

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Zoología y Antropología Física



APORRECTODEA TRAPEZOIDE (DUGÈS, 1828)
(OLIGOCHAETA, LUMBRICIDAE): FILOGEOGRAFÍA,
FILOGENIA Y BIOLOGÍA REPRODUCTIVA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Rosa María Fernández García

Bajo la dirección de los doctores

J. Díaz Cosín
Ana Almodóvar Pérez

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA Y
ANTROPOLOGÍA FÍSICA



***Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828)**
(Oligochaeta, Lumbricidae): Filogeografía,
Filogenia y Biología Reproductiva.

Memoria que presenta

ROSA MARÍA FERNÁNDEZ GARCÍA

para optar al grado de Doctor

por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Julio de 2011'

DARÍO J. DÍAZ COSÍN Y ANA ALMODÓVAR PÉREZ, PROFESORES DEL DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA Y ANTROPOLOGÍA FÍSICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada '*Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828)(Oligochaeta, Lumbricidae): Filogeografía, Filogenia y Biología reproductiva', que para optar al Título de Doctora en Biología presenta Rosa María Fernández García, ha sido realizada en el Departamento de Zoología y Antropología Física de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid bajo nuestra dirección. Y considerando que representa trabajo de Tesis, autorizamos su presentación a la Junta de Facultad.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado.

Madrid, 8 de Julio de 2011'.

Darío J. Díaz Cosín

Ana Almodóvar Pérez

Rosa María Fernández García

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por una beca de Formacion de Personal Investigador (FPI) concedida por la Universidad Complutense de Madrid.

Los estudios realizados han sido financiados por los proyectos nacionales CGL2007-60715/BOS y CGL2010- 16032/BOS.

A mi madre. A mi padre.

A toda mi familia. A Hans.

*Porque todos ellos han hecho que hoy sea capaz de esto,
y que el día de mañana sea capaz de mucho más.*

AGRADECIMIENTOS

Empecé a escribir esta tesis en un barco, literalmente. De hecho, estoy aquí ahora mismo, en el buque Florencia, viajando 23 horas de Livorno a Barcelona después de un viaje de muestreo agotador que empezó hace 10 días en Sicilia. Y es que es aún muy pronto para ir a buscar *Hormogaster*... Por suerte, yo me vuelvo con unas cuantas poblaciones de *trapezoides* bajo el brazo. Eso sí, ya para el 'postdoc', que se ve tan lejos pero a la vez tan cerca...

Y así, con el movimiento del barco, es cuando encuentro la inspiración para escribir esta parte de la tesis, estas únicas páginas en las que está permitida la subjetividad, unas cuantas líneas en las que debo concentrar cuatro años muy intensos cargados de experiencias...

Todo empezó cuando Darío me contaba que mi tesis sería en gran parte de biología molecular, pero que cuando él estudiaba el ADN no existía. Que además trabajaría con un bicho partenogénico, lleno de líos taxonómicos desde hacía 100 años. Y a mí, que me encantan los retos, me pareció una idea estupenda. Gracias Darío por confiar siempre en mí, por darme alas para que hiciera lo que creía más conveniente en cada momento, por tener siempre tiempo para mí cuando lo he necesitado, por inspirarme como investigador y como persona, por darme ánimo en los momentos duros. Porque gracias a ti, ahora mismo estoy totalmente enamorada de mi trabajo. Y eso es lo mejor que saco de esta tesis, sin duda. Ahora, cada vez que tengo una idea nueva para el futuro me siento como una niña con un juguete nuevo...

Gracias Ana por el apoyo con la parte de biología molecular. Tus ideas y tu ayuda han sido muy importantes para interpretar los resultados, sobre todo en la parte final de la tesis. Y es que es tan difícil empezar de cero... Gracias por todo el tiempo que me has dedicado y por todos los consejos. Todavía queda patatal para mucho tiempo.

Marta (que está ahora mismo echándose la siesta a mi lado) ha sido sin duda una de las personas más importantes en esta tesis. Gracias por ser mi 'hermana científica', por todos tus esfuerzos y tu ayuda, por estar siempre ahí cuando lo he necesitado. Cuando la gente mire nuestros papers, verá solamente árboles filogenéticos. Yo, detrás de cada población, veré siempre mil horas en coche con Fito, Sabina y Shakira, pizzas y creppes, risas, risas y más risas, hoteles cutres, encuentros con la Guardia Civil y con capitanes de barcos, con campesinas lesbianas y guardias forestales, con sicilianos 'alegres', con vacas en medio de la carretera, paisajes increíbles, chapuzones en el mar Tirreno en pleno mes de abril... y un sinfín de aventuras y desventuras que bien merecerían un capítulo aparte en esta tesis (y me atrevo a apostar que sería el más largo...). Estoy segura de que el destino nos depara muchas horas más de carretera y manta...

Gracias al resto del equipo de lombriceros, Mónica, Dolores y Juan, por los ánimos y el apoyo durante todos estos años. Gracias Juan, porque Darío siempre dice que entré en el grupo porque te caí bien cuando era alumna. También gracias al resto de gente de la cátedra de invertebrados por el buen rollo en la planta X.

I'm indebted to all the researchers that helped me during all this time. Thank you all for sending me earthworms or answering my hundreds of emails. I would like to thank Thibaud Decäens, Geoff Baker, Csaba Csuzdi, Ghania Ouahrani, Mohammed Salah, Sandrine Salmon and M^a Jesús Iglesias Briones for sending me (directly or indirectly through Darío) samples for this study, and Marcos Pérez-Losada for sharing information about his sequences from GenBank. Thanks also to Rob Blakemore and Maigualida Ricoy for giving me advices at the beginning of this thesis. Me gustaría agradecer también a Antonio Pérez Onteniente su ayuda en el muestreo de las especies de *Nicodrilus*. I'm also indebted to Velavan T.P. and Bart Muys for being the external referees of this thesis. Bart, te invitaré a una cerveza en el próximo congreso.

I spent nine months of my Ph.D. period in Tübingen (Germany), and although the language was a big handicap I had good moments there. I would like to thank Micha Heethoff for accepting me in his lab and helping me as much as he could (it's a pity that so much effort didn't yield good results...). Thanks also because you didn't kill me when I

lost the keys in such a funny way. Thanks to Paavo Bergmann for teaching me all I know about electron microscopy, for his patience and help and for all the time that he spent with me in front of the Siemens Elmiskop 1A, and of course for solving the problems every time I messed it up... Thanks also to Micha Laumann for his help and of course for being the intermediary between Macrogen and me :-)) I enjoyed the afterwork beers with the all the people of the AG. Thanks to the Erasmus people because they were a great support there. Thanks Idil, Marcos, Fer and Jara for such great moments, for so many beers and for being my German translators aaaall the time.

Laura y Laurita deberían firmar esta tesis conmigo. Sin vosotras, esta tesis no habría sido posible. Gracias musas, porque desde primero de carrera habéis estado en Mordor conmigo para apoyarme, y es que desde los 18 años lo hemos pasado todo juntas, las alegrías y las penas, tanto a nivel personal como profesional. Especialmente el último año, que tan duro ha sido. Poca gente tiene la suerte de comer todos los días con dos de sus mejores amigas. ¡¡Y mucho ánimo a las dos!!! Gracias también al resto de biólog@s que han estado ahí durante todos estos años aguantando historias de lombrices. Gracias Jose, Javi y María por demostrarme que los verdaderos amigos siempre están ahí, aunque la vida los lleve a destinos distintos. Tenemos pendiente un finde en una casa rural y un viajecito a Tenerife en cuanto termine.

Qué habría sido de mí durante todos estos años sin 'los más amigos'... Gracias getafenses por ser los mejores amigos que se puede desear. Gracias por el apoyo que me habéis dado desde siempre, y por pensar que soy muy grande cuando en realidad yo me siento muy pequeña. Gracias Chen, Merche, Alex y Elena por compartir mis risas y aguantar mis lágrimas desde hace tantísimos años. Muchos de los mejores momentos de mi vida los recuerdo a vuestro lado. Y no importa dónde esté el día de mañana, siempre volveré a finales de mayo a las fiestas de Getafe.

Gracias a mi prima Ana, porque 'nació con el don de la risa y con la intuición de que el mundo estaba loco', y eso hace de ella una de las personas más especiales que conozco. Gracias por todo el apoyo que me has dado siempre.

No todo el mundo tiene la suerte de saber qué quiere ser de mayor desde que es una niña. Desde que tengo uso de razón, yo siempre he querido ser zoóloga, y eso se lo debo a mis hermanos (aunque para ser franca nunca me hubiera imaginado estudiando lombrices de tierra...). Todavía me acuerdo de cuando íbamos de excursión en el pueblo en busca de egagrópilas. Gracias Carmelo, Juanfran y Miguel por todo vuestro apoyo desde siempre. Gracias Merce y Sara por hacer nuestra familia todavía más feliz. Gracias especiales a Ángela, por haberme enseñado, sin saberlo, las prioridades de la vida. Gracias a mi madre, que siempre me ha dado todo, sin condiciones, para que pudiera llegar tan lejos. Es nada más que gracias a sus esfuerzos por lo que hoy soy quien soy. Gracias a mi padre, por ser mi ángel desde su silencio. Gracias a todos, porque creo que tengo la mejor familia del mundo.

Gracias a Hans, por haber sido la luz más brillante guiando mi camino durante los dos últimos años. Gracias por todo aquello que vi cuando creías que no estaba mirando. Maybe I'll sell you a chicken...



"—Los otros embajadores me advierten de carestías, de concusiones, de conjuras, o bien me señalan minas de turquesas recién descubiertas, precios ventajosos de las pieles de marta, propuestas de suministros de armas damasquinas. ¿Y tú? — preguntó a Polo el Gran Kan—. Vuelves de comarcas tan lejanas y todo lo que sabes decirme son los pensamientos que se le ocurren al que toma el fresco por la noche sentado en el umbral de su casa. ¿De qué te sirve, entonces, viajar tanto?

— Es de noche, estamos sentados en las escalinatas de tu palacio, sopla un poco de viento — respondió Marco Polo—. Cualquiera que sea la comarca que mis palabras evoquen en torno a ti, la verás desde un observatorio situado como el tuyo, aunque en el lugar del palacio real haya una aldea lacustre y la brisa traiga el olor de un estuario fangoso.

— Mi mirada es la del que está absorto y medita, lo admito. ¿Pero y la tuya? Atraviesas archipiélagos, tundras, cadenas de montañas. Daría lo mismo que no te movieses de aquí.

El veneciano sabía que cuando Kublai se las tomaba con él era para seguir mejor el hilo de sus razonamientos; y que sus respuestas y objeciones se situaban en un discurso que ya se desenvolvía por cuenta propia en la cabeza del Gran Kan. O sea que entre ellos era indiferente que se enunciaran en voz alta problemas o soluciones, o que cada uno de los dos siguiera rumiándolos en silencio. En realidad estaban mudos, con los ojos entrecerrados, recostados sobre almohadones, meciéndose en hamacas, fumando largas pipas de ámbar.

Marco Polo imaginaba que respondía (o Kublai imaginaba su respuesta) que cuanto más se perdía en barrios desconocidos de ciudades lejanas, más entendía las otras ciudades que había atravesado para llegar hasta allí, y recorría las etapas de sus viajes, y aprendía a conocer el puerto del cual había zarpado, y los sitios familiares de su juventud, y los alrededores de su casa, y una placita de Venecia donde corría de pequeño.



Llegado a este punto Kublai Kan lo interrumpía o imaginaba que lo interrumpía, o Marco Polo imaginaba que lo interrumpía con una

*pregunta como: —¿Avanzas con la cabeza siempre vuelta hacia atrás?
— o bien: —¿Lo que ves está siempre a tus espaldas? —o mejor:
— ¿ Tu viaje se desarrolla sólo en el pasado?*

Todo para que Marco Polo pudiese explicar o imaginar que explicaba o que Kublai hubiese imaginado que explicaba o conseguir por último explicarse a sí mismo que aquello que buscaba era siempre algo que estaba delante de él, y aunque se tratara del pasado era un pasado que cambiaba a medida que él avanzaba en su viaje, porque el pasado del viajero cambia según el itinerario cumplido, no digamos ya el pasado próximo al que cada día que pasa añade un día, sino el pasado más remoto. Al llegar a cada nueva ciudad el viajero encuentra un pasado suyo que ya no sabía que tenía: la extrañeza de lo que no eres o no posees más te espera al paso en los lugares extraños y no poseídos.

Marco entra en una ciudad; ve a alguien vivir en una plaza una vida o un instante que podrían ser suyos; en el lugar de aquel hombre ahora hubiera podido estar él si se hubiese detenido en el tiempo tanto tiempo antes, o bien si tanto tiempo antes, en una encrucijada, en vez de tomar por una calle hubiese tomado por la opuesta y después de una larga vuelta hubiese ido a encontrarse en el lugar de aquel hombre en aquella plaza. En adelante, de aquel pasado suyo verdadero e hipotético, él está excluido; no puede detenerse; debe continuar hasta otra ciudad donde lo espera otro pasado suyo, o algo que quizá había sido un posible futuro y ahora es el presente de algún otro. Los futuros no realizados son sólo ramas del pasado: ramas secas.

— ¿ Viajas para revivir tu pasado? —era en ese momento la pregunta del Kan, que podía también formularse así: ¿ Viajas para encontrar tu futuro?

Y la respuesta de Marco:

— *El allá es un espejo en negativo. El viajero reconoce lo poco que es suyo al descubrir lo mucho que no ha tenido y no tendrá. "*



Las ciudades invisibles

Italo Calvino

(Pinturas, en orden: Fedora, Zobeide y Olinda, de Pedro Cano)

Capítulo 1. Introducción	20
<i>I. Introducción general</i>	21
<i>II. Especies peregrinas: el caso de Aporrectodea trapezoides</i>	23
<i>III. Más de un siglo de discrepancias: el complejo Aporrectodea caliginosa</i>	26
<i>IV. Partenogénesis en lombrices de tierra</i>	33
IV.a. Concepto de partenogénesis	33
IV.b. Tipos de partenogénesis: automixis y telitoquia en lombrices de tierra	34
IV.c. El concepto de especie en lombrices partenogenéticas	39
IV. d. Origen de las formas partenogenéticas	42
<i>V. Marcadores moleculares en lombrices de tierra</i>	43
<i>VI. Objetivos de esta tesis</i>	46
Capítulo 2. Un clon errante en una especie peregrina: filogeografía, alta diversidad clonal y distribución geográfica en Aporrectodea trapezoides (Dugès, 1828)	51
<i>Resumen</i>	52
<i>Abstract</i>	53
<i>Introducción</i>	54
<i>Materiales y Métodos</i>	55
I. Muestreo	55
II. Estudio anatómico-morfológico de los ejemplares	59
III. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación	60
IV. Variabilidad genética y análisis filogenéticos	62
V. Otros análisis estadísticos	64
<i>Resultados</i>	64
I. Alta diversidad clonal y variabilidad genética	64
II. Análisis filogenéticos y distribución biogeográfica de los linajes	67
III. Análisis anatómico-morfológico de los individuos	69
<i>Discusión</i>	76
I. Evidencia de selección en genes codificantes	76
II. Diversidad clonal	78
III. Separación de los linajes	78

IV. Implicaciones filo- y biogeográficas	79
V. Un clon errante en una especie peregrina	80
Capítulo 3. Genética de poblaciones e historia demográfica de dos linajes geográficamente diferenciados en <i>Aporrectodea trapezoides</i>	83
Resumen	84
Abstract	85
Introducción	86
I. Muestreo y II. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación	87
III. Parámetros de genética de poblaciones	87
IV. Análisis demográfico	88
Resultados	89
I. Diversidad genética	89
II. Estructura genética poblacional	90
III. Análisis demográfico	92
Discusión	96
Capítulo 4. Añadiendo complejidad al complejo: nuevas aproximaciones a la filogenia molecular del complejo de especies <i>Aporrectodea caliginosa</i>	99
Resumen	100
Abstract	102
I. Muestreo	106
II. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación	110
III. Variabilidad genética y análisis filogenéticos	110
IV. Datación relativa, datación absoluta y delimitación de especies	111
Resultados	114
I. Variabilidad genética	114
II. Relaciones filogenéticas	115
III. Datación relativa y absoluta	121
IV. Delimitación de especies: regla del 4X y GMYC	125
Discusión	128
Capítulo 5. Estudio a micro-mesoescala de poblaciones sexuales y partenogénicas de <i>Aporrectodea trapezoides</i>	136
Resumen	137

<i>Abstract</i>	138
<i>Introducción</i>	139
<i>Materiales y Métodos</i>	142
II. Método de muestreo	147
III. Extracción y secuenciación de ADN	148
III. Análisis filogenéticos y genética de poblaciones	149
<i>Resultados</i>	150
I. Variabilidad genética y morfológica	150
II. Relaciones filogenéticas	150
II. Genética de poblaciones	152
<i>Discusión</i>	158
I. Implicaciones taxonómicas: estasis molecular vs plasticidad fenotípica	158
II. Alta variabilidad genética, relaciones filogenéticas y genética de poblaciones: aislamiento por distancia	161
II. Implicaciones evolutivas: origen no híbrido, relativamente reciente y múltiple de la partenogénesis	163
Capítulo 6. Ciclo biológico y biología reproductiva de <i>Aporrectodea trapezoides</i> (Dugès, 1828) en cultivos de laboratorio	167
<i>Resumen</i>	168
<i>Abstract</i>	169
<i>Introducción</i>	170
<i>Materiales y Método</i>	172
I. Características de los capullos y tasa de eclosión en individuos recolectados del campo	172
II. Crecimiento de individuos cultivados en el laboratorio	173
III. Detección de posibles requerimientos para desencadenar la reproducción partenogenética	174
<i>Resultados</i>	175
I. Características de los capullos y tasa de eclosión en individuos recolectados del campo	175
II. Crecimiento de lombrices cultivadas en el laboratorio	175
III. Detección de posibles requerimientos para desencadenar la reproducción partenogenética	177
<i>Discusión</i>	178
Capítulo 7. Aproximaciones ultraestructurales en tres poblaciones de <i>Aporrectodea trapezoides</i> con diferente modo de reproducción	182
<i>Resumen</i>	183

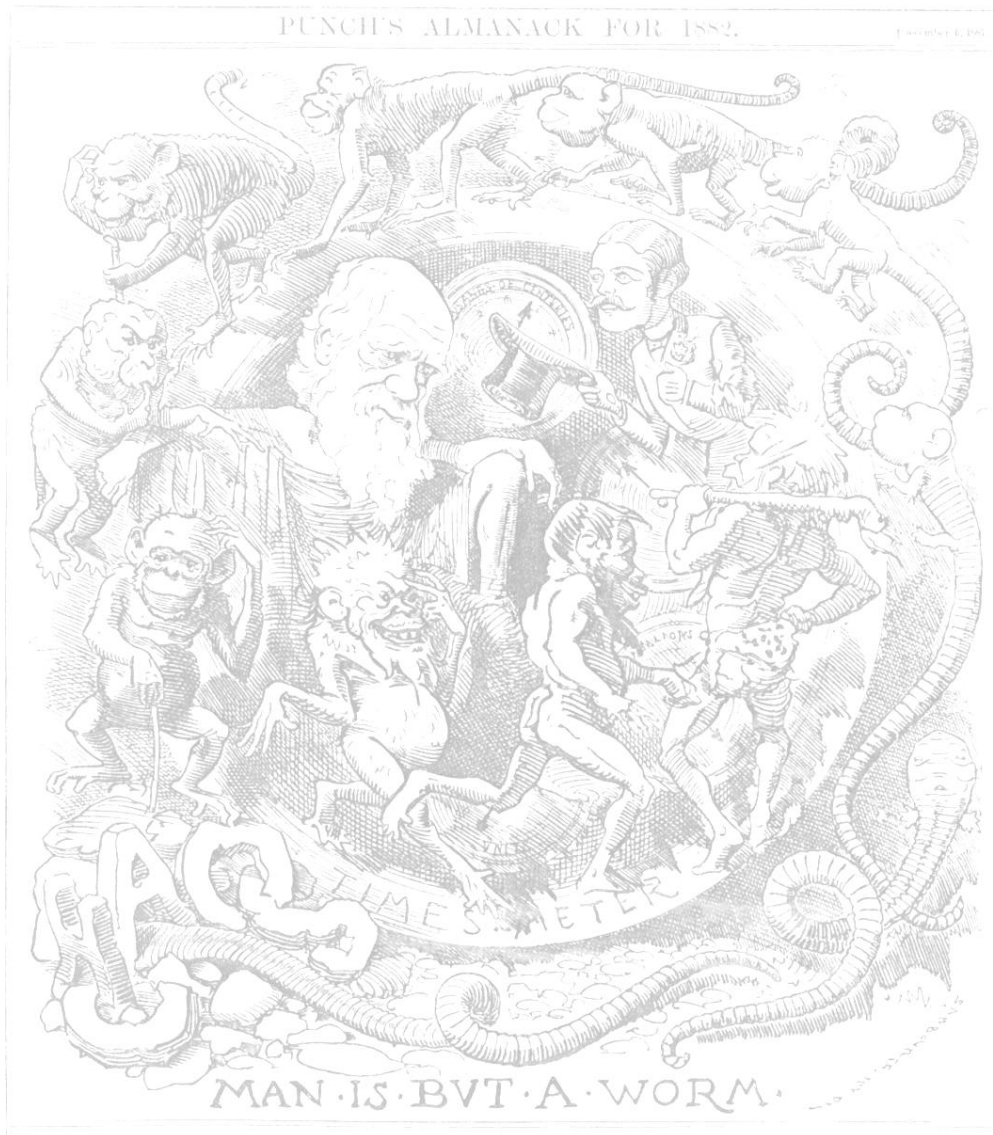
Abstract

184

<i>Introducción</i>	185
<i>Materiales y Métodos</i>	186
<i>I. Recolección de lombrices</i>	186
<i>II. Microscopía lumínica y electrónica de transmisión</i>	186
<i>Resultados</i>	189
<i>I. Espermatecas</i>	189
<i>II. Vesículas seminales</i>	193
<i>Discusión</i>	196
Capítulo 8. Conclusiones y futuras líneas/Conclusions	201
<i>Referencias</i>	212
<i>Anexos</i>	235

'My whole soul is absorbed with worms just at present'

Carta de Charles Darwin a Sir W. Thistleton-Dyer, 26 de Noviembre de 1880.



Capítulo 1

Introducción

I. Introducción general

El suelo es un sistema tremendamente complejo regulado por múltiples interacciones entre medio mineral, fauna, flora y microflora. En líneas generales, es un sistema muy poco conocido debido a la dificultad de exploración que presenta, a la enorme cantidad de elementos e interacciones que lo forman y a la heterogeneidad espacial de los mismos.

El suelo es el soporte para la obtención de más del 99% de todo el alimento consumido por la especie humana, tarda mucho tiempo en producirse, es tremendamente frágil y se pierde con gran facilidad. Podemos decir que el suelo es el gran desconocido para la ciencia actual por la gran cantidad de elementos y procesos que se desarrollan en el suelo y que quedan por estudiar y entender. Por tanto no es de extrañar que una revista tan prestigiosa como Science le dedicase en 2004 un volumen especial con el título “Soils – The Final Frontier”.

Entre todos estos elementos que conforman el suelo, las lombrices de tierra desempeñan un papel muy importante. Sus efectos cruciales son conocidos desde la antigüedad. Cleopatra los declaró animales sagrados, Aristóteles los describió como los ‘intestinos de la tierra’, y una de las traducciones de su símbolo en chino significa ‘ángeles de la tierra’. Más adelante a finales de la edad media y principios de la edad moderna, el testimonio escrito de sus beneficios empieza con la descripción de su utilización como cebo de pesca y su aplicación en jardinería (Blakemore, 2006). Sin embargo, no es hasta el siglo XIX cuando Darwin señala su importantísimo papel en la incorporación de la hojarasca al suelo y en la mezcla de la materia orgánica con los componentes minerales. De hecho, en su último libro “The formation of vegetable mould through the action of worms” llegó a declarar: *‘It may be doubted whether there are many other animals which have played so important a part in the history of the world, as have these lowly organized creatures’*.

La actividad de las lombrices de tierra en el suelo produce cambios físico-químicos que mejoran su fertilidad. A través de sus galerías, las lombrices de tierra mantienen una estructura del suelo abierta, creando multitud de canales que permiten tanto la aireación como el drenaje, y mezclan los horizontes del suelo (Barley, 1958; Lee, 1985; Lavelle, 1988; Parmelee et al., 1990; Zhang y Hendrix 1995, entre otros). Por otra parte, junto con la materia orgánica las lombrices también ingieren partículas minerales del suelo que al pasar por el intestino sufren modificaciones físicas y químicas, de tal manera que el resultado es la producción de heces con gran cantidad de minerales biodisponibles como nutrientes para las plantas. Por ejemplo, las heces frescas de lombriz contienen 5 veces más nitrógeno asimilable, 7 veces más fósforo y 11 veces más potasio que el suelo alrededor de las heces (Mollison, 1988).

Además de estos efectos físico-químicos, también tienen efectos biológicos ya que pueden llegar a transportar semillas (Decaens et al., 2003), modifican las comunidades microbianas en la rizosfera (Kreuzer et al. 2004), e intervienen en la composición de las comunidades de plantas (Scheu, 2003, Kreuzer et al., 2004). Darwin (1881) estimó que un acre de tierra cultivada podía contener hasta 53.000 lombrices ($13/m^2$); estudios más recientes llevados a cabo en la Rothamsted Experimental Station (la estación experimental más grande de Inglaterra y la más antigua del mundo) han puesto de manifiesto que incluso suelos pobres en materia orgánica pueden contener alrededor de 250.000 lombrices por acre ($62/m^2$), mientras que en suelos más fértiles se pueden encontrar hasta 1.750.000/acre ($432/m^2$). Teniendo en cuenta que las lombrices son la primera zoonosa en suelos templados, sus efectos tanto a nivel local como global son cruciales para el suelo.

No obstante, no todas las especies son igual de comunes o de abundantes. Algunas especies ocupan áreas de distribución geográficamente muy restringidas, como es el caso de la mayoría de las especies de hormogástridos (Omodeo, 1956); otras, sin embargo, se distribuyen a escala global debido a su dispersión antrópica junto con la expansión de prácticas agrícolas y a su alta capacidad de adaptación a nichos ecológicos distintos, y normalmente se suele encontrar un número alto de individuos en cualquier muestreo: son las especies peregrinas. Debido a esto y teniendo en cuenta la actividad de las lombrices en el suelo, cada especie tiene una importancia diferencial en el manejo de los

suelos. Esto pone de manifiesto que para poder entender bien el sistema del suelo y llevar a cabo una gestión adecuada se deben conocer primero a nivel intraespecífico diversos aspectos importantes pero por lo general ampliamente desconocidos que van desde el ciclo de vida hasta la filogeografía o incluso la filogenia de la especie o complejo de especies.

II. Especies peregrinas: el caso de *Aporrectodea trapezoides*.

Especies peregrinas son aquellas cuya distribución es bastante más amplia que su región de origen. Este término fue utilizado por primera vez en lombrices de tierra por Michaelsen (1903) para describir la distribución de lombrices ampliamente extendidas que pueden ser encontradas en localidades geográficamente muy remotas respecto a su lugar de origen. Las especies peregrinas suelen ser antropócoras, y consideradas especies exóticas y alóctonas fuera de su región de origen. Son varias las características que comparten muchas de las lombrices peregrinas: tamaño pequeño, reproducción partenogenética normalmente acompañada por poliploidía (Gates, 1972), alta fecundidad, capullos muy resistentes, amplia tolerancia a factores ambientales y tasas rápidas de expansión (Lee, 1987; Blakemore, 2006). El estudio de este tipo de especies es, por tanto, de gran interés científico ya que son especies cruciales en el manejo del suelo a escala global. Sin embargo, a pesar de su importancia ecológica y del gran número de especies descritas, hay una falta de conocimiento sobre la biología general de la mayoría de las especies de este tipo, por lo que un conocimiento detallado de diversos aspectos de su biología (ciclo de vida, potencial reproductivo, filogeografía...) constituye una de las prioridades en zoología del suelo para poder evaluar la magnitud real del efecto de este grupo en los ecosistemas.

Aporrectodea trapezoides (Dugès, 1828) se engloba en esta categoría de especie peregrina. Originaria del Paleártico, se distribuye actualmente por los cinco continentes. Según Smith (1917), '*it is apparently the most abundantly represented and certainly the most generally distributed of the North American species of earthworms*'. Omodeo (1948) la describió como la lombriz más común del mundo; de hecho, ha sido encontrada incluso en un oasis en el medio del desierto del Sáhara. Si bien puede no ser la especie más

abundante, es una de las más comunes a nivel mundial. Es, de hecho, una de las cinco especies de lombriz más vendida y usada como cebo de pesca en Norte América (Blakemore, 2006). Es normalmente la especie dominante en suelos mediterráneos tanto en biomasa como en número de individuos, y a menudo la única especie que se encuentra en este tipo de suelos debido a su capacidad de adaptación a condiciones ambientales extremas.

A. trapezoides presenta un prostomio epilóbico. Las quetas son pareadas, muy juntas en los flancos, siendo mayor la distancia de quetas aa que la de bc, y la distancia de quetas dd suele ser igual a la mitad del perímetro. El primer poro dorsal se sitúa en el surco intersegmentario 9/10 (raramente, en el 8/9). Los poros masculinos se encuentran en el segmento 15 y presentan unos labios glandulosos muy abultados, que generalmente afectan a los segmentos contiguos.

Presenta dos pares de poros de las espermatecas en los surcos intersegmentarios 9/10 y 10/11 en la línea de quetas cd. Cabe destacar que, aunque se reproduce partenogénicamente (como se explica más adelante en este capítulo) los caracteres sexuales, tanto primarios como secundarios, están muy conservados, al igual que sucede en otras muchas especies de lombrices partenogénicas. En los segmentos 9, 10 y 11 se

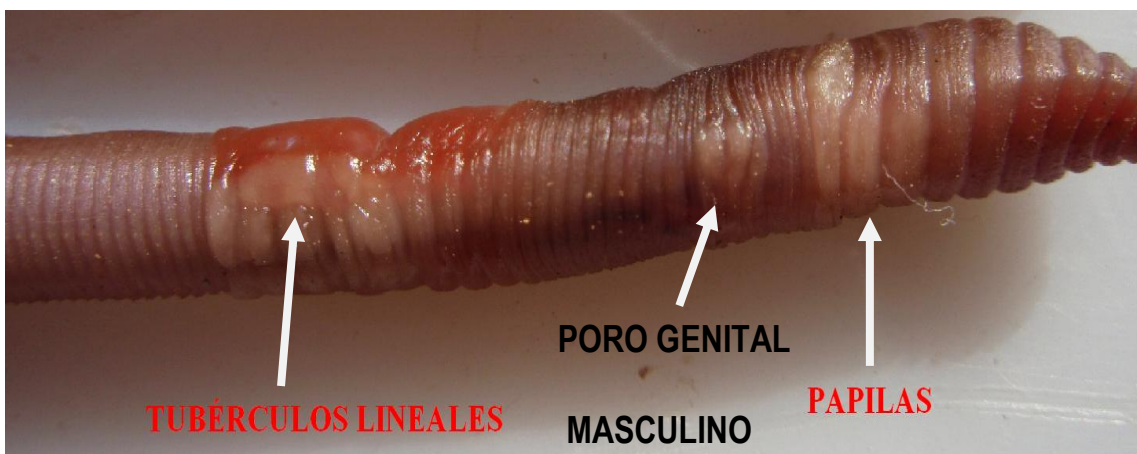


Fig. 1. Caracteres morfológicos en *A. trapezoides*. Se indican los tubérculos pubertarios y las papilas.

observan grandes papilas (Fig. 1) sobre las que se sitúan quetas sexuales, ligeramente curvas y más largas y delgadas que las normales. El clitelo es dorsal, y su longitud es de 7 u 8 segmentos (del 27 ó 28 al 34 ó 35). Presenta tubérculos pubertarios de forma lineal en los segmentos 31 a 33. En cuanto a su anatomía interna, es de especial importancia descriptiva su aparato reproductor. Presenta dos pares de espermatecas en los segmentos 10 y 11, pequeñas y vacías (Fig. 2), sin esperma en su interior, y dos pares de embudos seminales, con idéntica localización y que no son iridiscentes, lo que indica que no contienen espermatozoides maduros. Tiene cuatro pares de vesículas seminales, localizándose en los segmentos 9 a 12, pero los dos anteriores pueden ser muy pequeños y casi desaparecer. Puede existir en algún par solamente la vesícula derecha o la izquierda. En cuanto al aparato femenino, posee un par de ovarios en el segmento 13, y un par de ovisacos en el 14.



Fig. 2. Detalle de las espermatecas en *A. trapezoides*.

Bouché (1972) la define como hidrófila y con carácter eubiótico estenohúmico, aunque es ecológicamente muy variable. Es generalmente anécica, existiendo algunas poblaciones con características intermedias entre anécicas y endogeas (Bouché, 1972).

III. Más de un siglo de discrepancias: el complejo *Aporrectodea caliginosa*.

La taxonomía clásica de lombrices de tierra presenta numerosos problemas. De hecho, Michaelsen (1900) la definió como '*sine systemate chaos*' en la portada de su libro *Das Tierreich. 10. Vermes*.

La identificación de lumbrícidos adultos se basa principalmente en el tipo de prostomio, posición de las setas, y forma y posición del clitelo y tubérculos pubertarios y de algunos órganos internos como vesículas seminales o espermatecas. Sin embargo, la identificación morfológica está muy limitada por la simplicidad estructural de estos animales y por la variabilidad de los caracteres utilizados, que en muchos casos solapan (Pop et al., 2003). Además, debido a su escaso registro fósil es difícil decidir si un carácter es ancestral o evolucionado (Pierce et al., 1990). Por estas razones no es de extrañar que se haya llegado a la creación de complejos de especies en los casos en los que muchos de los caracteres diferenciales se solapan de manera sistemática. Es el caso del complejo *Aporrectodea caliginosa*, dentro del cual se ha incluido en muchas ocasiones a *A. trapezoides*.

El status legal del taxón *A. trapezoides* no es una cuestión clara. El primer problema se presenta al intentar asignarlo a un género, ya que no existe consenso respecto a este aspecto: algunos autores la asignan al género *Nicodrilus* Bouché 1972, otros al género *Allolobophora* Eisen 1874, y un tercer grupo al género *Aporrectodea* Örley 1885. Por otra parte, tampoco se ha precisado si se trata de un ecotipo o una subespecie de *A. caliginosa*, o bien una especie independiente. En lo que respecta al presente trabajo, se ha decidido asignarlo al género *Aporrectodea*, tal como hacen la mayoría de los autores, si bien para la comparación de resultados obtenidos por otros autores se tendrán también en cuenta los trabajos en que haya sido incluido en los otros géneros, siempre y cuando el epíteto específico (o subespecífico) sea *trapezoides*.

Debido a su similaridad morfológica (Tabla 1, Fig. 3), el status taxonómico de los taxones incluidos en el complejo de especies *A. caliginosa* ha sido objeto de discusión durante más de un siglo. El clitelo se sitúa aproximadamente en el mismo rango de segmentos, pero difieren la forma y la posición de los tubérculos pubertales; en *A. caliginosa*, *A. tuberculata* y *A. nocturna* éstos aparecen como dos protuberancias en 31 y 33 (a menudo unidas por arriba, dando aspecto de gafa), mientras que en *A. trapezoides* aparecen en forma de banda. Sin embargo, también es posible encontrar formas intermedias que complican la situación y hacen difícil la asignación de algunos ejemplares y poblaciones.

Inicialmente, *A. caliginosa*, *A. nocturna* y *A. trapezoides* fueron descritas como especies distintas, mientras que *A. tuberculata* se consideró una subespecie de *A. caliginosa*. Históricamente, esta visión ha ido cambiando según los autores. Para Michaelsen (1900) la especie *Helodrilus (Allolobophora) caliginosus* consistía en dos entidades, que denominó como “formas” o “subespecies”: *H. (A.) caliginosus (typicus)* y *H. (A.) caliginosus trapezoides*, considerando al resto de taxones como sinónimos de *H. (A.) caliginosus*. La principal diferencia entre ellas es la forma que presentan sus tubérculos pubertarios; en la forma *caliginosa*, aparecen en cada lado del individuo dos tubérculos en los segmentos 31 y 33 que presentan forma de gafas, mientras que en la forma *trapezoides* forman una línea en los segmentos 31, 32 y 33, aunque existen por otra parte numerosas formas con caracteres intermedios. Omodeo (1952) y Cobolli-Sbordoni et al. (1987) consideraron *A. trapezoides* como la variedad poliploide de *A. caliginosa* s.s. En 1972, Bouché las consideró como dos especies, que además colocó en un género diferente: *N. nocturnus* (= *A. nocturna*) y *Nicodrilus caliginosus* (= *A. caliginosa*), diferenciando varias subespecies dentro de ésta: *N. c. caliginosus* (= *A. c. caliginosa*), *N. c. alternisetosus* (= *A. tuberculata*), y *N. c. meridionalis* (= *A. trapezoides*). El mismo año, Gates (1972) las separó de nuevo en 4 especies distintas: *A. caliginosa* s.s., *A. tuberculata*, *A. trapezoides*, y *A. nocturna*. Una década más tarde, Sims y Gerard (1985) sugirieron que estos 4 taxones forman parte de una única especie altamente variable (*A. caliginosa sensu latum*) con 4 formas o variedades fenotípicas: *A. caliginosa sensu stricto*, *A. caliginosa var. trapezoides*, *A. caliginosa var. tuberculata*, y *A. caliginosa var. nocturna*. A finales de ese mismo siglo, Briones (1996) vuelve a sugerir la existencia de una especie con dos subespecies (*A. caliginosa caliginosa* y *A. caliginosa trapezoides*), al igual que

Character	<i>A. caliginosa</i>	<i>A. longa</i>	<i>A. nocturna</i>	<i>A. trapezoides</i>	<i>A. tuberculata</i>
Colour/Pigment	unpigmented	pale to dark	uniform dark brown	usually dark to very dark grey	unpigmented
Size (Range) mm	<85 (35-180)	90-170	90-180	>80 (80-270)	50-150
Body shape	usually cylindrical	tail flattens	cylindrical	tail flat or trapezoid	cylindrical or slightly flat
First dorsal pore	6/7-14/15	9/10-14/15	8/9/10	6/7-13/14	9/10-12/13
Clitellum range	24,25,26,27,28,29-34,35	27,28-35,36	27,28-1/235	27,28-33,34	27,28-34,35
Tubercula Pubertatis	30,31-33,34 interrupted slightly 32	31,32-34 between b and c lines	31 & 33 extending into 32	30,31-33,34 smooth	30,31-33,34 – of double origin
Glandular tumescence on 9-11	yes	yes, + rarely on 12	yes + usually on 12	yes	yes, + rarely on 8 or 12
Glandular tumescence usually near clitellum	27, 30, 32-34	31, 33-34	29, 30, 32-34	28, 30, 32-34	26, 30, 32, 34
Diapause	obligatory?	either/or?	?	facultative	facultative
Burrows/	topsoil/	deep/	deep/	topsoil/some surface casts	topsoil/
Castings	surface casts	surface	surface		surface casts
Parthenogenetic	no (never?)	no	no	yes (always?)	no?
Ploidy	2n = 36	2n = 36	2n = 36	3n = 54 and 4n = 72	2n = 36
Main Climatic range *	Sub-arctic/ Temperate	Temperate/Mediterr.	Temperate	Mediterr./ sub-tropical	Cold/Temperature

Tabla 1. Caracteres diferenciales de las especies del grupo de especies *A. caliginosa*. Tabla adaptada de Blakemore (2006).



Fig. 3. Especies del grupo *A. caliginosa*. De arriba a abajo, *A. longa*, *A. caliginosa*, *A. tuberculata*, *A. nocturna* y *A. trapezoides*.

hicieran Michaelsen un siglo antes y Severon et al. en el año 2007.

Las primeras aproximaciones a nivel molecular en lombrices de tierra se realizaron con estudios de alozimas (Bøgh, 1992), 'random amplified polymorphic DNA' (RAPD) (Dyer et al., 1998), y secuencias de los genes mitocondriales citocromo oxidasa I y 16S rRNA (Pop et al. 2005). Sin embargo, todas estas aproximaciones se realizaron o bien a escalas geográficamente muy reducidas, o bien con un número bajo de individuos o de especies (por ejemplo, en el estudio de Pop et al., 2005 sólo se incluían *A. caliginosa* y *A. trapezoides*). Por último, Pérez-Losada et al. (2009) abordaron recientemente el estudio filogenético de estos taxones con diversos marcadores mitocondriales y nucleares y con muestras de todas las especies putativas englobadas en el complejo, llegando a la conclusión de que no sólo *A. caliginosa*, *A. tuberculata*, *A. trapezoides* y *A. nocturna* son especies distintas, sino que *A. longa* se encuentra filogenéticamente muy emparentada con estas formas, por lo que debería ser incluida en el complejo. Toda esta visión molecular será tratada en profundidad en el capítulo 4.

Por otra parte, estudios cariológicos llevados a cabo por diversos autores en *A. trapezoides* (Darlington, 1948 en Cobolli-Sbordoni et al., 1987; Omodeo, 1951a; Onteniente y Rodríguez Babío, 2002) revelaron la existencia de linajes triploides ($3n=54$) y, menos frecuentemente tetraploides ($4n=72$) y diploides ($2n=36$; solamente dos individuos encontrados en la provincia de Valencia, España; Onteniente y Rodríguez Babío, 2002). Estudios corológicos pusieron de manifiesto que el linaje triploide es bastante común en países mediterráneos, mientras que el tetraploide quedaría relegado a ambientes eurosiberianos, existiendo, sin embargo, puntos en los que ambas formas coexisten simpátricamente (Cobolli-Sbordoni et al., 1987). Por todas estas observaciones, nos encontramos ante un complejo en el que coexisten formas diploides, triploides y tetraploides cuyo status es mucho más complicado del que originariamente se pensó al tener en cuenta únicamente las diferencias morfológicas.

Además, existen otras formas morfológicamente muy similares cuyas relaciones filogenéticas con el resto de especies del grupo se desconocen. Tal es el caso de *A. giardi*, *Nicodrilus monticola*, *N. carochensis* y *N. tetramammalis* (Fig. 4 y 5).



Fig. 4. Especies morfológicamente similares a las del grupo caliginosa. De arriba a abajo, *A. giardi*, *N. carochensis*, *N. monticola* y *N. tetramammalis*.

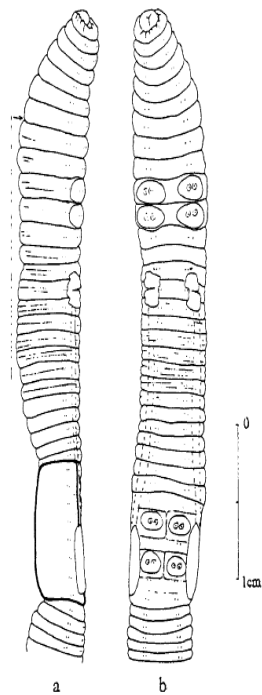


FIG. 2. *Nicodrilus carochensis* n. sp. (a) Lateral view; (b) ventral view.

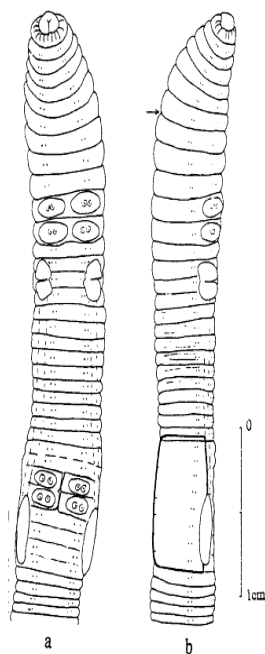


FIG. 3. *Nicodrilus tetramammalis* n. sp. (a) Ventral view; (b) lateral view.

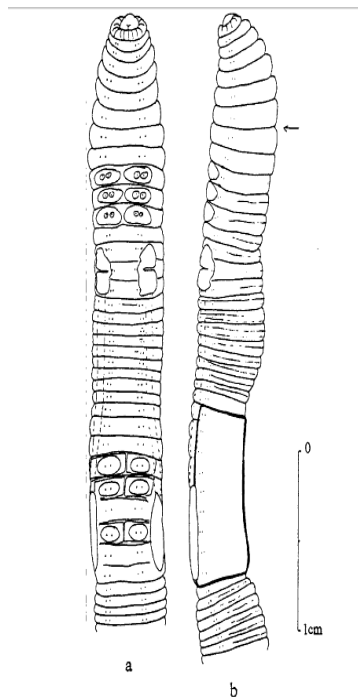


FIG. 1. *Nicodrilus monticola* n. sp. (a) Ventral view; (b) lateral view

Fig. 5. Esquema de la parte anterior de *N. carochensis*, *N. tetramammalis* y *N. monticola* (de arriba abajo, de izquierda a derecha). Tomado de Onteniente y Rodríguez Babío (2002).

IV. Partenogénesis en lombrices de tierra.

Las lombrices se han considerado generalmente como hermafroditas de fertilización cruzada. Aunque no todas las lombrices emplean esta estrategia reproductiva, la especie más famosa, *Lumbricus terrestris*, es un hermafrodita de fertilización cruzada y esta estrategia parece ser la más extendida en lombrices. Sin embargo, el hermafroditismo no es el único mecanismo reproductivo y cada vez se van descubriendo vez más especies partenogénicas, la mayoría de las cuales son poliploides. La partenogénesis es muy frecuente en la familia Lumbricidae. También se ha observado en más familias como en los Megascólécidos, pero nunca en otras como en los Glososcólécidos. Otros medios de reproducción 'asexual' como bipartición, gemación o procesos similares no se han observado en lombrices, y su capacidad de regeneración es limitada.

La reproducción partenogénica se empezó a estudiar en lombrices de tierra hace muchos años, gracias a contribuciones de autores como Omodeo (1951a), Casellato y Rodighiero (1972), Jaenike y Selander (1979) y Viktorov (1997), entre otros. Reynolds (1974) señaló la existencia en Norte América de 35 especies anfigónicas, 11 probablemente sexuales, 4 partenogénicas facultativas, 1 posiblemente partenogénica y 30 partenogénicas. Casellato (1987) citó 25 especies o subespecies partenogénicas (12 de las cuales tenían ploidía par y 13 con ploidía impar), y Viktorov (1997) señaló que en Rusia el número de lombrices poliploides casi igualaba el de diploides, con una proporción de 46 poliploides : 52 diploides. También observó que en casos de simpatria los poliploides tendían a ocupar las áreas marginales de su distribución.

IV.a. Concepto de partenogénesis.

El concepto de partenogénesis es un concepto muy amplio. Históricamente, autores clásicos como Aristóteles se han referido a él en varias ocasiones, y aunque no lo definían ni hacían una aproximación experimental, dieron algunas pistas sobre la existencia de este tipo de reproducción en algunos grupos de seres vivos.

La partenogénesis fue realmente descubierta por el naturalista suizo Charles Bonnet en 1740 mientras investigaba ápidos. El autor conjeturó que, ya que el espermatozoide no era necesario para la reproducción, la clave para la preservación de la especie debía de estar en el óvulo. Llegó a hipotetizar que dentro de cada óvulo existía una criatura hija perfectamente formada, que contenía otro óvulo que a su vez contenía otra criatura hija, *ad infinitum*.

Aunque fue Bonnet el creador de la primera prueba experimental para este tipo de reproducción, no fue hasta 1849 cuando Richard Owen acuñó el término. Este autor definió la partenogénesis como 'la procreación sin la influencia directa de un macho'. Como este concepto general podía incluir varios tipos de reproducción asexual típicos tales como fisión o gemación, algunos autores trataron de crear nuevas definiciones. Un siglo después, Suomalainen (1950) lo definió como 'el desarrollo de un ovario en un individuo nuevo sin fertilización'. Más tarde, Beatty (1957) propuso la definición de 'la producción de un embrión a partir de un gameto femenino sin la concurrencia de un gameto masculino, y con o sin desarrollo eventual de un adulto'.

IV.b. Tipos de partenogénesis: automixis y telitoquia en lombrices de tierra.

Existen diferentes clasificaciones para definir los distintos tipos de mecanismos partenogénéticos. Para entender las clasificaciones más empleadas en lombrices de tierra merece la pena mencionar las propuestas por Thomsen (1927), Ankel (1927), Suomalainen (1950) y White (1973); éstas se basan principalmente en el modo de reproducción, la determinación del sexo y la citología.

Cuando se tiene en cuenta la determinación del sexo de la progenie, es especialmente útil la clasificación de partenogénesis propuesta por Suomalainen (1950): arrenotoquia, telitoquia y deuterotoquia o anfitoquia (óvulos no fertilizados que producen solamente descendientes machos, hembras o de ambos sexos, respectivamente).

El sistema de clasificación propuesto por Thomsen (1927) y Ankel (1927) tiene en cuenta dos condiciones principales: el status cigótico-acigótico del individuo y el mantenimiento del número cromosómico cigótico. Incluye dos categorías principales: partenogénesis haploide o generativa, en la que la reducción cromosómica tiene lugar en el óvulo, y consecuentemente la descendencia tiene un número de cromosomas acigótico (haploide), y partenogénesis somática, en la que los descendientes tienen un número cromosómico cigótico (diploide o poliploide). La diferencia entre estas dos categorías depende básicamente de la ausencia (apomixis) o presencia (automixis) de conjugación y reducción cromosómicas. Ambos conceptos son sinónimos de las categorías definidas por White (1973) de partenogénesis ameiótica y meiótica, respectivamente.

En la partenogénesis automiética (o meiótica), las primeras fases de la meiosis ocurren de igual manera que en un organismo con reproducción sexual: los cromosomas se aparean en la fase de zigoteno, formando bivalentes y se recombinan. Como resultado de la reducción cromosómica durante la meiosis, la fase cigótica nuclear en el óvulo se vuelve acigótica. La fase cigótica es restaurada sin embargo inmediatamente a través de la fusión de dos núcleos acigóticos, la formación de un núcleo de restitución, o el proceso de endomitosis. La fusión de dos núcleos de distintos animales en la fertilización (anfimixis) es reemplazada de esta forma en automixis por la fusión de dos núcleos del mismo animal. Así, el resultado es el desarrollo de un nuevo individuo con un soma siempre cigótico (número cromosómico mayor de 1).

La restauración del número cromosómico cigótico en el óvulo de los animales partenogenéticos automiéticos se produce mediante 6 mecanismos citogenéticos distintos, los que se dan o bien antes o bien después de que ocurra la meiosis. Es importante mencionar estos mecanismos para entender las consecuencias genéticas de este tipo de reproducción (Suomalainen et al., 1987; Haccou y Schneider, 2004):

- *Duplicación gamética*: los núcleos segmentados se fusionan, o bien las mitades de los cromosomas divididos se quedan en el mismo núcleo. Todos los sets de cromosomas están duplicados, y de los pares resultantes uno es seleccionado al azar para convertirse en cigoto (Fig. 5a).

- *Fusión terminal*: el segundo corpúsculo polar se fusiona con el núcleo del ovocito secundario (Fig. 5b).
- *Fusión central*: los dos núcleos polares centrales se fusionan (Fig. 5c).
- *Fusión del primer corpúsculo polar con el ovocito secundario*: la fusión del ovocito puede producirse directamente con el primer corpúsculo polar (Fig. 5d.1), producto de la primera meiosis, o con un corpúsculo derivado de éste a través de mitosis (Fig. 5d.2).
- *Telitoquia gonoide*: el óvulo partenogenético sufre dos divisiones meióticas, y los cromosomas se aparean durante la profase de la segunda meiosis (Fig. 5e).
- *Duplicación premeiótica*: se produce una duplicación premeiótica del número de cromosomas durante las últimas divisiones oogoniales, que se reduce mediante meiosis. Durante la fase de telofase en la mitosis oogonial, los cromosomas quedan envueltos en la misma envoltura nuclear, lo que se conoce como endomitosis. Es el tipo de mecanismo que se da en lombrices de tierra (Fig. 5f).

Los dos últimos mecanismos descritos (telitoquia gonoide y duplicación premeiótica) son equivalentes a la apomixis respecto a sus resultados genéticos. Es decir, aunque existe meiosis y recombinación, los cromosomas se aparean con copias exactas de sí mismos, por lo que se generan individuos totalmente clónicos.

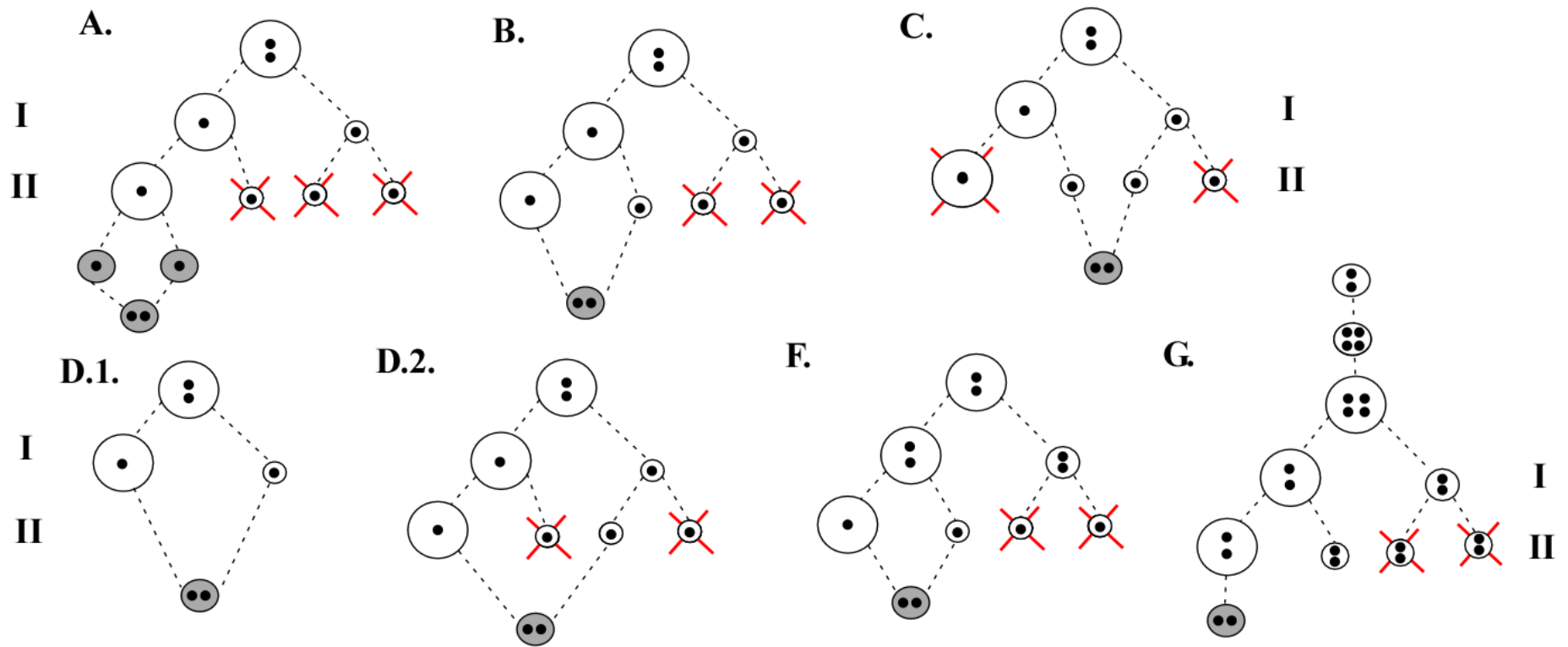


Fig. 5. Mecanismos citogenéticos de restitución de la ploidía. Las meiosis I y II se marcan en cada diagrama (I, II): El círculo de mayor tamaño en la meiosis I corresponde al óvulo, mientras que los de menor tamaño son corpúsculos polares. Las células marcadas con un cruz roja degeneran. La célula sombreada en gris dará lugar al embrión. A. Duplicación gamética. B. Fusión terminal. C. Fusión central. D. 1 y D.2 Fusión del ovocito secundario con el primer corpúsculo polar. E. Telitokia gonoide. F. Duplicación premeiótica. Modificado de Suomalainen et al. (1987).

Las lombrices partenogénicas son automícticas y telítocas. Según los estudios citológicos de Muldal (1952), Omodeo (1951a, 1952, entre otras publicaciones) y Casellato y Rodighiero (1972), existe una duplicación premeiótica del número cromosómico en la última división oogonial resultando en endomitosis (esto es, los cromosomas se duplican y quedan encerrados en la misma membrana nuclear), seguida de la formación de bivalentes quiasmáticos y meiosis regular con la eliminación de dos cuerpos polares. Como se ha mencionado anteriormente, las consecuencias genéticas de este mecanismo citológico son similares a las de la apomixis (es decir, formación de animales clonales), a pesar de la existencia de un proceso meiótico. A su vez, una de las consecuencias genéticas de este proceso es que la heterocigosidad se mantiene. Según White (1973), todos los bivalentes son estructuralmente homocigóticos y nunca se forman multivalentes. De manera sencilla, esto significa que los cromosomas se duplican y se recombinan con su copia idéntica. Por ello, este tipo de reproducción es perfectamente compatible con cualquier ploidía, incluyendo las impares.

Los textos clásicos que hablan de partenogénesis (White, 1973, 1978; Bell, 1982; Suomalainen et al., 1987) hablan solamente de una especie de lumbrícido, *Dendrobaena octaedra*, con partenogénesis apomíctica en vez de automíctica: el número cromosómico no se duplica en la oogonia, el de los oocitos no se reduce, y sólo existe una división ecuatorial (Suomalainen et al., 1987). Sin embargo, Simonsen y Holmstrup (2008) demostraron que en realidad se trata de un caso más de automixis.

Si bien los estudios sobre partenogénesis en lombrices de tierra son más bien escasos por lo que este tipo de reproducción es todavía ampliamente desconocido, se han detectado casos en que son necesarios una serie de estímulos físico-químicos para desencadenar el proceso partenogénico: tal es el caso de *Octolasion tyrtaeum*, en el que los individuos copulan e intercambian espermatozoides que se encuentran invariablemente vacíos, pero que parecen actuar de estímulo necesario para desencadenar la reproducción partenogénica (Muldal, 1952; Jaenicke y Selander, 1979). En otras especies, se da una partenogénesis 'pura', sin necesidad de estímulos externos.

IV.c. El concepto de especie en lombrices partenogenéticas.

Para Bouché (1972), es muy difícil de precisar la noción de especie en lumbrícidos por varios motivos diferentes, uno de los cuales es la diversidad de modos de reproducción. En las lombrices de tierra existen cuatro categorías reproductivas: diploide anfigónico, poliploide anfigónico, poliploide partenogenético meiótico y poliploide partenogenético ameiótico, lo que imposibilita la utilización del concepto biológico de especie en un número elevado de casos. Por otra parte, es importante tener en cuenta el papel de la selección natural en animales de escasa movilidad, circunstancia que impide un intercambio rápido de genes, lo que favorece la aparición de razas locales que, poco a poco, van separándose genéticamente unas de otras debido a presiones de selección ligeramente diferentes.

El caso de las lombrices partenogenéticas fue sabiamente definido como “pesadillas de los sistemáticos” por Blakemore (1999). El concepto biológico de especie no puede ser aplicado en estos casos, ya que cada individuo cumple el criterio de estar reproductivamente aislado. Algunos autores han tratado de resolver el problema, pero nunca se ha llegado a un consenso. Mayr (1963) sugirió que en estos casos lo mejor era utilizar un criterio morfológico. Según este autor, una especie partenogenética sería aquella que ‘resulta en la combinación dentro de una especie única de todos aquellos individuos asexuales cuya diferencia morfológica entre ellos no sea mayor a la que exista entre individuos conespecíficos o poblaciones de especies sexuales relacionadas’. Para completar este criterio, el autor también expuso que si el linaje partenogenético se originó a partir de una especie anfimíctica por un evento cromosomal irreversible (por ejemplo, poliploidía), debería ser considerado una especie diferente y hermana, aunque casi no existiera diferencia morfológica. Este criterio ha sido empleado tradicionalmente para definir especies en lumbrícidos partenogenéticos, aunque es difícil de aplicar ya que el grado de variación morfológica es a veces muy ligero e incluso solapante entre especies anfimícticas cercanas. Este es un gran problema en particular en complejos de especies muy similares que engloban formas anfimícticas y partenogenéticas, como es el caso del complejo de especies *A. caliginosa*. Por otra parte, es muy común en algunas especies partenogenéticas la existencia de polimorfismo en las estructuras reproductoras. Por ejemplo, Gates (1974) categorizó formas partenogenéticas de *D. octaedra* teniendo en

cuenta la presencia/ausencia o grado de desarrollo de diferentes estructuras reproductivas masculinas tales como espermatecas, testículos o vesículas seminales. Esto sin duda dificulta la delimitación de especies partenogenéticas en base a su morfología.

Según Gates (1974), "la especie debe incluir no solamente las poblaciones sexuales, sino también todos los linajes uniparentales, clones o formas evolucionadas recientemente y que están claramente afiliadas a ella'. Este concepto es útil cuando se encuentran formas intermedias, pero deja sin resolver el problema de cómo abordar el status de especies partenogenéticas con especies parentales extintas o desconocidas. En estos casos, una buena opción es emplear el concepto filogenético de especie basándose en el estudio de marcadores moleculares, lo que daría información sobre la divergencia genética entre formas o especies.

Algunos modelos recientes que intentan delimitar especies a partir de secuencias de ADN son los desarrollados por Pons et al. (2006) y Birky et al. (2005, 2010) (éste último desarrollado en primer lugar para animales partenogenéticos). El primer método consiste en la implementación de un modelo "general mixed Yule-coalescent" (GMYC) para la delimitación de clústers de ADN. Se basa en que los patrones de las ramas dentro de clústers genéticos reflejan procesos de coalescencia neutral dentro de especies (Kingman, 1982), mientras que dichos patrones entre clústers genéticos reflejan eventos de especiación (Yule, 1924.). De una manera sencilla, el modelo GMYC estima los límites entre especies a partir de secuencias de ADN identificando en un árbol filogenético los patrones de las ramas como una transición entre fenómenos de coalescencia y de especiación en linajes que han evolucionado independientemente, buscando los mayores valores de verosimilitud en cada transición.

La regla del 4X (Birky et al., 2005, 2010) es conceptualmente similar a la anterior, pero de aplicación mucho más sencilla y supuestamente no tan limitada por el número de muestras. La deriva genética entre linajes o metapoblaciones de una especie produce clados separados por gaps. Sin embargo, todos los individuos de la especie serán descendientes de un ancestro común con una antigüedad media de $2N_e$ generaciones, donde N_e es el tamaño efectivo poblacional. Hasta aquí estamos considerando

fenómenos de coalescencia, como en el caso del modelo anterior. Ante un evento de especiación, las poblaciones se separarán en clústers que se irán haciendo más profundos con el tiempo, mucho mayores que $2N_e$ generaciones. Teóricamente, se considera que el evento de especiación ha terminado cuando las poblaciones están separadas por gaps demasiado profundos como para ser generados solamente por deriva genética. Según los principios de genética de poblaciones, la diferencia media entre secuencias entre individuos en un clado, llamada diversidad nucleotídica π , es un estimador de $\theta \approx 2N_e\mu$, donde N_e es el tamaño efectivo poblacional y μ es la tasa de mutación por par de bases por generación. Más concretamente, $\theta = \pi / (1 - 4\pi/3)$, lo que da prácticamente π cuando $2N_e$ es pequeño. Por otra parte, la divergencia media entre secuencias K entre individuos de dos clados es una estima de $2t\mu$, donde t es el tiempo distante entre el ancestro común más cercano y los clados. Así, se podría emplear el cociente K/θ para conocer la probabilidad de que dos clados pertenezcan a especies evolutivas distintas. Un tiempo de divergencia entre clados de $t \geq 4N_e$ representa el límite de confianza del 95% del tiempo de coalescencia y de la profundidad de los gaps producidos por deriva genética, es decir, los gaps entre estos clústers tienen una probabilidad de menos del 5% de estar formados por deriva genética. Sustituyendo en la relación K/θ daría:

$$K/\theta = 2t\mu / 2N_e\mu \geq 8N_e\mu / 2N_e\mu = 4$$

Por tanto, dos clados separados por $K \geq 4\theta$ representarían dos poblaciones que han divergido al menos $4N_e$ generaciones. Cuando θ es pequeña, la regla queda muy cercana a $K \geq 4\pi$. La facilidad de aplicación de esta regla se debe a que N_e y μ se anulan en la ecuación y no hace falta conocerlos, por lo que nos basta con conocer el valor de π entre y dentro de clados para aplicarla. La ventaja de este método es que no fija unos valores de divergencia a partir de los cuales deba considerarse la existencia de distintas especies, lo que por otra parte se ha visto que puede llegar a ser muy diferente entre grupos de lombrices y está por supuesto sujeto a arbitrariedad en su elección.

También se han propuesto más recientemente conceptos integrativos de especie (Michiels, 1999; West et al., 1999), empleando datos moleculares, ecológicos, comportamentales, morfológicos, etc.

Las lombrices partenogenéticas son muy comunes y muy adecuadas para ciertos tipos de experimentos, por lo que es necesaria una solución para la delimitación de especies, ya que comparar datos con otros estudios es muy peligroso al no saber con exactitud la entidad biológica con la que se está trabajando.

IV. d. Origen de las formas partenogenéticas.

Los ancestros anfigméticos de formas partenogenéticas son bien conocidos en algunos grupos animales; desafortunadamente, no es el caso de las lombrices de tierra. La hibridación ha sido propuesta por varios autores (e.g., Suomalainen et al., 1987) como mecanismo común de origen de formas partenogenéticas en algunos grupos animales tales como peces, lagartos y salamandras. Entre invertebrados, existen varios casos en que las formas partenogenéticas surgen por hibridación. Es el caso, por ejemplo, de hemípteros delfácidos o insectos palo del género *Acanthoxyla*, en los que se describió la presencia de dos genomas haploides, cada uno proveniente de una especie anfigmética (Buckley et al, 2008). Suomalainen et al. (1987) citan algunos ejemplos de invertebrados en los que la partenogénesis parece haber surgido a partir de un evento mutacional simple o múltiple. En este último caso, la partenogénesis resultó ser una condición polifilética dentro de una única especie, como en el caso del lepidóptero psícido *Solenobia triquetrella*.

Existen cuatro mecanismos principales de origen de la partenogénesis en animales (Simon et al., 2003):

- *Origen espontáneo*: mediante mutaciones involucradas en meiosis y éxito de la reproducción sexual.

- *Origen híbrido*: resultante de cruces entre dos especies sexuales. Estos individuos suelen poseer alta heterocigosidad y alelos típicos de ambas especies parentales.

- *Origen contagioso*: los linajes partenogenéticos pueden originarse secundariamente a partir de linajes partenogenéticos preexistentes como resultado de un aislamiento reproductivo incompleto entre individuos sexuales y partenogenéticos. De hecho, se cree que la hibridación entre hembras partenogenéticas y machos de la misma especie o de especies próximas es uno de los principales mecanismos generadores de poliploidia en animales unisexuales.
- *Origen infeccioso*: a través de infecciones de microorganismos, como es el caso de *Wolbachia*.

Respecto a las lombrices de tierra, se han realizado algunos estudios moleculares empleando alozimas para ver la variabilidad genética en especies relacionadas partenogenéticas y sexuales, como *A. trapezoides* y *A. caliginosa* (Cobolli-Sbordoni et al., 1987). Sin embargo, la información obtenida mediante esta técnica no ha sido suficiente para evaluar hipótesis sobre el origen de estas formas. Herramientas moleculares más potentes, como es la comparación de filogenias mitocondriales y nucleares o la clonación de genes de copia única en especies poliploides, darán sin duda más información sobre este tópico.

V. Marcadores moleculares en lombrices de tierra.

El estudio de las lombrices de tierra a través de marcadores moleculares es un campo todavía muy emergente. Empezó a desarrollarse en los años 80 para intentar responder diversas preguntas que de otro modo son imposibles de abordar debido a las dificultades que ofrece este grupo de animales: escasez de registro fósil (Pearce et al., 1990), imposibilidad de observación directa lo que dificulta la realización de trabajos eco-etológicos, dificultad taxonómicas debido al solapamiento de caracteres entre especies y a la variabilidad de los mismos dentro de especies, etc.

Son diversas técnicas las que se han empleado hasta el presente: polimorfismos enzimáticos, AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms), RAPDs (Random Amplification of Polymorphic DNA), amplificación de genes mitocondriales, nucleares y regiones microsátélites. Se puede encontrar un excelente compendio de los trabajos moleculares realizados hasta ahora en lombrices de tierra en Dupont (2009) y Novo (2010). En la más reciente actualidad, se está empezando a trabajar con ARN y transcriptomas. En lo que respecta a esta tesis, la técnica elegida ha sido la amplificación directa de genes mitocondriales y nucleares, lo que se tratará en detalle a continuación.

La importancia de las secuencias de ADN reside en gran parte en que cada nucleótido de su estructura primaria tiene el papel de carácter homólogo cuando comparamos dicha secuencia en varios organismos. La gran mayoría de los cambios que observamos en una misma secuencia de organismos distintos son mutaciones neutras que no confieren ninguna ventaja o desventaja selectiva al organismo que las porta. Con cada generación, los organismos cambian ligeramente, y la tasa de cambio tiende a ser constante y fiable, pero variable dentro de grupos o incluso especies (Novo et al., 2010). La filogenia molecular trata de determinar las tasas y patrones de cambio ocurridos en el ADN o en las proteínas y mide el nivel de homología entre las secuencias de varios individuos para analizar y reconstruir sus relaciones evolutivas. Así, las poblaciones tendrán unas relaciones de parentesco genético, lo que complementado con información adicional como su patrón de distribución, eventos biogeográficos relevantes, etc. nos dará una idea de su historia evolutiva.

El ADN mitocondrial es muy utilizado en estudios evolutivos debido a una serie de propiedades que lo hacen realmente adecuado para este tipo de estudios (Harrison, 1989, Wolstenholme, 1992, Simon et al., 1994, Lunt, 1996; Saccone et al., 1999):

- Origen materno, por lo que presenta ausencia de recombinación.
- Fácil aislamiento.
- Presenta un gran número de copias (mínimo una por mitocondria).
- Estructura más o menos conservada en animales.
- Amplio rango de tasas evolutivas en diferentes regiones (genes más conservados o más variables).

- Una región control + 37 genes estructurales codificantes de proteínas y ribosomas.

El gen de la citocromo oxidasa I (COI o COXI) ha sido muy utilizado en estudios filogenéticos a escala intraespecífica o intragenérica debido a su rápida variación sobre todo en la tercera posición de los codones. De hecho, ha sido propuesto como ‘código de barras genético’ para la identificación de especies animales (Hebert et al., 2003) debido a la existencia de primers universales muy robustos que permiten la amplificación en filos muy diversos. En lombrices de tierra, existen numerosos estudios a partir de secuencias de este gen (Pop et al., 2003, Chang y Chen, 2005, Csuzdi et al., 2005, Pérez-Losada et al., 2005, Pop et al., 2005, Huang et al., 2007, Novo, 2010). El gen de la citocromo oxidasa II (COII o COXII) ha sido menos empleado ya que no existen primers universales tan robustos, a pesar de tener las mismas ventajas (Heethoff et al., 2004; Pérez-Losada et al., 2009). Otros genes mitocondriales son también muy utilizados, tales como el 12S o 16S rRNA. Su tasa de mutación es unas 3 veces menor que la del COI, lo que les da un valor complementario en estudios filogenéticos para detectar señales a nivel intraespecífico e intragenérico (Pop et al., 2003; Halanych y Janosik, 2006).

Como se ha comentado anteriormente, es importante utilizar marcadores moleculares con variabilidad distinta, ya que nos darán información complementaria a otro nivel. Por otra parte, es también muy útil la comparación y complementación de genes mitocondriales y nucleares, puesto que en los nucleares vemos la señal de la recombinación mientras que en los mitocondriales sólo tendremos información de la herencia materna. En linajes unisexuales estrictos sin recombinación, las filogenias basadas en genes mitocondriales y nucleares deberían corresponder perfectamente. Por otra parte, si los linajes asexuales resultan de la hibridación de individuos conespecíficos o interespecíficos sexuales, o si existe sexo raro dentro de los linajes unisexuales, deberían encontrarse incongruencias entre las filogenias mitocondrial y nuclear.

Los genes ribosómicos nucleares también han sido muy utilizados para la filogenia de anélidos. Los dos genes más utilizados son el 18S y el 28S rRNA. El gen 18S rRNA (subunidad pequeña del ribosoma) es útil a nivel de familia, orden y en ocasiones para identificar taxones hermanos (Erseus et al., 2002, Nygren y Sundberg, 2003, Rousset et al., 2004). El gen 28S rRNA (subunidad grande del ribosoma) suele ser más conservado

que el gen anterior, por lo que daría resolución a niveles más generales (Halanych y Janosik, 2006).

El uso de genes nucleares codificantes de proteínas es algo más reciente. Es el caso, por ejemplo, de las histonas H3 y H4, que en el caso de las lombrices de tierra aportan una buena resolución filogenética no solamente a nivel de familia y género (Novo, 2010), sino también a nivel intraespecífico, tal como se verá en los resultados de esta tesis. Ambas histonas presentan más variabilidad que los genes ribosómicos, siendo la H3 más variable que la H4.

VI. Objetivos de esta tesis.

A pesar de ser una de las especies de lombriz más abundante y extendida por toda la tierra, existen muy pocos estudios sobre la lombriz partenogenética *Aporrectodea trapezoides*: no sabemos de dónde ha surgido ni las relaciones biogeográficas entre sus poblaciones a nivel global, los estudios moleculares sobre su variabilidad genética son muy limitados y sus relaciones filogenéticas con especies parecidas quedan mal resueltas. La taxonomía tradicional no resuelve suficientemente el conflicto existente respecto al status legal de las formas que integran el complejo de especies *Aporrectodea caliginosa*, en el que usualmente se ha incluido a *A. trapezoides*. Los estudios moleculares más recientes dejan *A. trapezoides* sin resolver adecuadamente ya que aparece envuelta en una enorme politomía (Pérez-Losada et al., 2009). El carácter partenogenético de esta especie dificulta en gran medida este tipo de estudios.

Como objetivo general de esta Tesis, se pretende contribuir al conocimiento de qué es en realidad *A. trapezoides*, e intentar responder a preguntas sobre de dónde viene, cómo de variable es y cómo se reproduce, contextualizando su situación con el estudio de las relaciones filogenéticas de todo el complejo *A. caliginosa*. Para ello, se realizarán estudios a macroescala, mesoescala y microescala.

Los objetivos particulares son:

I. ESTUDIOS A MACROESCALA.

A. Filogeografía de *A. trapezoides* (capítulos 2 y 3).

1. ¿Cuál es la diversidad clonal de *A. trapezoides*?
2. ¿Existen linajes diferenciados en esta especie? Si es así, ¿cuál es su variabilidad genética?
3. ¿Existen diferencias morfológicas entre los distintos linajes?
4. ¿Cuáles son las relaciones filogenéticas de esta especie? ¿Cómo es el patrón de distribución de los clones y linajes?
5. ¿Cómo es la historia demográfica y evolutiva de *A. trapezoides*? ¿Existen diferencias a ese nivel entre los diferentes linajes?

B. Filogenia del complejo de especies *Aporrectodea caliginosa* (capítulo 4).

6. ¿Cuáles son las relaciones filogenéticas entre las especies típicamente consideradas dentro de este complejo y otras muy similares morfológicamente, hasta ahora no estudiadas a nivel molecular (*A. giardi*, *Nicodrilus tetramammalis*, *N. monticola* y *N. carochensis*)?
7. ¿Qué posición filogenética ocupa *A. trapezoides* dentro de este grupo de especies?
8. ¿Quedan las especies bien delimitadas?
9. ¿Tiene la partenogénesis un origen simple o múltiple en *A. trapezoides*?
10. ¿Cuándo se originó *A. trapezoides*? ¿Y el resto de especies del grupo?

A raíz de estos dos primeros estudios a macroescala, se obtienen ciertos resultados interesantes que se investigan en detalle en los siguientes capítulos y que son muy relevantes para saber más en profundidad qué es *A. trapezoides*, de dónde viene y cómo se reproduce.

II. ESTUDIOS A MESOESCALA.

C. Análisis de varias poblaciones de *A. trapezoides* que contienen individuos con espermatecas llenas y vacías (capítulo 5).

En un estudio realizado por los miembros del grupo sin relación con esta Tesis y casi al término de la misma, se han encontrado varios puntos de muestreo dentro de un área geográfica restringida en los que la población de lombrices de tierra contenía ejemplares de *A. trapezoides* unos con con espermatecas llenas (presuntamente sexuales) y otros con espermatecas vacías (presuntamente partenogénicas). El tamaño muestral es grande por lo que este hallazgo ha representado la posibilidad de realizar un estudio de detalle y con buen nivel de significación (capítulo 7). Las posibilidades que ofrece esta zona con población mixta son enormes pero no pueden ser exploradas en esta Memoria por falta de tiempo, pero lo serán sin duda en trabajos posteriores ya que pueden ayudar mucho a entender el origen de la partenogénesis en este grupo de lombrices de tierra.

11. ¿Cómo es la genética de estas poblaciones?

12. ¿Cómo son de similares genéticamente los individuos con espermatecas llenas y vacías? ¿Y los individuos con variación morfológica en papilas y clitelo?

13. ¿Existe variabilidad morfológica entre ellos?

14. ¿Se puede establecer alguna hipótesis sobre el posible origen de las formas partenogénicas?

III. ESTUDIOS A MICROESCALA.

D. Ciclo biológico del clon predominante en *A. trapezoides* (el denominado 'clon 1') (capítulo 6).

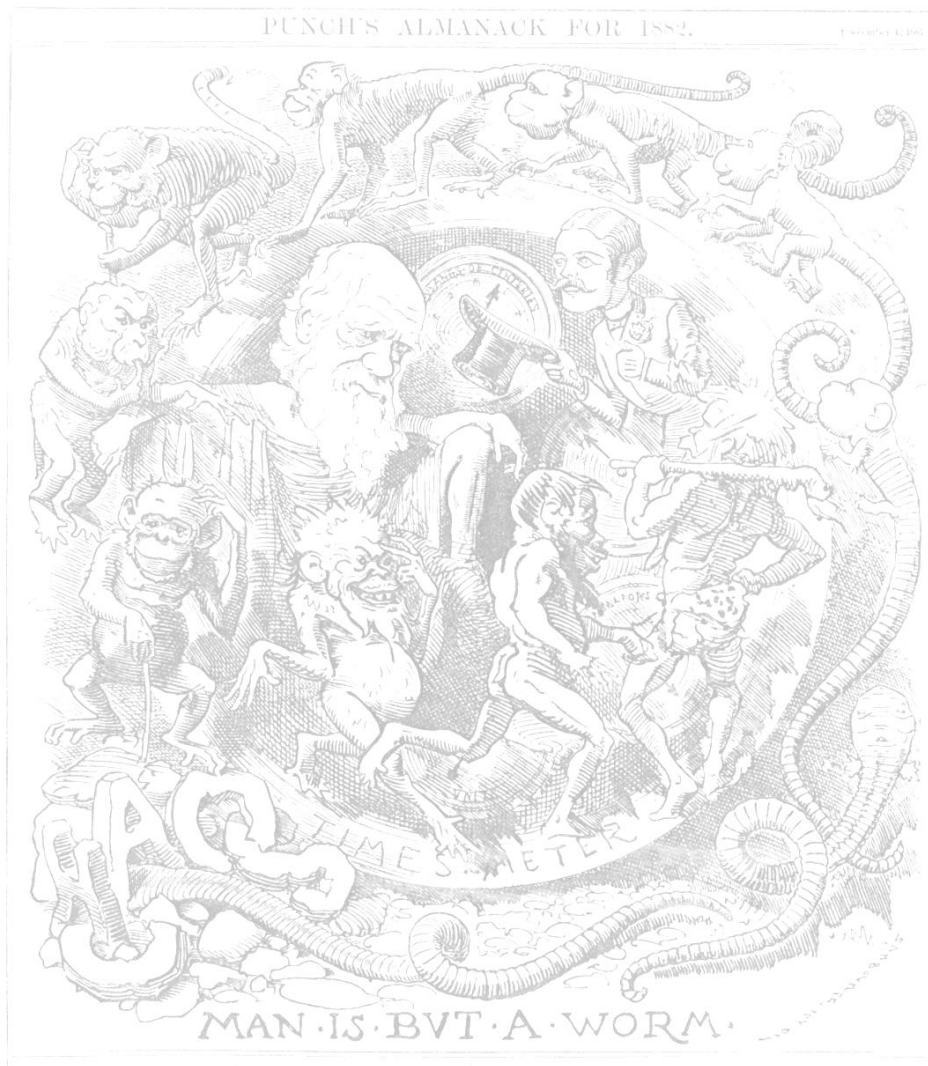
Durante el estudio de los linajes de *A. trapezoides* se ha encontrado un clon que es compartido aproximadamente por un tercio de los individuos muestreados de *A. trapezoides*, y cuya distribución es mundial. Este clon se ha denominado 'clon 1' (capítulo 5).

15. ¿Cómo es el ciclo biológico de este clon? ¿Cuál es su éxito reproductivo?
16. ¿Existe plasticidad fenotípica dentro de los individuos de este clon?

E. Análisis morfológico y ultraestructural de los órganos reproductores masculinos de *A. trapezoides* con espermatecas llenas y vacías (capítulo 7):

En una de las poblaciones muestreadas en los capítulos anteriores (Saint-Hilaire-du-Bois, Francia), se encuentran algunos individuos de *A. trapezoides* con espermatecas llenas (presuntamente sexuales), lamentablemente el tamaño muestral es pequeño y no se ha podido utilizar esta población para otros estudios más profundos. Se plantea por ello un estudio a nivel ultraestructural comparando estos individuos con otros que presentan espermatecas vacías y llenas.

17. ¿Cuáles son las diferencias a nivel morfológico y ultraestructural en las espermatecas y vesículas seminales de lombrices con espermatecas llenas y vacías?
18. ¿Son los órganos funcionales en los individuos de espermatecas llenas? ¿Se trata de individuos sexuales?



Capítulo 2

Un clon errante en una especie peregrina: filogeografía, alta diversidad clonal y distribución geográfica en *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828).

Fernández et al. (2011). A vagrant clone in a peregrine species: phylogeography, high clonal diversity and geographic distribution in *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828). *Soil Biology and Biochemistry* 43, 2085-2093.

Resumen

La lombriz peregrina *Aporrectodea trapezoides* es originaria de la región paleártica pero se distribuye actualmente por todo el mundo debido a su uso extendido como cebo de pesca y la expansión de las prácticas agrícolas europeas. Hasta ahora, se conoce muy poco sobre su diversidad clonal o la diversificación geográfica de sus clones. Este estudio trata de explorar la historia evolutiva de *A. trapezoides* mediante el análisis del ADN mitocondrial (genes COI y COII) y nuclear (28S rRNA e histona H3) de individuos recolectados en 11 países distintos. Se encontró una alta diversidad clonal, con 37 clones claramente divididos en dos linajes distintos (I y II). La barrera biogeográfica que separa la distribución de estos linajes corresponde a grandes rasgos con la línea que separa la franja eurosiberiana de la península ibérica de la zona mediterránea. Aproximadamente un tercio de los ejemplares estudiados perteneció al clon 1 del linaje II. Este clon se encontró en la mayor parte de las localidades muestreadas, mientras que el resto de clones en general mostraron una distribución geográficamente restringida. Este clon parece haberse originado en el área mediterránea del centro de España. Debido a su amplia distribución, se discute la posibilidad de que posea un genotipo generalista ('general purpose genotype'), lo que le permite adaptarse a un amplio rango de nichos ecológicos.

Abstract

The peregrine lumbricid *Aporrectodea trapezoides* is originally from the Palaearctic region but is distributed worldwide due to its widespread use as fishing bait and the spread of European agricultural practices. Little is known about its clonal diversity or the existence of a pattern of biogeographical diversification of clones. This study aimed to explore the evolutionary history of *A. trapezoides* by analysing the mitochondrial (COI and COII) and nuclear (28S rRNA and histone H3) DNA sequences of individuals collected in 11 different countries. High clonal diversity was found for this species, with thirty-seven clones clearly divided into two distinct lineages (I and II). The marked biogeographical boundary between these lineages corresponds to the line separating the Eurosiberian and Mediterranean climates in North España. Clone 1 was shared by approximately one third of the earthworms. While this clone was found in most of the sampled localities, the rest of the clones showed geographically restricted distributions. This clone may have originated in the Mediterranean area of Central Spain. As it was obviously introduced in Australia and it was found in locations occupied by members of both lineages, we hypothesise that it may have also been introduced in other countries and that it could be a general-purpose genotype able to adapt to a wide range of niches.

Las lombrices de tierra tienen un interés particular desde el punto de vista filogenético y biogeográfico ya que son un grupo antiguo con escasa movilidad y en muchas ocasiones confinadas en sus regiones de origen. Sus distribuciones pueden reflejar eventos paleogeográficos pasados debido a su restricción en áreas pequeñas durante todas las etapas de su vida y a su susceptibilidad a condiciones medioambientales extremas (como desecación).

Por otra parte, en tiempos relativamente recientes dos factores han permitido a algunas especies ampliar enormemente su distribución. Primero, el movimiento humano a través del globo ha causado el transporte no intencionado de lombrices de tierra en conexión con la agricultura y el comercio. Segundo, en décadas recientes el fenómeno de las mejoras biológicas en suelos vía introducción o estimulación de las lombrices ha empezado a atraer atención científica. Son muchos los estudios que demuestran la importancia de estas especies en el proceso de pedogénesis, así como su efecto en el reciclaje de nutrientes, el mantenimiento de la fertilidad y estructura del suelo y productividad de las plantas (Brun et al., 1987; Edwards y Bohlen, 1996), lo que ha llevado a la ejecución de varios proyectos de introducción de lombrices. Por ejemplo, Huhta (1979) introdujo *Aporrectodea caliginosa* en bosques de coníferas en Finlandia con resultados muy prometedores. Otras introducciones de lombrices en polders holandeses (Van Rhee, 1969; Hoogerkamp et al., 1983; Hoogerkamp, 1984), turberas en Irlanda (Curry y Bolger, 1984; Curry y Boyle, 1987), antiguas minas en América (Dunger, 1969; Vimmerstedt y Finney, 1973; Hamilton y Vimmerstedt 1980) o pastos en Nueva Zelanda (Stockdill, 1982) han arrojado resultados muy positivos.

Aporrectodea trapezoides es una lombriz peregrina. Como se comentó en la introducción, este término fue empleado por primera vez en lombrices por Michaelsen (1903) para describir la amplia distribución de algunas especies y su presencia en localidades geográficamente remotas. *A. trapezoides* es una especie ampliamente distribuida. Es normalmente la especie predominante en suelos mediterráneos (tanto en términos de biomasa como de número de individuos), y a menudo la única especie

presente debido a su gran capacidad de adaptación a condiciones ambientales extremas. Es por ello que *A. trapezoides* es sin duda una especie clave en el manejo del suelo a nivel global.

Al igual que *A. trapezoides*, otras especies peregrinas son también partenogenéticas. Existen varios estudios que tratan sobre la diversidad genética de este tipo de lombrices. En algunas especies, la diversidad clonal es baja, con un número reducido de clones (por ejemplo, uno o dos clones en el caso de *Octolasion cyaneum* y *O. tyrtaeum* (Terhivuo y Saura, 2003; Heethoff et al., 2004), mientras que en otras especies se han encontrado muchos más (por ejemplo, 20 clones en 50 ejemplares de *Aporrectodea rosea*, Terhivuo y Saura, 2006).

El presente estudio pretende examinar la variación genética (dos genes mitocondriales y dos nucleares) y las relaciones filogeográficas de varias poblaciones de *Aporrectodea trapezoides* recolectadas a nivel mundial para arrojar luz sobre i) la variabilidad clonal en esta especie, y ii) la existencia de diferentes linajes y, en caso afirmativo, la distinción de los mismos.

Materiales y Métodos

I. Muestreo

Un total de 178 especímenes de *A. trapezoides* fueron recolectados mediante cavado y extracción manual en 47 localidades diferentes (Fig. 1, Tabla 1) de España, Francia,

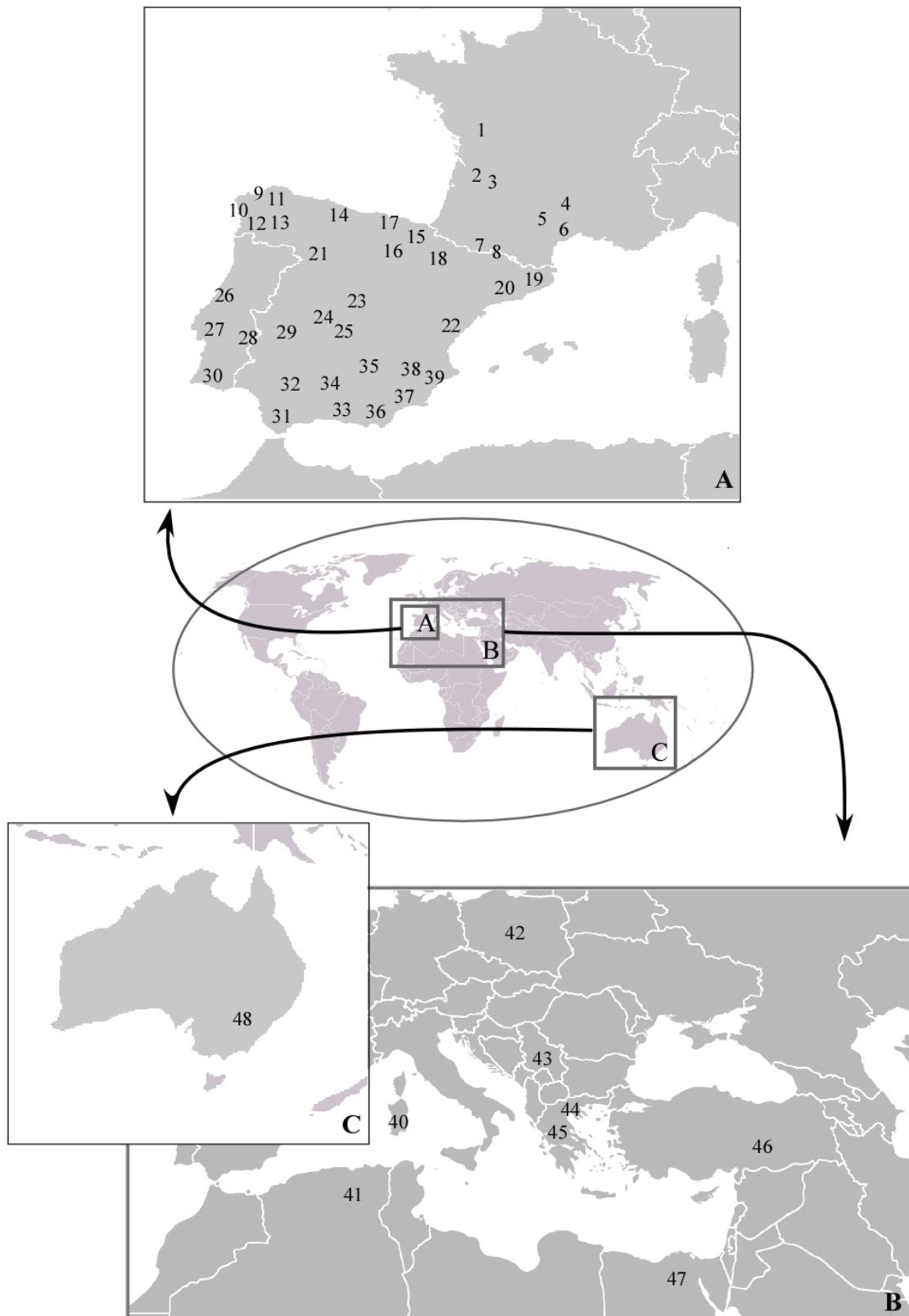


Fig. 1. Distribución geográfica de las localidades muestreadas.

Portugal, Italia, Grecia, Turquía, Algeria, Egipto y Australia. Todos los individuos fueron morfológica y anatómicamente identificados como *A. trapezoides* siguiendo las claves de Gates (1972), especialmente teniendo en cuenta la posición de las tumescencias genitales setales en los segmentos 9, 10 y 11, la localización del clitelo y de los tubérculos pubertarios no divididos en los segmentos 31 a 33, y la esterilidad masculina (espermatecas y embudos masculinos, ambos en los segmentos 10 y 11).

Después de la recolección, los especímenes fueron lavados con agua destilada y mantenidos en etanol absoluto o etanol 96° a -20°C. Una porción de la pared del cuerpo (± 0.025 g) se extrajo y se limpió cuidadosamente bajo estereomicroscopio para eliminar las partículas de suelo y los parásitos macroscópicos. Las muestras de tegumento se mantuvieron en etanol a -20°C hasta su digestión para la extracción del ADN.

Clon	Población	GPS	N. población en Fig.1
1 (78)	<i>Adé (Francia, MPL86)</i>	N 43° 09' 59.4" W 00° 00' 20.6"	7
	Constantine (Algeria)	N 36° 33' E 06° 21'	41
	Archena (España)	N 38° 07' 05.7" W 01° 16' 44.8"	37
	Harden (Australia)	S 34° 33' E 148° 21'	48
	Carnota (España)	N 42° 49' 26.01" W 09° 06' 09.60"	9
	El Cairo (Egipto)	N 30° 01' E 31° 12'	47
	El Molar (España)	N 40° 44' 22.9" W 03° 33' 53.1"	24
	Fátima (Portugal)	N 39° 37' 33.5" W 08° 40' 07.0"	26
	<i>Lugo (España, MPL109)</i>	N 43° 11' 34.2" W 07° 13' 46.2"	11
	Mojácar (España)	N 37° 08' 48.0" W 01° 52' 15.7"	36
	Molinicos (España)	N 38° 28' 31.5" W 02° 11' 19.1"	35
	<i>Navarra (España, MPL100)</i>	N 42° 01' 33.1" W 01° 39' 22.9"	15
	Navarrés (España)	N 39° 06' 26.1" W 00° 42' 32.8"	38
	<i>Ourense (España, MPL48)</i>	N 42° 08' 13.5" W 08° 02' 52.5"	13
	San Teodoro (Italia)	N 40° 47' 05.9" E 09° 40' 05.5"	40
	St. Gély-du-fesc (Francia)	N 43° 42' 19.0" E 03° 48' 03.7"	6

	Sta. Cristina de la Polvorosa (España)	N 41° 59' 56.10"	21
	Kragujevac (Serbia, MPL119)	W 05° 41' 53.96" N 44° 00' E 20° 59'	43
	Soudan (Francia, MPL85)	N 46° 25' 11.5" W 00° 04' 09.2"	1
	Diyabakir (Turquía)	N 37° 54' W 40° 13'	46
	Bilbao (España, MPL103)	N 43° 17' 54.10" W 03° 02' 32.30"	17
	Vigo (España, MPL312)	N 42° 10' 01.9" W 08° 41' 03.5"	12
	Vitoria (España, MPL104)	N 42° 55' 35.3" W 02° 43' 46.0"	
2 (5)	Alcalá de los Gazules (España)	N 36° 26' 28.7" W 05° 43' 14.3"	31
3 (1)	El Brull (España)	N 41° 48' 00.0" E 02° 21' 00.0"	20
4 (21)	El Brull (España)		
	Puerto Querol (España)	N 40° 33' 49.1" W 00° 01' 03.5"	22
	Robledillo (España)	N 39° 35' 49.6" W 04° 49' 39.6"	25
	Sitagri (Grecia)	N 41° 07' E 24° 01'	44
	Maara (Grecia)	N 41° 09' E 24° 07'	45
	Villavelayo (España)	N 42° 06' 23.63" W 02° 55' 41.06"	16
5 (11)	Corzos (España)	N 42° 39' 33.02" W 09° 01' 27.75"	10
	Lanne (Francia)	N 43° 09' 57.2" E 00° 00' 18.6"	8
	Laubert (Francia)	N 44° 35' 15.2" E 03° 39' 45.6"	4
	San Román (España)	N 43° 15' 20.9" W 05° 05' 10.3"	14
	Vitoria (España, MPL156)	N 42° 55' 35.3" W 02° 43' 46.0"	17
6 (17)	Corzos (España)		10
	Peña Oroel (España)	N 41° 23' 27.3" E 01° 49' 39.3"	18
	Saint Hilaire-du-Bois (Francia)	N 44° 39' 41.6" W 00° 05' 23.8"	2
	San Román (España)	N 43° 15' 20.9" W 05° 05' 10.3"	
	Sant Joan de les Abadesses (España)	N 42° 13' 30.0" E 02° 14' 57.5"	19
7 (5)	Écija (España)	N 38° 44' 38.1" W 02° 35' 02.7"	32
8 (2), 10 to 13 (1 each)	Laubert (Francia)		
9 (3)	Laubert (Francia)		
	Lomianki (Polonia, MPL94)	N 52° 20' E 20° 53'	42
14 (3), 15 (6)	Linares (España)	N 38° 05' 17.7" W 03° 39' 00.8"	34
	Piñar (España)	N 37° 24' 39.2" W 03° 29' 47.0"	33
16 (5)	Marvão (Portugal)	N 39° 22' 06.0"	28

		W 07° 20' 12.9"	
17 (5)	Mende (Francia)	N 44° 29' 43.6" E 03° 27' 41.9"	5
18 (3), 19 (1)	Monchique (Portugal)	N 37° 12' 14.9" W 08° 32' 07.5"	30
20 (1)	Robledillo (España)		
21 (1)	Laubert (Francia)		
22 (3), 23 (2)	Romangordo (España)	N 39° 44' 10.6" W 05° 42' 53.7"	29
24 (1)	San Román (España)		
25 (4), 26 to 28 (1 each)	Saint Hilaire-du-Bois (Francia)		
29 (2)	Vall d'Uixó (España)	N 39° 50' 25.2" W 00° 15' 59.7"	39
30 to 34 (1 each)	Vendas Novas (Portugal)	N 38° 40' 13.7" W 08° 26' 35.8"	27
35 (1)	<i>Toledo (España, MPL57)</i>	N 39° 51' 23.36" W 04° 06' 21.42"	24
36 (1)	<i>Adé (Francia, MPL87)</i>		
37 (2)	<i>Monségur (Francia, MPL89, MPL92)</i>	N 44° 39' 19.27" E 00° 04' 50.54"	3

Tabla 1. Tabla de correspondencias entre clones y localidades. El número de individuos muestreados por clon en cada localidad se indican entre paréntesis al lado del número de cada clon. Se indican las coordenadas GPS y el número de cada localidad en el mapa de la Fig. 1. Las poblaciones en cursiva corresponden a secuencias tomadas de GenBank (secuencias solamente de los genes COII y 28S rRNA; entre paréntesis, código identificativo de cada secuencia en GenBank empezando por MPL; Pérez-Losada et al., 2009). En el caso de encontrar distintos clones en la misma localidad, las coordenadas GPS y el número de población correspondiente a la Fig. 1 sólo se dan en el primer caso en que la población es mencionada.

II. Estudio anatómico-morfológico de los ejemplares

Se estudiaron 91 ejemplares a nivel morfológico y anatómico de 16 localidades distintas para ver si existen diferencias entre poblaciones. En concreto, se observaron la longitud total del individuo, el número de segmentos, posición de tubérculos, clitelo y papilas, número de segmentos tifosolados y atifosolados, y posición y estado de las espermatecas (vacías o llenas). Se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVAs) para ver si existían diferencias significativas en los caracteres cuantitativos entre las poblaciones estudiadas, y un análisis de la t de Student para ver las diferencias entre los dos linajes. Además, se observó el patrón general de los caracteres cualitativos.

III. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

El ADN genómico total fue extraído con el kit DNAeasy Tissue kit (Qiagen). La reacción en cadena de la polimerasa ('Polymerase chain reaction', PCR; Saiki et al., 1988) se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer 9700.

Se amplificó un fragmento del gen nuclear 28S rDNA (809 pares de bases) usando los cebadores descritos en Pérez-Losada et al. (2009), F1 (5'- GAG TAC GTG AAA CCG TCT AG -3') y R1 (5'- CGT TTC GTC CCC AAG GCC TC- 3'). La PCR consistió en un paso inicial de desnaturalización a 95 °C durante 3 minutos y 40 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, alineamiento a 54.5°C durante 60 segundos, extensión a 72 °C durante 90 segundos), y un paso de extensión final a 72 °C (5 minutos).

Para la amplificación del fragmento de la citocromo oxidasa subunidad II (COII) (551 pares de bases) se emplearon los cebadores descritos en Pérez-Losada et al. (2009), COII-LumbF1 (5'-GGC ACC TAT TTG TTA ATT AGG-3') y COII-LumR2 (5'- GTG AGG CAT AGA AAT ACA CC -3'). Las condiciones de PCR fueron: un paso inicial de desnaturalización a 95 °C durante 3 minutos, seguido de cuarenta ciclos de desnaturalización a 95°C (60 segundos), alineamiento a 48°C (70 segundos) y extensión a 72 °C (75 segundos).

La amplificación del fragmento de la citocromo oxidasa subunidad I (COI) (459 pares de bases) se realizó gracias al diseño de los cebadores específicos LCO_AT (5'-CAT TYG TRA TAA TYT TCT TT -3') y HCO_AT (5'- GCT GAT ATA RAA TAG GGT CTC -3'), ya que la amplificación con los cebadores universales empleados en Folmer et al. (1994) resultó solamente en aproximadamente un tercio de las muestras. Las condiciones de amplificación fueron: un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 15 minutos,

seguido de 35 ciclos que comenzaron con un primer paso de desnaturalización a 94°C (30 segundos), un segundo paso de alineamiento a 50°C (70 segundos) y un tercero de extensión a 72°C (90 segundos), y un último paso de extensión final a 72°C (10 minutos).

El fragmento del gen nuclear histona H₃ (H₃)(311 pares de bases) se amplificó usando la pareja de cebadores H_{3aF} (5'- ATG GCT CGT ACC AAG CAG ACV GC -3') y H_{3aR} (5'- ATA TCC TTR GGC ATR ATR GTG AC -3') (Colgan et al., 1998). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C (30 segundos), alineamiento a 50°C (30 segundos) y extensión a 72°C (60 segundos), y fase de extensión final a 72°C (7 minutos).

El volumen total de la solución de PCR (50 µl) incluyó 0,6 µl de la muestra de ADN, 1 µM de cada cebador, 200 µM de dNTPs (Invitrogen), 1X de tampón de PCR con 1,5 mM de MgCl₂ (Applied Biosystems) y 1,25 unidades de enzima polimerasa AmpliTaq (Applied Biosystems). Se incluyó DMSO (1 µl) para la amplificación del gen 28S. En el caso del COII, se realizaron diluciones del ADN 1:32 ya que resultó que la alta concentración inhibía la reacción de PCR.

Todos los productos de PCR fueron específicos; se purificaron con el kit Speedtools PCR clean-up kit (Biotools) y se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio. La secuenciación automática en una dirección se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid y en MacroGen Inc. (Corea).

Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias de otras lombrices en GenBank usando el algoritmo de búsqueda BLAST (Altschul et al., 1997). Las secuencias de DNA se depositaron en GenBank bajo los números de acceso JF918579-JF918719. Treinta y seis secuencias adicionales (COII y 28s, 18 de cada gen) de *A. trapezoides* de distintas localidades de España, Francia, Serbia y Polonia disponibles en GenBank de un estudio anterior (Pérez-Losada et al., 2009) fueron añadidas a los análisis (Tabla 1). Varias secuencias de *Hormogaster elisae*, *H. ireguana*, *H. castillana* y *H. huescana* empleadas

como grupos externos se tomaron también de GenBank (COI, 28s y H₃) y/o fueron cedidas por Marta Novo (COII).

IV. Variabilidad genética y análisis filogenéticos.

El modelo de evolución de las secuencias y sus correspondientes parámetros fueron estimados con jMODELTEST v. 0.1.1 (Posada, 2008) para cada gen. Los modelos que mejor se ajustaron fueron utilizados en las estimaciones filogenéticas.

La saturación en las terceras posiciones de los genes mitocondriales (COI y COII) fue analizada con el programa DAMBE (Xia y Xie, 2001). Como es de esperar, se observó mayor saturación en las transiciones, mientras que las transversiones no se encontraban saturadas (Anexo 1). Por ello, se optó por realizar los análisis filogenéticos con todas las posiciones.

Los análisis de máxima verosimilitud ('Maximum likelihood, ML) se realizaron con el programa Phyml v. 2.4.4 (Guindon y Gascuel, 2003) incluyendo los valores de α e I dados por jMODELTEST. El soporte estadístico de la topología de los clados se calculó usando bootstrap (Felsenstein, 1985) con 1.000 pseudorréplicas. Esta aproximación de verosimilitud incluyó búsquedas heurísticas implicando cambio de ramas por bisección del árbol y reconexión ('Tree bisection and reconnection', TBR) con 10 adiciones de taxón al azar por paso.

Los árboles de máxima parsimonia se infirieron mediante el programa TNT v. 1.1 (Goloboff et al., 2003). Se realizaron búsquedas heurísticas con 1.000 rondas de adición de taxones al azar manteniendo 10 árboles por ronda hasta un total de 10.000 árboles. Los mejores árboles se sometieron a otra ronda de cambio de ramas TBR. El soporte de los clados se calculó usando bootstrap con 1.000 pseudorréplicas.

La estimación de la filogenia bayesiana se realizó mediante el programa MRBAYES v.3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Los parámetros en MRBAYES se fijaron a 1×10^6 generaciones y se muestrearon 1.000 árboles cada cien generaciones, utilizando la opción por defecto de árbol al azar para empezar el análisis. Todos los puntos muestrales anteriores a la fase de plató (200 árboles) se descartaron como 'burn in'. La probabilidad posterior (pP) de cada clado obtenido de análisis separados se comparó para ver la congruencia y luego se combinó y resumió en un árbol consenso del 50% (Huelsenbeck e Imennov, 2002; Huelsenbeck et al. 2002).

Las regiones génicas se analizaron tanto de manera aislada como en forma de supermatriz de múltiples particiones concatenadas. Para testar la existencia de conflictos en los sets de datos, se realizó el test de incongruencias en la diferencia de longitud ('Incongruence Length Difference test, ILD) (Farris et al., 1994) en el programa WINCLADA v.1.00.08 (Nixon, 2002).

Como medida de la diferencia neutral en las regiones codificantes mitocondriales, se calculó el porcentaje de diferencias en los sitios 4 veces degenerados (fourfold degenerate sites, D₄) siguiendo el método de Kumar (Nei y Kumar, 2000). Esta distancia se satura de manera mucho más lenta y es menos sensitiva al sesgo transición-transversión que las diferencias en las posiciones 2 y 3 veces degeneradas (Li, 1993; Mark Welch y Meselson, 2000). Las posiciones D₄ fueron identificadas mediante el programa DnaSP v. 5.0 (Librado y Rozas, 2005). Las distancias genéticas en estas posiciones fueron calculadas en MEGA 4.0 (Tamura, 2007). Las tasas de sustituciones sinónimas y no sinónimas fueron estimadas en MEGA 4.0 mediante varios algoritmos (Li et al., 1985; Li, 1993; Pamilo y Bianchi, 1993; Nei y Kumar, 2000). Las secuencias nucleotídicas fueron trasladadas a aminoácidos en el programa DnaSP v. 5 utilizando el código genético mitocondrial de planaria. El contenido en AT en ambos genes mitocondriales también se calculó con este programa.

V. Otros análisis estadísticos

La diversidad haplotípica media de las secuencias (π) dentro y entre clústers se calculó en el COII al ser el gen mitocondrial del que se tenían más muestras disponibles. Los valores de diversidad se usaron para comprobar si pares de clados hermanos cumplían la regla del 4X (Birky et al., 2005), que trata de delinear poblaciones independientes comparando la diversidad dentro y entre clústers recíprocamente monofiléticos, comprobando así la separación de los linajes. Esta regla se creó originariamente para estudiar procesos de especiación en animales partenogenéticos (Birky et al., 2005; Birky et al., 2010) y es ampliamente utilizada en estudios con este tipo de animales para delimitar especies (Birky y Barraclough, 2009; Bode et al., 2010).

Resultados

I. Alta diversidad clonal y variabilidad genética.

Nuestros resultados revelan una alta diversidad clonal dentro de *A. trapezoides*. Se distinguieron claramente dos linajes (linajes I y II) (Fig. 2). La diversidad clonal encontrada fue alta y claramente estructurada en distintos grupos de secuencias o 'clústers', separados en el árbol filogenético por ramas internas cortas o de longitud media (Fig. 3). Se encontró un mayor número de clones en el linaje II que en el I.

La distribución de los individuos muestreados por clon se muestra en la Fig. 4. El gráfico muestra una distribución bipolar, indicando que la mayor parte de los clones estaban representados o bien por muy pocos individuos (menos de 6) o por un alto número (20 o más). Además, la tendencia general fue la presencia de un sesgo a favor de un escaso número de individuos por clon.

El porcentaje de sitios D4 en las regiones codificantes de ambos linajes fue entre un 16% y un 19%. La medida del porcentaje de las distancias en las posiciones es una estima de la

distancia no paramétrica muy adecuada, ya que estos sitios no afectan a la secuencia de la proteína y se conoce que tienen un nivel de saturación menor y son mucho menos proclives a presentar sesgos entre transiciones y transversiones (Li, 1993). En nuestros

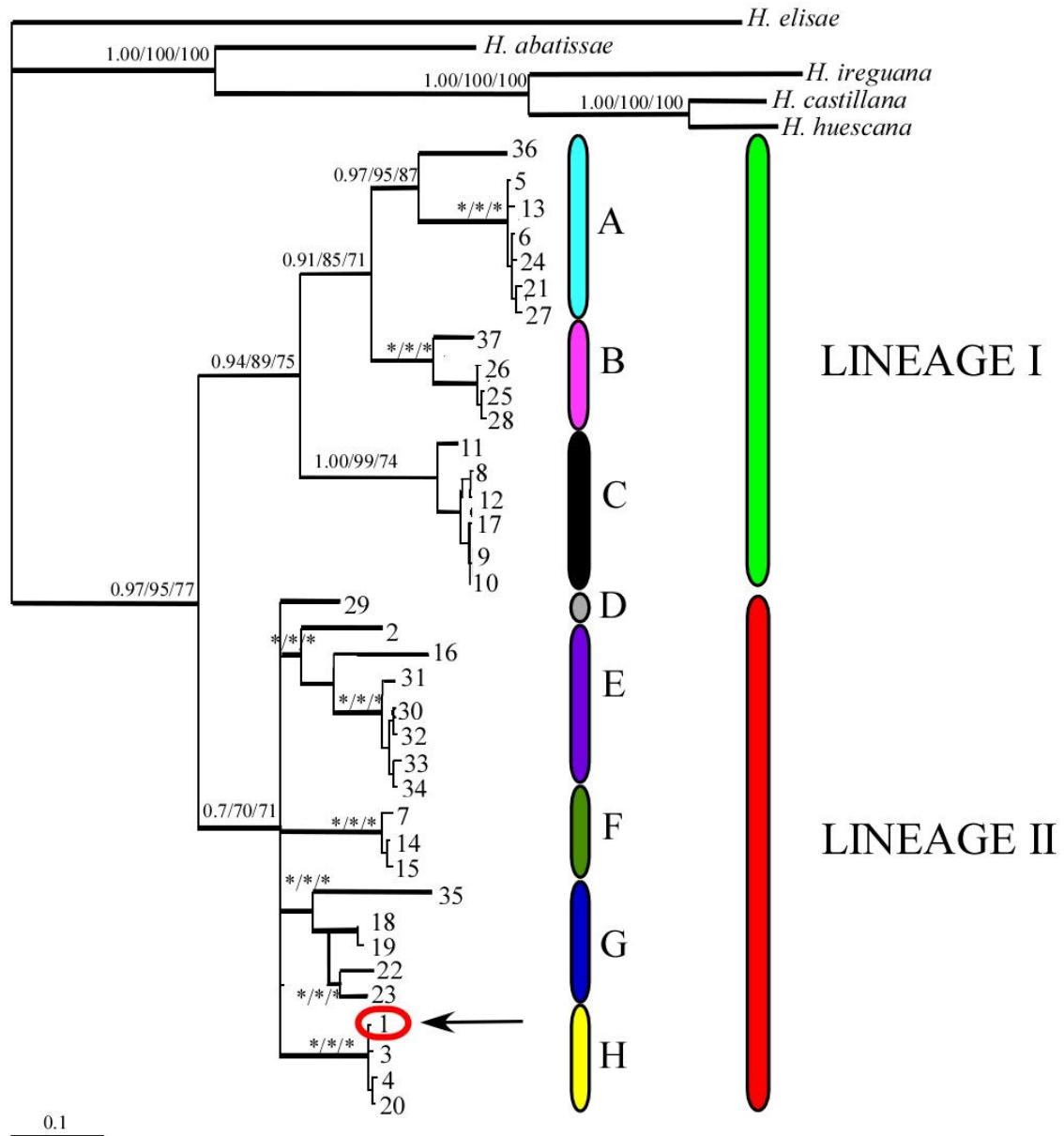


Fig. 2. Filograma basado en el análisis de inferencia bayesiana (BI) de la base de datos concatenada (COI, COII, 28S rRNA y H₃). Los valores de probabilidad posterior (BI) y de bootstrap arrojados por los programas de máxima verosimilitud (ML) y máxima parsimonia (MP) se indican sobre las ramas cuando > 0.70/70/70 (BI/ML/P). Un asterisco en ramas terminales indica > 0.70/70/70. La barra de escala representa 0,1 sustituciones por sitio. Se representan tanto los dos principales linajes (I y II) como subclados diferenciados dentro de cada uno de ellos (A a H).

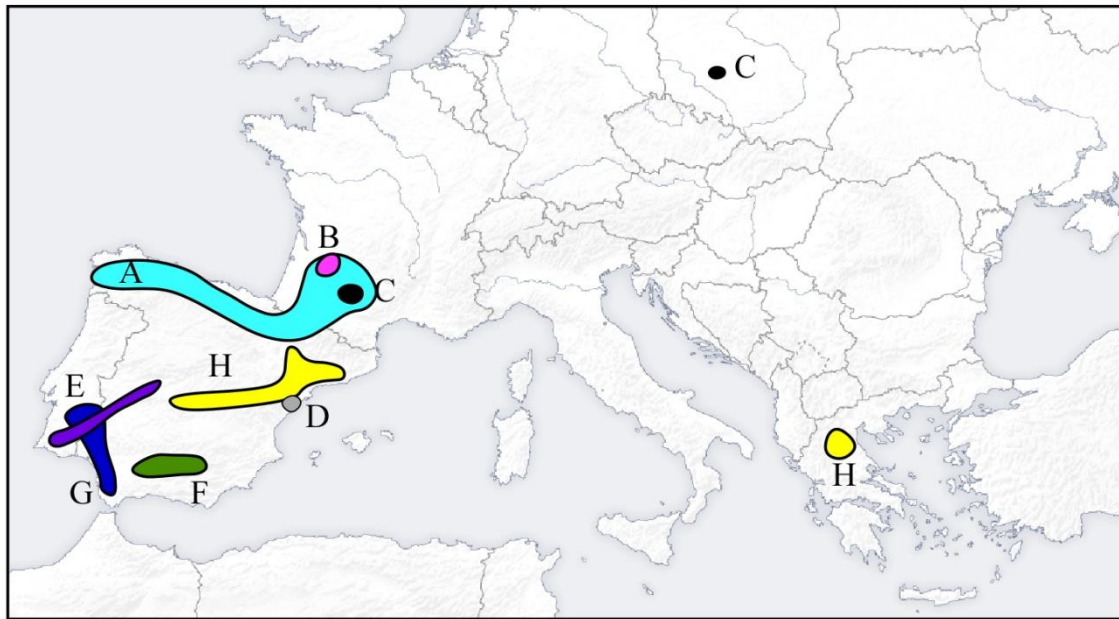


Fig. 3. Representación geográfica de los clados delimitados en el árbol filogenético de la Fig. 2. Cada área coloreada contiene los clones de cada clado para una mejor visualización; no predice si dichos clones serían encontrados fuera de los puntos muestreados incluidos en dichas áreas.

datos, la mitad de los sitios D₄ fueron variables y las distancias por pares variaron entre el 30% y el 41% en los genes COI y COII, respectivamente; estas distancias no soportan una división antigua entre los linajes, ni tampoco una alta saturación en las secuencias.

Los diferentes métodos empleados para calcular las sustituciones sinónimas (SS) y no sinónimas (NS) en los genes mitocondriales mostraron resultados muy similares. En todos los casos, las sinónimas fueron mucho mayores que las no sinónimas ($SS - NS > 1$), sugiriendo que estos genes están bajo fuerte selección. El contenido en AT en los genes mitocondriales estudiados fue similar (0,559 y 0,631 en COI y COII, respectivamente).

II. Análisis filogenéticos y distribución biogeográfica de los linajes

Se emplearon los tests de verosimilitud jerárquicos, el criterio de información de Akaike (AIC) y el criterio de información bayesiano (BIC) para elegir el modelo General de Tiempo Reversible ('General Time Reversible model', GTR) con distribución gamma (G) y sitios invariables (I) como el mejor modelo de evolución para los genes COII y 28s, y el modelo Hasegawa- Kishino- Yano (1985) con distribución gamma (HKY + G) para COI y H3.

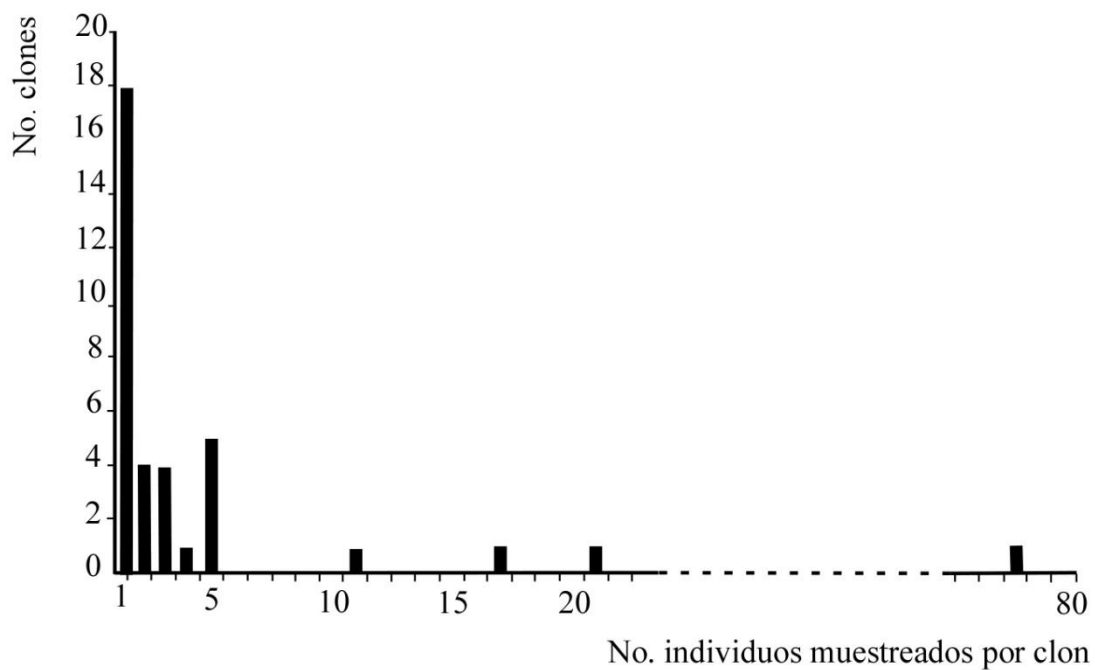


Fig. 4. Representación gráfica del número de clones que contienen el mismo número de individuos.

No se encontraron discordancias mayores entre las topologías de los árboles de ML, MP y BI. Las pocas diferencias topológicas observadas fueron siempre a nivel terminal y debidas principalmente al número mayor de politomías en el análisis bayesiano. Sin embargo, los mismos grupos de secuencias a nivel terminal fueron observados en todos los análisis. Todos los árboles realizados con las distintas particiones y con el set de datos

concatenados (Fig. 2) produjeron topologías congruentes. Además, el test ILD no encontró incongruencias significativas entre ellos ($P > 0.05$).

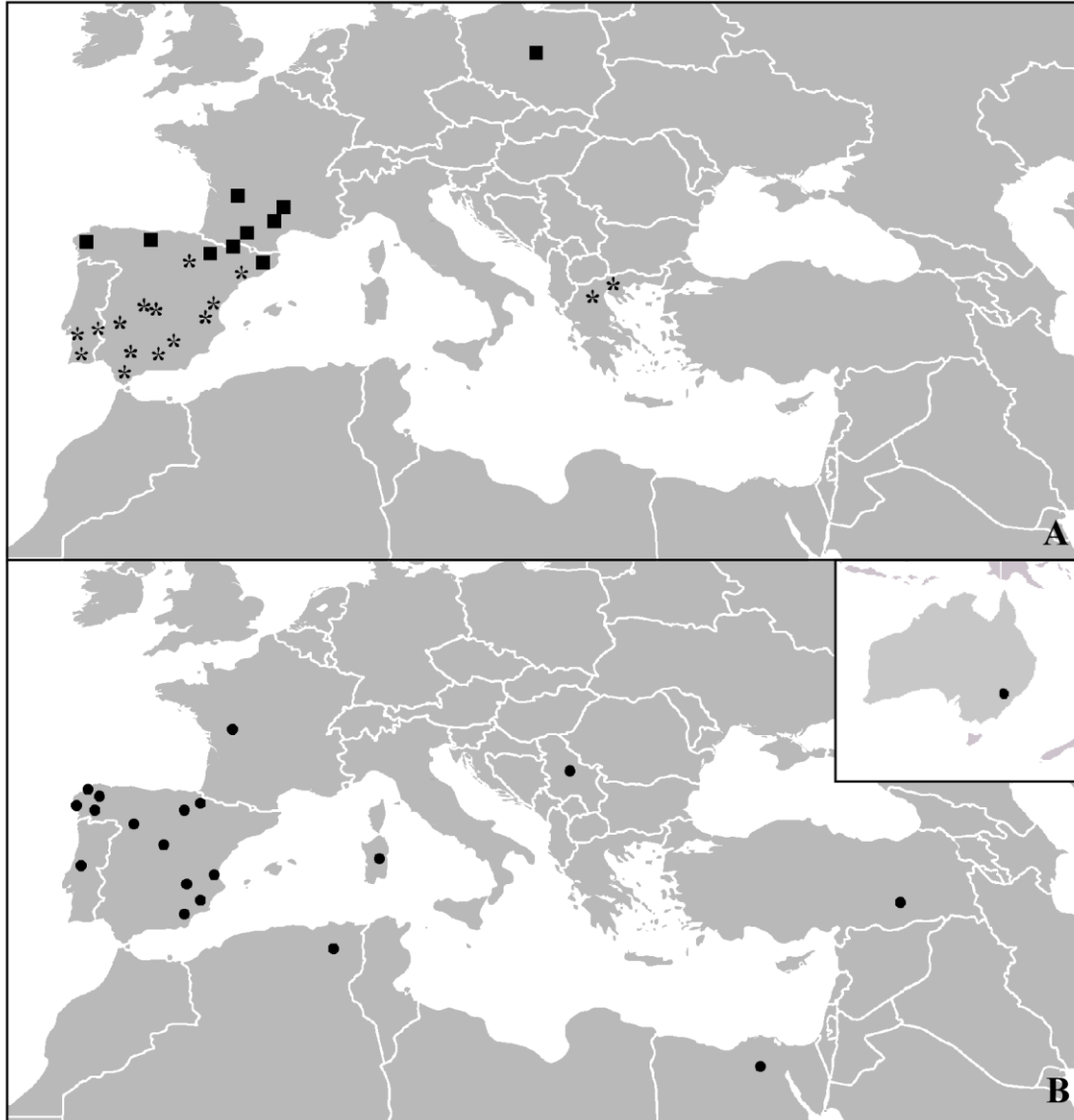


Fig. 5 (a) Distribución de ambos linajes principales encontrados en *A. trapezoides* (cuadrados: clones del linaje I; estrellas: clones del linaje II), excepto el clon 1. Fig 5 (b). Distribución del clon 1 (círculos).

Como se ha mencionado brevemente al inicio de los resultados, se encontraron dos linajes (llamados linaje I y II) representados por dos clados separados basalmente y soportados por altos valores de bootstrap y probabilidad posterior (Fig. 2). Cada linaje estaba formado por grupos de clados estrechamente relacionados y generalmente con alto valor de soporte estadístico.

La distribución del número de individuos por clon se muestra en la Tabla 1. El clon 1 (perteneciente filogenéticamente al linaje II) se encontró entre las muestras de la mayor parte de los países muestreados, mostrando una amplia área de distribución (Fig. 5a). El análisis de la distribución biogeográfica excluyendo el clon 1 mostró que ambos linajes tenían áreas de distribución claramente distintas. El linaje I muestra una distribución norteyropea (norte de España, Francia y Polonia), mientras que el linaje II se distribuye por el sur de Europa, países mediterráneos y Australia (Fig. 5a y b). En algunas poblaciones de ambos linajes los individuos pertenecientes al clon 1 se encontraron mezclados con otros clones.

Se testó la regla 4X en clados hermanos, excluyendo los clados sueltos. La mayoría de ellos no resultó consistente con dicha regla, ya que en todos los casos la distancia media entre clados fue menor de cuatro veces la distancia dentro de clados (Anexo 2). Solamente la obedecieron los clones 36 y 37 (linaje I).

III. Análisis anatómico-morfológico de los individuos

De los 91 individuos analizados, 44 resultaron pertenecer al linaje I y 47 al linaje II (Tablas 2 y 3). El ANOVA de los caracteres cuantitativos (longitud, número de segmentos totales, número de segmentos tiflosolados y atiflosolados) no mostró diferencias significativas entre linajes o entre poblaciones en ninguno de los casos (Tabla 4).

Población	Ref.	Longitud	Segmentos	Tubérculos	Clitelo	Papilas	No. tiflos.	No. atiflos.	Esp.	
Corzos	COR ₁	61	146	(30) 31-33	27,28-34	9,10,11	91	55	9-10,V	
	COR ₂	roto	roto	31-33	28-34	9,10,11	roto	roto	9-10,V	
	COR ₃	58	155	(30) 31-33	28-34,35	9,10,11	99	56	9-10,V	
	COR ₄	66	151	(30) 31-33	28-34,35	9,10,11	96	55	9-10,V	
	COR ₅	57	144	poco des	28-34 poco des	poco des	88	56	9-10,V	
	COR ₈	64	131	poco des	27-34	poco des	95	36	9-10,V	
	COR ₉	68	143	31-33	27-34	poco des	95	48	9-10,V	
	COR ₁₀	roto	roto	poco des	28-34	poco des	roto	roto	9-10,V	
	Lanne	LAN ₁	roto	roto	31-33	(27)28-34(35)	9,10,11	roto	roto	9-10,V
		LAN ₂	59	132	31-33	27-34	9,10,11	96	36	9-10,V
LAN ₃		77	153	(30) 31-33	(27) 28-34	9,10,11	105	48	9-10,V	
LAN ₄		58	138	31-33	27-34	9,10,11	98	40	9-10,V	
LAN ₅		70	146	31-33	(27) 28-34 (35)	9,10,11	100	46	9-10,V	

Tabla 2. Caracteres anatómico-morfológicos en individuos del linaje I de *A. trapezoides*. Ref: referencia de cada individuo. Poco des: poco desarrollados. No. tiflos: número de segmentos tiflosolados. No. atiflos: número de segmentos atiflosolados. Esp: espermatecas. V: vacías. LL: llenas.

Población	Ref.	Longitud	Segmentos	Tubérculos	Clitelo	Papilas	No. tiflos.	No. atiflos.	Esp.
Laubert	LAU7	104	139	31-33	(26) 27 - 34 (35)	9, 10, 11	102	37	9-10,V
	LAU10	69	153	31-33	(26) 27 - 34 (35)	9,10, 11 30,33,34	111	42	9-10,V
	LAU9	82	165	31-33	(26) 27 - 34 (35)	9, 10, 11	115	50	9-10,V
	LAU8	70	106	31-33	(26) 27 - 34 (35)	9, 10, 11	97	9	9-10,V
	LAU11	roto	roto	31-33	26 - 34	9, 10, 11	roto	roto	9-10,V
	LAU12	75	109	31-33	26- 34	9,10, 11	92	17	9-10,V
St. Hilaire-	SHB1	78	180	31-33	27-34	9,10,11	119	61	9-10,LL
du-Bois	SHB2	roto	roto	32-34 poco des	poco des.	(8) 9,10,11	roto	roto	9-10,V
	SHB3	78	187	(30) 31-33	28-34	9,10,11	125	62	9-10,LL
	SHB4	70	177	31-33	poco des.	9,10,11	121	60	9-10,V
	SHB5	68	140	(30) 31-33	poco des	poco des	128	12	9-10,V
	SHB6	91	178	31-33	poco des 29-34	9,10,11	118	62	9-10,LL
	SHB7	80	197	31-33	poco des.	poco des.	126	71	9-10,V
	SHB8	50	145	31-33	27-34	9,10,11	100	45	9-10,V
	SHB9	57	146	(30) 31-33	28-34 poco des	9,10,11	108	38	9-10,V
	SHB10	80	182	31-33	poco des	poco des	137	45	9-10,V

Tabla 2. Caracteres anatómico-morfológicos en individuos del linaje I de *A. trapezoides* (continuación).

Población	Ref.	Longitud	Segmentos	Tubérculos	Clitelo	Papilas	No. tiflos.	No. atiflos.	Esp.
Sant Joan de	SJOA1	roto	roto	31-33	(27) 28-34 (35)	9,10,11 20,30,32,34	roto	roto	9-10,V
les Abadesses	SJOA2	80	167	31-33	1/n27-1/n35	9,10,11 20,30,32,34	107	60	9-10,V
	SJOA3	roto	roto	31-33	1/n27-1/n35	9,10,11 20,30,32,34	roto	roto	9-10,V
	SJOA4	68	172	31-33	27-34	9,10,11, 30-34	120	52	9-10,V
	SJOA5	roto	roto	31-33	27-34	9,10,11	roto	roto	9-10,V
	SJOA6	roto	roto	31-33	27-34	9,10,11	roto	roto	9-10,V
	SJOA7	75	127	31-33	27-34	9,10,11 20,30,32,34	104	23	9-10,V
	SJOA8	roto	roto	31-33- difícil	27-34	9,10,11	roto	roto	9-10,V
	SJOA9	roto	roto	poco des	27-34	9,10,11	roto	roto	9-10,V
San Román	SAN1	82	143	(30) 31-33	27-34	9,10,11	101	42	9-10,V
	SAN2	82	190	31-33	28-34(35)	9,10,11	122	68	9-10,V
	SAN3	106	140	31-33	27-34 (35)	9,10,11,12 30,33,34	96	44	9-10,V
	SAN4	78	146	31-33	27-34	9,10,11 30,33,34	100	46	9-10,V
	SAN5	102	145	31-33	28-34	9,10,11	98	47	9-10,V
	SAN6	60	136	31-33	27-34	9,10,11	97	39	9-10,V

Tabla 2. Caracteres anatómico-morfológicos en individuos del linaje I de *A. trapezoides* (continuación).

Población	Ref.	Longitud	Segmentos	Tubérculos	Clitelo	Papilas	No. tiflos.	No. atiflos.	Esp.
Algeria	ALG1	87	138	31-33	26-34	9,10,11	106	32	9-10,V
	ALG2	87	147	31-33	27-34	(8),9,10,11	112	34	9-10,V
	ALG3	100	161	31-33	26-34	9,10,11 29,34	113	48	9-10,V
	ALG4	112	170	31-33	(26) 27-34 (35)	9,10,11	115	55	9-10,V
	ALG5	74	128	31-33	27-34	9,10,11	93	35	9-10,V
	ALG6	67	138	31-33	26-34	9,10,11,(12)	104	34	9-10,V
Carnota	CAR1	78	137	31-33	27-34	9,10,11	102	35	9-10,V
	CAR2	68	140	31-33	26-34	9,10,11	95	45	9-10,V
	CAR3	84	141	31-33	26-34	9,10,11 30,32,33	104	37	9-10,V
	CAR4	66	116	31-33	26,27-34	9,10,11	81	35	9-10,V
	CAR5	57	125	31-33	(26) 27-34	9,10,11	96	29	9-10,V
	CAR6	62	147	31-33	27-34	9,10,11	105	42	9-10,V
Diyarbakir	TUR1	roto	roto	no visibles	golpe, roto	poco des	roto	roto	9-10,V
	TUR2	79	148	31-33	(26) 27-34	9,10,11	104	44	9-10,V
	TUR3	74	124	31-33	26-34	9,10,11	97	27	9-10,V
	TUR4	roto	roto	(30)31-33	26-34	9,10,11	roto	roto	9-10,V
Sitagri	ROD1	54	91? Reg?	31-33	26-34	9,10,11	89	2	9-10,V
	ROD2	66	134	31-33	(25?) 26-34	9,10,11	no visible	no visible	9-10,V
Maara	DRA1	49	131	(30) 31-33	(26) 27-34 (35)	9,10,11	95	36	9-10,V
	DRA2	56	149	31-33	26-34	9,10,11, 32?	105	44	9-10,V
	DRA3	52	145	(30) 31-33	26-34 (35)	9,10,11	98	47	9-10,V

Tabla 3. Caracteres anatómico-morfológicos en individuos del linaje II de *A. trapezoides*. Ref: referencia de cada individuo. Poco des: poco desarrollados. No. tiflos: número de segmentos tiflosolados. No. atiflos: número de segmentos atiflosolados. Esp: espermatecas.

Población	Ref.	Longitud	Segmentos	Tubérculos	Clitelo	Papilas	No. tiflos.	No. atiflos.	Esp.
El Brull	BRU1	57	108	(30)31-33-(34)	27-34 (35)	8? 9, 10, 11	100	8	9-10,V
	BRU2	94	159	31-33	26-34	9,10,11 29,32	108	51	9-10,V
	BRU3	75	121	31-33	27?-34	9,10,11	97	24	9-10,V
	BRU4	55	123	31-33	27-34	9,10,11	100	23	9-10,V
	BRU5	67	131	31-33	27-34	9,10,11	101	30	9-10,V
Mojácar	MOJ1	80	144	31-33	26,27-34	9,10,11	105	39	9-10,V
	MOJ2	84	152	31-33	26-35	9,10,11 31,32,33	111	41	9-10,V
	MOJ3	82	159	(30) 31-33	(26) 27-34	9,10,11	106	52	9-10,V
	MOJ4	72	162	31-33	26-34	26,30,32,33	110	52	9-10,V
	MOJ5	64	138	31-33	26-34	9,10,11	93	45	9-10,V
	MOJ6	84	151	31-34	26-35	9,10,11	-	-	9-10,V
Sta. Cristina de	CRI1	60	139	31-33	27-34	9,10,11	94	45	9-10,V
la Polvorosa	CRI2	66	161	31-33	27-34	poco des	108	51	9-10,V
	CRI3	61	168	31-33	27?-34?	poco des	118	50	9-10,V

Tabla 3. Caracteres anatómico-morfológicos en individuos del linaje II de *A. trapezoides* (continuación).

Población	Ref.	Longitud	Segmentos	Tubérculos	Clitelo	Papilas	No. tiflos.	No. atiflos.	Esp.
Alcalá de los	ALZ1	83	143	(30) 31-33	(26) 27-34	poco des	108	35	9-10,V
Gazules	ALZ2	76	139	31-33	27-34	poco des	104	35	9-10,V
	ALZ3	87	109	31-33	26-34	9,10,11	roto	roto	9-10,V
	ALZ4	79	162	31-33	27-34	(8), 9,10,11	111	51	9-10,V
	ALZ5	roto	roto	30,31-33	26-34	29,32,33	roto	roto	9-10,V
	Navarrés	NAV1	71	136	31-33	26-34	9,10,11	102	34
Navarrés	NAV2	82	142	31-33	26-34	9,10,11	108	34	9-10,V
	NAV3	53	131	31-33	27-34	9,10,11 30, 32?	102	29	9-10,V
	NAV4	50	156	(30)31-33(34)	27-34	9,10,11	107	49	9-10,V
	NAV5	roto	roto	31-33	26-34	9,10,11	roto	roto	9-10,V
	NAV6	79	159	31-33	(26) 27-34	9,10,11 30,32,33?	113	46	9-10,V
	NAV7	73	144	31-33	26-34	9,10,11 30,32,33?	101	43	9-10,V

Tabla 4. Caracteres anatómico-morfológicos en individuos del linaje II de *A. trapezoides* (continuación).

Carácter/Comparación	Entre poblaciones	Entre linajes
Longitud	$F(15,75) = 10,779$	$t(1) = 0,678$
	$P = 0,614$	$P = 0,547$
No. segmentos	$F(15,75) = 15,874$	$t(1) = 0,689$
	$P = 0,628$	$P = 0,549$
No. tiflosolados	$F(15,72) = 8,597$	$t(1) = 0,578$
	$P = 0,425$	$P = 0,678$
No. atiflosolados	$F(15,72) = 7,217$	$t(1) = 0,457$
	$P = 0,397$	$P = 0,745$

Tabla 4. Resultado de los ANOVAs y análisis de t de Student para los caracteres anatómicos y/o morfológicos cuantitativos analizados.

En cuanto a los caracteres no cuantitativos, parecen ser bastante homogéneos tanto dentro de poblaciones como dentro de linajes, tal como se observa en las tablas 2 y 3. Las espermatecas están invariablemente vacías, excepto en tres individuos de *St. Hilaire-du-bois* que presentaban espermatecas llenas. Este fenómeno se estudiará en profundidad en el capítulo 7 de esta tesis, por lo que no se discutirá sobre ello en este capítulo. La forma de los tubérculos es siempre lineal. La posición de clitelo, tubérculos y papilas parece tener la misma variabilidad en ambos linajes. Por lo tanto, no existen diferencias morfológicas ni anatómicas diferenciales.

Discusión

I. Evidencia de selección en genes codificantes

La alta diversidad de linajes detectados al analizar el gen COI en algunos proyectos de barcoding podría ser una sobreestima de la diversidad real, ya que frecuentemente se amplifican pseudogenes insertos en el genoma nuclear (conocidos como ‘numts’, abreviatura de ‘nuclear mitochondrials’) (Song et al., 2008). Los genes que codifican para proteínas están normalmente bajo selección negativa cuando las substituciones

sinónimas son mayores que los no sinónimas ($SS > NS$; Page y Holmes, 1998). Por ello, la tasa SS/NS puede utilizarse para identificar estos 'numts' que no tienen función y, por tanto, se encuentran bajo selección neutra, esperando por ello un número similar de SS y NS .

La medida de SS y NS en COI y $COII$ mostró que las substituciones sinónimas eran predominantes ($SS - NS > 1$), mostrando por ello que ambos genes mitocondriales se encuentran bajo fuerte selección negativa. Las secuencias obtenidas en este estudio no contenían codones de terminación ni inserciones o deleciones ('indels', del inglés 'insertion-deletion'), y pudieron ser alineadas de manera no ambigua a pesar del gran número de diferencias en los pares de bases. También ha sido sugerido que un bajo contenido en AT puede indicar la presencia de 'numts' debido a un sesgo en la composición de bases diferente entre ADN mitocondrial y nuclear. En nuestros datos, la composición de bases de COI y $COII$ estaba sesgado hacia una mayor riqueza en AT (0,559 y 0,631, respectivamente), que es consistente con lo esperado para genes mitocondriales. Todas estas observaciones nos permiten descartar la amplificación de pseudogenes en el presente estudio.

El hecho de que estos genes estén bajo fuerte selección negativa y que la tasa evolutiva sea de una magnitud comparable con la de otras lombrices (Heethoff et al., 2004; Chang y Chen, 2008; Novo et al., 2009; Novo et al., 2010) contradice el concepto de que los organismos partenogenéticos deban acumular mutaciones deletéreas (Birky et al., 2005). Este hecho ha sido corroborado en otros invertebrados partenogenéticos, por ejemplo ácaros oribátidos (Heethoff et al., 2007).

II. Diversidad clonal

Nuestros resultados muestran una alta variación genética en *A. trapezoides*. Estos resultados se corresponden con la alta diversidad de alozimas encontradas en poblaciones italianas (Cobolli-Sbordoni et al., 1987) y australianas (Dyer et al., 1998) de esta especie, en los que se encontraron valores de similaridad genética entre poblaciones desde un 64,92% a un 86,82% en el primer trabajo mencionado, y desde un 80,4% a un 89% en el segundo. Por el contrario, un análisis previo de secuencias mitocondriales y nucleares (Pérez-Losada et al., 2009) no mostró gran variación genética. Sin embargo, el número de poblaciones muestreadas fue bajo y la mayor parte de las muestras pertenecían al denominado clon 1 en este estudio. En cualquier caso, ambos tipos de trabajos se basaron o bien en un muestreo relativamente restringido desde un punto de vista geográfico, o bien en un escaso número de individuos. Como se ha mencionado anteriormente, en el presente estudio no se han encontrado evidencias de inserciones mitocondriales en el genoma nuclear, por lo que no hay duda de la autenticidad de la alta diversidad encontrada.

III. Separación de los linajes

Bajo selección diversificadora, los gaps separan poblaciones que han estado evolucionando de manera independientemente el tiempo suficiente como para llegar a ser recíprocamente monofiléticos, hasta llegar a un evento de especiación completo si el tiempo es lo suficientemente largo. La regla del 4X propuesta por Birky et al. (2005, 2009, 2010) nos permite testar si la magnitud de los gaps es suficiente para considerar que se ha producido un evento de especiación.

En este estudio, ninguno de los clados siguió esta regla; solamente fue cumplida por dos clones que no formaban clado con otros clones, quedando como ramas terminales ('singletons'). Por lo tanto, la proporción divergencia entre clados/divergencia dentro de clados en *A. trapezoides* no es lo suficientemente grande como para considerar ambos linajes principales (o cualquier clado dentro de ellos) como líneas evolutivamente diferenciadas sensu Birky et al., 2009. Las distancias D_4 entre linajes también soportan

esta hipótesis. El tiempo desde que los linajes I y II se separaran geográficamente parece no haber sido suficiente como para que éstos sean dos especies evolutivas diferentes según esta regla; el evento de especiación parece estar todavía en proceso.

Supuestamente, es válido testar si los singletons también cumplen esta regla (Birky et al., 2010). Sin embargo, a la vista de los resultados es fácil esperar que si con un aumento de muestreo se encontraran clones que se agruparan con ellos, la diversidad nucleotídica sería bastante alta, al igual que ocurre en el resto de los clados.

IV. Implicaciones filo- y biogeográficas

Este es el primer estudio filogeográfico a escala cuasi mundial que se realiza sobre una especie de lombriz partenogenética. El patrón general que emerge de este estudio es que los individuos analizados de *A. trapezoides* se dividen en dos linajes bien separados y soportados estadísticamente, los llamados linajes I y II (Fig. 4). Otro resultado inmediato es la presencia de una alta diversidad clonal y la existencia de un clon dominante (el clon 1), presente en una tercera parte de las muestras analizadas y de distribución mundial. Además, si el clon 1 se excluye, existe evidencia de fuerte separación geográfica de ambos linajes. El linaje I se distribuye principalmente en áreas eurosiberianas (norte de España, Francia y Polonia), mientras que el linaje II parece tener una distribución básicamente mediterránea (centro y sur de España y Portugal, costa mediterránea de Francia, Cerdeña, Turquía, Grecia, Algeria y parte mediterránea de Australia).

Son varias las hipótesis que pueden ser postuladas para intentar explicar la existencia de estos linajes. Por una parte, el árbol filogenético parece indicar un origen distinto de la partenogénesis en ambos linajes, ya que la dicotomía es muy basal y está bien soportada estadísticamente. Por ello, pudiera ser que ambos linajes provinieran de formas sexuales diferentes, y su distribución geográfica refleja la de sus ancestros. Por otra parte, el papel de las glaciaciones cuaternarias para explicar la distribución actual de linajes geográficamente diferenciados ha sido postulado varias veces (Hewitt, 2001). En particular, las penínsulas mediterráneas (principalmente la Ibérica, la Itálica y la

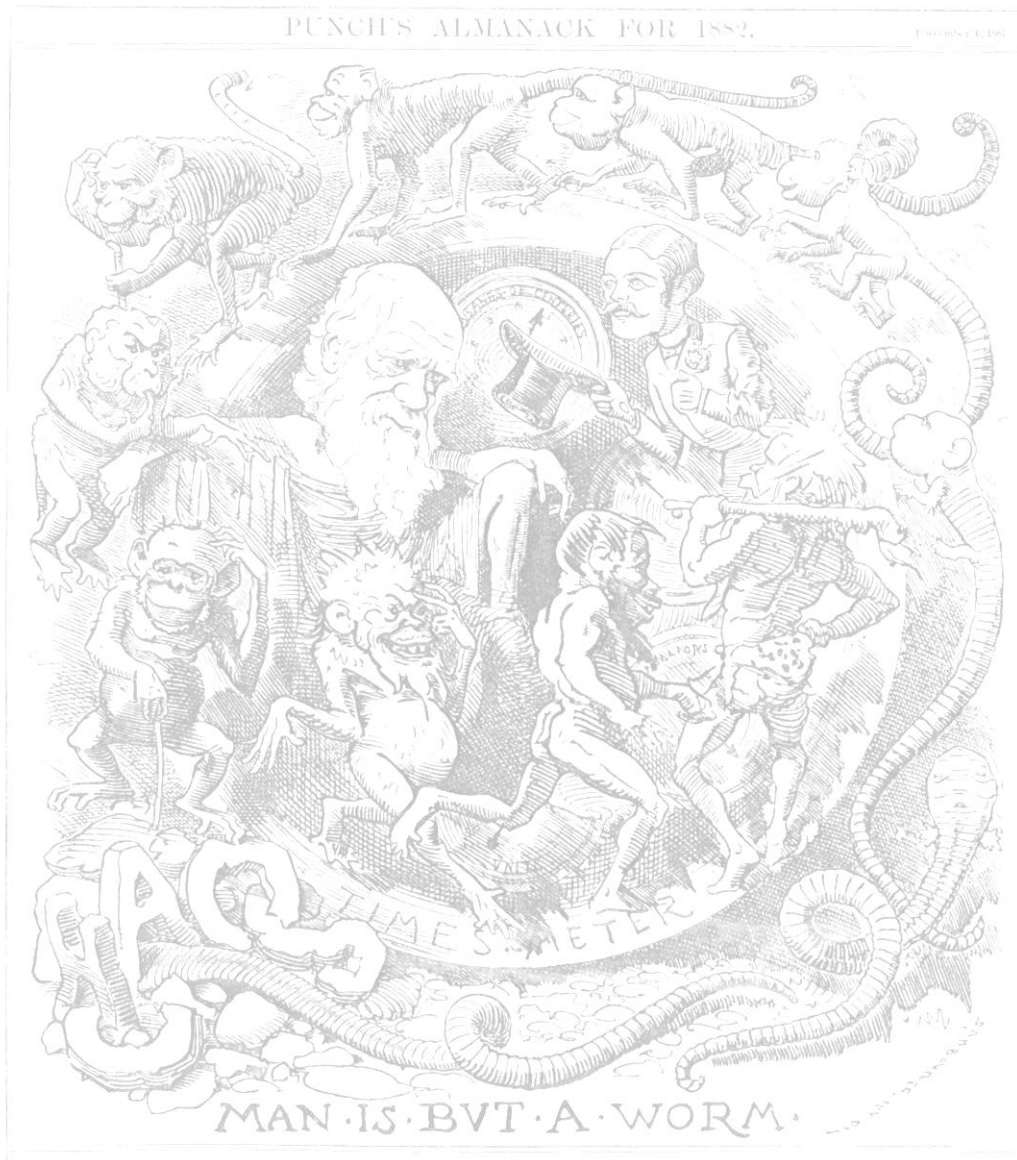
Balcánica) fueron un importante refugio tanto para animales como para plantas durante estas glaciaciones (Huntley y Birks, 1983; Taberlet et al., 1998; Hewitt, 2001). Sin embargo, no tenemos datos suficientes para apoyar ninguna de estas sugerencias. Harán falta por una parte más muestras de las penínsulas Itálica y Balcánica y por otra un estudio más profundo sobre el origen de las formas partenogenéticas para confirmar estas hipótesis.

V. Un clon errante en una especie peregrina

La mayoría de los clústers de clones mostraron una distribución geográfica reducida (Fig. 3), lo que sugiere una baja capacidad de dispersión y/o habilidad de colonización. Sin embargo, al clon 1 pertenecen un alto porcentaje de los individuos y aparece en muchas de las localidades muestreadas, y fue el único clon encontrado en el área de distribución de ambos linajes. Otros clones como el clon 4 y el 9 (que incluyen poblaciones de España y Grecia, y Francia y Serbia, respectivamente) también mostraron una amplia distribución ya que fueron encontrados en países geográficamente muy distantes. Al clon 4 pertenecen también un número bastante alto de lombrices (21), pero al clon 9 sólo 3 individuos. Sin embargo, el clon 1 fue el único que cruzó la ‘frontera’ geográfica entre ambos linajes, ya que el clon 9 sólo se encontró en el área de distribución del linaje I y el clon 4 en la del linaje II. En este estudio no contábamos con un número de muestras demasiado grande del norte de Europa o de países mediterráneos del este, lo que sería necesario para verificar las distribuciones de estos clones y su posible carácter errante.

Estos dos patrones de clones geográficamente restringidos versus clones ampliamente distribuidos parecen llevar a explicaciones contradictorias sobre la historia evolutiva de esta especie. El clon 1 es obviamente capaz de adaptarse a un amplio rango de condiciones medioambientales. Además, su eficacia reproductiva es mayor que la esperada según su categoría ecológica, tal como se verá en el capítulo dedicado al ciclo biológico del clon 1 (capítulo 6): en este sentido, es más parecida a especies epigeas (especies que viven normalmente cerca de la superficie, y que muestran tasas de reproducción muy altas y ciclos de vida muy rápidos) que a especies anécicas (especies que viven en galerías verticales y que presentan ciclos de vida más largos y menor

eficacia reproductiva), lo que podría explicar su amplia distribución y prevalencia en todo el mundo. Sería interesante contar con datos sobre el ciclo biológico de alguno de estos clones geográficamente restringidos y ver si su eficacia reproductiva o capacidad de adaptación a condiciones extremas es menor.



Capítulo 3

Genética de poblaciones e historia demográfica de dos linajes geográficamente diferenciados en *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828).

Fernández et al. (submitted). When morphology does not mirror the past: population genetics and demographic history of two geographically-distinct lineages of *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828).

Resumen

En el capítulo anterior, se encontraron dos linajes bien diferenciados (linajes I y II) tanto filogenética como biogeográficamente en la lombriz partenogenética *Aporrectodea trapezoides*. Este estudio trata de examinar la estructura poblacional y la historia demográfica de 194 individuos pertenecientes a ambos linajes recolectados en 48 localidades distintas distribuidas en 11 países distintos. El análisis de las secuencias del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad II (COII) reveló que la estructura poblacional y la historia demográfica de ambos linajes son similares. Se encontraron 37 haplotipos exclusivos de cada linaje (excepto el clon 1). Comparados con los valores de divergencia observados en otras lombrices, la divergencia entre clones de *A. trapezoides* fue generalmente media-alta (variando del 0,18% al 14,97%), media dentro de cada linaje (4,45% al 7,13% en los linajes I y II, respectivamente) y también media-alta entre linajes (13,03%). La red de haplotipos era dispersa en ambos linajes, sugiriendo una estabilidad en las poblaciones. La hipótesis nula de expansión repentina de las distribuciones mismatch en ambos linajes fue rechazada en base a la desviación de suma de cuadrados ($P < 0.05$). Estos resultados fueron consistentes con la significación del índice de irregularidad, sugiriendo de nuevo que ambos linajes tienen una historia demográfica estable. Ambos linajes mostraron una distribución bimodal; además, los valores de H y π fueron altos, lo que es de nuevo consistente con constancia en el tamaño poblacional.

Abstract

In the previous chapter, two well-differentiated lineages both from a phylogenetically and biogeographically point of view (lineages I and II) were found in the parthenogenetic earthworm *Aporrectodea trapezoides*. This study aims to examine the population genetics and demographic history of 194 earthworms belonging to both lineages that were collected in 48 localities distributed in 11 different countries. Cytochrome *c* oxidase subunit II (COII) sequence data revealed a similar population structure and demography in both lineages. 37 haplotypes exclusives to each lineage (excepting clone 1) were found. Compared with values found in other earthworm species, genetic divergence between clones in *A. trapezoides* was generally medium-high (from 0,18% to 14,97%), within lineages it was medium (from 4,45% to 7,13% in lineages I y II, respectively) and it was also medium-high between lineages (13,03%). The haplotype network showed disperse haplotypes in both lineages, suggesting stable populations. Regarding the mismatch distribution of each lineage, the null hypothesis of sudden expansion was rejected ($P < 0.05$). These results were consistent with the raggedness index, suggesting again a stable demographic history in both lineages. They also showed a bimodal mismatch distribution and high values of H and π , supporting once more a constancy in population size.

Como ya se vio en el capítulo anterior, se encontraron dos linajes de *A. trapezoides* muy diferenciados tanto a nivel molecular como geográfico. Sin embargo estos linajes no pueden considerarse especies evolutivas distintas sensu Birky y Barraclugh (2009). Dos de las hipótesis que se barajaron en el capítulo anterior para explicar la diferenciación de los linajes fueron el origen distinto de la partenogénesis en ambos linajes y el papel de las glaciaciones cuaternarias. Es también de destacar el hecho de que se encontrara un clon, el clon 1, de distribución cuasi mundial y al que pertenecían un tercio de los individuos muestreados. En cualquier caso, el estudio de la historia demográfica de ambos linajes es una buena herramienta para conocer la historia evolutiva de estos dos linajes de *A. trapezoides*.

En los últimos tiempos se está revelando la existencia de linajes genéticos muy diferenciados en una misma especie taxonómica de lombriz de tierra. Tal es el caso de *Lumbricus terrestris* (James et al., 2010), *L. rubellus* (Secchi, 2010) o *Octolasion tyrtaeum* (Heethoff et al., 2004). Sin embargo, la existencia de una forma generalista que supere las barreras geográficas entre los linajes es una observación genuina en *A. trapezoides*.

El objetivo de este estudio es el de evaluar la estructura poblacional y la demografía de *A. trapezoides* y de situarlas en el contexto de la evolución y la ecología de los dos linajes previamente definidos.

I. Muestreo y II. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

Se emplearon los mismos individuos que en el capítulo 3 (178 individuos recolectados por nuestro equipo más 16 secuencias extraídas de GenBank). Asimismo, la extracción de DNA, amplificación y secuenciación se realizó tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos del capítulo previo. Para este estudio, solamente se emplearon las secuencias del gen mitocondrial citocromo C oxidasa subunidad II (COII) por ser el más variable de los que se han secuenciado y por ser el gen del que más secuencias se tienen.

III. Parámetros de genética de poblaciones

Para evaluar las diferencias genéticas entre linajes geográficamente distintos, se calcularon estimas de variabilidad expresadas como diversidad haplotípica (H), diversidad nucleotídica (π) y número de sitios segregantes (S) con el programa Arlequin versión 3.5.1.2 (Schneider et al., 2000). La diferenciación genética media entre y dentro de poblaciones se estimó empleando p-distancias sin corregir.

Se empleó un Análisis de la Varianza Molecular ('Analysis of the Molecular Variance', AMOVA) para evaluar la jerarquía de la estructura poblacional de nuevo con el programa Arlequin y empleando 10.000 permutaciones para los valores de confianza estadística. El análisis se realizó incluyendo y excluyendo el clon 1 (ver discusión más adelante).

Se construyó una red de haplotipos utilizando el procedimientos de parsimonia estadística (Templeton et al., 1992) tal como se implementa en el programa TCS versión 1.21 (Clement et al., 2000). Posada y Crandall (2001) recomendaron este tipo de redes para estudios filogenéticos intraespecíficos, ya que muestran relaciones reticuladas a

nivel poblacional que no quedan representadas en los árboles filogenéticos convencionales. Además, siguiendo la teoría de la coalescencia, estas redes parsimoniosas no solamente no asumen que los haplotipos ancestrales se encuentren extintos, sino que además tienen en cuenta que puedan ser los más frecuentes en la población y que tiendan a tener muchas conexiones mutacionales con haplotipos más jóvenes. Como describieron Pfenniger y Posada (2002), las asunciones derivadas de la teoría de la coalescencia se emplearon para resolver los lazos en las redes de parsimonia estadística.

IV. Análisis demográfico

Se calcularon los estadísticos D de Tajima, F^* de Fu y Li, y D^* de Fu y Li en el programa Arlequin empleando 10.000 réplicas. Los estadísticos F_s de Fu y R_2 (Ramos-Onsins y Rozas, 2002) se calcularon con el programa DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009). Su significación se evaluó con 10.000 simulaciones de coalescencia en DnaSP dado el número observado de sitios segregantes.

La demografía poblacional se evaluó con el examen de la frecuencia de distribución de las diferencias a pares de las secuencias (distribuciones mismatch) entre todos los haplotipos muestreados dado el modelo nulo de expansión poblacional repentina tal como se describió por Rogers y Harpending (1992). Se evaluó la concordancia de los datos con la distribución esperada mediante una desviación de suma de cuadrados. El estadístico de irregularidad ('Raggedness statistic', Harpending, 1994) de la distribución de mismatch también fue calculado con Arlequin, basado en 10.000 réplicas.

I. Diversidad genética

Se encontraron 37 haplotipos en todos los individuos analizados de ambos linajes, tal como se explicó en el capítulo anterior. Todos los haplotipos excepto el haplotipo 1 (el llamado clon 1) fueron exclusivos de cada linaje. Aproximadamente un tercio de los individuos pertenecieron al clon 1. Se encontró mayoritariamente como clon único en las poblaciones en las que fue encontrado, pero en ocasiones se encontró mezclado con otros clones de otros linajes.

El número medio de diferencias a pares, la diversidad haplotípica y nucleotídica se calcularon por separado para cada linaje. La diversidad haplotípica en el linaje I fue mayor que en el B; el resto de parámetros estudiados presentaron resultados similares.

Los valores de divergencia génica se muestran en las tablas 1 y 2. Se incluyen los valores de divergencia de cada clon y linaje con *Lumbricus terrestris* y *Hormogaster castillana* como punto de referencia. Comparados con los valores de divergencia observados en otras lombrices, la divergencia entre clones de *A. trapezoides* fue generalmente media-alta (variando del 0,18% al 14,97%), media dentro de cada linaje (4,45% al 7,13% en los linajes I y II, respectivamente) y también media-alta entre linajes (13,03%).

	Linaje I	Linaje II	<i>H. castillana</i>
Linaje I	7.13		
Linaje II	13.03	4.45	
<i>H. castillana</i>	19.44	19.90	-
<i>L. terrestris</i>	17.95	16.72	19.05

Tabla 1. Distancias genéticas (p-distancias sin corregir) entre ambos linajes de *A. trapezoides* (en porcentaje de cambios).

II. Estructura genética poblacional

Se empleó un AMOVA para testar la estructura jerárquica poblacional. Como el clon 1 (que filogenéticamente pertenece al linaje II) mostró una distribución mundial, una alta ocurrencia entre los individuos muestreados y apareció mezclado con individuos de ambos linajes, el AMOVA se realizó incluyéndolo y excluyéndolo para verificar sus efectos en la estructura poblacional. Cuando se incluyó, el AMOVA reveló que la variación encontrada entre poblaciones dentro de cada linaje por una parte, y dentro de poblaciones por otro, fue mayor que la encontrada entre linajes. Sin embargo, cuando se excluyó este clon la variación entre linajes fue similar a la encontrada dentro de cada linaje, pero mucho mayor que dentro de poblaciones (Tabla 3).

Fuente de variación	d.f.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	% de variación
Incluyendo clon 1				
Entre linajes	5	3041.085	8.337 Va	27.59
Entre poblaciones dentro de linajes	45	2364.001	9.955 Vb	32.95
Dentro de poblaciones	270	3218.556	11.920	39.46
Total	320	8623.642	30.213	
Excluyendo clon 1				
Entre linajes	1	1084.723	17.637 Va	45.22
Entre poblaciones dentro de linajes	24	1824.853	17.062 Vb	43.74
Dentro de poblaciones	86	370.254	4.305	11.04
Total	111			

Tabla 3. Resultado del AMOVA para *A. trapezoides*. Los resultados se muestran incluyendo y excluyendo al clon 1. d.f.: grados de libertad.

COII	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	H.c.		
2	0.18																																							
3	0.36	9.07																																						
4	14.52	9.26	0.54																																					
5	14.71	13.43	14.70	14.52																																				
6	9.44	13.61	14.88	14.70	0.18																																			
7	13.41	10.53	9.62	9.44	14.79	14.97																																		
8	13.41	12.70	13.61	13.43	13.25	13.07	13.07																																	
9	13.61	12.70	13.61	13.07	13.07	12.89	12.70	1.45																																
10	13.25	12.88	13.79	13.25	13.25	13.07	12.89	1.63	0.18																															
11	11.98	12.34	12.16	11.98	12.16	11.98	12.16	3.45	3.45	3.27																														
12	13.61	12.88	8.89	13.61	13.43	13.25	12.89	0.18	1.27	1.45	3.27																													
13	14.88	13.79	14.06	14.88	0.36	0.54	14.79	13.61	13.43	13.61	12.52	13.79																												
14	8.89	10.34	9.07	9.26	14.60	14.70	0.91	13.25	12.88	13.07	12.34	13.07	14.61																											
15	9.26	10.34	9.44	9.62	14.42	14.61	1.27	13.25	12.88	13.07	12.34	13.07	14.43	0.36																										
16	8.89	9.26	8.89	9.26	14.34	14.52	10.89	14.70	14.52	14.70	14.52	14.88	14.52	10.34	10.34																									
17	13.25	12.88	13.43	12.88	13.24	13.07	12.89	1.27	0.18	0.36	3.27	1.09	13.61	13.07	13.07	14.70																								
18	8.71	8.17	8.89	8.71	14.16	14.34	9.80	12.70	12.34	12.52	12.43	12.89	14.16	9.62	9.62	8.89	12.52																							
19	8.53	8.35	8.71	8.53	14.34	14.52	9.44	12.34	11.98	12.16	11.98	12.52	14.34	9.26	9.26	9.07	12.16	0.91																						
20	0.18	9.07	0.36	0.18	14.34	14.52	9.62	13.61	13.25	13.43	12.16	13.79	14.70	9.07	9.44	9.07	13.07	8.53	8.35																					
21	14.34	13.43	14.52	14.34	0.54	0.36	14.79	13.07	12.89	13.07	11.89	13.25	0.91	14.61	14.43	14.34	13.07	14.34	14.52	14.16																				
22	9.62	9.98	9.80	9.62	14.97	14.79	9.07	14.16	13.79	13.97	13.79	14.34	14.97	9.26	9.26	9.80	13.97	7.44	7.26	9.80	14.79																			
23	7.98	9.98	8.17	7.98	14.69	14.52	9.26	13.25	12.89	13.07	12.70	13.43	14.70	9.44	9.62	8.35	13.07	7.26	7.08	8.17	14.52	3.63																		
24	14.52	13.79	14.70	14.52	0.36	0.18	14.79	12.88	12.70	12.34	11.80	13.07	0.73	14.61	14.43	14.70	12.88	14.16	14.34	14.34	0.54	14.61	14.33																	
25	12.34	12.52	12.52	12.34	10.53	10.71	13.61	12.70	12.16	12.52	12.70	12.88	10.71	13.25	13.43	13.97	12.34	12.16	11.98	12.16	10.71	13.79	12.52	10.53																
26	12.70	12.16	12.88	12.70	10.89	11.07	13.61	12.88	12.34	13.07	12.89	13.07	11.07	13.25	13.43	14.34	12.52	12.34	12.16	12.52	11.07	13.79	12.52	10.89	0.36															
27	14.70	13.61	14.52	14.70	0.54	0.36	14.97	13.07	12.89	12.52	11.98	13.25	0.91	14.79	14.61	14.34	13.07	14.34	14.52	14.52	0.36	14.79	14.52	0.54	10.71	11.07														
28	12.52	12.70	12.34	12.52	10.71	10.89	13.79	12.88	12.34	13.61	12.89	13.07	10.89	13.43	13.61	13.97	12.52	12.34	12.16	12.34	10.89	13.97	12.70	10.71	0.18	0.54	10.52													
29	8.17	8.17	8.35	8.53	14.34	14.52	9.62	13.43	13.43	12.88	13.61	13.97	14.52	9.44	9.44	9.07	13.61	8.71	8.17	8.35	14.34	7.62	6.90	14.70	11.25	11.25	14.52	11.43												
30	8.53	7.62	8.53	8.89	13.79	13.97	10.16	12.88	12.70	12.88	13.43	13.07	14.16	9.62	9.98	7.44	12.89	9.07	8.89	8.71	13.79	9.98	8.71	13.79	12.34	12.34	13.79	12.34	13.79	12.34	7.26									
31	9.26	7.98	9.26	9.62	13.79	13.97	10.34	13.43	13.43	13.61	14.16	13.61	13.98	9.80	10.16	7.44	13.61	9.44	9.26	9.44	13.79	9.98	8.71	14.15	12.70	12.70	13.79	12.70	7.26	1.09										
32	8.53	7.62	8.53	8.89	14.16	14.34	10.16	12.88	12.70	12.88	13.43	13.07	14.52	9.62	9.98	7.80	12.89	9.44	9.26	8.71	14.16	10.34	9.07	14.15	12.70	12.70	14.16	12.70	7.62	0.36	1.45									
33	9.26	7.62	9.26	9.62	13.43	13.61	10.89	12.88	12.70	12.88	13.43	13.07	13.79	10.34	10.71	7.44	12.89	9.07	8.89	9.44	13.43	10.34	8.71	13.79	12.52	12.52	13.43	12.52	7.26	0.54	1.45	1.09								
34	8.89	7.62	8.89	9.26	13.43	13.61	10.53	12.88	12.70	12.88	13.43	13.07	13.79	9.98	10.34	7.44	12.89	9.07	8.89	0.91	13.43	9.98	8.71	13.79	12.34	11.25	13.43	12.34	7.26	0.36	1.09	0.73	0.36							
35	9.26	10.16	9.44	9.62	13.97	14.16	10.53	13.98	13.61	13.79	13.25	14.16	14.16	9.62	9.62	9.98	13.79	9.26	9.71	9.44	14.34	11.43	10.71	13.97	12.16	11.25	14.52	12.34	9.26	10.16	10.89	10.53	10.53	10.53						
36	14.06	12.70	14.24	14.70	8.71	8.89	14.61	12.88	12.34	12.52	11.80	13.07	8.89	14.79	14.61	14.34	12.52	13.61	13.79	14.88	8.89	14.06	14.88	9.07	11.07	10.71	8.89	11.25	13.07	12.88	12.52	13.25	12.70	12.52	14.70					
37	14.06	12.88	12.70	12.52	9.98	10.16	13.43	13.25	12.70	12.88	13.43	13.43	10.16	13.07	13.25	13.61	12.88	11.98	11.80	12.34	10.16	12.89	12.34	10.34	5.26	5.26	10.16	5.44	12.70	13.07	13.43	13.07	12.88	12.70	12.89	11.07				
H. c.	18.69	17.96	18.87	19.06	19.60	19.78	19.24	19.42	18.87	19.06	19.96	19.60	19.78	18.87	19.24	18.51	19.06	19.63	19.78	18.87	19.78	21.23	19.96	19.60	18.69	18.69	19.78	18.87	19.96	19.06	19.24	18.69	19.60	19.42	18.51	19.96	18.51			
L. t.	16.72	16.55	16.56	16.54	17.87	16.21	16.55	16.55	17.69	16.95	17.55	17.89	18.96	18.96	18.54	17.23	16.98	16.87	17.55	18.21	16.55	16.55	17.69	16.95	17.55	17.69	16.95	17.55	17.89	18.96	18.96	17.55	16.54	17.23	16.55	16.32	17.58	19.05		

Tabla 2. Distancias genéticas (*uncorrected p-distances*) entre haplotipos de *A. trapezoides* para el gen COII, en porcentaje de cambios.

La red de haplotipos (Fig. 1) de los dos linajes mostró una red de haplotipos dispersos, sugiriendo una estabilidad en las poblaciones. Ambos linajes aparecen diferenciados, pero algunos clústers de haplotipos están separados por un alto número de pasos mutacionales.

III. Análisis demográfico

Los patrones de variación génica se caracterizaron calculando algunos estadísticos de la distribución de frecuencias alélicas dentro de poblaciones, incluyendo D de Tajima, D^* de Fu y Li, F^* de Fu y Li, y F_S de Fu (Tabla 4). Como se hace convencionalmente, primero se determinó si estos estadísticos diferían significativamente de lo esperado bajo un modelo neutral estándar realizando simulaciones de coalescencia bajo la asunción simplificada de no recombinación.

La dirección de los estadísticos D de Tajima, D^* de Fu y Li, y F^* de Fu y Li es potencialmente informativa sobre las fuerzas evolutivas y demográficas que una población ha experimentado. Un valor positivo de D de Tajima indica una reducción en el tamaño poblacional o la acción de selección balanceadora. El valor del estadístico R_2 se basa en la diferencia entre el número de mutaciones simples y el número medio de diferencias nucleotídicas, detectando por ello crecimientos poblaciones severos, indicados por un valor bajo de este estadístico.

Los valores de R_2 en ambos linajes fueron medio-altos y no significativos, rechazando por lo tanto la hipótesis de un crecimiento severo poblacional. Los estadísticos D de Tajima, D^* de Fu y Li y F^* de Fu fueron positivos y no significativos. Valores positivos para estos estadísticos indican evidencia de selección balanceadora o de evento de subdivisión poblacional. El valor de F_S de Fu fue positivo y significativo en ambos linajes, indicando un modelo de diversidad haplotípica desviado de lo esperado bajo neutralidad.

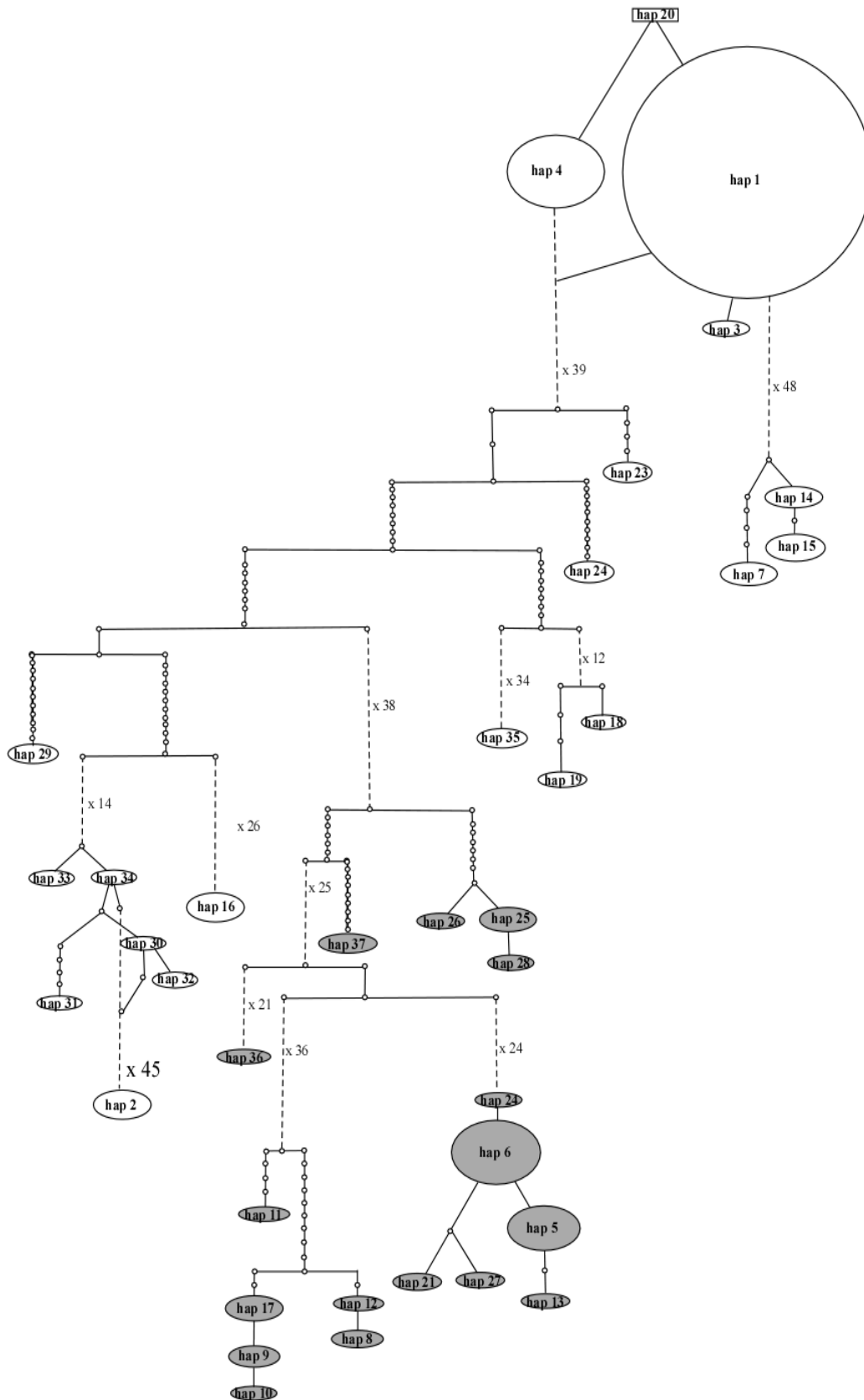


Fig. 1. Red de haplotipos del gen COII en *A. trapezoides*. El límite de conexión fue de 100 pasos mutacionales. Los círculos vacíos representan haplotipos no muestreados.

La hipótesis nula de expansión repentina de las distribuciones mismatch en ambos linajes fue rechazada en base a la desviación de suma de cuadrados ($P < 0.05$). Estos resultados fueron consistentes con la significación del índice de irregularidad, sugiriendo de nuevo que ambos linajes tienen una historia demográfica estable.

	Linaje I	Linaje II
No. muestras	54	142
No. haplotipos	17	20
Div. haplotípica	0.874 ± 0.029	0.673 ± 0.002
No. sitios polimórficos	183	143
Div. nucleotídica	0.231 ± 0.112	0.209 ± 0.102
No. medio de diferencias entre pares	46.613 ± 20.481	42.211 ± 18.552
D de Tajima	0.649	0.248
F de Fu	16,657	20,352
D* de Fu and Li	0,853	1,182
F* de Fu and Li	1,098	0,453
estadístico R₂	0,153	0,085
Test de bondad de ajuste:		
SSD	0.050	0.071
Índice Raggedness	0.026	0.062

Tabla 4. Parámetros demográficos y desviaciones estándar de los mismos en ambos linajes de *Aporrectodea trapezoides*. Los valores significativos ($P < 0.05$) se indican en negrita.

Las poblaciones bajo equilibrio demográfico largo y estable muestran una distribución mismatch bimodal, mientras que dicha distribución es unimodal después de expansiones demográficas recientes (Rogers y Harpending, 1992, Harpending, 1994). Ambos linajes mostraron una distribución bimodal (Fig. 2); además, los valores de H y π fueron altos, lo que es de nuevo consistente con constancia en el tamaño poblacional.

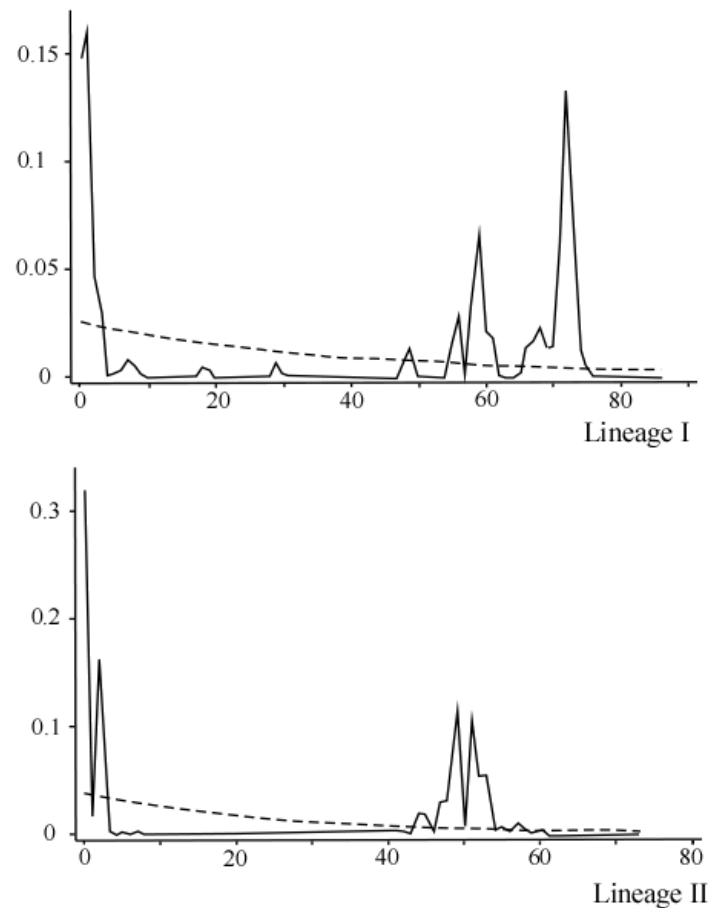


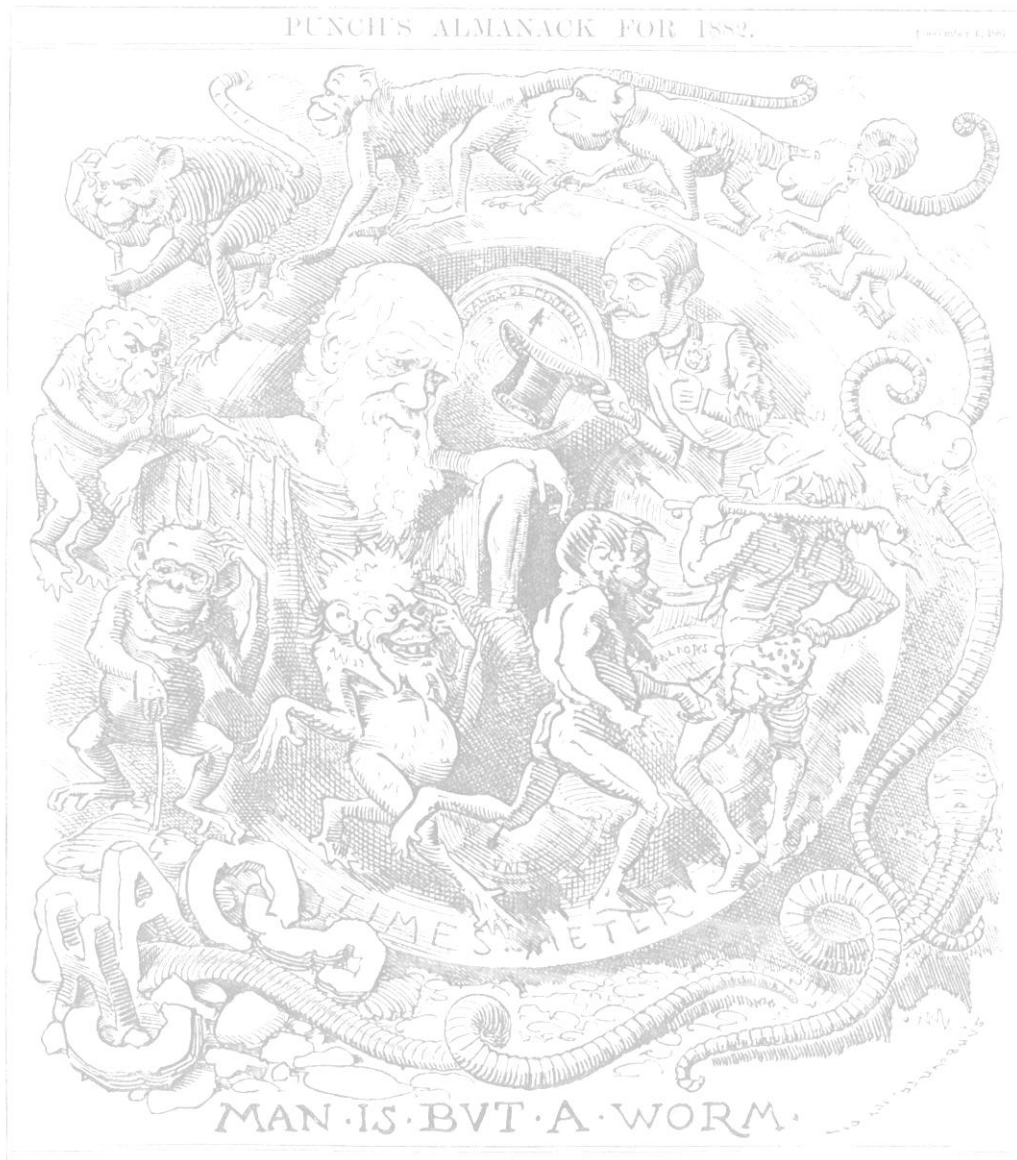
Fig. 2. Distribución mismatch de ambos linajes de *A. trapezoides* basada en un segmento de 551 pares de bases del gen COII. La abscisa representa el número de diferencias entre pares y la ordenada el número de observaciones. La línea continua representa la distribución observada y la discontinua la esperada bajo el modelo de expansión repentina de Rogers (1995) según las modificaciones de Schneider y Excoffier (1999).

Ambos linajes resultaron tener una estructura poblacional y una historia demográfica similar. Desde el punto de vista de una evaluación cualitativa de la demografía, ambos linajes mostraron altos valores de H y π , una red de haplotipos dispersa y una distribución mismatch bimodal, todo ello consistente con estabilidad poblacional. Los estadísticos basados en la frecuencia de mutaciones y la distribución de haplotipos (D de Tajima, F_s de Fu, D^* de Fu y Li, F^* de Fu y Li y R_2), apropiados y poderosos para detectar eventos de crecimiento poblacional (Ramos-Onsins y Rozas, 2002), parecen haber cumplido esta misión. En líneas generales, los estadísticos fueron positivos y no significativos, reforzando la hipótesis de poblaciones estables.

El estadístico F_s de Fu compara el número observado de haplotipos con el esperado bajo neutralidad y mostró señales significativas, lo que indica un patrón de diversidad haplotípica que se desvía de lo esperado bajo neutralidad. Sin embargo, el estadístico F_s de Fu es particularmente sensible a los efectos demográficos, y por ello no podemos concluir si una selección positiva o la historia demográfica (por ejemplo, diferentes tiempos e intensidades de expansión o 'hitchhiking' genético) son los causantes del patrón observado.

La variación entre linajes arrojada por el AMOVA es parecida a la encontrada en el ciclóforo *Symbion americanus* (Baker et al., 2007) o el caracol *Crepidula fornicata* (Collin, 2001), en los que también se encontraron dos grupos principales de haplotipos y el AMOVA sugirió que una cantidad moderada de variación genética ocurría entre poblaciones dentro de linajes (59% y 38%, respectivamente). En *A. trapezoides*, el porcentaje de variación genética dentro de poblaciones varió considerablemente cuando se incluyó o excluyó el clon 1, disminuyendo del 39,46% al 11,04%, respectivamente. Esto puede deberse al hecho de que algunas poblaciones contuvieran el clon 1 junto con otros clones, que en algunos casos (como en algunas poblaciones del linaje I) eran altamente divergentes.

El problema de la demografía poblacional es particularmente interesante en el contexto de la evolución de ambos linajes de *A. trapezoides*. Los dos linajes son peri o parapátridos, con distribuciones muy próximas que podrían o no solapar en una escala geográfica más reducida que la de este estudio. Según los estudios demográficos obtenidos en este estudio, ambos linajes parecen ser demográficamente estables y no haber sufrido expansiones repentinas. Además, muestran una alta divergencia genética entre ellos y entre algunos de los haplotipos dentro de cada linaje. La hipótesis más parsimoniosa para explicar esto es un origen múltiple de la partenogénesis en cada linaje, o bien por hibridación de antecesores sexuales distintos o a través de un origen espontáneo. De otro modo, los clones deberían ser muy antiguos para mostrar una divergencia genética tan alta. En el capítulo siguiente se discutirá más en profundidad sobre este punto.



Capítulo 4

Añadiendo complejidad al complejo: nuevas aproximaciones a la filogenia molecular del complejo de especies *Aporrectodea caliginosa*.

Fernández et al. (in prep.). Adding complexity to the complex: new molecular insights into the phylogeny of the *Aporrectodea caliginosa* species complex.

Varios estudios moleculares recientes en lombrices de tierra están sacando a la luz una gran diversidad críptica escondida bajo el nivel de morfoespecie. La importancia del complejo de especies *A. caliginosa* reside en la gran abundancia y amplia distribución de varias de las especies que lo forman. El caos taxonómico que concierne a este complejo de especies ha durado más de un siglo; los criterios de identificación taxonómica fallan a la hora de resolver el estatus taxonómico de las especies incluidas en el complejo. En el presente trabajo se pretende estudiar la filogenia del complejo de especies *A. caliginosa* aumentando por una parte el número de muestras respecto a trabajos anteriores con técnicas moleculares, y por otra incluyendo especies morfológicamente similares que pudieran estar filogenéticamente relacionadas con las consideradas hasta ahora dentro del complejo (*A. giardi*, *N. monticola*, *N. carochensis* y *N. tetramammalis*). Se obtuvieron dos clados basales bien soportados: uno formado por *A. caliginosa* y *A. tuberculata*, y el otro por el resto de especies. Este segundo clado se subdividió a la vez en otros dos: uno formado por el linaje I de *A. trapezoides*, *A. longa*, *A. nocturna* y *A. giardi* (clado con formas eurosiberianas); el otro por el linaje II de *A. trapezoides* y las 3 ‘especies’ de *Nicodrilus* (clado con formas mediterráneas). *A. caliginosa* se dividió en dos grupos parafiléticos, uno de ellos filogenéticamente más próximo a *A. tuberculata* que al otro clado de *A. caliginosa*. *A. longa* también presentó dos grupos parafiléticos, uno de ellos muy próximo a *A. nocturna*. Tanto *A. giardi* como *A. nocturna* formaron grupos monofiléticos. Todas las muestras de *A. trapezoides* del linaje I se incluían también en un grupo monofilético, mientras que las del linaje II mostraban parafilia. Las tres especies de *Nicodrilus*, mostraron también un estatus parafilético. Las muestras de *N. carochensis* aparecieron entremezcladas con algunas muestras del linaje II de *A. trapezoides*. *N. monticola* y *N. tetramammalis* aparecían mezcladas en el mismo clado, con un buen soporte estadístico. En un tiempo evolutivo relativo que va desde (momento actual) a 1 (momento de diversificación del complejo de especies), la diferenciación del clado *A. caliginosa/A. tuberculata* del resto de taxones es la más basal de todas. La diferenciación de los dos linajes de *A. caliginosa* no es un fenómeno relativamente reciente, ya que se produce en el punto 0,49. La diversificación del clado que da lugar a todas las formas de *A. trapezoides* se produce en un punto bastante basal en relación al comienzo de la diversificación del complejo (0,85). La diferenciación del clado que engloba el linaje I de *A. trapezoides*, *A. longa*, *A. nocturna* y *A. giardi* (en el

punto 0,70) es más antigua que la del clado que comprende el linaje II de *A. trapezoides* y las especies de *Nicodrilus* (que empieza en el punto 0,50). El antecesor común de todas las formas partenogénicas (es decir, el punto donde al menos en esta ocasión surge la partenogénesis) en el clado de formas mediterráneas es ligeramente más antiguo que el del clado de formas eurosiberianas (puntos 0,50 y 0,43, respectivamente), lo que implica que existen al menos dos puntos y momentos distintos en los que se originó la partenogénesis dentro de este complejo. Respecto a la datación absoluta, la diversificación del complejo de especies empezó hace entre 56 y 24 millones de años, momento en el que se separa *A. caliginosa* del resto de las especies. Los dos grandes clados que engloban formas de *A. trapezoides* empezaron a divergir entre los 42 y los 18 millones de años, lo que marca el origen de las primeras formas partenogénicas. Al igual que en el árbol de datación relativa, la diversificación del clado de formas eurosiberianas parece que empezó antes que en el de formas mediterráneas (35-14 y 29-11, respectivamente), aunque la amplitud de las barras hacen que los períodos se solapen. El antecesor común más inmediato del linaje I de *A. trapezoides* data hace entre 19 y 5 millones de años y el del linaje II entre 11 y 29. La diversificación de *N. carochensis* (hace entre 17 y 6 millones de años) parece ser algo más antigua que la de las otras dos formas que se han incluido en *Nicodrilus* (9-3 millones de años), aunque de igual manera que en el caso anterior, los períodos se solapan. Ninguno de los métodos de delimitación de especies (regla del 4X y modelo GMYC) separó especies taxonómicas.

Abstract

Recently, several molecular studies about earthworms have revealed a high cryptic diversity hidden under the level of morphospecies. The importance of the *A. caliginosa* species complex lies on the great abundance and wide distribution of the species belonging to it. More than a century has been chaos surrounding this complex; morphological criteria fail to solve the taxonomical status of these species. The present work aims to study the phylogeny of these complex by increasing the number of samples used in previous molecular works, and by including morphologically-similar species that were never studied with molecular tools (*A. giardi*, *N. monticola*, *N. carochensis* y *N. tetramammalis*). Two basal clades were obtained: one formed by *A. caliginosa* and *A. tuberculata*, and the other by the rest of the species. This second clade was divided in two more: one formed by the lineage I of *A. trapezoides*, *A. longa*, *A. nocturna* and *A. giardi* (clade with Eurosiberian forms), and the other by the lineage II of *A. trapezoides* and the 3 *Nicodrilus* 'species' (clade with Mediterranean forms). *A. caliginosa* was divided in two paraphyletic groups, one of them being closer to *A. tuberculata* than to the other clade of *A. caliginosa*. *A. longa* also showed two paraphyletic groups, one of them very close to *A. nocturna*. Both *A. giardi* and *A. nocturna* showed monophyletic groups. While lineage I of *A. trapezoides* was monophyletic, lineage II resulted to be paraphyletic, as well as the three *Nicodrilus* 'species'. *N. carochensis* appeared mixed with some samples from the lineage II of *A. trapezoides*. *N. monticola* and *N. tetramammalis* were mixed in the same clade. In a relative evolutionary time, the differentiation of the clade *A. caliginosa/A. tuberculata* was more basal than that of the rest of the clades. The differentiation of both lineages of *A. caliginosa* occurred in the point 0.49. The diversification of the clade leading to all forms of *A. trapezoides* occurred in a quite basal point regarding the diversification of the whole complex (0.85). The differentiation of the clade formed by the lineage I of *A. trapezoides*, *A. longa*, *A. nocturna* and *A. giardi* (in the point 0.70) is older than the one of the clade formed by the lineage II of *A. trapezoides* and the 'species' of *Nicodrilus* (which starts in the point 0.50). The common ancestor of all the parthenogenetic forms is slightly older in the clade containing the lineage I of *A. trapezoides* than in the one containing the lineage II (points 0.50 and 0.43, respectively), which implies the existence of at least two different moments in which parthenogenesis originated. Regarding the absolute dating, the diversification of the complex started between 56 and 24 millions of years, moment in which *A. caliginosa* started to separate

from the rest of the species. The two major clades with forms of *A. trapezoides* started to diverge between 42 and 18 millions of years, which marks the origin of the first parthenogenetic forms. In a similar way to the the relative dating, the diversification of the clade with Eurosiberian seems to be older than the one with Mediterranean forms (35-14 and 29-11 millions of years, respectively), although 95% confidence bars make both periods to overlap. The diversification of *N. carochensis* (between 17 and 6 millions of years) seems to be older than the one of the other *Nicodrilus* forms (9-3 millions of years). None of the used methods for delimiting species (the 4X rule and the GMYC model) delimited taxonomically-distinct species in a proper way.

La estasis morfológica ha sido históricamente un problema en taxonomía de lombrices. Michaelsen (1900) fue uno de los primeros autores que remarcó la dificultad de la taxonomía en lombrices de tierra por la escasez de caracteres definatorios, definiéndolas como “sine systemate chaos”. Esto parece ser un patrón común en animales del suelo, un medio en el que a los pocos centímetros prácticamente no penetra la luz y donde las señales químicas juegan por tanto un papel mucho más importante que las visuales, derivadas de la morfología, en la selección sexual (Lee y Frost, 2002). Además, algunos de los caracteres morfológicos y anatómicos empleados en taxonomía de lombrices se solapan a menudo fácilmente entre diferentes taxones (Pop et al., 2003). Estas limitaciones morfológicas han llevado a la creación de complejos de especies en los que se incluyen especies más o menos similares cuyo estatus taxonómico es incierto pero que se suponen relacionadas entre sí (Bouché, 1972; Gates, 1972; Sims y Gerard, 1985; Briones, 1993, 1996). Éste es el caso del complejo de especies que ha tomado el nombre de una de las especies más comunes de lombriz de tierra, *Aporrectodea caliginosa*.

Como consecuencia de esta estasis morfológica, varios estudios moleculares recientes en lombrices de tierra están sacando a la luz una gran diversidad críptica escondida bajo el nivel de morfoespecie (Heethoff et al., 2004; Pérez-Losada et al., 2005, 2009; Novo, 2010, Dupont et al., 2011). Es por ello que las técnicas moleculares se han convertido en los últimos años en las herramientas más apropiadas para intentar desenmarañar algunos de los problemas taxonómicos y mostrar la variación genética real que no queda reflejada en variación de los caracteres morfológicos.

La importancia del complejo de especies *A. caliginosa* reside en primer lugar en la gran abundancia y amplia distribución de varias de las especies que lo forman. Por ejemplo, Omodeo (1948) consideraba a *A. trapezoides* como la especie más común en todo el mundo, y varias de las especies del complejo entran en la categoría de especies peregrinas con amplia difusión (Blakemore, 2006). Por ello, debido al papel tan importante de las lombrices como ‘ingenieros del ecosistema’ (Lavelle et al., 1997; Decaëns et al., 2003) y a la posibilidad de que diferentes especies realicen diferentes

funciones, es crucial conocer no sólo el estatus taxonómico de las especies del complejo, sino también la variabilidad genética real que se esconde en este grupo, de tal manera que podamos disponer de un conocimiento básico imprescindible para estudios aplicados ecológicos, sistemáticos, evolutivos y de conservación de la biodiversidad (Domínguez, 2004; Pérez-Losada et al., 2005; King et al., 2008).

El caos taxonómico que concierne a este complejo de especies ha durado más de un siglo; los criterios de identificación taxonómica fallan a la hora de resolver el estatus taxonómico de las especies incluidas en el complejo. Desde 1900, han sido varios los autores que han discutido sobre el estatus taxonómico de estas especies (ver Introducción de esta tesis para más detalles, capítulo 1). Un reciente estudio realizado con varios marcadores moleculares (Pérez-Losada et al., 2009) apoyaba la existencia de varias especies distintas dentro del complejo: *A. caliginosa*, *A. tuberculata*, *A. nocturna*, *A. longa* y *A. trapezoides*. La mayor aportación de este trabajo ha sido descartar que *A. trapezoides* esté relacionada con *A. caliginosa*, estando filogenéticamente más cercana a *A. longa* y *A. nocturna*. Mientras *A. tuberculata*, *A. caliginosa* sensu stricto, *A. nocturna* y *A. longa* formaban clados monofiléticos, *A. trapezoides* presentaba un carácter parafilético. Los autores explicaban este hecho como una falta de evidencia molecular que soportara estos clados, alegando que podría ser debido a una resolución inadecuada de los marcadores moleculares empleados.

Otro resultado importante del trabajo de Pérez-Losada et al. (2009) es la existencia de evidencia molecular que soporta la inclusión de *A. longa* en el complejo, una especie morfológicamente muy similar pero considerada tradicionalmente fuera de él. Sin embargo, existen otras especies también muy similares a las que se suelen incluir en este complejo y que nadie había estudiado molecularmente como es el caso de *Aporrectodea giardi*, *Nicodrilus carochensis*, *N. monticola* y *N. tetramammalis*.

Estas tres especies de *Nicodrilus* han sido descritas muy recientemente (Onteniente y Rodríguez Babío, 2002) y existe una cierta controversia respecto a ellas ya que la mayoría de los taxónomos las han considerado como sinónimas de *A. caliginosa* (por ejemplo, Csuzdi y Zicsi, 2003; Blakemore, 2006) debido a su similitud morfológica. Además, estas

tres especies se diferencian entre sí básicamente en el número y posición de las papilas, carácter que se ha comprobado que puede variar ampliamente dentro de los individuos y poblaciones de una especie y con la actividad sexual de los individuos, siendo su diferencia más importante con *A. trapezoides* su carácter sexual.

Muchos autores suponen que los géneros *Aporrectodea* y *Allolobophora* son polifiléticos y han intentado separar grupos de especies monofiléticas de este conjunto supuestamente artificial. Esto es lo que llevó a Bouché a separar una serie de especies y agruparlas en el nuevo género *Nicodrillus* que ha sido poco utilizado salvo por algunos autores franceses o excepcionalmente de otros países.

En el presente trabajo se pretende estudiar la filogenia del complejo de especies *A. caliginosa* aumentando por una parte el número de muestras respecto a trabajos anteriores con técnicas moleculares, y por otra incluyendo especies morfológicamente similares que pudieran estar filogenéticamente relacionadas con las consideradas hasta ahora dentro del complejo, para ver si de esta forma se consiguen aclarar las relaciones entre estas especies.

Materiales y Métodos

I. Muestreo.

Se han capturado mediante excavación y extracción manual un total de 228 especímenes del complejo de especies *Aporrectodea caliginosa* y de otras especies morfológicamente similares y que potencialmente podrían estar filogenéticamente relacionadas (*A. caliginosa*, *A. trapezoides*, *A. nocturna*, *A. longa*, *A. giardi*, *N. carochensis*, *N. monticola* y *N. tetramammalis*). Los ejemplares proceden de 75 localidades de nueve países diferentes: España, Francia, Portugal, Italia, Grecia, Turquía, Argelia, Egipto y Australia, (Fig. 1, Tabla 1). Todos los individuos se identificaron basándose en los caracteres morfológicos y anatómicos usuales utilizando la clave de Gates (1972) para *A.*

trapezoides, el trabajo de Onteniente y Rodríguez Babío (2002) para las tres especies de *Nicodrilus*, y el de Blakemore (2006) para el resto. Los caracteres morfológicos de las distintas especies pueden consultarse en el Anexo 3.

Además de estos individuos, se añadieron secuencias de otros 34 individuos del complejo tomadas de GenBank (COII y 28S rRNA; Pérez-Losada et al., 2009), pertenecientes a *A. caliginosa*, *A. tuberculata*, *A. trapezoides*, *A. nocturna* y *A. longa* procedentes de diferentes localidades de España, Francia, Finlandia, Dinamarca, Alemania, Inglaterra, Serbia y Polonia. En definitiva se han incluido en este estudio un total de 262 individuos de 15 países distintos.



Fig. 1. Situación geográfica de las localidades muestreadas, exceptuando las de *A. trapezoides* que se pueden consultar en la Fig. 1 del capítulo 2.

Taxón	Código	Localidad	Nº localidad	GPS
<i>A. caliginosa</i>	AcSAN	San Román (España)	13	N 43°15'20.9" W 05°05'10.3"
	AcYVE	Yvetot (Francia)	3	N 49°37' W 00°35'
	AcBRE	Bretaña (Francia)	2	N 48°11' W 02°55'
	AcMPL61	Soudan (Francia)	8	N 46°25'11.5" W 00°04'09.2"
	AcMPL119	Antignac (Francia)	10	N 42°49'21.4" E 00°36'16.6"
	AcMPL121	Adé (Francia)	9	N 43°07'55.8" W 00°02'15.4"
	AcMPL123	Antignac (Francia)		
	AcMPL133	París (Francia)	5	N 48°43'14.91" E 02°57'15.42"
	AcMPL138	Göttingen (Alemania)	23	N 51°11'40.26" E 10°16'23.02"
	AcMPL139	Jokioinen (Finlandia)	26	N 60°48'02.82" E 23°27'39.77"
	AcMPL141	Quinto Real (España)	16	N 42°46'02.8" W 01°49'56.9"
	AcMPL143	Echarri (España)	15	N 43°05'46.4" W 01°39'22.9"
	AcMPL147	Bains-de-Taccana (Córcega)	21	N 41°50'02.4" E 08°57'45.9"
	AcMPL150	Orense (España)	12	N 42°07'55.26" W 08°03'04.59"
	AcMPL154	Bilbao (España)	14	N 43°17'54.1" W 03°02'32.3"
<i>A. tuberculata</i>	AtubMPL56	Lancaster (Reino Unido)	22	N 54°02' W 02°45'
	AtubMPL62	Jokioinen (Finlandia)		E 23°27'37.54" N 60°48'02.34"
	AtubMPL68	Jyväskylä (Finlandia)	27	N 62°14'44.75" E 25°41'27.49"
	AtubMPL73	Silkeborg (Finlandia)	25	N 56°12' W 09°30'
	AtubMPL74	Silkeborg (Finlandia)		
	AtubMPL96	Lomianki (Polonia)	24	N 52° 20' E 20° 53'
<i>A. nocturna</i>	AnBRE	Bretaña (Francia)		
	AnMPL306	Avignon (Francia)	6	N 43°54'43.6" E 004°53'07.7"
	AnMPL307	Vigo (España)	11	N 42°10'01.92" W 08°41'03.51"

Tabla 1. Localidades de muestreo de cada taxón. Se muestran las coordenadas GPS de cada localidad, así como cada código empleado en los árboles filogenéticos. Las muestras con el código MPL han sido tomadas de GenBank (Pérez-Losada et al., 2009). A estas localidades hay que añadir todas las de *A. trapezoides* mostradas en el capítulo 2.

Taxón	Código	Localidad	Nº loc.	GPS
<i>A. longa</i>	AlFrADRI	Saint-Adrien (Francia)	1	N48°29' W 03°07'
	AlFrBRU	Brunoy (Francia)	4	N48°41' W 02°30'
	AlFrYVE	Yvetot (Francia)		
	AlMPL47	París (Francia)		
	AlMPL52	Lancaster (Reino Unido)		
	AlMPL60	Soudan (Francia)		
	AlMPL79	Soudan (Francia)		
	AlMPL82	Marnay (Francia)	7	N 46°23'51.0" E 0°21'47.2"
	AlMPL93	Soudan (Francia)		
	AlMPL309	Vigo (España)		
	AlMPL311	Vigo (España)		
<i>A. giardi</i>	AgBRU	Brunoy (Francia)		
<i>N. carochensis</i>	NcMOG	Mogente (España)	20	N 38°54'39.5" W 00°49'48.1"
<i>N. monticola</i>	NmROB	Robledillo (España)	17	N 39°35'49.6" W 04°49'39.6"
	NmRMA	Robledo del Mazo (España)	19	N 39°36'43.7" W 04°54'30.2"
	NmRCRU	Cruce a Robledo del Mazo (España)	18	N 39°35'49.2" W 04°52'11.2"
<i>N. tetramammalis</i>	NtROB	Robledillo (España)		
	NtRMA	Robledo del Mazo (España)		
	NtRCRU	Cruce a Robledo del Mazo (España)		

Tabla 1 (continuación). Localidades de muestreo de cada taxón. Se muestran las coordenadas GPS de cada localidad, así como cada código empleado en los árboles filogenéticos. Las muestras con el código MPL han sido tomadas de GenBank (Pérez-Losada et al., 2009). A estas localidades hay que añadir todas las de *A. trapezoides* mostradas en el capítulo 2.

Después de la recolección, los especímenes fueron lavados con agua destilada y mantenidos en etanol absoluto o etanol 96° a -20°C. Una porción de la pared del cuerpo (± 0.025 g) se extrajo y se limpió cuidadosamente bajo estereomicroscopio para eliminar las partículas de suelo y los parásitos macroscópicos. Las muestras de tegumento se mantuvieron en etanol a -20°C hasta su digestión para la extracción del ADN.

II. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

Tanto la extracción como la amplificación y secuenciación se realizaron de igual manera que en el capítulo 2. Se amplificaron los mismos genes.

III. Variabilidad genética y análisis filogenéticos

Se estimaron las distancias (*p-distancia*) entre y dentro de cada taxón con el programa ARLEQUIN v. 3.1 (Excoffier et al., 2005) para los genes COII y 28S rRNA, ya que el número muestral es más elevado. La variación dentro de cada taxón se expresa como diversidad haplotípica (H), diversidad nucleotídica (π), número de posiciones polimórficas (S), número total de mutaciones y número medio de diferencias entre pares de secuencias. También se calculó el porcentaje de G+C.

Los modelos de evolución en las secuencias y sus correspondientes parámetros se estimaron con jMODELTEST v. 0.1.1 (Posada, 2008). Los modelos que mejor explicaban la evolución de cada gen se utilizaron en la estimación de la filogenia en los distintos análisis filogenéticos.

Se chequeó la saturación en las terceras posiciones en los genes COI y COII con el programa DAMBE (Xia y Xie, 2001). Tal como se espera, se encontró una mayor saturación en las transiciones, que son más fáciles de saturar que las transversiones. Se probó a realizar los análisis con y sin esta posición del codón, pero las relaciones filogenéticas resultaron ser las mismas.

Como análisis filogenéticos, se realizaron estimaciones de la filogenia mediante inferencia bayesiana, máxima verosimilitud y parsimonia. Los parámetros y condiciones de los análisis son los mismos que se describen en la sección Materiales y Métodos del capítulo 2.

Se analizaron filogenéticamente tres tipos de matrices diferentes: primero, solamente con COII para aplicar la regla del 4X para delimitación de especies (ver abajo); segundo, una matriz con COII y 28S rRNA ya que el número de muestras para estos dos genes es mayor; tercero, una supermatriz que incluía COII, COI, 28S rRNA y H3. En esta última se eliminaron las muestras obtenidas de GenBank, ya que se desconocían las secuencias de COI y H3. Sin embargo, se optó por mantener las muestras de *A. tuberculata* ya que experimentalmente se comprobó que el análisis era suficientemente robusto para no crear politomías en este clado, a pesar de la sustitución de COI y H3 por indeterminaciones en la supermatriz. Se testó la existencia de conflictos entre sets de datos mediante un test de congruencia ILD (incongruence length difference test; Farris et al., 1994) implementado en WINCLADA v.1.00.08 (Nixon, 2002).

Debido al gran número de muestras, los análisis filogenéticos se realizaron con un grupo reducido de muestras. En concreto, las muestras eliminadas pertenecían todas a *A. trapezoides* y fueron elegidas de tal manera que estuviera representada al menos una muestra de cada clado recobrado en los estudios filogeográficos.

IV. Datación relativa, datación absoluta y delimitación de especies

La estima de los tiempos de divergencia es interesante en el contexto de este estudio ya que permitiría entender por una parte la diversificación del complejo de especies, y por otra cuándo y cómo de reciente es la partenogénesis en las formas de *A. trapezoides*.

Para realizar las dataciones se empleó el programa BEAST v.1.4.8 (Drummond y Rambaut, 2007), implementando un análisis de inferencia bayesiana aplicando un reloj molecular relajado para cada una de las particiones (uncorrelated log-normal relaxed clock), es decir, no existe a priori una correlación entre la tasa de mutación de cada linaje y la de sus ancestros (Drummond et al., 2006). El resultado que obtenemos es, además, un árbol ultramétrico que nos va a servir de punto de partida para aplicar el método de delimitación de especies desarrollado por Pons et al. (GMYC, 2006), tal como se explicará más adelante. A cada partición se le aplicó el modelo evolutivo que mejor explicaba los

datos. Los sets de taxones fueron distintos en datación relativa o absoluta. Este programa contiene un panel de previos, o 'priors', que permite especificar información previa de todos los parámetros del modelo. Como 'tree prior', se eligió proceso de especiación ('speciation: Yule process'), lo que delimita que las ramas se vayan separando más o menos de manera homogénea. El 'Yule tree prior' asume una tasa de especiación constante por linaje. Este prior tiene un solo parámetro (yule.birthRate) que representa la tasa media neta de nacimiento de linajes. Bajo este prior, se espera que la longitud de las ramas tenga una distribución exponencial con una media de $yule.birthRate^{-1}$. En la pantalla de 'priors', se utilizaron las opciones por defecto excepto en los siguientes casos. En el prior 'yule.birth.Rate' se marcó el límite superior a 1.000.000. En el prior 'UCLD mean' de cada partición se estableció un valor inicial de 0.01 y un valor máximo de 100. Los valores del prior 'tmrca Calibration' variaron según se tratara de datación relativa o absoluta, tal como se describe a continuación.

En la datación relativa, solamente se emplearon los datos del complejo de especies (COII y 28S rRNA). El uso en este caso de un reloj molecular relajado permite la estimación de tiempos de divergencia pero no de edades absolutas de los clados. Se formaron dos sets de taxones: el primero, llamado 'calibration', incluía todas las secuencias. El segundo, llamado 'rooting', incluía también todas las secuencias y se marcó como monofilético. En el prior 'tmrca Calibration' se estableció una distribución normal de media 1 y desviación típica 0. Así, se marcó una tasa de sustitución por sitio de 1 de tal manera que la longitud de las ramas es proporcional al tiempo y varía dentro del complejo entre 0 y 1.

La datación absoluta requiere de algún punto de calibración que podamos asociar con una fecha concreta. En el caso de las lombrices, es difícil dada la ausencia de fósiles y de datos suficientes sobre las tasas de sustitución de cada gen en cada grupo. Por ello, se optó por crear una matriz conjunta con los datos del complejo *A. caliginosa* y todas las especies de hormogástridos, para los que ya se ha aplicado anteriormente este método (Novo, 2010). Los hormogástridos presentan una distribución mediterránea. Al ser animales endógenos, se asume un fenómeno de vicarianza en su distribución, lo que está justificado debido a la escasa capacidad de habilidad de dispersión en lombrices en general (Lighthart y Peek, 1997; Hale et al., 2005) y en hormogástridos en particular (Novo et al., 2010; Omodeo y Rota, 2008). Con esta asunción, se calibró el árbol filogenético

utilizando la separación entre *Hormogaster pretiosa pretiosa* de Cerdeña y las especies continentales que se agrupan filogenéticamente en el mismo clado, *H. pretiosa* cf. *hispanica* y *H. najaformis*, asumiendo un tiempo de divergencia entre estos linajes al menos igual al de la separación de la microplaca corso-sarda de la Europa continental (Novo et al., en prensa). En concreto, se utilizaron las secuencias de *H. pretiosa pretiosa* y *H. najaformis*, por ser las secuencias de las que se disponía. Como fecha de calibración, se empleó la fecha más antigua con la que los últimos estudios datan la separación de las microplacas mediterráneas occidentales (33 millones de años; Schettino y Turco 2006). La separación no comenzó antes de esta fecha y se prolongó hasta los 25 millones de años, por lo que esta edad representa una edad mínima de separación de los linajes (para una discusión en profundidad sobre estos fenómenos geológicos, consultar Novo et al., en prensa). En cuanto al funcionamiento del programa, se formaron dos sets de taxones: el primero, llamado 'calibration', incluía las secuencias de *H. pretiosa pretiosa* y *H. najaformis*. El segundo, llamado 'rooting', incluía todas las secuencias de hormogástridos ya que en este comando se necesita establecer un grupo que sepamos que es monofilético, y se marcó como tal. En el prior 'trmca Calibration' se estableció una distribución normal de media 33 y desviación típica 0,05. Así-se marcó una divergencia de 33 millones de años entre las dos especies de hormogástridos con una probabilidad del 95%. Como grupos externos se utilizaron las siguientes especies de anélidos: *Arenicola marina* (Polychaeta, Scolecida, Capitellida, Arenicolidae), *Hirudo verbana* (Clitellata, Hirudinida, Hirudinea, Arhynchobdellida, Hirudiniformes, Hirudinidae), *Aulophorus furcata* (= *Dero furcata*) (Clitellata, Oligochaeta, Haplotaxida, Tubificina, Naididae), *Aelosoma* sp. (Clitellata, Oligochaeta, Haplotaxida, Lumbricina, Aeolosomatidae) y *Amyntas robustus* (Clitellata, Oligochaeta, Haplotaxida, Lumbricina, Megascolecidae)(secuencias cedidas por Marta Novo y Gonzalo Giribet). Los árboles se realizaron con las secuencias de los genes COI y 28S rRNA, por lo que no se incluyeron las secuencias de GenBank (Pérez-Losada et al., 2009).

Una vez obtenidos los árboles ultramétricos, se aplicó el método de máxima verosimilitud desarrollado por Pons et al. (2006). Este método determina la transición más verosímil entre dos fases de la evolución: un fenómeno de 'nacimiento puro' ('pure-birth process') que genera un set de poblaciones (es decir, un fenómeno de especiación) y un proceso de coalescencia dentro de poblaciones. El punto (o puntos) de transición define un set de clados los cuales pueden ser considerados como una muestra de una

población que evoluciona independientemente. Una vez obtenido el árbol ultramétrico del complejo de especies *A. trapezoides*, se empleó el paquete R v.2.8.0. (R Development Core Team, 2008) con la extensión ape v.2.2-2 (Paradis et al., 2004) para aplicaciones filogenéticas. Una vez finalizado el análisis, el número de linajes se representó frente al tiempo y se estableció un límite entre especiación y coalescencia usando el modelo mixto Yule-coalescente (General Mixed Yule Coalescent model, GMYC model). Se empleó en primer lugar el umbral simple, y luego un umbral múltiple. Los resultados se compararon con un chi-cuadrado.

Como método de delimitación de especies alternativo, se empleó la regla del 4X (Birky et al., 2005; 2010), para lo que se comparó la diversidad media (medida como diversidad nucleotídica) entre y dentro de clados. Esta regla trata de delimitar poblaciones independientes comparando la diversidad dentro y entre clados recíprocamente monofiléticos.

Resultados

I. Variabilidad genética

La diversidad haplotípica (H), diversidad nucleotídica (π), número de posiciones polimórficas (S), porcentaje de G+C, número total de mutaciones y número medio de diferencias entre pares de secuencias se muestran en la tabla 2. Las divergencias genéticas entre y dentro de taxones se muestran en la tabla 3. Dados los resultados del capítulo X (filogeografía), *A. trapezoides* se consideró como dos linajes diferenciados (linaje I y linaje II) en la comparación de las divergencias genéticas. La divergencia dentro de taxones varía entre 1,49% en *A. tuberculata* y 9,27% en *A. longa* (COII) y 0,02% en *N. monticola* y 0,50% en *A. longa* (28S rRNA). Respecto a la distancia genética entre taxones, en algunos casos es similar o incluso más pequeña que los valores observados dentro de taxones (por ejemplo, la distancia genética entre las tres especies de *Nicodrilus* con el linaje II de *A. trapezoides*). En el caso de *N. monticola*, la distancia con *N. tetramammalis* fue incluso menor que la divergencia genética dentro de la especie (5,01% versus 5,71% en COII). La distancia entre *A. caliginosa* y *A. tuberculata* fue de 9,24%,

valor similar a la distancia máxima encontrada dentro de un taxón en todo el complejo (9,27% en *A. longa*). Las distancias entre el resto de especies varían entre 10,27% y 15,58%.

II. Relaciones filogenéticas

Utilizando el criterio informativo de Akaike, AIC (Posada y Buckley, 2004) el modelo de evolución GTR con proporción de sitios invariables y distribución gamma (GTR+I+G) fue el que mejor se ajustaba a los datos de los genes COII, COI y H3, mientras que en el gen 28S rRNA fue el modelo Hasewaga-Kishino-Yano con proporción de invariables (HKY+I). No se encontraron incongruencias significativas entre los genes (test ILD; $P > 0.05$).

Todos los árboles generados con los diferentes análisis (inferencia bayesiana, máxima verosimilitud y parsimonia) para las distintas particiones analizadas (COII -Fig. 2- y COII+28s -Fig. 3) y la matriz de todos los datos concatenados (Fig. 4) mostraron topologías congruentes. Las principales relaciones filogenéticas fueron las mismas y estaban siempre bien soportadas estadísticamente. Algunas relaciones entre nodos terminales cambiaron ligeramente como resultado de un mayor número de politomías en el análisis de parsimonia.

Se recobraron tres clados monofiléticos principales: un primer clado formado por *A. caliginosa* y *A. tuberculata*, un segundo formado por *A. longa*, *A. nocturna*, *A. giardi* y muestras del linaje I de *A. trapezoides*, y un tercero compuesto por el linaje II de *A. trapezoides* y las tres especies de *Nicodrilus* (*N. carochensis*, *N. monticola* y *N. tetramammalis*). Este último clado presentaba más politomías en alguno de los análisis (Fig. 2, 3 y 4).

COII 28s	<i>A. caliginosa</i>	<i>A. tuberculata</i>	<i>A. trapezoides</i> lineage I	<i>A. trapezoides</i> lineage II	<i>A. longa</i>	<i>A. giardi</i>	<i>N. carochensis</i>	<i>N. monticola</i>	<i>N. tetramamalis</i>	<i>A. nocturna</i>	<i>L. terrestris</i>	<i>H. elisae</i>	<i>H. castillana</i>
<i>A. caliginosa</i>	0.30/4.62	9.24	15.07	14.32	15.05	14.22	14.20	14.85	15.28	14.95	17.09	21.85	20.44
<i>A. tuberculata</i>	0.23	0.07/1.49	14.85	14.81	14.53	15.58	14.11	14.96	15.38	13.45	17.86	21.45	20.51
<i>A. trapezoides</i> lineage I	1.07	1.09	0.20/9.20	13.46	10.25	10.34	13.50	13.98	14.19	10.04	18.98	22.56	19.37
<i>A. trapezoides</i> lineage II	1.03	1.06	0.24	0.21/8.69	13.04	13.82	8.81	8.93	9.32	12.91	17.17	21.19	19.23
<i>A. longa</i>	1.28	1.29	0.57	0.55	0.50/9.27	10.27	12.68	13.28	13.59	10.36	18.02	22.13	18.96
<i>A. giardi</i>	1.47	1.50	0.52	0.58	0.64	0.20/2.80	13.78	14.34	14.69	12.08	19.08	23.77	19.40
<i>N. carochensis</i>	1.04	1.07	0.27	0.24	0.64	0.68	0.16/6.42	8.44	9.10	12.45	16.77	20.36	19.13
<i>N. monticola</i>	1.03	1.06	0.25	0.18	0.63	0.67	0.24	0.02/5.71	5.01	13.51	17.46	20.70	20.28
<i>N. tetramammalis</i>	1.02	1.05	0.24	0.17	0.62	0.66	0.23	0.02	0.03/3.25	14.08	17.73	20.33	20.64
<i>A. nocturna</i>	1.10	1.03	0.39	0.36	0.72	0.80	0.37	0.36	0.35	0.25/5.63	18.15	22.26	18.87
<i>L. terrestris</i>	4.05	4.44	3.97	3.85	4.02	4.25	3.78	3.77	3.77	4.05	-/-	22.32	19.06
<i>H. elisae</i>	5.90	5.85	5.11	5.16	5.34	5.38	5.19	5.18	5.17	5.07	5.19	-/-	22.69
<i>H. castillana</i>	4.91	4.86	4.49	4.54	4.72	4.76	4.57	4.56	4.56	4.45	4.57	2.10	-/-

Tabla 3. Distancias genéticas (p-distancias no corregidas) dentro y entre los distintos taxones en los genes COII y 28S rRNA.

COII	μ	H	Mut.	S	%G+C	Dif. pares
<i>A. caliginosa</i>	0,0878±0,0448	0,824±0,084	137	123	37,66	48,354±22,026
<i>A. tuberculata</i>	0,0149±0,0097	1,000±0,127	18	18	37,03	8,200±4,587
<i>A. longa</i>	0,09269±0,0466	0,962±0,026	175	147	37,60	51,076±23,025
<i>A. giardi</i>	0,0280±0,0159	0,643±0,184	61	61	37,11	15,429±7,726
<i>A. nocturna</i>	0,0562±0,0427	1,00±0,272	48	45	37,99	31,000±18,881
<i>N. tetramammalis</i>	0,0325±0,0178	0,956±0,060	45	45	36,31	17,933±8,710
<i>N. monticola</i>	0,0529±0,0276	0,989±0,031	114	109	36,9	29,154±13,577
<i>N. carochensis</i>	0,0642±0,0396	0,900±0,161	77	72	37,03	35,000±0,040
<i>A. trapezoides</i>	0,085±0,004	0,853±0,024	211	165	38,06	47,673±18.875
linaje I	0,1693±0,0829	0,990±0,058	136	125	39,59	40,297±17,790
linaje II	0,1367±0,0663	0,978±0,059	347	235	32,37	35,533±14,266
<hr/>						
28S rRNA						
<i>A. caliginosa</i>	0,0037±0,0022	0,877±0,039	11	11	65,51	2,982±1,610
<i>A. tuberculata</i>	0,0005±0,0006	0,429±0,169	1	1	65,42	0,429±0,429
<i>A. longa</i>	0,0047±0,0028	0,890±0,051	13	12	66,03	3,816±2,004
<i>A. giardi</i>	0,0018±0,0016	0,500±0,265	3	3	66,04	1,500±1,121
<i>A. nocturna</i>	0,00248±0,0021	0,667±0,204	3	3	66,07	2,000±1,405
<i>N. tetramammalis</i>	0,0008±0,0010	0,667±0,314	1	1	66,17	0,667±0,667
<i>N. monticola</i>	0,0025±0,0021	0,833±0,222	4	4	66,13	2,000±1,4050
<i>N. carochensis</i>	0,0017±0,0017	0,667±0,314	2	2	66,17	1,333±1,098
<i>A. trapezoides</i>	0,0022±0,0015	0,814±0,041	11	11	66,25	1,998±0,587
linaje I	0,0021±0,0015	0,8167±0,051	5	5	66,53	1,642±1,020
linaje II	0,0022±0,0014	0,657±0,104	11	11	66,17	1,70±1,037

Tabla 2. Parámetros de las secuencias de COII y 28S rRNA en cada uno de los taxones. Mut: número de mutaciones totales. Dif. entre pares: número medio de diferencias entre pares de secuencias.

A. caliginosa se dividió en dos grupos parafiléticos, uno de ellos filogenéticamente más próximo a *A. tuberculata* que al otro clado de *A. caliginosa*. *A. longa* también presentó dos grupos parafiléticos, uno de ellos muy próximo a *A. nocturna*. Tanto *A. giardi* como *A. nocturna* formaron grupos monofiléticos, excepto en el árbol ultramétrico realizado por inferencia bayesiana para realizar la datación relativa, en el que *A. nocturna* aparece mezclada con *A. longa* (Fig. 5). Todas las muestras de *A. trapezoides* del linaje I se incluían también en un grupo monofilético, mientras que las del linaje II mostraban parafilia. Las tres especies de *Nicodrilus*, mostraron también un estatus parafilético. Las muestras de *N. carochensis* aparecieron entremezcladas con algunas muestras del linaje II de *A. trapezoides*. *N. monticola* y *N. tetramammalis* aparecían mezcladas en el mismo clado, con un buen soporte estadístico.

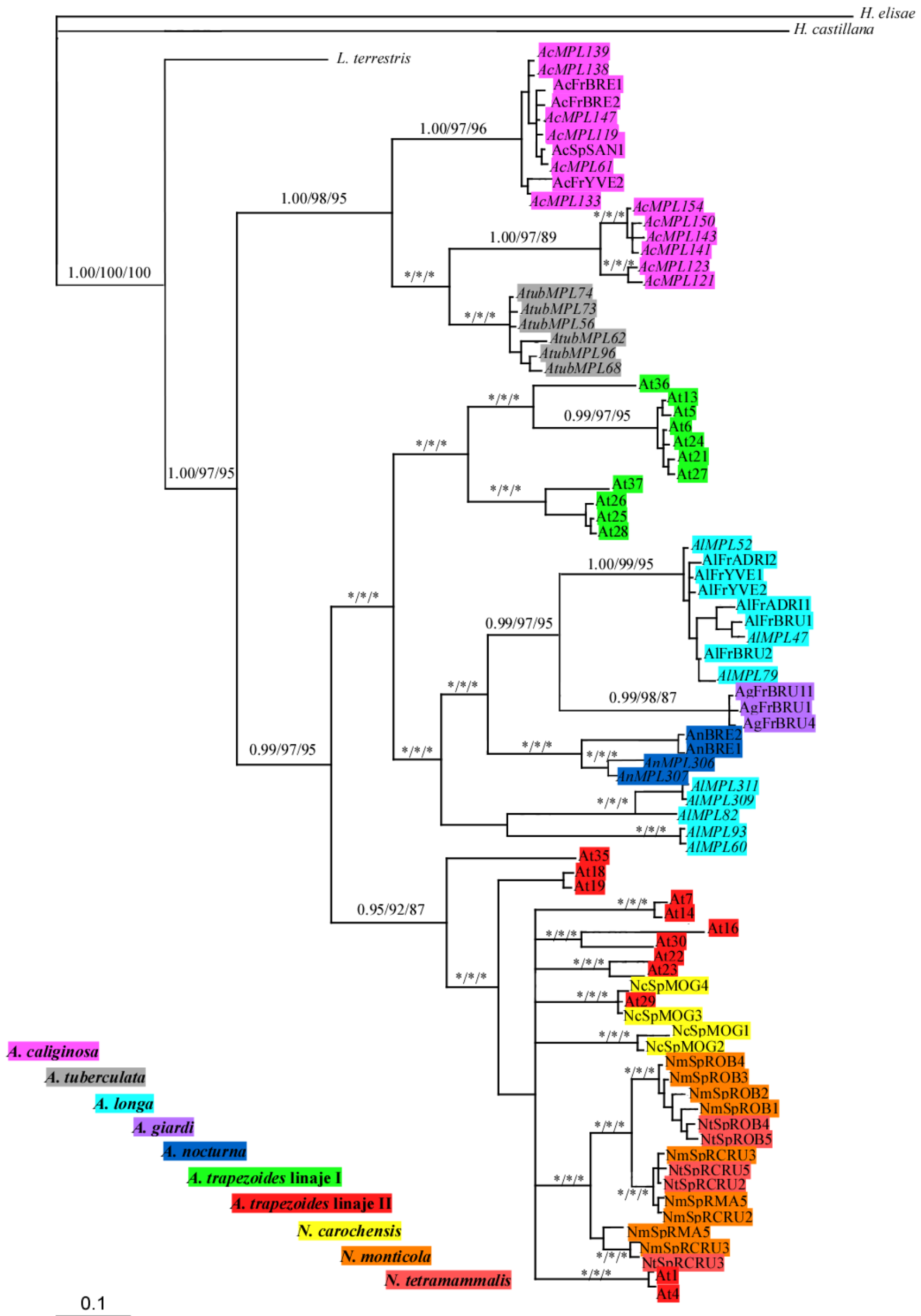


Fig. 2. Árbol filogenético del complejo de especies *A. caliginosa*, reconstruido por el método de inferencia bayesiana basado en la secuencia del gen mitocondrial COII. Los valores de probabilidad posterior (PP) y bootstrap obtenidos en los análisis de máxima verosimilitud (ML) y parsimonia (P) se muestran en los nodos cuando son superiores a 0,8 (PP/ML/P). Los asteriscos indican soportes estadísticos >0.80/80/80.

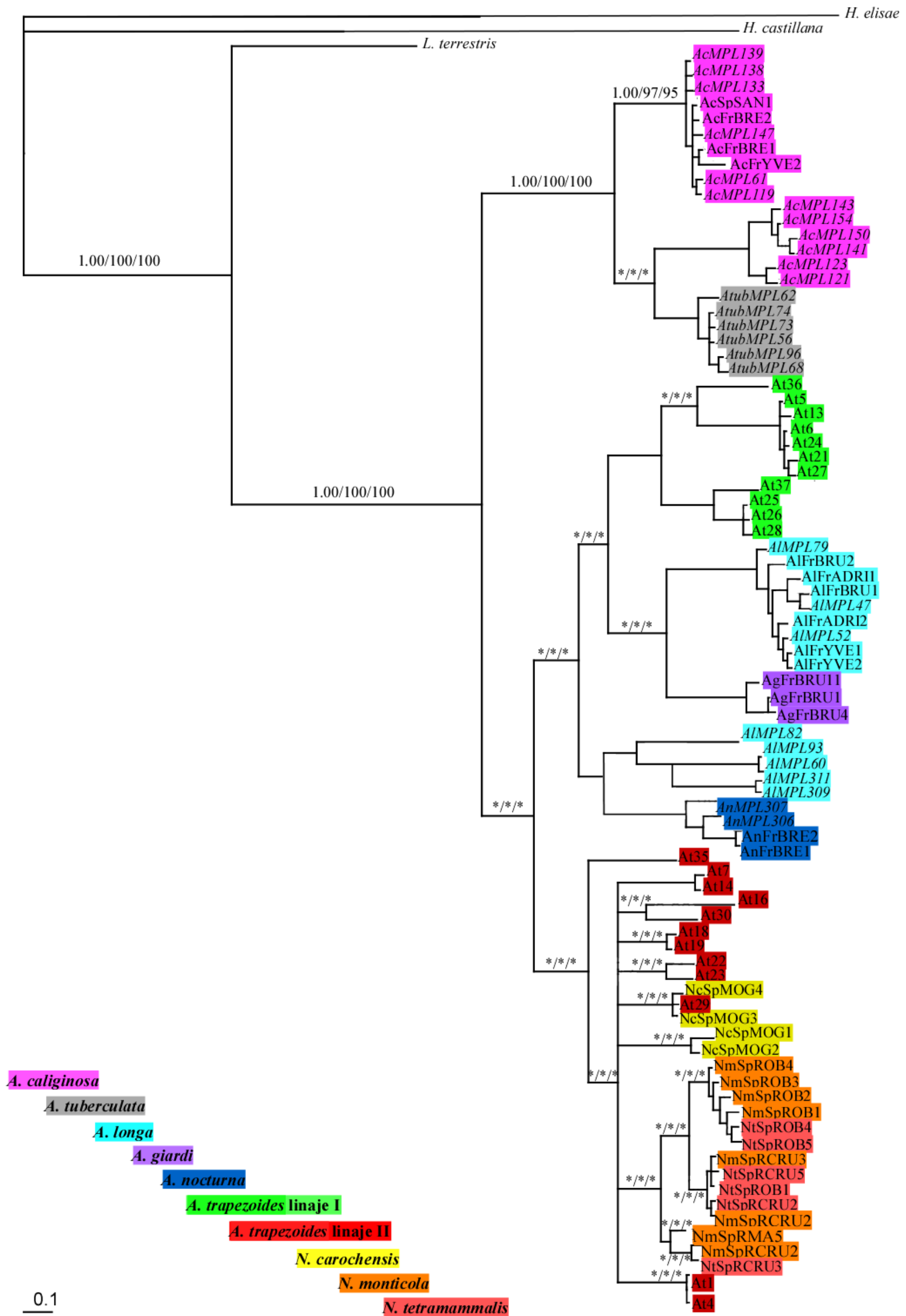


Fig. 3. Árbol filogenético del complejo de especies *A. caliginosa*, reconstruido por el método de inferencia bayesiana basado en la secuencia de los genes COII y 28S r RNA. Los valores de probabilidad posterior (PP) y bootstrap obtenidos en los análisis de máxima verosimilitud (ML) y parsimonia (P) se muestran en los nodos cuando son superiores a 0,8 (PP/ML/P). Los asteriscos indican soportes estadísticos >0.80/80/80.

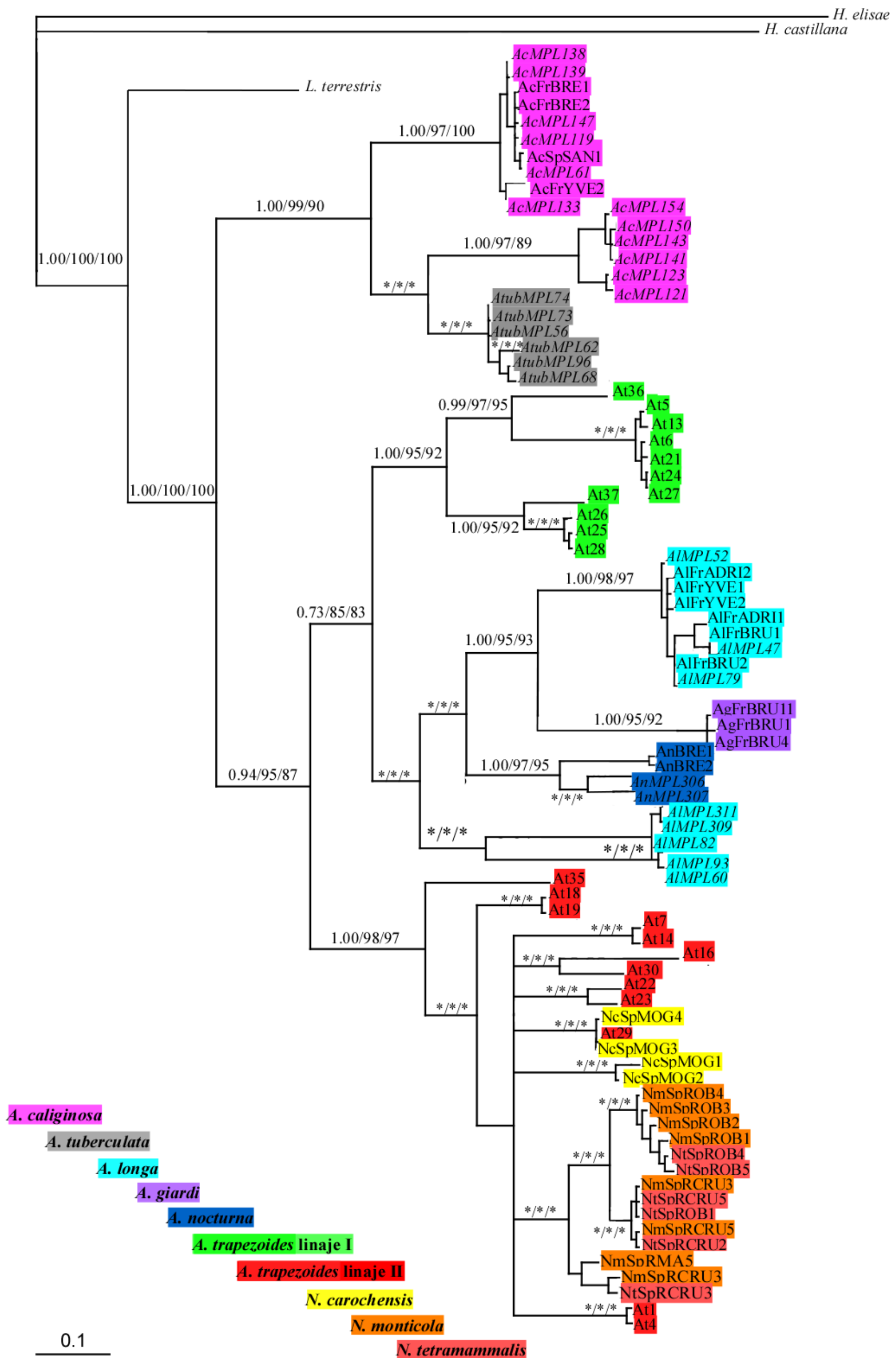


Fig. 4. Árbol filogenético del complejo de especies *A. caliginosa*, reconstruido por el método de inferencia bayesiana basado en la secuencia de los genes COII, COI, 28S rRNA y H3. Los valores de probabilidad posterior (PP) y bootstrap obtenidos en los análisis de máxima verosimilitud (ML) y parsimonia (P) se muestran en los nodos cuando son superiores a 0,8 (PP/ML/P). Los asteriscos indican soportes estadísticos >0.80/80/80.

III. Datación relativa y absoluta

En la Fig. 5 se muestra el árbol de datación relativa. En un tiempo evolutivo relativo que va desde (momento actual) a 1 (momento de diversificación del complejo de especies), la diferenciación del clado *A. caliginosa/A. tuberculata* del resto de taxones es la más basal de todas. La diferenciación de los dos linajes de *A. caliginosa* no es un fenómeno relativamente reciente, ya que se produce en el punto 0,49. También se observa que la diversificación del clado que da lugar a todas las formas de *A. trapezoides* se produce en un punto bastante basal en relación al comienzo de la diversificación del complejo (0,85). La diferenciación del clado que engloba el linaje I de *A. trapezoides*, *A. longa*, *A. nocturna* y *A. giardi* (que llamaremos de aquí en adelante ‘clado de formas eurosiberianas’ para abreviar) (en el punto 0,70) es más antigua que la del clado que comprende el linaje II de *A. trapezoides* y las especies de *Nicodrilus* (o ‘clado de formas mediterráneas’)(que empieza en el punto 0,50).

El antecesor común de todas las formas partenogenéticas (es decir, el punto donde al menos en esta ocasión surge la partenogénesis) en el clado de formas mediterráneas es ligeramente más antiguo que el del clado de formas eurosiberianas (puntos 0,50 y 0,43, respectivamente), lo que implica que existen al menos dos puntos y momentos distintos en los que se originó la partenogénesis dentro de este complejo. Dentro de cada uno de estos clados, el tiempo relativo de divergencia entre formas partenogenéticas es similar, con formas que han divergido más antiguamente que otras. En el clado de formas eurosiberianas, las formas partenogenéticas representan un grupo monofilético, mientras que en el de formas mediterráneas aparecen mezcladas con las distintas especies uniparentales de *Nicodrilus*. Esto podría indicar la existencia de distintos episodios de origen de la partenogénesis dentro de este segundo clado.

La divergencia entre los dos linajes de *A. longa* es bastante antigua (0,70). Como se mencionó anteriormente, en este árbol algunos individuos de *A. longa* aparecen mezclados con *A. nocturna*, a diferencia del resto de árboles en los que *A. nocturna* aparece siempre como un grupo monofilético.

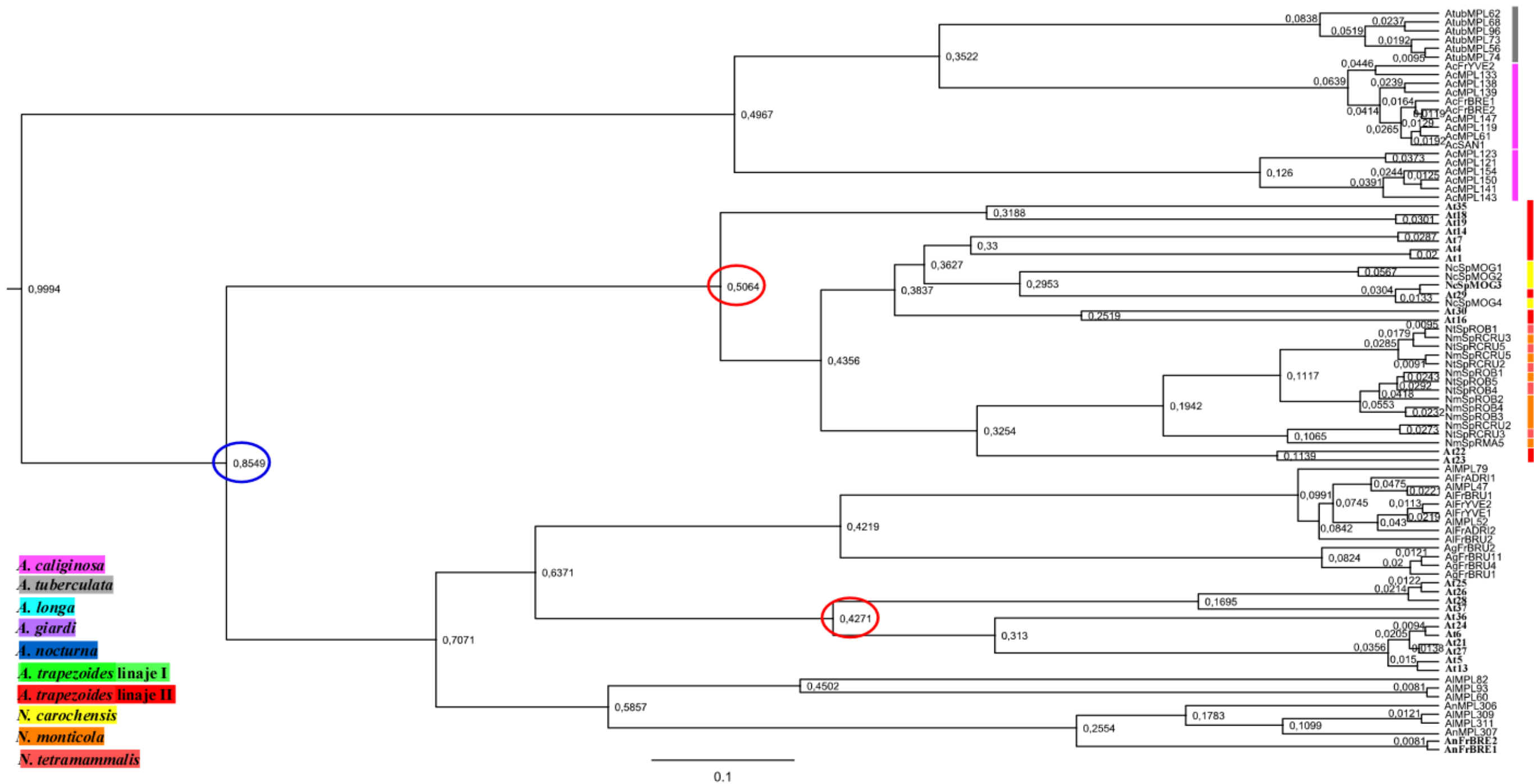


Fig. 5. Árbol ultramétrico realizado mediante inferencia bayesiana con las edades relativas de los principales eventos de diversificación del complejo de especies *A. caliginosa*. Se engloban con un círculo el ancestro común de las formas partenogénicas de cada linaje de *A. trapezoides* (rojo) y de todas en conjunto (azul). Para una mejor comprensión, las barras identificativas de cada especie mantienen los colores utilizados en las figuras 2, 3 y 4 (derecha).

La datación absoluta se realizó construyendo un árbol filogenético que incluía no solamente las especies del complejo, sino también casi todas las especies de hormogástridos. Como se comentó anteriormente, se utilizó como punto de datación la separación entre *H. pretiosa* de Villamassargia (Cerdeña, VIL) y *H. najiformis* de Ordal (Barcelona, ORD), puntos que al menos hace 33 millones de años estaban geográficamente unidos. Debido a que el punto de datación está filogenéticamente algo 'lejano', los intervalos de tiempo asociados a una probabilidad del 95% son relativamente grandes, aunque igualmente nos dan información muy importante sobre los eventos evolutivos de este grupo de especies.

En la Fig. 6 se muestran los resultados de las fechas de datación absoluta en millones de años calculadas con una probabilidad del 95%. La apariencia general del árbol ultramérico es la misma que el del árbol realizado para la datación relativa.

La diversificación del complejo de especies empezó hace entre 56 y 24 millones de años, momento en el que se separa *A. caliginosa* del resto de las especies (y presumiblemente *A. tuberculata* a raíz de los resultados obtenidos en el resto de análisis filogenéticos y en la datación relativa). Los dos grandes clados que engloban formas de *A. trapezoides* empezaron a diverger entre los 42 y los 18 millones de años, lo que marca el origen de las primeras formas partenogenéticas. Al igual que en el árbol de datación relativa, la diversificación del clado de formas eurosiberianas parece que empezó antes que en el de formas mediterráneas (35-14 y 29-11, respectivamente), aunque la amplitud de las barras hacen que los períodos se solapen. El antecesor común más inmediato del linaje I de *A. trapezoides* data hace entre 19 y 5 millones de años y el del linaje II entre 11 y 29. La diversificación de *N. carochensis* (hace entre 17 y 6 millones de años) parece ser algo más antigua que la de las otras dos formas que se han incluido en *Nicodrillus* (9-3 millones de años), aunque de igual manera que en el caso anterior, los períodos se solapan.

IV. Delimitación de especies: regla del 4X y GMYC

Se aplicó la regla del 4X (Birky et al., 2005, 2010) a todo el complejo de especies comparando la diversidad haplotípica del gen COII dentro y entre clados recíprocamente monofiléticos. En general, la diversidad nucleotídica dentro de los clados resultó ser bastante alta. Solamente se ajustaron a la regla uno de los dos clados de *A. caliginosa* (el que queda filogenéticamente más separado de *A. tuberculata*), uno de los clados del linaje I de *A. trapezoides* (At13, 5, 6, 21, 24, 27) y *A. giardi*, es decir, en estos clados la distancia media entre clústers fue al menos cuatro veces mayor que la distancia media dentro de cada clado. La regla no pudo aplicarse en el clado de formas mediterráneas debido al alto número de politomías.

El método GMYC delimitó 19 especies, considerando tanto un umbral simple (Fig. 7) como múltiple (Fig. 8). Además, la prueba del chi-cuadrado no mostró diferencias significativas entre ambos árboles ($\chi^2 = 4,2833$; $P = 0,63839$). De acuerdo con este método serían especies diferentes una especie de *A. nocturna*, tres de *A. longa*, dos dentro del linaje I de *A. trapezoides*, una de *A. giardi*, tres dentro del clado *N. tetramammalis/N. monticola*, dos de *N. carochensis*, tres del linaje II de *A. trapezoides*, tres de *A. caliginosa* y una de *A. tuberculata*. El clon 1 y el 4 (los dos más abundantes) se unen en una misma especie. En *A. carochensis* habría dos especies, una que se ligaría a un clon de *A. trapezoides* y la otra independiente. La especie delimitada en el clado de *A. giardi* fue la única que englobó a todos los individuos de ese taxón, pero solamente cuando se aplicó el umbral simple; considerando un umbral múltiple, una de las muestras no estaba incluida en la supuesta especie.

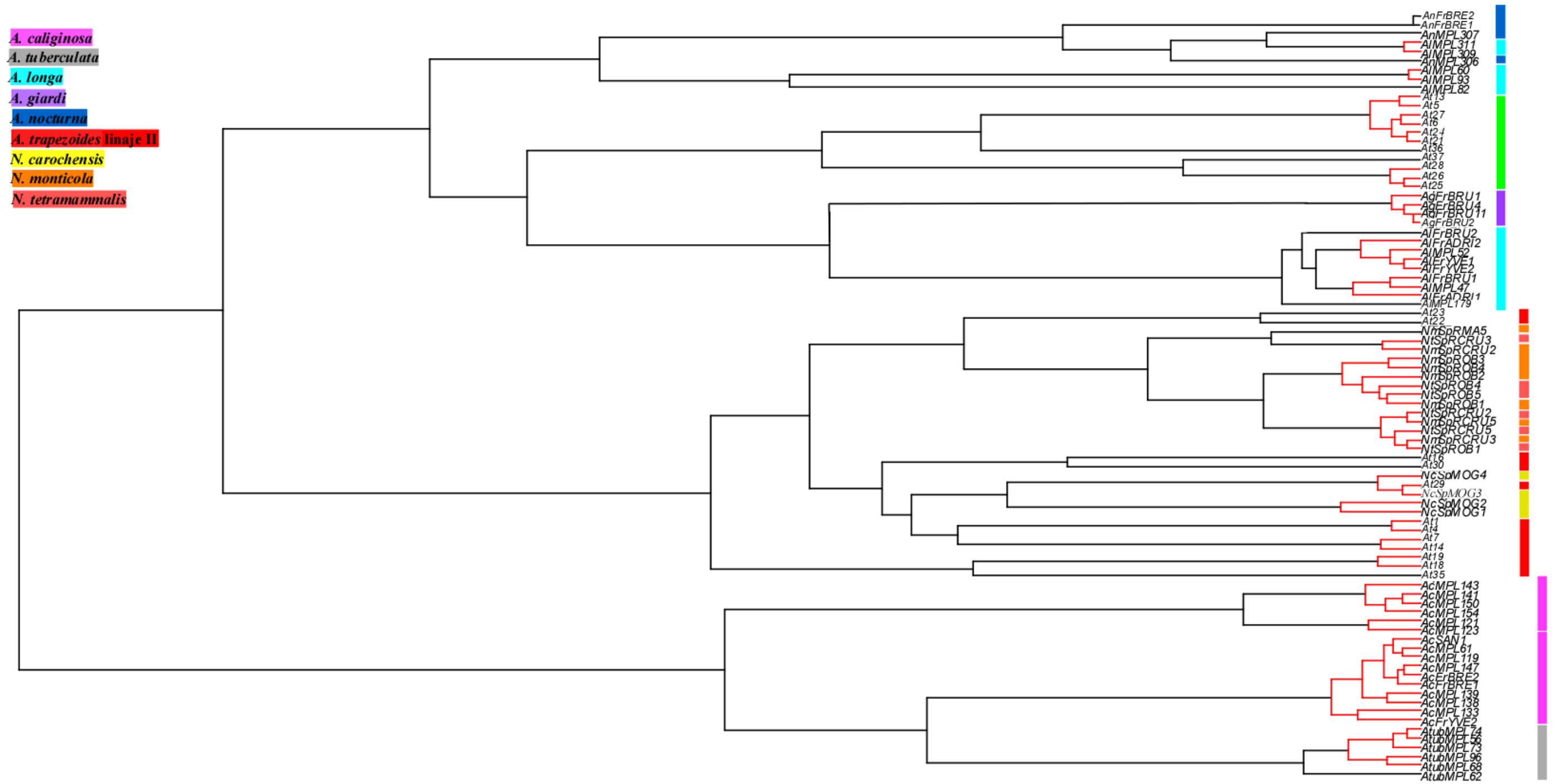


Fig. 7. Delimitación de especies en el complejo *A. caliginosa* mediante el método GMYC (umbral simple). Los clados unidos por ramas en rojo representarían especies distintas.

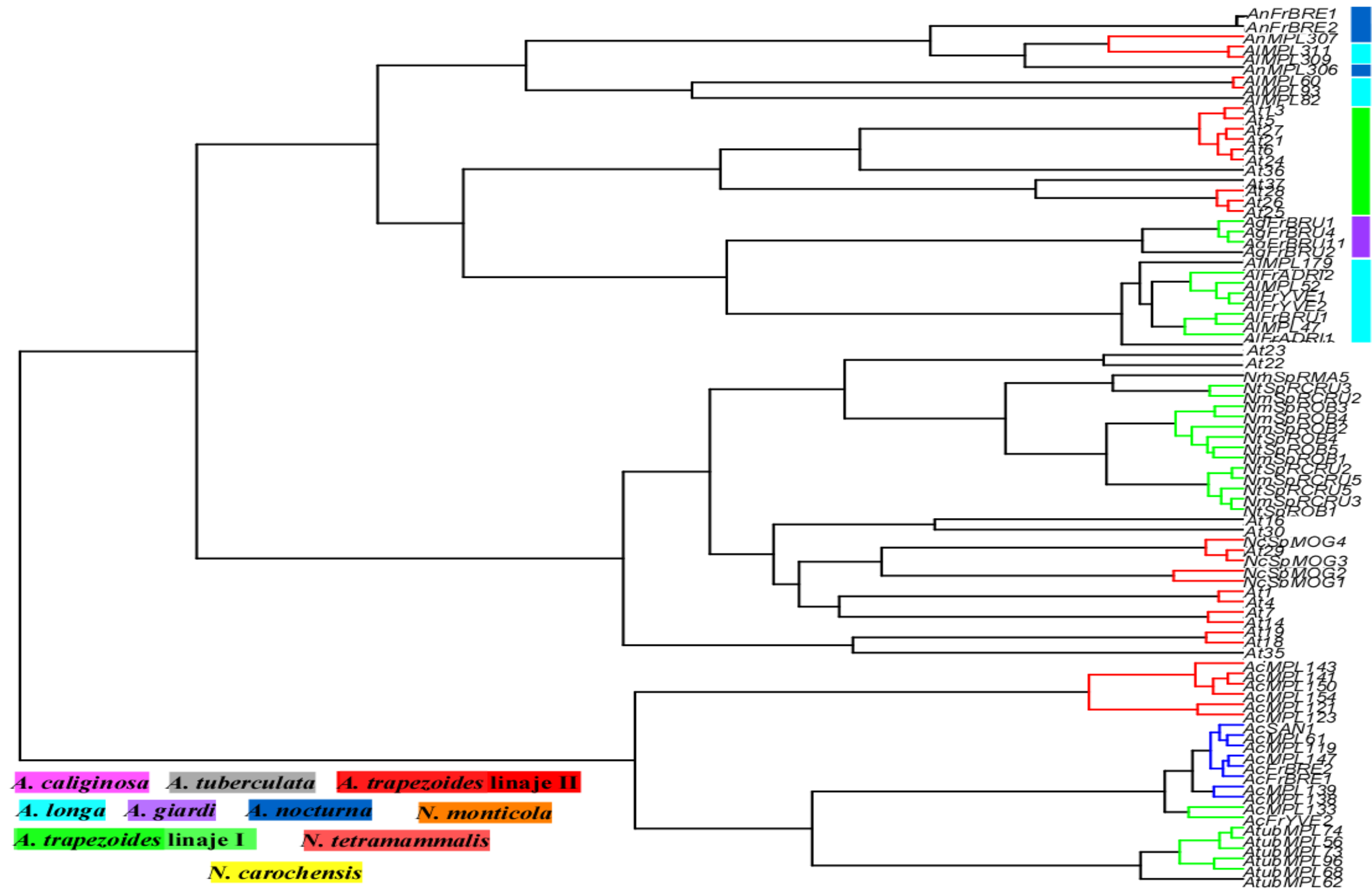


Fig. 8. Delimitación de especies en el complejo *A. caliginosa* mediante el método GMYC (umbral múltiple). Los clados unidos por ramas en rojo, azul y verde representarían especies distintas; cada uno de estos colores representaría un umbral distinto entre fenómenos de coalescencia y especiación.

Discusión

Todos los análisis filogenéticos revelaron la existencia de dos clados hermanos, uno compuesto por *A. caliginosa* y *A. tuberculata*, y otro por las restantes especies consideradas *A. nocturna*, *A. trapezoides*, *A. longa*, *A. giardi*, *N. carochensis*, *N. monticola* y *N. tetramammalis*. Esto coincide con lo indicado por Pérez Losada et al. (2009) en el sentido de que *A. trapezoides* no está directamente relacionada con *A. caliginosa*, sino con otras especies como *A. longa*.

Otro aspecto interesante es que los últimos cuatro taxones, que no se han incluido hasta este momento en ninguna filogenia molecular, están filogenéticamente muy relacionados con el resto de especies del complejo. Este resultado no es sorprendente ya que Pérez-Losada et al. (2009) encontraron evidencia molecular para incluir a *A. longa* en este complejo a pesar de que a nivel taxonómico nunca se había considerado como una forma relacionada con el resto de especies que habitualmente se suelen incluir. Estamos, por lo tanto, ante un 'complejo mucho más complejo' de lo que históricamente se pensaba, formado por muchas formas diferentes estrechamente relacionadas a nivel filogenético, y al mismo tiempo con una diversidad genética interna muy alta. Sin embargo, la posición filogenética de muchas formas no corresponde con lo esperado a nivel taxonómico; la mayoría de los taxones habituales no son recuperados como grupos monofiléticos bien definidos, apareciendo interconexiones muy frecuentes. Las repercusiones taxonómicas son distintas en cada clado, como se discutirá a continuación.

A. caliginosa está formada por dos clados principales, uno de ellos más cercano filogenéticamente a *A. tuberculata* que al otro clado de *A. caliginosa*. La separación del clado *A. caliginosa/A. tuberculata* del resto de especies es relativamente antigua (entre 56 y 24 millones de años), por lo que al menos la distinción de estas dos especies de las del resto del complejo está bastante clara. La existencia de dos linajes en *A. caliginosa*, uno sólo con formas asignables a *A. caliginosa* y otro en el que se mezclan ejemplares de *A. caliginosa* y *A. tuberculata* podría deberse a la existencia de una fuerte estructura genética o de linajes crípticos. En cualquier caso, la división *A. caliginosa/A. tuberculata* debe ser revisada ya que la característica más utilizada para distinguir la forma

tuberculata de *A. caliginosa* es una supuesta falta de tumescencias alrededor de las setas ab en el segmento 33. Sin embargo, *A. tuberculata* queda en el mismo clúster que un grupo de *A. caliginosa* y es independiente de otro grupo de *A. caliginosa*, esto indica que este carácter sólo permite diferenciar los ejemplares muy maduros. Además, las tumescencias no siempre son fáciles de observar, y como indicó Gates (1972) no es sorprendente encontrar esta característica en algunos individuos de *A. nocturna*, *A. caliginosa* o incluso *A. trapezoides*, mientras que por el contrario pueden no estar desarrolladas en algunos ejemplares de *A. tuberculata*.

A. longa aparece como un taxón polifilético, con uno de sus clados relacionado con *A. giardi* y el otro con *A. nocturna*. En algunos de los análisis, incluso uno de los linajes de *A. longa* está más próximo al linaje I de *A. trapezoides* que a su otro linaje. La relación entre *A. longa* y *A. giardi* ha sido percibida históricamente por varios taxónomos. *A. giardi* es sinónimo de *A. terrestris* que frecuentemente se subdividía en dos subspecies: *A. terrestris typica* (sinónima de *A. giardi*) y *A. terrestris longa* (sinónima de *A. longa*). Además, son varios los autores que apoyan la similitud taxonómica entre *A. giardi*, *A. longa* y *A. nocturna* (Gates, 1972; Blakemore, 2006). Las implicaciones morfológicas del conjunto *A. giardi/A. longa/A. nocturna* no se pueden resolver en este trabajo posiblemente por el escaso número de muestras recolectadas y la distribución geográfica de las mismas, pero en cualquier caso, esta división debe ser revisada con más profundidad realizando un estudio que incluya muchas más poblaciones procedentes de toda la zona de distribución de las especies afectadas.

El caso de *A. trapezoides* es el más llamativo de todos. Si consideramos que tanto el linaje I como el II deben incluirse en la especie *A. trapezoides*, entonces debemos considerar como *A. trapezoides* al resto de taxones que provienen del antecesor común de ambos linajes, lo que englobaría *A. giardi*, *A. longa*, *A. nocturna* y las tres especies de *Nicodrilus*. La diversificación de este ancestro común a ambos linajes es bastante antigua (hace 42-18 millones de años teniendo en cuenta la datación absoluta; en el punto 0,85 si tenemos en cuenta la relativa). Esta datación marca también la edad de aparición del ancestro común de las formas partenogénicas. Pocos grupos animales tales como ácaros oribátidos (Heethoff et al., 2007), rotíferos bdeloideos (Mark Welch et al., 2004), y probablemente ostrácodos darwinúlidos (Schön y Martens, 2003) tienen reproducción partenogénica

como modo de reproducción antiguamente adquirido (por ejemplo, 110 millones de años en el caso de los oribátidos). En la mayor parte de los grupos animales, la transición de sexo a partenogénesis es un fenómeno reciente, En *A. trapezoides* los ancestros comunes de los que derivan las formas partenogenéticas no son tan antiguos como en estos grupos, aunque se trata igualmente de decenas de millones de años.

La diversificación entre los dos linajes de *A. trapezoides* es incluso más antigua que la diversificación del clado *A. caliginosa/A. tuberculata*. Por lo tanto, ambos linajes de *A. trapezoides* podrían ser considerados como entidades evolutivas distintas, ya que su diversificación es muy antigua, y continuando con el razonamiento habría que asignarles nombres distintos. Al parecer el holotipo de *A. trapezoides* provenía de Montpellier pero desgraciadamente parece haberse perdido en un incendio (Gates, 1972). Lo ideal sería realizar campañas de muestreo en esta zona de Montpellier para capturar individuos que permitiesen realizar una neotipificación. Sin embargo, en este estudio no se han estudiado individuos de dicha zona, simplemente porque cuando afloraron estos resultados ya se había finalizado el programa de muestreo previsto, por lo que no se puede afirmar con seguridad a qué linaje pertenecería. Presumiblemente debería pertenecer al linaje I, por lo que este linaje seguiría conservando el nombre de *A. trapezoides*. Una propuesta inicial como nombre para el linaje II podría ser la de *A. monticola* siguiendo el criterio de prioridad de página (ya que la primera forma de *Nicodrilus* descrita por Onteniente y Babío es *N. monticola*). El nombre *A. monticola* es provisional porque algunos autores (Rota en Fauna Europea) no aceptan el género *Cataladrilus* de Qiu y Bouche (1998) y lo pasan a *Aporrectodea*, por lo que *Cataladrilus monticola* pasaría según esta autora a *A. monticola*, creándose un problema nomenclatorial que hay que resolver en el futuro.

Por otra parte, podría ser que los individuos encontrados en Montpellier se trataran de individuos del clon 1 que está ampliamente distribuido. Por ello, no creemos oportuno asignar en exclusiva el nombre de *A. trapezoides* a ninguno de los dos linajes y nombrar al otro por lo menos de momento. Mientras que no dispongamos de material de la zona y se realice el análisis molecular del mismo para determinar a qué linaje pertenece, seguiremos nombrando ambos linajes como linaje I y II de *A. trapezoides*, considerando siempre que se trata de entidades evolutivas muy diferenciadas. Por otra parte, el linaje II

de *A. trapezoides* presenta numerosas politomías, y antes de tomar ninguna decisión definitiva sería necesario aumentar el número de muestras y definir con más precisión el límite entre los dos linajes.

El linaje I de *A. trapezoides* aparece como un grupo monofilético, del que no se puede decir en este momento con qué especie está más estrechamente relacionado. Esto probablemente se deba a un muestreo incompleto ya que la diversidad genética dentro del clado es algo menor pero similar a la distancia con el resto de especies sexuales con las que se agrupa (*A. longa*, *A. giardi*, *A. nocturna*), por tanto sería conveniente realizar los análisis con más muestras y reevaluar los resultados. Por el contrario, el linaje II de *A. trapezoides* aparece como polifilético, mezclado con las tres especies que hasta ahora hemos seguido denominando como *Nicodrilus* por ser éste el género con el que se describieron. Sin embargo estas especies están filogenéticamente relacionadas con el resto de especies de *Aporrectodea* tratadas en este estudio, por lo que no cabe duda de la asignación de estos taxones al género *Aporrectodea*, como pasaremos a denominarlas a partir de ahora. Las muestras de *A. monticola* y *A. tetramammalis* aparecen mezcladas en un clado diferenciado bien soportado, si bien se subagrupan por localidades, lo que no apoya su diferenciación como especies distintas. Por otra parte, *A. carochensis* queda interdigitada con un clon del linaje II de *A. trapezoides*, que resultó ser de una zona geográfica cercana a la zona en la que se capturaron las muestras de *A. carochensis*. La diferencia más importante entre estas tres especies es la posición y número de papilas anteriores, y la principal diferencia de las tres con *A. trapezoides* es la condición sexual. A priori, parece que su estatus como especies no estaría justificado ni morfológicamente ni molecularmente (lo que quedaría apoyado no solamente por su posición en los árboles filogenéticos, sino también por la pequeña distancia genética entre ellas y con el linaje II de *A. trapezoides*), por lo que se interpretarán como formas sexuales de *A. trapezoides*. Aunque en este estudio sólo se disponen de muestras de una población o varias poblaciones muy cercanas de cada una de estas tres presuntas especies, esta interpretación recibirá también un fuerte apoyo por los resultados del siguiente capítulo de esta tesis (capítulo 5).

La diversificación del clado al que pertenece el linaje II de *A. trapezoides* es más reciente que la del clado del linaje I y especies afines (entre 29 y 11 millones de años en datación

absoluta, o en el punto 0,50 en datación relativa). A nivel geológico, la unión del macizo hespérico con el resto de Europa es un fenómeno más antiguo que la fusión del macizo bético-rifeño con la Península Ibérica, lo que cuadra con los datos obtenidos en la datación, a pesar de que en la datación absoluta la amplitud de las barras de error hace solapar ambos períodos. Por otra parte, parece ser que dentro del clado al que pertenece el linaje II de *A. trapezoides* (con numerosas politomías) existen en la actualidad muchos procesos de diversificación, lo que indica una fuerte radiación adaptativa. Sin embargo, el linaje I parece mejor definido a priori, y las relaciones entre sexo y partenogénesis más directas, lo que junto con su anterior expansión geológica podría ser un indicativo de que es más antiguo que el clado de formas mediterráneas. El estudio en profundidad de las poblaciones norteafricanas (de hecho, ya contamos con formas sexuales y asexuales del complejo de varios puntos de Argelia) y del sur de Europa nos permitirán realizar dataciones más precisas y conocer mejor el origen y evolución de estos dos linajes.

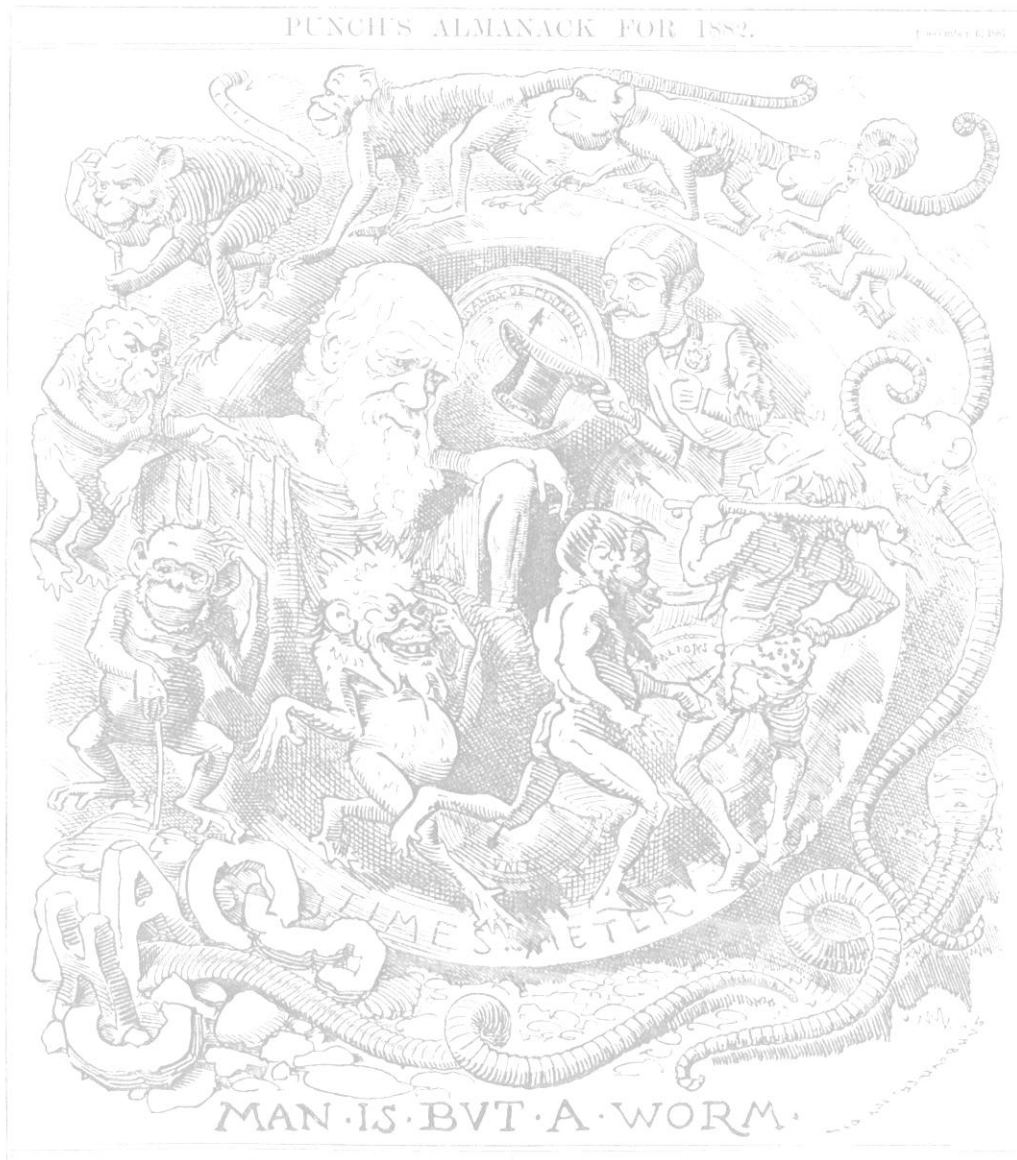
Un carácter morfológico tradicionalmente muy importante para la diferenciación taxonómica de las especies de este complejo es la forma y posición de los tubérculos pubertarios. Tal como se explicó en el capítulo introductorio de esta tesis, existen dos posiciones (segmentos 31-33 y 32-34) y dos formas posibles (tubérculos lineales o en forma de gafa). Así, existen ‘especies’ caracterizadas, entre otras cosas, por poseer los tubérculos lineales en posición 31-33 (ambos linajes de *A. trapezoides*, *A. carochensis*, *A. monticola* y *A. tetramammalis*), los tubérculos en gafa en posición 31-33 (*A. caliginosa*, *A. nocturna*), los tubérculos lineales en los segmentos 32-34 (*A. longa*) o los tubérculos en forma de gafa en los segmentos 32-34 (*A. giardi*).

A la vista de los resultados de este estudio, la forma y posición de los tubérculos pubertarios resulta ser un carácter inadecuado para la identificación de especies; por ejemplo, los linajes I y II de *A. trapezoides* comparten este carácter y están más alejados filogenéticamente entre ellos que taxones que difieren en la forma y posición de sus tubérculos. Además, históricamente este carácter ha llevado a engaño ya que las formas con la misma posición se han considerado incluso como subspecies (por ejemplo, *A. caliginosa*, *A. trapezoides*, *A. nocturna*), mientras que a nivel molecular pueden no estar estrechamente relacionadas. Además, intuitivamente podría esperarse este resultado ya que existen numerosas formas intermedias, tanto en forma como en posición, y a veces

es difícil saber a qué taxón asignar un individuo basándonos en este carácter. Por otra parte, las formas con tubérculos en 32-34 quedan dentro del mismo clado (*A. longa*, *A. giardi* y *A. nocturna*); tanto las formas de clados vecinos (linaje I de *A. trapezoides*) como del resto de clados (linaje II de *A. trapezoides*, *A. caliginosa* y *A. tuberculata*) poseen tubérculos en 31-33, lo que podría indicar que esta podría ser la posición de los tubérculos en el ancestro común de este grupo de especies, y que se podría haber producido una mutación en el ancestro común de *A. longa*, *A. giardi* y *A. nocturna* que conllevara el cambio en la posición de los tubérculos un segmento hacia atrás en el cuerpo del animal. Como hipótesis alternativa, se plantea la convergencia morfológica entre ambos linajes de *A. trapezoides*.

Ambos métodos para delimitar especies (regla del 4X y GMYC) han arrojado resultados diametralmente opuestos. Mientras que casi ningún clado obedecía la primera de las reglas, con el segundo método se reconocerían 19 especies diferentes, lo que sin duda es un número elevado se mire como se mire. Si bien el método GMYC parece funcionar bien en otros grupos animales, parece no ser así en lombrices de tierra, donde la escasa movilidad de los individuos desemboca con el paso del tiempo en aislamiento reproductivo y distancias genéticas grandísimas. Debido a esto, es probable que en este grupo animal los fenómenos de especiación funcionan 'a otro ritmo'; dos especies de hormogástridos que divergen casi un 20% pueden considerarse de la misma especie morfológica (Novo, 2010), mientras que esta distancia genética en otros grupos significaría hablar incluso de órdenes o familias distintas. Las poblaciones de lombrices de tierra tienden a permanecer en el mismo lugar durante largos períodos de tiempo debido a sus aptitudes fisiológicas, sus restricciones ecológicas y su baja capacidad de dispersión, por lo que acaban siguiendo el destino de su hábitat y área geográfica (Omodeo y Rota, 2008). Además, los eventos de especiación alopátrica deben requerir tiempos del orden de millones de años (es decir, ocurren en la misma escala de tiempo que los eventos geológicos) debido a que los cambios genéticos con repercusión a nivel evolutivo ocurren muy lentamente en las lombrices (Cobolli et al., 1992; Omodeo, 2000). La regla del 4X parece dar resultados más acordes con los conocimientos taxonómicos y biológicos en general de las lombrices de tierra. La diversidad nucleotídica dentro de cada grupo resultó ser muy alta, fruto de los procesos de aislamiento que desencadenan altas divergencias genéticas, por lo que es difícil que dos clados recíprocamente monofiléticos se ajusten a la regla.

Por el momento, los problemas taxonómicos dentro de este complejo de especies se multiplican también a nivel molecular. Parece ser que este caos que empezó hace más de un siglo va a tener que seguir sin resolverse algún tiempo más.



Capítulo 5

Estudio a mesoescala de poblaciones sexuales y partenogénicas de *Aporrectodea trapezoides*.

Durante el último año de realización de esta tesis, el grupo de Zoología del Suelo en colaboración con la Universidad de Extremadura llevó a cabo una investigación sobre biodiversidad de lombrices de tierra a mesoescala. Durante el análisis de las lombrices obtenidas en los muestreos se encontraron muchos ejemplares típicos asignables a *A. trapezoides* muy interesantes por su condición sexual o variantes morfológicas. Algunos presentaron espermatecas llenas (indicativo de formas sexuales) y otros espermatecas vacías (indicativo de formas partenogenéticas). También se observó cierta variación morfológica en los ejemplares encontrados, en concreto respecto al número y posición de las papilas y longitud del clitelo. Se realizó un estudio preliminar para estudiar las relaciones entre variación morfológica (posición de papilas y clitelo) y variación molecular en *A. trapezoides*, ver qué relaciones existen entre las formas sexuales y las partenogenéticas, así como su variación genética, y obtener información sobre el origen de la partenogénesis a escala mesogeográfica. Para ello se estudiaron los genes mitocondriales COII y 16S rRNA y los genes nucleares H3 y 28S rRNA. Se encontró una alta variabilidad genética en ambos genes mitocondriales, mientras que las secuencias de los genes nucleares resultaron ser muy poco variables o incluso iguales. Tanto los individuos sexuales y partenogenéticos de cada localidad como los individuos con distinto número y posición de las papilas compartían los mismos haplotipos en los genes mitocondriales. Los individuos de clitelo largo mostraron igual haplotipo que individuos de clitelo corto. Todos los análisis de genética de poblaciones (red de haplotipos, AMOVAs, test de Mantel) apuntaron hacia una estructuración genética muy marcada y a que las diferencias genéticas entre las localidades se deben a un patrón de aislamiento por distancia. Respecto al estatus del linaje II de *A. trapezoides*, se discute que está compuesto por formas sexuales y partenogenéticas, en las que el número y posición de las papilas e incluso la longitud del clitelo es variable. Se descartó el origen híbrido de las formas partenogenéticas y se hipotetizó sobre un origen espontáneo o contagioso. A raíz de los resultados obtenidos en este capítulo, puede asumirse también un origen múltiple y reciente de la partenogénesis.

Abstract

During the last year, the research group of Soil Zoology collaborated with the Extremadura University in a research about earthworm biodiversity performed in a mesoscale level. During the sampling, several interesting earthworms identified as *A. trapezoides* were found that showed a different sexual condition and morphological variants. While some had full spermathecae (pointing towards a sexual condition), the rest of them had empty ones (pointing towards parthenogenesis). There was also some morphological variation regarding the number and position of papillae and length of the clitellum. A preliminary study was performed to study the relationships between morphological and molecular variation in *A. trapezoides*, to check the phylogenetic relationships between the sexual and parthenogenetic forms, and to shed light on the origin of parthenogenesis at this mesogeographic level. Mitochondrial genes COII and 16S rRNA and nuclear genes H3 and 28S rRNA were studied. The genetic divergence in both mitochondrial genes was high, but the nuclear genes resulted to be only slightly variable or showing the same sequences. Sexual and parthenogenetic earthworms showed the same haplotype, as well as individuals with different number and position of papillae and individuals with long and short clitellum. Regarding population genetics, all the analyses (haplotype networks, AMOVAs, Mantel's test) supported a strong genetic structure and a pattern of isolation by distance. Regarding the status of the lineage II of *A. trapezoides*, the results supported that it is formed by both sexual and parthenogenetic forms, in which the number and position of the papillae and even the length of the clitellum is variable. A hybrid origin of parthenogenesis was ruled out, while both an spontaneous and contagious origin were considered.

Durante el último año de realización de esta tesis, el grupo de Zoología del Suelo en colaboración con la Universidad de Extremadura llevó a cabo una investigación sobre biodiversidad de lombrices de tierra a mesoescala. Esta investigación se engloba dentro de un proyecto a nivel europeo denominado BIO-BIO (Biodiversity-Bioindication to Evaluate Soil Health). La meta principal de este proyecto es la de generar un análisis de uso del suelo y físico-químico muy robusto y relacionarlo con un número significativo de bioindicadores. El proyecto engloba el estudio de tres tipos de localidades sometidas a manejos agrícolas distintos: suelos de agricultura ecológica, suelos que reciben fertilizantes de origen animal y mineral, y suelos tratados con lodos residuales. Se contempla el estudio químico de diferentes capas del suelo (0-5 cm, 5-15 cm y 15-30 cm). También se realizan análisis físicos y estudios de biodiversidad y bioindicación en un grupo amplio de organismos.

El Grupo de Investigación Forestal (GIF) de la Universidad de Extremadura (en particular, los investigadores Gerardo Moreno Marcos y Enrique Juárez Alcalde) participa en este proyecto europeo, siendo las lombrices de tierra uno de los grupos animales sobre los que se plantea el estudio de biodiversidad y valor bioindicador, comparando parcelas con y sin cultivos ecológicos (en concreto, 10 dehesas y 20 olivares). En este punto, dichos investigadores contactan con el grupo de Zoología del Suelo para que lleve a cabo la identificación taxonómica de los ejemplares recolectados. Fruto de este proyecto, el grupo de Zoología del Suelo ha podido disponer de varios miles de ejemplares de lombrices de una zona geográficamente reducida (campos de Plasencia).

Durante esta fase de la investigación, al analizar las lombrices obtenidas en los muestreos se encuentran muchos ejemplares típicos asignables a *A. trapezoides* (clitelo 26/27-34, tubérculos pubertarios lineares en 31-33 y papilas en 9-10-11) pero se capturaron también algunos ejemplares morfológicamente asignables a *A. trapezoides* y especies relacionadas (véase discusión sobre este punto) muy interesantes por su condición sexual o variantes morfológicas. En primer lugar, algunos presentan espermatecas llenas y otros espermatecas vacías. En segundo lugar, existe cierta variación morfológica en los

ejemplares encontrados, en concreto respecto al número y posición de las papilas (posibles posiciones: 9-10-11; 10-11-12; 10-11; 9- 10-11-12) y longitud del clitelo (longitud típica del segmento 26/27 al 34, o bien formas con clitelo largo del 24 al 34). Por último algunos ejemplares presentaban espermátóforos en la cara ventral de los segmentos 26 ó 27 lo que es un indicio evidente de cópula y quizás de reproducción sexual.

Como se comentó anteriormente en la introducción general de esta tesis (capítulo 1), asumimos que en las lombrices sexuales con tubérculos y clitelo bien desarrollados las espermatecas siempre están llenas con independencia del momento del muestreo, tal como nos dicta nuestra experiencia a nivel de grupo de investigación (al que pertenecen taxónomos veteranos que llevan decenas de años disecando lombrices), la literatura general sobre biología en lombrices de tierra (por ejemplo, Lee, 1985, Edwards y Bohlen, 1996) y los estudios estacionales en algunas especies (*Hormogaster elisae*; Garvín et al., 2003; Novo, 2010). Esto parece lógico ya que los tubérculos son necesarios en el momento de la cópula, y el clitelo está destinado a la producción de los capullos y es un órgano voluminoso que aumenta la sección corporal y dificulta la excavación y que es energéticamente costoso (células secretoras que representan un output energético importante), por lo que estos órganos no deberían desarrollarse salvo para copular y producir capullos, lo que implica que simultáneamente las espermatecas deben estar llenas. Las espermatecas vacías, en buena lógica funcional, sólo deberían aparecer en individuos que hayan consumido el esperma, o que no hayan copulado por algún problema orgánico o por falta de pareja, lo que dada la densidad local de la mayoría de las poblaciones de lombrices de tierra parece algo excepcional.

Por otra parte, tenemos evidencias de que la presencia de espermatecas vacías en individuos maduros con el clitelo y las papilas totalmente desarrollados es un carácter indicativo de partenogénesis en lombrices debido, además de a las fuentes anteriores, a la evidencia arrojada por los experimentos desarrollados en el capítulo 6 de esta tesis.

Una evidencia adicional es la falta de iridiscencia en los embudos masculinos en los ejemplares que tienen las espermatecas vacías. Esta falta de iridiscencia sugiere que en estos ejemplares la espermiogénesis no se completa de forma adecuada ya que no se

producen espermatozoides que sean capaces de abandonar las vesículas seminales y alcanzar los embudos masculinos, donde se acumulan previamente a la cópula. Es esta acumulación la que produce la iridiscencia característica en los embudos de las lombrices de tierra con fecundación cruzada. En preparaciones teñidas “in toto” hemos podido comprobar que la falta de iridiscencia va ligada a la ausencia de espermatozoides fijados sobre los embudos. No hay que descartar sin embargo la posibilidad de que la falta de iridiscencia se deba a que los ejemplares hayan copulado recientemente, consumido su reserva de esperma y que todavía no les haya dado tiempo a reponerla.

La presencia simultánea de estas tres características, espermatecas vacías, embudos masculinos sin iridiscencia, y presencia de tubérculos y clitelo desarrollados, es una fuerte evidencia a favor de la partenogénesis, y es lo que nos ha llevado a catalogar como partenogénéticos a los ejemplares que las presenten. Cualquier otra posible explicación, ejemplares inmaduros que no hayan copulado, ejemplares anormales, etc., parece poco probable desde el punto de vista funcional; la reproducción en lombrices es un fenómeno complejo resultado de la integración de una serie de procesos y órganos funcionando sincronizadamente, y cuando este proceso se rompe simultáneamente en varios pasos todo apunta hacia la partenogénesis como única explicación plausible.

De todas las localidades muestreadas a lo largo de esta tesis, éstas son las únicas en las que coexisten individuos sexuales y partenogénéticos, y de las que disponemos de formas con variación morfológica a nivel intrapoblacional, por lo que es un área perfecta para el estudio de la biología evolutiva de esta especie, para estudios sobre procesos evolutivos generales como el origen de la partenogénesis y para estudios taxonómicos que incluyan morfología y datos moleculares. Por tanto hemos decidido realizar un estudio preliminar en esta zona cuyos objetivos son: 1) estudiar las relaciones entre variación morfológica (posición de papilas y clitelo) y variación molecular en *A. trapezoides* en definitiva variación genotípica y fenotípica 2) ver qué relaciones existen entre las formas sexuales y las partenogénéticas, así como su variación genética, y 3) obtener información sobre el origen de la partenogénesis a escala mesogeográfica.

I. Área de muestreo.

La parte del proyecto europeo realizada por el GIF contempla el estudio de 22 localidades (10 dehesas y 12 olivares) cerca de Plasencia (provincia de Cáceres, comunidad autónoma de Extremadura, España). Para este estudio, se seleccionaron individuos maduros sexuales y partenogénéticos (considerando como tales a los que presentan espermatecas vacías y embudos no iridiscentes) (Tabla 1) procedentes de 8 localidades (5 dehesas y 3 olivares) situadas en un área rectangular de aproximadamente 20x30 km. Dentro de cada localidad, se realizaron diversos muestreos en puntos distintos (Fig. 1 y 2).

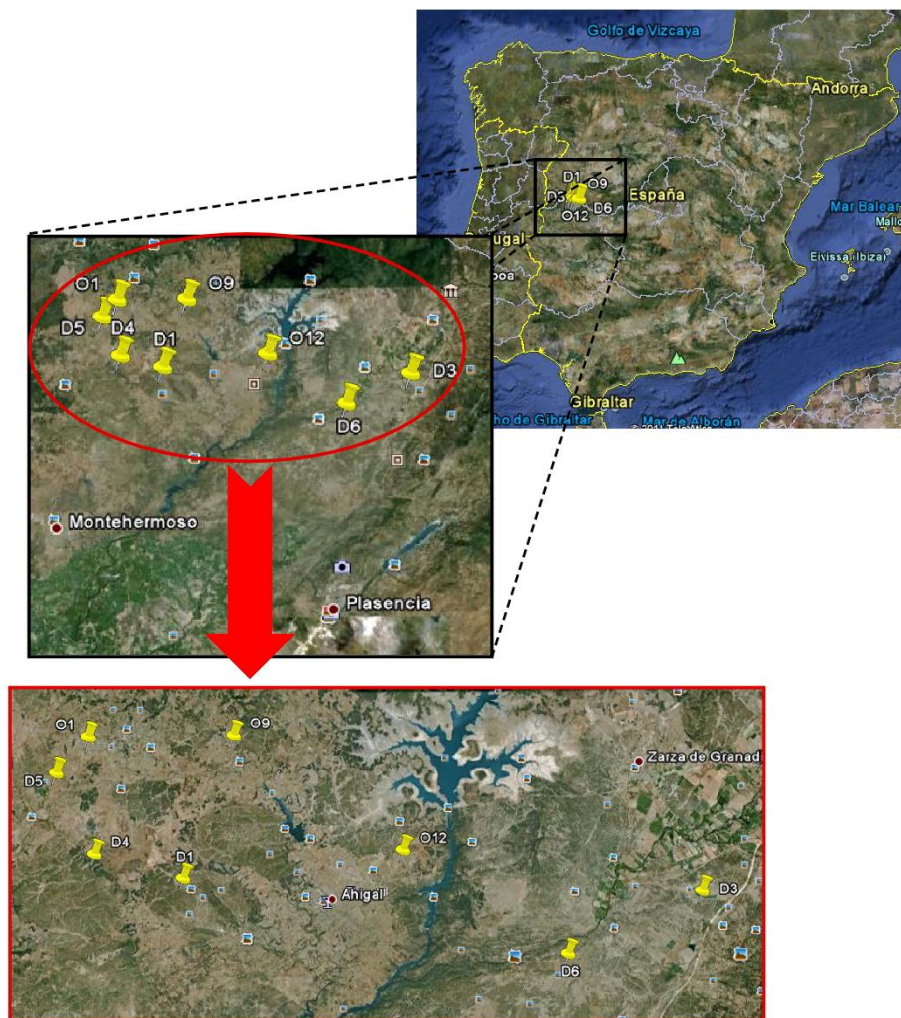


Fig. 1. Localización geográfica de las localidades seleccionadas.

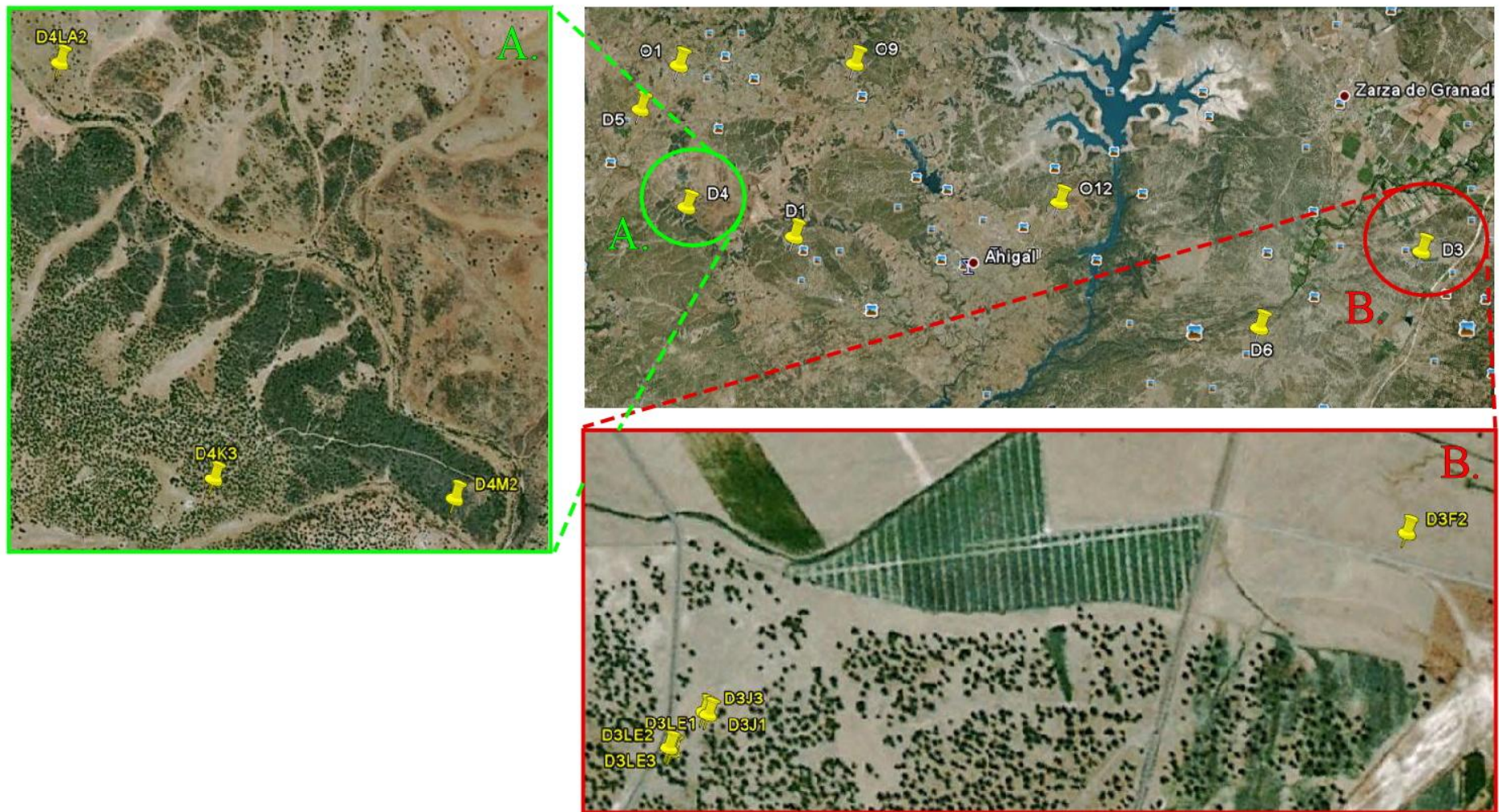


Fig. 2. Detalle de la situación geográfica de algunas de las localidades estudiadas.

Localidad	Punto muestreo	GPS	Código lombriz	Haplotipo COII/16S rRNA	Papilas	Clitelo	Tubérculos	Espermatecas	Espermatóforos
D1	D1M1 AITC	40° 11' 32.43" N 06° 15' 37.34" O	D1EL1	1/1	10-11-12	26-34	31-33 banda	LL	NO
			D1EV1	2/2	10-11-12	26-34	31-33 banda	V	NO
			D1EV2	2/2	10-11-12	26-34	31-33 banda	V	NO
D3	D3J1 AITC	40° 11' 20.01" N 06° 01' 20.30" O	D3EL1	3/3	9-10-11	26/27-34	31-33 banda	LL	NO
			D3EL2	4/3	9-10-11	26/27-34	31-33 banda	LL	SI
			D3EL3	5/3	9-10-11	26/27-34	31-33 banda	LL	NO
			D3Ev1	5/3	9-10-11	26/27-34	31-33 banda	V	NO
	D3LE1 AITC	40° 11' 18.25" N 06° 01' 23.02" O	D3EL4	6/4	9-10-11	26/27-34	31-33 banda	LL	NO
			D3EL13	5/7	9-10-11	26/27-34	31-33 banda	LL	NO
	D3LE2SOIL	40° 11' 18.15" N 06° 01' 22.89" O	D3EL14	5/3	10-11-12	27-34	31-33 banda	LL	NO
	D3LE3AITC	40° 11' 18.06" N 06° 01' 22.76" O	D3EL7	5/3	10-11-12	26/27-34	31-33 banda	LL	NO
			D3EL8	5/3	10-11-12	26/27-34	31-33 banda	LL	NO
			D3EL9	4/3	10-11-12	26/27-34	31-33 banda	LL	NO
			D3EL10	7/5	10-11-12	26/27-34	31-33 banda	LL	NO
			D3EL11	5/3	10-11-12	26/27-34	31-33 banda	LL	NO
			D3EV3	8/3	10-11-12	26/27-34	31-33 banda	V	NO
			D3EL15	5/3	10-11-12	26-34	31-33 banda	LL	NO
	D3LE3 SOIL		D3EL16	6/4	9-10-11-12	26-34	31-33 banda	LL	NO
			D3EL17	5/7	10-11-12	26-34	31-33 banda	LL	NO
			D3EL16	6/5	9-10-11-12	26-34	31-33 banda	LL	NO

Tabla 1. Datos sobre las localidades de muestreo y los individuos empleados en los análisis moleculares spp: poco patentes. LL: llenas. V: vacías. ni: no iridiscentes

Localidad	Punto muestreo	GPS	Código lombriz	Haplotipo COII/16S rRNA	Papilas	Clitelo	Tubérculos	Espermatecas	Espermatóforos		
D3	D3J3 AITC	40° 11' 20.19" N 06° 01' 20.61" O	D3EV4	9/3	pp	26-34	31-33 banda	V	NO		
			D3EV5	5/3	pp	26-34	31-33 banda	V	NO		
			D3EL18	5/3	pp	26-34	31-33 banda	LL	NO		
			D3EL19	5/3	10-11-12	26-34	31-33 banda	LL	NO		
			D3F2 AITC	40° 11' 29.65" N 06° 00' 31.47" O	D3EL20	6/11	9-10-11-12	26-34	31-33 banda	LL	NO
D4	D4K3 AITC	40° 11' 50.66" N 06° 17' 41.68" O	D4EV1	10/6	9-10-11	26/27-34	31-33 banda	V	NO		
			D4EV2	11/9	9-10-11	26/27-34	31-33 banda	V	NO		
			D4EL1	10/6	10-11-12	26/27-34	31-33 banda	LL	NO		
			D4EL2	10/6	10-11-12	26/27-34	31-33 banda	LL	NO		
			D4EV3	9/9	10-11-12	26/27-34	31-33 banda	V	NO		
	D4M2 AITC	40° 11' 48.47" N 06° 17' 06.91" O	D4EL3	12/6	9-10-11	26/27-34	31-33 banda	LL	NO		
D5	D5P1 AITC	40° 13' 44.96" N 06° 18' 39.39" O	D4LA2 AITC	40° 12' 34.67" N 06° 18' 03.95" O	D4EL4	13/8	9-10-11	26/27-34	31-33 banda	LL	NO
			D5EV1	14/10	10-11-12	26/27-34	31-33 banda	V	SI		
			D5EV2	14/10	10-11-12	26/27-34	31-33 banda	V	NO		
			D5EV3	14/10	pp	26/27-34	31-33 banda	V	SI		
			D5EV4	14/10	10-11-12	26/27-34	31-33 banda	V	NO		
	D5P1 SOIL		D5EV6	14/10	9-10-11	26/27-34	31-33 banda	V	NO		
D5EV7			15/7	9-10-11	26/27-34	31-33 banda	V	NO			

Tabla 1 (continuación). Datos sobre las localidades de muestreo y los individuos empleados en los análisis moleculares. pp: poco patentes. LL: llenas. V: vacías. i: iridiscentes. ni: no iridiscentes.

Localidad	Punto muestreo	GPS	Código lombriz	Haplotipo COII/16S rRNA	Papilas	Clitelo	Tubérculos	Espermatecas	Espermatóforos
D6	D6F1 AITC	40° 10' 02.59" N 06° 04' 50.70" O	D6EL1	16/11	9-10-11	26/27-34	31-33 banda	LL	NO
			D6EL2	16/11	9-10-11	26/27-34	31-33 banda	LL	NO
O1	O1H1 AITC	40° 14' 29.41" N 06° 17' 47.31" O	O1EV1	17/12	10-11-12	26/27-34	31-33 banda	V	NO
			O1EV2	17/12	10-11-12	26/27-34	31-33 banda	V	NO
O9	O9LB2SOIL	40° 14' 31.73" N 06° 13' 52.63" O	O9EV1	14/10	10-11-12	24-34	31-33 banda	V	NO
			O9EV2	14/10	9-10-11	24-34	31-33 banda	V	NO
			O9EV3	14/10	10-11	24-34	30-33 banda	V	NO
			O9EV4	14/10	10-11	24-34	30-33 banda	V	NO
			O9EL1	15/7	10-11-12	26-34	31-33 banda	LL	NO
O12	O12E2 SOIL	40° 12' 10.59" N 06° 09' 18.10" O	O12EL2	18/14	10-11-12	26-34	31-33 banda	LL	NO
			O12EL3	19/13	10-11-12	26-34	31-33 banda	LL	NO
			O12EL4	20/13	10-11-12	26-34	31-33 banda	LL	NO
			O12EL5	21/13	10-11-12	26-34	31-33 banda	LL	NO

Tabla 1 (continuación). Datos sobre las localidades de muestreo y los individuos empleados en los análisis moleculares. pp: poco patentes. LL: llenas. V: vacías. i: iridiscentes. ni: no iridiscentes.

II. Método de muestreo

Dentro de cada localidad de muestreo, se seleccionaron diferentes puntos, identificados por un código, tal como se observa en la figura 1 y tabla 1. Dentro de cada punto, se realizaron 3 muestreos en un cuadrado de 30x30 cm y 20 cm de profundidad, con 10 m de separación entre ellas y 20 m de separación respecto al borde de la localidad. En primer lugar, los cuadrados fueron despojados de la cubierta herbácea. A continuación, se añadieron 5 l de alil isocianato (AITC), agente expelente fabricado a partir de aceites esenciales de mostaza. En muestreos de lombrices de tierra, su efecto es similar al del tradicional formol: las lombrices salen a la superficie a medida que el agente penetra en el suelo. Se preparó diluyendo el AITC en isopropanol (5 g/l de solución), y volviendo a diluir en agua hasta alcanzar 0.1 g/l. Las lombrices que aparecieron en superficie durante los siguientes 15 min fueron recogidas y recolectadas en recipientes con agua. Trascorrido ese tiempo, se procedió a la extracción del suelo con la ayuda de una pala y a la recolección manual de las lombrices contenidas en él, que se metieron en un recipiente con agua distinto con objeto de comparar ambos métodos de muestreo. A continuación, se procedió a la fijación de las lombrices en etanol 80° y a su conservación en etanol de 96° hasta identificación. Dada la naturaleza del proyecto, se identificaron todas las lombrices recolectadas en cada localidad (Anexos 5 a 8; información cedida por Darío J. Díaz Cosín, Dolores Trigo, Juan B. Jesús y Mónica Gutiérrez).

Se seleccionaron para este estudio inicial 48 ejemplares identificados como *A. trapezoides* y formas afines (con variación en número y posición de papilas y longitud de clitelo que serían compatibles en algunos casos con la asignación a *A. monticola*). Se encontraron individuos maduros con espermatecas llenas y vacías (tabla 1). La presencia/ausencia de esperma en espermatecas y embudos se chequeó en 3 individuos de cada tipo siguiendo el siguiente protocolo. Primero, se extrajeron las espermatecas y embudos masculinos por disección en los individuos conservados en etanol 96°. Tras un lavado prolongado en agua destilada (2 ó 3 días), se realizó un lavado en alcohol de 70° (un día). A continuación, se procedió a la tinción en carmín borácico de Grenacher diluido en alcohol de 70° hasta que las espermatecas o embudos tomaron un color rojo vivo. Tras un lavado rápido en alcohol de 70°, se diferenciaron en alcohol clorhídrico para eliminar el exceso de colorante y se llevó a cabo la deshidratación de las muestras

en serie de alcoholes 70º, 96º y absoluto (dos baños de 5-10 minutos cada alcohol). A continuación, se eliminó el etanol mediante baños de tolueno (tres baños de 5 - 10- 15 minutos) y se procedió al montaje de espermatecas y embudos en portas empleando Bálsamo de Canadá. Las muestras se observaron con un microscopio lumínico, detectando presencia de espermatozoides solamente en las espermatecas que habían sido clasificadas como aparentemente llenas y en los embudos iridiscentes.

III. Extracción y secuenciación de ADN

La extracción del tejido y del ADN se realizó de la manera descrita en el capítulo 2.

Se amplificaron los genes mitocondriales citocromo oxidasa II (COII) y 16S tRNA y los nucleares 28S rRNA e histona H3. Las condiciones de amplificación mediante PCR para los genes COII, 28S rRNA e histona H3 son las indicadas en el capítulo 2.

Las condiciones para la amplificación del gen 16S tRNA fueron las siguientes: una primera fase de desnaturalización inicial a 95°C (30 s) seguida de 35 ciclos compuestos de fase de desnaturalización a 95°C (30 s), fase de extensión a 60°C (1 min) y fase de elongación a 72°C (1 min), y una fase final de elongación a 72°C (5 min). La mezcla de PCR contenía tampón libre de MgCl₂ 1X, Mg Cl₂ 3mM, dNTPs 0.8 mM, cebadores forward y reverse µM cada uno, y enzima polimerasa 0,04 u/µl, en un volumen final de 50 µl.

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en una dirección en MacroGen Inc. (Corea). Al ser un estudio preliminar, las secuencias no han sido todavía incluidas en GenBank, a la espera de completar este trabajo en los próximos meses.

III. Análisis filogenéticos y genética de poblaciones

Se realizaron estimas filogenéticas mediante inferencia bayesiana, máxima verosimilitud y máxima parsimonia. Se analizaron por una parte los individuos de este capítulo para conocer las relaciones filogenéticas a mesoescala de los individuos sexuales y partenogenéticos, y por otra estos individuos más todos los del complejo *A. caliginosa* previamente analizados para conocer a qué linaje de *A. trapezoides* pertenecían y su posición filogenética respecto al resto de especies.

Se realizó una red de haplotipos con ambos genes mitocondriales (COII, más variable, y 16S tRNA, con menos variabilidad). También se realizaron dos Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA). En el primero, se comparó la variación molecular debida al carácter sexual o partenogenético, por lo que los individuos se agruparon en dos grupos (espermatecas llenas vs espermatecas vacías); en el segundo, los individuos se agruparon por localidades para ver qué porcentaje de variación se debía a su distribución en localidades. Para complementar la información obtenida en estos análisis, se analizó la correlación entre distancias genética y geográfica (comparación de los valores de F_{ST} para el gen COII entre poblaciones y la distancia en línea recta entre puntos de muestreo) con un test de Mantel (1967) implementado en el programa IBD (Isolation By Distance, Jensen et al., 2005). En localidades con varios puntos muestreados, se tomó el punto medio entre ellos como punto de comparación con el resto de las localidades. La significación de la correlación entre las matrices se evaluó mediante comparaciones del estadístico Z, para el que se obtuvieron distribuciones aleatorias con 10.000 permutaciones. El resto de análisis mencionados en este apartado se realizaron conforme a la descripción en los capítulos 2 y 4.

I. Variabilidad genética y morfológica

Se encontró una alta variabilidad genética en ambos genes mitocondriales (21 y 14 haplotipos para los genes COII y 16S rRNA, respectivamente). Sin embargo, las secuencias de los genes nucleares H₃ resultaron ser muy poco variables (solamente variaban un par de bases), y las del gen 28S rRNA exactamente iguales en todos los individuos.

Los individuos sexuales y partenogenéticos de cada localidad compartían los mismos haplotipos en los genes mitocondriales (tabla 1). De igual manera, los individuos con distinto número y posición de las papilas también mostraron el mismo haplotipo. Por último, los individuos de clitelo largo (olivar 9, O₉) mostraron igual haplotipo que individuos de clitelo corto (dehesa 5, D₅).

II. Relaciones filogenéticas

Al igual que en los capítulos 2 y 4, el modelo General de Tiempo Reversible ('General Time Reversible model', GTR) con distribución gamma (G) y sitios invariables (I) fue elegido el mejor modelo de evolución para los genes COII y 28s, y el modelo Hasegawa-Kishino- Yano con distribución gamma (HKY + G) para COI y H₃.

No se encontraron discordancias mayores entre las topologías de los árboles de ML, MP y BI. Las pocas diferencias topológicas observadas se encontraron siempre a nivel terminal y debidas principalmente al número mayor de politomías en el análisis de parsimonia. Sin embargo, los mismos grupos de secuencias a nivel terminal fueron observados en todos los análisis. Todos los árboles realizados con las distintas particiones y con el grupo de datos concatenados (Fig. 2 y 3) produjeron topologías congruentes. Además, el test ILD no encontró incongruencias significativas entre ellos ($P > 0.05$).

La Fig. 3 muestra las relaciones filogenéticas entre los individuos estudiados. La mayoría de clados terminales se distribuyen en dos parcelas. Excepcionalmente, uno de ellos se distribuye en más. Se observan 3 clados principales, con un gran número de politomías. Los individuos sexuales y partenogenéticos aparecen mezclados en los clados, al igual

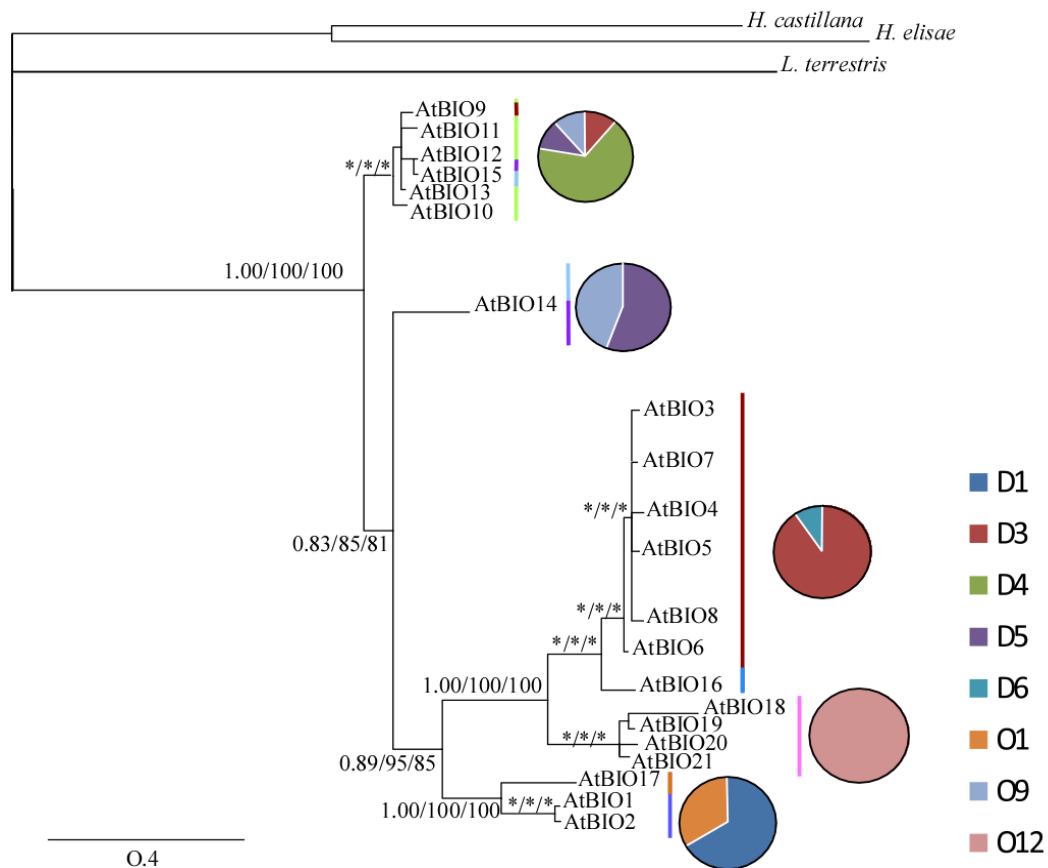


Fig. 3. Árbol filogenético de los individuos recolectados en las localidades estudiadas del proyecto BIOBIO, reconstruido por el método de inferencia bayesiana basado en la secuencia de los genes mitocondriales (COII, 16S rRNA). Los números en los terminales corresponden con el número de haplotipo de COII. Los valores de probabilidad posterior (PP) y bootstrap obtenidos en los análisis de máxima verosimilitud (ML) y parsimonia (P) se muestran en los nodos cuando son superiores a 0,8 (PP/ML/P). Los asteriscos indican soportes estadísticos >0.80/80/80. Los diagramas circulares muestran la distribución de las muestras de cada uno de los clados principales.

que los individuos con caracteres morfológicos distintos. Todos los clados presentaron un soporte estadístico muy alto. Por lo general, los individuos de cada población o de poblaciones geográficamente cercanas (ver tabla 4 más abajo) se agrupan en el mismo

clado. Las lombrices del olivar 9 (O9) aparecen separadas en dos clados distintos. Los individuos de clitelo largo (O9EV1, O9EV2, O9EV3 y O9EV4) comparten haplotipo en ambos genes con algunos de los individuos de la dehesa 5. Otro individuo del mismo olivar (O9EL1) con clitelo corto mostró un haplotipo distinto en ambos genes a los individuos de clitelo largo de la misma parcela.

Las distancias genéticas son sorprendentemente altas para ser un estudio a esta escala (hasta un 12,16%), tal como se observa en la Tabla 2.

En la filogenia de todo el complejo de especies (Fig. 4) se observa que las muestras de las poblaciones extremeñas se agrupan en el clúster formado por el linaje II de *A. trapezoides* y las distintas especies de *Nicodrilus* debido a la posición geográfica de estas localidades. Sin embargo, el número de politomías sigue siendo elevado, tal como se observaba en el capítulo 4.

II. Genética de poblaciones

Las dos redes de haplotipos elaboradas a partir de los genes mitocondriales estudiados (Fig. 5 y 6) muestran relaciones entre los individuos similares a las obtenidas a partir del análisis filogenético: los individuos aparecen principalmente separados por localidades. El número de saltos mutacionales entre los individuos de las distintas localidades y grupos de haplotipos tiende a ser muy elevado, siendo mayor en el gen COII y menor en el gen 16S tRNA, reflejo de las altas distancias genéticas encontradas.

COII/16S rRNA	hap1	hap2	hap3	hap4	hap5	hap6	hap7	hap8	hap9	hap10	hap11	hap12	hap13	hap14	hap15	hap16	hap17	hap18	hap19	hap20
hap1		3,99	5,35	4,98	5,35	3,99	3,86	3,86	3,61	3,86	4,23	1,74	4,36	4,23	*	*	*	*	*	*
hap2	0,18		4,86	4,73	4,61	0,75	1,25	1,37	1,35	2,24	3,99	4,98	4,23	4,36	*	*	*	*	*	*
hap3	4,36	9,62		0,37	0,25	4,73	4,73	4,61	4,48	4,86	1,62	5,73	1,87	1,87	*	*	*	*	*	*
hap4	9,44	9,26	0,36		0,37	4,61	4,61	4,48	4,36	4,73	1,49	5,35	1,74	1,62	*	*	*	*	*	*
hap5	9,62	9,44	0,18	0,18		4,48	4,48	4,36	4,23	4,61	1,37	5,73	1,62	1,74	*	*	*	*	*	*
hap6	9,44	9,26	0,36	0,36	0,18		0,50	0,62	0,50	2,12	3,86	4,86	4,36	4,48	*	*	*	*	*	*
hap7	9,26	9,44	0,54	0,54	0,36	0,54		0,25	0,25	1,87	3,86	4,73	4,23	4,36	*	*	*	*	*	*
hap8	9,62	9,44	0,54	0,54	0,36	0,54	0,73		0,50	1,87	3,74	4,73	3,99	4,11	*	*	*	*	*	*
hap9	6,90	6,72	7,80	7,44	7,62	7,44	7,62	7,99		1,62	3,61	4,48	3,99	4,11	*	*	*	*	*	*
hap10	6,90	6,72	7,99	7,62	7,80	7,62	7,80	8,17	1,27		3,74	4,61	3,86	3,99	*	*	*	*	*	*
hap11	7,08	6,90	7,99	7,62	7,80	7,62	7,80	8,17	0,54	1,81		4,61	1,25	1,37	*	*	*	*	*	*
hap12	7,44	7,26	8,53	8,17	8,35	8,17	8,35	8,71	1,09	2,36	1,63		5,11	4,98	*	*	*	*	*	*
hap13	6,90	6,72	7,80	7,44	7,62	7,44	7,62	7,99	0,54	1,45	1,09	1,63		0,12	*	*	*	*	*	*
hap14	7,44	7,62	9,62	9,26	9,44	9,26	9,07	9,80	4,90	4,17	5,08	5,99	5,08		*	*	*	*	*	*
hap15	6,90	6,72	7,80	7,44	7,62	7,44	7,62	7,99	0,36	1,63	0,91	0,73	0,91	5,26		*	*	*	*	*
hap16	9,44	9,26	2,54	2,54	2,36	2,18	2,72	2,72	8,53	8,35	8,71	9,26	8,53	9,62	8,53		*	*	*	*
hap17	5,08	5,26	9,53	9,16	9,34	9,16	9,98	9,71	7,62	7,44	8,17	8,17	7,80	7,80	7,62	9,16		*	*	*
hap18	9,89	10,07	7,99	7,99	7,80	7,62	7,44	8,17	10,07	10,25	10,25	10,80	10,07	10,98	10,07	8,17	12,16		*	*
hap19	8,71	8,89	5,81	5,81	5,63	5,44	5,26	5,99	8,71	8,89	8,89	9,44	8,71	9,80	8,71	5,81	9,98	3,27		*
hap20	8,71	8,89	5,81	5,81	5,63	5,44	5,26	5,99	8,71	8,89	8,89	9,44	8,71	9,80	8,71	5,81	9,98	2,90	0,73	
hap21	8,53	3,27	5,99	5,99	5,81	5,63	5,44	6,17	8,53	8,71	8,71	9,26	8,53	9,62	8,53	5,99	9,80	3,45	0,91	0,54

Tabla 2. Distancias genéticas (*uncorrected p-distance*) entre haplotipos. COII: debajo de la diagonal. 16S rRNA: encima de la diagonal.

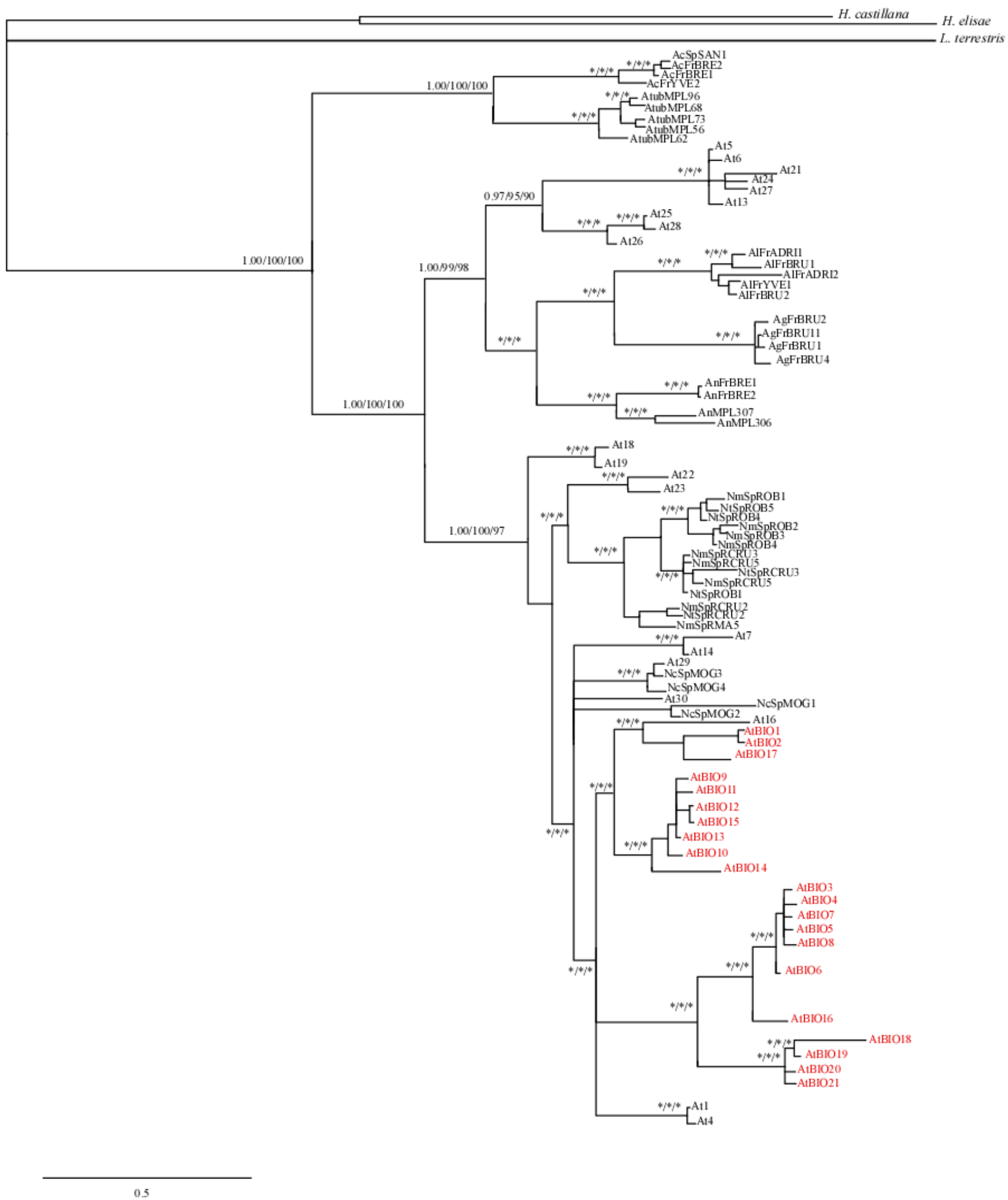


Fig. 4. Árbol filogenético de los individuos recolectados en las localidades estudiadas del proyecto BIOBIO junto con todas las lombrices del complejo de especies, reconstruido por el método de inferencia bayesiana basado en la secuencia de los genes COII, H3 y 16S rRNA. Los terminales en rojo representan las lombrices de este estudio (AtBIO). Los valores de probabilidad posterior (PP) y bootstrap obtenidos en los análisis de máxima verosimilitud (ML) y parsimonia (P) se muestran en los nodos cuando son superiores a 0,8 (PP/ML/P). Los asteriscos indican soportes estadísticos >0.80/80/80.

El primer AMOVA realizado (en el que se comparaban individuos con espermatecas llenas y vacías) mostró que solamente un 19,77% de la varianza genética encontrada se daba entre grupos, mientras que la varianza dentro de grupos es de un 64,30%. La varianza encontrada dentro de cada localidad en cada uno de los grupos fue 15,93%. En el segundo AMOVA (en el que se comparaban los individuos agrupados por localidades), un 83,45% de la varianza genética se debía a la distribución de los individuos en localidades distintas, mientras que sólo un 0,4% de la varianza se debía a las diferencias genéticas entre localidades. De manera similar al primer AMOVA, dentro de las localidades la varianza encontrada fue del 16,15% (Tablas 3 y 4).

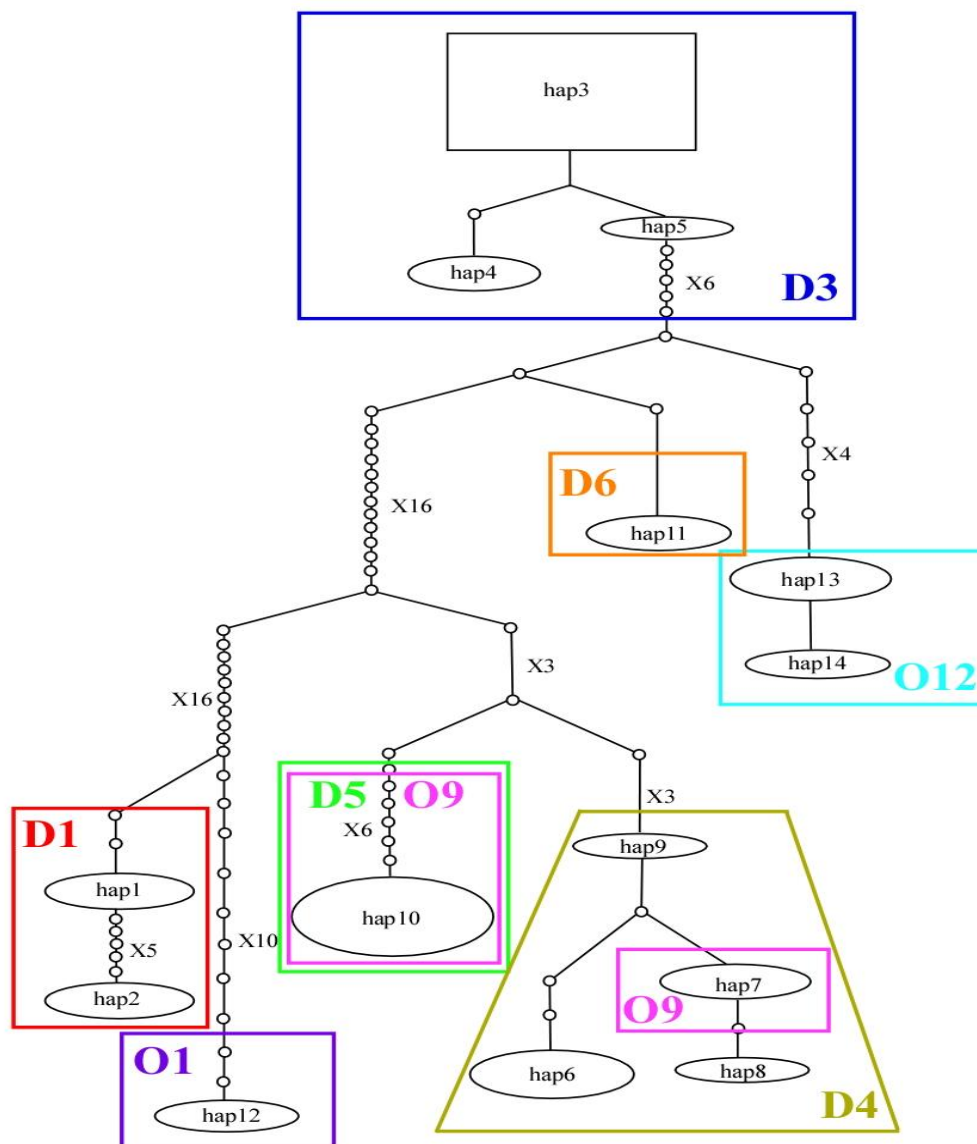


Fig. 5. Red de haplotipos de 16S rRNA de *A. trapezoides* generada por el programa TCS. El límite de conexión fueron 20 pasos. El tamaño del óvalo representa la frecuencia haplotípica. Los círculos vacíos son haplotipos intermedios (no muestreados). Cada rama representa un cambio mutacional, excepto si se indica su número en la rama correspondiente. La longitud de las ramas no contiene información.

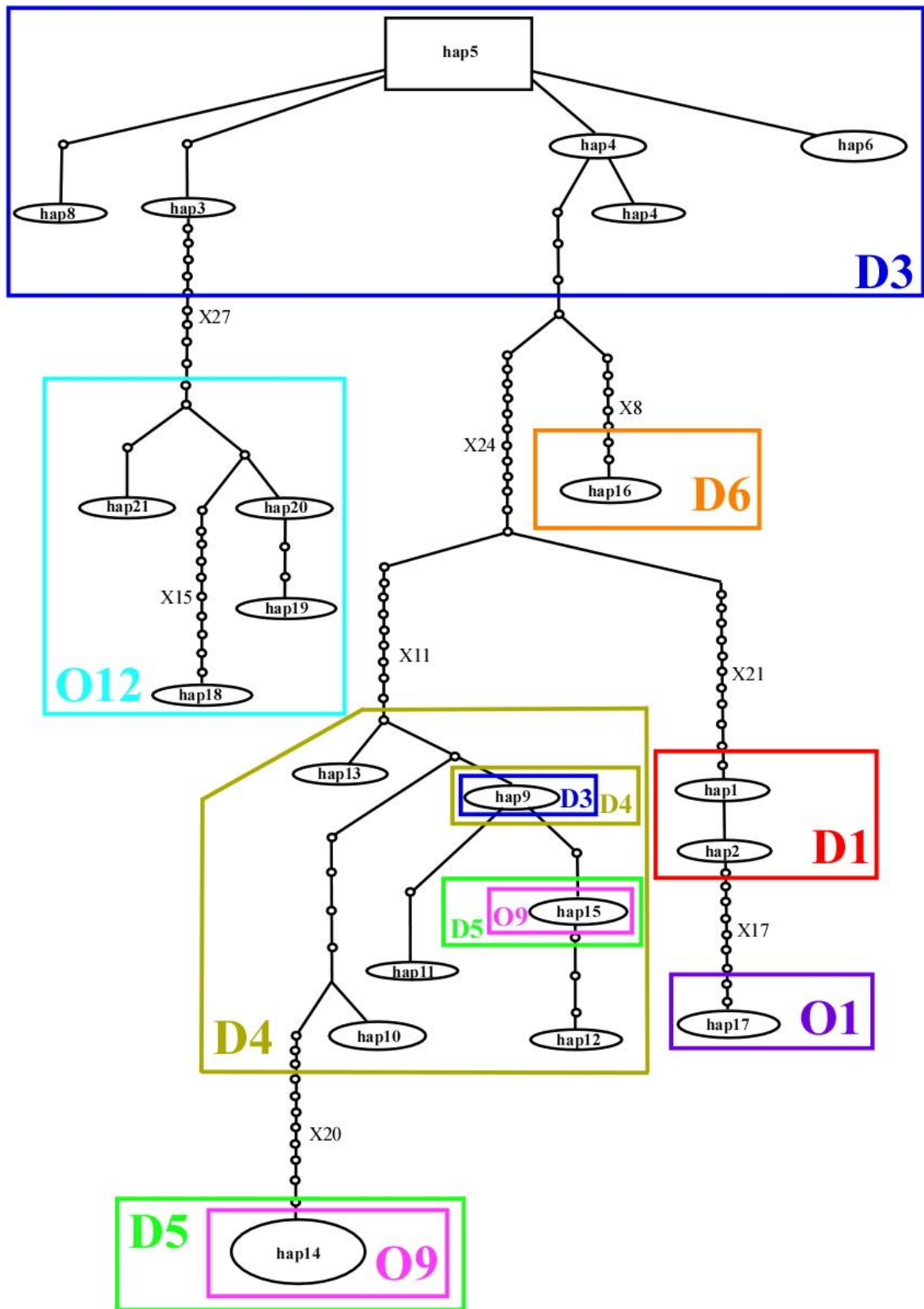


Fig. 6. Red de haplotipos del gen COII de *A. trapezoides* generada por el programa TCS. El límite de conexión fueron 65 pasos. El tamaño del óvalo representa la frecuencia haplotípica. Los círculos vacíos son haplotipos intermedios (no muestreados). Cada rama representa un cambio mutacional, excepto si se indica su número en la rama correspondiente. La longitud de las ramas no contiene información.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	% variación
Entre grupos	1	198.274	4.14620 Va	19.77
Entre poblaciones dentro de grupos	9	457.081	13.48454 Vb	64.30
Dentro de poblaciones	36	120.283	3.34120 Vc	15.93
Total	46	775.638	20.97194	

Tabla 3. Resultados del AMOVA comparando individuos de *A. trapezoides* sexuales y partenogenéticos, basado en el gen mitocondrial COII. Se muestra la partición de la varianza a tres niveles jerárquicos.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	% variación
Entre grupos	7	644.455	17.26659 Va	83.45
Entre poblaciones dentro de grupos	3	10.900	0.08427 Vb	0.41
Dentro de poblaciones	36	120.283	3.34120 Vc	15.93
Total	46	775.638	20.97194	

Tabla 4. Resultados del AMOVA comparando individuos de *A. trapezoides* separados por poblaciones muestreadas, basado en el gen mitocondrial COII. Se muestra la partición de la varianza a tres niveles jerárquicos.

El test de Mantel indicó que la distancia genética por pares entre localidades (Fst, tabla 5) y la distancia geográfica entre puntos en metros están significativamente correlacionadas ($Z = 273646,2628$; $P = 0,0233$; $r = 0,3309$).

	D1	D3	D4	D5	D6	O1	O12	O9
D1		19,677	3,165	5,996	15,040	6,019	8,178	6,004
D3	0,90664		23,016	24,587	5,428	23,682	11,266	18,425
D4	0,83645	0,86227		3,400	18,264	4,482	11,845	7,210
D5	0,80441	0,87328	0,63460		20,701	1,982	13,515	6,989
D6	0,99029	0,69729	0,87180	0,84898		19,742	7,282	15,098
O1	0,98246	0,91529	0,85817	0,81765	1,00000		12,568	5,592
O12	0,83947	0,82508	0,83182	0,81860	0,77749	0,86174		7,649
O9	0,77414	0,86699	0,58797	-0,21992	0,82554	0,79001	0,79740	

Tabla 5. Debajo de la diagonal, valores medios de Fst por pares entre puntos de muestreo basados en COII. Los números en negrita representan valores significativos de Fst al $P < 0,05$. Encima de la diagonal, distancia entre las localidades de muestreo (km).

Discusión

I. Implicaciones taxonómicas: estasis molecular vs plasticidad fenotípica

Uno de los resultados más llamativos de este estudio es la presencia de variación morfológica apreciable en individuos con el mismo haplotipo. Hasta ahora, los estudios más recientes en lombrices de tierra habían mostrado casos de una fuerte estasis morfológica relacionada con altas divergencias genéticas, lo que llevó al establecimiento de ‘especies crípticas’ en varias especies diferentes de lombrices de tierra (por ejemplo, Novo, 2010). Éste es el primer estudio en el que se encuentra el caso contrario: formas

morfológicamente variables en caracteres importantes a nivel taxonómico (por ejemplo, la posición del clitelo) y otros no tanto como la posición de las papilas, muestran las mismas secuencias en genes altamente variables, como son los mitocondriales. De esta forma, se demuestra que en *A. trapezoides* y especies afines el número y posición de las papilas y la longitud del clitelo no pueden considerarse siempre como caracteres taxonómicos válidos.

El número y posición de las papilas se ha cuestionado como un carácter válido para la identificación de especies, ya que algunos autores han señalado que este carácter depende de la actividad sexual de los individuos y se ha podido detectar su extrema variabilidad en casos como *Hormogaster elisae* (Novo et al., 2010). Quizás por esta razón el patrón más común en formas de *A. trapezoides* con espermatecas vacías (que, por otra parte, son las más abundantes) es encontrar tres pares de papilas en los segmentos 9-10-11. Sin embargo este carácter ha sido considerado como importante por Onteniente y Rodríguez Babío (2002) para caracterizar especies próximas como *Nicodrilus tetramammalis*, *N. monticola* y *N. carochensis*. Estos autores observaron que estos individuos siempre tenían espermatecas llenas, a diferencia de *A. trapezoides* (con papilas en 9, 10 y 11) que las tenía vacías. También encontraron dos individuos asignables a *A. trapezoides* con las espermatecas llenas en la población de Navarrés (Valencia).

En este estudio, se han encontrado individuos con espermatecas llenas con papilas desarrolladas en posición 9-10-11, 10-11-12, 9-10-11-12 y 10-11, y con idénticas secuencias a nivel molecular, lo que demuestra que este carácter carece de relevancia taxonómica.

En el árbol filogenético del complejo de especies (capítulo 4), *N. monticola* y *N. tetramammalis* aparecían juntas y mezcladas en el mismo clado, incluso algunos de los individuos compartiendo el mismo haplotipo en los genes mitocondriales. Al igual que sucede en el presente estudio, ambas ‘especies’ provenían de las mismas localidades, pero en este capítulo es la primera ocasión en que se ha realizado un estudio molecular con un número lo suficientemente grande de muestras para testar su validez taxonómica con herramientas moleculares. En el estudio realizado en el capítulo 4 no se encontraron individuos con papilas en la posición típica de *A. trapezoides* (9-10-11) en las mismas

localidades donde se muestrearon *N. tetramammalis* y *N. monticola*, por lo que no se pudo comparar con este tipo de formas, que por otra parte son las más típicas. A la luz de estos resultados, al menos en *A. trapezoides* el número y posición de las papilas es un carácter fenotípicamente muy plástico.

El caso del clitelo es distinto, puesto que en muchas especies su posición sí es un carácter taxonómicamente muy considerado en la identificación y delimitación de especies, ya que es cierto que hay especies en las que la variación de su posición es mínima y el desplazamiento de sólo un segmento implica la pertenencia a especies diferentes, ver por ejemplo *Octolasion lacteum* y *O. cyaneum*. Sin embargo hay otras especies con los límites más variables, quizás dependiendo del estado de madurez, pero generalmente la variación no es demasiado amplia y el clitelo puede considerarse habitualmente como un buen carácter taxonómico. Este es el primer estudio en el que se observa una plasticidad fenotípica de este carácter en individuos con el mismo haplotipo. Sin embargo, también es cierto que sólo se observó en una de las poblaciones (olivar 9), así que parece que en *A. trapezoides* una variación mayor que un segmento por delante o detrás (dependiente muchas veces del grado de madurez) es un fenómeno muy puntual pero que por otra parte existe, lo que puede comprometer la validez taxonómica de emplear la longitud del clitelo como carácter diferencial.

Como consecuencia de estas observaciones y de la posición de las formas de *Nicodrilus* y formas sexuales de los alrededores de Plasencia en el árbol filogenético, puede descartarse su estatus como especies, y podemos postular que el linaje II de *A. trapezoides* está compuesto por formas sexuales y partenogenéticas (siempre que sea cierto el criterio definitorio empleado más arriba), en las que el número y posición de las papilas e incluso la longitud del clitelo es variable.

Como se comentó en la introducción de esta tesis (capítulo 1) y en el capítulo que trata sobre la filogenia del complejo de especies (capítulo 4), son muchos los autores que durante más de un siglo han tratado de definir qué especies pueden considerarse dentro de este grupo y cómo son cada una de ellas. A la vista de los resultados de esta tesis, parece que el asunto es más complejo de lo que pudiera pensarse.

Desde mi punto de vista, y atreviéndome a dar una opinión basada en el trabajo de estos últimos años, la cosa no se ha solucionado sino más bien al contrario; la biología molecular ha aclarado algunos aspectos pero ha complicado más muchos otros, y hace falta todavía mucha información para resolver el caos taxonómico, empezando por una visión global (filogeografía) y una particular (a mesoescala) de cada una de las especies para ver cómo puede variar cada una de ellas, designando neotipos y paratipos que reflejen dicha variación. Entender cómo se produce el origen de las formas partenogenéticas es también crucial para resolver este problema.

II. Alta variabilidad genética, relaciones filogenéticas y genética de poblaciones: aislamiento por distancia

La situación general de los individuos analizados en este capítulo en los árboles filogenéticos es la esperada de acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios filogeográficos y filogenéticos de esta especie. Las localidades estudiadas se encuentran en la zona de distribución del linaje II de *A. trapezoides*, tal como se identificó en el capítulo 2. Por otra parte, sus relaciones filogenéticas con las especies sexuales del complejo son similares al resto de clones del linaje II.

Un resultado muy llamativo es la gran cantidad de haplotipos diferentes en los genes mitocondriales y las elevadas distancias genéticas encontradas entre algunos de ellos (hasta más de un 12,16%), ya que estas distancias son similares a las encontradas entre el linaje I y II, tal como se observa en el capítulo 2. Hasta el momento, son escasos los trabajos de genética de poblaciones en lombrices de tierra a nivel de mesoescala (Field et al., 2007; Novo et al., 2009), y los resultados son similares: las distancias genéticas son siempre muy altas. Por ejemplo, Novo et al. (2009) observaron distancias muy altas (hasta el 20% en el COI) en poblaciones muy cercanas separadas por pocos kilómetros de *Hormogaster elisae* en el centro de la Península Ibérica. Por otra parte, es evidente que los valores de distancias varían mucho en distintos taxones (velocidades evolutivas diferentes dentro de las lombrices) y que por lo tanto no existe la posibilidad de establecer un valor de distancia con validez general para diferenciar especies en este

grupo animal, sino que es necesario el estudio de cada caso para ver los patrones y la magnitud de la variación genética.

Por otra parte, los genes nucleares son muy poco variables, y las copias amplificadas son totalmente iguales en el gen 28S rRNA y casi en la histona H3. Esto nos indica que o bien actualmente existe flujo génico entre las poblaciones y que existe una tendencia hacia la homogeneización genética, o bien que los genes nucleares no están bien escogidos, ya que a niveles interespecíficos tampoco muestran demasiada variabilidad (capítulo 4). Sería adecuado estudiar genes nucleares más variables o microsatélites para estudiar este aspecto.

Todos los análisis de genética de poblaciones (red de haplotipos, AMOVAs, test de Mantel) apuntan hacia el mismo resultado: existe una estructuración genética muy marcada en las poblaciones extremeñas estudiadas y las diferencias genéticas entre las localidades se deben a un patrón de aislamiento por distancia. Parece ser que existe una tendencia general en las lombrices de tierra a presentar poblaciones aisladas y con poco o nulo flujo génico entre ellas. Esto puede estar motivado por su baja capacidad de dispersión.

Aunque son pocos los estudios que tratan sobre la dispersión de las lombrices de tierra, se ha visto que tienen bajas tasas de migración entre poblaciones, con tasas naturales observadas de solo 1,4–9 m/año (Lighthart y Peek, 1997, Hale et al., 2005). Este hecho favorece el aislamiento entre poblaciones y la estructuración genética, tal como se ha observado en este capítulo. Además, es conocido el papel de la península Ibérica como uno de los refugios más importantes donde las especies de animales y plantas sobrevivieron durante las glaciaciones del Cuaternario (Huntley y Birks, 1983, Taberlet et al., 1998, Hewitt, 2001), lo que podría haber favorecido aún más el aislamiento geográfico de las poblaciones y, por lo tanto, el aislamiento genético.

II. Implicaciones evolutivas: origen no híbrido, relativamente reciente y múltiple de la partenogénesis

Lejos de la complejidad de las herramientas moleculares, tenemos una prueba bastante robusta para descartar el origen híbrido de la partenogénesis: no se han encontrado especies filogenéticamente afines a *A. trapezoides* en los muestreos intensivos realizados, no solamente en las localidades reflejadas en este estudio (tabla 1), sino en ninguna de las localidades analizadas en el proyecto BIOBIO (Díaz Cosín, comunicación personal). Solamente se encontraron algunos ejemplares atribuidos con dudas a *A. caliginosa* en una localidad diferente de las estudiadas, en la que no se habían encontrado ejemplares sexuales de *A. trapezoides*. A parte de este caso, la única especie del género *Aporrectodea* presente en la zona fue *A. rosea*, que está genéticamente muy ‘alejada’ de *A. trapezoides* tal como se ve en el árbol filogenético del estudio realizado por Pérez-Losada et al. (2009). Por otra parte, ante un caso de hibridación se esperaría encontrar una filogenia mitocondrial y una nuclear distintas, siendo aquí exactamente iguales ya que las secuencias de los genes nucleares eran idénticas en individuos sexuales y asexuales.

¿Qué origen pueden tener, entonces, las formas partenogenéticas de *A. trapezoides*? El origen infeccioso parece altamente improbable debido a los patrones biogeográficos encontrados en los distintos linajes (capítulo 2). Podemos plantear como hipótesis que el origen dependa de la labilidad del sistema reproductor de estos animales, posibilidad apoyada también por la existencia de bastantes especies de lombrices de tierra partenogenéticas. Merece la pena barajar entonces un origen espontáneo, en el que una mutación en un punto genere las formas partenogenéticas, y/o alternativamente un origen contagioso, por el que los linajes partenogenéticos se originen secundariamente a partir de linajes partenogenéticos preexistentes como resultado de un aislamiento reproductivo incompleto entre individuos sexuales y partenogenéticos. Omodeo (1952) ya formuló esta hipótesis, explicando que los linajes triploides con partenogénesis obligatoria debían provenir de linajes diploides en los que la partenogénesis estaría presente al menos de manera facultativa, pasando en estos casos por una etapa en la que es necesaria la participación del esperma (pseudogamia) para desencadenar la partenogénesis. En el caso de los individuos tetraploides, los posibles orígenes podrían ser distintos: fecundación de un ovocito no reducido por un espermatozoide diploide,

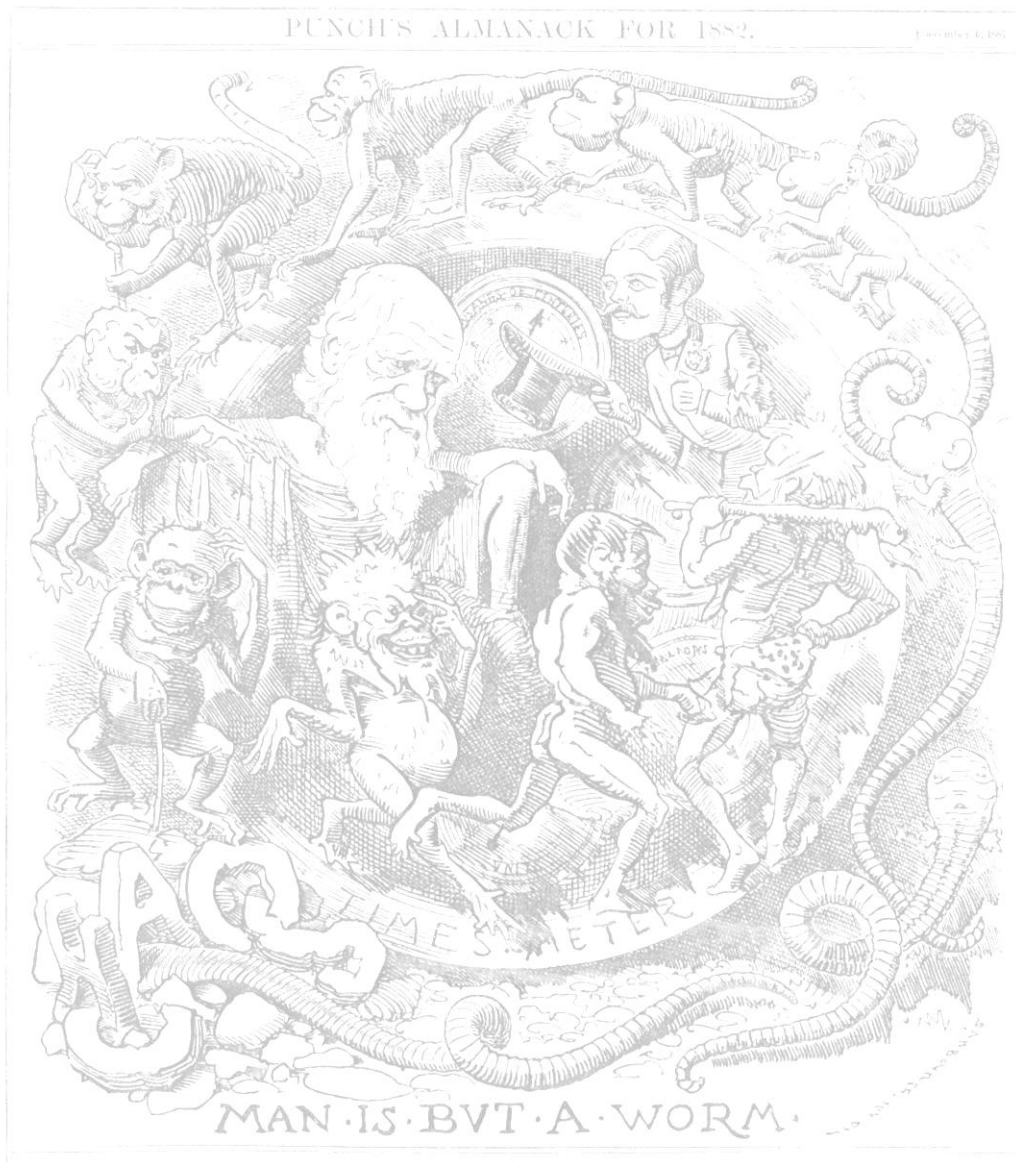
fecundación de un ovocito triploide por un espermatozoide haploide, autofecundación en un individuo con líneas germinales masculina y femenina tetraploides, etc.

Como ya se mencionó en la introducción de esta tesis, hay autores que apoyan que la hibridación entre hembras partenogenéticas y machos de la misma especie es uno de los principales mecanismos generadores de poliploidía en animales unisexuales. *A priori*, la biología de las especies partenogenéticas de lombrices parece apuntar a este origen contagioso, ya que es común encontrar distintos grados de ploidía. Todas las formas partenogenéticas que se han encontrado son poliploides (Suomalainen et al., 1987). El nivel de poliploidía varía de formas triploides a formas dodecaploides. Además, una única especie morfológica puede tener grados de ploidía distintos. Por ejemplo, en *A. trapezoides* se han encontrado individuos diploides (Onteniente y Rodríguez Babío, 2002), triploides que es lo habitual y tetraploides (Omodeo, 1952; Casellato y Rodighiero, 1972). *A. rosea* presenta formas desde $3n$ hasta $10n$ (Omodeo, 1952), siendo algunas anfigmíticas y otras partenogenéticas.

A raíz de los resultados obtenidos en este capítulo, puede asumirse también un origen múltiple y reciente de la partenogénesis. Múltiple, porque no todas las formas partenogenéticas se asocian a una única forma sexual, sino que varias formas sexuales comparten diversos haplotipos con varias formas partenogenéticas; además, el test de Mantel revela un aislamiento por distancia. Este origen múltiple se corrobora también a escala global en el árbol filogenético de la filogenia del complejo (capítulo 4). Reciente, porque las formas sexuales y las partenogenéticas comparten haplotipos en genes mitocondriales altamente variables; todavía no ha habido ‘tiempo evolutivo’ suficiente para la acumulación de mutaciones a esta escala. Podría incluso calificarse como origen ‘instantáneo’, ya que parece ser que se está dando en este momento del tiempo evolutivo. Chang y Chen (2005) encontraron una tasa de mutación del 3,5% de sustituciones por posición y millón de años en el gen COI en megascolécidos. Novo (2010) calculó una tasa para hormogástridos que variaba entre el 0,6 y el 2,9% para el mismo gen mitocondrial. En este capítulo, nos hemos encontrado con secuencias totalmente iguales en animales sexuales y partenogenéticos, por lo que se puede suponer que se han separado hace menos de un millón de años. A escala filogenética global, este origen de la

partenogénesis también relativamente reciente (aproximadamente 40 millones de años), tal como se observa en la datación realizada en el árbol ultramétrico del capítulo 4.

En cualquier caso, hemos encontrado una localidad excelente para profundizar en todas estas cuestiones evolutivas y taxonómicas sin resolver. Futuros trabajos a un nivel más exhaustivo utilizando todo el material capturado en esta zona ayudarán a contestar preguntas básicas en la biología evolutiva y filogenia de las lombrices de tierra en general y de *A. trapezoides* y formas afines en particular que fueron formuladas por primera vez hace más de cien años.



Capítulo 6

Ciclo biológico y biología reproductiva de *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828) en cultivos de laboratorio.

Fernández et al. (2010). Life cycle and reproductive traits of the earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828) in laboratory cultures. *Pedobiologia* 53, 295-299.

La lombriz partenogenética *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828), originaria del Paleártico, se distribuye por todo el mundo debido principalmente a la expansión de las prácticas agrícolas europeas. Para estudiar su ciclo biológico en el laboratorio, se obtuvieron capullos de cultivos de individuos recolectados en el campo y se anotaron sus características y viabilidad, período de incubación, número de neonatos y tasa de mortalidad. Del 59% de capullos viables eclosionaron 2 neonatos gemelos, mientras que del 38% sólo eclosionó un único individuo (neonatos de eclosión única). La tasa de mortalidad fue mayor en gemelos. Sólo de un 2% de capullos viables eclosionaron trillizos, y de un 1% cuatrillizos. Se cultivaron neonatos gemelos y neonatos de eclosión única desde eclosión durante 490 días bajo condiciones ambientales óptimas. Se anotó su biomasa, tasa de supervivencia, estado de madurez y tasa de producción de capullos cada 15 días durante todo el experimento. La biomasa media individual en neonatos de eclosión única fue significativamente mayor ($p < 0.001$) que en neonatos gemelos pero solamente durante los primeros 15 días del experimento. La tasa de producción de capullos no fue significativamente distinta entre los dos tipos de neonatos ($p = 0.317$). De media, los individuos de *A. trapezoides* criados aisladamente desde su eclosión alcanzaron la madurez reproductora a los 153 días con un peso medio de 1 g. Para conocer las diferencias en reproducción entre individuos recolectados del campo y criados en laboratorio, se montaron 40 microcosmos experimentales que contenían una única lombriz (20 con lombrices recolectadas en el campo y otros 20 con individuos criados en el laboratorio) y 40 que contenían 3 ejemplares (20 con cada tipo de individuos). Este experimento se mantuvo durante un año bajo condiciones ambientales controladas. Cada 15 días, se anotó el número de capullos encontrados en el suelo y se reemplazó con suelo nuevo. Todos los individuos mantenidos en aislamiento produjeron capullos, probando por lo tanto la reproducción partenogenética obligatoria sin cópula o necesidad de estímulos físico-químicos. En general, las lombrices aisladas mostraron una tasa de producción de capullos significativamente mayor que las lombrices cultivadas en grupos de tres; el mismo resultado se obtuvo al comparar lombrices criadas en laboratorio con lombrices recolectadas en el campo. Este estudio subraya tanto la importancia de conocer el ciclo biológico y la reproducción de una posible especie clave en gestión de suelos debido a su vasta distribución y alta densidad, como su uso altamente recomendado en estudios aplicados debido a su facilidad de cultivo.

Abstract

The parthenogenetic earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828) is widely distributed all over the world due to European agricultural practices. In order to provide baseline life cycle data, cocoons were obtained from field-collected individuals and their features and viability, incubation period, number of hatchlings and mortality rate were recorded. More twins (59% of all viable cocoons) than singletons (38%) were produced, but mortality rates in this kind of hatchlings were higher. Only 2% of cocoons produced triplets and 1% quadruplets. Singleton and twin earthworms from this first experiment were cultured from hatching during a 490-day period under controlled conditions with biomass, survival, reproductive condition and cocoon production recorded at intervals of 15 days. Individual mean mass of singletons was only significantly higher ($p < 0.001$) than that of twins at days 1 and 15. Cocoon production was not significantly different between them ($p = 0.317$). On average, individuals of isolated-reared *A. trapezoides* reached maturity at day 153 and body weight at maturity was more or less 1g. In order to record reproduction traits and differences between field-collected and laboratory-reared individuals, a second experiment was performed. Forty microcosms with an isolated earthworm (20 with field-collected individuals and 20 with laboratory-reared ones) and 40 containing three of them (20 with each type of individuals) were maintained during a complete year under controlled conditions. Every 15 days, microcosm content was replaced and cocoon production was recorded in the discarded soil. All individuals kept in isolation produced cocoons, hence completely proving the obligatory parthenogenetic reproduction in this species without copulation or need of any physical-chemical stimulus. In general, isolated earthworms produced a significantly higher number of cocoons than those in groups of three, and the same was recorded for laboratory-reared earthworms when compared with field-collected ones. This study highlights the importance of knowing the life cycle and reproductive traits of one possible key species in soil management due to its vast distribution and high density in soils, and the species' highly recommended use in applied studies because of its ease of culture.

Aporrectodea trapezoides es una lombriz de tierra de tamaño medio originaria del Paleártico pero prácticamente distribuida por todo el mundo. A pesar de ser una especie típicamente holártica, ha sido introducida en Australia (Blakemore, 1999), Nueva Zelanda (Fraser et al., 1996), Sudáfrica (Reinecke y Ljungstrom, 1969) y tanto en Norteamérica (Zaitlin et al., 2007) como en Sudamérica (De Mischis, 1997). Estas introducciones fueron debidas a la expansión de las prácticas agrícolas europeas y al extenso uso de esta especie como cebo de pesca (Blakemore, 2006). Bouché (1972) caracterizó esta especie como anécica, viviendo en galerías verticales en el suelo.

Todas las lombrices utilizadas en este estudio fueron morfológicamente y anatómicamente identificadas como *A. trapezoides* siguiendo la clave taxonómica de Gates (1972). En concreto, se tuvieron en cuenta la posición de las papilas genitales en los segmentos 9, 10 y 11, de los tubérculos pubertarios en línea entre los segmentos 31 y 33, del clitelo en (25–26) 27–34 (35), y la esterilidad masculina (espermatecas y embudos vacíos, ambos en los segmentos 10 y 11).

En otras especies de lumbrícidos, como *Octolasion tyrtaeum* (Muldal, 1952; Jaenicke y Selander, 1979), las estructuras masculinas no están reducidas y los individuos son pseudogámicos: copulan para intercambiar espermátóforos que, sin embargo, están invariablemente vacíos. Así, a pesar de que los espermatozoides no son necesarios, esta especie necesita algún tipo de estímulo mecánico o químico para desencadenar la reproducción.

La degradación polimórfica de las estructuras reproductivas, tal como se encuentra a veces en otras especies partenogénicas, no se ha observado en *A. trapezoides*. Tanto caracteres sexuales primarios como secundarios (papilas peritecales, tubérculos pubertarios, espermatecas, poros masculinos hinchados y vesículas seminales) están muy mantenidos en esta especie. Este hecho llevó a Gates (1972) a proponer dos posibles hipótesis: una aparición reciente de la partenogénesis o una resistencia inusual a la

mutación en estos órganos. Gates (1972) también sugirió que en *A. trapezoides* la pseudogamia podría haber evolucionado hacia esterilidad masculina. Hasta el momento, no se ha realizado ningún experimento sobre reproducción en esta especie, por lo que nunca se ha probado ni descartado la necesidad de estimulación para desencadenar la reproducción.

Tradicionalmente, se ha prestado poca atención al ciclo de vida de lombrices partenogénicas (por ejemplo, *Octolasion cyaneum*, Lowe y Butt, 2008; *Perionyx ceylanensis*, Karmegan y Daniel, 2009). Sin embargo, especies con este tipo de reproducción podrían ser potencialmente más apropiadas que las hermafroditas en la realización de estudios aplicados. Como sugirieron Lowe y Butt (2007), las especies con partenogénesis obligada deberían ser preferibles a las amfimícticas para tests ecotoxicológicos debido a ciertas ventajas. Por ejemplo, estas lombrices se pueden mantener aisladas, permitiendo una monitorización individual a largo plazo.

Los ciclos de vida estudiados en otras lombrices han sido realizados tradicionalmente bien con individuos recolectados en el campo, bien con ejemplares cultivados en el laboratorio. Por ello, algunos aspectos tales como la existencia de aprendizaje putativo o acomodación, o las diferencias entre reproducción real y potencial se entienden de manera muy pobre.

El interés científico sobre *A. trapezoides* ha estado típicamente sesgado hacia su papel en el suelo. Algunos aspectos de su ecología como su distribución como especie exótica y su efecto en las propiedades del suelo o sistemas de cultivo han sido considerados de especial relevancia. Sin embargo, su ciclo de vida sólo ha sido estudiado hasta el momento durante un corto período de tiempo (solamente 19 semanas) bajo condiciones de campo (dinámica de poblaciones y cambios en abundancia; McCredie et al., 1992). Es por ello que se conoce muy poco sobre el ciclo de vida de una de las lombrices más abundantes en la faz de la Tierra. Este hecho impide el desarrollo de estrategias de gestión adecuadas para optimizar su papel en el mantenimiento de las propiedades del suelo y en la evaluación de sus efectos potenciales en ecosistemas naturales y agrícolas

en relación a su posible uso en estudios aplicados de ecotoxicología, vermicompostaje o restauración ecológica.

Así, los objetivos de este estudio fueron la obtención de datos básicos sobre el ciclo de vida y reproducción del clon más abundante, el clon 1 de *A. trapezoides*, tales como (1) producción de capullos y neonatos, así como sus características morfológicas y viabilidad; (2) tasa de crecimiento bajo condiciones óptimas en el laboratorio; (3) posibles requerimientos para desencadenar la reproducción; y (4) diferencias e reproducción entre individuos recolectados en el campo y ejemplares cultivados en el laboratorio.

Materiales y Métodos

I. Características de los capullos y tasa de eclosión en individuos recolectados del campo.

Individuos maduros de *A. trapezoides* fueron recolectados mediante excavación y separación manual en una pradera en El Molar (Madrid, N 40° 44' 22.9" N; O 003° 33' 53.1"). Las lombrices se mantuvieron en dos microcosmos experimentales (entre 15 y 25 lombrices por microcosmos; superficie 0,19 m², profundidad 10 cm) con tapas agujereadas para permitir la ventilación. Estos microcosmos se llenaron con 2 kg de suelo recogido en la misma localidad previamente secado y tamizado (2 mm). Se añadió estiércol seco de vaca en la superficie de los microcosmos (1% en peso) y se mantuvieron en incubador científico a 16 °C y oscuridad. La humedad del suelo se mantuvo al 25%. Cada 15 días los capullos se recolectaron manualmente (n=244), fueron pesados y medidos, y 147 de ellos se incubaron en placas de Petri (un capullo por placa) sobre papel de filtro con agua en exceso para evitar la deshidratación. Se obtuvieron un total de 241 neonatos. Las placas se inspeccionaron diariamente para anotar la viabilidad y el número de neonatos por capullo. El tiempo de incubación se calculó como el tiempo transcurrido hasta eclosión en cada caso más 7 días (la mitad del tiempo entre períodos de obtención de capullos en los microcosmos experimentales).

II. Crecimiento de individuos cultivados en el laboratorio.

Treinta y siete de los 241 neonatos (24 de eclosión única y 13 individuos gemelos) se cultivaron de manera individual en microcosmos experimentales (área 0,025 m², profundidad 5,5 cm) con 250 g de suelo seco y tamizado (2 mm), alimentados con estiércol seco de vaca (1% en peso), al 25% de humedad y mantenido a 16 °C. Se anotaron cada 15 días de manera individual la tasa de supervivencia, la biomasa y la condición reproductora durante un período de 490 días.

El contenido de los microcosmos se reemplazó cada 15 días. Cuando los individuos alcanzaron la madurez (definida por la presencia de clitelo hinchado), se recogieron los capullos pasando dicho suelo por un tamiz de 2 mm con la ayuda de agua a presión. Las diferencias en peso y producción total de capullos entre neonatos de eclosión única y gemelos se analizaron mediante el test t de Student, con un valor de significación de alfa de 0.05. Todos los análisis se realizaron con el programa Statistica versión 6.0. Los datos se muestran como media más/menos desviación típica. Como una medida de crecimiento complementaria, se calculó la tasa instantánea de crecimiento (Instantaneous Growth Rate, IGR) para cada intervalo de 15 días. IGR asume que el crecimiento se realiza logísticamente en vez de linealmente (Eriksen-Hamel y Whalen, 2006). Su valor se obtiene calculando el cambio en el peso de cada individuo durante un lapso de tiempo infinitesimal (Pertrusewicz y Macfayden, 1970). IGR se calculó mediante la ecuación:

$$\text{IGR} = \ln(\text{Pf} / \text{Pi}) / \Delta t$$

donde Pi y Pf son el peso inicial y final de la lombriz (g), y Δt es el intervalo de crecimiento en días (Brafield y Llewellyn, 1982).

III. Detección de posibles requerimientos para desencadenar la reproducción partenogenética.

Individuos maduros (n=40) recolectados durante distintas estaciones del año (otoño, invierno y primavera) en El Molar fueron estudiados anatómicamente para comprobar la ausencia de espermatozoides en las espermatecas. Para ello, estos órganos fueron extraídos, colocados en un portaobjetos, cubiertos por un cubreobjetos, aplastados suavemente y observados en microscopio lumínico (400X). Una vez corroborada la esterilidad masculina en todos los individuos analizados de esta población, se recolectaron 80 lombrices maduras del campo para preparar el experimento. Veinte de ellas se cultivaron individualmente en microcosmos experimentales de 250 ml de capacidad (nombradas como If, del inglés 'individual from the field'). Sesenta lombrices se cultivaron en grupos de tres en microcosmos experimentales de 750 ml de capacidad (nombradas como Gf, del inglés 'group from the field'). Cada microcosmos se preparó y se mantuvo de la manera descrita en el experimento 2 (ver más arriba), exceptuando la cantidad de suelo tres veces mayor en los microcosmos que contenían tres lombrices para mantener una cantidad de suelo constante por lombriz. Cada 15 días, el suelo de los microcosmos fue reemplazado y expuesto a chorros de agua a presión sobre un tamiz de 2 mm para recolectar los capullos. Este experimento se mantuvo durante un año entero.

El mismo tipo de procedimiento se realizó con individuos cultivados en laboratorio desde eclosión. Los microcosmos con un individuo aislado fueron nombrados Il (del inglés 'individual from the laboratory') y los que contenían tres lombrices Gl (del inglés 'group from the laboratory'). Para analizar las diferencias, se realizó un análisis de la varianza de medidas repetidas (Repeated measures analyses of variance, RM-ANOVA). El test de Mauchly se empleó para analizar la esfericidad de los análisis de medidas repetidas. Si la asunción de esfericidad no se cumplía, se empleó el ajuste de Greenhouse-Geisser para proteger sobre error de tipo I (Keselman et al., 2001). En cualquier caso, el nivel de significación se estableció al 5%.

I. Características de los capullos y tasa de eclosión en individuos recolectados del campo.

De cada capullo de *A. trapezoides* eclosionaron entre 1 y 4 neonatos; la tasa de eclosión fue del 87% del total de capullos incubados. De éstos, del 59% eclosionaron neonatos únicos y del 38% gemelos. Solamente de 3 capullos (2%) eclosionaron trillizos y de 2 cuatrillizos (1%). La biomasa media fue $0,014 \pm 0,006$ g, variando desde $0,0011$ g (en cuatrillizos) hasta $0,0327$ g (en neonatos únicos) ($n=241$). La media de neonatos por capullo fue de $1,67 \pm 0,59$. En el 2% de los capullos se observaron neonatos gemelos anormales unidos por la cabeza o la cola. Durante las dos primeras semanas de vida, la tasa de mortalidad fue de 4.9% en los gemelos y de 1,69 en los neonatos únicos. Al mes de la eclosión, la tasa de supervivencia fue similar en ambos tipos de neonatos (94,6%). Los capullos se caracterizaron por un peso medio de $0,033 \pm 0,008$ g y un tamaño de $5,7 \pm 0,8$ mm de largo por $3,3 \pm 0,4$ mm de ancho. El tiempo medio de incubación de los capullos fue de $41,9 \pm 9,6$ días.

II. Crecimiento de lombrices cultivadas en el laboratorio.

La tasa de supervivencia durante todo el período experimental (490 días) fue del 100%. El crecimiento de *A. trapezoides* siguió una curva sigmoidea (Fig. 1), con una fase inicial de crecimiento lento durante los primeros 60 días (media de peso de $0,101 \pm 0,026$ g), seguida de una fase exponencial alcanzada a los 285 días (media de peso de $2,745 \pm 0,566$ g), y una última fase de crecimiento estacionario a partir del día 345, con un peso medio de $3,307 \pm 0,695$ g. La longitud de las fases de crecimiento se determinó calculando los puntos donde las asíntotas superior e inferior cruzan la línea tangente al punto de inflexión. La madurez sexual se alcanzó entre los días 142 y 165 tanto para neonatos únicos como para gemelos, con un peso medio de $1,005 \pm 0,172$ g. La producción de capullos se empezó a medir tan pronto como las lombrices alcanzaron la madurez sexual; la tasa media de reproducción fue de $4,06 \pm 1,26$ capullos por lombriz cada dos semanas (es decir, aproximadamente 105 capullos por lombriz y por año). Durante el experimento, dos de los individuos fueron encontrados esporádicamente inactivos y enrollados en cámaras de estivación esféricas.

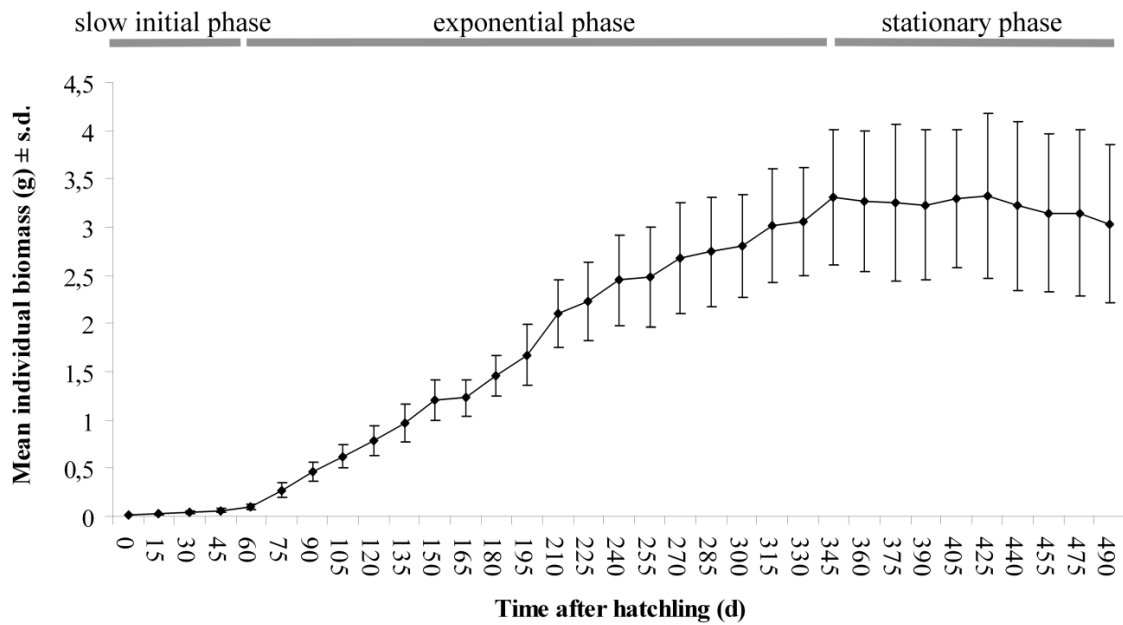


Fig. 1. Curva de crecimiento de *A. trapezoides* cultivada en el laboratorio a 16°C (n=37). Se indican las fases de crecimiento lento inicial, exponencial y estacionario.

Las diferencias en peso medio individual entre neonatos únicos y gemelos solamente fueron significativas durante las mediciones en los días 1 y 15, teniendo los neonatos únicos un peso mayor (t de Student; $t=3,48$; $df=36$, $P<0,01$; $t=3,51$, $df=36$, $P<0,01$, respectivamente). No se observaron diferencias significativas entre los dos tipos de neonatos durante el resto del experimento ni en el peso medio (t de Student; $t=0,23$, $df=64$, $P=0,82$), ni en la tasa de reproducción media (t de Student; $t=1,01$, $df=36$, $P=0,317$).

Los valores de IGR siguieron un patrón logarítmico, mostrando las mismas fases que las previamente observadas en el patrón de crecimiento (Fig. 2). Durante la fase exponencial, se alcanzó el valor mínimo de IGR (día 150), que coincidía con el período en el que los individuos alcanzaron la madurez sexual. Después del día 330, los valores de IGR fueron próximos a cero.

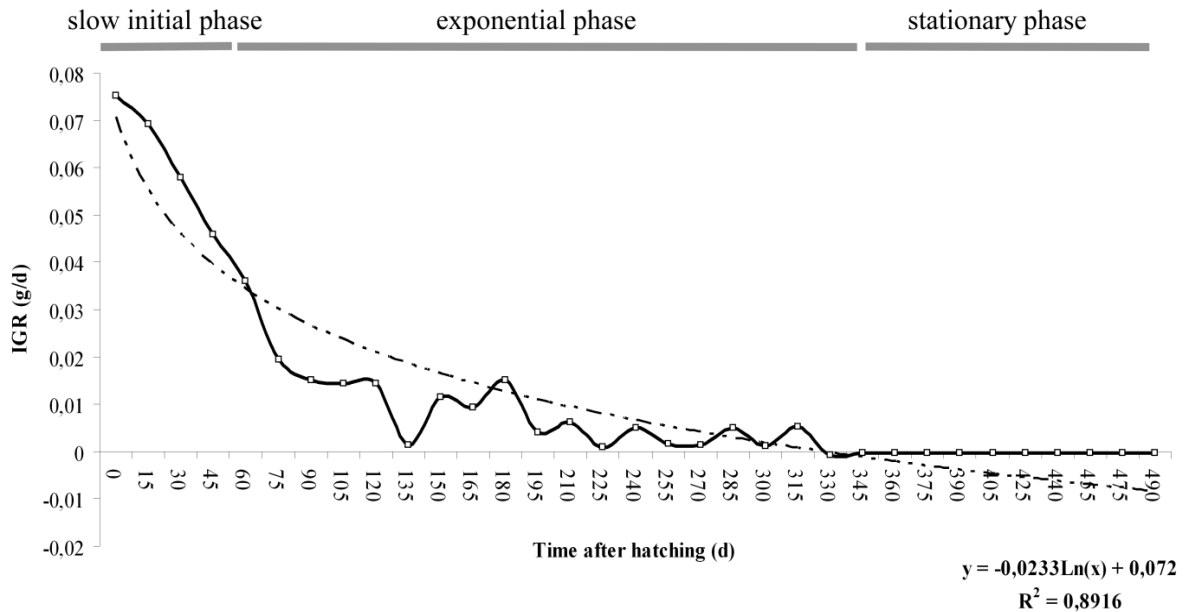


Fig. 2. Tasas instantáneas de crecimiento en *A. trapezoides* a 16°C (n = 37). La línea de tendencia se representa como una línea discontinua. Se indican las fases de crecimiento lento inicial, exponencial y estacionario.

III. Detección de posibles requerimientos para desencadenar la reproducción partenogenética.

Todos los individuos de *A. trapezoides* mantenidos en aislamiento (de ambos orígenes: campo o laboratorio) produjeron capullos durante todo el experimento. Todos los individuos recolectados en el campo se disecaron para testar la esterilidad masculina, por lo tanto se descarta la reproducción pseudogámica y se prueba la reproducción partenogenética 'pura' en esta población. Sin embargo, la producción de capullos fue diferente en los cuatro tipos de microcosmos, como se discute más abajo.

La tasa media de producción de capullos por lombrices cada 15 días se comparó en los distintos microcosmos (If, Gf, Il y Gl). Dicha tasa fue de $1,60 \pm 0,83$ capullos por lombriz cada 15 días en If, $1,31 \pm 0,47$ en Gf, $4,16 \pm 1,49$ en Il y $2,44 \pm 1,71$ en Gl. El RM-ANOVA no mostró diferencias significativas entre las tasas de If y Gf. Sin embargo, fue significativamente mayor en Il que en Gl, en Il en comparación con If, y en Gl comparado

con Gf. Las lombrices cultivadas en aislamiento (If y Il) mostraron tasas significativamente mayores que aquellas cultivadas en grupos de tres (Gf y Gl). Asimismo, la tasa de individuos criados en el laboratorio (Il y Gl) fue mayor que la de individuos recolectados en el campo (If y Gf) (Tabla 1).

Se observó procesos de estivación en un porcentaje variable de individuos recolectados en el campo durante todo el experimento en ambos tipos de microcosmos (If y Gf), generalmente después del período de verano. El porcentaje de individuos en estivación varió entre el 5 y el 25% de los individuos clitelados totales en cada tipo de microcosmos. Como este porcentaje fue similar en ambos tipos de microcosmos, se comparó la tasa media de producción de capullos en períodos de estivación, pero no se observaron diferencias significativas ($F(1,19)=1,46$, $P=0,239$). Este fenómeno sólo se observó dos veces durante todo el experimento en individuos criados en el laboratorio.

Discusión

A. trapezoides parece ser una especie altamente adecuada para cultivos en el laboratorio gracias a su alta tasa de supervivencia tanto en adultos como en neonatos y la alta viabilidad de sus capullos. Teniendo en cuenta que cada lombriz puede producir potencialmente más de 150 neonatos vivos por año, esta especie es también muy apropiada para experimentos de laboratorio. Por todo ello, el empleo de esta especie puede ser altamente recomendado en estudios aplicados, tales como restauración ecológica de taludes de carretera (Trigo, datos no publicados), agricultura ecológica o tests ecotoxicológicos, como ya sugirieron Lowe y Butt (2007) para otras especies partenogenéticas.

Tanto la tasa de producción de capullos como el número de neonatos por capullo varía mucho entre especies de lombrices. La tasa observada en *A. trapezoides* (105 capullos por lombriz y por año) es mucho mayor que la de otras lombrices anécicas o endógeas, como *Octodrilus complanatus* (52 capullos por lombriz y por año; Monroy et al., 2007), o *Lumbricus terrestris* (38 capullos por lombriz por año; Butt, 1993). Esta tasa sitúa a *A.*

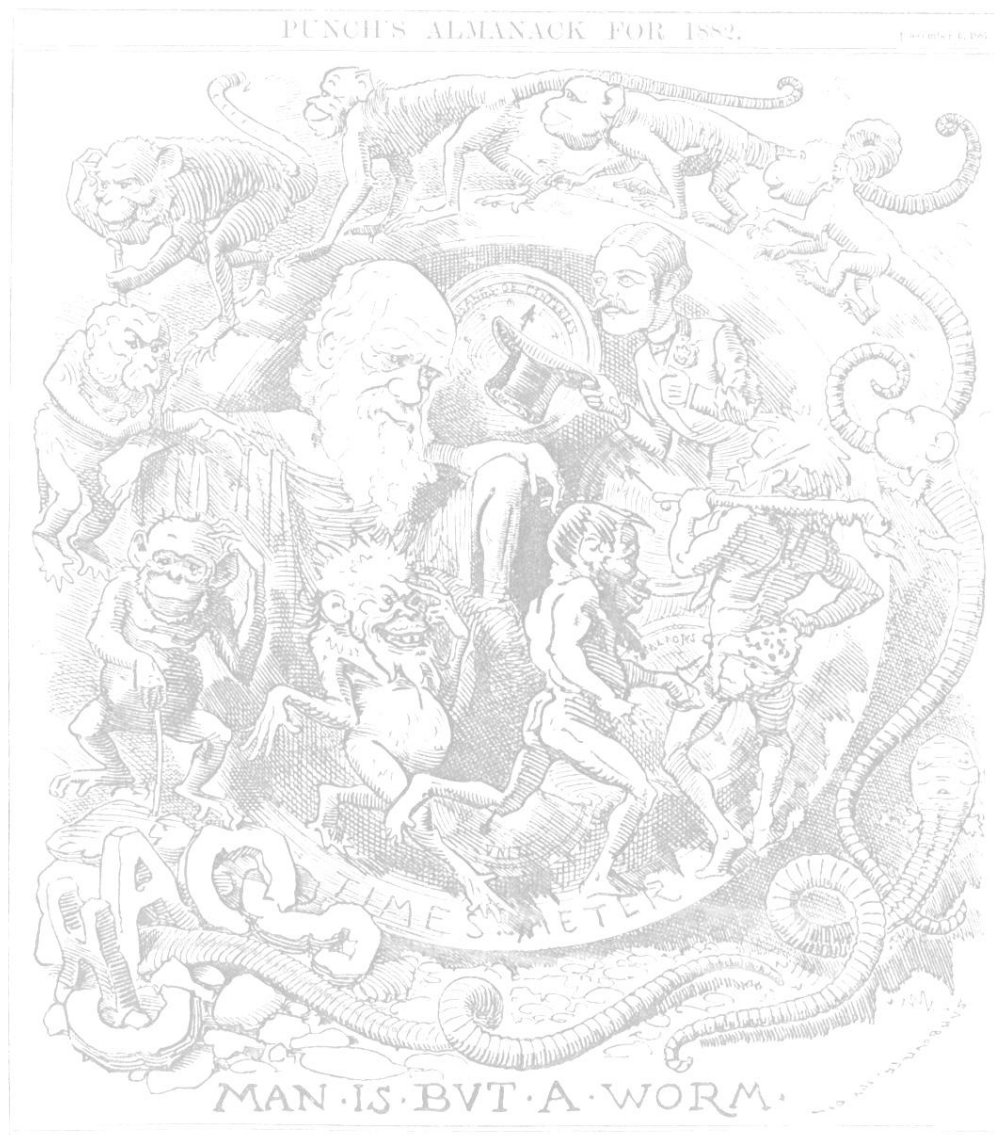
trapezoides más próxima a especies epigeas tales como *Eisenia fetida* (70 capullos durante sus 27 semanas de vida; Hartenstein et al., 1979).

Los resultados de este estudio de laboratorio pueden compararse con los obtenidos por McCredie et al. (1992), quienes estudiaron la dinámica poblacional de *A. trapezoides* en el campo en Australia. Los valores de algunos parámetros como el número de neonatos por capullo, el tiempo de incubación y el peso al alcanzar la madurez son similares en ambos estudios. Sin embargo, debido a la corta duración del experimento de campo de estos autores (19 semanas) no se mencionan otros parámetros importantes que se han tenido en cuenta en este experimento y que añaden información adicional para una imagen completa del ciclo de vida de esta importante especie.

Al contrario que los resultados obtenidos por Lowe y Butt (2008) para *Octolasion cyaneum*, la tasa de crecimiento y la fecundidad de *A. trapezoides* no estuvieron influenciadas por el estado individual de neonato único o gemelo, aunque los neonatos únicos tuvieron al eclosionar un peso medio casi el doble al de los gemelos. Después de los primeros 15 días, el peso medio no fue significativamente distinto en ambos tipos de neonatos, pero la tasa de mortalidad fue mayor en gemelos durante este período inicial. Lowe y Butt (2008) sugirieron que era más probable que algunos de los gemelos sobrevivan bajo condiciones ambientales adversas, simplemente al estar su número duplicado. Así, la formación de gemelos significaría una ventaja en el incremento de una población durante un evento de colonización de nuevas áreas, de tal manera que el mayor número de neonatos tendría más peso que el peso de cada uno. Sin embargo, en *A. trapezoides* las cosas parecen ocurrir de manera diferente: el estatus de neonato único/gemelo no parece tener ninguna influencia en el peso y, por tanto, el tamaño individual a largo plazo, pero sí en la tasa de mortalidad durante los 15 primeros días de vida. Así, parece existir un compromiso entre el número de neonatos por capullo y la mortalidad inicial de los mismos. En cualquier caso el número de ejemplares que sobreviven es mayor en gemelos, por lo que esta estrategia está siendo seleccionada como más adaptativa, y por eso hay más eclosiones dobles que simples.

En individuos recolectados en el campo, la tasa media de producción de capullos fue similar en lombrices aisladas y en grupos de tres. Por tanto, la presencia de otros individuos en el mismo microcosmos no tuvo ni un efecto positivo ni negativo en la reproducción. Sin embargo, dicha tasa fue mayor en individuos criados en laboratorio cultivados aislados que en grupos de tres. La densidad de lombrices influye el crecimiento, el peso y la fecundidad de los adultos (Edwards y Bohlen, 1996). Por ejemplo, la tasa de reproducción en *L. terrestris* se redujo a altas densidades de cultivo (15-25 g de lombriz en 2 kg de suelo; Lowe y Butt, 2005). En el presente estudio, se sugiere que la densidad utilizada (4 a 6 g de lombriz en 750 g de suelo) podría considerarse una alta densidad para *A. trapezoides*, produciendo un efecto negativo en la producción potencial de capullos (medida en individuos criados en el laboratorio). La inactividad periódica (estivación) observada en las lombrices recolectadas en el campo podría ser una posible causa de que este efecto no haya sido observado en lombrices recolectadas en el campo, al ser menor la perturbación física en el suelo.

Todos los individuos de *A. trapezoides* cultivados en aislamiento produjeron capullos viables durante todo el experimento, descartando la pseudogamia y la necesidad de estímulos físico-químicos para desencadenar la reproducción en esta especie. La producción de capullos fue mayor en individuos aislados que en aquellos cultivados en grupos de tres. Como algunos de los individuos recolectados en el campo entraron en estivación en varias ocasiones durante el experimento, se desconoce su capacidad reproductiva total. Sin embargo, los individuos criados en el laboratorio mostraron su capacidad reproductiva potencial, ya que sólo dos entraron en estivación en algún momento. Merece la pena mencionar que la producción de capullos se midió durante el primer año de vida en los individuos criados en el laboratorio, pero se desconoce la edad de los ejemplares recolectados en el campo. Se ha visto que la tasa de reproducción es dependiente de la edad en algunos invertebrados, pero pocos ejemplos pueden encontrarse en la literatura (por ejemplo, en la cercaria *Transversotrema patialense*; Mills, 2002). Sería interesante analizar si la producción de capullos varía con la edad en *A. trapezoides*.



Capítulo 7

Aproximaciones ultraestructurales en tres poblaciones de *Aporrectodea trapezoides* con diferente modo de reproducción.

Fernández et al. (in press). Ultrastructural and molecular insights into three populations of *Aporrectodea trapezoides* (Dugés, 1828) (Oligochaeta, Lumbricidae) with different reproductive modes. *Pedobiologia*. DOI 10.1016/j.pedobi.2011.04.003

Aporrectodea trapezoides es una lombriz con una amplia distribución que presenta formas partenogenéticas, pseudogámicas y sexuales. Se muestrearon individuos de tres poblaciones con distinto tipo de reproducción: una población sexual (ROB), una partenogenética (MOL) y otra población (SHB) con individuos que mostraban espermatecas llenas de esperma (indicando cópula) pero embudos masculinos vacíos (indicando producción inhibida de esperma). El análisis ultraestructural de las espermatecas de las tres poblaciones mostró presencia de esperma funcional en ROB, ausencia de esperma en MOL, y presencia de esperma en SHB con evidencia morfológica de degradación. La espermiogénesis resultó completa y normal en ROB pero aberrante en MOL y SHB, que contenían un número menor de células germinales en las vesículas seminales y mostraban una maduración incompleta de los espermatozoides. SHB y MOL también contenían una cantidad significativamente mayor de gotas lipídicas que ROB tanto en las espermatecas como en las vesículas seminales, indicando que los mecanismos involucrados en la nutrición del esperma no han sido alterados en las formas no sexuales.

Abstract

Aporrectodea trapezoides is a widely distributed earthworm, consisting of sexual, pseudogamic and parthenogenetic forms. We sampled individuals from three differently reproducing populations: one sexual population (ROB), one parthenogenetic population (MOL), and another population (SHB) where specimens had filled spermathecae (indicating copulation) but empty male funnels (indicating inhibited sperm production). Ultrastructure of spermathecae showed a high number of functional spermatozoa in ROB, no presence of any sperm in MOL, but presence of sperm in SHB, however, with morphological evidence for active degradation. Spermiogenesis was complete in ROB, but aberrant in MOL and SHB, which had less germ cells in the seminal vesicles and incomplete maturation of spermatozoa. SHB and MOL also showed a significantly higher amount of lipid droplets than ROB in spermathecae epithelium and seminal vesicles, indicating that the mechanisms involved in nurturing the sperm have not been altered.

Entre los lumbricidos, las formas partenogenéticas no solamente son muy comunes, sino que además muestran variedad en cuanto al modelo de partenogénesis: algunas formas son pseudogámicas (Omodeo, 1952; Suomalainen et al., 1987), mientras que otras son puramente partenogenéticas (Omodeo, 1952; Fernández et al., 2010). Esta variedad puede ocurrir incluso a nivel intraespecífico, y sugiere a priori un mecanismo de transición sexo-partenogénesis muy lábil, pareciendo indicar además diferentes orígenes de la reproducción uniparental en este grupo de oligoquetos.

Aporrectodea trapezoides presenta distintos modos de reproducción. En el capítulo 6 se probó que el clon más abundante de esta especie se reproduce partenogenéticamente, descartando la posibilidad de producción temporal de esperma. Omodeo (1951) descubrió una población pseudogámica en Italia, cerca de Nápoles, con indicios tanto de cópula (espermatecas llenas de esperma) como de producción de esperma. Por otra parte, en los capítulos 4 y 5 de esta tesis se habla de formas sexuales de *A. trapezoides*. Además, durante el estudio filogeográfico de esta especie (capítulo 2) se encontró una población en Saint Hilaire-du-Bois (Francia) con espermatecas llenas (por lo tanto, capaz de copular) pero con embudos masculinos vacíos (es decir, sin indicios de producción de esperma) que podría ser a priori una forma intermedia entre reproducción sexual y partenogenética. Por tanto, *A. trapezoides* es un sistema modelo muy adecuado para estudiar la transición de sexo a partenogénesis y sus consecuencias a diferentes niveles, ya que muestra no sólo formas sexuales y partenogenéticas conoespecíficas, sino también formas intermedias.

Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio es investigar las diferencias morfológicas en la producción de esperma (vesículas seminales) y la presencia de esperma en las espermatecas indicando cópula de los individuos en tres poblaciones de *A. trapezoides* en un gradiente sexo-partenogénesis. Para ello, se investigó en detalle i) la ultraestructura de las espermatecas en una población en la que las lombrices copulan pero no producen esperma para analizar la presencia y características del esperma contenido en ellas; y ii) la ultraestructura de las vesículas seminales en la población

anteriormente mencionada, en una población sexual y en otra población totalmente partenogenética para analizar la maduración y funcionalidad de la producción de esperma.

Materiales y Métodos

I. Recolección de lombrices

En Marzo de 2010, se recolectaron especímenes de *Aporrectodea trapezoides* totalmente clitelados mediante la técnica de excavación y separación manual en tres localidades diferentes: (Fig. 1): El Molar (MOL, forma partenogenética; provincia de Madrid; comunidad autónoma de Madrid, España) (2 individuos), Saint Hilaire-du-Bois (SHB, forma con espermatecas llenas y embudos masculinos vacíos, región de Aquitania, departamento de Gironde, Francia) (6 individuos) y Robledillo (ROB, forma sexual con dos pares de papilas en posición 11 y 12, asignable a *N. tetramammalis* según su descripción original; provincia de Toledo, comunidad autónoma de Castilla-La Mancha, España) (3 individuos).

II. Microscopía lumínica y electrónica de transmisión

Los especímenes se fijaron hasta su muerte en fijador de Karnovsky (2,5% de glutaraldehído y 2% de paraformaldehído) diluido en tampón HEPES 0,05 M y a pH 7,56 con un 4% de sacarosa y 0,01 mM de MgSO₄, enfriado previamente en hielo. El fijador se preparó utilizando paraformaldehído despolimerizado (Fluka, Buchs, Suiza) y glutaraldehído al 25% (Science Services, Munich, Alemania). Tras su muerte, las lombrices se mantuvieron sumergidas en el mismo fijador y fueron disecadas; las vesículas seminales y espermatecas fueron extraídas para su procesado; se mantuvieron

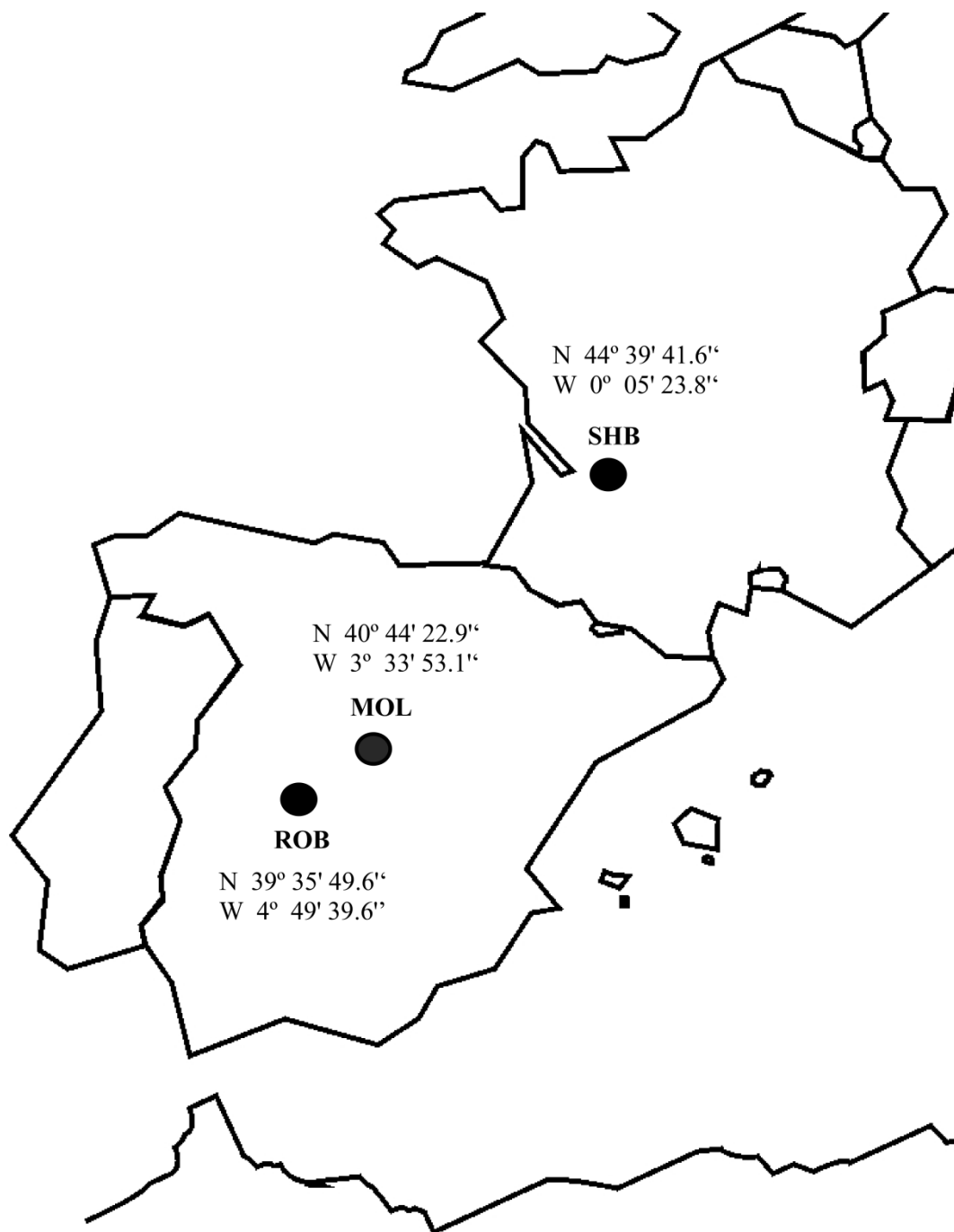


Fig. 1. Localización geográfica de las poblaciones estudiadas. Se indican las coordenadas GPS en cada caso.

2 h más en el fijador anteriormente mencionado en condiciones de vacío. Durante la disección, se prestó atención a la iridiscencia de los embudos masculinos, signo de producción de esperma, siendo iridiscentes en ROB pero no iridiscentes en SHB y MOL.

Los siguientes pasos se realizaron a 0°C. Los órganos se lavaron tres veces (10 minutos cada vez) en tampón HEPES 0,05 M (pH 7.56) y postfijados primero en tetróxido de osmio al 1% diluido en tampón HEPES 0,05 M (pH 7.56) durante una hora. Después de otros tres lavados de 10 minutos cada uno con el mismo tampón y las mismas condiciones de concentración y pH, las muestras fueron deshidratadas en un gradiente etanol-acetona como se indica a continuación: etanol 30% y 50% durante 10 minutos, acetato de uranilo diluido en etanol al 70% durante toda la noche, etanol 70% durante 10 minutos (dos lavados) , etanol 80%, 90%, 95% y 100% durante 10 minutos (tres lavados con cada uno), y finalmente acetona 100% durante 30 minutos (dos lavados) a temperatura ambiente. Después de la deshidratación, las muestras fueron infiltradas gradualmente en una mezcla acetona-resina 3:1 y 1:1 durante 90 minutos cada vez en viales abiertos colocados en una plataforma rotatoria a 180 rpm durante toda la noche y a temperatura ambiente. Finalmente, fueron incluidas en resina epoxy (Araldite CY212 Premix Kit, Plano GmbH Wetzlar, Alemania). La polimerización se llevó a cabo en una estufa a 60° durante 72 h.

Se obtuvieron secciones semifinas (0,5 µm) y ultrafinas (50 nm) cortadas con un microtomo Reichert Ultracut (Leica-Jung, Vienna, Austria) y cuchillas de diamante (Diatome 45°, Biel, Suiza). Las secciones semifinas se tiñeron con azul de Stevenel y se observaron en un microscopio lumínico Zeiss Axioplan. Las fotografías se procesaron con el programa AxioVision 4.0 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). Las secciones ultrafinas para microscopía electrónica de transmisión (TEM) se posttiñeron con acetato de uranilo diluido en etanol al 50% durante 20 minutos, seguido de citrato de plomo durante 12 minutos. Se emplearon un microscopio electrónico Siemens Elmiskop 1A (Siemens, Alemania) y un FEI Tecnai 10 (FEI, Holanda) a 80 kV.

Para calcular la cantidad relativa de gotas lipídicas encontradas tanto en las espermatecas como en las vesículas seminales (medida como la superficie ocupada en las fotografías) se tomaron al azar 10 fotos (1750X) en 1 mm² por rejilla en 5 rejillas por individuo para que el muestreo fuera hecho en las tres dimensiones y para comprobar que la distribución de las gotas era homogénea. El programa ImageJ 1.43 se utilizó para realizar estas mediciones. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica 6.0.

I. Espermatecas

Las espermatecas de las tres poblaciones resultaron tener una estructura y ultraestructura completamente diferente. Tanto en la población sexual (ROB) como en la partenogenética (MOL), el lumen ocupaba una gran parte del volumen (Fig. 2a y Fig. 3a), y estaba rodeado de un fino epitelio formado por células elongadas y cilíndricas con numerosas microvellosidades, rodeadas por una cápsula de tejido conectivo. El tejido alrededor del lumen parecía homogéneo en microscopio lumínico, siendo la única diferencia un teñido aparentemente menos intenso y una diferenciación citoplásmica mayor en ROB que en MOL. En ROB, el lumen estaba ocupado por una masa densa de esperma maduro embebido en una sustancia fibrosa, mientras que en MOL estaba totalmente vacío. En la población con espermatecas llenas pero embudos vacíos (SHB) (Fig. 4a), el lumen estaba muy reducido debido a que el epitelio de la espermateca era mucho más grueso que en las otras muestras. Las células epiteliales eran aproximadamente el doble de anchas y varias veces más largas que en las otras poblaciones y mostraban signos conspicuos de diferenciación citoplásmica, con una parte basal vacuolar menos teñida y una porción apical más oscura. El contenido del lumen también era diferente respecto a las muestras anteriores, con esperma disperso y una tinción general menos densa.

En cuanto a la ultraestructura, había también claras diferencias. En ROB, los espermatozoides estaban densamente empaquetados (Fig. 2c). Su estructura era similar

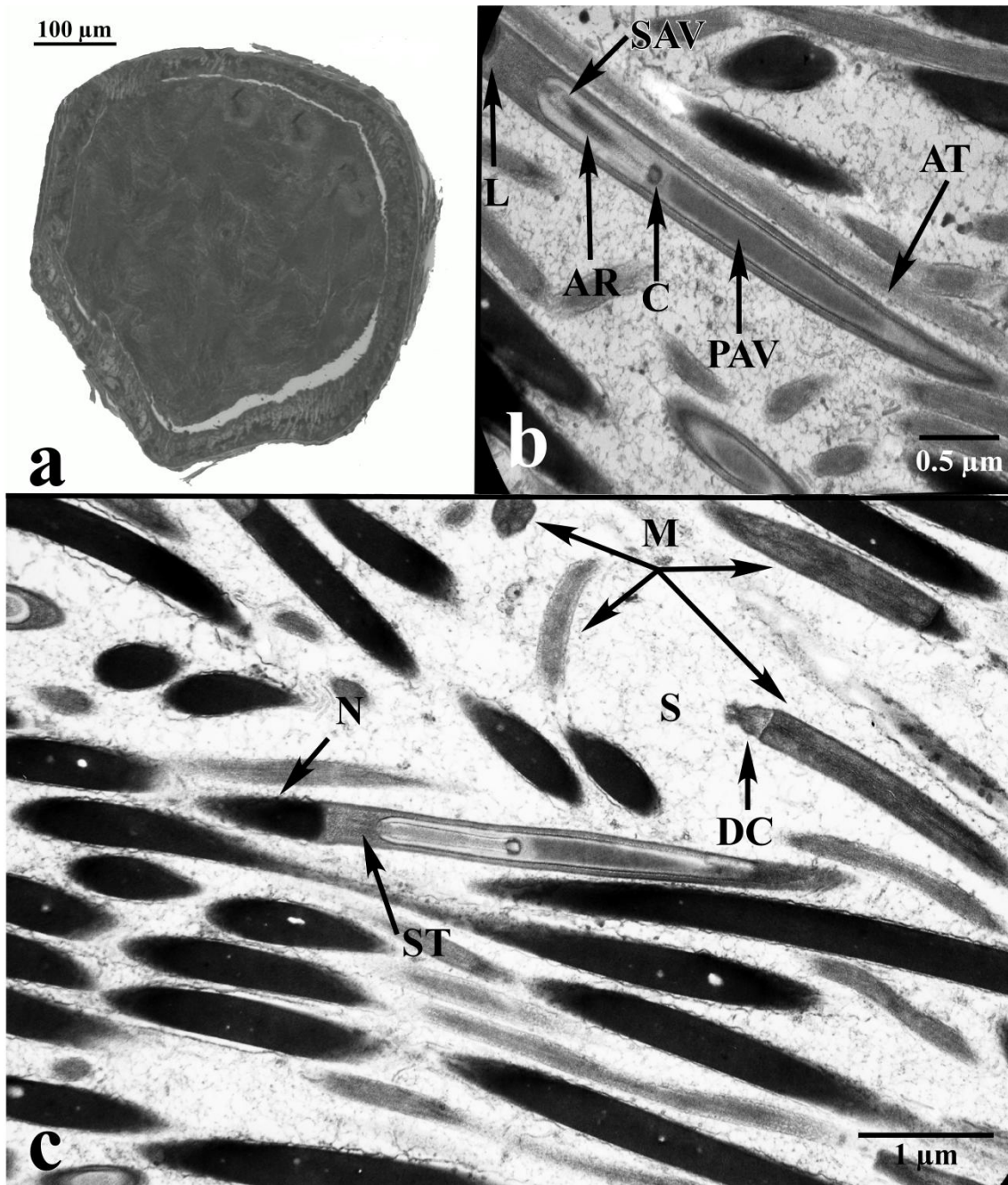


Fig. 2. a. Sección semifina de la espermateca en la población sexual (Robledillo, ROB). Se observa el lumen lleno de esperma. b-c. Secciones ultrafinas en las que se muestra el contenido del lumen. b. Detalle del espermatozoide maduro. AT Tubo acrosomal. PAV Vesícula acrosomal primaria. SAV Vesícula acrosomal secundaria. C Capitulum. AR Varilla axial. L Limen. M Pieza media en la que las seis mitocondrias se disponen alrededor de un eje central. N Núcleo. ST Tubo secundario. DC Centríolo distal. S Sustancias de secreción que forman la matriz del lumen.

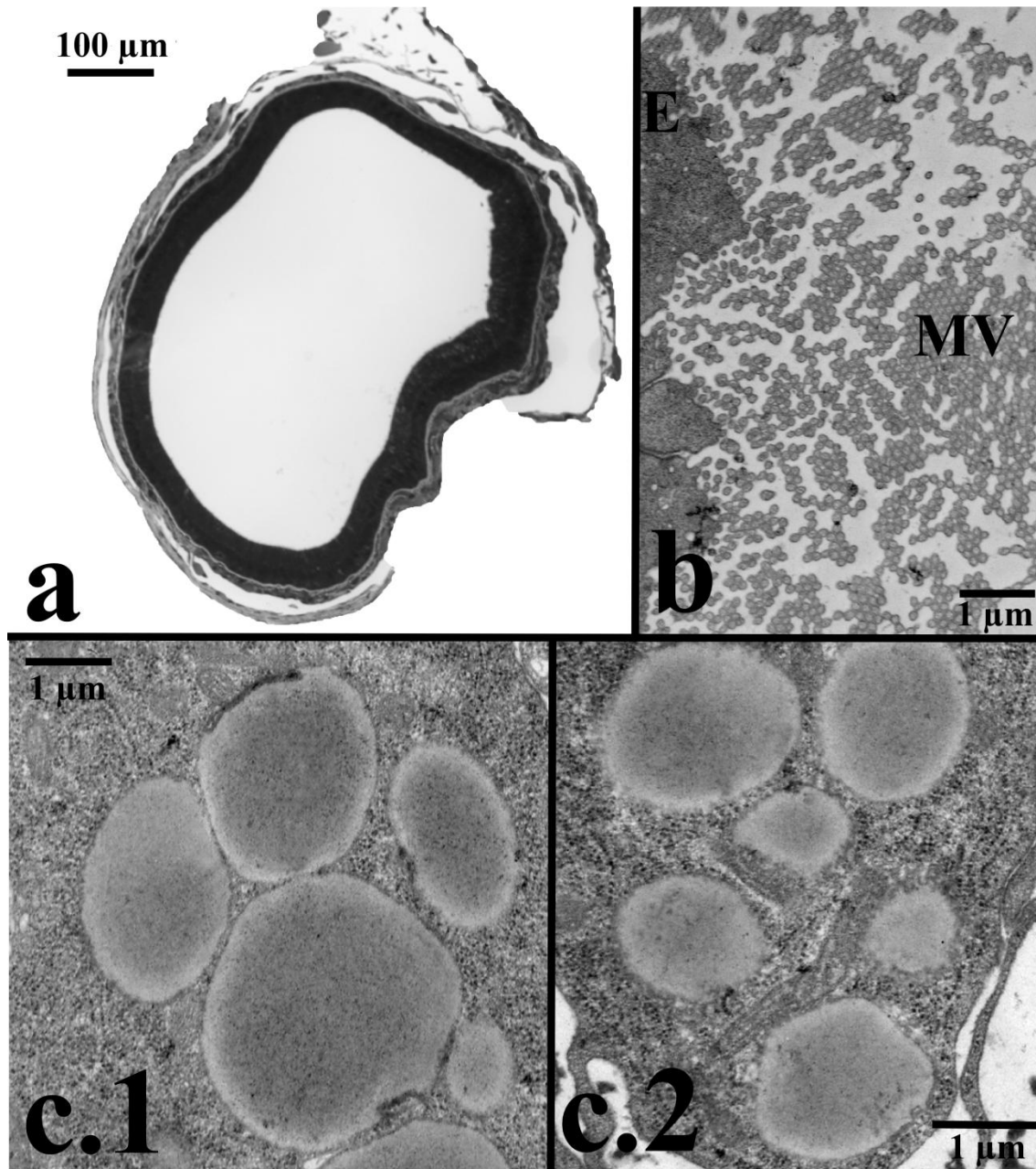


Fig. 3. a. Sección semifina de la espermateca de la población partenogenética (El Molar, MOL). El epitelio es fino y el lumen está totalmente vacío. b.-c. Secciones ultrafinas que muestran el epitelio. b. Detalle de las microvellosidades (MV). c. Detalle de las gotas lipídicas.

a la observada en otras especies de lumbrícidos: el acrosoma implantado en la punta del núcleo elongado y condensado, las mitocondrias de la pieza media del espermatozoide (el llamado 'nebenkern') cerca del extremo distal del núcleo, el complejo centriolar y el flagelo, constituido por el axonema con citoplasma alrededor y la membrana axonémica

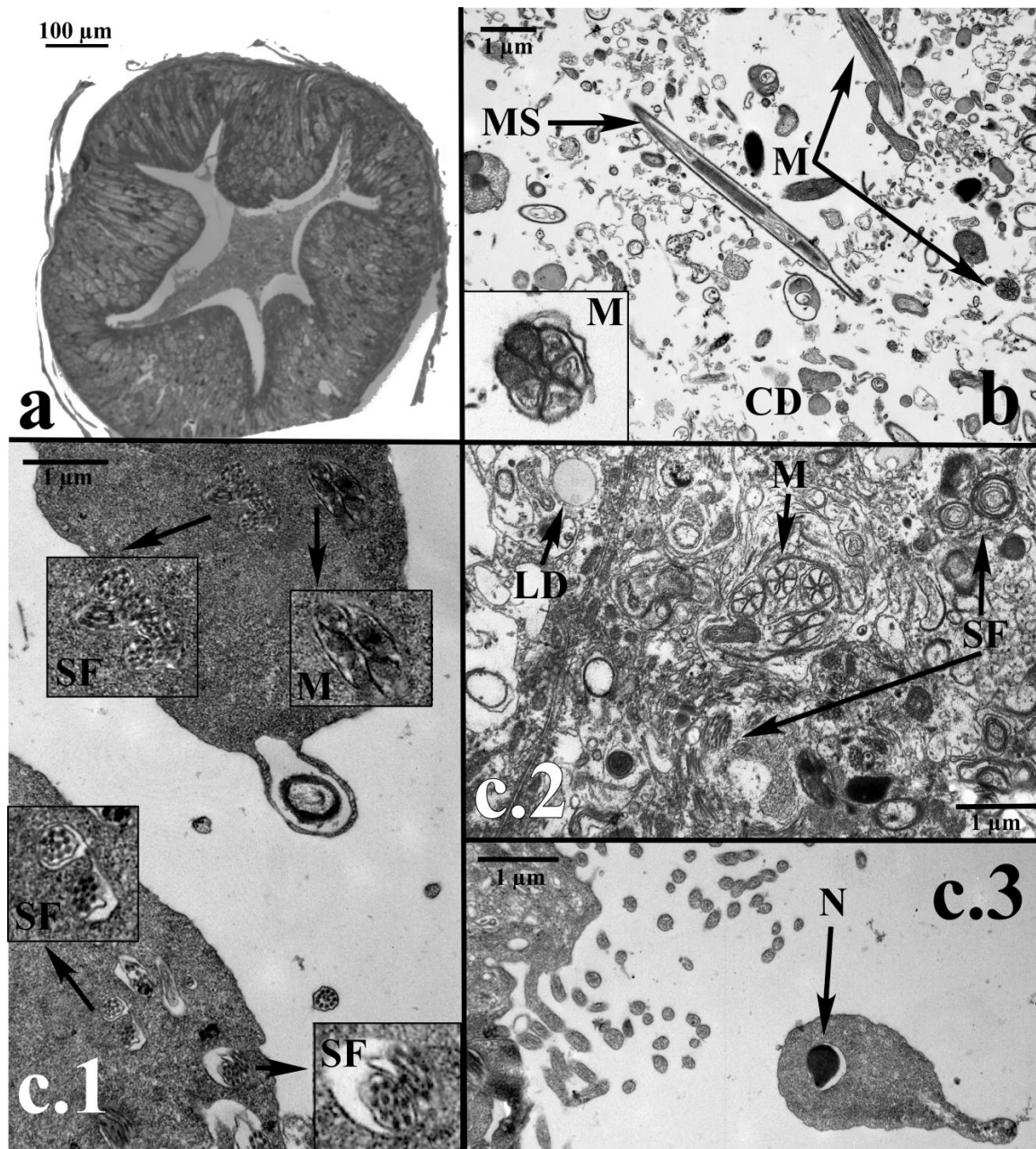


Fig. 4. a. Sección semifina de la espermateca en la población Saint-Hilaire-du-bois (SHB). El epitelio está muy engrosado y el lumen se encuentra muy reducido. b. Sección ultrafina mostrando el contenido del lumen. La matriz contiene desechos celulares (CD) y espermatozoides maduros (MS) en proceso de degradación. c. Epitelio de la espermateca. Degradación activa del espermatozoide maduro. c.1 y c.3. Detalle de fagocitosis en un espermatozoide maduro. M Pieza central en la que las seis mitocondrias se disponen alrededor del eje central; la apariencia anormal de la membrana de la mitocondria denota degradación. SF Flagelo del espermatozoide. N. Núcleo del espermatozoide. LD Gotas lipídicas.

(Fig. 2b, c). Se encontraron gotas lipídicas de pequeño tamaño homogéneamente distribuidas en la pared de la espermateca (una media del 1.5% de la superficie total del tejido). En SHB, el contenido del lumen contenía espermatozoides degradados y restos celulares

(Fig. 4b). El epitelio mostraba numerosos espermatozoides aparentemente fagocitados de manera individual o en grupos, y siendo degradados dentro de vesículas endocíticas en el epitelio citoplásmico (Fig. 4c). La presencia de gotas lipídicas de distinto tamaño (una media de 4.9% de la superficie de tejido total) era común en el citoplasma epitelial. En MOL, ni espermatozoides ni restos celulares se observaron en el lumen (Fig. 3a, b). Además, la cantidad de gotas lipídicas en el tejido era mayor que en las otras muestras (una media de 6.4% de la superficie de tejido total) (ANOVA, $F_{(7,7)}=4.454$; $P<0,05$), pero sólo significativamente mayor que en la población sexual (t de Student; $t_{(8)}= -11,339$; $P<0,05$). SHB y ROB también difirieron significativamente en la cantidad de gotas lipídicas ($t_{(8)}= -9,997$; $P<0,05$).

II. Vesículas seminales

En las vesículas seminales, las espermatogonias llegan desde los testículos para sufrir el proceso de espermiogénesis, pasando por los estadios de espermatocito primario y secundario y desarrollándose en espermátidas que finalmente se convierten en espermatozoides maduros. Todos estos estadios de maduración se observaron en la población sexual (Fig. 5), mientras que en SHB y MOL no se encontraron espermatozoides maduros. El número de células germinales observadas fue significativamente diferente en las tres poblaciones, mucho menos abundantes en MOL y SHB que en ROB (ANOVA, $F_{(7,7)}=5.874$; $P=0.037$). En MOL y SHB, se observaron células germinales en el estadio de espermatocito de distinto grado (Fig. 6 and 7). El estadio de maduración más avanzado que se observó fue el de espermátida. Tanto en MOL como en SHB, se observaron diferencias morfológicas en las células germinales respecto a las células en ROB, como forma irregular en el núcleo de espermátidas (Fig. 6b) en vez de forma redondeada, y presencia de menos orgánulos. Otra diferencia principal fue la superficie ocupada por gotas lipídicas (una media de 1,2%, 5,7% and 6,7% de la superficie total en ROB, SHB y MOL, respectivamente). El tamaño de las gotas lipídicas resultó ser

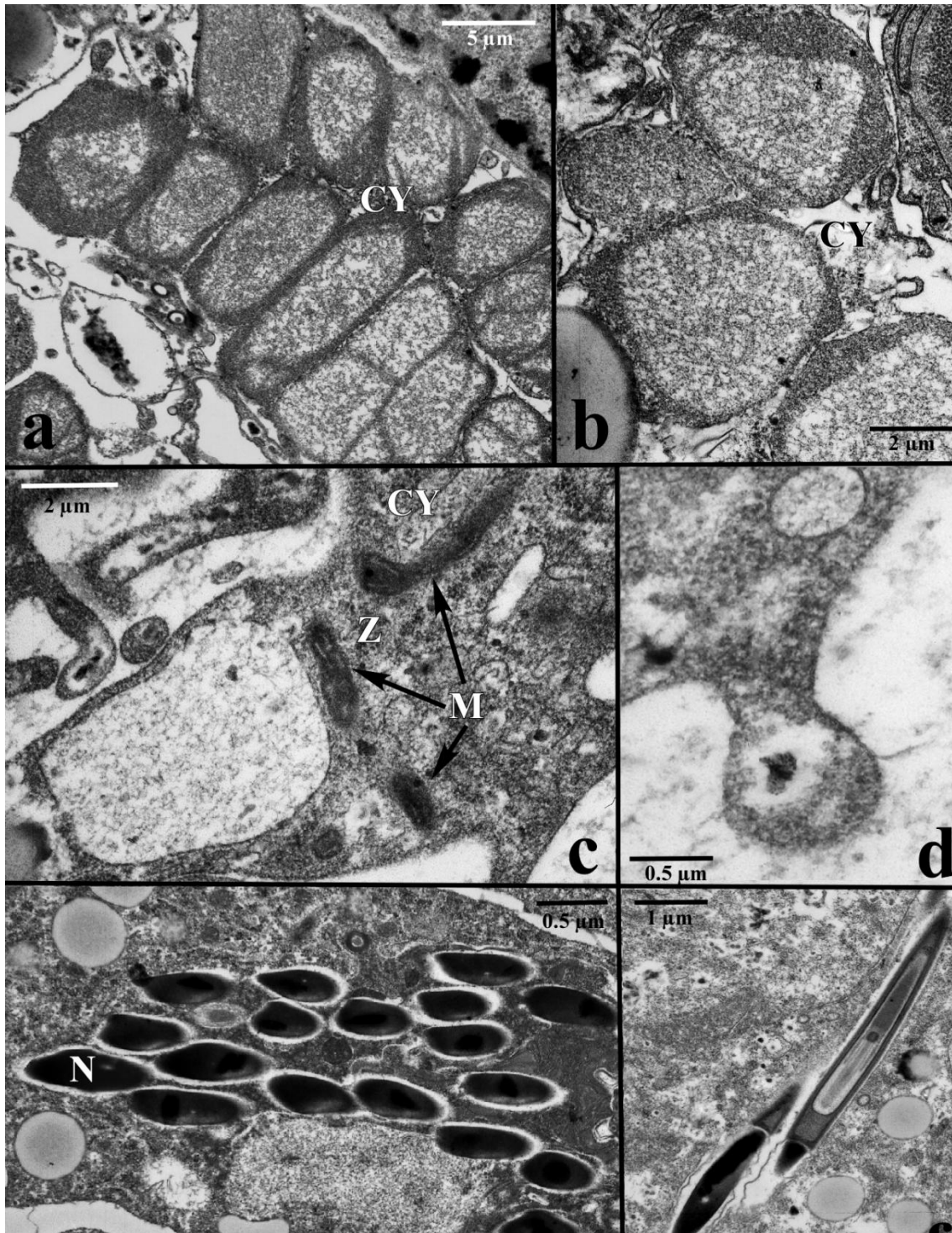


Fig. 5. a-f. Vesículas seminales en la población sexual (ROB). a-b. Espermatida temprana en mórula. CY Citóforo. c. Espermatida unida al citóforo. Se observan las mitocondrias migrando a través de la zonula collaris (Z). d. Detalle de espermatida madura separándose de la mórula. e. Sección transversal del espermatozoide maduro a nivel del núcleo (N). f. Sección longitudinal del espermatozoide maduro.

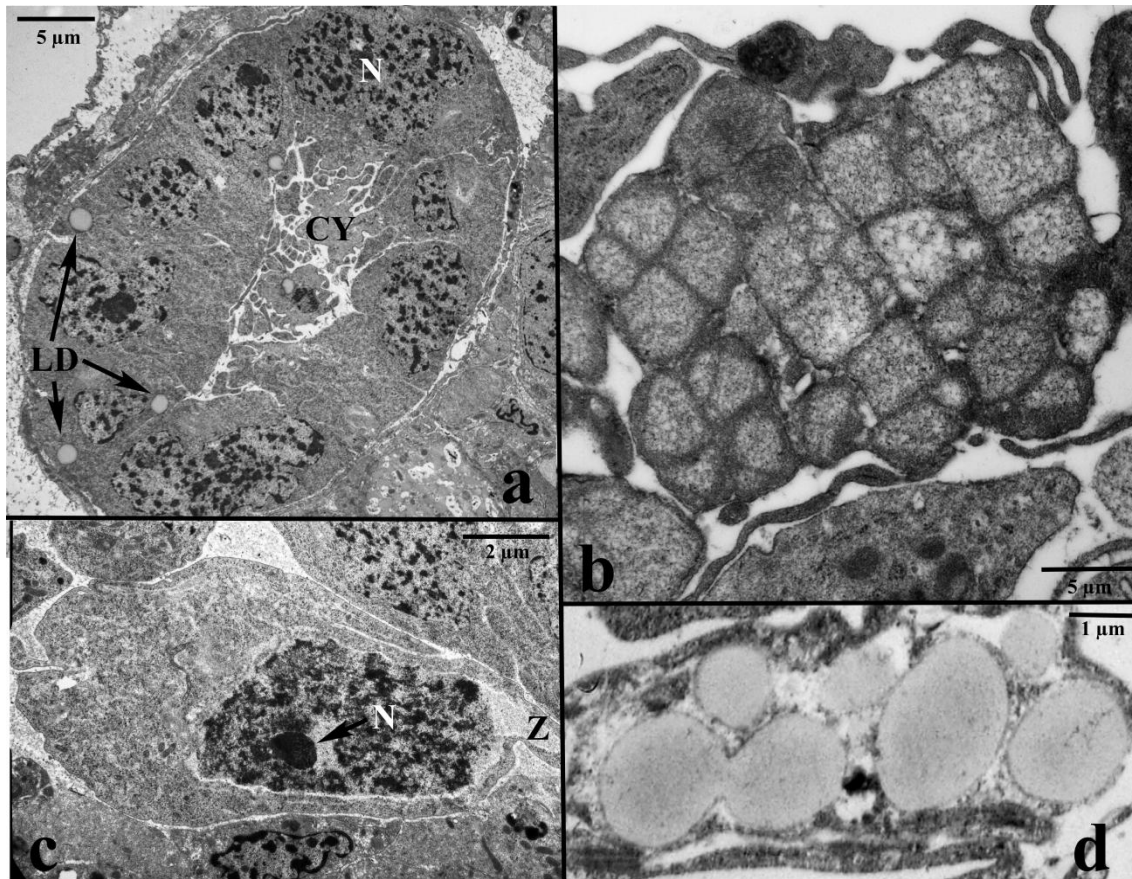


Fig. 6. a-d. Vesículas seminales en la población de Saint-Hilarie-du-Bois (SHB). a. Espermatogonia en interfase unida al citóforo (CY). LP Gotas lipídicas. b. Espermatidas en mórula. c. Detalle del espermatocito primario unido al citóforo a través de la zonula collaris (Z). d. Detalle de gotas lipídicas.

altamente variable (de menos de un micrómetro a más de 5 μm). La forma en las gotas más pequeñas era redonda, y en las grandes ovalada. Al igual que ocurría en el epitelio de la espermateca, la cantidad de gotas lipídicas en el tejido de las vesículas seminales fue similar en MOL y SHB ($t\text{-test}_{(8)} = -1,500$; $P = 0,1720$), y significativamente mayor que en ROB (ANOVA, $F_{(7,7)} = 4,884$; $P = 0,028$). En MOL y SHB, la mayor parte de las mitocondrias encontradas en el citoplasma se encontraban próximas a las gotas lipídicas (Fig. 7c), y sus crestas eran muy densas a los electrones.

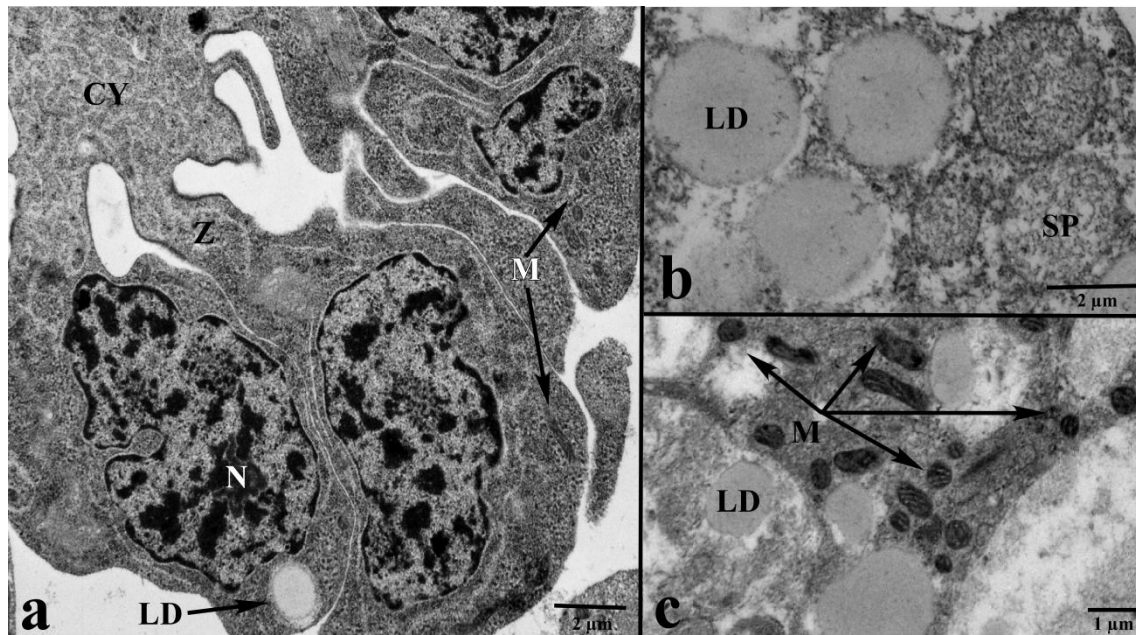


Fig. 7. a-c. Vesículas seminales en la población partenogenética (MOL). a. Espermatogonia en interfase unida al citóforo (CY) a través de la zonula collaris (Z). M Mitocondria, N Núcleo. b. Ejemplo de espermatida temprana (SP) cercana a gotas lipídicas (LD). c. Detalle de zona rica en mitocondrias (M) cercanas a gotas lipídicas (LD).

Discusión

El objetivo principal de este trabajo es realizar una aproximación morfológica para analizar las diferencias entre varias poblaciones de la misma especie: una población sexual, una partenogenética y una tercera en la que los individuos muestran signos de cópula pero no producción espermática.

Aunque no es objetivo de este trabajo el estudio en profundidad de la espermiogénesis en *A. trapezoides*, se obtuvieron datos suficientes para sugerir que la espermiogénesis en la población sexual (ROB) es similar a la descrita en otros lumbrícidos (Jamieson, 1981). Los distintos estadios de la espermatogénesis, primero esféricos y después elongados, se desarrollan alrededor de un citóforo anucleado del cual se separan como espermatozoides maduros al final del proceso. Al final del proceso de maduración de las espermatidas, sólo 6 mitocondrias migran a la región de la pieza media (lo que se conoce como 'nebenkern'); antes de ello sufren una profunda modificación en su forma y distribución intracelular. Así, las mitocondrias se alargan y sus crestas se vuelven

irregulares. Este detalle, mostrado en este estudio (Fig. 5c, 7c), no es frecuentemente descrito en la bibliografía de oligoquetos sobre el tema. El espermatozoide maduro también muestra las mismas características morfológicas que otros lumbrícidos (complejo axonémico, núcleo, capitulum, pieza media y flagelo) (Rolando et al., 2007; Anderson et al., 1967; Jamieson et al., 1981).

La presencia de espermatogonias, espermatoцитos y espermatidas en las vesículas seminales de las poblaciones uniparentales (MOL y SHB) conllevan la producción de células germinales masculinas en los testículos. Por qué los testículos siguen produciéndolas sigue siendo un misterio. Los resultados de este estudio corresponden a las observaciones de Omodeo (1952) para esta misma especie, quien observó que en algunas poblaciones casi todas las células germinales degeneraban antes de alcanzar las vesículas seminales, mientras que en otras estas células maduraban hasta el estadio de espermatida, que posteriormente eran fagocitadas. En MOL y SHB, las células germinales masculinas sufren un proceso de maduración aberrante tal como estableció Omodeo (1951 a,b) para las formas partenogénicas de *A. trapezoides*, aunque no se describe un patrón de degradación, simplemente se menciona la acumulación de estructuras aberrantes durante el proceso de maduración. El estadio de maduración más avanzado en estas poblaciones fue el de espermatidas en mórula, que no llegan nunca a alcanzar el estadio de espermatozoide inmaduro. Sin embargo, la presencia de esperma en las espermatecas en SHB abre la interesante pregunta de quién es el posible donante. Como se mencionó en la introducción, Omodeo (1952) encontró una población pseudogámica en Italia en la que se describe una espermiogénesis aberrante, pero fueron observados unos pocos espermatozoides. De acuerdo con esto, parece plausible que individuos de ambas condiciones coexistan y copulen. Por otra parte, también puede establecerse la hipótesis de que el donante sea un individuo de una especie próxima del 'complejo caliginosa' (Gates, 1972; Pérez Losada et al., 2009), dentro del cual se incluye *A. trapezoides*. Es llamativo que tanto los caracteres sexuales primarios como secundarios (por ejemplo, tubérculos pubertarios y papilas) son muy conspicuos en las formas partenogénicas aunque la cópula es teóricamente no necesaria, sugiriendo o bien que estos órganos son más resistentes a la mutación o bien que la esterilidad masculina apareció recientemente en un tiempo evolutivo. Los resultados de los estudios filogenéticos y filogeográficos de capítulos anteriores parecen apoyar este último punto.

En lumbrídeos, pseudogamia y partenogénesis parecen estar relacionadas con poliploidía (Omodeo, 1951b, 1953a, 1953b). En *A. trapezoides*, se han encontrado formas triploides y tetraploides (Omodeo, 1952, 1955; Casellato, 1987; Cobolli-Sbordoni et al., 1987), siendo la forma triploide la dominante, mientras que sólo se encontraron individuos tetraploides en dos poblaciones. Omodeo (1951a, 1952, 1955) describió una espermiogénesis abortiva en ambas formas que era debida a una ineficiencia en el mecanismo mitótico. A pesar de ello, un porcentaje mínimo de células germinales produjeron esperma maduro de manera exitosa en la forma tetraploide (Omodeo, 1955). El autor también describe en esta forma la penetración del espermatozoide en el óvulo y la expulsión de dos polocitos. En SHB, sin embargo, la espermiogénesis fue aparentemente completamente abortiva y se observaron evidencias de degradación y digestión en el esperma acumulado en las espermatecas, por lo que no parece posible que esta población sea pseudogámica, ya que si no el esperma debería ser almacenado en la espermateca en buenas condiciones al ser necesario para fertilizar al óvulo. Sin embargo, se necesitan evidencias citológicas para evaluar si esta población es pseudogámica o los individuos simplemente copularon accidentalmente. Tampoco queda resuelto si el esperma encontrado en la espermateca viene de la misma especie o población (en este caso, algunos individuos producirían esperma mientras que otros no) o de otra distinta. La forma triploide estudiada por Omodeo (1951 a, 1952, 1955) resultó ser partenogénica. Por el momento, no existen datos sobre el nivel de ploidía de los individuos empleados en este estudio; futuras investigaciones sacarán a la luz la correspondencia entre el nivel de ploidía y el modo de reproducción en estas poblaciones.

En otros animales, como en las salamandras, se ha observado la presencia de gotas lipídicas en las espermatecas, cumpliendo la función de fuente endógena de energía (Zalisko y Larsen, 1990) y estando normalmente asociadas con las mitocondrias y el retículo endoplasmático, lo que sugiere su papel en la producción endógena de energía (Sever, 1993). En *A. trapezoides*, las diferencias observadas en la cantidad de gotas lipídicas, significativamente mayor en SHB y MOL que en ROB, sugiere que en estas poblaciones el aporte de recursos nutritivos continúa funcionando, pero el resultado es su acumulación, posiblemente porque esta energía no es necesaria para alimentar al

esperma maduro en las espermatecas, ni para producirlo en las vesículas seminales. Este hecho sugiere que a pesar de que el modo de reproducción en estas poblaciones sea partenogénesis o un modo intermedio hacia este estado, los mecanismos implicados en la nutrición del esperma no han sido alterados y/o suprimidos. Así, a pesar de la falta de esperma, las vesículas seminales seguirían reteniendo su organización funcional, lo que podría ser un signo de partenogénesis reciente. Esta abundante fuente de energía no utilizada podría explicar la alta carga parasítica normalmente observada en las vesículas seminales de esta especie (Díaz Cosín y Fernández, observación personal).



Capítulo 3

Conclusiones y futuras líneas/Conclusions

A lo largo de esta tesis se ha realizado una aproximación al conocimiento de la biología evolutiva y reproductiva de *A. trapezoides*, poniendo énfasis en la reproducción partenogenética de esta especie. Es poco lo que se conoce sobre el origen y/o mantenimiento de este tipo de reproducción en lombrices de tierra, y los resultados obtenidos en esta tesis, aunque básicos, pueden ser un excelente punto de partida para estudios evolutivos más profundos y ambiciosos. Las localidades muestreadas en el capítulo 5 de esta tesis serán uno de los puntos de partida: contamos actualmente con un número grandísimo de individuos recolectados en localidades donde coexisten formas presumiblemente sexuales y partenogenéticas.

El primer paso a seguir será conseguir evidencias directas sobre la certeza o no de la asunción de que los individuos maduros con espermatecas vacías son partenogenéticos y los de espermatecas llenas son sexuales, lo que abordaremos inmediatamente realizando cultivos en laboratorio. A continuación, y siempre que nuestra asunción sea cierta, se secuenciarán un mayor número de genes en muchos más individuos, y se desarrollarán marcadores microsátélites que nos permitirán estudiar en profundidad las relaciones de parentesco entre lombrices sexuales y asexuales, así como la heterocigosis en los individuos partenogenéticos, que puede ser una fuente de información sobre el posible origen de la partenogénesis. Además, se harán pruebas para desechar otros orígenes poco probables de este tipo de reproducción uniparental, como el origen infeccioso. Se intentará realizar además una datación más precisa de ambos linajes encontrados recolectando por un lado individuos de Córcega y Cataluña/sur de Francia (datación del linaje A) y por otro lombrices norteafricanas y del sur de España (linaje B), utilizando como punto de calibración la separación de la placa norteafricana de la ibérica. De esta manera se pretende datar tanto la diversificación como el origen más antiguo de la partenogénesis en ambos linajes, así como la aparición del clon 1.

Cabe mencionar en este punto que durante 9 meses de este período de realización de la tesis doctoral se intentó amplificar distintos genes de copia única para comprobar si el origen de las formas partenogenéticas de alguno o de los dos linajes era por hibridación, tal como parecía sugerir que cada linaje estuviera emparentado con especies sexuales distintas. Estos experimentos se realizaron en los laboratorios de la Universidad Eberhard-Karls de Alemania en colaboración con el Dr. Michael Heethoff. Se intentaron

amplificar hasta 5 genes de copia única distintos (Factor de elongación α -1, TBP – TATA-binding protein, hsp 82 – heat-shock protein 82, POLII -subunidad grande de la RNA polimerasa II, factor de elongación II –EF2) empleando cebadores de otros grupos animales (por ejemplo, ácaros y rotíferos), ya que por el momento este tipo de genes no se han amplificado en lombrices de tierra. Lamentablemente, los resultados no fueron buenos, ya que los cebadores no amplificaban en la mayor parte de las muestras. Por otra parte, se detectó la presencia de grandes intrones en los genes elegidos, lo que dificultó el diseño de primers específicos. Fue un año después de estos intentos cuando comenzó nuestra participación en el proyecto BIOBIO y empezamos a tener indicios de que el origen de las formas partenogenéticas puede parecer no tener nada que ver con procesos de hibridación, tal como se discute en el capítulo 5. Por fortuna, ahora tenemos otro punto de salida muy prometedor para investigarlo.

Otra prioridad será conocer la ploidía de todos los individuos que se secuencian. Ya que la realización del cariotipo de todos los individuos estudiados es inviable (la mayoría se fijan en el campo al ser recolectados, además de que su número es muy grande), se intentó poner a punto la determinación de la ploidía mediante un citómetro de flujo en el Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT, Madrid). Lamentablemente, los resultados tampoco fueron positivos debido a la falta de un protocolo adecuado. En el futuro, se intentará optimizar la técnica con el objetivo de conocer la ploidía de todos los individuos que se secuencien.

Esta tesis también ha tenido implicaciones taxonómicas importantes. Como se discutió en varios capítulos, es conocida la existencia de dos o más linajes muy divergentes en varias especies de lombrices de tierra. En algunos casos, se ha propuesto la creación de dos especies distintas, como en *Lumbricus terrestris* y *L. herculeus* (James et al., 2010). Por ello, no es realmente sorprendente que existan dos linajes en *A. trapezoides*, pero sí lo es que su distribución se refleje a nivel biogeográfico. Estos resultados invitan a seguir investigando por qué, a intentar definir mejor los dos linajes consiguiendo muestras de otros países europeos y a contrastar los resultados moleculares con datos paleogeográficos.

Si bien la alta divergencia de varios linajes en lombrices de tierra no es novedosa, sí que lo es la existencia de un clon muy predominante y con una distribución cuasi mundial. Investigaciones más profundas nos ayudarán a saber con exactitud su distribución y el por qué de su éxito colonizador, lo que puede ayudar a entender mejor las ventajas de la partenogénesis y algunas invasiones biológicas.

Otras implicaciones taxonómicas importantes están relacionadas con la labilidad de los caracteres morfológicos en lombrices de tierra, o al menos en este grupo de especies. Incluso individuos con distinta longitud del clitelo mostraron el mismo haplotipo en los genes más variables. Esta observación, aunque es también muy inicial, requiere ser estudiada en profundidad ya que puede probarse con herramientas moleculares la validez de este y quizás de otros caracteres morfológicos empleados normalmente en la taxonomía de lombrices de tierra. Esto puede ser interesante y prometedor ya que normalmente la concordancia entre datos taxonómicos y moleculares en lombrices de tierra suele ser bastante mala.

En definitiva, esta tesis abre muchas y muy interesantes perspectivas en la investigación sobre las lombrices de tierra, tanto a nivel taxonómico como molecular e incluso ecológico. Y aunque abre muchas más preguntas de las que cierra, por suerte los nuevos interrogantes son más interesantes y prometedores, y sin duda de alguna manera ayudarán a conocer mejor a este grupo de animales del que cada día nos damos más cuenta de que no sabemos prácticamente nada.

Siguiendo la descripción original de los objetivos particulares propuestos en la introducción de esta tesis, las conclusiones de esta memoria son las siguientes:

I. ESTUDIOS A MACROESCALA.

A. Filogeografía de *A. trapezoides* (capítulos 2 y 3).

1. La diversidad clonal de *A. trapezoides* es alta. Se han encontrado 37 haplotipos para el gen COII. Aproximadamente un tercio de los individuos muestreados pertenecían al mismo clon (clon 1).

2. Existen dos linajes filo y biogeográficamente bien diferenciados (linajes I y II).

3. No existen diferencias morfológicas apreciables entre ambos linajes.

4. En general, el linaje I presenta una distribución eurosiberiana, y el linaje II mediterránea. Los clones de distribución más amplia (1, 4 y 9) pertenecen filogenéticamente al linaje II.

5. Ambos linajes parecen haber tenido la misma historia demográfica. Ambos representan grupos estables que no han estado sometidos a expansiones repentinas recientes.

B. Filogenia del complejo de especies *Aporrectodea caliginosa* (capítulo 4).

6. *A. caliginosa* y *A. tuberculata* forman un clado muy separado del resto de especies. El linaje I de *A. trapezoides* está filogenéticamente relacionado con *A. longa*, *A. giardi* y *A. nocturna*. El linaje II forma un clúster con las tres 'especies' descritas en *Nicodrilus*, con multitud de politomías. Se postula que el linaje II de *A. trapezoides* está formado por formas partenogenéticas y sexuales.

7. Ambos linajes de *A. trapezoides* representan entidades evolutivas muy distintas, filogenéticamente relacionadas con diferentes especies sexuales.

8. Las especies taxonómicas no quedan bien delimitadas con los métodos empleados (modelo GMYC y regla del 4X).

9. La partenogénesis en *A. trapezoides* ha tenido al menos dos orígenes distintos.

10. La diversificación del grupo de especies comenzó hace entre 56 y 24 millones de años. La separación de los dos clados que contienen formas de *A. trapezoides* ocurrió hace entre 42 y 18 millones de años. La diversificación del clado de formas eurosiberianas se produjo hace entre 35 y 14 millones de años, y la del clado de formas mediterráneas hace entre 29 y 11.

II. ESTUDIOS A MESOESCALA.

C. Análisis de varias poblaciones de *A. trapezoides* que contienen individuos con espermatecas llenas y vacías (capítulo 5).

11. Parece que existe una estructuración genética que se refleja en un patrón de aislamiento por distancia entre localidades muestreadas.

12. Los individuos con espermatecas llenas y vacías comparten haplotipos. Lo mismo ocurrió con individuos con distinto número/posición de papilas y longitud de clítelos.

13. Los individuos con espermatecas llenas y vacías presentaron los mismos caracteres morfológicos.

14. El origen de las formas partenogenéticas parece ser múltiple y ocurre frecuentemente. Con los datos existentes se descarta por el momento el origen híbrido, y se hipotetiza un origen espontáneo y/o contagioso.

III. ESTUDIOS A MICROESCALA.

D. Ciclo biológico del clon predominante en *A. trapezoides* (clon 1) (capítulo 6).

15. El clon 1 de *A. trapezoides* tiene un ciclo de vida relativamente rápido. Su éxito reproductivo es alto, con una media de 105 capullos por año y una alta viabilidad de los neonatos.

16. Existe cierta plasticidad fenotípica dentro de los individuos de este clon respecto al tamaño, número de segmentos y forma de la cola.

E. Análisis morfológico y ultraestructural de los órganos reproductores masculinos de *A. trapezoides* con espermatecas llenas y vacías (capítulo 7):

17. Existen claras diferencias morfológicas y ultraestructurales tanto en espermatecas como en vesículas seminales en las tres poblaciones estudiadas. En MOL no se observan signos de cópula y la espermiogénesis es aberrante. En ROB, se observaron espermatozoides sanos en las espermatecas y espermiogénesis normal. En SHB, se produjo la degradación del esperma guardado en las espermatecas y la espermiogénesis era aberrante.

18. Se postula que SHB es una población con reproducción con rasgos de sexual y partenogenética, ya que parece no producir esperma viable pero es capaz de copular, aunque no podemos asegurar si lo hace entre congéneres o con otras especies próximas.

Following the original description of the particular objectives proposed in the introduction of this thesis, the conclusions could be summed up as follows:

I. MACROSCALE STUDIES.

A. Phylogeography of de *A. trapezoides* (chapters 2 and 3).

1. *A. trapezoides* showed a high clonal diversity. Thirty-seven haplotypes were found for the COII gen. Aproximately one third of the sampled earthworms shared the same clone (clone 1).

2. Two phylo- and biogeographically-distinct lineages were recovered E (lineages I y II).

3. No noticeable morphological differences were observed between both lineages.

4. In general, lineage I showed a Eurosiberian distribution, and lineage II a Mediterranean one. The clones with a broader distribution (1, 4 and 9) belonged phylogenetically to lineage II.

5. Both lineages seem to have had the same demographic history. Both seem to be stable groups that did not suffer recently a sudden expansion.

B. Phylogeny of the *Aporrectodea caliginosa* species complex (chapter 4).

6. *A. caliginosa* and *A. tuberculata* clúster together in a clade apart from the rest of the species. Lineage I of *A. trapezoides* is phylogenetically close to *A. longa*, *A. giardi* and *A. nocturna*. Lineage II clústers together with the three 'species' discribed as *Nicodrilus*. It is considered that lineage II of *A. trapezoides* is formed by parthenogenetic and sexual forms.

7. Both lineages of *A. trapezoides* seem to be very different evolutionary entities, as they are phylogenetically related to different sexual species.

8. Taxonomic species were not well-delimited while using the GMYC model and the 4X rule.

9. Parthenogenesis in *A. trapezoides* seems to have had at least two different origins.

10. Diversification of the group of species started between 56 and 24 millions of years ago. The separation of the clades that contain forms of *A. trapezoides* occurred between 42 and 18 millions of years. The diversification of the group with Eurosiberian forms was dated to have occurred between 35 and 14 millions of years, while in the group of Mediterranean forms between 29 and 11 millions of years.

II. MESOSCALE STUDIES.

C. Analysis of different populations of *A. trapezoides* containing individuals with full and empty spermathecae (chapter 5).

11. It seems to exist a strong genetic structure; a pattern of isolation by distance explained the genetic divergences among the sampled localities.

12. The same haplotypes were shared among individuals with empty and full spermathecae, and among earthworms with different number/position of papillae and length of clitellum.

13. Individuals with empty and full spermathecae showed the same morphological characters.

14. The origin of the parthenogenetic forms seems to be multiple and frequent. A hybrid origin was ruled out for the moment, and a spontaneous and/or contagious origin are discussed.

III. MICROSCALE STUDIES.

D. Life cycle of clone 1 of *A. trapezoides* (chapter 6).

15. Clone 1 of *A. trapezoides* has a relatively fast life cycle. Its reproductive fitness is high, reaching a mean of 105 cocoons per year and a high viability of hatchings.

16. It exists some phenotypic plasticity within the individuals sharing this clone regarding its size, number of segments and shape of the tail.

E. Morphological and ultrastructural analysis of sexual organs in *A. trapezoides* with empty and full spermathecae (chapter 7):

17. There are clear morphological and ultrastructural differences in spermathecae and seminal vesicles from the three studied populations. In MOL, there were not signs of copula and spermiogenesis was aberrant. In ROB, mature sperm was observed in the spermathecae and spermiogenesis was normal. In SHB, sperm was degraded in the spermathecae and spermiogenesis was aberrant.

18. It is discussed that SHB could be a population with a reproductive condition in between sex and parthenogenesis, as individuals do not produce viable sperm but they copulate, although it could not be known if they copulate with individuals from the same or different species.



Referencias

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J., 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389–3402.

Anderson, W.A., Weissman, A., Ellis, R.A., 1967. Cytodifferentiation during spermiogenesis in *Lumbricus terrestris*. *Journal of Cell Biology* 32, 11-26.

Ankel, W.E., 1927. Neuere Arbeiten zur Zytologie der natürlichen Parthenogenese der Tiere. *Z. Indukt. Abstamm. Vererbungsl.* 45, 232- 278.

Baker, J. M., Funch P., Giribet G., 2007. Cryptic speciation in the recently discovered American cyclophoran *Symbion americanus*; genetic structure and population expansion. *Marine Biology*. 151, 2183-2193.

Barley, K.P., 1958. The influence of earthworms on soil fertility. II. Consumption of soil organic matter by the earthworm *Allolobophora caliginosa*, Savigny. *Australian Journal of Agricultural Research* 10, 179-185.

Beatty, R. A., 1957. Parthenogenesis and Polyploidy in Mammalian Development. Cambridge University Press, London.

Bell, G., 1982. The Masterpiece Of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality. University of California Press, Berkeley.

Birky, C. W., Barraclough, T. G., 2009. Asexual Speciation, in: I. Schön, K. Martens and P. J. Van Dijk, Eds., *Lost Sex. The Evolutionary Biology of Parthenogenesis*. Springer, Dordrecht, pp. 77-99.

Birky, C.W. Jr., Wolf, C., Maughan, H., Herbertson, L., Henry, E., 2005. Speciation and selection without sex. *Hydrobiologia* 546, 29-45.

Birky, C.W., Adams, J., Gemmel, M., Perry, P., 2010. Using Population Genetic Theory and DNA Sequences for Species Detection and Identification in Asexual Organisms. *PLoS ONE* 5, 1-11.

Blakemore, R.J., 1999. The diversity of exotic earthworms in Australia – a status report. In: W. Ponder, D. Lunney, eds.. Proceedings of “The other 99%”. TRZS NSW, pp 182-187.

Blakemore, R.J., 2006. Cosmopolitan Earthworms – An Eco-Taxonomic Guide to the peregrine species of the world. 2nd Ed. VermEcology, Japan.

Blakemore, R., 2006. Cosmopolitan Earthworms – an Eco-Taxonomic Guide to the Peregrine Species of the World. VermEcology, PO BOX 414 Kippax, ACT 2615, Australia.

Bode, S.N.S., Adolfsson, S., Lamatsch, D.K., Martins, M.J.F., Schmit, O., Vandekerkhove, J., Mezquita, F., Namiotko, T., Rossetti, G., Schön, I., Butlin, R. Martens, K., 2010. Exceptional cryptic diversity and multiple origins of parthenogenesis in a freshwater ostracod. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54, 542–552.

Bøgh, P.S., 1992. Identification of earthworms, Lumbricidae.: choice of method and distinction criteria. *Megadrilogica* 4, 163-174.

Bouché, M.B., 1972. *Lombriciens de France. Écologie et Systématique*. Institut National de la Recherche Agronomique. *Annales de Zoologie Écologie animale*. Numéro hors série. Paris.

Brafield, A.E., Llewellyn, M.J., 1982. *Animal Energetics*. Blackie and Son Ltd., Glasgow, UK.

Briones, M.J.I., 1993. Two ecotypes in *Allolobophora caliginosa* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Acta Oecologica* 14, 317-325.

Briones, M.J.I., 1996. A taxonomic study of the *Allolobophora caliginosa* complex, Oligochaeta, Lumbricidae.: a preliminary study. *Canadian Journal of Zoology* 74, 240-244.

Brown, G.

Brun, J.J., Cluzeau, D., Trehen, P. Bouché, M.B., 1987. Biostimulation: the prospects and limitations of the biological improvement of soil by stimulation or introduction of earthworms. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol* 24, 685-701.

Buckley, T.R., Attanayake, D., Park, D., Ravindran, S., Jewell, T.R., Normark, B.B., 2008. Investigating hybridization in the parthenogenetic New Zealand stick insect *Acanthoxyla*, Phasmatodea. using single-copy nuclear loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48, 335-349.

Butt, K.R., 1993. Reproduction and growth of three deep-burrowing earthworms , Lumbricidae. in laboratory culture in order to assess production for soil restoration. *Biology and Fertility of Soils* 16, 135-138.

Casellato, S., 1987. On polyploidy in Oligochaetes with particular reference to Lumbricids. In: *On Earthworms*. A. M. Bonvicini Pagliai and P. Omodeo , eds.. Selected Symposia and Monographs U.Z.I., 2, Mucchi, Modena, pp. 75-87.

Casellato, S., Rodighiero, R., 1972. Karyology of Lumbricidae. III Contribution. *Caryologia*, 25, 513-524.

Chang, C.H., Chen, J.H., 2005. Taxonomic status and intraspecific phylogeography of two sibling species of *Metaphire*, Oligochaeta: Megascolecidae. in Taiwan. *Pedobiologia* 49, 591-600.

Chang, C.H., Lin, S.M., Chen, J.H., 2008. Molecular systematics and phylogeography of the gigantic earthworms of the *Metaphire formosae* species group (Clitellata, Megascolecidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49, 958-968.

Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657-1659.

Cobolli-Sbordoni, M., De Matthaëis, E., Bidoli, R. Rodinò, E., 1987. Allozyme variation and divergence between diploid and triploid populations of *Allolobophora caliginosa* ,Lumbricidae, Oligochaeta, in: A. M. Bonvicini Pagliai and P. Omodeo , Eds. *On earthworms*. Selected Symposia and Monographs U.Z.I., 2, Mucchi, Modena, pp 53-74.

Cobolli Sbordoni, M., De Matthaeis, E., Alonzi, A., Mattoccia, M., Omodeo, P., Rota, E., 1992. Speciation, genetic divergence and palaeogeography in the Hormogastridae. *Soil Biology and Biochemistry* 24 (12), 1213-1221.

Colgan, D.J., McLauchlan, A., Wilson, G.D.F., Livingston, S.P., Edgecombe, G.D., Macaranas, J., Cassis, G. Gray, M.R., 1998. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Australian Journal of Zoology* 46, 419-437.

Collin, R., 2001. The effects of mode of development on phylogeography and population structure of North Atlantic *Crepidula* (Gastropoda: Calyptraeidae). *Molecular Ecology* 10, 2249-2262.

Csuzdi, C., Pop, A.A., Pop, V.V., Wink, M., Zicsi, A., 2005. Revision of the *Dendrobaena alpina*, Rosa, 1884. species group, Oligochaeta, Lumbricidae, by morphological and molecular methods. En: Pop V.V. and Pop A.A. , Eds.. *Advances in Earthworm Taxonomy II*, Cluj University Press, Cluj-Napoca, pp. 119-128.

Csuzdi, C.S., Zicsi, A., 2003. Earthworms from Hungary, Annelida: Oligochaeta; Lumbricidae. Hungarian Natural History Museum. Budapest, 271 pp.

Curry, J.P. Bolger, T., 1984. Growth, reproduction and litter and soil consumption by *Lumbricus terrestris* L. in reclaimed peat. *Soil Biology and Biochemistry* 16, 253-257.

Curry, J.P., Boyle, K.E., 1987. Growth rates, establishment, and effects on herbage yield of introduced earthworms in grassland on reclaimed cutover peat. *Biology and Fertility of Soils* 3, 95-98.

Darwin, C., 1881. The formation of vegetable mould through the actions of worms. John Murray, London, 326 pp.

De Mischis, C.C., 1997. Earthworms (Annelida, Oligochaeta) of a provincial reserva in Córdoba, Argentina: A preliminary survey. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 235-236.

Decäens, T., Mariani, L., Betancourt, N., Jiménez, J.J., 2003. Seed dispersion by surface casting activity of earthworms in Colombian grasslands. *Acta Oecologica* 24, 175-185.

Domínguez, J., 2004. State of the art and new perspectives on vermicomposting research. In: C.A. Edwards (ed) *Earthworm Ecology* (2nd edition). CRC Press LLC, pp 401-424.

Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees." *BMC Evolutionary Biology* 7, 214.

Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A., 2006. *PLoS Biology* 4, 88.

Dunger, W., 1969. Fragen der natürlichen und experimentellen Besiedlung kulturfeindlicher Böden durch Lumbriciden. *Pedobiologia* 9, 146-151.

Dupont, L., 2009. Perspectives on the application of molecular genetics to earthworm ecology. *Pedobiologia* 52, 3, 191-206.

Dupont, L., Lazrek, F., Porco, D., King, R.A., Rougerie, R., Symondson, W.O.C., Livet, A., Richard, B., Decäens, T., Butt, K.R., Mathieu, J., 2011. New insight into the genetic structure of the *Allolobophora chlorotica* aggregate in Europe using microsatellite and mitochondrial data. *Pedobiologia* 54, 217-224.

Dyer, A.R., Fowler, J.C.S., Baker, G.H., 1998. Detecting genetic variation in exotic earthworms, *Aporrectodea* spp. ,Lumbricidae. in Australian soils using RAPD markers. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 159-165.

Edwards, C.E., Bohlen, P.J., 1996. *Biology and Ecology of Earthworms*. Chapman Hall, London.

Eriksen-Hamel, N.S., Whalen, J.K., 2006. Growth rates of *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta: Lumbricidae) as influenced by soil temperature and moisture in disturbed and undisturbed soil columns. *Pedobiologia* 50, 207-215.

Farris J. S., Källersjö, M, Kluge, A. G., Bult, C., 1994 Testing significance of congruence. *Cladistics* 10, 315-319

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.

Fernández, R., Almodóvar, A., Novo, M., Gutiérrez, M., Díaz Cosín, D. J., 2011. A vagrant clone in a peregrine species: phylogeography, high clonal diversity and geographic distribution in *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828). *Soil Biology and Biochemistry* 43, 2085-2093.

Fernández, R., Bergmann, P., Almodóvar, A. Díaz Cosín, D.J., Heethoff, M., in press. Ultrastructural and molecular insights into three populations of *Aporrectodea trapezoides*, Dugès, 1828 (Oligochaeta, Lumbricidae) with different reproductive modes. *Pedobiologia*, DOI 10.1016/j.pedobi.2011.04.003

Fernández, R., Novo, M., Gutiérrez, M., Almodóvar, A. Díaz Cosín, D.J., 2010. Life cycle and reproductive traits of the earthworm *Aporrectodea trapezoides*, Dugès, 1828. in laboratory cultures. *Pedobiologia* 53, 295–299.

Field, S.G., Lange, M., Schulenburg, H., Velavan, T.P., Michiels, N.K., 2007. Genetic diversity and parasite defense in a fragmented urban metapopulation of earthworms. *Animal Conservation* 10, 162–175.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxydase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 294- 299.

Fraser, P.M., Williams, P.H., Haynes, R.J., 1996. Earthworm species, population size and biomass under different cropping systems across the Canterbury Plains, New Zealand. *Applied Soil Ecology* 3, 49-57.

Garvín, M.H., Trigo, D., Hernández, P., Díaz Cosín, D.J., 2003. Gametogenesis and reproduction in *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae). *Invertebrate Biology* 122 (2), 152-157.

Gates, G.E., 1972. Contributions to North American earthworms ,Annelida, Oligochaeta. No. 3. Toward a revision of the earthworm family Lumbricidae. IV. The trapezoides species group. Bulletin of the Tall Timbers Research Station 12, 1-146.

Gates, G.E. 1974. Contributions to a revision of the family Lumbricidae. X. *Dendrobaena octaedra* (Savigny, 1826) with special reference to the importance of its parthenogenetic polymorphism for the classification of earthworms. Bulletin of the Tall Timbers Research Station 15, 15-57.

Goloboff, P.A., Farris, J.S., Nixon, K.C., 2003. T.N.T: Tree Analysis Using New Technology, version 1.1.

Guindon, S. Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Systematic Biology 52, 696-704.

Haccou, P., Schneider, M.V., 2004. Modes of reproduction and the accumulation of deleterious mutations with multiplicative fitness effects. Genetics 166, 1093-1104.

Halanych, K.M., Janosik, A.M., 2006. A review of molecular markers used for Annelid phylogenetics. Integrative and Comparative Biology 46, 533-543.

Hale, C.M., Frelich, L.E., Reich, P.B., 2005. Exotic European earthworm invasion dynamics in northern hardwood forest of Minnesota, USA. Ecological Applications 15, 848-860.

Hamilton, W.E., Vimmerstedt, J.P., 1980. Earthworms on forested soil banks, in: D. L. Dindal (Ed.). Soil Biology as Related to Land Use Practices. Proceedings of the 7th International Soil Zoology Colloquium, Syracuse, New York, pp. 409-417.

Harpending, H. C., 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution Human Biology 66, 591-600.

Harrison, R.G., 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. Trends in Ecology and Evolution 4, 6-11.

Hartenstein, R., Neuhauser, E.F., Kaplan, D.L., 1979. Reproductive potential of the earthworm *Eisenia foetida*. *Oecologia* 43, 329-340.

Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, K., 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22, 160-174.

Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J. R., 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 270, 96-99.

Heethoff, M., Etzold, K., Scheu, S., 2004. Mitochondrial COII sequences indicate that the parthenogenetic earthworm *Octolasion tyrtaeum* (Savigny, 1826) constitutes of two lineages differing in body size and genotype. *Pedobiologia* 48, 9-13.

Heethoff, M., Domes, K., Laumann, M., Maraun, M., Norton, R.A., Scheu, S., 2007. High genetic divergences indicate ancient separation of parthenogenetic lineages of the oribatid mite *Platynothrus peltifer*, Acari, Oribatida. *J. Evolution. Biol.* 20, 392 – 402.

Hewitt, G.M., 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10, 537-549.

Hoogerkamp, M., 1984. The effect of earthworms ,Lumbricidae and "grass sickness" on the productivity of grassland. *Verslag Centrum voor Agrobiologischen Onderzoek* 52, pp. 71.

Hoogerkamp, M., Rogaar, H. Eijsackers, H.J.P., 1983. Effect of earthworms on grassland on recently reclaimed polder soils in the Netherlands, in: J.E. Satchell, Ed. *Earthworm Ecology, from Darwin to Vermiculture*. Chapman and Hall, London, pp. 85-105.

Huang, J., Xu, Q., Jun Sun, Z., Lan Tang, G., You Su, Z., 2007. Identifying earthworms through DNA barcodes. *Pedobiologia* 51, 301-309.

Huelsenbeck, J. P., Imenov, N.S., 2002. Geographic origin of human mitochondrial DNA: Accommodating phylogenetic uncertainty and model comparison. *Systematic Biology* 51, 155-165.

Huelsenbeck, J. P., Larget, B., Miller, R.E., Ronquist, F., 2002. Potential applications and pitfalls of Bayesian inference of phylogeny. *Systematic Biology* 51, 673-688.

Huhta, V., 1979. Effects of liming and deciduous litter on earthworm (Lumbricidae) populations of a spruce forest, with an inoculation experiment on *Allolobophora caliginosa*. *Pedobiologia* 19, 340-345.

Huntley, B., Birks, H.J.B., 1983. *An Atlas of Past and Present Pollen Maps for Europe: 0-13,000 Years Ago*. Cambridge University Press, Cambridge.

Jaenicke, J., Selander, K., 1979. Evolution and ecology of parthenogenesis in earthworms. *American Zoologist* 19, 729-737.

James, S.W., Porco, D., Decaëns, T., Richard, B., Rougerie, R., Erséus C., 2010. DNA Barcoding Reveals Cryptic Diversity in *Lumbricus terrestris* L., 1758 (Clitellata): Resurrection of *L. herculeus* (Savigny, 1826). *PLoS One*, 5 (12): 1-8.

Jamieson, B.G.M., 1981. *Ultrastructure of the Oligochaeta*. Academic Press, London.

Jensen, J.L., Bohonak, A.J., Kelley, S.T., 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6, 13-18. Disponible en: <http://ibdws.sdsu.edu/>

Karmegan, N., Daniel, T., 2009. Growth, reproductive biology and life cycle of the vermicomposting earthworm, *Perionyx ceylanensis* Mich., Oligochaeta: Megascolecidae. *Bioresource Technol.* 100, 4790-4796.

Keselman, H.J. Algina, J., Kowalchuk, R.K., 2001. The analysis of repeated measures designs: a review. *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology* 54, 1-20.

King, R.A., Tibble, A.L., Symondson, W.O.C., 2008. Opening a can of worms: unprecedented sympatric speciation within British lumbricid earthworms. *Molecular Ecology* 17, 4684-4698.

Kingman, J.F.C., 1982. On the genealogy of large populations. *Journal of Applied Probability* 19, 27-43.

Kreuzer, K., Bonkowski, M., Langel, R., Scheu, S., 2004. Decomposer animals, Lumbricidae, Collembola. and organic matter distribution affect the performance of *Lolium perenne*, Poaceae. and *Trifolium repens*, Fabaceae. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 2005-2011.

Lavelle, P., 1979. Relations entre types ecologiques et profils démographiques chez les Vers de terre de la savane de Lamto (Cote-d'Ivoire). *Revue d'Ecologie et Biologie du Sol* 16 (1), 85-101.

Lavelle, P., Bignell, D., Lepage, M., Wolters, V., Roger, P., Ineson, P., Heal, O.W., Dhillon, S., 1997. Soil function in a changing world: The role of invertebrate ecosystem engineers. *European Journal of Soil Biology* 33, 159-193.

Lavelle, P., 1988. Earthworm activities and the soil system. *Biology and Fertility of Soils* 6, 237-251.

Lee, K.E., 1985. *Earthworms: ecology and relationships with soils and land use*. Academic Press, Sydney.

Lee, K.E., 1987. Peregrine species of earthworms. *On earthworms*, ed. By A.M. Bonvicini Pagliai and P. Omodeo., pp. 315-327. *Selected Symposia and Monographs*. U.Z.I., 2, Mucchi, Módena.

Lee, C.E., Frost, B.W., 2002. Morphological stasis in the *Eurytemora affinis* species complex (Copepoda: Temoridae). *Hydrobiologia* 480, 111-128.

Li, W. H., 1993. Unbiased estimation of the rates of synonymous and nonsynonymous substitution. *Journal of Molecular Evolution* 36, 96-99.

Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.

Ligthart, T.N., Peek, G.J.C.W., 1997. Evolution of earthworm burrow systems after inoculation of lumbricid earthworms in a pasture in the Netherlands. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 453-462.

Lowe, C.N., Butt, K.R., 2005. Culture techniques for soil dwelling earthworms: a review. *Pedobiologia* 49, 401-413.

Lowe, C.N., Butt, K.R., 2007. Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: a critical review. *European Journal of Soil Biology* 43, 281-288.

Lowe, C.N., Butt, K.R., 2008. Life cycle traits of the parthenogenetic earthworm *Octolasion cyaneum*, Savigny, 1826. *European Journal of Soil Biology* 44, 541-544.

Lunt, D.H., 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: Evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology* 5, 153-165.

Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research* 27, 209-220.

Mark Welch, D., Meselson, M., 2000. Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science* 288, 1211-1214.

Mark Welch, J., Mark Welch, D.B., Meselson, M., 2004. Cytogenetic evidence for asexual evolution of bdelloid rotifers. *PNAS* 101, 1618-1621.

Mayr, E., 1963 *Animal Species and Evolution*. Harvard University. Press, Cambridge, Massachusetts.

McCredie, T.A., Parker, C.A., Abbott, I., 1992. Population dynamics of the earthworm *Aporrectodea trapezoides*, Annelida: Lumbricidae, in a Western Australian pasture soil. *Biology and Fertility of Soils* 12, 285-289.

Michaelsen, W. , 1900. *Oligochaeta*. *Das Tierreich* 10. P. Friedlander and Sohn, Berlin.

Michaelsen, W., 1903. Die geographische Verbreitung der Oligochaeten. Friedländer Sohn, Berlin.

Michiels, N.K., 1999. Sexual adaptation to high density in hermaphrodites. *Invertebrate Reproduction and Development* 36, 1-3, 35-40.

Mills, C.A., 2002. Age- and density-dependent growth within populations of the ectoparasitic digenean *Transversotrema patialense* on the fish host. *International Journal of Parasitology* 10, 287-291.

Mollison, B., 1988. *Permaculture- A Designer's Manual*. Tagari Press.

Monroy, F., Aira, M., Gago, J.A., Domínguez, J., 2007. Life cycle of the earthworm *Octodrilus complanatus*, Oligochaeta, Lumbricidae. *Comptes Rendues Biologies* 330, 389-391.

Muldal, S., 1952. The chromosomes of the earthworms. I. The evolution of polyploidy. *Heredity* 6, 55-76.

Nei, M, Kumar, S., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, UK.

Nixon, K.C., 2002. *Winclada*, version 1.00.08. Published by the author, Ithaca, New York.

Novo, M., 2010. Algunos aspectos de la Biología Evolutiva de la Familia Hormogastridae Michaelsen, 1900: Filogenia, Filogeografía y Selección Sexual. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.

Novo, M., Almodóvar, A., Díaz Cosín, D., 2009. High genetic divergence of hormogastrid earthworms, Annelida, Oligochaeta. in the central Iberian Peninsula: evolutionary and demographic implications. *Zoologica Scripta* 38, 537-552.

Novo, M., Almodóvar, A., Fernández, R., Trigo, D., Díaz Cosín, D., 2010. Cryptic speciation of hormogastrid earthworms revealed by mitochondrial and nuclear data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56, 507-512.

Novo, M., Almodóvar, A., Fernández, R., Giribet, G., Díaz Cosín, D., in press. Understanding the biogeography of a group of earthworms in the Mediterranean basin—the phylogenetic puzzle of Hormogastridae (Clitellata: Oligochaeta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, DOI 10.1016/j.ympev.2011.05.018

Omodeo, P., 1948. La poliembrionia e le anomalie di sviluppo presso un comune lombrico: *Allolobophora caliginosa trapezoides*, Dugès. *Italian Journal of Zoology* 33, 1-87.

Omodeo, P., 1951 a. Corredo cromosomico e spermatogenesi aberrante in *Allolobophora caliginosa trapezoides*. Estratto dal Bolletino di Zoologia, Vol. XVIII, 27-39.

Omodeo, P., 1951 b. Problemi genetici connessi con la poliploidia di alcuni lombrichi. *Bolletino di Zoologia* 18, 123-129.

Omodeo, P., 1952. Cariologia dei Lumbricidae. *Caryologia* 4, 173-178.

Omodeo, P., 1953 a. Considerazioni sulla poliploidia nei lombrichi. *Bolletino della Società Italiana di Biologia Sperimentale* 29, 1437-1439.

Omodeo, 1953 b. Specie e razze poliploidi nei lombrichi. *Ricerca Scientifica* 23, 43-49.

Omodeo, P., 1955. Cariologia dei Lumbricidae, II Contributo. *Caryologia* 8, 135-178.

Omodeo, P., 1956. Sistematica e distribuzione geografica degli Hormogastrinae, Oligocheti. *Archivio Botanico e Biogeografico Italiano* 32, 159-177.

Omodeo, P., 2000. Evolution and biogeography of megadriles (Annelida, Clitellata). *Italian Journal of Zoology* 67, 179-201.

Omodeo, P., Rota, E., 2008. Earthworm diversity and land evolution in three mediterranean districts. Proceedings of the California Academy of Sciences, Fourth Series 59 (I, N. 5), 65-83.

Onteniente, A.P., Rodríguez Babío, C., 2002. Three new species of earthworm, Annelida: Oligochaeta: Lumbricidae., from the Valencian Community, Spain. Journal of Natural History 36, 515-530.

Owen, R., 1849. On Parthenogenesis, or the Successive Production of Procreating Individuals from a Single Ovum. John van Voorst, London.

Page, R.D.M., Holmes, E.C., 1998. Molecular Evolution. A Phylogenetic Approach. Blackwell Science, Malden.

Pamilo, P., Bianchi, N.O., 1993. Evolution of the Zfx and Zfi Genes: Rates and Interdependence between the Genes. Molecular Biology and Evolution 10, 271-281.

Paradis, E., Claude, J., Strimmer, K., 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. Bioinformatics 20, 289-290.

Parmelee, R.W., Beare, M.H., Cheng, W., Hendrix, P.F., Rider, S.J., Crossley, D.A. JR, Coleman, D.C., 1990. Earthworms and enchytraeids in conventional and no-tillage agroecosystems: A biocide approach to assess their role in organic matter breakdown. Biology and Fertility Soils 10, 1-10.

Pérez-Losada, M., Julio Eiroa, J., Mato, S., Domínguez, J., 2005. Phylogenetic species delimitation of the earthworms *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché, 1972 (Oligochaeta, Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences Pedobiologia 49, 317-324.

Pérez-Losada, M., Ricoy, M., Marshall, J.C. Domínguez, J., 2009. Phylogenetic assessment of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta: Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 52, 293-302.

Pertrusewicz, K., Macfayden, A., 1970. Productivity of terrestrial animals. Principles and methods. Blackwell, Oxford.

Pfenniger, M., Posada, D., 2002. Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata*, Helicellinae, Stylommatophora: fragmentation, corridor migration and secondary contact. *Evolution* 56, 1776-1788.

Pearce, T.G., Oates, K., Carruthers, W.J., 1990. A fossil earthworm embryo, Oligochaeta, from beneath a Late Bronze Age midden at Potterne, Wiltshire, UK. *Journal of Zoology* 220, 537-542.

Pons, J., Barraclough, T. G., Gómez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W. D., Vogler, A.P., 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology* 55, 595-609.

Pop, A.A., Wink, M., Pop, V.V., 2003. Use of 18S, 16S rDNA and cytochrome c oxidase sequences in earthworm taxonomy, Oligochaeta, Lumbricidae. *Pedobiologia* 47, 428-433.

Pop, A.A., Csuzdi, Cs., Wink, M., Pop, V.V., 2005. An attempt to reconstruct the molecular phylogeny of the Genus *Allolobophora*, sensu lato, Pop, 1941. using 16S rDNA and COI sequences, Oligochaeta, Lumbricidae. In: V.V. Pop, A.A. Pop, Eds., *Advances in earthworm taxonomy II*. Univ. Press, Cluj, pp. 155-166.

Posada, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25, 1253-1256.

Posada, D., Buckley, T.R., 2004. Advantages of AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests for model selection in phylogenetics. *Systematic Biology* 53, 793-808.

Posada, D., Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817-818.

Qiu, J.P., Bouché, M.B., 1998. Contribution a la taxonomie des *Avelonini* trib. nov. (Annelida: Lumbricidae): *Avelona* gen. nov., *Koinodrilus* gen. nov. et *Nicodrilus cuendeti* sp. nov. Documents Pedozoologiques 4, 109-116.

R Development Core Team, 2008. An Introduction to R: Notes on R, A Programming Environment for Data Analysis and Graphics (electronic edition).

Ramos-Onsis, S.E., Rozas, J., 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19, 2092-2100.

Reinecke, A.J., Ljungstrom, P.O., 1969. An ecological study of the earthworms from the banks of the Mooi River in Potchefstroom, South Africa. *Pedobiologia* 9, 106-111.

Reynolds, J.W., 1974. The earthworms of Maryland, Oligochaeta: Acanthodrilidae, Lumbricidae, Megascolecidae and Sparganophilidae. *Megadrilogica* 1, 1-12.

Rogers, A.R., 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution* 49, 608-615.

Rolando, A., Romanini, M.C., Mugnaini, M.T., Bozzo, A., Pastorino, I., Soñez, C.A. , 2007. Ultrastructural study of spermatogenesis in *Eisenia foetida*, Annelida, Oligochaeta. *International Journal of Morphology* 25, 277-284.

Rogers, A.R., Harpending, H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9, 552-569.

Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-1574.

Rousset, V., Rouse, G.W., Siddall, M.E., Tillierm A., Pleijel, F., 2004. The phylogenetic position of Siboglinidae (Annelida) inferred from 18S rRNA, 28S rRNA and morphological data. *Cladistics*. 20, 518-533.

Saccone, C., de Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G., Reyes, A., 1999. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238, 195-209.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Schneider, S., Excoffier, L., 1999. Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152, 1079-1089.

Schettino, A., Turco, E., 2006. Plate kinematics of the Western Mediterranean region during the Oligocene and Early Miocene. *Geophysical Journal International* 166 (3), 1398-1423.

Scheu, S., 2003. Effects of earthworms on plant growth: patterns and perspectives. *Pedobiologia* 47, 846-856.

Schneider, M.V., Beukeboom, L.W., Driessen, G., Lapchin, L., Bernstein, C., Van Alphen, J. J. M., 2002. Geographical distribution and genetic relatedness of sympatrical thelytokous and arrhenotokous populations of the parasitoid *Venturia canescens*, Hymenoptera. *Journal of Evolutionary Biology* 15, 191-200.

Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L., 2000. Arlequin ver. 2.000: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. Switzerland, University of Geneva.

Schön, I., Martens, K., 2003. No slave to sex. *Proceedings of the Royal Society of London* 270, 827-833.

Sechi, P., 2010. Phylogeographic and adaptive study in the earthworm *Lumbricus rubellus* sampled from locations corresponding to southern European glacial refugia and extending into northern Europe. Book of abstracts from the 9th International Symposium on Earthworm Ecology, Xalapa (México), p. 7.

Severon, T., Joschko, M., Graff, O., 2007. Die Formen von *Allolobophora caliginosa*, Savigny. , Oligochaeta: Lumbricidae. Braunschweiger Naturkundliche Schriften 7, 843-853.

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87, 651-70.

Simon, J. C., Delmotte, F., Rispe, C., Crease, T., 2003. Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals. *Journal of the Linnean Society of London* 79, 151-163.

Simonsen, V., Holmstrup, M. 2008. Deviation from apomictic reproduction in *Dendrobaena octaedra*? *Hereditas* 145, 212-214.

Sims, R.W, Gerard, B.M., 1985. Earthworms, Keys and Notes for the Identification and Study of the Species, Synopses of the British Fauna, New Series. No. 31, Linnean Society of London and The Estuarine and Brackish-Water Sciences Association, London.

Smith, F., 1917. North American earthworms of the family Lumbricidae in the collections of the United States National Museum. *Proceedings of the United States National Museum* 2174, 157-182.

Song, H., Buhay, J.E., Whiting, M.F., Crandall, K.A., 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *PNAS* 105, 13486-13491.

Stockdill, S.M.J., 1982. Effects of introduced earthworms on the productivity of New Zealand pastures. *Pedobiologia* 24, 29-35.

Suomalainen, E. , 1950. Parthenogenesis in animals. *Advances in Genetics*, 3, 193-253.

Suomalainen, E., Saura, A., Lokki, J., 1987. *Cytology and Evolution in Parthenogenesis*. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida. 216 pp.

Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.G., Cosson, J.F., 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7, 453-464.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.

Templeton, A.R., Crandall, K.A., Sing, C.F., 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data III. Cladogram estimation. *Genetics* 132, 619-633.

Terhivuo, J., Saura, A., 2003. Low clonal diversity and morphometrics in the parthenogenetic earthworm *Octolasion cyaneum*, Sav. *Pedobiologia* 47, 434-439.

Terhivuo, J., Saura, A., 2006. Dispersal and clonal diversity of North-European parthenogenetic earthworms. *Biological Invasions* 8, 1205-1218.

Thomsen, M., 1927. Studien über die Parthenogenese bei einigen Cocciden und Aleurodinen. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 5, 1-10.

Van Rhee, J.A., 1969. Development of earthworm populations in polder soils. *Pedobiologia* 9, 128-132.

Varios autores, 2011. Soils- The Final Frontier. *Science* vol 304, issue 5677, pages 1561-1684.

Viktorov, A. G., 1997. Diversity of polyploid races in the family Lumbricidae. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 217-221.

Vimmerstedt, J.P., Finney, J.H., 1973. Impact of earthworm introduction on litter burial and nutrient distribution in Ohio strip-mine spoil bands. *Soil Science Society of America Proceedings* 37, 388-391.

West, S.A., Lively, C.M. & Read, A.F. 1999. A pluralist approach to sex and recombination. *Journal of Evolutionary Biology* 12, 1003-1012.

White, M.J.D., 1973. *Animal Cytology and Evolution*. Cambridge University Press, London.

White, M.J.D., 1978. *Modes of Speciation*. Freeman, San Francisco.

Wolstenholme, D.R., 1992. Animal mitochondrial DNA: Structure and evolution. *International Review of Cytology* 141, 173-216.

Xia, X., Xie. Z., 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92, 371-373.

Yule, G.U., 1924. A mathematical theory of evolution based on the conclusions of Dr. J. C. Willis, FRS. *Philos. Transactions of the Royal Society of London, Bulletin of Biological Sciences* 213, 21-87.

Zaitlin, B., Hayashi, M., Clapperton, J., 2007. Distribution of northern pocket gopher burrows, and effects on earthworms and infiltration in a prairie landscape in Alberta, Canada. *Applied Soil Ecology* 37, 88-94.

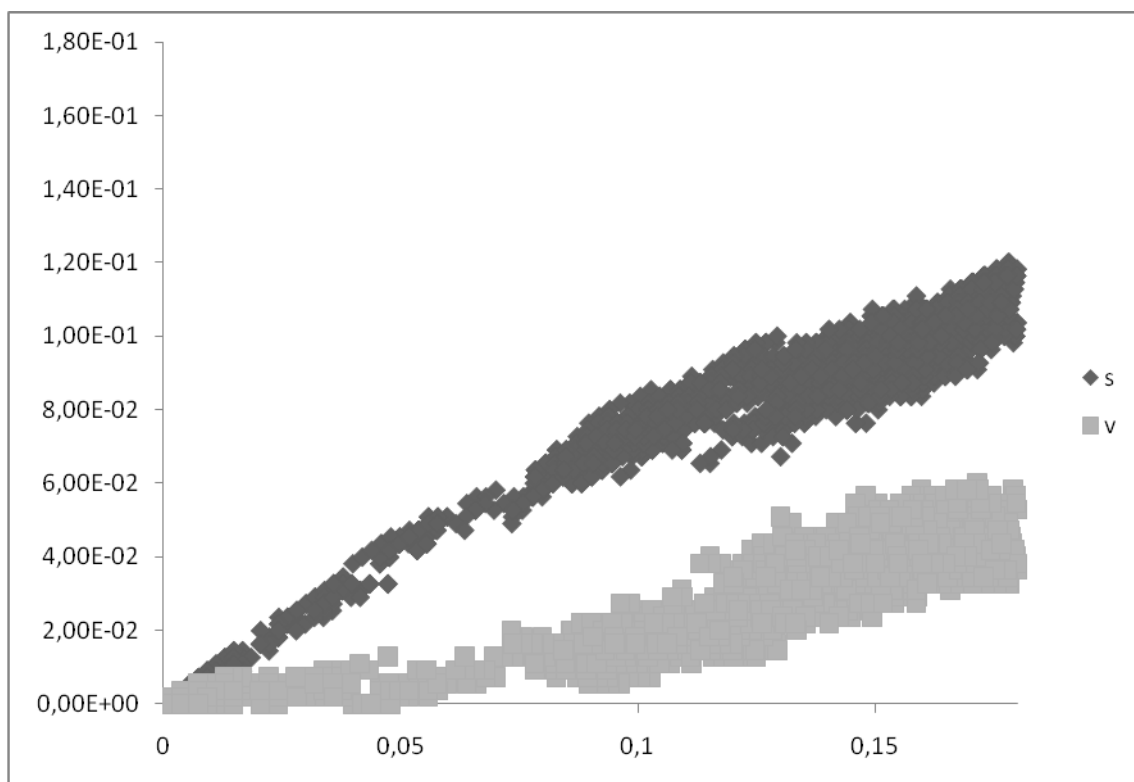
Zalisko, E.J., Larsen J. H., 1990. Breeding and post-breeding structure of the vas deferens of the long-toed salamander *Ambystoma macrodactylum*. *Journal of Morphology* 203, 321-330.

Zhang, Q.L., Hendrix, P.F., 1995. Earthworm (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*) effects on Carbon Flux in Soil. *Soil Science Society of America Journal* 59, 816-823.



Anexos

ANEXO 1. Gráfico de representación transiciones vs transversiones en el gen COII.



ANEXO 2. Valores de diversidad nucleotídica en los clados testados para la regla del 4X (ver Fig. 2, capítulo 2).

Clados comparados	π primer clado	π segundo clado
[At37, At26, At28, At25] vs [At36, At 13, At 5, At6, At24, At21, At27]	0.067529	0.067529
{At17, At9, At10} vs [At8, At12]	0.005747	0.004310
[At37, At26, At28, At25, At36, At13, At5, At6, At24, At21, At27] vs [At11, At17, At9, At10, At8, At12]	0.192333	0.060805
[At33, At34] vs [At 30, At32]	0.008621	0.008621
[At2, At16, At31, At30, At32, At33, At34] vs [At29, At15, At7, At14, At4, At20, At3, At1]	0.105090	0.151324
[At22, At23] vs [At2, At16, At31, At30, At32, At33, At34, At29, At15, At7, At14, At4, At20, At3, At1]	0.086207	0.179187
[At22, At23, At2, At16, At31, At30, At32, At33, At34, At29, At15, At7, At14, At4, At20, At3, At1] vs [At35, At18, At19]	0.197028	0.07845
Linaje A vs Linaje B	0.216563	0.193013

ANEXO 3. Tabla de caracteres morfológicos de los individuos de distintas especies estudiados en el capítulo 4.

Carácter	<i>A. giardi</i>	<i>A. longa</i>	<i>A. caliginosa</i>	<i>A. nocturna</i>
Longitud	150-250	130-170	60-101	90-180
Diámetro (clit-postclit)	5-7	5,5-8	3,5-4,5	4-5
Peso	1,5-3,1	1,2-3,8	0,18-0,84	1,95-2,65
Nº segmentos	183-203	160-200	130-165	180-250
Color	pardo-negro oscuro irisado	gris negruzco irisado	claro	pardo-negro oscuro irisado
Prostomio	epilóbico 1/3 cerrado	epilóbico 1/3 cerrado	epilóbico 1/3 cerrado	epilóbico 1/3 cerrado
Quetas	9:1,5:4:1:22	10:1,3:4:1:22	9:1,5:4,5:1:25	12,5:1,5:6:1:40
Poros dorsales	(10/11) 11/12	12/13	(9/10) 10/11	(8/9) 9/10
Poros nef.	forma de solfeo	-	minúsculos, en línea 1/3 ab	forma de solfeo
Poros espermatecas	9/10, 10/11, ½ c	9/10, 10/11, ½ c	9/10, 10/11, ½ c	9/10, 10/11, ½ c
Poros masculinos	½ 15, área B; atrios 14/15 y 15/16	½ 15, área B; atrios 1/3 14-2/3 16	atrios ½ 14-1/2 16	atrios 14/15
Clitelo	(1/n 26) 27-35(2/3 36)	(1/2 27) 28-35(1/2 36)	27-34	(1/n 27) 28-34 (1/2 35)
Tubérculos pub.	32-34, gafas. En ind. muy maduros afectan a 31 y 35.	32-34, línea. No afectan a 31 y 35.	31-33 gafas	31-33 gafas, con dos protuberancias ventrales en 31 y 33
Poros femeninos	½ 14, área b	½ 14, área b	½ 14, área b	½ 14, área b

Papilas	mamelones ab (9) 10,11,12 papilas (30) 31,32,33,34,35	mamelones ab 9, 10,11 papilas (30) 31,33,34 (35)	mamelones ab 9, 10,11 papilas 27(29) 30 (32) 33 (34)	mamelones ab (9) 10,11,12 papilas (29) 30,32, 33,34
Septos	1° en 4/5 Con musculatura débil 6/7,7/8,10/11 y 11/12. Con musculatura fuerte 8/9 y 9/10.	1° en 4/5 Con musculatura débil 5/6,6/7,9/10,10/11. Con musculatura fuerte 7/8 y 8/9.	1° en 4/5 Con musculatura débil 6/7 a 11/12	1° en 4/5 Con musculatura débil 6/7 a 9/10
Corazones	6-11	6-11	6-11	6-11
Glándulas de Morren	½ 10-14 con divertículo bilobulados en 10	½ 10-14 con divertículo bilobulados en 10	½ 10-14 con divertículo bilobulados en 10	½ 10-14 con divertículo bilobulados en 10
Esófago post.	buche 15,16 molleja 17,18	buche 15,16 molleja 17,18	buche 15,16 molleja 17,18	buche 15,16 molleja 17,18
Tiflosol (inicio)	22/23, bifido	Inicialmente pennado, a veces organizado en 2 ó 3 láminas.	21, bifido	inicio desde molleja, pennado o formado por 2, 3, 5 láminas
Testículos y embudos	normales	normales	normales	normales
Vesículas seminales	9 a 12	9 a 12	9 a 12	9 a 12
Espermatecas	simples, globulosas, 10 y 11	simples, globulosas, 10 y 11	simples, globulosas, 10 y 11	simples, globulosas, 10 y 11
Ovarios y embudos fem.	normales	normales	normales	normales
Nefridios	enteriformes	enteriformes	enteriformes	enteriformes

ANEXO 3 (continuación). Tabla de caracteres morfológicos de los individuos de distintas especies estudiados en el capítulo 4.

Carácter	<i>A. trapezoides</i>	<i>N. monticola</i>	<i>N. carochensis</i>	<i>N. tetramammalis</i>
Longitud	85-110	65-130	102-155	85-126
Diámetro (clit-postclit)	2,5-4	3-5,5	4,5-6	4,7-6
Peso	0,31-0,95	0,7-2,05	1,1-2,65	0,9-2,5
Nº segmentos	130-170	132-209	180-209	153-183
Color	pardo oscuro irisado	pardo castaño claro	pardo castaño claro	pardo castaño claro
Prostomio	epilóbico 1/3 cerrado	epilóbico 1/3 cerrado	epilóbico 1/3 cerrado	epilóbico 1/3 cerrado
Quetas	9:1,5:6:1:28	12:1,6:8:1:29	11:13:7:1:la mitad del perímetro	7,6:1:5,6:1:23
Poros dorsales	(8/9) 9/10	(6/7) 7/8, 8/9	(6/7) 7/8	(7/8) 8/9
Poros nef.	en línea o dispersos	dispersos	dispersos	dispersos
Poros espermatecas	9/10, 10/11, ½ c	9/10, 10/11, ½ c	9/10, 10/11, ½ c	9/10, 10/11, ½ c
Poros masculinos	atrios ½ 14- ½ 16	atrios ½ 14- ½ 16	atrios ½ 14- ½ 16	atrios ½ 14- ½ 16
Clitelo	27-34	26,27-34	(25)(26)27-34(1/4 35)	(1/n 26) 27-34
Tubérculos pub.	31-33 línea, tripartitos	½ 30-33 (2/3 34) línea	½ 30 (31)-33(1/n 34) línea	1/n 30,31-1/n 34 línea
Poros femeninos	½ 14, área b	½ 14, área b	½ 14, área b	½ 14, área b

Papilas	mamelones ab 9, 10,11 papilas (28) 30, 32, 33 (34)	mamelones ab 10,11,12 papilas 29, 30,32	mamelones ab 10,11 papilas (26)(27) 30,32	mamelones ab 11,12 papilas (26) 29, 30 (aplanadas)
Septos	1° en 4/5 Con musculatura débil 6/7 a 9/10	1° en 5/6 Con musculatura débil 6/7 a 10/11	Con musculatura débil 5/6 y 10/11 Con musculatura fuerte 6/7 a 9/10	Con musculatura débil 5/6 y 11/12 Con musculatura fuerte 7/8, 8/9 y 9/10
Corazones	6-11	5-9	-	-
Glándulas de Morren	½ 10-14 con divertículo bilobulados en 10	6-11 con dilataciones en 10	-	-
Esófago post.	buche 15,16 molleja 17,18	buche 15,16 molleja 17,18	buche 15,16 molleja 17,18	buche 15,16 molleja 17,18
Tiflosol (inicio)	22, pennado	21,22, pennado con cresta central	21,22, pennado con crestas laterales y central	21,22, pennado con cresta central
Testículos y embudos	normales	normales	normales	normales
Vesículas seminales	9 a 12	9 a 12	9 a 12	9 a 12
Espermatecas	simples, globulosas, 10 y 11	simples, globulosas, 10 y 11	simples, globulosas, 10 y 11	simples, globulosas, 10 y 11
Ovarios y embudos fem.	normales	normales	normales	normales
Nefridios	enteriformes	enteriformes	enteriformes	enteriformes

ANEXO 4. Especies de hormogástridos utilizados en la Fig. 6 del capítulo 4. Tomado de Novo (2010). *H.*: *Hormogaster*. *Hem.*: *Hemigastrodrilus*.

Código	Localidad	Especie
ALE5	Alesanco (La Rioja, España)	<i>H. riojana</i>
ALG1	Alghero (Sassari, Cerdeña, Italia)	<i>H. redii redii</i>
BIO2	Biosca (Lérida, España)	<i>H. arenicola</i>
BRU1	El Brull (Barcelona, España)	<i>H. catalaunensis</i>
BSM1	Banyuls-sur-mer (Pyrénées-Orientales, Francia)	<i>H. gallica</i>
CER3	Cervera del Maestre (Castellón, España)	<i>H. pretiosa?</i>
GHI2	Ghilarza (Oristano, Cerdeña, Italia)	<i>H. redii redii</i>
GRA2	Graus (Huesca, España)	<i>H. eserana</i>
IGL1	Iglesias (Carbonia-Iglesias, Cerdeña, Italia)	<i>H. redii redii</i>
LOP3	Lopórzano (Huesca, España)	<i>H. huescana</i>
MAJ2	Montmajor (Barcelona, España)	<i>H. sylvestris</i>
MON2	Monrepós (Huesca, España)	<i>H. pretiosiformis</i>
OEL2	Peña Oroel (Huesca, España)	<i>H. oroeli</i>
PRB1	Peralba (Lérida, España)	<i>H. pretiosa var.</i>
QLL1	Quillan (Aude, Francia)	<i>H. pretiosa nigra</i>
QUE1	Puerto Querol (Castellón, España)	<i>H. castillana</i>
SAN2	Sant Joan de les Abadesses (Gerona, España)	<i>H. abatissae</i>
TAL1	Talarn (Lérida, España)	<i>H. spp.</i>
TES1	Col de la Testa (Corse du Sud, Córcega, Francia)	<i>H. samnitica lirapora</i>
TOR2	Torrecilla en Cameros (La Rioja, España)	<i>H. ireguana</i>
UIX1	Vall d'Uixó (Castellón, España)	<i>H. pretiosa arrufati</i>
VPJ1	Volpajola (Haurte-Corse, Córcega, Francia)	<i>H. redii insularis</i>

Código	Localidad	Especie
VIL₂	Villamassargia (Carbonia-Iglesias, Cerdeña, Italia)	<i>H. pretiosa</i>
ORD₁	Ordal (Barcelona, España)	<i>H. najiformis</i>
PAR₁	El Pardo (Madrid, España)	<i>H. elisae</i>
BOA₁	Boadilla (Madrid, España)	<i>H. elisae</i>
SEV₁	Sevilla La Nueva (Madrid, España)	<i>H. elisae</i>
MOL₂	El Molar (Madrid, España)	<i>H. elisae</i>
TRE₂	Tres Cantos (Madrid, España)	<i>H. elisae</i>
VEN₈	Venturada (Madrid, España)	<i>H. elisae</i>
JAR₂	Paracuellos del Jarama (Madrid, España)	<i>H. elisae</i>
RED₂	Redueña (Madrid, España)	<i>H. elisae</i>
CAB₁	Cabrera (Madrid, España)	<i>H. elisae</i>
NAV₁	Navas de Buitrago (Madrid, España)	<i>H. elisae</i>
LOZ₁	Lozoyuela (Madrid, España)	<i>H. elisae</i>
FRE₁	Fresno del Torote (Madrid, España)	<i>H. elisae</i>
UCE₂	Cubillo de Uceda (Madrid, España)	<i>H. elisae</i>
ANC₁	Anchuelo (Madrid, España)	<i>H. elisae</i>
SIG₁	Siguero (Segovia)	<i>H. elisae</i>
SOT₂	Soto del Real (Madrid, España)	<i>H. elisae</i>
LAC₁	Lacardayre (Lot-en-Garonne, Francia)	<i>Hem. monicae</i>
MND₁	Mende (Lozère, Francia)	<i>Hem. monicae</i>
XAN₁	San Román (Asturias)	<i>Xana omodeoi</i>
SGF₁	Saint Gély-du-fesc (Hérault, Francia)	<i>Vignisa popi</i>
PIG₁	Pignans (Var, Francia)	<i>Vignisa vedovinii</i>

ANEXO 5. Lombrices totales muestreadas en olivares, en términos de biomasa.

Especies	<i>A. chitae</i>	<i>A. icterica occidentalis</i>	<i>A. iberica</i>	<i>A. molleri</i>	<i>A. rosea</i>	<i>Allolobophora</i> sp.	<i>A. trapezoides</i>	<i>D. alvaradoi</i>	<i>D. byblica</i>	<i>E. tetraedra</i>	<i>L. friendi</i>
Olivar 1	7,45		1,23		11,54		53,91	0,08	0,12	0,39	
Olivar 2		4,47				0,12	3,46			0,27	
Olivar 3			0,29	0,78	2,74		37,35				7,40
Olivar 4			1,59				7,08				
Olivar 5			1,92				3,79		0,11		
Olivar 6			4,26		1,55		5,52		0,10		
Olivar 7					0,21		9,38				
Olivar 8			18,26		14,41		21,24				
Olivar 9	1,48				0,91		21,84			0,20	
Olivar 10			1,61	2,22	0,60		0,90				
Olivar 11			0,98		0,54		2,29				
Olivar 12	0,17		4,76	4,97	3,06		16,35				
Olivar 13	1,44						8,09				
Olivar 14	1,92				0,20		2,86				
Olivar 15			3,05				0,23				
Olivar 16			8,63	6,34	1,03		28,09				
Olivar 17			0,35				0,59				
Olivar 18			0,10		0,04		0,71				
Olivar 19			0,63		0,66		2,71				
Olivar 20			6,61		4,13		4,22				
Total especies (g)	12,46	4,47	54,28	14,31	41,61	0,12	230,60	0,08	0,33	0,86	7,40
Promedio especies (g)	2,49	4,47	3,62	3,58	2,97	0,12	11,53	0,08	0,11	0,29	7,40

ANEXO 5 (continuación). Lombrices totales muestreadas en olivares, en términos de biomasa.

Especies	<i>Lumbricus</i> sp.	<i>M. dubius</i>	<i>M. phosphoreus</i>	<i>Microscolex</i> sp.	<i>O. complanatus</i>	<i>O. cyaneum</i>	<i>O. lacteum</i>	<i>Octolasion</i> sp.	Enquitreidos	Lumbrícidos	No determinado
Olivar 1		1,91	0,25				0,14			0,07	1,07
Olivar 2		0,76					2,09		0,02		0,31
Olivar 3	2,21		0,15	0,04	35,13	2,81					1,64
Olivar 4		1,14	0,16								0,33
Olivar 5											0,06
Olivar 6									0,01		1,53
Olivar 7		0,28	0,68								0,47
Olivar 8			0,16								4,19
Olivar 9		3,88	0,02								1,91
Olivar 10		0,48									
Olivar 11											0,84
Olivar 12		0,36	0,37								1,16
Olivar 13											
Olivar 14											0,01
Olivar 15											0,12
Olivar 16		2,20	0,13					0,05			0,48
Olivar 17		0,27									
Olivar 18			0,05								0,09
Olivar 19											
Olivar 20		0,16	0,15								1,08
Total especies (g)	2,21	11,44	2,12	0,04	35,13	2,81	2,23	0,05	0,03	0,07	15,29
Promedio especies (g)	2,21	1,14	0,21	0,04	35,13	2,81	1,12	0,05	0,02	0,07	0,96

ANEXO 6. Lombrices totales muestreadas en olivares, en términos de número total de individuos.

Especies	<i>A. chitae</i>	<i>A. icterica occidentalis</i>	<i>A. iberica</i>	<i>A. molleri</i>	<i>A.rosea</i>	<i>Allolobophora</i> sp.	<i>A. trapezoides</i>	<i>D. alvaradoi</i>	<i>D. byblica</i>	<i>E. tetraedra</i>	<i>L. friendi</i>
Olivar 1	23		3		65		76	1	1	2	
Olivar 2		14				1	3			2	
Olivar 3			2	1	20		55				10
Olivar 4			7				7				
Olivar 5			6				2		2		
Olivar 6			19		7		8		2		
Olivar 7					1		7				
Olivar 8			73		74		42				
Olivar 9	6				3		25			1	
Olivar 10			8	2	2		1				
Olivar 11			5		6		3				
Olivar 12	1		22	7	22		26				
Olivar 13	6						7				
Olivar 14	8				2		4				
Olivar 15			28				2				
Olivar 16			46	10	4		44				
Olivar 17			1				2				
Olivar 18			2		1		3				
Olivar 19			2		4		3				
Olivar 20			51		14		11				
Total especies	44	14	275	20	225	1	331	1	5	5	10
Promedio especies	8,80	14,00	18,33	5,00	16,07	1,00	16,55	1,00	1,67	1,67	10,00

ANEXO 6 (continuación). Lombrices totales muestreadas en olivares, en términos de número total de individuos.

Especies	<i>Lumbricus</i> sp.	<i>M. dubius</i>	<i>M. phosphoreus</i>	<i>Microcolelex</i> sp.	<i>O. complanatus</i>	<i>O. cyaneum</i>	<i>O. lacteum</i>	<i>Octolasion</i> sp.	Enquitreidos	Lumbricidos	No determinado
Olivar 1		8	7				1			1	8
Olivar 2		2					6		1		2
Olivar 3	4		1	1	13	3					13
Olivar 4		5	1								4
Olivar 5											2
Olivar 6									1		10
Olivar 7		1	16								1
Olivar 8			4								17
Olivar 9		12	1								15
Olivar 10		2									
Olivar 11											4
Olivar 12		1	6								2
Olivar 13											
Olivar 14											1
Olivar 15											1
Olivar 16		14	7					1			5
Olivar 17		7									
Olivar 18			2								2
Olivar 19											
Olivar 20		1	8								14
Total especies	4	53	53	1	13	3	7	1	2	1	101
Promedio especies	4,00	5,30	5,30	1,00	13,00	3,00	3,50	1,00	1,00	1,00	6,31

ANEXO 7. Lombrices totales muestreadas en dehesas, en términos de biomasa.

Especie	<i>A. caliginosa</i>	<i>A. chitae</i>	<i>A. chlorotica</i>	<i>A. iberica</i>	<i>A. icterica occidentalis</i>	<i>A. moebi</i>	<i>A. molleri</i>	<i>A. rosea</i>	<i>A. trapezoides</i>
Dehesa 1				0,76			63,12	7,27	98,19
Dehesa 2				10,84			46,15	6,89	147,43
Dehesa 3			1,42	3,15			77,51	8,49	188,25
Dehesa 4		3,96		3,43			35,85	3,77	79,11
Dehesa 5		5,78		0,73			10,35	5,92	90,92
Dehesa 6				9,05		9,23	57,14	16,52	194,08
Dehesa 7		3,71		0,35			18,90	8,55	80,37
Dehesa 8		3,01		0,74	1,56		39,32	6,35	65,15
Dehesa 9				36,25			34,49	8,68	146,13
Dehesa 10	1,14	6,92		2,36			12,30	3,09	117,74
Total especies (g)	1,14	23,38	1,42	67,66	1,56	9,23	395,12	75,53	1207,36
Promedio especies (g)	1,14	4,68	1,42	6,77	1,56	9,23	39,51	7,55	120,74

ANEXO 7 (continuación). Lombrices totales muestreadas en dehesas, en términos de biomasa.

Especie	<i>D. cognettii</i>	<i>D. byblica</i>	<i>M. dubius</i>	<i>M. phosphoreus</i>	<i>L. friendi</i>	<i>O. cyaneum</i>	<i>O. lacteum</i>	<i>Octolasion</i> sp.	Enquitreidos	No determinado
Dehesa 1			1,50	10,65						8,64
Dehesa 2			0,52	0,03						1,83
Dehesa 3	0,04	0,31	5,58	0,19	15,91	1,62	2,73	0,39		1,08
Dehesa 4				0,08						1,84
Dehesa 5				0,10					0,02	2,67
Dehesa 6				0,07						5,63
Dehesa 7				0,33						4,13
Dehesa 8			2,30	0,07		4,10				4,42
Dehesa 9										5,58
Dehesa 10				0,11						1,28
Total especies (g)	0,04	0,31	9,90	11,63	15,91	5,72	2,73	0,39	0,02	37,10
Promedio especies (g)	0,04	0,31	2,48	1,29	15,91	2,86	2,73	0,39	0,02	3,71

ANEXO 8. Lombrices totales muestreadas en dehesas, en términos de número total de individuos.

Especie	<i>A. caliginosa</i>	<i>A. chitae</i>	<i>A. chlorotica</i>	<i>A. iberica</i>	<i>A. icterica occidentalis</i>	<i>A. moebi</i>	<i>A. molleri</i>	<i>A. rosea</i>	<i>A. trapezoides</i>
Dehesa 1				3			104	48	149
Dehesa 2				25			50	30	157
Dehesa 3			7	4			75	34	162
Dehesa 4		9		12			43	18	141
Dehesa 5		16		4			11	28	125
Dehesa 6				35		10	56	68	218
Dehesa 7		13		3			27	58	94
Dehesa 8		10		3	6		40	25	98
Dehesa 9				86			32	34	195
Dehesa 10	5	26					21	19	156
Total especies	5	74	7	175	6	10	459	362	1495
Promedio especies	5,00	14,80	7,00	19,44	6,00	10,00	45,90	36,20	149,50

ANEXO 8 (continuación). Lombrices totales muestreadas en dehesas, en términos de número total de individuos.

Especie	<i>D. cognettii</i>	<i>D. byblica</i>	<i>M. dubius</i>	<i>M. phosphoreus</i>	<i>L. friendi</i>	<i>O. cyaneum</i>	<i>O. lacteum</i>	<i>Octolasion</i> sp.	Enquitreidos	Larvas de artrópodos	Nematodos	No determinado
Dehesa 1			7	8					11	3	1	13
Dehesa 2			2	1								6
Dehesa 3	1	2	21	1	15	2	7	1				7
Dehesa 4				2								20
Dehesa 5				5					5	1		12
Dehesa 6				3								24
Dehesa 7				12								9
Dehesa 8			6	2		3						16
Dehesa 9									1			26
Dehesa 10				2								6
Total especies	1	2	36	36	15	5	7	1	17	4	1	139
Promedio especies	1,00	2,00	9,00	4,00	15,00	2,50	7,00	1,00	5,67	2,00	1,00	13,90