bandes d'aproximadament 193 i 74 pb més un fragment d'aproximadament 400-410 pb que s'ajusten al patró de *P. olseni/P. mediterraneus*. Per diferenciar entre aquestes espècies es va realitzar una digestió amb l'enzim *HinfI*. El patró obtingut a totes les nostres mostres amb aquesta digestió subsegüent va ser quatre fragments, un doblet de 192-179 i un altre de 162-149 pb, típic de *P. mediterraneus* (Fig. 38b).

Anàlisi de seqüències.

Les seqüències de nucleòtids de la regió ITS obtingudes en aquest estudi (N=51) es van remetre al GenBank amb els números d'accés KJ569310 fins a KJ569360 (Fig 39) :

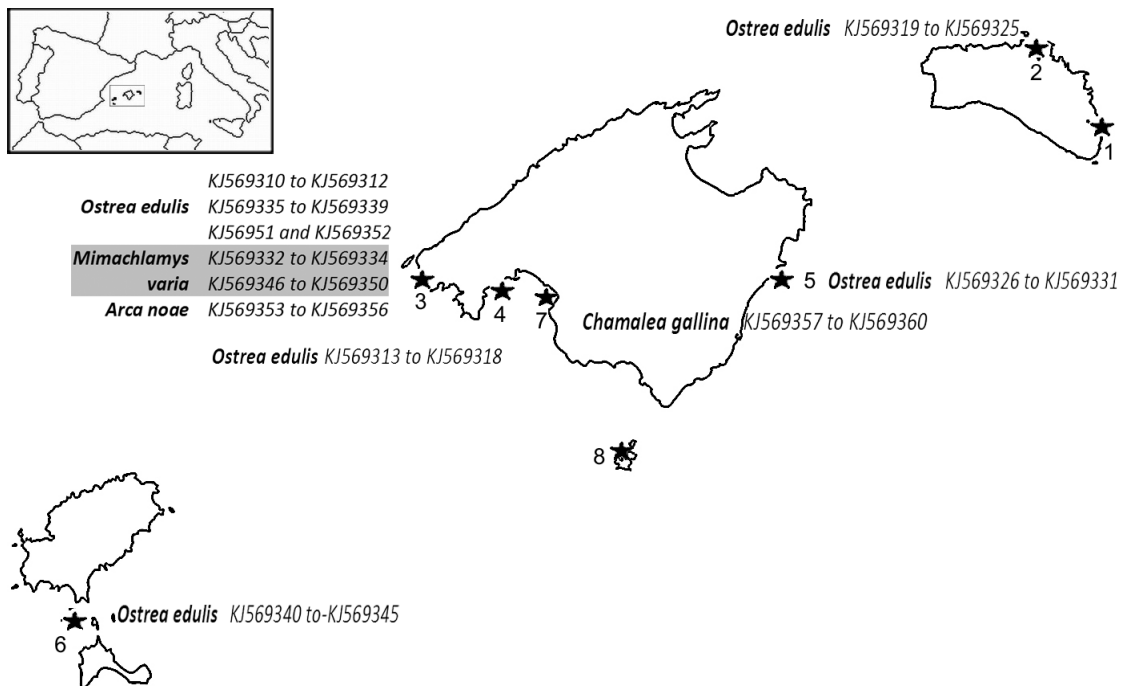


Figura 39. Nombre d'accés, espècie infectada i localització de les seqüències de *Perkinsus mediterraneus* obtingudes: 1, Port de Maó; 2, Fornells; 3, Port d'Andratx; 4, Palmanova-Magalluf; 5, Porto Cristo; 6, Freu d'Eivissa-Formentera, 7, s'Arenal de Palma i 8, Cabrera.

Es van detectar dotze haplotips diferents entre els 51 individus de *P. mediterraneus* seqüenciats (diversitat d'haplotips, Hd = 0,646 ± 0,075) (Taula 18). L'haplotip més freqüent (anomenat H03) es va trobar a 30 individus i es va observar a totes les espècies i localitats. La diversitat nucleotídica va ser baixa (π) (0,00171 ± 0,00029), amb vuit posicions polimòrfiques (totes transicions): 300, 333, 374, 385, 409, 410, 492 i 574. La transició més freqüent es produeix a la posició 374 (9 individus, G→A), la segona a la 385 (6 individus, T→C) i la tercera a la 574 (5 individus, C→T).

Afegint les 21 seqüències del GenBank (nombres d'accés: DQ370482 a DQ370492 i AY487834 a AY487843), obtingudes en *O. edulis* del port de Maó, es completa el nombre d'haplotips trobats a l'espècie fins ara. Aquests seqüències mostraren 15 haplotips diferents, tres d'ells en comú amb els observats al present estudi: haplotip 3 (a 5 d'aquestes 21 seqüències) i haplotips 6 i 7 (cada un a un individu). El conjunt de les

seqüències va mostrar un total de 20 posicions polimòrfiques (18 transicions i 2 transversions): 49, 83, 94, 98, 242, 300, 333, 358, 371, 374, 385, 409, 410, 425, 448, 492, 563, 574, 611 i 619. La transició més freqüent se produeix en la posició 374 (G→A, 13 individus), la segona es dona a la 385 (T→C, 11 individus), i la tercera a la posició 333 (T →C, 8 individus) (Taula 18).

Taula 18. Posicions dels nucleòtids polimòrfics de les seqüències ITS1-5.8S-ITS2 de *Perkinsus mediterraneus* dels mol·luscs recol·lectats a les Illes Balears. L'haplotip més freqüent, el nombre 3, va ser utilitzat com a base. Les transversions s'indiquen com a columnes grises i les transicions, en blanc. Els haplotips 1 a 12 es van obtenir a partir de les seqüències obtingudes en aquest treball. Del 13 a 24, a partir de seqüències dipositades al Genbank.

Haplotips	ITS1				5.8S	ITS2										Núm d'individus infectats	O. edulis Port d'Andratx	O. edulis Palmanova	O. edulis Badia de Fornells.	O. edulis Porto Cristo	O. edulis Ibiza-Formentera	M. varia Port d'Andratx.	A. noae Port d'Andratx.	C. gallina Platja de s'Arenal	O. edulis Port de Maó (GenBank)												
	4	8	9	9	2	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4											4	5	5	6	6							
1												A	C	C									1	1													
2																																					
3	A	T	T	T	T	T	C	T	G	G	T	T	C	C	T	A	T	C	G	G			35	4	4	5	5	4	4	2	2	5					
4													C										2		1			1									
5												C											2		1			1									
6													C										3	1		1									1		
7						C	T								G								2			1									1		
8											A												5	1		1	2			1							
9											A	C											2	1				1									
10																				T			3	1					2								
11							T					C											1	1													
12							T				A												1							1							
13	T															C							1												1		
14										A	C		T										2														2
15	C						C	T							G					A			1													1	
16							C	T							G					A			2													2	
17							C	T	C						G								1													1	
18			C																				1													1	
19	T	C																					1													1	
20									A				C										T	1												1	
21	T				C				A											C			1												1		
22	T								A	C		T											T	1												1	
23	T										C												1													1	
24	T								A	C		T	T										1													1	

Totes les seqüències de *Perkinsus* spp. obtingudes mostraren una identitat del 97-100 % amb l'ADN de la regió ITS de *P. mediterraneus*. Els resultats augmentaren la identitat al 99-100 % quan es van eliminar les seqüències amb els nombres d'accés EU068099 i EU068097, que són més divergents.

La figura 40 mostra el gràfic TCS de totes les seqüències de *P. mediterraneus*. L'haplotip 3 (H03) ocupa una posició central; els altres haplotips deriven d'aquest, amb un màxim de sis passes mutacionals. Podem observar que els haplotips H15, H16 i H17 (del port de Maó, GenBank) i H07 (que es troba a Maó i Porto Cristo) s'agrupen. Els haplotips H22 i H24 s'agrupen i deriven de H14, tot tres de Maó.

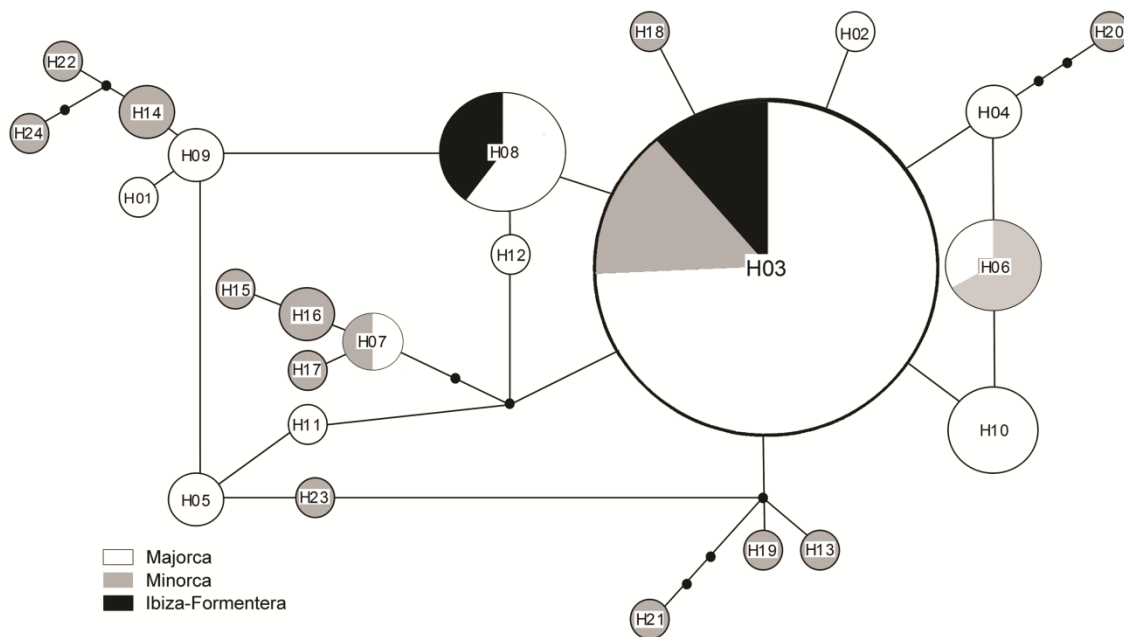


Figura 40. Xarxa d'haplotips de la regió espaciadora de l' ITS de *P. mediterraneus*, obtinguda mitjançant el programari TCS, amb un límit de connectivitat del 95%. Cada línia representa una mutació simple. Els haplotips inferits que no s'han mostrejats, es mostren com a punts negres sobre els segments. La mida del cercle es proporcional a la freqüència de l'haplotip.

El NJ i l'arbre Baiesià basats en las seqüències de la regió ITS (Fig. 41 i 42) agrupen clarament les diferents espècies de *Perkinsus* (*P. olseni*, *P. marinus*, *P. mediterraneus*, *P. honshuensis*, *P. beihaiensis*, *P. chesapeaki* i *P. qugwadi*) en distints clades recolzats per elevats valors de *bootstrap* (62-100%). A més, dins del clade de *P. mediterraneus*, el NJ va revelar l'existència dels dos grups descrits a l'anàlisi de TCS, un incloent els haplotips H07, H15, H16 i H17 (84 % de *bootstrap*) i el segon incloent dos haplotips del port de Maó H22 i H24 (69 % *bootstrap*). El NJ també detecta un tercer grup amb els haplotips 6 i 10 (63 % de *bootstrap*), però que no apareixen al TCS o a l'arbre Bayesià.

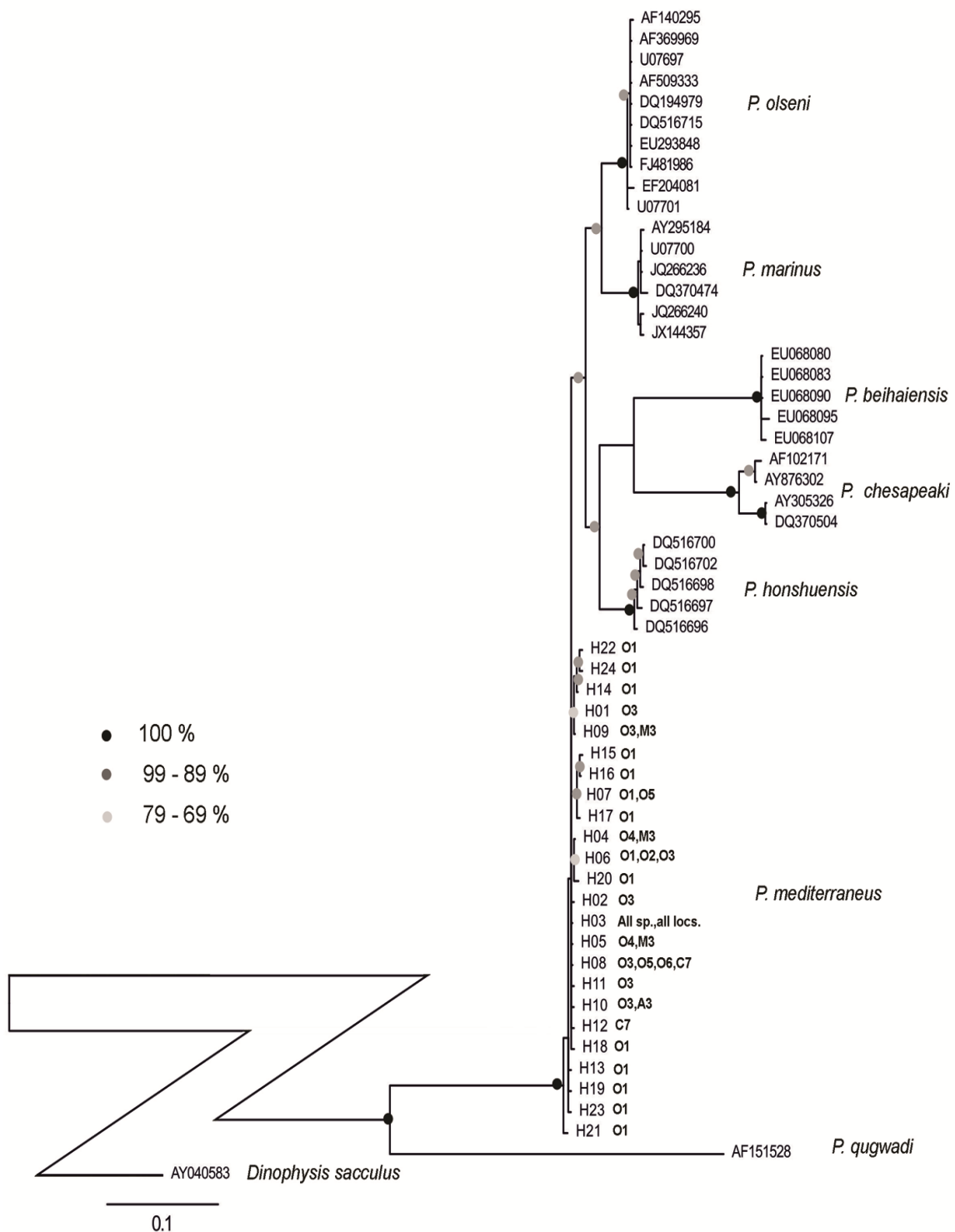


Figura 41. Arbre filogenètic obtingut mitjançant l'anàlisi Bayesià de la seqüència ITS de *Perkinsus mediterraneus* i altres *Perkinsus*. El suport de les probabilitats "a posteriori" es mostren en els nodes i sols es mostren els valors superiors al 69%. Per a *P. mediterraneus* s'indiquen els haplotips (H1 a H24); les lletres indiquen l'espècie de bivalve i el nombre, la localitat. O, *O. edulis*; M, *Mimachlamys varia*; A, *Arca noa*; C, *Chamelea gallina* i All sp., totes les espècies. 1 Port de Maó, 2 Badia de Fornells, 3 Port d'Andratx, 4 Palmanova, 5 Porto Cristo, 6 Ibiza-Formentera, 7 Platja de s'Arenal, All locs, totes les localitats. La barra d'escala indica el nombre de substitucions per lloc.

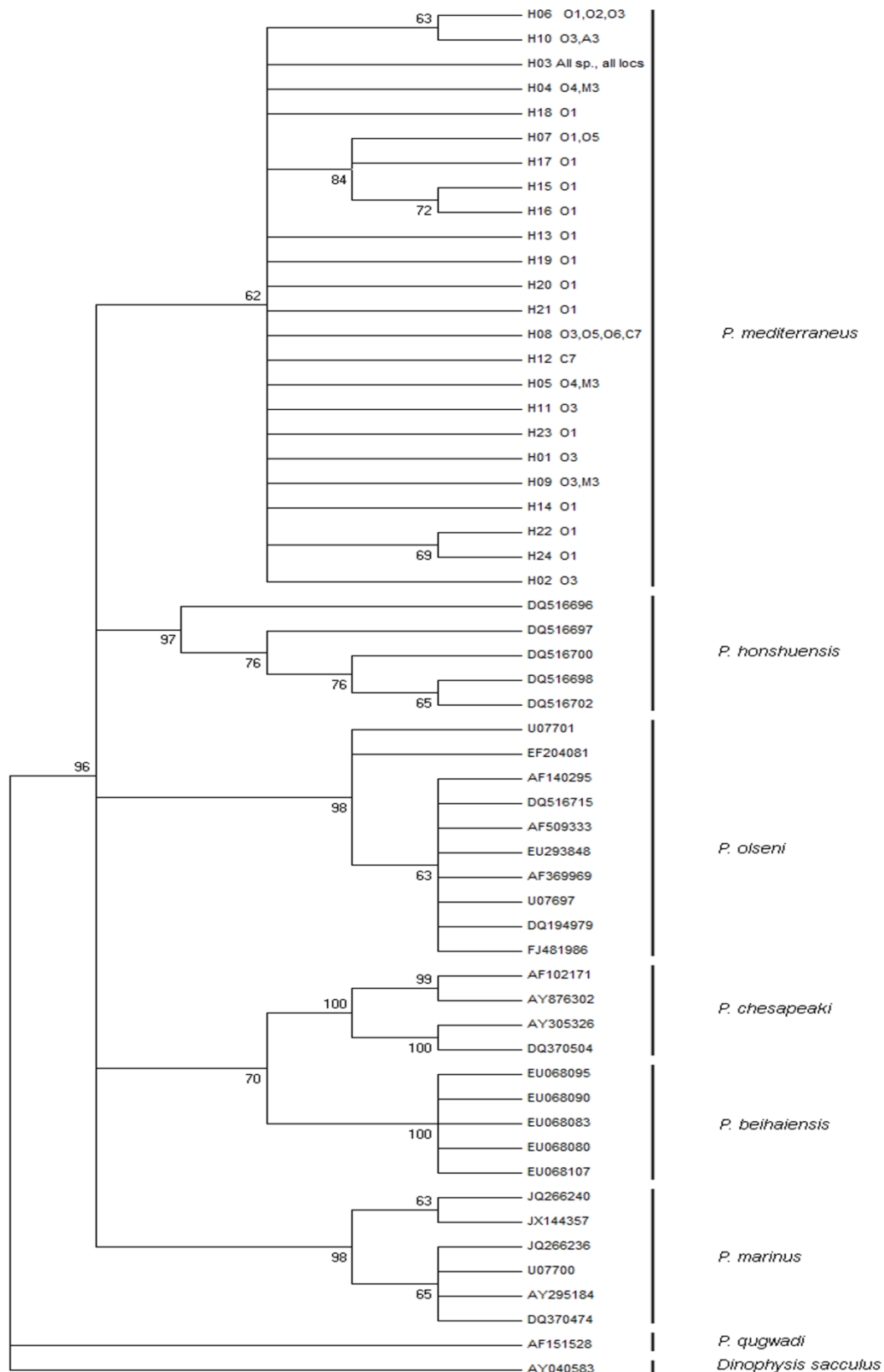


Figura 42. Arbre neighbor-joining (NJ) obtingut de l'anàlisi de l'ITS de *Perkinsus* spp. Els valors de bootstrap superiors al 60% es mostren a les branques. Per a *P. mediterraneus* s'indiquen els haplotips (H1 a H24); les lletres indiquen l'espècie de bivalve i el nombre, la localitat. O, *O. edulis*; M, *Mimachlamys varia*; A, *Arca noae*; C, *Chamelea gallina* i All sp., totes les espècies. 1 Port de Maó, 2 Badia de Fornells, 3 Port d'Andratx, 4 Palmanova, 5 Porto Cristo, 6 Ibiza-Formentera, 7 Platja de s'Arenal, All locs, totes les localitats.

L'anàlisi d'AMOVA va mostrar un valor de F_{ST} (Índex de fixació) del 0,042, amb un valor de P igual a $0,028 \pm 0,005$. L'AMOVA va determinar que un 4,14 % de la variabilitat genètica està associada a diferenciació entre poblacions, mentre que un 95,86 % s'atribueix a variació intrapoblacional (Taula 19).

Taula 19. Anàlisi molecular de la variància (AMOVA) usant les seqüències de l'ITS de *P. mediterraneus*. g.l., graus de llibertat; SSD, suma de les desviacions quadràtiques, CV, components estimats de la variància.

Font de variabilitat	g.l	SSD	CV	% de variància
Interpoblacional	2	4,017	0,04614	4,14
Intrapoblacional	69	73,622	1,06699	95,86
Total	71	77,639	1,11313	
Índex de fixació $F_{ST} = 0,04145$			P-valor = $0,02835 \pm 0,00543$	

La comparació entre les poblacions (*pairwise difference*) ofereix un valor significatiu entre les poblacions de Menorca (Maó i Fornells) i les de Mallorca (Andratx, Palmanova, Porto Cristo i s'Arenal), amb un valor de F_{ST} de 0,56 i de $P < 0,01$ (Taula 20).

Taula 20. Comparació aparellada entre poblacions. Sobre la diagonal es mostren els valors de P i davall, els valors de l'índex de fixació (F_{ST}) basats en 1000 permutacions.

	Mallorca	Menorca	Eivissa
Mallorca		0,00684±0,0027	0,64258±0,0155
Menorca	0,05622		0,45801±0,0179
Eivissa	-0,02871	-0,00416	

Els valors de F_{ST} obtinguts en les comparacions amb la població d'Eivissa no varen ser significatius, probablement per la baixa quantitat de mostres obtingudes a aquesta illa.

DISCUSSIÓ.

Els resultats obtinguts demostren que *Perkinsus mediterraneus* infecta a una gran varietat de mol·luscs bivalves a l'arxipèlag balear: ostres, romeres, peus de cabrit, rossellones, nacres (seqüència obtinguda posteriorment, que coincideix amb l'haplotip H03) i escopinyes gravades. En el cas dels musclos no varem detectar infeccions, el mateix que succeeix a altres indrets, com la llacuna de St. Gilla, Sardenya (Culurgione *et al.* 2006). Posteriorment, s'ha ampliat el nombre d'indrets del Mediterrani occidental afectats per *P. mediterraneus*, trobant-se mitjançant ISH a *O. edulis* al Golf de Manfredonia (sud d'Italia) i mitjançant PCR-RFLP a ostres i a *M. varia* d'Alacant (est d'Espanya) (Ramilo *et al.* 2015).

La perkinsosis és una greu amenaça per als cultius de bivalves a tot el món, amb dramàtiques conseqüències a molts indrets. Encara que es va trobar la presència de *P. mediterraneus* a les nostres mostres, no es van registrar mortalitats, tal i com succeeix amb altres espècies de *Perkinsus* a *Ruditapes decussatus* i *Cerastoderma glaucum* (Culurgione *et al.* 2006); amb *P. olseni* i *P. cheasapeaki* a cloïsses procedents de França (Arzul *et al.* 2012) i amb *P. marinus* a *Crassostrea corteziensis* en Mèxic (Escobedo-Fregoso *et al.* 2015). En el cas de *P. marinus* les diferències al seu impacte sobre els mol·luscs bivalves s'associen amb:

1. Les variacions en els factors ambientals (Oliver *et al.* 1998),
2. La virulència entre els diferents genotips de *P. marinus* (Bushek i Allen 1996), i
3. La variabilitat genètica entre els diferents estocs d'ostres, que poden conduir a diferències a la resistència a *P. marinus* (Encomio *et al.* 2005).

Una combinació d'aquests factors podria explicar la resistència a la infecció de *P. mediterraneus* dels bivalves analitzats a aquest estudi.

Un altre factor a tenir en compte és l'efecte de l'exposició a fitoplancton tòxic d'individus infectats, la qual cosa provoca una disminució de la resposta immunitària dels hostes (Hegaret *et al.* 2007, 2009, da Silva *et al.* 2008a). Encara que la productivitat natural del port de Maó és elevada, els recomptes de fitoplancton que es fan des dels anys 90, dins del marc del control de les zones de producció de mol·luscs bivalves a les Illes Balears, han detectat molt pocs episodis de proliferacions d'algues tòxiques i no ha hagut informes sobre mortalitats anòmales que es poguessin atribuir a *P. mediterraneus*.

A aquesta investigació exposam dades relatives a la prevalença de *P. mediterraneus*, que es semblant a la d'altres espècies de *Perkinsus* (Dungan *et al.* 2002, Culurgioni *et al.* 2006, Park *et al.* 2006, Sabry *et al.* 2009, Da Silva *et al.* 2013, Escobedo-Fregoso *et al.* 2015). La prevalença màxima fou del 100% en *Mimachlamys varia* (octubre de 2013) al port d'Andratx i *Pinna nobilis* (Cabrera, setembre de 2011 i port d'Andratx i Magalluf, octubre de 2011). El mínim (excloent *Mytilus galloprovincialis*, que sembla ser no susceptible a la infecció) fou del 0 % en *Chamelea gallina*, *Ostrea edulis*, *Pinna nobilis* i *Venus verrucosa*. La no infecció es detecta preferentment als mesos més freds. En aquest sentit, la dinàmica de la infecció per *Perkinsus mediterraneus* és similar a la de *P. marinus* en la badia de Chesapeake, amb valors màxims de detecció del paràsit a ostres al setembre i octubre, després del màxim estival de temperatura, i regressió de la infecció a l'hivern, segons la temperatura de l'aigua va baixant. Aquesta disminució de la prevalença a l'hivern es deu a la regressió de la infecció, i a la persistència del paràsit a nivells indetectables amb les tècniques estàndard de diagnòstic (Ragone i Burreson 1994, Burreson i Ragone Calvo 1996). La prevalença és superior als individus amb més d'1 any d'exposició al patogen (Andrews 1996, Burreson i Ragone Calvo 1996, Soniat 1996, Powell *et al.* 1997, Park *et al.* 1999, Park i Choi 2001, Villalba *et al.* 2005). En el cas de *C. gallina* els individus recollits a la platja de s'Arenal tenien una mida de $20,4 \pm 0,816$ mm, fet que indica que la seva edat n'és aproximadament un any (Vizuet *et al.* 1993). Aquesta és probablement la causa de la baixa prevalença i grau d'infecció d'aquesta població.

La detecció rutinària de les infeccions de *Perkinsus* spp. als mol·luscs es fa amb l'assaig RFTM. L'ús de mètodes histològics per detectar aquestes infeccions és poc fiable perquè l'especificitat del mètode histològic és baixa. La sensitivitat és bona per a infeccions moderades i intenses, però és baixa per infeccions lleus, com hem apreciat a les nostres mostres (OIE 2015). Amb finalitat diagnòstica *P. mediterraneus* pot detectar-se mitjançant PCR-RFLP. Aquesta metodologia proporciona perfils de restricció compatibles amb *P. mediterraneus* en totes les àrees investigades i espècies de bivalves. Diversos estudis informen de l'èxit amb l'ús dels fragments de la regió rADN-ITS als anàlisis filogenètics per al diagnòstic molecular de les diferents espècies de *Perkinsus* (Brown *et al.* 2004, Burreson *et al.* 2005, Casas *et al.* 2002a, 2004, Dungan i Reece 2006, Moss *et al.* 2008, Sabry *et al.* 2009, Sanil *et al.* 2012). Al present estudi, ambdós mètodes mostraren la mateixa eficiència en la identificació de *P.*

mediterraneus. No obstant això, el RFLP per si mateix podria no identificar correctament l'espècie, especialment per a un possible nou membre del gènere *Perkinsus*. Per tant, la seqüenciació del fragment ITS ha demostrat ser molt útil per assignar les diferents espècies de *Perkinsus* i per a la detecció de la variabilitat genètica.

En base a la variabilitat genètica observada, les topologies dels arbres filogenètics mostraren una estreta relació entre totes les espècies de *Perkinsus*, encara que cada una d'elles formen un grup monofilètic. Com també s'indica a la bibliografia, les seqüències de la regió ITS suggereixen que *P. mediterraneus* s'agrupa estretament amb *P. honshuensis*, *P. olseni* i *P. marinus*. *P. qugwadi* és el més divergent mentre que *P. chesapeaki* i *P. beihaiensis*, que són les espècies més similars entre si, es troben intermèdies (Casas *et al.* 2002b, Villalba *et al.* 2004, Moss *et al.* 2008) .

Les distàncies aparellades (*pairwise*) entre els nostres 12 haplotips fou del 0,40 %. Aquest valor va augmentar a 0,60 % en incloure les seqüències de *P. mediterraneus* del GenBank. Aquests valors estan dins del rang de les variacions intraespecífiques observades dintre de les espècies de *Perkinsus* actualment acceptades (Moss *et al.* 2008). Aquests resultats recolzen el cicle de vida clonal típic d'aquests paràsits i descrits també a la literatura a altres espècies com *P. olseni* (Vilas *et al.* 2011). Els tres mètodes d'inferència filogenètica emprats a aquest estudi, el TCS, i els arbres NJ i Bayesià, detecten en conjunt tres grups diferents en *O. edulis* de Menorca que es diferencien d'altres llinatges coespecífics. L'AMOVA recolza aquesta diferenciació entre les poblacions de Menorca i Mallorca, la qual sembla atribuïble a l'aïllament geogràfic del port de Maó. Malgrat això, altres factors, com la variabilitat ambiental, diferents localitats i dates de detecció, la translocació d'animals, l'activitat humana, etc, poden tenir certa influència (Oliver *et al.* 1998, Bushek i Allen 1996, Encomio *et al.* 2005). En qualsevol cas, aquesta diferenciació indica qualque tipus d'aïllament d'aquestes mostres, i en aquest sentit, coneixem que a partir de 3 diferents cultius *in vitro* de *P. mediterraneus*, en concret PmG2, PmG3 i PmHt2, es varen obtenir 11 seqüències (GenBank nombres d'accés DQ-370482- DQ370492), 4 de les quals corresponen als haplotips H15, H16 i H17 (Abollo *et al.* 2006). És possible que les condicions *in vitro* afavoriren la diferenciació genètica (Dungan *et al.* 2002).

Recents investigacions (Ramilo *et al.* 2015), han demostrat l'existència de *Perkinsus mediterraneus* a altres indrets del Mediterrani occidental. En aquest sentit, les seqüències obtingudes a ostres i romeres de Santa Pola (Alacant), d'ostra al golf de

Manfredonia (Itàlia) i d'escupinya a Maó, presenten haplotips compatibles amb els obtinguts al nostre treball (en concret, H03, H04 i H06). No obstant això, a tres escupinyes gravades de Maó, han aparegut tres nous haplotips. Aquest resultat referma l'aïllament de les poblacions de l'illa de Menorca.

La regió ITS de l'ADN ribosomal té tres seqüències diferents (ITS1, 5.8S i ITS2). Es va trobar una major variabilitat a les regions ITS1 i ITS2 que a la 5.8S. Aquesta darrera regió presenta únicament una transició en l'haplotip 21. No podem descartar que aquestes diferències en la variabilitat podria ser també una conseqüència de la importància i el bon estat de conservació de la seqüència 5.8S als organismes.

Al present estudi no hem trobat co-infecció amb dues espècies de *Perkinsus*, encara que s'han descrit a la bibliografia: *P. marinus* i *P. chesapeakei* en les ostres *Crassostrea virginica* a la badia de Chesapeake (NE USA)(Pecher *et al.* 2008, Reece *et al.* 2008); *P. marinus* i *Perkinsus* spp. a *C. virginica* (NE USA)(Pecher *et al.* 2008); *P. olseni* i *P. chesapeake-like* a *R. decussatus* de França (Arzul *et al.* 2012), o *P. olseni* i *P. mediterraneus* en *V. verrucosa* (Ramilo *et al.* 2010).

L'octubre de 2008, en una mostra de *Chamalea gallina*, mitjançant tècniques histològiques, vàrem trobar un organisme similar a *Perkinsus*, que posteriorment es va confirmar com *P. mediterraneus* (Moss *et al.* 2008).

Per una altra part, també l'any 2008 vàrem detectar una mortalitat anòmla de *M. varia* en el polígon de gàbies de les instal·lacions del LIMIA (Laboratori d'Investigacions Marines i Aqüicultura, depenent de la Conselleria de Medi Ambient, Agricultura i Pesca), on s'estaven engreixant. Per esbrinar els motius, es varen realitzar proves en tancs de cultiu, els resultats de les quals varen suggerir que aquesta mortalitat va ser per la manipulació (Trut *et al.* 1994, Cano *et al.* 2011), encara que es va trobar un elevat grau d'infecció per *P. mediterraneus* als individus mantinguts a 28°C (53,3 %).

No es va detectar disminució de les poblacions ni mortalitats anòmales a les altres localitats investigades per causa de *P. mediterraneus*, tal com també succeeix amb *P. olseni* i *P. chesapeakei* en les copinyes a França (Arzul *et al.* 2012), i per *Perkinsus* spp. en *Ruditapes decussatus* i *Cerastoderma glaucum* a Itàlia (Culurgione *et al.* 2006). Malgrat això, estan descrites mortalitats causades per la perkinsosi a diferents indrets del món i considerant la intensitat de la seva prevalença i grau d'infecció a les

poblacions de bivalves de les Illes Balears hauria d'establir-se un programa de monitoratge d'aquesta malaltia.

DISCUSSIÓ GENERAL.

A Balears, la principal producció de mol·luscs prové de l'aqüicultura del musclo, mentre que una petita part s'obté del marisqueig. Malgrat això, tenen una certa importància en la producció d'aliments per a les Illes. Uns dels principals limitacions a la que s'enfronta la producció de mol·luscs bivalves és la prevenció i control de malalties, en primer lloc, perquè és difícil detectar els primers símptomes i en segon lloc, perquè els mol·luscs sols disposen d'una immunitat innata (Medzhitov 2001) i no és possible desenvolupar vacunes. Per aquest motiu, la principal eina de prevenció és evitar la introducció de patògens, els quals es dispersen, principalment, pel moviment d'estocs.

A Espanya, les malalties de mol·luscs que han causat més greus perjudicis econòmics o són més preocupants des del punt de vista zoosanitari són: la marteiliosi, causada per *M. refringens* (Gutierrez 1997, Masso 1978) i *M. cochillia* (Carrasco *et al.* 2013, Villalba *et al.* 2014); la bonamiosi, tant per *Bonamia ostreae* (Polanco *et al.* 1984) com per *Bonamia exitiosa* (Abollo *et al.* 2008, Carrasco *et al.* 2012); la perkinsosi, causada per *P. olseni*, *P. mediterraneus* i *P. chesapeakei* (Casas *et al.* 2004, Abollo *et al.* 2006, Elandaloussi *et al.* 2009, Valencia 2010, Ramilo *et al.* 2010, Carrasco *et al.* 2014, Valencia *et al.* 2014, Ramilo *et al.* 2015); l'herpesvirosi dels ostreïds microvariant 1 (da Silva *et al.* 2008b), i les causades per *Xenohaliotis californiensis* (Balseiro *et al.* 2006) i *Haplosporidium montforti* (Azevedo *et al.* 2006).

Anàlisi histopatològic

A les Balears, els primers estudis epidemiològics, realitzats entre 1994 i 1995 i basats en tècniques histològiques, varen detectar la presència, en ostra, de fases larvàries de *Bucephalus haimeanus* (Trematoda), *Marteilia refringens* (Paramyxea), protozous ciliats i *Perkinsus* spp. (Perkinsozoa), que, posteriorment, va ser identificat com a una nova espècie, *P. mediterraneus* (Casas *et al.* 2004). En el cas dels musclos, varen trobar *Marteilia refringens*, *Mytilicola intestinalis* (Artropoda) i metacercàries de tremàtodes. (Furones *et al.* 1995), conclouent que l'estat sanitari dels mol·luscs bivalves del port de Maó era bo.

Entre 1999 i 2000, vàrem executar un projecte sobre les malalties dels mol·luscs bivalves al port de Maó, emprant tècniques histològiques i RTFM. Amb aquest estudi, vàrem confirmar que tant els musclos com les ostres estan infectats durant tot l'any per

M. refringens. La presència d'aquesta espècie és una greu amenaça per a les ostres, doncs produeix desordres fisiològics que poden matar a l'hoste (Alderman 1979, Grizel *et al.* 1974, Audemard *et al.* 2001), que afecten sobretot a individus de més de dos anys d'edat (Villalba *et al.* 1993a, Audemard *et al.* 2001) i els causa la mort durant el segon any després de la infecció inicial (Alderman 1979, Grizel 1985). En el cas dels humans, no causa cap efecte. Probablement, als anys 80, la desaparició gairebé completa dels bancs ostrícoles a les Balears es deu a aquesta malaltia (Grau, A., comunicació personal). Els musclos estan menys afectats per la infecció, encara que s'han descrit mortalitats fins un 40% a llocs afectats (Berthe *et al.* 2004, Villalba *et al.* 1993a) i els musclos que no havien tingut contacte previ amb la infecció varen presentar una mortalitat del 100% després de cultivar-los durant 6 mesos en una àrea infectada (Thébault *et al.* 1999). Durant l'estiu de l'any 2005 es va produir una mortalitat anòmala als musclos del port de Maó, però l'examen histològic d'individus aparentment sans i moribunds, va descartar la presència de *M. refringens*. A aquest cas, la mortalitat la vàrem atribuir a les elevades temperatures i a la sembra de musclos provinents d'aigües més fredes (Galícia). Tenint en compte que no hi ha hagut cap mortalitat de musclos associada a *M. refringens* a les muscleres del port de Maó, consideram que no és una greu amenaça per als musclos, però cal continuar amb la vigilància.

Els esporocists i cercàries de *Bucephalus haimeanus* s'observen exclusivament en ostra plana durant els mesos d'hivern. La infestació dels bivalves amb esporocists i metacercàries de bucephàlids causen castració i debilitat (Lauckner 1983), encara que a les nostres mostres no hem trobat lesions d'importància associades a *B. haimeanus*, per la qual cosa no consideram que siguin un risc, tenint en compte que sols s'han observades durant l'hivern i que la posta de l'ostra es fa durant maig i juny, amb una segona posta a la tardor.

Mytilicola intestinalis parasita als musclos (*M. edulis* i *M. galloprovincialis*) (Grainger 1951), encara que també afecta, entre altres espècies, a l'ostra (Baird 1951), tal i com succeeix al port de Maó. L'examen histoquímic del contingut intestinal de *M. intestinalis* va revelar que la dieta del copèpode és principalment herbívora, pel que presumiblement el copèpode s'alimenta dels continguts intestinals de l'hoste i no dels seus teixits (Moore *et al.* 1978). Per això, no consideram que *M. intestinalis* sigui un risc per als bivalves del Port de Maó.

Les metacercàries de tremàtodes detectades al peu dels musclos són relativament poc patogèniques. S'ha demostrat que l'exposició dels musclos a neurotoxines produïdes pel dinoflagel·lat *Alexandrium fundyense*, va causar un augment significatiu en l'aparició de metacercàries de la família Gymnophallidae en el teixit de l'hoste, que es considera oportunista, doncs aprofita la debilitat induïda per la toxina (Galimany et al. 2008). No podem descartar que aquesta sigui la causa de la seva presència als musclos del port de Maó, encara que són poc freqüents les floracions de dinoflagel·lats nocius. En el cas de les ostres, les infeccions per tremàtodes són també relativament poc patogèniques, per la qual cosa considerem que no són una amenaça per les ostres a Balears.

La perkinsosi és una malaltia epidèmica dels mol·luscs marins causada pels protozous paràsits del gènere *Perkinsus* a la qual se l'han associat mortalitats elevades de mol·luscs d'importància comercial (Andrews i Hewatt 1957, Mackin i Hopkins 1962, Lester i Davis 1981, Da Ros i Canonzier 1985, Azevedo 1989, Goggin i Lester 1995, Santmartí et al 1995, Burrenson i Ragone Calvo 1996, Ford 1996, Soniat 1996, Choi i Park 1997, Bower et al 1998, Park i Choi 2001). Els òrgans diana i els teixits infectats són l'epiteli del tub digestiu, teixit conjuntiu de tots els òrgans i els hemòcits (Mackin 1951). En el cas dels mamífers es produeix una resposta immune sense causar cap patologia (Wijayalath 2014).

Les espècies més sensibles a *Perkinsus* spp. solen morir entre 1 i 2 anys després de la infecció, durant o poc després del màxim anual de temperatura del mar (Burrenson i Ragone Calvo 1996). En el cas de les ostres i escopinyes gravades del Port de Maó, no s'han detectat mortalitats que puguin ser atribuïdes a *Perkinsus* spp. i sembla que el musclo no n'és parasitat.

Tècniques moleculars.

Marteilia refringens

La rossellona és una espècie que viu a la franja costera litoral, motiu pel qual, és molt sensible als canvis que es produeixen a aquesta, principalment com a conseqüència de factors meteorològics i oceanogràfics. Dos temporals, en 2001 i 2002, van produir una mortalitat massiva. Mortalitats massives similars associades a riades s'han documentat a l'Adriàtic (Frogliola i Fiorentini 1989, del Piero i Fornaroli 1998, Paolini *et al.* 1998, Prioli *et al.* 1998). En aquests casos la mortalitat s'explica per l'anòxia induïda als

sediments (Frogliola *et al.* 1998, del Piero 1998). Per recuperar el banc de la rossellona es va deixar de pescar, però no es va aconseguir el resultat esperat.

Per aquest motiu, com en qualsevol mortalitat anòmala, es varen recollir mostres, que es varen processar mitjançant tècniques histològiques per a la detecció de patògens. Durant l'observació dels talls histològics al microscopi òptic, vàrem trobar inclusions intracitoplàsmiques, que es podien correspondre amb diferents parasitemies com rickettsiosi, una marteiliasi o una bonamiasi.

Cal remarcar, que els individus afectats ultrapassaven la mida de 2 cm de longitud màxima, segons les observacions de camp. Com mai s'ha introduït llavors de mol·luscs a s'Arenal, l'agent infecció ja es trobava de forma natural. Sembla clar que les pressions antròpiques sobre els mol·luscs de la zona, especialment la pesca, els increments de temperatura de l'aigua (Frogliola 2000, Moschino i Marin 2006) han contribuït a la disminució de la resistència dels individus i l'episodi d'eutrofització de les aigües succeït l'any 2001 i 2002 pot haver estat decisiu per l'extensió de la infecció. La devolució dels individus de talla inferior a la mínima, estressats per les pràctiques d'arrossegament, també podria afavorir la dispersió de la malaltia. Malgrat això, l'adscripció al patògen causant no està clara mitjançant tècniques histològiques. Per aquest motiu es va recórrer a l'ús de tècniques biomoleculares.

El mètode emprat per la detecció del genoma de *Marteilia refringens*, a partir de mostres incloses en paraplàst inclou una amplificació prèvia i una PCR niada. La PCR prèvia incrementa els llocs d'unió pels encebadors emprats a la segona amplificació. Per tant, la PCR niada aporta una major sensibilitat que la PCR estàndard, doncs el segon parell de *encebadors* amplifica una segona diana present dins el producte amplificat de la PCR prèvia. S'ha emprat una combinació de PCR niada i PCR de cadena curta per superar la reducció de l'eficiència d'amplificació a la PCR estàndard, que es deu probablement a l'ampla degradació de l'ADN i la presència d'inhibidors de la PCR, freqüent en aquests tipus de mostres (Greer *et al.* 1991, Wilson 1997).

Així, la identificació del paràsit similar a *Marteilia* que infectava a *Chamelea gallina* fou possible després de l'amplificació d'un fragment del genoma del paràsit mitjançant una PCR niada i la comparació de la seva seqüència amb d'altres de *Marteilia refringens*. La seqüència obtinguda a partir del bloc de parafina va mostrar un 97,4% d'identitat amb les seqüències de *Marteilia refringens* aïllades de *Mytilus edulis* i *Solen marginatus* (*M. refringens* tipus M) i d'un 99,1 % de les d'*Ostrea edulis* (*M. refringens*

tipus O). Aquests resultats recolzen la presència de *M. refringens* (tipus O) en *C. gallina*.

La ubicació específica de les cèl·lules de *Marteilia refringens*, en els teixits de *C. gallina* es va determinar per hibridació *in situ*, emprant sondes d'ADN obtingudes a partir de *M. refringens* d'*Ostrea edulis*. La sonda Smart2, localitzada en el gen 18S ribosomal del paràsit, considerada específica a nivell del gènere *Marteilia* (Le Roux *et al.* 1999, Kleeman *et al.* 2002a), es va emprar com a control en l'anàlisi *in situ*, perquè les característiques morfològiques dels paràsits en les seccions histològiques es corresponien amb les descrites per al gènere *Marteilia*, confirmant així la infecció per aquest gènere. L'altra sonda utilitzada va ser els 358 pb del fragment d'IGS de *M. refringens* comprès entre els encebadors MT-1B i MT-2B. El senyal d'hibridació obtingut amb la sonda IGS va ser similar a l'obtinguda amb teixits parasitats d'*O. edulis*, mentre que no va ser observada cap senyal amb les cèl·lules de l'espècie relacionada, *M. sydneyi* de *Saccostrea commercialis*.

Tot això ha permès identificar al paràsit del sistema digestiu de *C. gallina* com *M. refringens*. Aquesta és la primera vegada que s'identifica *Marteilia refringens* en la rossellona. El mar Mediterrani es considera una àrea enzoòtica de *M. refringens*, de la qual s'ha comunicat que infecta a bivalves en la propera regió del Delta de l'Ebre (Durfort 1994, Bigas *et al.* 2000, Novoa *et al.* 2005, Carrasco *et al.* 2007a). La presència de diferents etapes conegudes de *M. refringens* a les cèl·lules de *C. gallina*, incloent la fase d' esporulació, suggereix que el paràsit és capaç de completar la infecció a aquesta espècie d'escopinya i, per tant, *C. gallina* ha de ser considerada com un nou hoste de *M. refringens*. Amb les mostres incloses en paraplàst no es pot establir una clara associació entre la infecció per *M. refringens* i la mortalitat de *C. gallina* a la Badia de Palma perquè només 3 de les 69 rossellones es van trobar infectades.

No obstant això, per determinar si l'agent causal de la depleció del banc de la rossellona és *M. refringens*, es van realitzar PCR amb encebadors específics (Le Roux *et al.* 2001). Al ser individus de mida petita (edat 0+ i 1+), la infecció, presumiblement, es trobava en la fase inicial (Villalba *et al.* 1993b, Audemard *et al.* 2001) i pel fet d'haver-les mantingut congelades, no es va recórrer a tècniques histològiques, ni per tant, a hibridació *in situ*. Tenint en compte que ja s'havia detectat la infecció en rossellona mitjançant histologia amb hibridació *in situ* i que la PCR amb encebadors específics es pot emprar tant per al diagnòstic provisional com pel confirmatiu (OIE 2015), se va

optar per aquest mètode, combinat amb RFLP. D'aquesta manera s'ha confirmat la presència de *M. refringens* en el 55,1% dels individus analitzats.

Perkinsus mediterraneus

Perkinsus mediterraneus infecta a una gran varietat de mol·luscs bivalves a l'arxipèlag balear: ostres, romeres, peus de cabrit, rossellones, nacres i escopinyes gravades. En el cas dels musclos, no vàrem detectar infeccions, el mateix que succeeix a altres indrets, com la llacuna de St. Gilla, Sardenya (Culurgione *et al.* 2006). Posteriorment, s'ha ampliat el nombre d'indrets del Mediterrani occidental afectats per *P. mediterraneus*, trobant-se mitjançant hibridació *in situ* a *O. edulis* al Golf de Manfredonia (sud d'Italia) i mitjançant PCR-RFLP a ostres i a *M. varia* d'Alacant (Ramilo *et al.* 2015).

La perkinsosis és una greu amenaça per als cultius de bivalves a tot el món, amb dramàtiques conseqüències a molts indrets. Encara que es va trobar la presència de *P. mediterraneus* a les nostres mostres, no es van registrar mortalitats, tot i que, l'any 2008 vàrem detectar una mortalitat anòmla a *M. varia* al polígon de gàbies de cultiu de les instal·lacions del LIMIA, que finalment va estar associada a la manipulació de les romeres (Trut *et al.* 1994, Cano *et al.* 2011), malgrat que els individus mantinguts a 28°C tenien un elevat grau d'infecció. Per tant, a les Illes Balears, la perkinsosi no finalitza en mortalitats, tal i com succeeix amb altres espècies de *Perkinsus* a *Ruditapes decussatus* i *Cerastoderma glaucum* (Culurgione *et al.* 2006); amb *P. olseni* i *P. cheasapeaki* a cloïsses procedents de França (Arzul *et al.* 2012) i amb *P. marinus* a *Crassostrea corteziensis* en Mèxic (Escobedo-Fregoso *et al.* 2013).

La prevalença de *P. mediterraneus* és semblant a la d'altres espècies de *Perkinsus* (Dungan *et al.* 2002, Culurgioni *et al.* 2006, Park *et al.* 2006, Sabry *et al.* 2009, Da Silva *et al.* 2013, Escobedo-Fregoso *et al.* 2013). La dinàmica de la infecció per *Perkinsus mediterraneus* és similar a la de *P. marinus* en la badia de Chesapeake, amb valors màxims de detecció del paràsit a ostres al setembre i octubre, després del màxim estival de temperatura, i regressió de la infecció a l'hivern (Ragone i Burreson 1994, Burreson i Ragone Calvo 1996). La prevalença és superior als individus amb més d'un any d'exposició al patògen (Andrews 1996, Burreson i Ragone Calvo 1996, Soniat 1996, Powell *et al.* 1997, Park *et al.* 1999, Park i Choi 2001, Villalba *et al.* 2005). En el cas de *C. gallina* els individus recollits a la platja de s'Arenal tenien una mida de $20,4 \pm 0,816$ mm, fet que indica que la seva edat n'és aproximadament un any (Vizuete *et al.*

1993). Aquesta és probablement la causa de la baixa prevalença i grau d'infecció d'aquesta població.

Perquè la histologia és poc sensible (OIE 2015), per a la detecció rutinària de les infeccions de *Perkinsus* spp. a nivell de gènere als mol·luscs, és més adequat l'assaig RFTM. Per a la distinció diagnòstica específica de *P. mediterraneus*, se pot emprar PCR-RFLP. Aquesta metodologia proporciona perfils de restricció compatibles amb *P. mediterraneus* a totes les àrees investigades i espècies de bivalves. La seqüenciació de part de la regió rADN-ITS també és molt útil per al diagnòstic molecular de les diferents espècies de *Perkinsus* i les seves relacions filogenètiques (Brown *et al.* 2004, Burrenson *et al.* 2005, Casas *et al.* 2002a, Casas *et al.* 2004, Dungan i Reece 2006, Moss *et al.* 2008, Sabry *et al.* 2009, Sanil *et al.* 2012). A aquesta tesi, ambdós mètodes mostraren la mateixa eficiència en la identificació de *P. mediterraneus*. Tal com ja hem indicat abans, la variabilitat genètica observada i les topologies dels arbres filogenètics, mostren una estreta relació entre totes les espècies de *Perkinsus*, encara que cada una d'elles formen un grup monofilètic. Com també s'indica a la bibliografia, les seqüències de la regió ITS suggereixen que *P. mediterraneus* s'agrupa estretament amb *P. honshuensis*, *P. olseni* i *P. marinus*. *P. qugwadi* és el més divergent mentre que *P. chesapeakei* i *P. beihaiensis*, que són les espècies més similars entre si, es troben intermèdies (Casas *et al.* 2002b, Villalba *et al.* 2004, Moss *et al.* 2008).

Dins de les nostres mostres de *P. mediterraneus* hem trobat 12 haplotips, els quals presenten una alta similitud genètica. Les diferències es fan majors quan es varen incloure les seqüències de *P. mediterraneus* procedents de la bases de dades del GenBank. Aquest augment de diferenciació genètica podria indicar qualche tipus d'aïllament d'aquestes mostres, però també hem de tenir en compte que Abollo *et al.* (2006) varen incloure al GenBank 11 seqüències a partir de 3 diferents cultius *in vitro* de *P. mediterraneus*. És possible que les condicions *in vitro* afavoriren la diferenciació genètica (Dungan *et al.* 2002). Tanmateix, aquestes diferències genètiques estan dins del rang de les variacions intraespecífiques observades dintre de les espècies de *Perkinsus* actualment acceptades (Moss *et al.* 2008). Hem de tenir en compte el cicle de vida clonal típic d'aquests paràsits, que explicaria aquesta proximitat genètica com també apareix a la literatura a altres espècies com *P. olseni* (Vilas *et al.* 2011).

Els tres mètodes d'inferència filogenètica emprats a aquest estudi, el TCS i els arbres NJ i Bayesià, detecten en conjunt tres grups diferents en *O. edulis* de Menorca que es

diferencien d'altres llinatges coespecífics. Les anàlisis recolzen aquesta diferenciació entre les poblacions de Menorca i Mallorca, la qual podria ser el resultat de diferents factors, com la variabilitat ambiental, diferents dates de detecció i localitats, el moviment d'animals, l'activitat humana, etc, (Oliver *et al.* 1998, Bushek i Allen 1996, Encomio *et al.* 2005), però és difícil discernir la importància de cada factor.

Perkinsus mediterraneus es va descobrir a partir de mostres d'ostres de Menorca i a aquesta tesi s'ha ampliat el nombre d'espècies i localitats afectades per aquest paràsit a les Illes Balears. Noves recerques (Ramilo *et al.* 2015) han ampliat la distribució de *P. mediterraneus* a altres indrets del Mediterrani occidental: Manfredonia (Itàlia) i Santa Pola (Alacant), les seqüències de les quals són compatibles amb els haplotips obtinguts al nostre treball (en concret, H03, H04 i H06). També varen obtenir noves seqüències d'escopinyes gravades del port de Maó, entre les quals han aparegut tres nous haplotips, resultat que creïm que referma l'aïllament de les poblacions de l'illa de Menorca.

Al Mediterrani es troben tres espècies de *Perkinsus*: *P. mediterraneus* (Casas *et al.* 2004), *P. olseni* (Elandaloussi *et al.* 2009) i *P. chesapeaki* (Carrasco *et al.* 2004). Malgrat que es coneix que es produeixen co-infeccions a l'escopinya gravada del port de Maó (Ramilo *et al.* 2010) amb *P. olseni* i *P. mediterraneus*, no hem trobat cap cas a les mostres estudiades, ni tampoc bivalves afectats per *P. chesapeaki*, espècie que s'ha trobat al delta de l'Ebre recentment (Carrasco *et al.* 2103).

Per tant, considerant que estan descrites mortalitats causades per *Perkinsus* a diferents indrets del món i tenint en compte la intensitat de la seva prevalença i grau d'infecció a les poblacions de bivalves de les Illes Balears, hauria d'establir-se un programa permanent de monitoratge d'aquesta malaltia.

Co-infecció per *M. refringens* i *P. mediterraneus*.

Com ja s'ha citat abans, l'any 2004 es va detectar una mortalitat anòmala al banc natural de *Chamelea gallina* de la platja de s'Arenal. Les anàlisis histològiques detectaren infecció per *Marteilia refringens*, encara que amb un grau d'infecció molt baix, sols el 4,3%, confirmant-se l'adscripció del paràsit mitjançant PCR niades i hibridacions *in situ* (López-Flores *et al.* 2008). Amb mostres de l'octubre de 2008, mitjançant tècniques histològiques, vàrem trobar un organisme similar a *Perkinsus*, que posteriorment es va confirmar com *P. mediterraneus* (Moss *et al.* 2008), però no vàrem detectar co-infecció mitjançant tècniques histològiques amb *M. refringens* i *P. mediterraneus*.

La realització de PCR amb encebadors específics de l'ITS per a *Marteilia refringens* en rossellones d'aproximadament un any d'edat, obtingudes el juliol de 2009, varen detectar la presència de *M. refringens* en un 55,1% dels individus examinats, mentre que la PCR amb encebadors específics per l'ITS per a *P. mediterraneus* no van detectar la presència d'aquest darrer paràsit a les mateixes rossellones.

Per tant, amb la PCR tampoc hem trobat co-infecció de *M. refringens* i *P. mediterraneus*. Així i tot, no podem descartar que les causes de l'elevada mortalitat es puguin explicar per la presència simultània de *P. mediterraneus* i *M. refringens* en el banc natural de *C. gallina*, perquè els individus són molt joves i possiblement ambdós patògens estiguin a fases inicials d'infecció. Però tenint en compte que l' esporulació de *M. refringens* s'inicia quan la temperatura de l'aigua és 17°C (mes de maig), que les zoospores de *P. mediterraneus* apareixen més tard (setembre-octubre), i que la mortalitat es detecta al juny-juliol, és més probable que la causa de la mortalitat sigui la marteiliosis.

CONCLUSIONS.

1. Tant les ostres com els musclos estan infectats per *Marteilia refringens*, pràcticament durant tot l'any.
2. Les ostres i les escopinyes gravades estan infectades amb *Perkinsus* spp., mentre que els musclos no estan parasitats.
3. Només es detecta *Bucephalus haimeanus* en ostres, *Mytilicola intestinalis* i metacercàries de tremàtodes s'han trobat a musclo i ostra i sols s'han detectat ciliats en digestiu d'ostra.
4. En general, l'estat sanitari dels mol·luscs bivalves estudiats és adequat. No obstant això, la presència de *Marteilia refringens* i *Perkinsus* spp. és una amenaça pels bivalves.
5. La biocenosi dels fons arenosos litorals de la platja de Palma n'és la pròpia de fons d'arenas fines, amb predominància de l'espècie *Chamelea gallina*.
6. Les espècies acompanyants més freqüents són: *Rudicardium tuberculatum*, *Astropecten jonhstoni*, *Macra corallina*, *Pectunculus violacescens* i *Diogenes pugillator*.
7. La reducció en la talla mitjana màxima al llarg de l'explotació del banc de la rossellona és una conseqüència de l'extracció dels individus de talla comercial, que són els més vells de la població.
8. L'exhauriment del banc de la rossellona es deu, probablement, a la interacció d'una sèrie de factors com són la pesca, l'aport de sediments i nutrients extraordinària per les torrentades de 2001 i 2002, temperatures anormalment elevades durant períodes prolongats als estius, que van afavorir el desenvolupament d'un patogen (*Marteilia refringens* tipus O) present naturalment al banc.
9. Les tècniques histopatològiques van posar de manifest la presència d'un organisme patogen. Per determinar l'espècie es va fer necessari utilitzar tècniques moleculars, en concret, per la manca de material conservat en condicions òptimes, es va emprar PCR niada i hibridació *in situ*.
10. L'ús de la sonda Smart2, localitzada en el gen 18S ribosomal del paràsit, específica a nivell del gènere *Marteilia* permet adscriure el paràsit a aquest

gènere, mentre que la sonda MT-1B/MT-2B marcada amb digoxigenina (Sonda *Marteilia*-IGS) permet confirmar l'espècie.

11. Aquesta és la primera vegada que es detecta a *Marteilia refringens* afectant a *Chamelea gallina*.
12. *Perkinsus mediterraneus* es troba present a totes les illes de l'arxipèlag Balear, infectant diferents espècies de mol·luscs: *Ostrea edulis*, *Venus verrucosa*, *Mimachlamys varia*, *Chamelea gallina* i *Pinna nobilis*. S'han detectat hipnospores de *Perkinsus* spp. en *Lima lima* i *Limaria inflata*, encara que no s'ha pogut adscriure a una espècie en concret.
13. La infecció per *P. mediterraneus* presenta una marcada estacionalitat, amb relació directa amb la temperatura, amb màxims d'infecció entre setembre i octubre.
14. S'han trobat 24 haplotips diferents. No s'ha pogut associar la infecció amb *Perkinsus mediterraneus* a mortalitats.
15. No hem detectat co-infecció de *P. mediterraneus* i *P. olseni* en *Ostrea edulis*, *Mimachlamys varia*, *Chamelea gallina* i *Pinna nobilis*, encara que està documentada en *Venus verrucosa*. Tampoc bivalves afectats per *P. chesapeaki*, espècie que s'ha trobat recentment al delta de l'Ebre.
16. Tampoc hem detectar co-infecció de *P. mediterraneus* i *M. refringens* en les mostres investigades de rossellona en aquest estudi, encara que ambdós paràsits es troben a les mostres.

BIBLIOGRAFIA.

- Abollo, E., Casas, S. M., Ceschia, G. i Villalba, A. 2006. Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Mol. Cel. Probes*, **20**, 323–329.
- Abollo, E., Ramilo, A., Casas, S. M., Comesaña, P., Cao, A., Carballal, M. J. i Villalba, A. 2008. First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. *Aquaculture*, **274**(2), 201–207.
- Acarli, S., Lok, A., Serdar, S., Kucukdermenci, A., Kirtik, A., Yigitkurt, S. i Guler, M. 2010. Growth and survival of european oyster (*Ostrea edulis*, Linnaeus 1758) in suspended culture in Homa lagoon, Izmir Bay, Turkey. *Aquaculture*, **191**, 309–321.
- Aemet. 2012. www.aemet.es.
- Allam, B., Carden, W. E., Ward, J. E., Ralph, G., Winnicki, S. i Espinosa, E. P. 2013. Early host-pathogen interactions in marine bivalves: Evidence that the alveolate parasite *Perkinsus marinus* infects through the oyster mantle during rejection of pseudofeces. *Journal of invertebrate pathology*, **113**(1), 26–34.
- Alderman, D. J. 1979. Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. *Mar. Fish. Rev.*, **41**, 67–69.
- Andrews, J. D. i Hewatt W. G. 1957. Oyster mortality studies in Virginia. II. The fungus disease caused by *Dermocystidium marinum* in oysters of Chesapeake Bay. *Ecol. Monogr.*, **27**, 1–26.
- Andrews, J. D. 1996. History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. *J. Shellfish Res.*, **15**, 13–16.
- Angioni, S. A., Giansante, C. i Ferri, N. 2010. The clam (*Chamelea gallina*): evaluation of the effects of solids suspended in seawater on bivalve molluscs. *Veterinaria italiana*, **46**(1), 101–106.
- Ansell, A. D. 1961. Reproduction, growth, mortality of *Venus striatula* (Da Costa) in Kames Bay, Millport. *Marine Biological Association of the United Kingdom*, **41**, 191–215.
- APROMAR. 2014. La acuicultura en España. 91 pp. www.apromar.es.
- Arzul, I., Chollet, B., Michel, J., Robert, M., Garcia, C., Joly, J. P., François, C. i Miossec, L. 2012. One *Perkinsus* species may hide another: characterization of *Perkinsus* species present in clam production areas of France. *Parasitology*, **139**(13), 1757.
- Arzul, I., Chollet, B., Boyer, S., Bonnet, D., Gaillard, J. Baldi, Y., Robert, M., Joly, J. P., Garcia, C. i Bouchoucha M. 2014. Contribution to the understanding of the cycle of the protozoan parasite *Marteilia refringens*. *Parasitology*, **141**, 227–240
- Audemard, C., Barnaud, A., Collins, C. M., Le Roux, F., Sauriau, P. G., Coustau, C., Blachier, P. i Berthe, F. C. J. 2001. Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **257**, 87–108.
- Audemard, C., Le Roux, F., Barnaud, A., Collins, C., Sautour, B., Sauriau, P. G., de Montaudouin X., Coustau C., Combes C. i Berthe, F. 2002. Needle in a haystack:

- involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life-cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*. *Parasitology*, **124**(03), 315–323.
- Auzoux-Bordenave, S., Vigario, A. M., Ruano, F., Domart-Coulon, I. i Doumenc, D. 1995. In vitro sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. *J Shellfish Res.*, **14**(2), 469–475.
- Ayuso, V. M. G. 1996. El poblamiento inicial de la isla de Mallorca. *Complutum*, **6**, 83–104.
- Azevedo, C. 1989. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *The Journal of parasitology*, **75**(4), 627–635.
- Azevedo, C., Balseiro, P., Casal, G., Gestal, C., Aranguren, R., Stokes, N. A., Carnegie, R. B. Nova, B. Burreson, E. M. i Figueras, A. 2006. Ultrastructural and molecular characterization of *Haplosporidium montforti* n. sp., parasite of the European abalone *Haliotis tuberculata*. *Journal of invertebrate pathology*, **92**(1), 23–32.
- Baird, R. H., Bolster, G. C. i Cole, H. A. 1951. *Mytilicola intestinalis*, Steuer, in the European flat oyster (*Ostrea edulis*). *Nature*, **168**, 560.
- Balseiro, P., Aranguren, R., Gestal, C., Nova, B. i Figueras, A. 2006. *Candidatus Xenohaliotis californiensis* and *Haplosporidium montforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe. *Aquaculture*, **258**(1), 63–72.
- Balseiro, P., Montes, A., Ceschia, G., Gestal, C., Nova, B. i Figueras, A. 2007. Molecular epizootiology of the European *Marteilia* spp., infecting mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *M. edulis*) and oysters (*Ostrea edulis*): an update. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **27**(4), 148–156.
- Berrilli, F., Ceschia, G., De Liberato, C., di Cave, C. i Oreccia, P. 2000. Parasitic infections of *Chamelea gallina* (Mollusca, Bivalvia) from commercially exploited banks of the Adriatic Sea. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **20**, 199–205.
- Berthe, F. C. J., Le Roux, F., Peyretailade, E., Peyret, P., Rodriguez, D., Gouy, M. i Vivarès, C. P. 2000. Phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA of *Marteilia refringens* validates the existence of phylum Paramyxia (Desportes Perkins, 1990). *J. Eukaryot. Microbiol.*, **47**, 288–293.
- Berthe, F. C. J., Le Roux, F., Adlard, R. D. i Figueras, A. 2004. Marteiliosis in molluscs: A review. *Aquatic Living Resources*, **17**, 433–448.
- Bigas, M., Sagristà, E., Bozzo, M. G., Durfort, M. i Poquet, M. 2000. Occurrence of heavy metals and protozoan parasites in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*, collected in the western Mediterranean. *Ecotoxicol Environ Saf*, **3**, 16–21.
- Blackbourne, J., Bower, S. M. i Meyer, G. R. 1998. *Perkinsus qugwadi* sp. nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Can. J. Zool.*, **76**, 942–953.
- Bougrier, S., Tige, E., Bachere, G. i Grizel, H. 1986. *Ostrea angasi* acclimatization to French coasts. *Aquaculture*, **58** (1-2), 151–154.
- Bower, S. M., Blackbourne, J. i Meyer, G. R. 1998. Distribution, prevalence, and pathogenicity of the protozoan *Perkinsus qugwadi* in Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Can. J. Zool.*, **76**, 954–959.

- Bower, S. M. 2006. Parasitic diseases of shellfish. *Fish Diseases and Disorders*, Volume 1: Protozoa and Metazoan Infections, Second Edition, CABI, Wallingford. pp. 629–677.
- Bower, S. M. 2011. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: *Marteilia refringens/maurini* of Mussels. <http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/mrmaurmu-eng.html>
- Brown, G. D., Hudson, K. L. i. Reece, K. S. 2004. Multiple polymorphic sites at the ITS and ATAN loci in cultured isolates of *Perkinsus marinus*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **51**, 312–320.
- Boyer, S., Chollet, B., Bonnet, D. i Arzul, I. 2013. New evidence for the involvement of *Paracartia grani* (Copepoda, Calanoida) in the life cycle of *Marteilia refringens* (Paramyxia). *International journal for parasitology*, **43**(14), 1089–1099.
- Burreson, E. M. i Ragone Calvo, L. M. 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *J. Shellfish Res.*, **15**, 17–34.
- Burreson, E. M., Reece, K. S. i Dungan, C. F. 2005. Molecular, morphological, and experimental evidence support the synonymy of *Perkinsus chesapeaki* and *Perkinsus andrewsi*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **52**, 258–270.
- Bushek, D. i Allen, S. 1996. Host-parasite interactions among broadly distributed populations of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and the protozoan *Perkinsus marinus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **139**, 127–141.
- Bushek, D., Allen, S. K., Alcox, K. A., Gustafson, R. i Ford S. E. 1997. Response of *Crassostrea virginica* to in vitro cultured *Perkinsus marinus*: preliminary comparison of three inoculation methods. *J. Shellfish Res.*, **16**, 479–485.
- Bushek, D., Scarpa, J. i Laramore, S.E. 2002a. Susceptibility of the caribbean oyster *Crassostrea rhizophorae* to *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.*, **21**, 371–372.
- Bushek, D., Ford, S. E. i Chintala, M. M. 2002b. Comparison of in vitro cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. III. Fecal elimination and its role in transmission. *Dis. Aquat. Org.* **51**, 217–225.
- Bushek D., Dungan C. F. Lewitus A. J. 2002c. Serological affinities of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) with some dinoflagellates (Dinophyceae). *J. Euk. Microbiol.*, **49**, 11–16.
- Cáceres-Martínez, J., Ortega, M. G., Vásquez-Yeomans, R., García, T. D. J. P., Stokes, N. A. i Carnegie, R. B. 2012. Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. *Journal of invertebrate pathology*, **110**(3), 321–325.
- Cahour, A. 1979. Épidémiologie de la maladie de l'huitre plate, *Ostrea edulis* (L.). Tesi, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 110 pp.
- Cahour, A., Poder, M. i Balouet, G. 1980. Présence de *Minchinia armoricana* (Haplosporea, Haplosporida) chez *Ostrea edulis* d'origine française. *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, **174**, 359–364.
- Calvin J. C. 1995. El Ecosistema Marino Mediterráneo. Guia de su Flora y Fauna. *Juan Carlos Calvín*, Murcia.

- Calvo, G. W. i Bureson, E. M. 1994. In vitro and in vivo effects of eight chemotherapeutants on the oyster parasite *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen, and Collier). *J. Shellfish Res* **13**, 101–107.
- Camacho, A., Villalba, A., Beiras, R. i Labarta, U. 1997. Absortion efficiency and condition of cultured mussels (*Mytilus edulis galloprovincialis* Linnaeus) of Galicia (NW Spain) infected by parasites *Marteilia refringens* (Grizel *et al.*) and *Myticola intestinalis* (Steven). *Journal of Shellfish Research*, **16**, 77–82.
- Canestri Trotti, G., Baccarani, E. M., Giannetto, S., Giuffrida, A. i Paesanti, F. 1998. Prevalence of *Mytilicola intestinalis* (Copepoda: Mytilicolidae) and *Urastoma cyprinae* (Turbellaria: Hypotrichinidae) in marketable mussels *Mytilus galloprovincialis* in Italy. *Diseases of Aquatic Organisms* **32**, 145–149.
- Cano, J., Campos, M. J., López, F. J. i Saavedra, M. 2011. Utilización de distintos sistemas de engorde en el cultivo de vieira *Pecten maximus* (L., 1758), zamburiña *Mimachlamys varia* (L., 1758) y volandeira *Aequipecten opercularis* (L., 1758) en Andalucía (España). *Boletín. Instituto Español de Oceanografía*, **21**(1-4), 283–291.
- Carella, F., Aceto, S., Marrone, R., Maiolino, P. i de Vico, G. 2010. *Marteilia refringens* infection in cultured and natural beds of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) along the Campanian coast (Tirrenian sea, South of Italy). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **30**, 189–196.
- Carnegie, R. B. i Cochennec-Laureau, N. 2004. Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. *Aquatic Living Resources*, **17**(04), 519–528.
- Carrasco, N., Lopez-Flores, I., Alcaraz, M., Furones, M. D., Berthe, F. C.J. i Arzul, I. 2007a. Dynamics of the parasite *Marteilia refringens* (Paramyxea) in *Mytilus galloprovincialis* zooplankton populations in Alfacs Bay (Catalonia, Spain). *Parasitology*, **134**(11), 1541–1550.
- Carrasco, N., López-Flores, I., Alcaraz, M., Furones, M. D., Berthe, F. C. i Arzul, I. 2007b. First record of a *Marteilia* parasite (Paramyxea) in zooplankton populations from a natural estuarine environment. *Aquaculture*, **269**(1), 63–70.
- Carrasco, N., Arzul, I., Chollet, B., Robert, M., Joly, J. P., Furones, M. D. i Berthe, F. C. J. 2008a. Comparative experimental infection of the copepod *Paracartia grani* with *Marteilia refringens* and *Marteilia maurini*. *Journal of fish diseases*, **31**(7), 497–504.
- Carrasco, N., Arzul, I., Berthe, F. C. J. i Furones, M. D. 2008b. *In situ* hybridization detection of initial infective stages of *Marteilia refringens* (Paramyxea) in its host *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of fish diseases*, **31**(2), 153–157.
- Carrasco, N., Villalba, A., Andree, K. B., Engelsma, M. Y., Lacuesta, B., Ramilo, A., Gairin, I. i Furones, M. D. 2012. *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) observed infecting the European flat oyster *Ostrea edulis* cultured on the Spanish Mediterranean coast. *Journal of invertebrate pathology*, **110**(3), 307–313.
- Carrasco, N., Hine, M., Durfort, M., Andree, K. B., Malchus, N., Lacuesta, B., González, M., Roque, A., Rodgers, C. i Furones, M.D., 2013. *Marteilia cochillia* sp. nov., a new *Marteilia* species affecting the edible cockle *Cerastoderma edule* in European waters. *Aquaculture*, **413-414**, 223–230.

- Carrasco, N., Rojas, M., Aceituno, P., Andree, K. B., Lacuesta, B. i Furones, M. D. 2014. *Perkinsus chesapeaki* observed in a new host, the European common edible cockle *Cerastoderma edule*, in the Spanish Mediterranean coast. *Journal of invertebrate pathology*, **117**, 56–60.
- Carrasco, N., Green, T. i Itoh, N. 2015. *Marteilia spp.* parasites in bivalves: a revision of recent studies. *Journal of invertebrate pathology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.016>
- Casas, S. M., Villalba, A. i Reece, K. S. 2002a. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Dis. Aquat. Org.* **50**, 51–65.
- Casas, S. M., La Peyre, J. F., Reece, K. S., Azevedo, C. i Villalba, A. 2002b. Continuous in vitro culture of the carpet shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Diseases of aquatic organisms*, **52**(3), 217–231.
- Casas, S. M., Grau, A., Reece, K. S., Apakupakul, K., Azevedo, C. i Villalba, A. 2004. *Perkinsus mediterraneus* n. sp., a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. *Diseases of aquatic organisms*, **58**(2/3), 231–244.
- Cavaliere, A. R. i Alberte, R. S. 1970. Fungi in animal shell fragments. *Elisha Mitchell Sci Soc J.* **86**, 203–206.
- Chicharo, L., Chicharo, M., Gaspar, M., Regala, J. i Alves, F. 2002. Reburial time and indirect mortality of *Spisula solida* clams caused by dredging. *Fisheries Research*, **59**(1), 247–257.
- Chintala M. M., Bushek, D. i Ford, S. E. 2002. Comparison of in vitro cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. I. Dosing methods and host response. *Dis. Aquat. Org.*, **51**, 203–216.
- Choi, K. S. i Park, K. I. 1997. Report on the occurrence of *Perkinsus* sp. in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum* in Korea. *J. Aquacult.*, **10**, 227–237.
- Choi, K.S., K.-I. Park, M. Cho and P. Soudant. 2005. Diagnosis, pathology, and taxonomy of *Perkinsus* sp. isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Journal of the Korean Aquaculture Society*, **18**, 207–214.
- Choi, K. S. i Park, K. I. 2010. Review on the protozoan parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis 1981) infection in Asian waters. *Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea*, 269–281.
- Chu, F. L. E., 1996. Laboratory investigations of susceptibility, infectivity and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. *J. Shellfish Res.*, **15**, 57–66.
- Clement, M., Posada, D. i Crandall, K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* **9**(10), 1657–1660.
- Comps, M. 1970. Observations sur les causes d'une mortalite anormal des huitres plates dans le bassin de Marennes. *Revue des Travaux de l'Institut des Peches Maritimes*, **34**, 317–326.
- Comps, M., Tigé, G. i Grizel, H. 1980. Étude ultrastructurale d'un protiste parasite de l'huitre *Ostrea edulis* L. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci.*, **290**, 383–384.

- Comps, M. i Joly, J. P. 1980. Contamination expérimentale de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck par *Marteilia refringens*. *Sci. Pêche*, **301**(1), 19–21.
- Comps, M. 1982. Recherches sur un protiste, parasite nouveau de l'huitre plate des cotes françaises. *Malacologia*, **22**, 1–2.
- Conchas, R. F., Santamarina, J., Lama, A., Longa, M. A. i Montes, J. 2003. Evolution of bonamiosis in Galicia (NW Spain). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **23**(6), 265–272.
- Coss, C. A., Robledo, J. A. F., Ruíz, G. M. i Vasta, G. R. 2001. Description of *Perkinsus andrewsi* n. sp. isolated from the Baltic clam (*Macoma balthica*) by characterization of the ribosomal RNA locus, and development of a species-specific PCR-based diagnostic assay. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **48**, 52–61.
- Cranfield H. J., Dunn A., Doonan I. J. i Michael K. P. 2005. *Bonamia exitiosa* epizootic in *Ostrea chilensis* from Foveaux Strait, southern New Zealand between 1986 and 1992. *ICES J. Mar. Sci.*, **62**, 3–13.
- Culloty, S. C. i Mulcahy, M. f. 1994. Season, age, sex-related variation in the prevalence of bonamiasis in flat oysters (*Ostrea edulis* L.) on the south coast of Ireland. *Aquaculture*, **144**, 53–63.
- Culloty, S. C., Novoa, B., Pernas, M., Longshaw, M., Mulcahy, M. F., Feist, S. W. i Figueras, A. 1999. Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite. *Diseases of Aquatic Organisms*, **37**(1), 73–80.
- Culloty, S. C., Cronin, M. A. i Mulcahy, M. F. 2001. An investigation into the relative resistance of Irish flat oysters *Ostrea edulis* L. to the parasite *Bonamia ostreae*. *Aquaculture*, **199**(3), 229–244.
- Culurgioni, J., d'Amico, V., de Murtas, R., Trotti, G. C. i Figus, V. 2006. Parasitological monitoring of commercial native bivalves from St. Gilla lagoon (Sardinia, South Western Mediterranean). *Ittiopatologia*, **3**, 243–252.
- da Ros, L. i Canonzier, W. J. 1985. *Perkinsus*, a protistan threat to bivalve culture in the Mediterranean basin. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.*, **5**, 23–27.
- da Ros, L., Nesto, N., Nasci, C., Moschino, V., Pampanin, D. I Marin, M. G. 2003. Biochemical behavioural effects of hydraulic dredging on the target species *Chamelea gallina*. *Fish. Res.*, **64**(1), 71–78.
- da Silva, P. M., Hégaret, H., Lambert, C., Wikfors, G. H., Le Goïc, N., Shumway, S. E. i Soudant, P. 2008a. Immunological responses of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) with varying parasite (*Perkinsus olseni*) burden, during a long-term exposure to the harmful alga, *Karenia selliformis*, and possible interactions. *Toxicon*, **51**(4), 563–573.
- da Silva, P., Renault, T., Fuentes, J. i Villalba, A. 2008b. Herpesvirus infection in European flat oysters *Ostrea edulis* obtained from brood stocks of various geographic origins and grown in Galicia (NW Spain). *Diseases of aquatic organisms*, **78**(3), 181–188.
- da Silva, P. M., Vianna, R. T., Guertler, C., Ferreira, L. P., Santana, L. N., Fernández-Boo, S., Ramilo, A., Cao, A. i Villalba, A. 2013. First report of the protozoan parasite *Perkinsus*

- marinus* in South America, infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Paraíba River (NE, Brazil). *J. Invertebr. Pathol.*, **113**(1), 96–103.
- da Silva, P. M., Scardua, M. P., Vianna, R. T., Mendonça, R. C., Vieira, C. B., Dungan, C. F., Scott, G.P. i Reece, K. S. 2014. Two *Perkinsus* spp. infect *Crassostrea gasar* oysters from cultured and wild populations of the Rio São Francisco estuary, Sergipe, northeastern Brazil. *Journal of invertebrate pathology*, **119**, 62–71.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. i Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* **9**(2), 772–772.
- Davey, J. T. i Gee, J. M. 1988. *Mytilicola intestinalis*, a copepod parasite of blue mussels. *American Fisheries Society Special Publication*, **18**, 64–73.
- de la Herrán, R., Garrido-Ramos, M.A., Navas, J. I., Ruíz-Rejón, C. i Ruíz-Rejón, M. 2000. Molecular characterization of the ribosomal RNA gene region of *Perkinsus atlanticus*: its use in phylogenetic analysis and as a target for a molecular diagnosis. *Parasitology*, **120**, 345–353.
- del Piero, D., 1998. Indagini sullo stock di *Chamelea gallina* (L. 1758), vongola comune nei compartimenti di Monfalcone (1984–1997) e Venezia (1990–1997). *Biol. Mar. Mediterr.*, **5**, 395–399.
- del Piero, D. i Fornaroli, D. 1998. Situazione dello stock di *Chamelea gallina* (L.) nel comparto marittimo di Venezia (1984/1995). *Biol. Mar. Mediterr.*, **5**, 393–403.
- Delaney, M. A., Brady, Y. J., Worley, S. D. i Huels, K. L. 2003. The effectiveness of N-halamine disinfectant compounds on *Perkinsus marinus*, a parasite of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research*, **22**(1), 91–94.
- Degremont, L. 2011. Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture*, **317**(1–4), 94–98.
- Deval, M. C. i Oray, I. K. 1998. The annual shell increments of Bivalvia *Chamelea gallina* L. 1758 in the northern Sea of Marmara. *Oebalia*, **24**, 93–109.
- Deval, M. C., 2001. The shell growth the biometry of the striped venus *Chamelea gallina* (L) in the Marmara Sea, Turkey. *Journal of Shellfish Research*, **20**, 155–159.
- Diamond, E. A. 2012. Do scavengers influence dermo disease (*Perkinsus marinus*) transmission?: experiments in oyster parasite trophic interactions. Doctoral dissertation, Rutgers University-Graduate School-New Brunswick.
- Dinamani, P., Hine, M. i Jones, J. B. 1987. Occurrence characteristics of the hemocyte parasite *Bonamia* sp. on the New Zealand dredge oyster *Tiostrea lutaria*. *Dis. Aquat. Org.*, **3**, 37–44.
- Dungan C. F. i Hamilton R. M. 1995. Use of a tetrazolium-based cell proliferation assay to measure effects of *in vitro* conditions on *Perkinsus marinus* (Apicomplexan) proliferation. *J. Euk. Microbiol.*, **42**, 379–388.
- Dungan, C. F., Hamilton, R. M., Burreson, E. M. i Ragone-Calvo, L. M. 1996. Identification of *Perkinsus marinus* portals of entry by histochemical immunoassays of challenged oysters. *J. Shellfish Res.*, **15**, 500.

- Dungan, C. F., Hamilton, R. M., Hudson, K. L., McCollough, C. B. i Reece, K. S. 2002. Two epizootic diseases in Chesapeake Bay commercial clams, *Mya arenaria* and *Tagelus plebeius*. *Dis. Aquat. Org.* **50**, 67–78.
- Dungan, C. F. i Reece, K. S. 2006. *In vitro* propagation of two *Perkinsus* spp. parasites from Japanese Manila clams *Venerupis philippinarum* and description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **53**, 316–326.
- Dungan C. F., Reece, K. S., Hamilton, R.M., Stokes, N.A. i Burreson, E.M. 2007a. Experimental cross-infections by *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* in three sympatric species of Chesapeake Bay oysters and clams. *Dis. Aquat.Org.*, **76**, 67–75.
- Dungan, C.F., Reece, K.S., Moss, J.S., Hamilton, R.M. i Diggles, B.K. 2007b. *Perkinsus olseni* *in Vitro* isolates from the New Zealand clam *Austrovenus stutchburyi*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **54**, 263–270.
- Durfort, M. 1994. Revisión de las parasitosis más frecuentes de los moluscos bivalvos de interés comercial del mar catalán (Mediterráneo). *V Congreso Nacional de Acuicultura*, May 10-13, 1995, S. Carlos de la Rápita, Spain, Universidad de Barcelona.
- Elandalloussi, L. M., Leite, R. B., Rodrigues, P. M., Afonso R., Nunes P. A. i Cancela M. L. 2005. Effect of antiprotozoal drugs on the proliferation of the bivalve parasite *Perkinsus olseni*. *Aquaculture*, **243**, 9–17.
- Elandaloussi, L., Carrasco, N., Furones, D. i Roque, A. 2009. Phylogenetic relationship of *Perkinsus olseni* from the Ebro Delta, Spain, to other *Perkinsus* species, based on ribosomal ADN sequences. *Dis. Aquat. Org.*, **86**, 135–142.
- Elgharsalli, R., Aloui-Bejaoui, N., Chollet, B., Joly, J. P., Robert, M., Couraleau, Y. i Arzul, I. 2013. Characterization of the protozoan parasite *Marteilia refringens* infecting the dwarf oyster *Ostrea stentina* in Tunisia. *Journal of invertebrate pathology*, **112**(2), 175–183.
- Elston, R. A., Farley, C. A. i Kent, M. L. 1986. Occurrence significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Diseases of Aquatic Organisms*, **2**, 49–54.
- Elston, R. 1989. Bacteriological methods for diseased shellfish, pp. 187–215. *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*, Ellis Horwood Chichester, UK.
- Elston R. A., Dungan C. F., Meyers T. R. i Reece K. S. 2004. *Perkinsus* sp. infection risk for manila clams, *Venerupis philippinarum* (A. Adams and Reeve, 1850) on the Pacific coast of North and Central America. *J. Shellfish Res.*, **23**, 101–105.
- Encomio, V. G., Stickler, S. M., Allen Jr, S. K. i Chu, F. L. 2005. Performance of “natural dermo-resistant” oyster stocks-survival, disease, growth, condition and energy reserves. *Journal of Shellfish Research*, **24**(1), 143–155.
- Escobedo-Fregoso, C., Arzul, I., Carrasco, N., Gutiérrez-Rivera, J. N., Llera-Herrera, R. i Vázquez-Juárez, R. 2015. Polymorphism at the ITS and NTS loci of *Perkinsus marinus* isolated from cultivated oyster *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, Mexico and phylogenetic relationship to *P. marinus* along the Atlantic Coast. *Transboundary and emerging diseases*, **62**(2), 137–147.

- Excoffier, L. i Lischer, H. E. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 564–567.
- Faisal, M., La Peyre, J. F., Elsayed, E. i Wright, D. C. 1999. Bacitracin inhibits the oyster pathogen *Perkinsus marinus* in vitro and in vivo. *Journal of Aquatic Animal Health*, **11**(2), 130–138.
- FAO. 2003. Software para la pesca y la acuicultura. FishStat Plus - Programa informático universal para series cronológicas de estadísticas pesqueras. In: *Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO* [en línea]. Roma.
- FAO. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. Roma. 231 págs.
- Falcaie, L. i Miniervini, R. 1995. Guía de los crustáceos decápodos de Europa. *Omega*, Barcelona.
- Feng, S. Y. 1988. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.*, **18**, 153–168
- Ferreira, L. P., Sabry, R. C., da Silva, P. M., Gesteira, T. C. V., de Souza Romão, L., Paz, M. P., Galdino Feijó, R., Dantas Neto, M. P. i Maggioni, R. 2015. First report of *Perkinsus beihaiensis* in wild clams *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia: Veneridae) in Brazil. *Experimental parasitology*, **150**, 67–70.
- Figueras, A. J., Jardon, C. F. i Caldas, J. R.. 1991. Diseases and parasites of rafted mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk): preliminary results. *Aquaculture*, **99**, 17–33.
- Figueras, A. J. i Montes, J. 1988. Aber disease of edible oysters caused by *Marteilia refringens*. *Am Fish Soc Spec Publ.*, **18**, 38–46.
- Fisher, W., Bauchot, M. L. i Schneider, M. 1987. Fiches FAO d'identification d'especies pour les Besoins de la Peche: Mediterranee et Mer Negre. *FAO-CEE*, Roma.
- FAO Fisheries Department .2003. Fisheries Global Information System (FAO-FIGIS) - Web site. Fisheries Global Information system (FIGIS). FI Institutional Websites. FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. <http://www.fao.org/fishery/figis/en>.
- Ford, S. E., 1996. Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the Northeastern United States: response to climate change? *J. Shellfish Res.*, **15**, 15–56.
- Ford, S. E., Chintala, M. M. i Bushek, D. 2002. Comparison of in vitro cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. I. Pathogen virulence. *Dis. Aquat. Org.*, **51**, 187–201.
- Friedman, C. S , Scott, B. B., Strenge, R. E. i McCormick, T.B. 2007. Oxytetracycline as a tool to manage and prevent losses of the endangered white abalone, *Haliotis sorenseni*, due to withering syndrome. *J. Shellfish Res.*, **26** (3), 877–885.
- Frogliola, C., 1975a. Osservazioni sull'accrescimento di *Chamelea gallina* (L.) ed *Ensis minor* (Chenu) nel Medio Adriatico. *Quad. Lab. Tecnol. Pesca*, **2**, 37–48.
- Frogliola, C. i Fiorentini, L. 1989. Valutazione dei banchi dei vongole nei compartimenti marittimi di Ancona e San Benedetto del Tronto. *Nova Thalassia*, **10**, 475–483.

Bibliografia

- Frogliola, C., Polenta, R., Arneri, E. i Antolini, M. B. 1998. Osservazioni sulle fluttuazioni del reclutamento di *Anadara inequalis* (Brughiere, 1789) e *Chamelea gallina* (L., 1758) nel medio Adriatico. *Biol. Mar. Mediterr.*, **5**, 290–298.
- Frogliola, C., 2000. Il contributo della ricerca scientifica alla gestione della pesca dei moluschi bivalvi con draghe idrauliche. *Biol. Mar. Mediterr.*, **7**, 71–82.
- Furones M. D., Grau, A., Gutierrez, M. C., Perez, S. I., Rodriguez, S. i Vilas M. P. 1995. First epidemiological survey of the shellfish populations in the Balearic islands. *7th International Conference of the European Association of Fish Pathologists. "Diseases of fish and Shellfish"*. Palma de Mallorca (Spain). 10-15 september 1995, 7
- Galimany, E., Sunila, I., Hégaret, H., Ramon, M. i Wikfors, G. H. 2008. Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: Histopathology, immune responses, and recovery. *Harmful Algae*, **7**, 702–711.
- Gaspar, M. B., Santos, M. N. i Vasconcelos, P. 2001. Weight-length relationships of 25 bivalve species (Mollusca: Bivalvia) from the Algarve coast (southern Portugal). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **81**, 805–807.
- Gauthier J.D., Miller C.R. i Wilbur A.E. 2006. TaqMan® MGB real-time PCR approach to quantification of *Perkinsus marinus* and *Perkinsus* spp. in oysters. *J. Shellfish Res.*, **25**, 619–624.
- Giovanardi, O., Savelli, F. i Ferretti, M. 1994. Indagine preliminare sull'utilizzo della draga idraulica (turbosoffiante) per la pesca dei bivalvi in ambiente lagunare. *Quad. Icram.*, **7**, 1–54.
- Goggin C. L., Sewell K.B. i Lester R. J. G. 1989. Cross-infection experiments with Australian *Perkinsus* species. *Dis. Aquat. Org.*, **7**, 55–59.
- Goggin, C. L., Boulo, V., Mialhe, E., Cousin, K. i Hervio, D. 1991. Diagnosis of *Perkinsus atlanticus* with monoclonal antibodies and ADN probes. In *Aquaculture Europe 91*, 123.
- Goggin, C. L. i Lester, R. J. G. 1995. *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. *Mar. Freshw. Res.*, **46**, 639–646.
- González Herrero, V., Rodríguez, J. P. i Martínez, A. D. 1987. Dermocystidiosis en almeja fina portuguesa de importación. *Cuadernos Marisqueros, Publicación Técnica del Plan de Explotación Marisquera de Galicia*, **12**, 695–700.
- Grainger, J. N. R. 1951. Notes on the biology of the copepod *Mytilicola intestinalis* Steuer. *Parasitology*, **41**(3-4), 135–142.
- Grau, A. M. 1989. Aproximació a l'evolució històrica i a la situació actual del marisc o el marisqueig a Maó (Menorca). *Jornades sobre conservació i desenvolupament a Menorca*, 29–30.
- Greer, C. E., Peterson, S. L., Kiviat, N. B. i Manos, M. M. 1991. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative fixation time. *Am. J. Clin. Pathol.*, **95**, 117–124.

- Grizel, H., Comps, M., Bonami, J. R., Cousserans, F., Duthoit, J. L. i Le Pennec, M. A. 1974. Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. *Science et Pêche*, **240**, 7–30.
- Grizel, H. 1979. *Marteilia refringens* and oyster disease—recent observations. *Mar. Fish. Rev.*, **41**, (1-2), 38–39.
- Grizel, H. 1985. Etude des récentes épizooties de l'huitres plate *Ostrea edulis* Linne et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Tesi Universite des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France, 145 p.
- Grizel, H., Mialhe, E., Chagot, D., Boulo, V. i Bachere, E. 1988. Bonamiasis: a model study of diseases in marine molluscs. *American Fisheries Society Special Publication*, **18**, 1–4.
- Guerin, J. P. 1973. Contribution a l'étude systemàtique, biologique et écologique des larves méroplanctoniques de polychètes et de mollusques du golfe de Marseille, 2. Le cycle des larves de lamelibranches. *Tethys*, **5**, 55–70.
- Gutiérrez M. 1977. Nota sobre marteiliasis en el mejillón, *Mytilus edulis* (L.), de la costa Noroeste de España. *Investigación Pesquera*, **41**, 637–642.
- Habsburgo, L. 1897. Die Balearen geschildert in Wort und Bild. *Edició castellana Sa Nostra*. Palma de Mallorca.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, **41**, 95–98.
- Hégaret, H., Da Silva, P. M., Wikfors, G. H., Lambert, C., De Bettignies, T., Shumway, S. E. i Soudant, P. 2007. Hemocyte responses of Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures. *Aquatic toxicology*, **84**(4), 469–479.
- Hégaret, H., Da Silva, P. M., Sunila, I., Shumway, S. E., Dixon, M. S., Alix, J., Wikfors, G. H. i Soudant, P. 2009. Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **371**(2), 112–120.
- Howard, D.W. i Smith, C.S. Histological techniques for marine bivalve mollusks. 2004. National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, Northeast Fisheries Center.
- Huelsensbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R. i Bollback, J. P. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, **294**, 2310–2314.
- Illes Balears. 2003. Resolució del conseller d'Agricultura i Pesca de 28 d'agost de 2003 per la qual s'aprova la convocatòria de les ajudes per a la paralització temporal de l'activitat de la recollida de la rossellona (*Chamalea gallina*) a la badia de Palma. Butlletí Oficial de les Illes Balears, de 4 d'octubre de 2003. 17893, 7-8.
- IMEDEA (UIB-CSIC), 2010. Estrategia 2: Afrontar el cambio global y preservar los sistemas naturales, terrestres y marinos. A: *Consortio de la playa de Palma*.
- Karagiannis, D. i Angelidis, P. 2007. Infection of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* by the protozoan *Marteilia* sp. in the Thermaikos Gulf (N Greece). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **27**, 131–141.

- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, **16**, 111–120.
- Kleeman, S. N., Le Roux, F., Berthe, F. i Adlard, R. D. 2002a. Specificity of PCR and in situ hybridization assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *M. refringens*. *Parasitology*, **125**(02), 131–141.
- Kleeman, S. N., Adlard, R. D. i Lester, R. J. G. 2002b. Detection of the initial infective stages of the protozoan parasite *Marteilia sydneyi* in *Saccostrea glomerata* and their development through to sporogenesis. *International journal for parasitology*, **32**(6), 767–784.
- Kumar, S., Tamura, K. i Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis sequence alignment. *Bioinform.*, **5**, 150–163.
- la Peyre J.F., Faisal M. i Burreson E.M. 1993. In vitro propagation of the protozoan *Perkinsus marinus*, a pathogen of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Euk. Microbiol.*, **40**, 304–310.
- la Peyre, M. K., Nickens, A. D., Volety, A. K., Tolley, G. S. i La Peyre, J. F. 2003. Environmental significance of freshets in reducing *Perkinsus marinus* infection in eastern oysters *Crassostrea virginica*: potential management implications. *Mar Ecol Prog Ser* **248**, 165–176.
- Lacaze-Duthiers, H. 1854. Memoire sur le bucephale Haime (*Bucephalus haimeanus*) helminthe parasite des huitres et des bucardes. *Annls Sci. nat. (Ser. 4, Zool.)*, **1**, 294–302.
- Lama, A. i Montes, J. 1993. Influence of depth of culture in the infection of the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) by *Bonamia ostreae*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **13**, 17–20.
- Lauckner, G. 1983. Diseases of mollusca: bivalvia. *Diseases of marine animals*, Volume II: Introduction, Bivalvia to Scaphopoda, Vol. 2. *Biologische Anstalt Helgoland*, Hamburg. pp. 477–961.
- le Bec, C., Mazurie, J., Cochennec, N. i le Coguic, Y. 1991. Influence of *Crassostrea gigas* mixed with *Ostrea edulis* on the incidence of *Bonamia* disease. *Aquaculture*, **93**, 263–271.
- le Roux, F., Audemard, C., Barnaud, A. i Berthe, F. 1999. DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Mar. Biotechnol.*, **1**, 588–597.
- le Roux, F., Lorenzo, G., Peyret, P., Audemard, C., Figueras, A. Vivares, C., Gouy, M. i Berthe, F. 2001. Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **48**, 449–454.
- Leethochavalit, S. Chalermwat, K., Upatham, E.S., Choi, K.S., Sawangwong, P. i Kruatrachue, M. 2004. Occurrence of *Perkinsus* sp. in undulated surf clams *Paphia undulata* from the Gulf of Thailand. *Dis Aquat. Org.*, **60**, 165–171.
- Lester, R. J. G. i Davis, G. H. G. 1981. A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. *J. Invertebr. Pathol.*, **37**, 181–187.
- Librado, P. i Rozas, J. 2009. DnaSp v5: a software for comprehensive analysis of ADN polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451–1452.
- López-Flores, I., De La Herran, R., Garrido-Ramos, M. A., Navas, J. I., Ruiz-Rejon, C. i Ruiz-Rejon, M. 2004. The molecular diagnosis of *Marteilia refringens* and differentiation

- between *Marteilia* strains infecting oysters and mussels based on the rDNA IGS sequence. *Parasitology*, **129**(04), 411–419.
- López-Flores, I., Garrido-Ramos, M. A., de la Herrán, R., Ruiz-Rejón, C., Ruiz-Rejón, M. i Navas, J. I. 2008a. Identification of *Marteilia refringens* infecting the razor clam *Solen marginatus* by PCR and in situ hybridization. *Molecular and cellular probes*, **22**(3), 151–155.
- López-Flores, I., Robles, F., Valencia, J. M., Grau, A., Villalba, A., de la Herrán, R., Garrido-Ramos, M. A., Ruíz-Rejón, C., Ruíz-Rejón, M. i Navas, J. I. 2008b. Detection of *Marteilia refringens* using nested PCR and in situ hybridisation in *Chamelea gallina* from the Balearic Islands (Spain). *Diseases of aquatic organisms*, **82**(1), 79–87.
- López-Sanmartín, M., Batista, F. M., Marín, M. C, Garrido, I., Quintero, D., Grade, A., Ruano, F., de la Herrán, R. i Navas, J. I. 2015. Detection of *Marteilia refringens* infecting the European flat oyster *Ostrea edulis* and the dwarf oyster *Ostrea stentina* in southern Portugal and Spain. *Journal of invertebrate pathology*, **130**, 52–55.
- Mackin, J. G., 1951. Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* Gmelin by *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen and Collier. *Bull. Mar. Sc. Gulf Caribb.*, **1**, 72–87.
- Mackin, J. G. i Boswell, J. L., 1956. The life cycle and relationships of *Dermocystidium marinum*. *Proc. Nat. Shellfish Assoc.*, **46**, 112–115
- Mackin, J. G. i Hopkins, S. H. 1962. Studies on oyster mortality in relation to natural environment and to oil fields in Louisiana. *Publ. Inst. Mar. Sci. Univ. Tex.*, **7**, 3–131.
- MAGRAMA-JACUMAR. Grupos de trabajo.
- Marano, G., Casavola, N. i Saracino, C. 1980. Indagine comparativa sulla riproduzione di *Chamelea gallina* (L.), *Venus verrucosa* (L.), *Rudicardium tuberculatum* (L.) nel Basso Adriatico. *Memorie di Biologia Marina e di Oceanografia*, **10**, 229–233.
- Marano, G., Casavola, N., Saracino, C. i Rizzi, E. 1982. Riproduzione e crescita di *Chamelea gallina* L. e *Venus verrucosa* L. (Bivalvia: Veneridae) nel basso Adriatico. *Mem. Biol. Mar. Oceanogr.*, **12**, 97–114.
- Marbà, N. i Duarte, C. M. 2010. Mediterranean warming triggers seagrass (*Posidonia oceanica*) shoot mortality. *Global Change Biology*, **16**, 2366–2375.
- Martin, A.G. 1993. Relance de l'huitre plate-Rapport d'avancement des travaux annee 1991. Rapport IFREMER. RIDRV-93.026 RA/trinite, 40.
- Masse, H., 1971a. Contribution a l'étude de la macrofaune de peuplement des sables fins infralittoraux des cotes de Provence. I - La baie de Bandol. *Tethys*, **2**, 783–820.
- Masse, H., 1971b. Contribution a l'étude de la macrofaune de peuplements des sables fins infralittoraux des cotes de Provence: III - L'Anse de Verdon. IV - L'Anse de Saint-Gervais (Golfe de Fos). *Tethys*, **3**, 283–319.
- Masso, J.M. 1978. La enfermedad de la glandula digestiva de la ostra (*Ostrea edulis* L.) en las rias bajas. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, **4**, 125–140.
- McLaughlin, S. M., Tall, B. D., Shaheen, A., Elsayed, E. E. i Faisal, M. 2000. Zoosporulation of a new *Perkinsus* species isolated from the gills of the softshell clam *Mya arenaria*. *Parasite (Paris, France)*, **7**(2), 115–122.

- Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, **1**, 135–145.
- Medzhitov, R. i Janeway, Jr. C.A. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, **9**, 4–9.
- Montes, J., Villalba, A., López, M. C., Carballal, M. J. i Mourelle, S. G. 1991. Bonamiasis in native flat oysters (*Ostrea edulis* L.) from two intertidal beds of the Ortigueira Estuary (Galicia, N.W. Spain) with different histories of oyster culture. *Aquaculture*, **93**, 213–224.
- Moore, M. N., Lowe, D. M. i Gee, J.M. 1978. Histopathological effects induced in *Mytilus edulis* by *Mytilicola intestinalis* and the histochemistry of the copepod intestinal cells. *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, **38**, 6–11.
- Morello, E. B., Frogliola, C., Atkinson, R. J. A. i Moore, P. G. 2006. L'effetto delle draghe idrauliche sul riaffossamento di alcuni molluschi (The effects of hydraulic dredging on the reburial of several molluscan species). *Biol. Mar.Mediterr.*, **13**, 610–613.
- Moschino, V., Deppieri, M. i M. G. Marin, 2003. Evaluation of shell damage to the clam *Chamelea gallina* captured by hydraulic dredging in the Northern Adriatic Sea. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, **60**, 393–401.
- Moschino, V. i Marin, M. G. 2006. Seasonal changes in physiological responses evaluation of 'well-being' in the Venus clam *Chamelea gallina* from the Northern Adriatic Sea. *Comparative Biochemistry Physiology - Part A: Molecular i Integrative Physiology*, **145**, 433–440.
- Moschino, V., Chicharo, L. i Marin, M. G. 2008. Effects of hydraulic dredging on the physiological response of the target species *Chamelea gallina* (Mollusca: Bivalvia): laboratory experiments field surveys. *Scientia Marina*, **72**, 493–501.
- Moss, J. A., Burreson, E. M., Cordes, J. F., Dungan, C. F., Brown, G. D., Wang, A., Wu, X. i Reece, K. S. 2007. Pathogens in *Crassostrea ariakensis* and other Asian oyster species: implications for non-native oyster introduction to Chesapeake Bay. *Dis. Aquat. Org.*, **77**, 207–223.
- Moss, J. A., Xiao, J. I. E., Dungan C. F. i Reece, K. S. 2008. Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. parasite in oysters of southern China. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **55**, 117–130.
- Murrell, A., Kleeman, S. N., Barker S. C i Lester, R. J. G. 2002. Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester and Davis, 1981 and *Perkinsus atlanticus* Azevedo, 1989 and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.*, **22**, 258–265.
- Naciri-Graven, Y., Martin, A. G., Baud, J. P., Renault, T. i Gerard, A. 1998. Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **224**(1), 91–107.
- Nojima, S. i Russo, G. F. 1989. Struttura della popolazione del bivalve *Chamelea gallina* (L.) in un fondo sabioso dell'isola de Ischia (golfo di Napoli). *Oebalia*, **15**, 189–201.
- Novoa, B., Posada, D. i Figueras, A. 2005. Polymorphisms in the sequences of *Marteilia* internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA genes (ITS-1) in Spain: genetic types are not related with bivalve hosts. *J. Fish. Dis.*, **28**, 331–338.

- OIE 2015. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-acuatico>.
- Oliver, L. M., Fisher, W. S., Ford, S. E., Calvo, L. M., Bureson, E. M., Sutton, E. B. i Gandy, J. 1998. *Perkinsus marinus* tissue distribution and seasonal variation in oysters *Crassostrea virginica* from Florida, Virginia and New York. *Dis. Aquat. Org.*, **34**, 51–61.
- Oliver, A. V. 2015. An ancient fishery of Banded dye-murex (*Hexaplex trunculus*): zooarchaeological evidence from the Roman city of Pollentia (Mallorca, Western Mediterranean). *Journal of Archaeological Science*, **54**, 1–7.
- Palmer, M., Pons, G. X. i Linde, M. 2004. Discriminating between geographical groups of a Mediterranean commercial clam (*Chamelea gallina* (L.): Veneridae) by shape analysis. *Fisheries Research*, **67**, 93–98.
- Paolini, M., Piccinetti, C. i Piccinetti Manfrin, G. 1998. Stock di Vongole (*Chamelea gallina* L.) nel Compartimento Marittimo de Ravenna (1984-1977). *Biol. Mar.Mediterr.*, **5**, 400–406.
- Park, K. I., Choi, K. S. i Choi, J. W. 1999. Epizootiology of *Perkinsus* sp. found in the manila clam, *Ruditapes philippinarum* in Komsae bay, Korea. *J. Korean Fish. Soc.*, **32**, 303–309.
- Park, K. I. i Choi, K. S. 2001. Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. *Aquaculture*, **203**, 9–22.
- Park, K.I., Park, J.K., Lee, J. i Choi, K.S. 2005. Use of molecular markers for species identification of Korean *Perkinsus* sp. isolated from Manila clams *Ruditapes philippinarum*. *Dis. Aquat. Org.*, **66**, 255–263.
- Park, K. I., Ngo, T. T., Choi, S. D., Cho, M. i Choi, K. S. 2006. Occurrence of *Perkinsus olseni* in the Venus clam *Protothaca jedoensis* in Korean waters. *Journal of invertebrate pathology*, **93**(2), 81–87.
- Pascual, S., Villalba, A., Abollo, E., Garcí, M., González, A. F., Nombela, M., Posada, D. i Guerra, A. 2010. The mussel *Xenostrobus securis*: a well-established alien invader in the Ria de Vigo (Spain, NE Atlantic). *Biological Invasions*, **12**(7), 2091–2103.
- Pecher, W. T., Alavi, M. R., Schott, E. J., Fernández-Robledo, J. A., Roth, L., Berg S. T. i Vasta, G. R. 2008. Assessment of the northern distribution range of selected *Perkinsus* species in eastern oysters (*Crassostrea virginica*) and hard clams (*Mercenaria mercenaria*) with the use of PCR-based detection assays. *J. Parasitol.*, **94**, 410–422.
- Pellumb, A., Ceschia, G. i Kapllan, S., 2006. First report of Marteiliosis in *Mytilus galloprovincialis* in Albania. *Ittiopatologia*, **3**, 47–52.
- Perkins F.O. i Menzel R.W. 1966. Morphological and cultural studies of a motile stage in the life cycle of *Dermocystidium marinum*. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.*, **56**, 23–30.
- Perkins, F. O. 1968. Fine structure of zoospores from *Labyrinthomyxa* sp. parasitizing the clam *Macoma balthica*. *Chesapeake Science*, **9**(3), 198–202.
- Perkins, F. O. 1976. Ultrastructure of sporulation in the European flat oyster pathogen, *Marteilia refringens* - taxonomic implications. *Journal of Protozoology*, **23**, 64–74.

Bibliografia

- Perkins, F.O. 1988. Parasite morphology, strategy, and evolution: Structure of protistan parasites found in bivalve molluscs. *Am. Fish. Soc. Special Pub.*, **18**, 93–111.
- Pichot, Y., Comps, M., Tigé, G., Grizel, H. i. Rabouin M.A. 1980. Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n. parasite nouveau de l'huitre plate *Ostrea edulis* L. *Revue Trav. Inst.(scient.Tech.) Pech. marit.*, **43**, 131–140.
- Polanco, E., Montes, J., Outón, M. J. i Meléndez, M. I. 1984. Situation pathologique du stock d'huitres plates en Galice (Espagne) en relation avec *Bonamia ostreae*. *Haliotis*, **14**(9), 1–95.
- Poppe, G. T. i Goto, Y. 1991. European Seashells Vol. 1 (Polyplacophora, Caudofoveata, Solenogastrea, Gastropoda). *Conchbooks*, Darmstad.
- Poppe, G. T. i Goto, Y. 1993. European Seashells Vol. II (Scaphopoda, Bivalva, Cephalopoda). *Conchbooks*, Darmstad.
- Powell, E. N., Klinck, J. M. i Hofmann, E. E. 1997. Modeling diseased oyster populations. 2. Triggering mechanisms for *Perkinsus marinus* epizootics. *J. Shellfish Res.*, **15**, 141–165.
- Prioli, G., Fiori, F. i Mietti, N. 1998. Sperimentazione della gestione dei moluschi bivalvi nel Compartimento di Chioggia. Novembre 1997 - Aprile 1997. *Biol. Mar. Mediterr.*, **5**, 418–427.
- Ragone, L. M. i Burreson, E. M., 1994. Characterization of overwintering infections of *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) in Chesapeake Bay oysters. *J. Shellfish Res.*, **13**, 123–130.
- Ragone-Calvo, L. M., Calvo, G. W. i Burreson, E. M. 2003a. Dual disease resistance in a selectively bred eastern oyster, *Crassostrea virginica*, strain tested in Chesapeake Bay. *Aquaculture*, **220**(1), 69–87.
- Ragone-Calvo L. M., Dungan C. F., Roberson B. S. i Burreson E. M., 2003b. Systematic evaluation of factors controlling *Perkinsus marinus* transmission dynamics in lower Chesapeake Bay. *Dis. Aquat. Org.*, **56**, 75–86.
- Ramilo A., Villalba, A., Ceschia, G. i Abollo, E. 2010. Molecular identification of *Perkinsus* species (Protozoa) infecting commercial bivalves in Mediterranean waters. *Aquaculture Europe 2010*. 1077–1078.
- Ramilo, A., Iglesias, D., Abollo, E., González, M., Darriba, S. i Villalba, A. 2014. Infection of Manila clams *Ruditapes philippinarum* from Galicia (NW Spain) with a *Mikrocytos*-like parasite. *Diseases of aquatic organisms*, **110**(1), 71–79.
- Ramilo, A., Carrasco, N., Reece, K. S., Valencia, J. M., Grau, A., Aceituno, P., Rojas, M., Gairin, I., Furomes, M. D., Abollo, E. i Villalba, A. 2015. Update of information on perkinsosis in NW Mediterranean coast: Identification of *Perkinsus* spp.(Protista) in new locations and hosts. *Journal of invertebrate pathology*, **125**, 37–41.
- RASVE (Red de Alerta Sanitaria Veterinaria).
http://rasve.magrama.es/RASVE_2008/Publica/Focos/Consulta.aspx
- Ray, S. M., 1952. A culture technique for the diagnosis of infection with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owell and Collier in oysters. *Science*, **116**, 360–361.

- Ray, S. M. 1954. Biological studies of *Dermocystidium marinum*. *Rice Inst. Pamphlet*, **41**, 1–114.
- Ray, S. M. 1966a. A review of the culture method of detecting *Dermocystidium marinum* with suggested modifications and precautions. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.*, **54**, 55–69.
- Ray, S. M., 1966b. Historical perspective on *Perkinsus marinus* disease of oysters in the Gulf of Mexico. *J. Shellfish Res.*, **15**, 9–11.
- Reece, K. S., Siddall, M. E., Bureson, E. M. i Graves, J. E. 1997. Phylogenetic analysis of *Perkinsus* based on actin gene sequences. *J. Parasitol.*, **83**, 417–423.
- Reece, K. S., Dungan, C. F. i Bureson, E. M. 2008. Molecular epizootiology of *Perkinsus marinus* and *P. chesapeakei* infections among wild oysters and clams in the Chesapeake Bay, USA. *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 237–248.
- Rield, R. 1986. Fauna y Flora del Mar Mediterráneo. *Omega*, Barcelona.
- Robert, R., Borel, M., Pichot, Y. i Trut, G. 1991. Growth mortality of the European oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). *Aquatic Living Resources*, **4**, 265–274.
- Robledo, J. A. F., Boulo, V., Mialhe, E., Desprès, B. i Figueras, A. 1994a. Monoclonal antibodies against sporangia and spores of *Marteilia* sp. (Protozoa: Asctospora). *Diseases of aquatic organisms*, **18**, 211–216.
- Robledo, J. A. F., Santarém, M. M. i Figueras, A. 1994b. Parasite loads of rafted blue mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Spain with special reference to the copepod, *Mytilicola intestinalis*. *Aquaculture*, **127**, 287–302.
- Robledo, J. A.F, Caceres-Martinez, J. i Figueras, A. 1994c. *Marteilia refringens* in mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck) beds in Spain. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.*, **14**, 61–63.
- Robledo J. A. E., Mialhe E. i Figueras A. 1995. Purification of several phases of the parasite *Marteilia* (Protozoa: Asctospora) from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Techniques in fish immunology*, **4**, 117–121.
- Rodellas, V., Garcia-Orellana, J., Masqué, P., Feldman, M. i Weinstein, Y. 2015. Submarine groundwater discharge as a major source of nutrients to the Mediterranean Sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**(13), 3926–3930.
- Rodríguez, F., Godoy, T. i Navas, J. I., 1994. Cross-infection with *Perkinsus atlanticus* in *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum* and *Venerupis pullastra*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **14**, 24–27
- Rogier, H., Hervio, D., Boulo, V., Clavies, C., Hervaud, E., Bachère, E., Mialhe, E., Grizel, H, Pau, B. i Paolucci, F. 1991. Monoclonal antibodies against *Bonamia ostreae* (Protozoa: Asctospora), an intrahaemocytic parasite of flat oyster *Ostrea edulis* (Mollusca: Bivalvia). *Diseases of aquatic organisms*, **11**(2), 135–142.
- Romanelli, M., Cordisco, C. A. i Giovanardi, O. 2009. The long-term decline of the *Chamelea gallina* L. (Bivalvia: Veneridae) clam fishery in the Adriatic Sea: is a synthesis possible? *Acta Adriat.*, **50**, 171–205.
- Rosenblum, E. S., Juhasz, C., Friedman, C. S., Robbins, T. T., Craigmill, A., Tjeerdema, R. S. i Moore, J. D. 2008. Oxytetracycline as a treatment for abalone withering syndrome Part

- II: Efficacy, pharmacokinetics, and long term resistance to re-infection at elevated sea water temperatures. *Aquaculture*, **277**(3–4), 138–148.
- Royo, A., 1997. Efecto de la draga hidráulica en el comportamiento de las chirlas (*Chamelea gallina* L.) (Bivalvia: Veneridae) no comercializadas: siembra en estanques de semillas. *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura*, 263–268.
- Sabry, R. C., Rosa, R. D., Magalhaes, A. R. M., Barracco, M. A., Gesteira, T. C. V. i da Silva, P. M. 2009. First report of *Perkinsus* sp. infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Brazilian coast. *Dis. Aquat. Org.*, **88**, 13–23.
- Saldarriaga, J. F., McEwan, M. L., Fast, N. M., Taylor, F. J. i Keeling, P. J. 2003. Multiple protein phylogenies show that *Oxyrrhis marina* and *Perkinsus marinus* are early branches of the dinoflagellate lineage. *Internat. J. System. Evolut. Microbiol.*, **53**, 355–365.
- Sanil, N. K., Vijayan, K. K., Kripa, V. i Mohamed, K. S. 2010. Occurrence of the protozoan parasite, *Perkinsus olseni* in the wild and farmed pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould) from the southeast coast of India. *Aquaculture*, **299**, 8–14.
- Sanil, N. K., Suja, G., Lijo J. i Vijayan, K. K. 2012. First report of *Perkinsus beihaiensis* in *Crassostrea madrasensis* from the Indian subcontinent. *Dis. Aquat. Org.*, **98**, 209–220.
- Santmartí, M. M., García-Valero, J., Montes, J. F., Pech A. i Durfort, M. 1995. Seguimiento del protozoo *Perkinsus* sp., en las poblaciones de *Tapes decussatus* y *Tapes semidecussatus* del delta del Ebro. *Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura*, 260–265.
- Scanlon C. H., Ragone Calvo, L.M. i Burreson E.M., 1997. The potential for transmission of *Perkinsus marinus* by faecal matter from the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.*, **16**, 332.
- Serracca, L., Prearo, M., Rossini, I., Battistini, R., Corsi, M. i Ercolini, C. 2014. Four-year surveillance of *Marteilia refringens* in shellfish farms in the gulf of La Spezia (Liguria, Italy). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **14**, 893–896.
- Sheppard, B.J. i Phillips, A. C. 2008. *Perkinsus olseni* detected in Vietnamese aquacultured reef clams *Tridacna crocea* imported to the USA, following a mortality event. *Dis. Aquat. Org.*, **79**, 229–235
- Siddall, M. E., Reece, K. S., Graves, J. E. i Burreson, E. M. 1997: ‘Total evidence’ refutes the inclusion of *Perkinsus* species in the phylum Apicomplexa. *Parasitol.*, **2**, 165–176.
- Silva, L., 2010. Informe sobre la situación de los caladeros de chirla en el golfo de Cádiz y análisis del descenso de las capturas comerciales. *IEO Centro Oceanográfico de Cádiz*.
- Soniat, T. M., 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of eastern oysters in the Gulf of Mexico. *J. Shellfish Res.*, **15**, 35–44.
- Tajima, F. i Nei, M. 1984, Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.*, **1**, 269–285.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. i Kumar, S. 2011, MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, **28**, 2731–2739.

- Thébault A., Baud J. P., Le Saux J. C., Le Roux F., Chollet B., Le Coguic M. J., Fleury P. G., Berthe F. i Gerard A. 1999. Compte rendu sur les mortalité de juillet 1999 des moules (*Mytilus edulis*) en poches dans l'Aber Benoît. *Rapport IFREMER*. 12 p.
- Thébault A., Bergmann S., Pouillot S., Le Roux F. i Berthe F.C.J. 2005. Validation of *in situ* hybridization and histology assays for the detection of the oyster parasite *Marteilia refringens*. *Dis. Aquat. Org.*, **65**(1), 9–16.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. i Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673–4680.
- Tieri, E., Ceschia, G., Cannone, N. i Giansante, C. 2006. Presence of *Marteilia refringens* in European flat oysters (*Ostrea edulis*) natural bank in the Adriatic Sea, Italy. *Ittiopatologia*, **3**, 41–45.
- Tigé, G., Grizel, H. i Comps, M. 1980. Données sur le nouveau parasite de l'huitre plate. Situation épidémiologique. *CIEM Conseil International pour l'Exploration de la mer*.
- Trut, G., Robert, R. i Laborde, J. L. 1994. Croissance et mortalité du petoncle noir dans le bassin d'Arcachon (France). Rapport Interne Ifremer Del/94.04/Arcachon - Drv/Ra/94-05. Ifremer. Arcachon, Francia, 36 pp.
- Unió Europea. 1984. Reglament (CEE) n° 2108/84 de la Comisió, de 23 de julio de 1984, pel qual se preveuen normes detallades per a la determinació de la mida de les malles de les xarxes de pesca. *Diari Oficial de les Comunitats Europees*, núm. 194, de 24 de juliol de 1984.
- Unió Europea. 1992. Directiva 92/43/CEE del Consell de 21 de maig de 1992 relativa a la conservació dels hàbitats naturals i de la fauna i flora silvestres. *Diari Oficial de les Comunitats Europees*, n°: 206, de 22 de juliol de 1992.
- Unió Europea. 1994. Reglament (CE) núm. 1626/94 del Consell de 27 de juny de 1994 pel qual s'estableixen determinades mesures tècniques de conservació dels recursos pesquers en el Mediterrani. *Diari Oficial de les Comunitats Europees*, núm. 171, de 6 de julio de 1994. (Derogado por el Reglamento (CE) n° 1967/2006).
- Unió Europea. 2006. Directiva 2006/88/CE del Consell de 24 d'octubre de 2006 relativa als requisits zoonosanitaris dels animals i dels productes de l'aqüicultura, i a la prevenció i el control de determinades malalties dels animals aquatics. *Diari Oficial de les Comunitats Europees*, núm. 328, de 24 d'octubre de 2006.
- Valencia, J. M. 2010. Second record of *Perkinsus mediterraneus* in Balearic Islands, Spain, Western mediterranean. *Aquaculture Europe 2010*, 1326–1327.
- Valencia, J. M., Bassitta, M., Picornell, A., Ramon, C. i Castro, J. A. 2014. New data on *Perkinsus mediterraneus* in the Balearic Archipelago: locations and affected species. *Diseases of aquatic organisms*, **112**(1), 69–82.
- Valiulis, G. A. i Mackin, J. G., 1969. Formation of sporangia and zoospores by *Labyrinthomyxa* sp. parasitic in the clam *Macoma baltica*. *J. Invertebr. Pathol.*, **14**, 268–270.
- Valli, G., Nodari, P. i Zecchini-Pinesich, G. 1981. Statistical observation on fishing of *Chamelea gallina* (L.) other mollusca bivalvia gastropoda of Gulf of Trieste. *Nova Thalassia*, **5**, 75–96.

- Valli, G. i Zecchini-Pinesich, G. 1982. Considerazioni sulla biometria e la riproduzione di *Chamelea gallina* (L.) (Mollusca, Bivalvia) del Golfo di Trieste (Alto Adriatico) (Some aspects of reproduction biometry of *Chamelea gallina* L., Mollusca Bivalvia, in the Gulf of Trieste). *Nova Thalassia*, **5**, 57–73.
- Valli, G., Zardini, D. i Nodari, P. 1985. Cycle reproductif et biométrie chez *Chamelea gallina* L. (Mollusca: Bivalvia) dans le Golfe de Trieste. *Rapp. Reun. Comm. Int. Mer Médit.*, **29**, 339–340.
- Van Banning, P. 1985. Control of *Bonamia* in Dutch oyster culture. *Fish Shellfish Pathology*, 393–396.
- Vilas, R., Cao, A., Pardo, B. G., Fernandez, S., Villalba, A. i Martínez, P. 2011. Very low microsatellite polymorphism and large heterozygote deficits suggest founder effects and cryptic structure in the parasite *Perkinsus olseni*. *Infect. Genet. Evol.*, **11**, 904–911.
- Villalba, A., Mourelle, S. G., Lopez, M. C., Carballal, M. J., Azevedo, C. 1993a. Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW Spain). I: Etiology, phases of the infection, temporal spatial variability in prevalence. *Dis. Aquat. Org.*, **16**, 61–72.
- Villalba, A., Mourelle, S. G., Carballal, M. J. i Lopez, M. C. 1993b. Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*, **17**, 205–213.
- Villalba, A., Mourelle, S. G., Carballal, M. J. i López, C. 1997. Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rías de Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*, **31**, 127–139.
- Villalba, A., Reece, K. S., Camino Ordás, M., Casas, S. M. i Figueras, A. 2004. Perkinsosis in molluscs: A review. *Aquat. Living Resour.*, **17**, 411–432.
- Villalba, A., Casas, S. M., López, C. i Carballal, M. J. 2005. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 257–267.
- Villalba, A., Iglesias, D., Ramilo, A., Darriba, S., Parada, J. M., No, E., Abollo, E., Molaes, J. i Carballal, M. J. 2014. Cockle *Cerastoderma edule* fishery collapse in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain) associated with the protistan parasite *Marteilia cochillia*. *Dis. Aquat. Org.*, **109**, 55–80.
- Virvilis, C., Angelidis, P. i Photis, G. 2003. Presence of the parasite *Marteilia* sp. in the shellfish of the Thermaikos Gulf in Northern Greece. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **23**, 157–162.
- Vizuete, F., Martínez, P., Más, J. i Faraco, F. 1990. Estudio del banco natural de chirla (*Chamelea gallina* L., 1758) de San Ginés (T. M. Cartagena). *Serie Estudios*, **6**, 47–70.
- Vizuete, F., Martínez, P. i Mas, J. 1993. Estudio del ciclo reproductivo de *Chamelea gallina* L., en la bahía de Mazarrón (SE de la península Ibérica). *Publ. Espec. Inst. Esp. Oceanogr.*, **11**, 49–55.
- Volety A. K. i Chu F. L. E. 1994. Comparison of infectivity and pathogenicity of two life stages, meront (trophozoite) and prezoosporangia stages of the oyster pathogen

Perkinsus marinus in Eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin 1971). *J. Shellfish Res.*, **13**, 521–527.

WAHID (World Animal Health Information Database).
http://www.oie.int/wahis_2/wah/health_v7_en.php

Wijayalath, W., Majji, S., Kleschenko, Y., Pow-Sang, L., Brumeanu, T. D., Villasante, E. F., Vasta, R. V., Fernández-Robledo, J. A. i Casares, S. 2014. Humanized HLA-DR4 mice fed with the protozoan pathogen of oysters *Perkinsus marinus* (Dermo) do not develop noticeable pathology but elicit systemic immunity. *PloS one*, **9**(1), doi: [10.1371/journal.pone.0087435](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087435)

Wilson, I. G., 1997. Inhibition facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3741–3751.

Zhang, X, Liang, Y., Fan, J., Zhang, W., Pu, H., Liang, B., Chen, H. i Song, L. 2005. Identification of *Perkinsus*-like parasite in Manila clam, *Ruditapes philippinarum* using ADN molecular marker at ITS region. *Acta Oceanologica Sinica*, **24**, 139–144.

Zenetos A., Gofas, S., Rosso, G. i Templado, J. 2003. CIESM Atlas of exotic species in the Mediterranean. *CIESM Publishers*, Monaco.

Zrncic, S., Le Roux, F., Oraic, D., Sostaric, B. i Berthe, F. C. 2001. First record of *Marteilia* sp. in mussels *Mytilus galloprovincialis* in Croatia. *Dis. Aquat. Organ.*, **44**, 143–148.

ANNEXOS

Annex fotogràfic.

Es presenten les espècies citades al text de la tesi, ordenades alfabèticament.

Totes les fotografies són de l'autor, excepte:

¹ *opistobranchia.myspecies/info*

² *Paula Lightfoot Flickr.com*

³ *datuopinion.com*

⁴ *el rincon del malacologo.com*

⁵ *www.natgeocreative.com*

⁶ *Elvira Álvarez*

⁷ *surfcastingcadiz.mforos.com*

⁸ *Vladim, naturamediterraneo.com*

⁹ *Jose Sanchez, flickr.com*

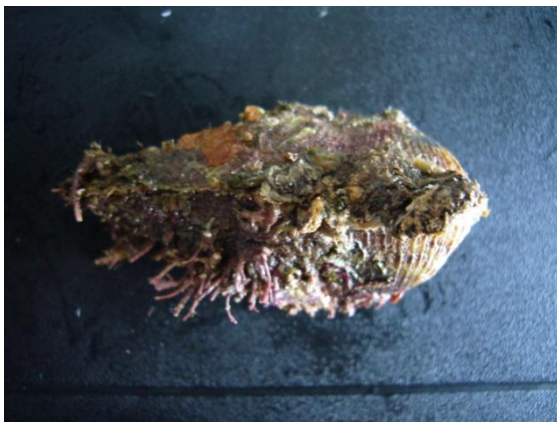
¹⁰ *Robert Patzner maestropescador.com*



Albunea carabus



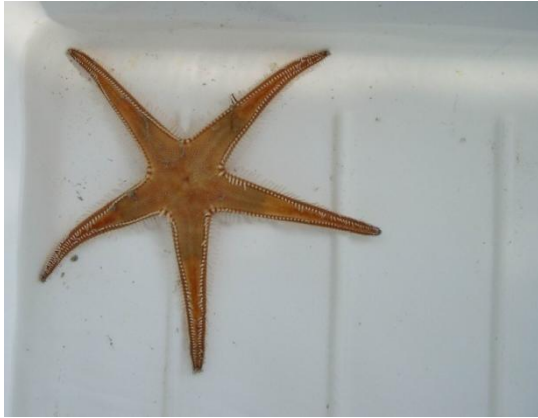
Anemonia sulcata - ortiga



Arca noae - Peu de cabrit



Ariosoma balearicum



Astropecten bispinosus



Astropecten johnstoni



Astropecten spinulosus



Bothus podas



Buccinulum corneum



*Bursatella leachi*¹



Callista chione



Cerastoderma edule – Escopinya de gallet



Cerebratulus marginatus



Chamelea gallina - Rossellona



Dasyatis sp



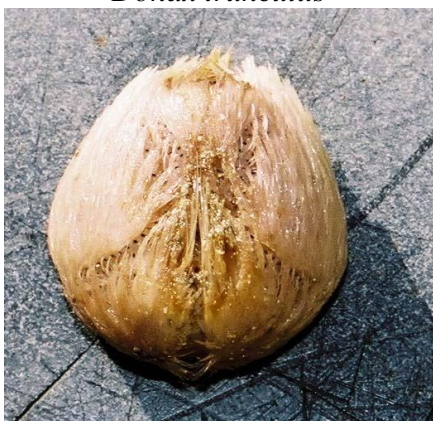
Diogenes pugilator



Donax trunculus



Dosinia lupinus



Echinocardium mediterraneum



Ensis minor



Epitonium clathrus



Glycera tridactyla



Halla parthenopeia



Hexaplex trunculus - Corn de tap



*Hinia incrassata*²



Holothuria sp.



Laevicardium crassum



Leptosynastra inhaerens



Lima lima



Limaria inflata



Liocarcinus depurator



Lithophaga lithophaga - Dàtil de mar



Lythognatus mormyrus - Marbre



Mactra corallina



Mimachlamys varia - Romera



Mullus surmuletus



Murex brandaris- corn amb pues



Mytilus galloprovincialis - Musclo



Naticarius cruentatum



Octopus vulgaris



*Ophidion sp*³



Ophiura ophiura



Ostrea edulis - Ostra plana⁴



Pandora inaequalvis



Paracentrotus lividus - Bogamarí



Pectunculus violacescens



*Penaeus kerathurus*⁵



Phascolosoma sp



Pinna nobilis – Nacra⁶



Portunus hastatus



Rudicardium tuberculatum - Corruco



Ruditapes decussatus – Escopinya llisa



Sabella pavonina



Sipunculus nudus



Solea sp.



Sphaeronassa mutabilis



Spisula subtruncata



Spondylus gaederopus – *Ostra vermella* ⁷



Squilla mantis ⁸



Tellina incarnata



Tellina nitida



Tellina planata



*Thais haemastoma*⁹



*Trachinus draco*¹⁰



Venerupis sp



Venus verrucosa - Escopinya gravada

*Seqüències obtingudes.**Marteilia refringens.***AM292652:**

cgatcgagta agtgcgatgca caactcgaca accgacaaat ccaatgctcc tcgaaggggc
 tatcgaagtt gtgggtgctc cgggtgctga tcttccaacc tctctcccgt atctaccggc
 ttctgcaaac acgttcgatc gtggctgcct atatttccag tcggtagatt cgggacgacg
 gctgacaaga tcacccggac acccgccgac tttctcaagc ggcacgcat caacagggta
 tgttggtcca tagctggctg ctctgtggc acttcgagtg ctatgcatca gcagcagcca
 tgcgtgtggt tcacgagtcg aatagagtcc tatgtggaaa ggctacggtc gtagtggtg

*Perkinsus mediterraneus.***H01:****KJ569310.**

cccacctgag cgccttaacc ggtttgcttc gggtgattat ctctatgaa ccattgtact
 agtcacagta tccaaatcct ttttgattt tggatattca aaacgaaatt ccaaactctc
 aacgatggat gcctcggctc gagaatcgat gaaggacgca gcgaagtgcg ataagcactg
 cgatttgacg aattccgtga accagtagaa atctcaacgc atactgcaca aaggggatct
 ttcctctttg tacatacata tcagtgtcgc tcttcttccc gatacaaaca ttttgttggt
 aacgcaactc aatgctttgt atcccgcttg ggctgactct cttttgagcc agttcgttat
 gtgcgcttgat gaaagcaggc gtatcaattt gcaaggctat aatctattcc atagtttgta
 gcccctccga aaggaggatt ggcctgtga gcatctttgg atgctcgca actcgactgt
 gttgtggtga tatcacgtgt tccttgatca cgcgattctt ctcttcaacg cattatgtca
 aatcttgata aatgcagaga agtgtttga tcacgcgttc agtctggctg cgagatagtt
 atatatcata gcacgcttg cgtttgac catggcaatt tgt

H02:**KJ569311.**

cccacctgag cgccttaacc ggtttgcttc gggtgattat ctctatgaa ccattgtact
 agtcacagta tccaaatcct ttttgattt tggatattca aaacgaaatt ccaaactctc
 aacgatggat gcctcggctc gagaatcgat gaaggacgca gcgaagtgcg ataagcactg
 cgatttgacg aattccgtga accagtagaa atctcaacgc atactgcaca aaggggatct
 ttcctctttg tacatacata tcagtgtcgc tcttcttccc gatacaaaca ttttgttggt
 aacgcaactc aatgctttgt atcccgcttg ggctgactct cttttgagcc agttcgttat
 gtgcgcttgat gaaagcaggc gtattaattt gcaaggctat aatctatttt atagtttgta
 gcccctccga aaggaggatt ggcctgtga gcatctttgg atgctcgca actcgactgt
 gttgtggtga tatcacgtgt tccttgatca cgcgattctt ctcttcaacg cattatgtca
 aatcttgata aatgcagaga agtgtttga tcacgcgttc agtctggctg cgagatagtt
 atatatcata gcacgcttg cgtttgac catggcaatt tgt

H03:

KJ569312, KJ569313, KJ569314, KJ569315, KJ569317, KJ569319, KJ569320, KJ569321, KJ569322, KJ569324, KJ569326, KJ569327, KJ569328, KJ569329, KJ569330, KJ569332, KJ569333, KJ569335, KJ569336, KJ569340, KJ569341, KJ569343, KJ569345, KJ569346, KJ569348, KJ569351, KJ569353, KJ569355, KJ569358, KJ569359, nacara (sense enviar al GenBank).

```
cccacctgag cgccttaacc ggtttgcttc gggtgattat ctccatgaa ccattgtact
agtcacagta tccaaatcct ttttgattt tggtatttca aaacgaaatt ccaaactctc
aacgatggat gcctcggctc gagaatcgat gaaggacgca gcgaagtgcg ataagcactg
cgatttgcag aattccgtga accagtagaa atctcaacgc atactgcaca aaggggatct
ttcctctttg tacatacata tcagtgtcgc tcttcttccc gatacaaaca ttttgttggt
aacgcaactc aatgctttgt atcccgttg ggctgactct cttttgagcc agttcgttat
gtgcgcttgt gaaggcaggc gtattaattt gcaaggctat aatctatttc atagtttgta
gcccctccga aaggaggatt gcgcctgtga gcatctttgg atgctcgcaa actcgactgt
gttgtgggtga tatcacgtgt tccttgatca cgcgattctt ctcttcaacg cattatgtca
aatcttgata aatgcagaga agtgtttga tcacgcgttc agtctggtcg cgagatagtt
atatatcata gcacgcttgt cggtttgcac catggcaatt tgt
```

H04:

KJ569316, KJ569334.

```
cccacctgag cgccttaacc ggtttgcttc gggtgattat ctccatgaa ccattgtact
agtcacagta tccaaatcct ttttgattt tggtatttca aaacgaaatt ccaaactctc
aacgatggat gcctcggctc gagaatcgat gaaggacgca gcgaagtgcg ataagcactg
cgatttgcag aattccgtga accagtagaa atctcaacgc atactgcaca aaggggatct
ttcctctttg tacatacata tcagtgtcgc tcttcttccc gatacaaaca ttttgttggt
aacgcaactc aatgctttgt atcccgttg ggctgactct cttttgagcc agttcgttat
gtgcgcttgt gaaggcaggc gtattaattt gcaaggctat aatctattcc atagtttgta
gcccctccga aaggaggatt gcgcctgtga gcatctttgg atgctcgcaa actcgactgt
gttgtgggtga tatcacgtgt tccttgatca cgcgattctt ctcttcaacg cattatgtca
aatcttgata aatgcagaga agtgtttga tcacgcgttc agtctggtcg cgagatagtt
atatatcata gcacgcttgt cggtttgcac catggcaatt tgt
```

H05:

KJ569318, KJ569347.

```
cccacctgag cgccttaacc ggtttgcttc gggtgattat ctccatgaa ccattgtact
agtcacagta tccaaatcct ttttgattt tggtatttca aaacgaaatt ccaaactctc
aacgatggat gcctcggctc gagaatcgat gaaggacgca gcgaagtgcg ataagcactg
cgatttgcag aattccgtga accagtagaa atctcaacgc atactgcaca aaggggatct
ttcctctttg tacatacata tcagtgtcgc tcttcttccc gatacaaaca ttttgttggt
aacgcaactc aatgctttgt atcccgttg ggctgactct cttttgagcc agttcgttat
gtgcgcttgt gaaggcaggc gtatcaattt gcaaggctat aatctatttc atagtttgta
gcccctccga aaggaggatt gcgcctgtga gcatctttgg atgctcgcaa actcgactgt
gttgtgggtga tatcacgtgt tccttgatca cgcgattctt ctcttcaacg cattatgtca
aatcttgata aatgcagaga agtgtttga tcacgcgttc agtctggtcg cgagatagtt
```

atatatcata gcacgcttgt cggtttgcac catggcaatt tgt

H06:

KJ569323, KJ569338.

cccacctgag cgcttaacc ggtttgcttc gggtgattat ctctatgaa ccattgtact
 agtcacagta tccaaatcct ttttgattt tggtatttca aaacgaaatt ccaaactctc
 aacgatggat gcctcggctc gagaatcgat gaaggacgca gcgaagtgcg ataagcactg
 cgatttgcag aattccgtga accagtagaa atctcaacgc atactgcaca aaggggatct
 ttcctctttg tacatacata tcagtgtcgc tcttcttccc gatacaaaca ttttgttggt
 aacgcaactc aatgctttgt atcccgttg ggctgactct cttttgagcc agttcgttat
 gtgcgcttgt gaaggcaggc gtattaattt gcaaggctat aatctattcc atagtttgta
 gcccctccga aaggaggatt gcgcctgtga gcatctttgg atgctcgcaa actcgactgt
 gttgtgggtga tatcacgtgt tccttgatca cgcgattctt ctcttcaacg cattatgtca
 aatcttgata aatgcagaga agtgtttggg tcacgcgttc agtctggctc cgagatagtt
 atatatcata gcacgcttgt cggtttgcac catggcaatt tgt

H07:

KJ569325.

cccacctgag cgcttaacc ggtttgcttc gggtgattat ctctatgaa ccattgtact
 agtcacagta tccaaatcct ttttgattt tggtatttca aaacgaaatt ccaaactctc
 aacgatggat gcctcggctc gagaatcgat gaaggacgca gcgaagtgcg ataagcactg
 cgatttgcag aattccgtga accagtagaa atctcaacgc atactgcaca aaggggatct
 ttcctctttg tacatacata tcagtgtcgc tcttcttccc gatacaaaca ttttgttggtc
 aacgcaactc aatgctttgt atcccgttg ggttgactct cttttgagcc agttcgttat
 gtgcgcttgt gaaggcaggc gtattaattt gcaaggctat aatctatttc atagtttgta
 gcccctccga aaggaggatt gcgcctgtga gcatctttgg atgctcgcaa actcgactgt
 gttgtgggtga tgcacgtgt tccttgatca cgcgattctt ctcttcaacg cattatgtca
 aatcttgata aatgcagaga agtgtttggg tcacgcgttc agtctggctc cgagatagtt
 atatatcata gcacgcttgt cggtttgcac catggcaatt tgt

H08:

KJ569331, KJ569342, KJ569344, KJ569349, KJ569360.

cccacctgag cgcttaacc ggtttgcttc gggtgattat ctctatgaa ccattgtact
 agtcacagta tccaaatcct ttttgattt tggtatttca aaacgaaatt ccaaactctc
 aacgatggat gcctcggctc gagaatcgat gaaggacgca gcgaagtgcg ataagcactg
 cgatttgcag aattccgtga accagtagaa atctcaacgc atactgcaca aaggggatct
 ttcctctttg tacatacata tcagtgtcgc tcttcttccc gatacaaaca ttttgttggt
 aacgcaactc aatgctttgt atcccgttg ggctgactct cttttgagcc agttcgttat
 gtgcgcttgt gaaagcaggc gtattaattt gcaaggctat aatctatttc atagtttgta
 gcccctccga aaggaggatt gcgcctgtga gcatctttgg atgctcgcaa actcgactgt
 gttgtgggtga tatcacgtgt tccttgatca cgcgattctt ctcttcaacg cattatgtca
 aatcttgata aatgcagaga agtgtttggg tcacgcgttc agtctggctc cgagatagtt
 atatatcata gcacgcttgt cggtttgcac catggcaatt tgt

H09:

KJ569337, KJ569350.

cccacctgag cgccttaacc ggtttgcttc gggtgattat ctccatgaa ccattgtact
agtcacagta tccaaatcct ttttggattt tggatattca aaacgaaatt ccaaactctc
aacgatggat gcctcggctc gagaatcgat gaaggacgca gcgaagtgcg ataagcactg
cgatttgacag aattccgtga accagtagaa atctcaacgc atactgcaca aaggggatct
ttcctctttg tacatacata tcagtgtcgc tcttcttccc gatacaaaca ttttgttggt
aacgcaactc aatgctttgt atcccgttg ggctgactct cttttgagcc agttcgttat
gtgcgcttgt gaaagcaggc gtatcaattt gcaaggctat aatctatttc atagtttgta
gcccctccga aaggaggatt gcgcctgtga gcatctttgg atgctcgcaa actcgactgt
gttgtggtga tatcacgtgt tccttgatca cgcgattctt ctcttcaacg cattatgtca
aatcttgata aatgcagaga agtgtttga tcacgcgttc agtctggtcg cgagatagtt
atatacata gcacgcttgt cggtttgac catggcaatt tgt

H10:

KJ569339, KJ569354, KJ569356.

cccacctgag cgccttaacc ggtttgcttc gggtgattat ctccatgaa ccattgtact
agtcacagta tccaaatcct ttttggattt tggatattca aaacgaaatt ccaaactctc
aacgatggat gcctcggctc gagaatcgat gaaggacgca gcgaagtgcg ataagcactg
cgatttgacag aattccgtga accagtagaa atctcaacgc atactgcaca aaggggatct
ttcctctttg tacatacata tcagtgtcgc tcttcttccc gatacaaaca ttttgttggt
aacgcaactc aatgctttgt atcccgttg ggctgactct cttttgagcc agttcgttat
gtgcgcttgt gaaggcaggc gtattaattt gcaaggctat aatctattcc atagtttgta
gcccctccga aaggaggatt gcgcctgtga gcatctttgg atgctcgcaa actcgactgt
gttgtggtga tatcacgtgt tccttgatca cgcgattctt ctcttcaacg cattatgtca
aatcttgata aatgcagaga agtgtttga tcacgcgttc agtctggtcg cgagatagtt
atatacata gcacgcttgt cggtttgac catggcaatt tgt

H11:

KJ569352.

cccacctgag cgccttaacc ggtttgcttc gggtgattat ctccatgaa ccattgtact
agtcacagta tccaaatcct ttttggattt tggatattca aaacgaaatt ccaaactctc
aacgatggat gcctcggctc gagaatcgat gaaggacgca gcgaagtgcg ataagcactg
cgatttgacag aattccgtga accagtagaa atctcaacgc atactgcaca aaggggatct
ttcctctttg tacatacata tcagtgtcgc tcttcttccc gatacaaaca ttttgttggt
aacgcaactc aatgctttgt atcccgttg ggctgactct cttttgagcc agttcgttat
gtgcgcttgt gaaggcaggc gtatcaattt gcaaggctat aatctatttc atagtttgta
gcccctccga aaggaggatt gcgcctgtga gcatctttgg atgctcgcaa actcgactgt
gttgtggtga tatcacgtgt tccttgatca cgcgattctt ctcttcaacg cattatgtca
aatcttgata aatgcagaga agtgtttga tcacgcgttc agtctggtcg cgagatagtt
atatacata gcacgcttgt cggtttgac catggcaatt tgt

H12:

KJ569357.

```
cccacctgag cgccttaacc ggtttgcttc gggtgattat ctcctatgaa ccattgtact
agtcacagta tccaaatcct ttttgattt tggtatttca aaacgaaatt ccaaactctc
aacgatggat gcctcggctc gagaatcgat gaaggacgca gcgaagtgcg ataagcactg
cgatttgcag aattccgtga accagtagaa atctcaacgc atactgcaca aaggggatct
ttcctctttg tacatacata tcagtgtcgc tcttcttccc gatacaaaca ttttgttggt
aacgcaactc aatgctttgt atcccgttg ggttgactct cttttgagcc agttcgttat
gtgcgcttgt gaaagcaggc gtattaattt gcaaggctat aatctatttc atagtttgta
gcccctccga aaggaggatt gcgcctgtga gcatctttgg atgctcgcaa actcgactgt
gttgtgggta tatcacgtgt tccttgatca cgcgattctt ctcttcaacg cattatgtca
aatcttgata aatgcagaga agtgtttga tcacgcgttc agtctggtcg cgagatagtt
atatacata gcacgcttgt cggtttgac catggcaatt tgt
```