

# Historia y distribución de las sanixueles melecinables ibéricas

## *Hirudo verbana bilineata*, una nueva subespecie

Por **Andrés Arias Rodríguez**

Prof. Ayudante Doctor

Departamentu de Biología d'Organismos y Sistemes (Zooloxía)

Universidá d'Uviéu

Versión n'inglés y más amplia na revista *Biology*, 10: 315 (2021) <https://doi.org/10.3390/biology10040315>: Unravelling the Extent of Diversity within the Iberian Medicinal Leeches (Hirudinea: *Hirudo*) Using Molecules and Morphology.

A. Arias (Deptu. BOS, Zooloxía, Univ. Uviéu); V. Surugiu (Fac. of Biology «Alexandru Ioan Cuza», Univ. of Iasi, Rumanía); R. Carballeira (Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), Fac. Ciencias, Univ. da Coruña); O. P. Popa & L. O. Popa (Grigore Antipa National Museum of Nat. History, Bucharest, Rumanía) & S. Utevsky (Dep. of Zoology and Animal Ecology, V. N. Karazin Kharkiv National University, Ucraína)



La sanixuela melecinal «sensu lato» — *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758— ye una de les primeres especies descrites d'Anélidos y el representante más conocíu de la subclás Hirudinea, que foi nomada y definida orixinalmente por esta especie. Les sanixueles melecinales son ectoparásitos hematófagos de vertebrados y utilícense ampliamente en medicina y como organismu modelu en bioloxía y fisioloxía<sup>1</sup>. *Hirudo medicinalis* consideróse tradicionalmente como una única especie; sicasí, delles publicaciones de recién demostraron que lo que se consideraba *H. medicinalis* en realidá compriende pelo menos cinco especies estremaes: *Hirudo medicinalis*, *Hirudo troctina* Johnson, 1816; *Hirudo verbana* Carena, 1820; *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005 ya *Hirudo sulukii* Saglam, Saunders, Lang y Shain, 2016<sup>1-7</sup>. La bioxeografía de les sanixueles melecinales del Paleárticu occidental foi revisada va poco por Utevsky *et al.*<sup>6</sup>. Estos autores afirmaron qu'*H. medicinalis* se distribúi dende Gran Bretaña y el sur de Noruega hasta'l sur de Los Urales y probablemente hasta Los Montes d'Altai; *H. verbana* distribúise dende Suiza ya Italia a Turquía y Uzbequistán; *H. orientalis* atópase nos países de Transcaucasia, Irán y Asia Central; *H. troctina* ta presente nel noroeste d'África y el sur d'Iberia<sup>6</sup>, y finalmente *H. sulukii*, hasta agora, namás se conoz nel sureste d'Anatolia<sup>7</sup>. Arriendes d'ello, los autores mentaos<sup>6</sup> tamién concluyeron que les condiciones climátiques xueguen un papel importante nos patrones de distribución de les sanixueles melecinales na rexón del Paleárticu Occidental.

Pola mor de les sos carauterístiques xeográfiques, la Península Ibérica tien diferentes tipos de clima, destacando'l clima oceánicu de norte a noroeste y el mediterraneu nes rexones centru y sur. Tamién presenta tanto'l clima alpín como'l subárticu nos montes más altos del norte d'España (principalmente El Cordal Cantábricu y Los Pirineos)<sup>8</sup>. Dende la perspeutiva bioxeográfica, la nuesa península considérase ún de los abellugos glaciares del Pleistocenu más importantes del subcontinente européu<sup>9-11</sup>. Iberia agospia una diversidá biolóxica bultable qu'inxer ectoparásitos endémicos<sup>12</sup>.

#### DOS POBLACIONES (CON DOS ESPECIES Y DOS SUBESPECIES) NA PENÍNSULA IBÉRICA

Avezábase a considerar dos especies de sanixueles melecinales n'Iberia: *H. medicinalis*, principalmente na parte norte [6,13-17], y *H. troctina*, principalmente na sur [18-22]. Sicasí, sobre la base del conocimientu actual alreduer de la taxonomía y bioxeografía de les sanixueles melecinales europees, los rexistros ibéricos de la primera d'elles han considerase mui duldosos<sup>6</sup>. Amás, les condiciones climátiques del noroeste y norte d'Iberia podríen favorecer la ocurrencia d'*H. verbana* nesta fastera, como barruntaben Utevsky *et al.*<sup>6</sup>.

A lo llargo del cursu de les nuses investigaciones, descubrimos dos poblaciones d'*Hirudo* del noroeste y centro-norte d'España, carauterizaes per mediu d'un patrón de pigmentación estremáu del típicu européu d'*Hirudo* spp. (ello ye, *H. medicinalis*, *H. verbana* y *H. troctina*), con un patrón ventral mui asemeyáu al d'*H. verbana* y un patrón dorsal distintivu, que consta de dos llinies apareyaes que cuerren paraleles nos

***Nes nuses investigaciones, descubrimos dos poblaciones d'Hirudo del Noroeste y Centro-Norte de la Península, carauterizaes per un patrón de pigmentación estremáu del típicu européu d'Hirudo spp.), un patrón ventral mui asemeyáu al d'Hirudo verbana y otru dorsal distintivu, con dos llinies apareyaes que cuerren paraleles nos márxenes llaterales del dorsu per tolo llargo de la sanixuela***

márxenes llaterales del dorsu per tolo llargo de la sanixuela (denomada nel presente artículu «billiniada»). Amás, tamién atopamos delles poblaciones col patrón de color típicu asignáu a *H. verbana* en Galicia (noroeste d'España).

L'oxetivu principal del trabayu foi evaluar la diversidá y distribución real de les sanixueles melecinales ibéricas, col envís de cubrir el vacíu de conocimientu sobre la bioxeografía d'*Hirudo* spp. del sur d'Europa. Esti estudiu tamién tien como oxetivu revelar les rrellaciones filoxenétiques ente les sanixueles melecinales ibéricas y otre europees per aciu del emplegu de dos xenos mitocondriales y dellos carauteres morfoanatómicos.

La nuesa busca de poblaciones d'*Hirudo* nel campu fíxose dende mayu de 2015 hasta ochobre de 2017. Hebo collecha prestosa d'*Hirudo* spp. dende agostu de 2015 hasta xunetu de 2016 en dellos llugares del norte de la Península Ibérica (Figura 1).

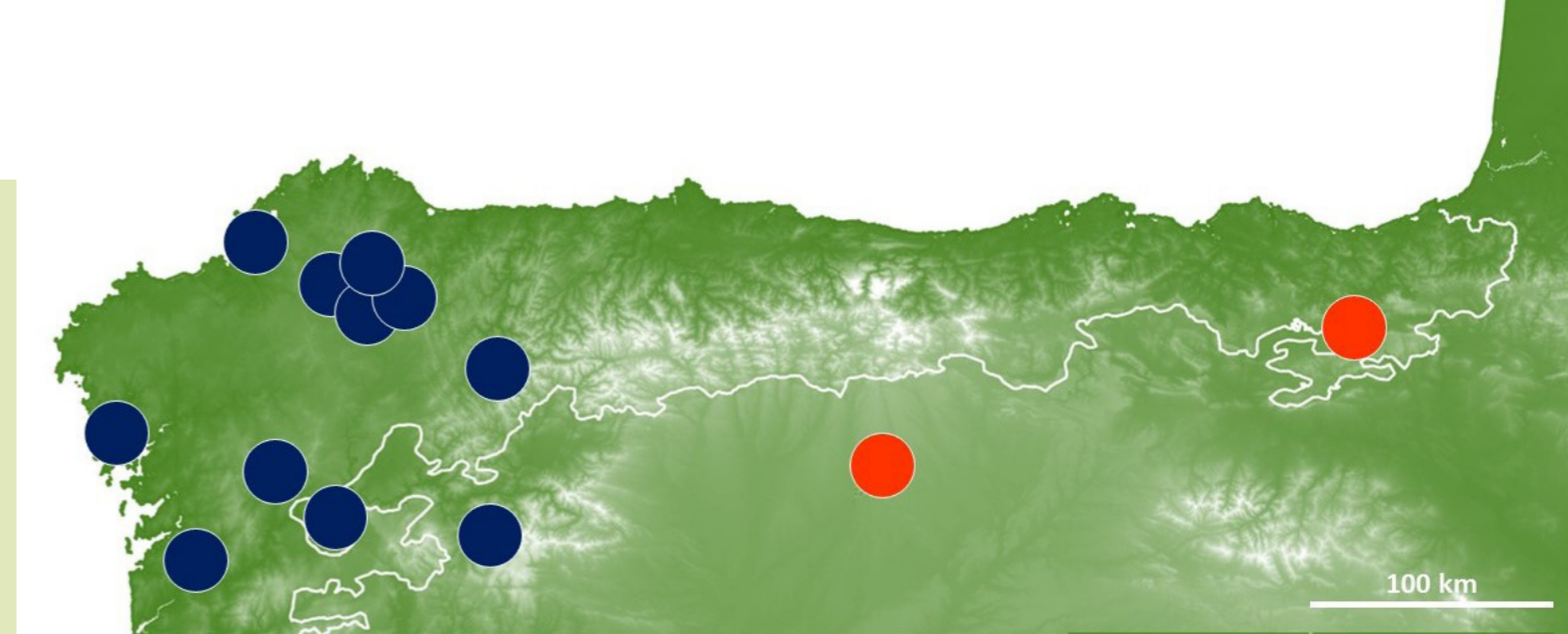
Les sanixueles amañáronse pa la so conservación *in situ*: primero relaxáronse nuna serie ascendente d'etanol graduado y llueu fixéronse en formalina al 10% pa estudios morfolóxicos y n'etanol al 100% pa estudios xenéticos. Los especímenes recolectaos llváronse al llaboratoriu pal posterior análisis taxonómicu y xenéticu. Pa definir la identidá específica o subespecífica de los taxones estudiaos, utilizamos un enfoque integrador qu'inclúi topoloxíes d'árboles, p-distancia ensin correxir por pares, descubrimientu automáticu de fiendes de códigos de barras (ABGD) y datos morfolóxicos y anatómicos. Los exemplares examinaos nesti estudiu tán depositados nel Muséu Nacional de Ciencies Naturales (MNCN) de Madrid y nel d'Historia Natural «Grigore Antipa» (MGAB) de Bucarest, Rumanía.

## RECONSTRUCCIÓN FILOXENÉTICA DE LAS SANIXUELES MELECINABLES IBÉRIQUES Y EUROPEES

Les allinaciones finales de les 55 secuencias concatenaes de los dos marcadores mitocondriales analizaos, ARNr COI (606 pb) y 12S (286 pb), revelaron 27 haplotipos únicos de les *Hirudo* spp. trataes. Identificáronse dos nuevos haplotipos de COI y ARNr 12S («H 1» y «H 2») nes amueses d'España analizaes. Atopóse «H 1» en tolos exemplares del morfotipu «billiniáu» del País Vascu y Lleón, y «H 2» en tolos exemplares de la forma «típica» de Galicia (Tabla 1). Identificamos nueve sitios informativos de parsimonia nos dos haplotipos, de los que seis d'estos atopáronse na porción COI de les secuencias combinaes (toles posiciones mutaes producíen diferencies na secuencia d'aminoácidos), mentes que namás s'atoparon trés posiciones mutaes na porción 12S de les secuencias combinaes. L'Análisis Bayesianu de los dos xenos mitocondriales concatenaos sofita la monofilia del grupu formáu polos dos morfotipos ibéricos d'*Hirudo*, hermanos d'*H. verbana*. Los nuegos análisis confirmaron los dos clados primeramente reportaos y bien sofitaos d'*H. verbana* (esto ye, los filogrupos orientales y occidentales sensu Trontelj y Utevsky <sup>4</sup>) y evidenciaron la existencia d'un nuevu filogrupu, qu'equí se designa como'l «Filogrupu ibéricu». El nuevu filogrupu ibéricu d'*H. verbana* ta compuestu por tolos exemplares recoyíos n'España (Figura 1). El resolvimientu internu d'esti filogrupu, que comprende los morfotipos «billiniaos» y «típicos», foi sólidamente sofítáu nel nuesu análisis (BS = 99-100%).

L'análisis 'Medien-Joining network' qu'amuesa les rrellaciones ente los haplotipos d'*H. verbana*. Puede reparase en que les diferencies de nucleótidos lléndase a una o dos posiciones mutacionales ente distintos haplotipos en cada llinia. Pal llinaxe oriental d'*H. verbana* llogremos un haplotipu dominante H 12, que s'atopa n'individuos del suroeste, sur y nordeste d'Ucráina, los territorios de Krasnodar y Stavropol de la Federación de Rusia, ún de los más importantes centros de recoyida comercial de sanixueles melecinales, onde la lliberación d'animales dempués del so usu puede camudar la estructura xenética intraespecífica. La forma d'estrella de la rede con un haplotipu más raru que s'irradia del haplotipu común llográu pal llinaxe oriental suxer una rápida espansión del rangu d'una población fundadora relativamente pequeña. El llinaxe occidental ta representáu por dos haplotipos, que s'estremen per aciu d'una única posición mutada. El nuevu filogrupu ibéricu comprende dos haplotipos con nueve mutaciones ente ellos.

Les distancies xenétiques ente morfotipos ibéricos «billiniaos» y «típicos» d'*H. verbana* y los dos filogrupos oriental y occidental de la mesma especie son ente 0.039 y 0.043. La distancia xenética ente los dos morfotipos españoles (1%) nun ye significativamente diferente de la distancia xenética entre los filogrupos oriental y occidental d'*H. verbana* (1,80%), considerando l'error estándar. Les distancias xenétiques por pares calculaes ente toles demás especies



ARRIBA

Figura 1. Lugares onde s'atoparen exemplares de sanixuela na prospección 2015-17. Azul, *Hirudo verbana verbana*; Colorao, *H. verbana bilineata*.

analizaes variaron del 7,30% (*H. orientalis* / *H. medicinalis*) al 10,30% (*H. sulukii* / *H. troctina*) y al 20,80% (*H. nipponia* / *H. orientalis*), y fueron significativamente mayores que les distancias ente los grupos d'*H. verbana*.

L'análisis Automatic Barcoding Gap Discovery (ABGD) identificó correutamente toles especies utilizaes cuando la diverxencia intraespecífica previa variaba ente 2,20% y 3,60%. Cuando esti valor previu yera tan baxu como 1,30%, l'análisis identificó al cladu ibéricu como un grupu estremáu de toles demás amueses d'*H. verbana*. Finalmente, con un 0,70% de diverxencia intraespecífica, l'análisis identificó los llinaxes occidental y oriental d'*H. verbana*, al igual que los morfogrupos «billiniaos» y «típicos» d'España. El mesmu resultáu (grupos que se xebren nos mesmos niveles de diverxencia xenética intraespecífica) llogróse cuando s'utilizaron

distancias Jukes-Cantor o Kimura 2-P y pa valores d'anchu de fienda relativu ente 0,5 y 1,5.

Los análisis ABGD revelaron la existencia de diversidá críptica dientro de les amueses estudiaes d'*H. verbana*. Estos análisis recuperaron los mesmos cuatro grupos que nos análisis filoxenéticos. Asína, amuébase qu'*H. verbana* ta formáu por un complexu de cuatro filogrupos (Grupu Oriental, Grupu Occidental, Ibéricu «típicu» ya Ibéricu «billiniáu»). Morfolóxicamente, según el conocimientu que tenemos hasta güei, los tres primeros son prácticamente indistinguibles (ello ye, «crípticos») y considérense pertenecientes a la morfo subespecie nominal (*H. verbana verbana*), mientras que'l postreru se describió como una nueva subespecie (*Hirudo verbana bilineata* Arias et al., 2020).





ARRIBA

Figura 2. *Hirudo verbana bilineata* nuna mano pa comparar el tamaño.

***Hirudo verbana bilineata* Arias et al., 2020**  
(subespecie nueva)

Animales de grandor medianu, llargor máximu d'unos 80 mm, incluyíos los chupones; pigmentación del dorsu pardizu a averdosáu con dos pares de rayes o llinies llonxitudinales anaranxaes / coloraes distintas, con o ensin manches es-cures pequeñes cuadrangulares o redondeaes nes rayes; márxenes llaterales con una franxa llonxitudinal beixe / mariellu claro; parte ventral unicolor verdosa a marellosa, ensin marques de color y llendada por un par de franxes ventrollaterales prietes; mandíbules trignates, monoestocodotes y con papiles; ensin crestes faríngees que terminen ente les mandíbules; epidídimos de grandor medianu; vaxina centralmente hinchada y curvada (Figura 2).

**Carauteres esternos**

Llargor hasta 80 mm dempués de la fixación, anchor máximu del cuerpu 10,5 mm, anchor de la ventosa anterior 5 mm (2,5–5), anchor de la ventosa posterior 7,5 mm (4–8); gonoporos xebraos por cinco aniellos, poru masculín nel riegu XI b5 / b6, poru femenín nel riegu XII b5 / b6; segmentu completu de cinco aniellos (b1, b2, a2, b5, b6); superficie corporal cubierta de numbe-roses papiles; cinco pares de güeyos, en II, III, IV a1, V a1 y VI a2, en disposición de ferradura; un riegu estrechu y distintu que va de la cripta de la mandíbula dorsal media hasta'l borde dorsal de la ventosa anterior; dorsu pardizu o averdosáu con dos pares d'estreches franxes llonxitudinales anaranxaes o acolorzaes (dacuando entrambos colores tán presentes nel mesmu individuu: llinia esterna naranxa y una interna acolorazada) con bordes prietos, con o ensin pequeñes manches cuadrangulares, arredondies o irregulares escu-

res en rayes; si tán presentes, franxes marginales marielles, bordiaes con una llinia prieta; parte ventral unicolor verdosa, con dos franxes ventrollaterales prietes irregulares.

**Observaciones taxonómiques**

*Hirudo verbana bilineata* ye mui asemeyada a otes *H. verbana* en dellos carauteres esternos ya internos; sicasí, puede estremase fácilmente d'elles per mediu de dalgunos carauterístiques clares. La pigmentación ye'l caráuter más útil pa identificar estes sanixueles, *H. verbana bilineata* diferénciase de les formes restantes d'*H. verbana* por tener dos llinies fines, empareyaes y de color naranxa intenso a acolorazao que cuerren paraleles a entrambos llaos del dorsu a lo llargo d'él (Figures 3 y 4), mentanto que les otes formes d'*H. verbana* tienen franxes paramedianes anchas y difuses que son de color naranxa pálido (esti patrón denomarase equí «típico»).



ARRIBA

Figura 3. *Hirudo verbana bilineata* nel so hábitat.



Figura 4. *Hirudo verbana bilineata*, vistas dorsal y ventral.



***H. verbana bilineata* estrémase de les formes restantes d'*H. verbana* por tener dos llinies fines, empareyaes y de color naranxa intenso a acolorazao que cuerren paraleles a entrambos llaos del dorsu y a lo llargo d'él, mentanto que les otre formes d'*H. verbana* tienen franxes paramedianes anchas y difuses que son de color naranxa pálido**

Camentemos tamién una esplicación alternativa y supuesta: ello ye que la nueva subespecie podría ser un híbridu d'*H. verbana* y *H. troctina*. La primer observación que descarta esti «escenariu d'hibridación» ye'l fechu de que les dos especies tienen preferencies estremaes d'hábitat y, poro, nun pueden interactuar en condiciones naturales (ye dicir, hai una torga ecolóxica ente entrambes especies). Tamién abordamos esti escenariu dende un puntu de vista xenéticu. Si se produjo la hibridación, *H. verbana* tuvo d'actuar como fema (yá que tolos nuegos supuestos especímenes híbridos comparten el mesmu ADN mitocondrial con *H. verbana*) y *H. troctina* como machu. Por tanto, los supuestos híbridos sedrén la descendencia d'un *H. verbana* fema y un *H. troctina* machu. L'análisis d'un xen nuclear, que presenta diferencies ente *H. verbana* y *H. troctina*, habría dexanos recuperar (nos supuestos híbridos) la variante del xen paternu (*H. troctina*). D'esti mou, secuencióse'l marcador nuclear del espaciador trescritu internu (ITS2) en cuatro especímenes d'*H. verbana bilineata* y comparámoslos con 27 secuencies ITS2 d'*H. verbana* y una d'*H. troctina* recuperaes de Genbank<sup>4</sup>. Esto reveló que tolos especímenes d'*H. verbana bilineata* pertenecen a un solu haplotipu, que tamién ye l'haplotipu más frecuente atopáu ente *H. verbana*. L'únicu haplotipu d'*H. troctina* ITS2 atopáu distínguese bien de los haplotipos d'*H. verbana*. Asina, tanto dende'l pun-



ARRIBA

Figura 5. Un hábitat típicu: charca de Bikuña (Álava).

tu de vista ecolóxicu como xenéticu, l'escenariu d'hibridación ye mui improbable y, poro, puede descartase de forma oxetiva.

**Hábitat y distribución**

*Hirudo verbana bilineata* namás se conoz del agua estancau de llombes y fontanes de lla-

siberiana Atlántica) y el Valle Mediterraneu d'El Ríu Ebro (rexón bioxeográfica Mediterránea). L'esame de les coleiciones del Departamentu B.O.S. (Universidá d'Uviéu) demostró qu'esta subespecie tamién tuvo presente en dellos fontanes del valle de Kuartango (500-1.000 m d'altitú, País Vascu) hasta los años 90, cuando les sanixueles s'estinguieron de la zona<sup>31</sup>. Nun s'atoparon esemplares d'*H. verbana* nes coleiciones del MNCN: tolos esemplares d'*Hirudo* pertenecen a *H. troctina*. Esta última especie tamién taba presente na Coleición BOS de dalgunos regueros de monte d'Asturies. Ye importante señalar que tolos especímenes esaminaos d'*H. troctina* foron recoyíos en mases d'agua en movimientu, como ríos y regueros, mentanto que tolos especímenes d'*H. verbana* atopaos proveníen d'hábitats que son principalmente agua estancau, como llagos y fontanes.

Esta nueva subespecie atopóse n'agua claro, tranquilo, lénticu o de fluxu baxu, de 0,1 a 1,5 m de fondura, como parte de la comunidá *Chara-Potamogeton*. *Potamogeton* sp. ye una planta perenne rizomatosu abondo ramificada con fueyes filiformes somorguiaes, que constitúi un hábitat tridimensional proteutor pa un gran númberu d'animales venceyaos. La Xaronca Verde (*Pelophylax perezii*) y el Guardafontes Alpín (*Ichthyosaura alpestris*) yeren mui comunes nel hábitat d'*H. verbana bilineata* y viose qu'entrambos anfibios actuaben como agospia-dores d'esta nueva subespecie na naturaleza.

Como exemplu de los parámetros fisicoquímicos, l'estanque Bikuña enantes mentáu (Figura 5) presenta una estacionalidá marcada. Nos meses de branu hai escasez d'agua pero nun seca dafechu. La so fondura máxima nun pasa de 1 m. La temperatura del agua varia dende los 4 ° C nos meses d'iviernu (nunca llegando al

naes nos montes del País Vascu y Lleón (norte d'España). Les poblaciones actuales d'esta nueva subespecie (Bikuña y Cieza) asítiense nun ecotonu o «zona de transición» ente la Cornisa Atlántica Cantábrica (rexón bioxeográfica Euro-



puntu de xelase) hasta más de 20 °C, llegando temperaturas superiores a los 25 ° C nos días más calorosos del branu. El pH a lo llargo de tol ciclu añal ye siempre superior a 7, normalmente variando nun rangu ente 7,5 y 8,5 (Rede de siguimientu del estáu ecolóxicu de les llamargales interiores, Axencia Vasca del Agua; consultáu'l 29/06/2020).



1 cm

ARRIBA  
Figura 6. *Hirudo verbana verbana*.

#### ***Hirudo verbana verbana* Carena, 1820**

Especie de grandor medianu, llargor máximu d'unos 70 mm, incluyíos les ventoses; anchor máximu del cuerpu 9 mm; pigmentación del dorsu averdosáu con un retículu llonxitudinal anaranxáu; márxenes llaterales con una franxa llonxitudinal de beixe a mariella; barriga unicolor averdosao a marelloso, ensin (o mui poques) manches escures y un par de franxes marxinales prietes (Figura 6); ensin crestes farínxees que terminen ente les mandíbules; grandor de tamañu mediu; vaxina centralmente hinchada y curvada.

#### **Hábitat y distribución**

*Hirudo verbana* cf. *verbana* namás se citó de los llagos, llagunes y pocos de Galicia y el País Vascu de 4 a 1.517 m d'altitú (NO a N España). Sicasí, nel nuesu mostréu, esta subespecie namás s'atopó en Galicia. Ye bien probable que les poblaciones del País Vascu rexistreaes a partir de les coleiciones históriques tean güei desaniciaes<sup>31</sup>.

#### ***Hirudo troctina* Johnson, 1816**

Especie de grandor pequeñu a medianu, llargor mediu d'unos 50 mm, incluyíos les ventoses chupones; pigmentación del dorsu d'averdosáu a agrisao con cuatro o seis puntos prietos metaméricos dorsales; márxenes llaterales con una franxa naranxa llonxitudinal; barriga unicolor d'averdosao a marelloso, con manches escures y un par de franxes marxinales prietes dispuestes en ziszás (Figura 7); con seis crestes musculares farínxees que se fusionen en pares pa formar tres, caúna d'elles termina na base d'una mandíbula; epidídimos pergrandes; vaxina ancha, allargada ya hinchada centralmente y que s'estrecha n'entrambos estremos.

#### **Hábitat y distribución**

Ríos y regueros de caudal mediu-altu del sur, centru y norte d'España. El nuesu últimu rexistru históricu confirmáu de la especie remóntase a 1992 nel norte d'España. Nun s'atoparon especímenes nel nuesu mostréu de 2015 a 2017.

#### **DISCUSIÓN**

Los sanixueles melecinales popularizáronse históricamente pola so utilidá na estraiación de sangre (flebotomía) nos siglos XVIII y XIX. Nuevamente esperimentaren una relevancia agora de recién nos tratamientos posoperatorios pa ciruxíes de colgaxu y reimplantación, y en términos de carauterización y aisllamientu d'anticoagulantes salivales<sup>1,6,24</sup>. Los sanixueles melecinales criáronse con fines comerciales nos siglos XVIII y XIX, n'estanques de dellos países europeos, incluyíos España y los sos vecinos Portugal y Francia. Millones d'estos sanixueles utilizáronse n'hospitales, peluquerías y botiques de la dómina<sup>25,26</sup>. Había un gran comerciu de sanixueles melecinales y la producción local complementábase comúnmente con importaciones del estranxeru<sup>26,27</sup>. Namás n'España, el tráficu d'importación / esportación por comerciu marítimu a metá del sieglu XIX, suponía ente 10.000 y 1 millón d'exemplares al añu<sup>26</sup>. Esto desencadenó una sobreesplotación masiva de les poblaciones naturales de sanixueles melecinales, lo que provocó que, en dalgunes fasteres como'l norte d'España, escasearen dende medios del sieglu XIX<sup>13,15</sup>.

A pesar de la so gran importancia pasada y presente en medicina y farmacoloxía, la nueva conocencia de la diversidá, distribución y zoogeografía de los sanixueles melecinales ye todavía incompleta. Un exemplu claru d'ello representenlu los sanixueles melecinales ibéricos,

Magar la so gran importancia pasada y presente en medicina y farmacoloxía, la nueva conocencia de la diversidá, distribución y zoogeografía de los sanixueles melecinales ye todavía incompleta. Un exemplu claru d'ello son los sanixueles melecinales ibéricos, que s'estudiaron de forma insuficiente y non sistemática.



1 cm

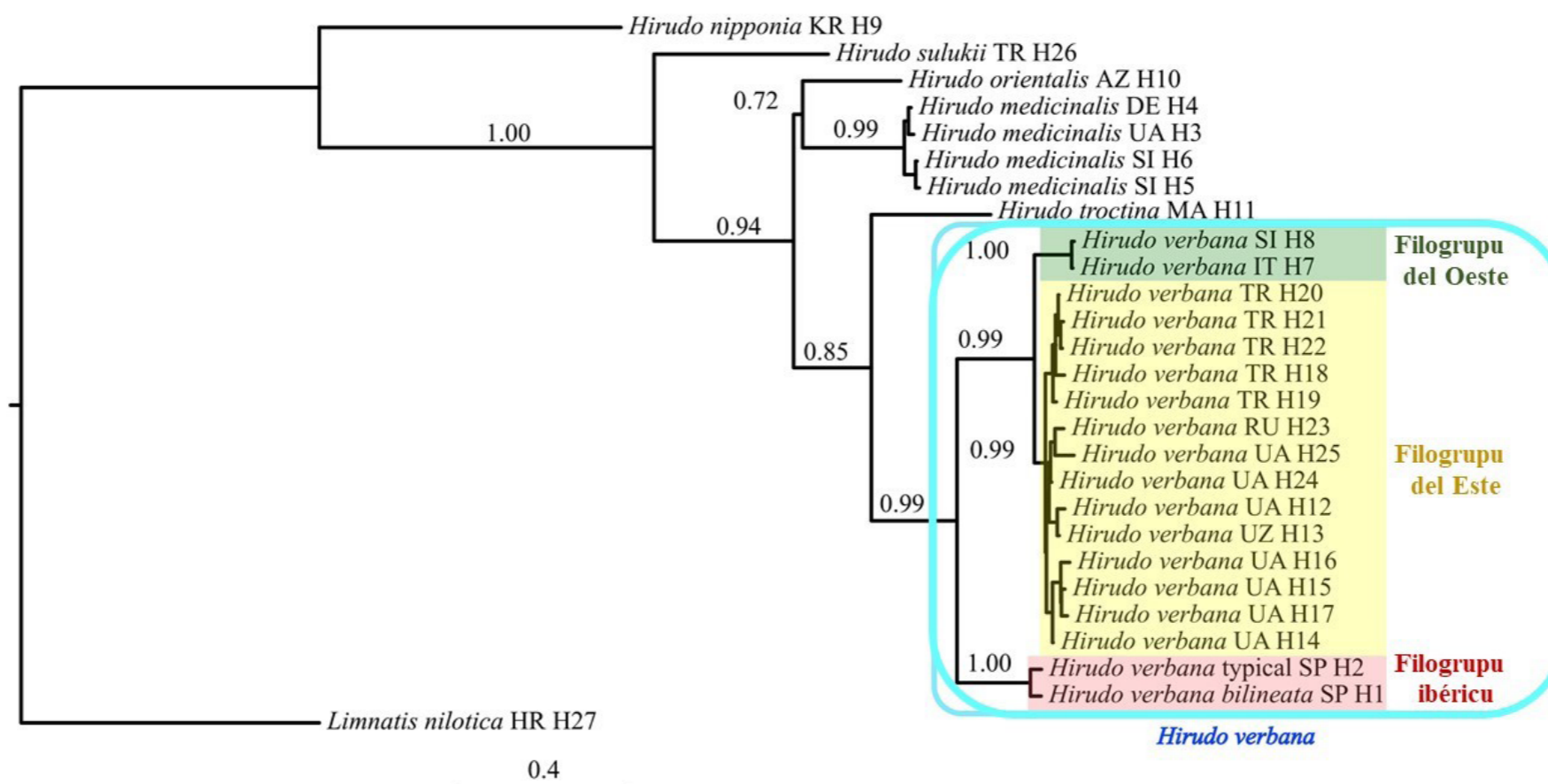
ARRIBA  
Figura 7. *Hirudo troctina*.

que s'estudiaron de forma insuficiente y non sistemática. Equí reportamos per primer vegada la presencia d'*Hirudo verbana* na Península Ibérica, daqué que representa la so distribución más occidental hasta la fecha.

Les poblaciones ibéricas correspunden a dos morfotipos estremaos, que tamién tán sofitaos por datos moleculares. Ta ampliamente aceutao que la pigmentación esterna nun ye namás una de les carauterístiques más útiles pa estremar les especies de sanixueles, sinón tamién posiblemente'l meyor caráuter pa diagnosticar especies dentro del xéneru *Hirudo*<sup>1,3,6,24</sup>. Aparte del menor grandor de los exemplares ibéricos d'*H. verbana* con color «típico» (máx. 70 mm de llargor x 9 mm d'anchor) en rrellación colos demás clados europeos (máx. 100–140 mm x 10–12 mm d'anchor)<sup>1,3,6,24</sup>, nun atopamos otru diferencies morfolóxicas suficientemente clares y, polo tanto, nun les describimos formalmente como una subespecie nel presente estudiu. Sicasí, afayamos diferenciación xenética nos marcadores mitocondriales analizaos y, por tanto, referímonos a ella como *H. verbana* cf. *verbana*. Estes afayadures suxeren que la diversidá xenética dentro d'*H. verbana* ye considerablemente más alta de lo que s'aceutaba antes. Asina, caún de los cuatro clados alcontraos dentro d'*H. verbana* puede representar un estáu subespecíficu. Esta hipótesis ha investigase más a fondu basándose nel esame de material adicional y marcadores xenéticos.

El rangu taxonómicu de les subespecies sigue siendo mui polémicu, en gran parte porque les llendes de les subespecies tradicionales se refugaren dacuando polos datos moleculares<sup>28</sup>. Sicasí, los nuestos resultaos demuestran un altu nivel de congruencia ente «morfo-subespecies» y datos filoxenéticos moleculares (Figura 8).

El rangu de distribución de los morfotipos del xéneru *Hirudo* ibéricos divídese en dos grupos xeográficos bien dellimitaos con dalgunas diferencies morfolóxicas. *Hirudo verbana bilineata* habita los pequeños estanques o charques de monte (de más de 800 m d'altura) del Cordal Cantábricu que s'allarguen más de 300 km nel norte d'España. Polo demás, *H. verbana* «típico» atopóse en grandes llagos a menor altitú del Macizu Gallegu en Galicia. Utilizando un enfoque integrador (una combinación de morfoloxía y datos moleculares), alcontramos que los dos



ABAXO

Figura 8. Cladograma del grupu d'*Hirudo verbana*.

grupos xeográficos han considerase como dos taxones xebrados. En consecuencia, describimos formalmente la nueva subespecie *H. verbana bilineata*. Los análisis morfolóxicos encanten la diferenciación d'esta nueva subespecie del otru morfotipu ibéricu y del restu de filogrupos ibéricos d'*H. verbana*. Hai fuertes carauteres de diagnósticu pa estremalos acordies col patrón de color y el tamañu. Amás de la morfoloxía y la xenética, les preferencies d'hábitat llixeramente diverxentes y la distribución dixunta de les dos subespecies tamién sofiten la recon-

ocencia de los nuevos taxones. Les poblaciones ibéricas d'*H. verbana* (ye dicir, el filogrupu ibéricu) constitúin un componente importante nel patrimoni evolutivu de les sanixueles melecinales europees y, polo tanto, les poblaciones d'*H. verbana bilineata* y *H. verbana* «típica», considérense equi **Unidaes Evolutivamente significatives** (ESU). En resultancia, han tratase de forma distinta y prioritaria a los efeutos de la conservación. Esti ye un puntu fundamental, porque les poblaciones de sanixueles melecinales ibéricos foron menguando nes últimes décadas como resultancia direuta ya indireuta de l'actividá humana<sup>13,15,17,31</sup>.

Dalgunos rexistros de la lliteratura ibérica clásica d'*H. medicinalis* y *H. officinalis* septentrionales pueden referise a esta nueva subespecie<sup>18,29</sup>.





Sicasí, la mayoría d'ellos nun brinden información sobre los sos patrones de color nin fotografías o dibuxos de los exemplares, polo que nun pueden ser confirmaos formalmente. Como esceición, Laborda<sup>30</sup> nel so manual de Fauna de Lleón presenta una semeya d'un espécime vivu de presuntu *H. medicinalis* qu'amuesa'l patrón billiniáu típicu d'*H. verbana bilineata*<sup>30</sup>. D'igual miente, los exemplares ilustraos reportaos como *H. medicinalis* por Ocharan<sup>31</sup> de Kuartango (Álava, País Vasco) y por García-Mas y Muñoz<sup>15</sup>, son efeutivamente *H. verbana* del patrón típicu de coloración<sup>15,31</sup>. Asina, ye probable que les sanixueles melecinales portugueses tamién pertenezan a *H. verbana*, darréu que tradicionalmente se comercializaben como «sanixueles verdes» o «marca de Lisboa» (nomes comunes atribuyíos a *H. verbana*)<sup>28</sup>. Pol contrariu, les sanixueles del norte d'Europa (*H. medicinalis*) foron históricamente conocíes como «sanixueles prietes» o «marca d'Hamburgu»<sup>32</sup>. Ayres y Comesaña-Iglesias<sup>16</sup> informaron de qu'*H. medicinalis* ye un parásitu de la Xaronca Parda Ibé-

rica, *Rana iberica*. Magar que ye malo de determinar a partir de la semeya non diagnóstica apurrída, l'asitiamentu au toparon esta sanixuela melecinal (ello ye, un pequeñu regueru en Barranqueira de Casariños, Pontevedra, Galicia) ta dientro del área de distribución de la forma «típica» d'*H. verbana* equí reportáu. Polo tanto, estes sanixueles pueden denomase *H. verbana*. Pela cueta, n'otros rexistros de depredación d'anfibios por *H. medicinalis* del norte d'España<sup>33</sup>, ye evidente (gracies a les imáxenes apurríes) que la especie foi mal identificada y nun corresponde a nengún miembru del xéneru *Hirudo*, sinón mui probablemente a la Sanixuela de Caballu *Haemopsis sanguisuga*.

Blanchard<sup>18</sup> señaló qu'*H. troctina* nun se llimitaba al sur d'España como se consideró anteriormente. Cuasi 100 años dempués, Fernández Bernaldo de Quirós<sup>34</sup> reportó la especie de dos ríos asturianos cercanos a les sos desembocadures nel mar Cantábricu (ente 0,5 y 10 m d'altitú)<sup>34</sup>. La revisión que se fixo, afitada en coleiciones históriques, confirma la presencia d'esta especie

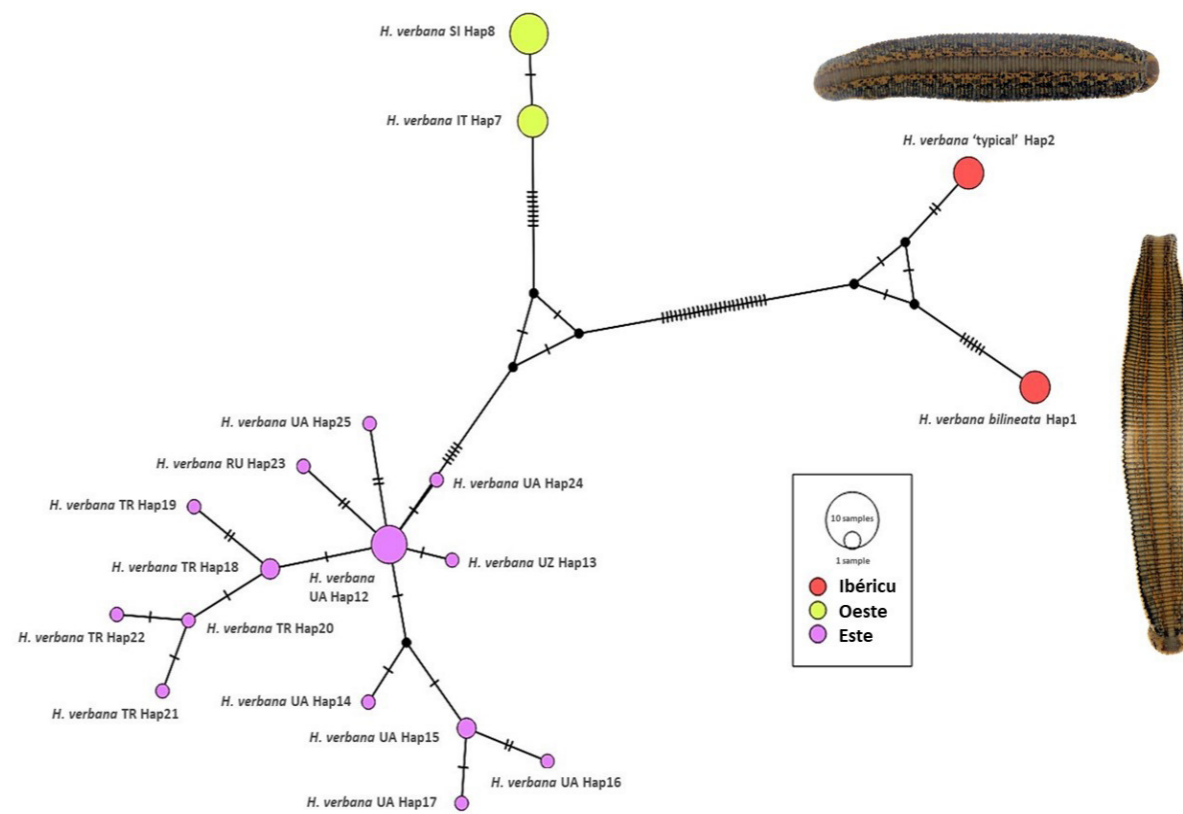
IZQUIERDA

Figures 9 y 10. Dos aspectos d' Hirudo verbana bilineata.

ABAXO

Figura 11. Esquema filoxenéticu de les poblaciones d'Hirudo verbana. Hap, haplotipos; les barrines nes rames representen el número de sustituciones de bases nitroxenaes.

nel norte d'España, concretamente n'A Coruña y Lugo y hasta 43 ° lat. N (Asturies). Amás, los nuevos resultaos demostraron qu'*H. troctina* difier nos sos hábitats d'*H. verbana*, queriendo meyor agua en movimientu a los ecosistemas lénticos. Esta afirmación tamién ta sofitada por datos bibliográficos, yá que, hasta onde sabemos, tolos rexistros ibéricos provienen de ríos o regueros<sup>18-20,34,35</sup>.



Amás, nun hai informes de coexistencia d'estes dos especies nes mesmes agües, polo que ye poco probable qu'entrambes especies puedan competir ente sí. Teniendo en cuenta la nueva información apurrída sobre la distribución y diversidá morfolóxica d'*H. verbana* n'Iberia, enantes *Hirudo* spp., los rexistros han tomase con procuru hasta que nueves pruebes puedan confirmar qu'estes poblaciones entá existen.

Ye mui probable qu'antes de les glaciaciones pleistocéniques *H. verbana* s'espardiere per tol Paleárticu occidental. Los principales clados d'*H. verbana* (los filogrupos occidental y oriental y el supercladu ibéricu), que nun se superponen na so distribución xeográfica, sofiten la hipótesis d'un procesu de colonización posglacial distintu de les penínsules mediterráneas<sup>4</sup>. El filogrupu oriental recolonizó grandes territorios de la es-

tepa oriental y los paisaxes áridos, mentanto que los filogrupos occidentales ya ibéricos tán restrinxíos a les penínsules de Los Apeninos ya Ibérica y áreas axacentes. Amás, la estructuración xeográfica de los dos llinaxes ibéricos de sanixueles melecinales (*H. verbana bilineata* nos tramos altos de la cuenca del Duero, Ebro y norte y *H. verbana* «típica» na cuenca del Miño-Sil) indica supervivencia en pelo menos dos abellugos glaciares del Pleistocenu diferentes.



**H. verbana bilineata, namás s'atopó en dos llugares y en número escasu. Poro, esta nueva subespecie, al igual que la forma típica d'H. verbana, pueden considerarse como taxones raros localmente, siendo también coherente con la definición d'Unidad Evolutivamente Significativa. Las poblaciones ibéricas d'H. verbana combinan rangos xeográficos restringidos con un hábitat estrecho y un tamaño de población pequeño, lo que les fai vulnerables al desaniciu**

Polo tanto, la Península Ibérica considérase más probablemente como un bierzu d'endemismos d'agua dulce que como un abellugu único, como suxirierEn previamente Gómez y Lunt <sup>11</sup>. Ciertamente, los patrones ibéricos de distribución de las subespecies *H. verbana* ssp. contribúin a una

## CONCLUSIONES

Las poblaciones d'*Hirudo* ibéricas tán menguando nes últimas décadas como resultancia direuta ya indireuta de l'actividá humana. Equí describimos *H. verbana bilineata*, que namás s'atopó en dos llugares y en número escasu. Poro, esta nueva subespecie, al igual que la forma típica d'*H. verbana*, pueden considerarse como taxones **raros localmente**, siendo también coherente con la definición d'*Unidad Evolutivamente Significativa*. La rareza de las especies esplicase xeneralmente per aciu d'una combinación de rango xeográfico estensu *versus* restringíu, tolerancia d'hábitat amplia vs. estrecha y tamaño de población grande vs. pequeño. Las poblaciones ibéricas d'*H. verbana* combinan rangos xeográficos restringidos con un hábitat estrecho y un tamaño de población pequeño, lo que les fai **vulnerables al desaniciu**. Asina, hai una necesidá urxente d'evaluar en detalle l'estáu de conservación y entamar midies de conservación pa esta subespecie endémica y los sos

mejor comprensión de la complexidá interna de la Península Ibérica como fonte de reliquies glaciales / taxones endémicos, allugando poblaciones con un altu grau d'estructura xenética que comenzaron a asentar a lo llargo del Pleistocenu.

conxéneres, col envís de revertir el so amenor-gamientu y recuperales.

A pesar de la llarga historia d'estudios sobre la taxonomía y la filoxenia de los sanixueles melecinales, la nuesa conocencia inda ye incompleta. Ensin dulda, faen falta más investigaciones qu'involucren pruebes de marcadores xenéticos nucleares y variación morfolóxica n'*H. verbana* «tipu ibéricu». L'aplicación de microscopía electrónica de barrú y ferramientes moleculares puede dar lluz sobre la historia evolutiva de las poblaciones de sanixueles melecinales d'otres penínsules mediterráneas y los países d'Europa occidental, que pueden preservar una diversidá non reconocida nes especies d'*Hirudo*. La visión más amplia ye que las subespecies / filogrupos d'*H. verbana* pueden dar un atayu amañosu pa estimar patrones de diversidá xenética intraespecífica, constituyendo asina una ferramienta afayadiza pal estudiu de la diverxencia evolutiva y la conservación de sanixueles melecinales n'Europa.

## Referencias bibliográfiques

- Trontelj, P.; Utevsky, S.Y. Celebrity with a neglected taxonomy: molecular systematics of the medicinal leech (genus *Hirudo*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 2005, 34, 616–624. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.10.012>
- Nesemann, H.; Neubert, E. Annelida, Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellea, Hirudinea. In *Süßwasserfauna von Mitteleuropa*; Schwoerbel, J., Zwick, P., Eds.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg Berlin, Germany, 1999; pp. 1–62.
- Hechtel, F.O.P.; Sawyer, R.T. Toward a taxonomic revision of the medicinal leech *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 (Hirudinea: Hirudinidae): re-description of *Hirudo troctina* Johnston, 1816 from North Africa. *J. Nat. Hist.* 2002, 36, 1269–1289. <https://doi.org/10.1080/00222930110048945>
- Trontelj, P.; Utevsky, S.Y. Phylogeny and phylogeography of medicinal leeches (genus *Hirudo*): Fast dispersal and shallow genetic structure. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2012, 63, 475–485. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.01.022>
- Siddall, M.E.; Trontelj, P.; Utevsky, S.Y.; Nkamany, M.; Macdonald, K.S. Diverse molecular data demonstrate that commercially available medicinal leeches are not *Hirudo medicinalis*. *Proc. Royal Soc. B.* 2007, 274, 1481–1487. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0248>
- Utevsky, S.Y.; Zigmajster, M.; Atemasov, A.; Zinenko, O.; Utevska, O.M.; Utevsky, A.Y.; Trontelj, P. Distribution and status of medicinal leeches (genus *Hirudo*) in the Western Palaearctic: anthropogenic, ecological, or historical effects? *Aquat. Conserv.* 2010, 20, 198–210. <https://doi.org/10.1002/aqc.1071>
- Sağlam, N.; Saunders, R.; Lang, S.A.; Shain, D.H. A new species of *Hirudo* (Annelida: Hirudinidae): historical biogeography of Eurasian medicinal leeches. *BMC Zool.* 2016, 1(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40850-016-0002-x>
- García, M.A. Atlas Climático Ibérico; Agencia Estatal de Meteorología- Instituto de Meteorología de Portugal- Closas-Orcoyen SL: Madrid, Spain, 2011; pp. 1–8.
- Taberlet, P.; Fumagalli, L.; Wust-Saucy, A.G.; Cosson, J.F. Comparative phylogeography and post-glacial colonization routes in Europe. *Mol. Ecol.* 1998, 7, 453–464. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00289.x>
- Hewitt, G.M. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol. J. Linn. Soc.* 1999, 68, 87–112. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1999.tb01160.x>
- Gómez, A.; Lunt, D.H. Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. In *Phylogeography of Southern European Refugia. Evolutionary perspectives on the origins and conservation of European biodiversity*; Weiss, S., Ferrand, N., Eds.; Springer: Dordrecht, Germany, 2007; pp. 155–188. [https://doi.org/10.1007/1-4020-4904-8\\_5](https://doi.org/10.1007/1-4020-4904-8_5)
- Benovics, M.; Desdevises, Y.; Šanda, R.; Vukić, J.; Scheifler, M.; Doadrio, I.; Sousa-Santos, C.; Šimková, A. High diversity of fish ectoparasitic monogeneans (*Dactylogyrus*) in the Iberian Peninsula: a case of adaptive radiation? *Parasitology* 2020, 147, 418–430. <https://doi.org/10.1017/S0031182020000050>
- Pastor y López P. *Apuntes sobre la fauna asturiana bajo su aspecto científico e industrial*. Imp. y Lit. de D. Benito González: Oviedo, Spain, 1859; pp. 1–44.



Johansson, L. Hirudineen aus dem nördlichen und ostlichen Spanien, gesammelt von Dr. F. Haas in den Jahren 1914-1919. *Abh. Senckenb Naturforsch Ges.* 1926, 39, 217–211.

García-Más, I., Muñoz, B. *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758. In *Los Invertebrados no insectos de la "Directiva Hábitat" en España*; Ramos, M.A., Bragado, D., Fernández, J., Eds.; Ministerio de Medio Ambiente–Consejo Superior de Investigaciones Científicas: Madrid, Spain, 2001; pp. 125–130.

Ayres, C.; Comensaña-Iglesias, J. Leech presence on Iberian Brown Frog, *Rana iberica*, (Amphibia: Anura: Ranidae) from north-western Spain. *Acta Herpetol.* 2008, 3(2), 155–159.

Muñoz, B.; Soriano, O. *Hirudo medicinalis*. In *Bases ecológicas preliminares para la conservación de las especies de interés comunitario en España: Invertebrados*; VV. AA., Eds.; Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente: Madrid, Spain, 2012; pp. 1–51.

Blanchard, R. Sanguijuelas de la Península Ibérica. *Anales Soc. Esp. Hist. Nat.* 1893, 22, 234–258.

Rivas-Mateos, M. El *Hirudo troctina* Johnson, de Extremadura. *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. Secc. Biol.* 1901, 1, 175–377.

García-Más, I.; Jiménez, J.M. Introducción al estudio de las comunidades macrobentónicas de los ríos Asturianos: Hirudineos. *Limnetica* 1984, 1, 179–186.

Utevsky, S.Y.; Zinenko, A.I.; Atemasov, A.A.; Huseynov, M.A., Utevska, O.M.; Utevsky, A.Y. New information on the distribution of the medicinal leech (genus *Hirudo*) in the Iberian Peninsula, the Caucasus and Central Asia. *Lauterbornia* 2008, 65, 119–130.

Kovalenko, M.V.; Utevsky, S.Y. Transitional morphology in hybrids of *Hirudo verbana* and *H. orientalis* (Clitellata, Hirudinida). *Vestn. Zool.* 2013, 47(6), 32–36. <https://doi.org/10.2478/vzoo-2013-0057>

Tessler, M., de Carle, D., Voiklis, M.L.; Gresham, O.A.; Neumann, J.S.; Cios, S.; Siddall, M.E. Worms that suck: Phylogenetic analysis of Hirudinea solidifies the position of Acanthobdellida and necessitates the dissolution of Rhynchobdellida. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2018, 127, 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.05.001>

Phillips, A.J.; Siddall, M.E. Poly-paraphyly of Hirudinidae: many lineages of medicinal leeches. *BMC Evol. Biol.* 2009, 9, 246–257. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-246>

Pennak, R.W. *Freshwater invertebrates of United States*. The Ronald Press Company: New York, U.S.A., 1953; pp. 1–769. <https://doi.org/10.2307/1440380>

Madoz, P. *Diccionario geográfico-estadístico-histórico de España y sus posesiones de ultramar: volúmenes I-XVI*. Establecimiento tipográfico de P. Madoz y L. Sagasti: Madrid, Spain, 1850; pp. 1–625.

Elliott, J.M.; Mann, K.H. *A key to British Freshwater Leeches, with Notes on their Life Cycles and Ecology*. Freshwater Biological Association: Ambleside/Cumbria, United Kingdom, 1979; pp. 1–72.

Zurita, A.; García-Sánchez, A.M.; Cutillas, C. *Ctenophthalmus baeticus boisseauorum* (Beaucournu, 1968) and *Ctenophthalmus apertus allani* (Smit, 1955) (Siphonaptera: Ctenophthalmidae) as synonymous taxa: morphometric, phylogenetic, and molecular characterization. *Bull. Entomol. Res.* 2020, 110(6), 663–676. <https://doi.org/10.1017/S0007485320000127>

Muñoz-Goyanes, G. *Parque Nacional de la Montaña de Covadonga*. SNPPC: Madrid, Spain, 1976; pp. 1–226.

Laborda, A.J. *Fauna: Naturaleza Leonesa III*. Edilesa: León, Spain, 1994; pp. 1–180.

Ocharan, F.J. Anélidos y otros grupos afines. In *Zoología: Invertebrados*; Anadón, E., Ed.; Júcar: Oviedo, Spain, 1981; pp. 107–109.

Sawyer, R.T. The Portuguese Leech Trade in the 19th Century: The First TransAtlantic Commerce in Medicinal Leeches. O Negócio Português de Sanguessugas no Século XIX: O Primeiro Comércio Transatlântico de Sanguessugas Medicinais. *Anuario do Centro de Estudos de Historia do Atlantico* 2015, 7, 283–322.

Álvarez, D. Depredación de *Mesotriton alpestris* por *Hirudo medicinalis* en los Picos de Europa. *Bol. Asoc. Herpetol. Esp.* 2010, 21, 25–26.

Fernández-Bernaldo-de-Quirós, C. Contribución al estudio de las sanguijuelas (Hirudinea) de las aguas dulces de Asturias (N. de España). *Bol. Cien. Nat. I. D. E. A.* 1982, 30, 107–125.

García-Más, F.; Martínez, F.; Pujante, A. Sanguijuelas y moluscos de las aguas de La Mancha (España). *Cuadernos de Estudios Manchegos* 1990, 21, 123–148.

Sawyer R.T. *Leech biology and behaviour*. Oxford University Press: Oxford, United Kingdom, 1986; pp. 1– 1065.

Folmer, O.; Black, M.; Hoen, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1994, 3(5), 294–299.

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-Del Barrio, J.C.; Guirao-Rico, S.; Librado, P.; Ramos-Onsins, S.E.; Sánchez-Gracia, A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2017, 34, 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>

Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K.. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Med.* 2016, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

Leigh, J.W.; Bryant, D. Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.* 2015, 6, 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>

Ronquist, F.; Teslenko, M.; van der Mark, P.; Ayres, D.L.; Darling, A.; Höhna, S.; Larget, B.; Liu, L.; Suchard, M.A.; Huelsenbeck, J.P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 2012, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

Lanfear, R.; Brett, C.; Simon, Y.W.H.; Stéphane, G. PartitionFinder: Combined Selection of Partitioning Schemes and Substitution Models for Phylogenetic Analyses. *Mol. Biol. Evol.* 2012, 29(6), 1695–1701. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss020>

Drummond, A.J.; Rambaut, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 2007, 7, 214. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-214>

Rambaut, A. FigTree v1.4.2; 2014. Retrieved from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Puillandre, N.; Lambert, A.; Brouillet, S.; Achaz, G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol. Ecol.* 2012, 21, 1864–1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>