

BIODIVERSIDAD DE PLANARIAS TERRESTRES EN DOS PARQUES NACIONALES: INDICIOS DE UNA HISTORIA DE MACRO Y MICROREFUGIOS PLEISTOCÉNICOS

MARTA ÁLVAREZ-PRESAS¹, EDUARDO MATEOS², MARTA RIUTORT³

RESUMEN

Las planarias terrestres, un grupo poco conocido de criaturas que habitan en los suelos forestales, pueden proporcionar información útil sobre los efectos de los cambios climáticos del pasado reflejado en la distribución actual de su diversidad. Por esta razón, hemos llevado a cabo varias campañas de muestreo en un estudio comparativo centrado en dos parques nacionales en el norte de España, Picos de Europa y Ordesa y Monte Perdido, con el fin de analizar los patrones de distribución de la diversidad genética de la especie más común europea, *Microplana terrestris*. Contrariamente a nuestras expectativas, hemos encontrado un gran número de nuevas especies crípticas bajo la apariencia externa de *M. terrestris*. En la comparación entre los parques, Ordesa tiene una menor diversidad de especies, sólo 4 frente a las 13 que se encuentran en los Picos de Europa. Además, las especies que se encuentran en Ordesa están presentes también en otras partes remotas de Europa, mientras que la mayoría de las especies en los Picos de Europa presentan una distribución restringida. Probablemente Picos de Europa actuó como un refugio de los bosques y su fauna asociada durante el Pleistoceno. Por el contrario, Ordesa puede haber sido re-colonizado por especies de Europa del este o actuado como un microrefugio y punto de origen de recolonización hacia el norte de Europa. El presente estudio muestra que la diversidad de la fauna del suelo críptica es mayor de lo imaginado de antemano y, a pesar de que las planarias terrestres pueden ser difíciles de encontrar en regiones templadas, el estudio de su diversidad y biogeografía puede prestar conocimiento sobre la historia pasada de los bosques en los que habitan y ayudar a predecir su evolución futura.

Palabras clave: Hayedo, pinar, robleal, bosque mixto, conservación, edafofauna, parque nacional de Ordesa y Monte Perdido, parque nacional de Picos de Europa, especies crípticas, endemismo, refugio pleistocénico.

¹ Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística y Institut de Recerca de la Biodiversitat (IRBio), Universitat de Barcelona. Avinguda Diagonal, 643. Teléfono: 934035432 / 934035304. E-mails: onaalvarez@ub.edu

² Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals, Universitat de Barcelona. Avinguda Diagonal, 643. Teléfono: 934020842. E-mail: emateos@ub.edu

³ Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística y Institut de Recerca de la Biodiversitat (IRBio), Universitat de Barcelona. Avinguda Diagonal, 643. Teléfono: 934035432 / 934035304. E-mails: mriutort@ub.edu

LAND PLANARIAN BIODIVERSITY IN TWO NATIONAL PARKS: SIGNS OF A PLEISTOCENE MACRO AND MICROREFUGIA HISTORY

ABSTRACT

Land planarians, a little-known group of creatures that inhabit forest soils, can provide useful information about the effects of past climate changes reflected in the current distribution of their diversity. For this reason, we have conducted several sampling campaigns in a comparative study focused on two national parks in northern Spain, Picos de Europa and Ordesa y Monte Perdido, in order to analyze the patterns of genetic diversity distribution for the most common European species, *Microplana terrestris*. Contrary to our expectations, we found a large number of new cryptic species under the outward appearance of *M. terrestris*. In the comparison between the parks, Ordesa has less diversity of species, only 4 compared to the 13 that are in the Picos de Europa. In addition, the species found in Ordesa are also present in other remote parts of Europe, while most of the species in the Picos de Europa have a restricted distribution. Picos de Europa probably acted as refugia of forests and their associated fauna during the Pleistocene. By contrast, Ordesa may have been re-colonized by species of Eastern Europe or, alternatively, acted as a microrefugia and point of origin for the recolonization of northern Europe. The present study shows that the diversity of cryptic soil fauna is greater than imagined in advance and, although land planarian can be difficult to find in temperate regions, the study of their diversity and biogeography can provide knowledge about the history of the forests they inhabit and help predict its future evolution.

Keywords: Beech forest, pine forest, oak forest, mixed forest, conservation, edafofauna, parque nacional de Ordesa y Monte Perdido, parque nacional de Picos de Europa, cryptic species, endemism, Pleistocene refugia.

INTRODUCCIÓN

Las planarias terrestres miembros de la fauna edáfica críptica

La fauna edáfica está formada por aquellos animales que viven en el suelo y los microhábitats asociados a éste (hojarasca, debajo de piedras y en troncos caídos). Es una fauna compuesta por muchos grupos animales diferentes y caracterizada por una elevada densidad de población y alta diversidad taxonómica y funcional (LAVELLE & SPAIN 2000, LAVELLE 2002). El monitoreo de la biodiversidad animal edáfica generalmente se realiza mediante técnicas de muestreo con metodologías estandarizadas (ver ISO 2003a, 2003b, 2004a, 2004b). Sin embargo, no

todos los animales del suelo se pueden capturar o detectar mediante estas técnicas, así éstos han permanecido «ocultos» a los investigadores y gestores de los espacios naturales, constituyendo lo que aquí denominamos «fauna edáfica críptica». Las planarias terrestres (Platyhelminthes: Tricladida: Continenticola: Geoplanidae) forman parte de esta fauna críptica, motivo por el cual apenas existe información de este grupo en los ecosistemas europeos y ninguna información en los parques nacionales de España.

Actualmente todas las planarias terrestres se engloban en la familia Geoplanidae Stimpson, 1857 (SLUYS et al., 2009), en la que se distinguen cuatro subfamilias: Bipaliinae Von Graff, 1896, Microplaninae Pantin, 1953, Rhynchodeminae Von Graff,

1896 y Geoplaninae Stimpson, 1857. Las especies europeas nativas (30 especies en total al inicio de este trabajo) pertenecen fundamentalmente a la subfamilia Microplaninae, siendo el género *Microplana* Vejvodsky, 1890 el más extendido. Las especies europeas son en general de pequeño tamaño (entre varios milímetros y algunos centímetros) y coloraciones apagadas o blancas.

Estos organismos son activos depredadores de la fauna de invertebrados del suelo, no han desarrollado ningún mecanismo especial de retención de agua (KAWAGUTI 1932) por tanto necesitan humedad ambiental elevada para sobrevivir (FROELICH 1955). Por este motivo son altamente dependientes de hábitats muy concretos (MCDONALD & JONES 2007), viven bajo la hojarasca, en los troncos caídos, en los espacios intersticiales del suelo y están presentes sólo en determinadas áreas de la península ibérica. Además, su dependencia de microhábitats en suelos forestales con temperaturas moderadas y un elevado grado de humedad las hace muy sensibles al cambio climático.

Las características de poca capacidad dispersiva, sensibilidad a la calidad del medio y situación en el vértice de la pirámide trófica, señalan a las planarias terrestres como un grupo idóneo para realizar estudios filogeográficos orientados a comprender cómo se origina y mantiene la diversidad (SUNNUCKS *et al.*, 2006, ÁLVAREZ-PRESAS *et al.*, 2011). Pero, sobre todo, son buenos indicadores de la biodiversidad existente y del estado de conservación de los hábitats en los que están presentes (SLUYS 1999, CARBAYO *et al.*, 2002). Así, en un reciente trabajo (ÁLVAREZ-PRESAS *et al.*, 2011) realizado con especies de planarias terrestres del Bosque Atlántico de Brasil, el estudio de datos genéticos mediante análisis de coalescencia ha permitido llegar a conclusiones sobre la historia reciente del bosque. Estos análisis nos han permitido además emitir algunas recomendaciones sobre la extensión de los denominados corredores biológicos y sobre qué áreas protegidas sería adecuado volver a poner en contacto teniendo en

cuenta la historia evolutiva de los organismos que viven en ellas.

Antes de 2007, en la península ibérica solo existían unas pocas citas de planarias terrestres, correspondiendo algunas a especímenes australianos o asiáticos introducidos en jardines y a tres especies autóctonas localizadas en Cataluña y las islas Baleares (MATEOS *et al.*, 1998). Sin embargo, gracias a la aplicación de protocolos de monitoreo específicos para el estudio de estos organismos, y a la aplicación de técnicas moleculares para delimitar e identificar especies realizadas por nuestro grupo (MATEOS *et al.*, 2003; MATEOS *et al.*, 2007; VILA-FARRE *et al.*, 2008; 2011; MATEOS *et al.*, 2009; ÁLVAREZ-PRESAS *et al.*, 2012; SLUYS *et al.*, 2016) ha sido posible establecer que las planarias terrestres son animales comunes en los bosques ibéricos y su diversidad potencial es muy superior a la que hasta ahora se les atribuía en los ecosistemas terrestres de Europa. Estos muestreos revelaron también que el tercio norte de la península ibérica es la región en la que se encuentra una mayor densidad y diversidad de estos organismos.

Un estudio genético exhaustivo de las planarias terrestres de esta región ha detectado para *Microplana terrestris* (Müller, 1774) (especie también presente en el resto de Europa) una alta diversidad genética y la existencia de dos grandes grupos genéticos claramente diferenciados a nivel mitocondrial (ÁLVAREZ-PRESAS *et al.*, 2012). Estos dos grupos delimitan las regiones este y oeste de la distribución ibérica de la especie, estando la zona divisoria entre las provincias de Navarra y Huesca, la zona oeste presenta a su vez una alta estructuración genética. Por otra parte, animales procedentes del Reino Unido analizados pertenecen al clado este, compartiendo haplotipos con animales de la península.

Los bosques húmedos en los parques nacionales

En España tres parques nacionales (PPNN) albergan bosques húmedos ocupando una extensión signifi-

cativa: en los Pirineos los PPNN Aigüestortes i Sant Maurici y Ordesa y Monte Perdido (PNOMP), y en los Montes Cantábricos el PN Picos de Europa (PNPE). En los dos últimos es donde están más desarrolladas estas formaciones forestales y son los que han sido objeto del presente estudio.

En el PNPE se localizan diversas formaciones forestales potencialmente muy idóneas para la presencia de fauna edáfica críptica. En el piso montano (600 a 1600 msnm) predominan bosques cuya especie dominante es el roble albar (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) y, conforme se sube en altura, esta especie va siendo sustituida por el haya (*Fagus sylvatica* L.). Además, los diversos cursos de agua albergan vegetación y bosques de galería que son igualmente adecuados para los organismos que nos ocupan. En el PNOMP en los valles de Ordesa, Añisclo y Pineta se encuentran extensas áreas de bosques de ribera y bosques húmedos (hayedos, abetales y bosques mixtos), potencialmente idóneos para los animales objeto de nuestro estudio. El hayedo, el abetal (*Abies alba* Mill.) y bosques mixtos de ambas especies forestales son las formaciones boscosas dominantes, ocupando más de un tercio de la masa forestal (VILLAR & BENITO 2004).

Es de destacar que los hayedos de los parques nacionales seleccionados están considerados como maduros y bien conservados. En particular, los hayedos del Valle de Ordesa son bosques muy maduros, no habiendo sido explotados en los últimos 85 años (BENITO 2010). Es esperable que estos bosques maduros alberguen una elevada abundancia y diversidad de fauna edáfica, maximizándose por tanto la probabilidad de encuentro de planarias terrestres.

Uso de marcadores moleculares en el estudio de comunidades

El estudio de las comunidades se ha visto favorecido en tiempos recientes por el avance de la genética y de los métodos aplicables en

la delimitación de especies. Sobre todo en grupos con pocos caracteres morfológicos útiles para la descripción e identificación de especies, como es el caso de las planarias terrestres, es clave el uso de datos moleculares para identificar algunos taxones crípticos, así como ejemplares juveniles, dañados o capullos. El «DNA-barcoding» (código de barras genético, HEBERT et al., 2003) es muy útil para asignar animales caracterizados simplemente por morfología externa (morfotipos, M) a entidades moleculares o MOTUs (Molecular Operational Taxonomic Units). Una pequeña parte de un gen (comunmente el gen mitocondrial *citocromo oxidasa I*, *CoxI*) es suficiente para identificar y asignar un individuo a un grupo, con la finalidad de caracterizar cuál es la composición de especies de la región.

Por otro lado los niveles de diversidad genética tanto a nivel interespecífico, como a nivel poblacional dentro de las especies permite estudiar tanto los procesos micro como macroevolutivos (AVISE 2000), y representa la aproximación más adecuada en estudios de filogeografía y de conservación. Este tipo de análisis son los que han permitido trazar la historia reciente de muchos grupos de organismos, especialmente ayudando a localizar los denominados refugios pleistocénicos, centros que permitieron la supervivencia de muchas especies y su posterior expansión (HEWITT 2004).

Así pues, con estos precedentes, nos pareció muy interesante analizar la composición de planarias terrestres en dos áreas protegidas con bosques potencialmente adecuados. El conocimiento de esta fauna tan poco tenida en cuenta, tendría que redundar también en un mejor conocimiento del nivel de conservación de los suelos forestales. Los objetivos del proyecto van desde caracterizar la diversidad de planarias terrestres y su abundancia en los diversos tipos de bosque, a determinar

la historia evolutiva de las especies y realizar análisis biogeográficos. En esta monografía por razones de espacio nos centraremos en los análisis de diversidad y de comunidades, y daremos tan solo una pincelada de los resultados preliminares de los estudios filogenéticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreos de campo

En cada uno de los dos parques (PNOMP y PNPE) se han realizado dos campañas de muestreo exhaustivas de dos semanas de duración, coincidiendo con épocas de máxima pluviometría para maximizar la probabilidad de encuentro de planarias terrestres.

En el PNOMP los muestreos exhaustivos se realizaron entre el 2 y el 13 de octubre de 2013 (campaña de otoño) y entre el 24 de mayo y el 6 de junio de 2014 (campaña de primavera). En el primer muestreo se establecieron 46 puntos de muestreo (parcelas de 50x50 m de superficie, Tabla 1) repartidos en los cuatro valles principales del parque (Ordesa, Añisclo, Escuaín y Pineta). En cada valle se seleccionaron la mitad de parcelas en bosques de hayas (*Fagus sylvatica*) y la otra mitad en bosques de pino rojo (*Pinus sylvestris* L.). En total se establecieron 6 parcelas de hayedo y 6 parcelas de pinar en cada valle, excepto en el valle de Escuaín donde sólo fué posible establecer 4 parcelas en bosques de hayas. En el segundo muestreo se volvieron a visitar las 46 parcelas.

En el PNPE los muestreos exhaustivos se han realizado entre el 21 de octubre y el 1 de noviembre de 2013 (campaña de otoño) y entre el 22 de junio y el 3 de julio de 2014 (campaña de primavera). En el primer muestreo, se establecieron 49 parcelas (Tabla 1) repartidas en seis áreas que abarcan las tres provincias que contienen el parque (Asturias, Cantabria y León) y que fueron revisadas en el segundo muestreo.

A estas seis áreas de trabajo las denominaremos valles a efectos prácticos, ya que se corresponden con áreas dentro una misma cuenca hidrográfica. En cada área se seleccionaron parcelas en bosques de hayas (*Fagus sylvatica*), en bosques de roble (*Quercus robur* L. en dos parcelas y *Quercus petraea* en siete parcelas) y en bosques mixtos (*Quercus robur* mezclado con *Fraxinus excelsior* L. y *Betula celtiberica* Rothm. & Vasc. en cinco parcelas, y *Quercus petraea* mezclado con *Fraxinus excelsior* y *Betula celtiberica* en nueve parcelas). En total se establecieron 24 parcelas en hayedos (cuatro parcelas en cada valle), 14 en bosques mixtos y 9 en robledales. Las parcelas de bosques mixtos y robledales no se establecieron de forma balanceada en los seis valles.

Una cuestión importante es el establecimiento de una metodología y una unidad de muestreo estandarizados para obtener datos comparables entre unidades de muestreo. Otros autores que trabajan en ecología de planarias terrestres han utilizado parcelas de medidas fijas (50x2m, 2x2m, 7x7m) o transectos de una longitud determinada (de 30 a 50m) como unidades de muestreo (CARBAYO *et al.*, 2002, CASTRO & LEAL-ZANCHET 2005, FICK *et al.*, 2006, BAPTISTA *et al.*, 2006, BAPTISTA & LEAL-ZANCHET 2010, LEAL-ZANCHET *et al.*, 2011). En cada parcela o transecto la metodología de muestreo usada en todos estos trabajos es siempre la búsqueda directa por un número fijo de investigadores (de 1 a 5) durante un período de tiempo estandarizado (entre 15 minutos y una hora). En el presente proyecto se ha estandarizado el esfuerzo estableciendo áreas de muestreo de 50x50 m de superficie (parcelas) en las que se realizó una búsqueda activa de planarias terrestres (bajo piedras y troncos caídos) por dos investigadores simultáneamente durante una hora sin pausa. De esta forma se uniformiza el esfuerzo de muestreo y queda establecida así la unidad muestral en la forma «número de individuos por hora recolectados por dos investigadores en una misma parcela».

Tabla 1. Datos globales de los muestreos. Parque: PNOMP – Parque nacional Ordesa y Monte Perdido, PNPE – Parque nacional Picos de Europa; Plot: código de cada parcela muestreado, formado por dos letras que designan el valle y un número correlativo (valles: AN – Añisclo, ES – Escuin, OR – Ordesa, PI – Pineta, AM – Amieva, BE – Bejer, DE – Deva, LA – Lagos, SA – Sajambre, VA – Valdeon; Bosque: Fo – hayedo de PNOMP, Fe – hayedo de PNPE, P – pinar, M – mixed forest, Q – robledal; PTab: número de ejemplares de planarias terrestres; PTsp: número de especies de planarias terrestres; pH: pH de los horizontes orgánicos del suelo; Agua: contenido hídrico del suelo en porcentaje; Temp: temperatura del suelo; Altitud: altitud en metros sobre el nivel del mar; Latitud y Longitud de grados decimales. Los datos de las columnas PTab y PTsp contienen la suma de los datos obtenidos en otoño y primavera en cada parcela. Los datos de las columnas pH, Agua y Temp contienen el promedio de los datos obtenidos en otoño y primavera en cada parcela.

Parque	Plot	Bosque	PTab	PTsp	pH	Agua	Temp	Altitud	Latitud	Longitud
PNOMP	AN01	Fo	8	2	7.92	34.72	6.85	1514	42.62354	0.05418
PNOMP	AN02	Fo	2	2	6.555	55.34	7.9	1469	42.61795	0.0532
PNOMP	AN03	Fo	2	1	6.885	65.56	8.05	1424	42.61465	0.05161
PNOMP	AN04	Fo	7	1	5.975	61.55	7.4	1405	42.61181	0.0497
PNOMP	AN05	Fo	5	2	6.255	69.25	9.217	1394	42.60729	0.05184
PNOMP	AN06	Fo	5	2	6.48	61.18	10.5	1393	42.60348	0.05374
PNOMP	ES01	Fo	7	1	6.905	44.16	9.333	1526	42.61636	0.10024
PNOMP	ES03	Fo	0	0	7.275	46.07	9.267	1493	42.60865	0.1054
PNOMP	ES05	Fo	1	1	6.85	46.98	6.517	1508	42.61577	0.10024
PNOMP	ES06	Fo	2	2	7.02	48.91	7.867	1546	42.61077	0.09839
PNOMP	OR01	Fo	1	1	7.62	63.49	8.617	1618	42.63648	-0.022
PNOMP	OR02	Fo	6	1	7.46	63.83	8.85	1360	42.64419	-0.04158
PNOMP	OR05	Fo	1	1	7.505	50.33	6.433	1393	42.63744	-0.0301
PNOMP	OR06	Fo	8	1	7.38	56.12	7.267	1366	42.63855	-0.03422
PNOMP	OR11	Fo	4	1	6.4	46.02	5.517	1310	42.64904	-0.06816
PNOMP	OR12	Fo	4	1	7.805	50.06	6.8	1338	42.64635	-0.04915
PNOMP	PI01	Fo	0	0	5.71	48.81	8.783	1591	42.68717	0.08033
PNOMP	PI02	Fo	3	2	6.635	53.44	10.2	1390	42.68201	0.07181
PNOMP	PI03	Fo	1	1	5.965	60.22	10.57	1382	42.68061	0.0705
PNOMP	PI04	Fo	15	2	6.615	54.36	10.63	1318	42.67604	0.07864
PNOMP	PI08	Fo	3	2	5.88	54.52	9.117	1284	42.67241	0.08728
PNOMP	PI12	Fo	4	2	6.53	53.46	8.217	1278	42.66951	0.08985
PNOMP	AN07	P	3	2	6.185	48.99	10.08	991	42.55814	0.05013
PNOMP	AN08	P	8	2	6.53	55.46	9.917	1035	42.56187	0.04138
PNOMP	AN09	P	3	3	5.93	26.23	8.933	1171	42.53611	0.07526
PNOMP	AN10	P	9	2	5.54	26.32	9.833	1094	42.53437	0.07866
PNOMP	AN11	P	5	2	7.025	36.97	10.18	1223	42.52631	0.08133
PNOMP	AN12	P	8	3	6.535	47.09	10.45	1074	42.56254	0.03365
PNOMP	ES02	P	3	1	6.915	55.51	9.133	1452	42.60918	0.10761

Parque	Plot	Bosque	PTab	PTsp	pH	Agua	Temp	Altitud	Latitud	Longitud
PNOMP	ES04	P	6	2	6.28	55.01	11.12	1433	42.60649	0.11477
PNOMP	ES07	P	2	1	6.24	41.79	8.183	1563	42.60861	0.09934
PNOMP	ES08	P	6	2	6.485	49.4	12.6	1345	42.60373	0.11941
PNOMP	ES09	P	0	0	5.85	58.71	5.717	1514	42.61599	0.09926
PNOMP	ES10	P	5	2	6.505	40.32	8.6	1327	42.60062	0.12239
PNOMP	OR03	P	11	2	5.325	50.82	8.983	1206	42.65457	-0.09533
PNOMP	OR04	P	3	2	6.375	57.05	9.783	1241	42.65677	-0.09794
PNOMP	OR07	P	2	1	6.06	56.98	8.967	1295	42.65616	-0.09101
PNOMP	OR08	P	0	0	4.95	62.91	11.2	1132	42.6522	-0.09058
PNOMP	OR09	P	10	2	5.525	44.56	6.567	1150	42.65183	-0.08643
PNOMP	OR10	P	0	0	5.195	37.22	6.983	1189	42.65347	-0.08286
PNOMP	PI05	P	4	2	7.34	29.51	6.717	1258	42.65346	0.13563
PNOMP	PI06	P	3	2	6.66	57.21	10.15	1277	42.66282	0.11046
PNOMP	PI07	P	4	3	5.44	60.88	14.22	1285	42.66985	0.09789
PNOMP	PI09	P	5	3	4.755	66.23	7.767	1256	42.66524	0.09786
PNOMP	PI10	P	10	2	5.58	65.74	9.017	1286	42.66134	0.10428
PNOMP	PI11	P	3	2	5.925	63.99	11.82	1265	42.65974	0.10794
PNPE	AM01	Fe	4	2	7.03	36.59	12.97	895	43.2141	-5.02324
PNPE	AM02	Fe	12	4	6.71	44.71	13.45	801	43.21615	-5.02594
PNPE	AM03	Fe	0	0	6.505	36.79	14.53	971	43.22621	-5.04553
PNPE	AM04	Fe	1	1	6.51	37.61	15.07	854	43.22973	-5.0492
PNPE	BE01	Fe	1	1	6.675	59.26	9.817	1106	43.23954	-4.70308
PNPE	BE02	Fe	0	0	6.035	55.28	10.65	1129	43.24225	-4.68725
PNPE	BE03	Fe	1	1	6.44	35.8	10.77	1142	43.23112	-4.78057
PNPE	BE04	Fe	0	0	7.42	31.34	11.35	1010	43.23	-4.76197
PNPE	DE01	Fe	3	3	6.96	52.56	9.183	928	43.10457	-4.7541
PNPE	DE02	Fe	10	3	6.6	34.27	8.833	931	43.10401	-4.757
PNPE	DE03	Fe	3	2	6.625	34.36	8.9	1089	43.1145	-4.78784
PNPE	DE04	Fe	2	2	6.555	30.6	9.45	1182	43.1144	-4.81166
PNPE	LA01	Fe	6	3	5.285	45.57	12.42	967	43.26546	-5.01993
PNPE	LA02	Fe	0	0	5.57	45.99	14	844	43.2636	-5.02237
PNPE	LA05	Fe	1	1	5.24	64.25	12.55	1155	43.26094	-4.98967
PNPE	LA06	Fe	0	0	6.14	30.87	14.33	1102	43.25489	-5.0045
PNPE	SA01	Fe	1	1	4.275	41.44	9.75	1345	43.16669	-5.00952
PNPE	SA02	Fe	4	3	4.175	57.61	10.6	1247	43.16324	-5.01995
PNPE	SA05	Fe	1	1	4.35	37.33	10.58	1081	43.15593	-5.03328

Parque	Plot	Bosque	PTab	PTsp	pH	Agua	Temp	Altitud	Latitud	Longitud
PNPE	SA06	Fe	0	0	4.46	37.94	10.12	1204	43.15904	-5.02333
PNPE	VA01	Fe	0	0	4.35	32.18	9.967	1238	43.12989	-4.94422
PNPE	VA02	Fe	0	0	5.36	31.88	10.52	1235	43.13111	-4.93103
PNPE	VA05	Fe	0	0	3.9	53.03	9.083	1353	43.11769	-4.97395
PNPE	VA06	Fe	0	0	5.685	32.18	9.233	1299	43.12609	-4.95444
PNPE	BE05	M	19	3	7.48	44.12	12.52	691	43.26168	-4.77407
PNPE	BE08	M	18	2	6.62	26.48	14.15	152	43.27944	-4.64597
PNPE	DE05	M	0	0	6.95	41.02	10.15	1049	43.12151	-4.80962
PNPE	DE08	M	14	3	7.39	29.01	11	959	43.13285	-4.78049
PNPE	DE09	M	2	1	7.3	40.53	12.22	845	43.18938	-4.67523
PNPE	SA04	M	4	2	5.89	35.91	13.2	926	43.12766	-5.01264
PNPE	SA07	M	5	2	5.79	41.83	12.65	912	43.15529	-5.04059
PNPE	VA04	M	2	1	7.11	38.2	15.1	593	43.19372	-4.90621
PNPE	VA08	M	9	4	7.41	55.89	13.25	589	43.19189	-4.91066
PNPE	AM07	M	4	2	7.875	21.37	13.85	115	43.30319	-5.12758
PNPE	LA03	M	1	1	7.325	27.25	17.38	300	43.3084	-5.06045
PNPE	LA04	M	2	2	5.275	28.54	17.18	341	43.30821	-5.06253
PNPE	LA07	M	3	1	6.755	50.29	12.98	204	43.30901	-5.05185
PNPE	LA08	M	4	3	6.18	35.2	13.75	161	43.32386	-5.08197
PNPE	AM05	Q	0	0	6.47	15.67	15.32	571	43.27772	-5.11203
PNPE	AM06	Q	5	3	5.71	30.5	15	527	43.28235	-5.11262
PNPE	BE06	Q	2	2	5.01	43	11.53	792	43.24788	-4.64942
PNPE	BE07	Q	0	0	4.86	37.82	12.47	707	43.24995	-4.64907
PNPE	DE06	Q	2	1	5.355	37.38	8.7	1216	43.15282	-4.73765
PNPE	SA03	Q	2	1	5.075	30.4	13.33	895	43.15792	-5.04059
PNPE	SA08	Q	0	0	4.755	31.79	12.58	915	43.12274	-5.0213
PNPE	VA03	Q	0	0	3.91	22.63	12.88	1081	43.14432	-4.92578
PNPE	VA07	Q	0	0	3.835	36.6	12.73	1068	43.13904	-4.94477

Todas las planarias encontradas fueron recolectadas e introducidas en pequeñas cajas de plástico rígido transparente (de 3x3 cm) con una base de tierra húmeda. Estas cajas son introducidas a su vez en un recipiente refrigerado, lo cual garantiza el mantenimiento de la humedad y temperatura adecuadas para el traslado

de los ejemplares vivos. Durante la noche del mismo día en que fueron recolectadas, las planarias fueron fotografiadas con un objetivo de macrofotografía (CANON MP-E 65mm f/2.8 L-5x) y flash anular (CANON Ring Lite MR L4EX), y observadas al microscopio estereoscópico para realizar una descripción detallada

de su morfología externa. Posteriormente cada ejemplar fue seccionado en dos trozos. El trozo anterior (más pequeño) se fijó con alcohol absoluto (para posteriores estudios moleculares). El trozo posterior fue sometido a un proceso de fijación con líquido Steinmann (1 parte de ácido nítrico concentrado, 1 parte de una solución saturada de cloruro de mercurio en cloruro de sodio al 5% y 1 parte de agua destilada) y conservado en alcohol de 70° (para posteriores estudios histológicos).

Medición de parámetros ambientales

Paralelamente a la toma de muestras de planarias terrestres, en cada parcela se realizaron medidas de la temperatura, pH y contenido hídrico del suelo al nivel de la capa de humus, así como la altitud con la ayuda de una unidad GPS (GARMIN etrex 30x). En cada parcela se midió la temperatura en tres puntos diferentes utilizando un termómetro digital de sonda (TFA 30.1040), se tomaron dos muestras de sustrato para medir el pH en laboratorio, y otras dos muestras para mediciones de contenido hídrico también en laboratorio. Las medidas de pH se realizaron durante la noche del mismo día en que fueron tomadas las muestras; se utilizó un pHímetro portátil y las mediciones se realizaron diluyendo la muestra original de sustrato en 5 volúmenes de agua destilada. También en la misma noche a la toma de muestras de sustrato se realizaron medidas del peso fresco de las dos muestras de cada parcela destinadas a medir el contenido hídrico. Una vez acabado el periodo de muestreo en cada parque, al día siguiente de la llegada al laboratorio en Barcelona, las muestras para contenido hídrico se secaron en una estufa a 105°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se volvieron a pesar las muestras, obteniéndose así el peso seco de las mismas. El contenido hídrico de las muestras se calculó por diferencia entre los pesos fresco y seco (contenido hídrico por gravimetría).

Análisis morfológico

El estudio histológico en secciones solo se ha realizado para unos pocos representantes de cada uno de los clados genéticos detectados (ver resultados), para ello los fragmentos fijados en el líquido Steinmann y conservados en alcohol al 70% se procesaron según el siguiente protocolo: (1) Deshidratación en una serie ascendente de concentraciones de alcohol; (2) Transparentado en aceite de clavo; (3) Inclusión en parafina sintética; (4) Corte a intervalos de 5-7 micras; (5) Montaje en portas revestidos de albúmina; (5) Tinción de las secciones con Mallory-Heidenhain (cf. SLUYS, 1989); (6) Montaje en Depex.

Mediante el análisis de las secciones con una cámara clara conectada a un microscopio compuesto se realizaron las reconstrucciones del aparato copulador. Estas se han comparado con la bibliografía existente para identificar las especies o bien describirlas en caso de ser nuevas para la ciencia.

Análisis molecular

La extracción del ADN total se ha realizado siguiendo un protocolo donde se utilizan productos de Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA) a partir de los fragmentos de tejido fijados en alcohol 100%. Se amplificó y secuenció el gen mitocondrial *Citocromo Oxidasa I* (CoxI) para todos los especímenes recolectados siguiendo el protocolo descrito en ÁLVAREZ-PRESAS *et al.* 2011. Los productos de PCR fueron enviados a Macrogen (Corea) para ser secuenciados.

Delimitación de especies y filogenia

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa Geneious v 8.1.7. (Biomatters). Para la alineación se ha utilizado la secuencia

de aminoácidos. El programa Jmodeltest2 (DARRIBA et al. 2012) se utilizó para seleccionar el modelo evolutivo más apropiado para este gen. La inferencia de los árboles filogenéticos se ha realizado con métodos probabilísticos, Máxima Verosimilitud (programa RAxMLHPCv8.0., STAMATAKIS 2014) con valores de bootstrap calculados a partir de 10000 repeticiones e Inferencia Bayesiana (Mr. Bayes v3.2., RONQUIST et al. 2012). El análisis bayesiano se realizó durante 5 millones de generaciones, muestreando cada 1000 árboles, mediante dos ejecuciones independientes con cuatro cadenas cada una (3 calientes y una fría). Con el fin de comprobar que ambas ejecuciones habían convergido, la congruencia de las topologías y los parámetros de ambas ejecuciones se compararon mediante la desviación estándar de las frecuencias. Para evitar el uso de los parámetros y árboles muestreados antes de llegar a la convergencia, se descartaron el 25% de los árboles guardados.

Análisis de estructura poblacional en planarias terrestres

Para la especie con un mayor número de representantes (*Microplana terrestris*) se han realizado análisis poblacionales. Para cada parque (tratando parque como población en lugar de valle, para tener potencia estadística) se ha estimado el número de haplotipos y los niveles de diversidad nucleotídica y haplotípica (h , π y Hd ; NEI 1987). Se ha visualizado la relación entre haplotipos y su distribución mediante la reconstrucción de una red de haplotipos utilizando el programa Network v5.0. (BANDELT et al. 1999). Los niveles de diferenciación genética a nivel de población se estimaron utilizando el estadístico F_{ST} de HUDSON et al. (1992). También aplicamos dos pruebas de neutralidad para comprobar si los niveles de polimorfismo de ADN se ajustan a lo esperado bajo la hipótesis de neutralidad (D de Tajima, TAJIMA 1989; y R_s , RAMOS-ONSINS & ROZAS 2002). Su significación estadística se

estimó mediante simulaciones de coalescencia. El análisis de los datos se han realizado con el programa DnaSP v5 (LIBRADO & ROZAS 2009).

Análisis estadísticos

El parámetro «número de ejemplares de cada especie de planaria terrestre encontrados en cada parcela por dos investigadores simultáneamente durante una hora» es el dato base para los análisis numéricos del presente estudio. Se han elaborado dos matrices de datos de doble entrada, una matriz de abundancias (especies/parcelas) en la que cada casilla contiene la abundancia de cada especie en cada parcela, y una matriz de variables (variables/parcelas) en la que cada casilla contiene el valor de cada variable en cada parcela. Se ha trabajado con dos categorías de variables: variables continuas (temperatura, pH y contenido hídrico del suelo al nivel del humus, y altitud) y variables categóricas (parque, valle, bosque). La variable parque tiene dos categorías (PNOMP y PNPE); la variable valle tiene diez categorías, cuatro correspondientes a las cuatro áreas establecidas del PNOMP (Añisclo, Escuaín, Ordesa y Pineta) y seis correspondientes a las áreas establecidas en el PNPE (Amieva, Bejes, Deva, Lagos, Sajambre y Valdeón); la variable bosque tiene cinco categorías, dos correspondientes a los tipos de bosque muestreados en el PNOMP (hayedo y pinar) y tres correspondientes a los bosques muestreados en el PNPE (hayedo, robledal y bosque mixto).

A partir de la matriz de datos de abundancias de las especies de planarias terrestres en las parcelas se ha realizado un Análisis de Componentes Principales (PCA). Para ello los datos de abundancia de las especies han sido transformados usando el procedimiento $\log(x+1)$, y han sido promediados por tipo de bosque en cada valle (Tabla 2). Para evitar sesgos debido a las especies raras se han eliminado del análisis aquellas especies con abundancia global inferior a cuatro ejemplares (MOTUs M35, M71 y M77).

Tabla 2. Abundancia media (expresada en número de ejemplares por parcela) de las especies (MOTUs) de planarias terrestres por tipo de bosque en cada valle de los dos Parques nacionales. PNOMP – Parque nacional Ordesa y Monte Perdido, PNPE – Parque nacional Picos de Europa. Valle: AN – Añiscada, ES – Escuin, OR – Ordesa, PI – Pineta, AM – Amieva, BE – Beier, DE – Deva, LA – Lagos, SA – Sajambre, VA – Valdeon. Bosque: F – hayedo, P – pinar, M – mixed forest, Q – robleal. Ni: número de parcelas. El * indica las especies con abundancia general inferior a 4 ejemplares y eliminadas del análisis PCA.

Parque	Valle	Bosque	N	M01	M02	M19	M20	M22	M23	M24	M25	M28	M35*	M37	M71*	M73	M77*	M78
PNOMP	AN	Fo	6	0.33	4.00	—	—	—	—	—	0.17	—	—	—	—	—	—	0.33
PNOMP	AN	P	6	0.33	3.83	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.83
PNOMP	ES	Fo	4	—	1.75	—	—	—	—	—	0.50	—	—	—	—	—	—	0.25
PNOMP	ES	P	6	—	2.33	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.33
PNOMP	OR	Fo	6	—	3.83	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.17
PNOMP	OR	P	6	—	3.83	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.50
PNOMP	PI	Fo	6	—	1.00	—	—	—	—	—	0.33	—	—	—	—	—	—	3.00
PNOMP	PI	P	6	0.33	1.83	—	—	—	—	—	0.67	—	—	—	—	—	—	2.00
PNPE	AM	Fo	4	—	1.00	—	—	—	—	—	—	2.50	0.25	0.25	—	0.25	—	—
PNPE	AM	M	1	—	2.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.00
PNPE	AM	Q	2	—	—	—	1.00	—	0.50	—	—	1.00	—	—	—	—	—	—
PNPE	BE	Fe	4	—	—	—	—	—	0.25	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PNPE	BE	M	2	—	13.00	—	—	—	1.00	—	—	4.00	—	—	0.50	—	—	—
PNPE	BE	Q	2	—	—	—	—	—	—	0.50	—	0.50	—	—	—	—	—	—
PNPE	DE	Fe	4	—	2.25	1.25	—	0.50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.50
PNPE	DE	M	3	—	1.67	—	—	1.00	—	—	—	2.67	—	—	—	—	—	—
PNPE	DE	Q	1	—	—	—	2.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PNPE	LA	Fe	4	—	—	—	—	—	0.25	—	—	1.00	—	—	—	—	—	—
PNPE	LA	M	4	—	1.75	—	—	0.25	—	—	—	—	0.25	—	0.25	—	—	—
PNPE	SA	Fe	4	—	—	—	—	—	—	—	—	0.50	—	—	—	—	—	—
PNPE	SA	M	2	—	3.00	—	—	—	—	—	—	1.00	—	—	—	—	—	—
PNPE	SA	Q	2	—	1.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PNPE	VA	Fe	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PNPE	VA	M	2	—	1.00	—	—	—	1.00	—	—	2.50	—	0.50	—	—	—	0.50
PNPE	VA	Q	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Los valores de las variables ambientales medidas en cada parcela (temperatura, contenido hídrico y pH a nivel del humus, y la altitud), así como las variables categóricas «parque», «valle» y «bosque» han sido igualmente introducidos en el análisis como variables ajustadas.

Se han utilizado las funciones «*rda*» y «*envfit*» del paquete estadístico «R Vegan package» (OKSANEN *et al.*, 2013) en el entorno «R-language» (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2013). La función «*rda*» realiza un PCA utilizando la abundancia de las especies como descriptores y las parcelas como objetos. El resultado del PCA es una configuración espacial en la cual los objetos se representan como puntos, distribuidos de tal manera que sus distancias se corresponden a sus similitudes en cuanto a la composición de especies de planarias terrestres que albergan. Asimismo, las especies se representan como flechas en el diagrama, apuntando en la dirección en que presentan su máxima abundancia. La función «*envfit*» ajusta en el PCA los vectores de las variables ambientales continuas (pH, temperatura, contenido hídrico y altitud) y los centroides de las diferentes categorías de las variables categóricas (parque, valle y bosque). Las flechas muestran la dirección del gradiente de las variables continuas, y su longitud es proporcional a la correlación entre la variable y la ordenación en cada eje.

Prueba de comparación de medias

Para comparar los valores medios de las diferentes variables continuas medidas en cada parcela se han utilizado (tras una prueba de Levene para comprobar la homogeneidad de varianzas) las pruebas «*t* de Student», «*U* de Mann-Whitney» y «ANOVA de una vía» (con comparaciones post hoc de Tukey en caso de existir diferencias significativas entre grupos en las pruebas ANOVA). Estos análisis, así como los gráficos de barras asociados, han sido elaborados con el paquete «Sigma Plot v.11».

RESULTADOS

Parámetros abióticos, abundancia y riqueza de planarias terrestres

En total se recogieron 202 planarias terrestres en el PNOMP y 148 en el PNPE. En las Figuras 1 y 2 se muestra por tipo de bosque, y de forma separada para los muestreos de otoño y primavera, la abundancia y riqueza de planarias terrestres y los valores de los parámetros abióticos medidos en cada parcela en los dos parques (temperatura, porcentaje de agua y pH del suelo al nivel del humus). En la Tabla 1 se muestran los valores promedios de las dos épocas por parcela.

En PNOMP los suelos del hayedo tienden a tener una menor temperatura, un mayor contenido hídrico y un pH más elevado que el pinar (diferencias más evidentes en primavera que en otoño). La abundancia media de planarias terrestres por parcela no varía significativamente entre los dos tipos de bosque, mientras que el número medio de especies por parcela es significativamente mayor en el pinar que en el hayedo durante la primavera de 2014.

En PNPE los suelos del bosque mixto tienden a tener una mayor temperatura y un pH más elevado que el hayedo y el robledal, mientras que el contenido hídrico es sensiblemente superior en el hayedo que en los otros dos tipos de bosque. Los valores medios de abundancia y número de especies por parcela son mayores en el bosque mixto, aunque las diferencias no son significativas (con la excepción del número de especies en primavera de 2014).

Diversidad de planarias terrestres

Los análisis moleculares (Figura 3) han delimitado un total de 15 MOTUs que en su mayoría

no coincidían con los morfotipos identificados por morfología externa “in situ” (que solo permitirían reconocer 4 morfotipos), en múltiples ocasiones un mismo morfotipo (principalmente el que corresponde a M02) se divide en múltiples clados genéticos que ni tan solo son grupos hermanos en el árbol filogenético.

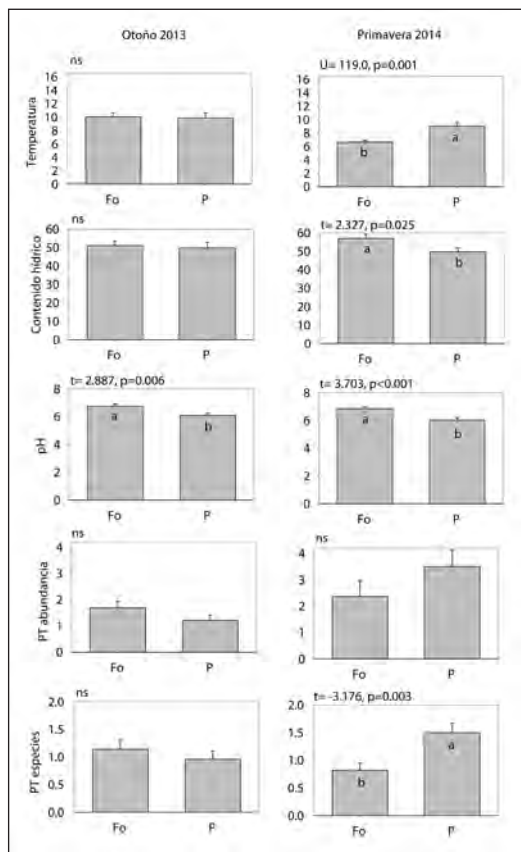


Fig. 1. Valores promedio de las variables ambientales, abundancia y número de especies para el PNOMP. Temperatura: temperatura del suelo; Contenido hídrico: contenido hídrico del suelo en porcentaje; pH: pH de los horizontes orgánicos del suelo; PT abundancia: número de ejemplares de planarias terrestres por parcela; PT especies: número de especies de planarias terrestres por parcela; Fo: hayedo (n=23); P: Pinar (n=23). Sobre cada gráfico se indica el resultado de una prueba estadística de comparación (t-Student o U Mann-Whitney) y se indican con letras los grupos con diferencias significativas. «ns»: prueba no significativa.

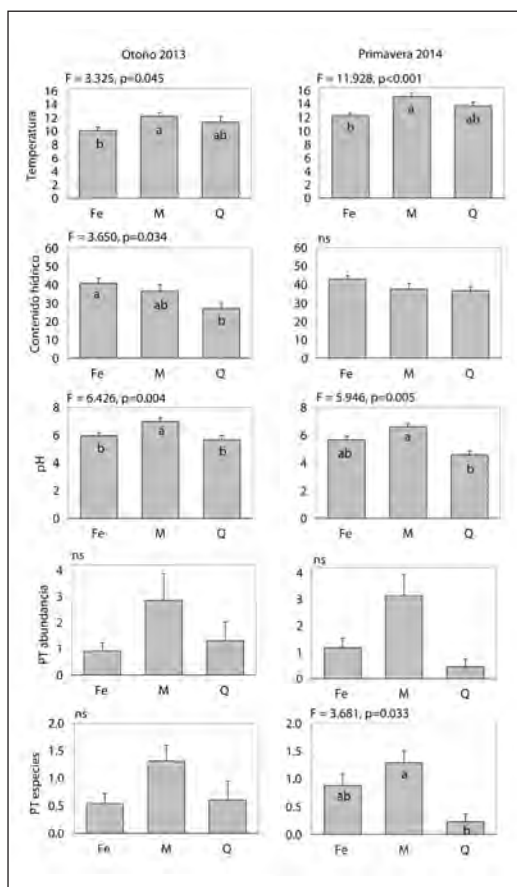


Fig. 2. Valores promedio de las variables ambientales, abundancia y número de especies para el PNPE. Temperatura: temperatura del suelo; Contenido hídrico: contenido hídrico del suelo en porcentaje; pH: pH de los horizontes orgánicos del suelo; PT abundancia: número de ejemplares de planarias terrestres por parcela; PT especies: número de especies de planarias terrestres por parcela; Fe: hayedo (n=24); Q: robleal (n=13); M: bosque mixto (n=10). Sobre cada gráfico se indica el resultado de un test de comparación (ANOVA de una vía) y se indican con letras los grupos con diferencias significativas según la prueba de Tukey. «ns»: prueba no significativa.

De los 15 MOTUs delimitados (Figuras 3 y 4) solamente 3 corresponden a especies descritas antes del inicio de este proyecto (*M. terrestris*, *M. aixandrei* Vila-Farre, Mateos, Sluys & Romero, 2008 y *M. nana* Mateos, Giribet and Carranza, 1998), el resto están siendo o serán descritas en base

a datos morfológicos y métodos moleculares de delimitación de especies (MATEOS et al., 2017; ÁLVAREZ-PRESAS et al. en preparación). De las especies ya conocidas dos están presentes en ambos parques, *M. terrestris* (M02 en las tablas) una especie de amplia distribución en Europa, y

M78 que corresponde a *M. aixendrei*-2 (MATEOS et al., 2017) presente en diversas localidades de la península ibérica y el resto de Europa. La tercera especie conocida, *M. nana* (M01 en las tablas) se encuentra solamente en el PNOMP y en poblaciones de Catalunya (Tarragona, Barcelona, Girona).

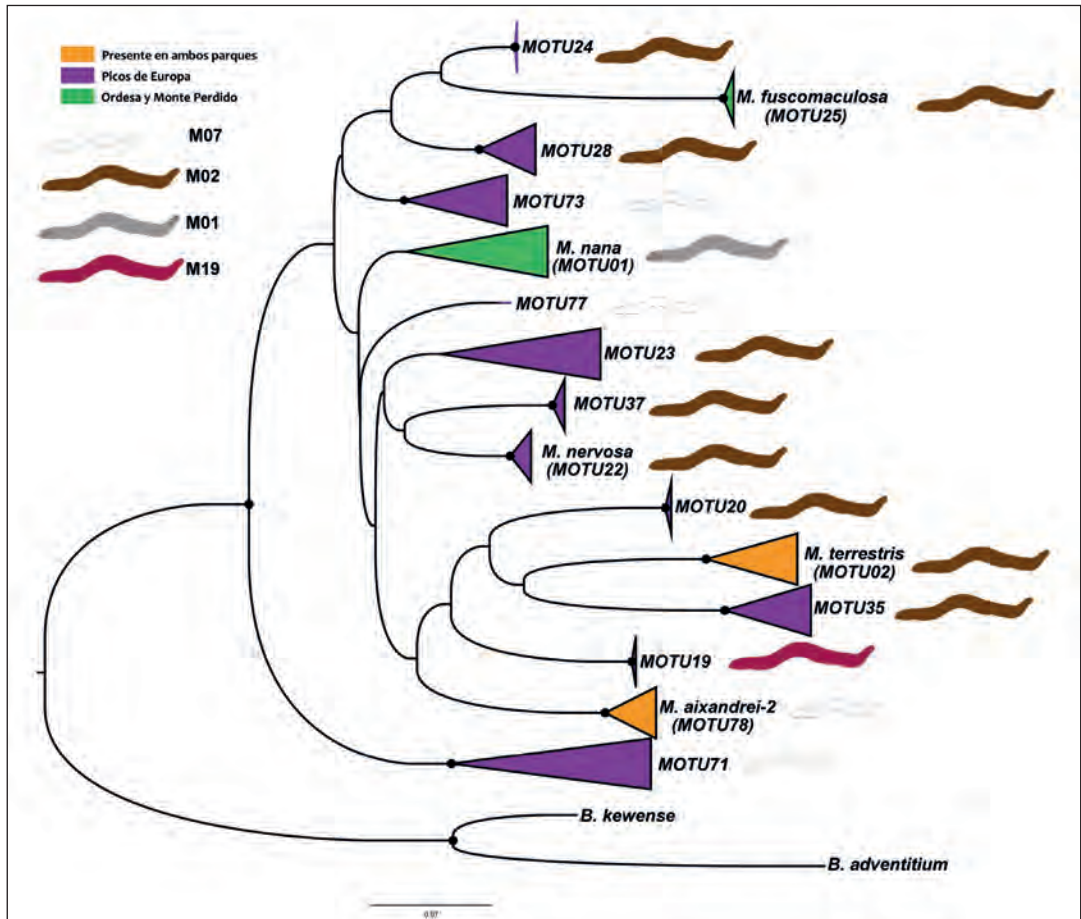


Fig. 3. Árbol filogenético obtenido a partir de los datos del gen Cox1 mediante máxima verosimilitud. Los nodos con un punto presentan un soporte >75% de bootstrap y >0.85 para la probabilidad posterior de la inferencia bayesiana. La escala representa el número de sustituciones por posición. Se han colapsado los clados correspondientes a cada MOTU y los colores indican el origen geográfico de cada uno de ellos. Los dibujos de planarias terrestres muestran los cuatro morfotipos identificados en base a la morfología externa y la asignación original de los individuos de cada MOTU.

El PNPE presenta una diversidad mayor, con un total de 13 MOTUs, de los que 7 serán probablemente especies endémicas del propio

parque o de una zona no muy extensa alrededor del mismo, ya que no se han encontrado en los muestreos que hemos realizado

en los últimos años en la región norte de la península ibérica (MATEOS *et al.*, 2009; ÁLVAREZ-PRESAS *et al.*, 2012). En PNOMP no hemos encontrado ningún endemismo. En este

parque además de las tres especies indicadas más arriba, está presente una cuarta especie nueva pero que también hemos encontrado en muestreos en otros países europeos.



Fig. 4. Imágenes de los 15 MOTUs de planarias terrestres encontrados en los Parques nacionales Ordesa y Monte Perdido y Picos de Europa. Todos los ejemplares con el extremo anterior hacia la izquierda. Barras de escala: A=2 mm, B=4 mm, C=5 mm, D=10 mm, E=15 mm, F=20 mm.

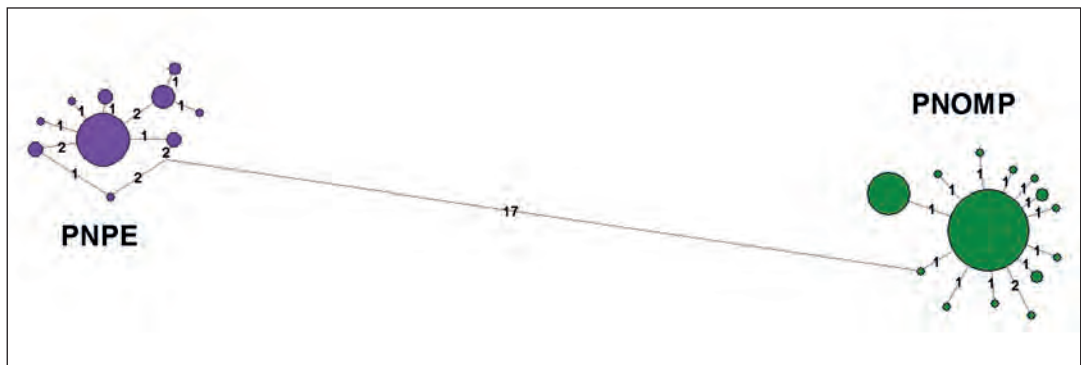
Análisis poblacional de *Microplana terrestris*

La Tabla 3 muestra un resumen de la diversidad nucleotídica y haplotípica de *Microplana terrestris* en ambos parques. Los valores de π (diversidad nucleotídica) son muy bajos siendo el valor de PNPE el más elevado. El número de haplotipos y

sitios polimórficos en ambos parques es muy parecido, pero sus poblaciones no comparten haplotipos (Figura 5). El valor de F_{ST} muestra una clara diferenciación genética entre ambos parques ($F_{ST}=0.96$). Además la población de PNOMP tiene una diversidad genética inferior y un valor de D de Tajima negativo y significativo (-2,07502*).

Tabla 3. Resumen de las estimas de diversidad molecular para el gen mitocondrial *CoxI*.

Población	<i>n</i>	Nº Haplotipos (<i>h</i>)	Diversidad haplotípica (<i>Hd</i>)	Nº sitios polimórficos (<i>S</i>)	Nº sitios polimórficos (π)
PNOMP	130	14	0.483	14	0.00079
PNPE	62	12	0.612	13	0.00172

**Fig. 5.** Red de haplotipos del gen *CoxI* para la especie *Microplana terrestris*. Los números representan el número de sustituciones, el diámetro de los círculos es proporcional al número de individuos que presenta el haplotipo.

Distribución de las especies de planarias terrestres en los parques

En la Figura 6 se representan las abundancias medias de las especies de planarias terrestres en los bosques de los dos parques. En el PNOMP las mismas cuatro especies se encuentran en los dos tipos de bosque y con abundancias muy similares. En PNPE las trece especies encontradas no se distribuyen de forma homogénea en los tres tipos de bosque. En el hayedo se han encontrado once especies, seis en el robledal y diez en el bosque mixto. En el hayedo y el robledal las especies presentan abundancias medias muy similares (en general bajas), mientras que en el bosque mixto dos especies destacan por su elevada abundancia media (MOTU02 y MOTU28).

Las comunidades de planarias terrestres

La composición de las comunidades de planarias terrestres encontradas en los parques muestreados se ha analizado mediante un Análisis de Componentes principales (PCA). La inercia total del PCA ha sido de 0.2313. Los dos primeros ejes explican el 70% de la inercia total (41.3% el eje 1 y 28.2% el eje 2), lo cual es una cantidad importante de inercia explicada. En el diagrama formado por estos dos primeros ejes (Fig. 7A), y que representa los puntos (valle-bosque) y las especies de planarias terrestres (flechas), los puntos quedan bien separados según el parque al que pertenecen (con recuadro las parcelas de PNOMP y sin recuadro los de PNPE). Los vectores de las especies (flechas rojas) apuntan en la dirección en que presentan su máxima abundancia, quedando patente qué especies son

representativas de cada parque. En el diagrama que representa la proyección de las variables ambientales y los centroides de las variables categóricas (Fig. 7B), queda asimismo patente la separación entre los dos parques y se aprecian las características abióticas de cada uno de ellos representadas por los vectores de las variables ambientales. En términos generales PNOMP es un área de mayor altitud, y los suelos forestales estudiados presentan un mayor contenido hídrico y una menor temperatura que en PNPE. Los valores de pH son globalmente similares en

ambos parques. La proximidad de los centroides de los valles y bosques en el PNOMP indica que la composición específica de planarias terrestres en el conjunto del parque es muy similar. En el PNPE se aprecia una mayor separación entre los centroides de los diferentes tipos de bosque, sobre todo entre el bosque mixto con respecto del hayedo y el robledal. Esto es indicativo de que la composición específica de las comunidades de planarias terrestres en el bosque mixto es diferente de la encontrada en el hayedo y el robledal.

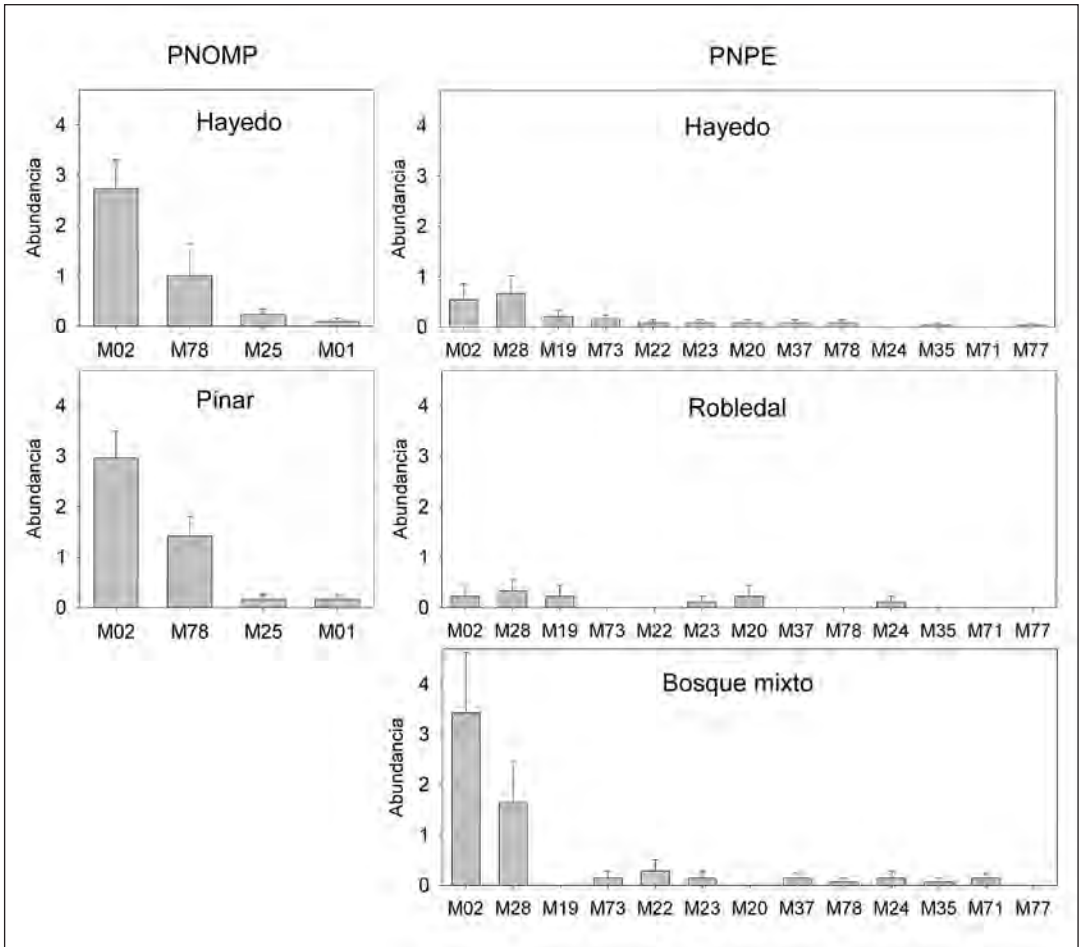


Fig. 6. Abundancias medias (+ error estándar) de los MOTUs de planarias terrestres en los bosques de los Parques nacionales de Ordesa y Monte Perdido (PNOMP) y del Parque nacional Picos de Europa (PNPE).

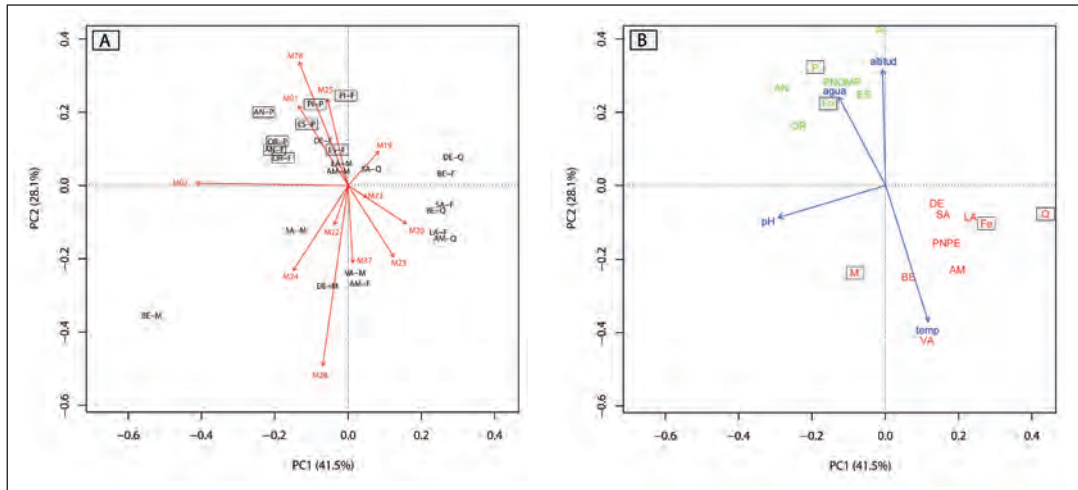


Fig. 7. Representación de los dos primeros ejes del análisis de Componentes Principales (PCA). Las abundancias de las especies en las parcelas han sido promediadas por valle y tipo de bosque (Tabla 2). A: Cada punto «valle-bosque» se etiqueta con un código compuesto de dos caracteres que indica el valle, seguido de un guion y otro carácter que indica el tipo de bosque; los puntos «valle-bosque» enmarcados corresponden al PNOMP, los no enmarcados corresponden al PNPE; las especies se sitúan en el extremo de las flechas que apuntan en la dirección de su máxima abundancia. B: Representación (en el mismo diagrama PCA que la figura B) de los centroides de las variables categóricas (parque, valle y bosque) y del ajuste de las variables continuas (Temperatura —Temp—, pH, contenido hídrico —agua— y altitud); los «puntos-bosque» están enmarcados, los «puntos-valle» se representan con dos letras y no están enmarcados, los «puntos-parque» se representan con sus siglas (PNOMP y PNPE); en verde los puntos correspondientes al PNOMP, en rojo los correspondientes al PNPE.

DISCUSIÓN

La abundancia de planarias terrestres en los dos parques y en los distintos tipos de bosques ha sido moderada en cuanto al total de individuos pero ha sido sorprendentemente alta en cuanto al número de especies, sobre todo en PNPE. Por otro lado, la hipótesis inicial de que los hayedos, siendo probablemente más húmedos, albergarían una mayor abundancia de planarias terrestres no ha recibido el soporte de los datos obtenidos. Aunque observamos claras diferencias de abundancia de planarias terrestres entre bosques en ambos parques, éstas no son significativas en ningún caso. Además, a pesar de que los parámetros abióticos presentan algunas diferencias significativas entre los distintos tipos de bosque dentro de cada parque en el sentido

esperable, por ejemplo una mayor humedad del suelo en los hayedos, con los datos obtenidos estos parámetros no parecen estar correlacionados con las diferencias observadas en abundancia de planarias (Figuras 1 y 2).

El análisis filogenético del gen *Cox1* ha demostrado ser una herramienta básica para conocer de forma rápida la composición de especies. Ha permitido asignar bien los individuos a especies (conocidas o pendientes de descripción), dándose una buena coincidencia entre los grupos genéticos y la existencia de caracteres anatómicos internos que permiten diagnosticar las especies. En cambio, como ya se había observado en casos anteriores, el aspecto externo de los animales puede conducir a errores ya que existe un elevado número de especies de coloración

y tamaño similar (Figuras 3 y 4). Los resultados de este trabajo han dado lugar al descubrimiento de numerosas especies crípticas escondidas bajo la apariencia externa de *M. terrestris* (M02) o *M. aixandrei-2* (M78). Es de destacar que en más de una ocasión estas especies crípticas se han encontrado conviviendo en una misma parcela, hecho que plantea futuras preguntas como la existencia o no de competencia entre ellas.

En ambos parques *M. terrestris* ha sido la especie más abundante. En trabajos anteriores se había detectado que esta especie es la más frecuente en el norte de la península ibérica y está estructurada genéticamente en dos grandes grupos: (1) poblaciones desde Catalunya hasta Huesca y (2) poblaciones desde Navarra hasta Galicia y norte de Portugal (ÁLVAREZ-PRESAS *et al.* 2012). Las poblaciones del PNPE se sitúan en este segundo grupo, mientras que las de PNOMP se sitúan en el primero. Los resultados del análisis poblacional de esta especie, con indicaciones de la falta de flujo genético entre los dos PPNN y una mayor diversidad en el PNPE, y especialmente los indicios de una expansión reciente para la población de PNOMP, dan soporte a la hipótesis de una separación durante las glaciaciones del Pleistoceno. Esta separación habría dejado aisladas, en la región oeste de la península, poblaciones relictas relativamente grandes y diversas, mientras que en la región este las poblaciones actuales, mucho más relacionadas con el resto de poblaciones europeas, procederían de un evento de expansión reciente a partir de una población menor y menos diversa. Estos dos grandes grupos genéticos de *M. terrestris* coinciden con los grupos genéticos en bosques de haya (*Fagus sylvatica*) y robledales (*Quercus*) en la misma región (MAGRI *et al.*, 2006; MAGRI, 2008; PETIT *et al.*, 2002a; 2002b); BAGNOLI *et al.*, 2015). Es posible que la coincidencia de la diferenciación genética observada en *M. terrestris* con la observada en los bosques húmedos sea consecuencia de la misma historia paleoclimática debido a la dependencia de estos animales de este tipo de hábitat.

La segunda especie común a los dos parques, *M. aixandrei-2*, presenta una situación distinta, ya que ambos parques comparten unos pocos haplotipos del gen *Cox1* muy poco diferenciados entre ellos. Sin embargo, la poca representación de esta especie en PNPE (solamente 4 individuos) no nos permite sacar conclusiones relevantes de la comparación entre parques.

El análisis de PCA indica que, en el PNOMP, la composición específica de planarias terrestres en el conjunto del parque es muy similar entre valles y tipos de bosque, mientras que en el PNPE se aprecia que la composición específica de las comunidades de planarias terrestres en el bosque mixto es sensiblemente diferente de la encontrada en el hayedo y el robledal. Todos los análisis realizados nos indican una composición de especies distinta entre los dos parques (Figuras 3, 6 y 7). Curiosamente, encontramos una mayor diversidad a nivel de especies en PNPE que en PNOMP, el mismo patrón que observamos dentro de la especie *M. terrestris*. Así, la explicación de esta diferencia en número y composición de especies entre parques podría ser similar a la de *M. terrestris*. Es probable que la región ocupada por el PNPE haya actuado como un refugio de especies que diversificaron con anterioridad a los períodos glaciales, y que tal vez tuvieron una distribución mucho más amplia en la península ibérica, pero que tras el último período glacial (Last Glacial Maximum, LGM) han quedado restringidas a esta área. Esto explicaría la abundancia de especies endémicas en el PNPE. Por otro lado, en la región donde se sitúa el PNOMP, tal y como veíamos para *M. terrestris*, se habría situado algún microrefugio a partir del cual las especies se habrían recuperado después del LGM y expandido hacia el resto de Europa, lo que explicaría la presencia de las mismas especies encontradas en otros países europeos con una diferenciación genética muy baja (ÁLVAREZ-PRESAS *et al.*, 2012 y en preparación). Una alternativa sería que el/los microrefugios a partir de los que se ha repoblado la región del

PNOMP no se encontrasen en el Pirineo sino más al norte en Europa y desde allí se haya realizado la recolonización del continente (HEWITT 2004). Estos resultados se ajustarían también a la historia conocida para los bosques de haya (MAGRI et al., 2006, MAGRI 2008). Serán necesarios un amplio muestreo de especies a nivel europeo y análisis moleculares a nivel poblacional para probar estas hipótesis.

CONCLUSIONES

No se han encontrado diferencias significativas en la abundancia de planarias terrestres entre bosques o parques, pero sí que se ha encontrado diferencias en cuanto a la composición de especies entre parques. Aunque las diferencias en los niveles de pluviosidad entre ambos parques (algo mayor en los Picos de Europa) podrían afectar a la riqueza de taxones, los datos obtenidos no parecen indicar que, en primavera y otoño, los factores abióticos presenten una correlación con la abundancia de planarias. En cambio, los datos genéticos obtenidos apoyan que sean los factores históricos recientes los que expliquen las diferencias de composición de comunidades de planarias terrestres entre parques.

Picos de Europa es un centro de diversidad del suelo muy importante, con 11 especies nuevas (7 de ellas probablemente endémicas) practica-

mente se duplica el número de especies conocidas hasta ahora en Europa para *Microplana*.

Finalmente, creemos importante remarcar que la gran diversidad de planarias terrestres encontrada en los parques nacionales estudiados, situadas en la parte superior de la cadena trófica y altamente sensibles a la pérdida de su hábitat, puede ser un reflejo de una diversidad equivalente de otros grupos de organismos del suelo, todos ellos poco estudiados y probablemente muy importantes en el mantenimiento del ecosistema que no deben ser olvidados.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a Amparo Mora Cabello de Alba (parque nacional Picos de Europa), Elena Villagrasa y Ramón Castillo (parque nacional Ordesa y Monte Perdido), por facilitarnos la infraestructura y apoyo logístico necesarios para la realización de las campañas de recolección. Asimismo nuestro agradecimiento a todos los guardas de ambos parques nacionales que nos han acompañado durante nuestras jornadas de trabajo de campo. Agradecemos a Arnau Poch, Laia Leria y Paula Escuer su activa participación en las campañas de recolección. También queremos agradecer al Organismo Autónomo Parques Nacionales (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) la financiación concedida en su convocatoria de 2012 (ref 589/2012).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁLVAREZ-PRESAS, M.; CARBAYO, F.; ROZAS, J. y RIUTORT, M. (2011): Land planarians (Platyhelminthes) as a model organism for fine-scale phylogeographic studies: understanding patterns of biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Revista: Journal of Evolutionary Biology* 24: 887 -896.
- ÁLVAREZ-PRESAS, M.; MATEOS, E.; VILA-FARRÉ, M.; SLUYS, R. y RIUTORT, M. (2012): Evidence for the persistence of the land planarian species *Microplana terrestris* (Müller, 1774) (Platyhelminthes, Tricladida) in microrefugia during the Last Glacial Maximum in the northern section of the Iberian Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 64: 491-499.
- AVISE, J. C. (2000): *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

- BAGNOLI, F.; TSUDA, Y.; FINESCHI, S.; BRUSCHI, P.; MAGRI, D.; ZHELEV, P.; PAULE, L.; SIMEONE, M.C.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C. y VENDRAMIN, G.G. (2015): Combining molecular and fossil data to infer demographic history of *Quercus cerris*: Insights on European eastern glacial refugia. *Journal of Biogeography*, 43: 679-690.
- BANDELT, H.J.; FORSTER, P. y RÖHL, A. (1999): Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- BAPTISTA, V.A.; MATOS, L. B.; FICK, I. A. y LEAL-ZANCHET, A. M. (2006): Composição das comunidades de planárias terrestres (Platyhelminthes, Tricladida, Terrícola) do Parque Nacional dos Aparados da Serra, Brasil. *Iheringia, Sér. Zool.* 96(3): 293-297.
- BAPTISTA, V.A. y LEAL-ZANCHET, A. M. (2010): Land flatworm community structure in a subtropical deciduous forest in Southern Brazil. *Belgian Journal of Zoology* 140 (SUPPL.): 83-90.
- BENITO ALONSO, J. L. (2010): Vegetación del Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido (Sobrarbe, Pirineo central aragonés). 421 pp + Mapa de vegetación I: 40.000. Serie Investigación, n.º 50. Consejo de Protección de la Naturaleza de Aragón. Gobierno de Aragón. Zaragoza. ISBN: 84-89862-54-0.
- CARBAYO, F.; LEAL-ZANCHET, A. M. y VIEIRA, E. M. (2002): Terrestrial flatworm (Platyhelminthes: Tricladida: Terrícola) diversity vs. man-induced disturbance in a subtropical rainforest from Southern Brazil. *Biod. Conserv.* 11: 1091-1104.
- CASTRO, A. DE y LEAL-ZANCHET, A. M. (2005): Composição de comunidades de planárias terrestres (Platyhelminthes) em áreas de floresta estacional decidual e de campo na região central do rio grande do sul, brasil *Acta Biologica Leopoldensia* 27(3): 147-150.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R. y POSADA, D. (2012): jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- FICK, I. A.; LEAL-ZANCHET, A. M. y VIEIRA, E. M. (2006): Community structure of land flatworms (Platyhelminthes, Terrícola): comparisons between Araucaria and Atlantic forest in Southern Brazil. *Invertebrate Biology*, 125 (4): 306-313.
- FROELICH, C. G. (1955): Sobre morfologia e taxonomia das Geoplanidae. *Bol. Fac. Fil. Ciênc., Sér. Zool.* 19: 195-279.
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L. y DEWAARD, J. R. (2003): Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci.* Feb 7; 270 (1512): 313-321.
- HEWITT, G. M. (2004): Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 2004 359, 183-195.
- HUDSON, R. R.; SLATKIN, M. y MADDISON, W. P. (1992): Estimation of Levels of Gene Flow from DNA Sequence Data. *Genetics* 132: 583-589.
- ISO 2003a. Soil quality - Sampling of soil invertebrates – Part 1: Hand-sorting and formaline extraction of earthworms. ISO/DIS 23611-1.
- ISO 2003b. Soil quality - Sampling of soil invertebrates – Part 4: Sampling, extraction and identification of free-living stages of terrestrial nematodes. ISO/DIS 23611-1.
- ISO 2004a. Soil quality - Sampling of soil invertebrates – Part 2: Sampling and extraction of microarthropods (Collembola and Acarina). ISO/DIS 23611-2.
- ISO 2004b. Soil quality - Sampling of soil invertebrates – Part 3: Sampling and soil extraction of enchytraeids. ISO/DIS 23611-3.
- KAWAGUTI, S. (1932): On the physiology of land planarians. *Mem. Fac. Sci. & Agr., Taihokulmp. Univ., Formosa, Japan* 7: 15-55.
- LAVELLE, P. y SPAIN, A.V. (2000): *Soil Ecology*. Kluwer Academic Publishers, 654 pp.
- LAVELLE, P. (2002): Functional domains in soils. *Ecological Research* 17: 441-450.
- LEAL-ZANCHET, A. M.; BAPTISTA, V.; CAMPOS, L. M. y RAFFO, J. F. (2011): Spatial and temporal patterns of land flatworm assemblages in Brazilian Araucaria forests. *Invertebrate Biology*, 130 (1): 25-33.
- LIBRADO, P. y ROZAS, J. (2009): DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- MCDONALD, J. C. y JONES, H. D. (2007): Abundance, reproduction, and feeding of three species of British terrestrial planarians: Observations over 4 years. *J. Nat. Hist.* 41, 293-312.

- MAGRI, D. (2008): Patterns of post-glacial spread and the extent of glacial refugia of European beech (*Fagus sylvatica*). *J. Biogeography* 35: 450-463.
- MAGRI, D.; VENDRAMIN, G. G.; COMPS, B.; DUPANLOUP, I.; GEBUREK, T.; GÖMÖRY, D.; LATAŁOWA, M.; LITT, T.; PAULE, L.; ROURE, J. M.; TANTAU, I.; VAN DER KNAAP, W. O.; PETIT, R. J. y BEAULIEU, J. L. (2006): A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytologist* 171: 199-221.
- MATEOS, E.; CABRERA, C.; CARRANZA, S. y RIUTORT, M. (2009): Molecular analysis of the diversity of terrestrial planarians (*Platyhelminthes, Tricladida, Continenticola*) in the Iberian Peninsula. *Zoologica Scripta*, 38, 6: 637-649.
- MATEOS, E.; CARRANZA, S.; CABRERA, C. y VILA, M. (2007): Les planàries terrestres (*Platyhelminthes: Tricladida*) de la Garrotxa. *Annals de la Delegació de la Garrotxa de la Institució Catalana d'Historia Natural*, 2: 35-38.
- MATEOS, E.; GIRIBET, G. y CARRANZA, S. (1998): Terrestrial planarians (*Platyhelminthes, Terricola*) from the Iberian Peninsula: first records of the family *Rhynchodemidae*, with the description of a new *Microplana* species. *Contributions to Zoology* 67 (4): 267-276.
- MATEOS, E.; VILA, M. y ROMERO, R. (2003): Presència del gènere *Microplana* (*Platyhelminthes, Tricladida, Terricola*) al Parc Natural del Montnegre. IV Trobada d'Estudiosos del Montnegre i el Corredor, Diputació de Barcelona: 101-104.
- MATEOS, E.; SLUYS, R.; RIUTORT, M.; ÁLVAREZ-PRESAS, M. (2017): Species richness in the genus *Microplana* (*Platyhelminthes, Tricladida, Microplaninae*) in Europe: as yet no asymptote in sight. *Invertebrate Systematics*, 31: 269-301.
- NEI, M. (ed.) (1987): *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- OKSANEN, J.; GUILLAUME BLANCHET, F.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIN, P. R.; O'HARA, R. B.; SIMPSON, G. L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M. H. H. y WAGNER, H. (2013): *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.0-8.
- PETIT, R.; BREWER, S.; BORDÁCS, S.; BURG, K. (2002a): Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidences. *Forest Ecology and Management* 156: 49-74.
- PETIT, R. J.; CSAIKL, U. M.; BORDÁCS, S.; BURG, K.; COART, E.; COTTRELL, J.; VAN DAM, B.; DEANS, J. D.; DUMOLIN-LAPÈGUE, S.; FINESCHI, S.; FINKELDEY, R.; GILLIES, A.; GLAZ, I.; GOICOECHEA, P. G.; JENSEN, J. S.; KÖNIG, A. O.; LOWE, A. J.; MADSEN, S. F.; MÁTYÁS, G.; MUNRO, R. C.; OLALDE, M.; PEMONGE, M. H.; POPESCU, F.; SLADE, D.; TABBENER, H.; TAURCHINI, D.; DE VRIES, S. G. M.; ZIEGENHAGEN, B.; KREMER, A. (2002b): Chloroplast DNA variation in European white oaks. *Forest Ecology and Management*, 156 (1-3): 5-26.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2013). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.r-project.org/>.
- RAMOS-ONSINS, S. E. y ROZAS, J. (2002): Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19: 2092-2100.
- RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A. y HUELSENBECK, J. P. (2012): MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology* 61: 539-542.
- SLUYS, R. (1999): Global diversity of land planarians (*Platyhelminthes, Tricladida, Terricola*): a new indicator-taxon in biodiversity and conservation studies. *Biodiversity and Conservation* 8(12): 1663-1681.
- SLUYS, R.; KAWAKATSU, M.; RIUTORT, M. y BAGUÑA, J. (2009): A new higher classification of planarian flatworms (*Platyhelminthes, Tricladida*). *Journal of Natural History*, 43 (29-30): 1763-1777.
- SLUYS, R.; MATEOS, E.; RIUTORT, M. y ÁLVAREZ-PRESAS, M. (2016): Towards a comprehensive, integrative analysis of the diversity of European microplanid land flatworms (*Platyhelminthes, Tricladida, Microplaninae*), with the description of two peculiar new species. *Systematics and Biodiversity*, 14(1): 9-31.
- STAMATAKIS, A. (2014): RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312-3.
- SUNNUCKS, P.; BLACKET, M. J.; TAYLOR, J. M.; SANDS, C. J.; CIAVAGLIA, S. A.; GARRICK, R. C.; TAIT, N. N.; ROWELL, D. M. y PAVLOVA, A. (2006): A tale of two flatties: different responses of two terrestrial flatworms to past environmental climatic fluctuations at Tallaganda in montane southeastern Australia. *Molecular Ecology* 15: 4513-4531.
- TAJIMA, F. (1989): Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

- VILA-FARRÉ, M.; SLUYS, R.; MATEOS, E. y JONES, H. D. (2011): Land planarians (*Platyhelminthes, Tricladida, Geoplanidae*) from the Iberian Peninsula: new records and description of two new species, with a discussion on ecology, *Journal of Natural History*, 45 (15-16): 869-891.
- VILA-FARRÉ, M.; MATEOS, E.; SLUYS, R. y ROMERO, R. (2008): Terrestrial planarians (*Platyhelminthes, Tricladida, Terricola*) from the Iberian Peninsula: new records and description of three new species. *Zootaxa* 1739: 1-20.
- VILLAR, L. y BENITO, J. L. (2004): Los Bosques del Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido (Pirineo central español): cartografía, valor ecológico y conservación. *Naturalia Maroccana* 2 (1-2): 155-162.