



Estudio comparativo de la anatomía y caracterización del ADN de los arionidos descritos por Torres Mínguez (1925) en Cantabria (España): *Arion cendreroi* y *A. fulvipes*, y la de *A. rufus* y *A. vulgaris* (Gastropoda: Pulmonata: Arionidae)

José Castillejo^{1*}, Jorge Rodríguez-Castro² & Javier Iglesias-Piñero¹

¹Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, La Coruña, Spain. ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, La Coruña, Spain.

Rebut el 23 d'octubre de 2017
Acceptat el 20 d'octubre de 2019

Paraules clau:

Mollusca
Biodiversitat
Taxonomia
Pairwise Distances
p-Distance
Distància Kimura 2 paràmetres
K 2-p
Anàlisi molecular.

Key words:

Mollusca
Biodiversity
Taxonomy
Pairwise Distances
p-Distance
Distance Kimura 2 parameters
K 2-p
Molecular analysis.

Palabras clave:

Mollusca
Biodiversidad
Taxonomía
Pairwise Distances
p-Distance
Distancia Kimura 2 parámetros
K 2-p
Análisis molecular.

RESUM

Estudi comparatiu de l'anatomia i caracterització de l'ADN dels arionids descrits per Torres Mínguez (1925) a Cantàbria (Espanya): *Arion cendreroi* i *A. fulvipes*, i la de *A. rufus* i *A. vulgaris* (Gastropoda Pulmonata: Arionidae). - En aquest treball es fa un estudi comparatiu del sistema genital i de l'ADN entre topotips de les espècies que Torres Mínguez (1925) va descriure a Argoños (Cantàbria, Espanya), i espècimens europeus d'*A. rufus* i *A. vulgaris*. Es constata la variabilitat intraespecífica del sistema genital i de l'òrgan estimulador, i es demostra que la lígula té valor taxonòmic. La topografia del sistema genital de *A. cendreroi* coincideix amb la de l'*A. rufus* s. str. d'Europa, mentre que la de *A. fulvipes* és diferent a la de les espècies conegudes. Per les anàlisis de l'ADN mitocondrial, la p-Distance i el K 2-p entre espècimens de *A. rufus* de les zones d'estudi i espècimens de *A. rufus* de França i Polònia és del 16%, mentre que amb espècimens de *A. ater* de Lituània i Portugal és del 21%. *A. fulvipes* té una distància genètica superior al 23% amb relació a les espècies del subgènere *Mesarion* de la Península Ibèrica i del 30% amb *A. vulgaris*. Es conclou que calen nous estudis moleculars per definir el complex *A. ater* / *A. rufus*. Provisionalment considerem *A. cendreroi* una sinonímia de *A. rufus*, i que la separació molecular no està ben definida. Es considera *A. fulvipes* una bona espècie. Admetem que 12% és el llindar que marca la separació genètica entre espècies del gènere *Arion*.

SUMMARY

A comparative study of the anatomy and characterization of the DNA of the arionids described by Torres Mínguez (1925) in Cantabria (Spain): *Arion cendreroi* and *A. fulvipes*, and *A. rufus* and *A. vulgaris* (Gastropoda Pulmonata: Arionidae). - In this work a comparative study of the genital and DNA system between topotypes of the species that Torres Mínguez (1925) described in Argoños (Cantabria, Spain) and European specimens of *A. rufus* and *A. vulgaris* were carried out. The intraspecific variability of the genital system and the stimulating organ is verified, and it is demonstrated that the ligule has taxonomic value. The topography of the *A. cendreroi* genital system coincides with that of *A. rufus* s. str. of Europe, whereas the *A. fulvipes* is different from the known species. By mitochondrial DNA analysis, p-Distance and K 2-p between *A. rufus* specimens from the study areas and *A. rufus* specimens from France and Poland is 16%, whereas with specimens from *A. ater* of Lithuania and Portugal is 21%. *A. fulvipes* has a genetic distance greater than 23% in relation to the species of the subgenus *Mesarion* of the Iberian Peninsula and 30% with *A. vulgaris*. It is concluded that new molecular studies are necessary to define the *A. ater* / *A. rufus* complex. Provisionally we consider *A. cendreroi* a synonym of *A. rufus*, and that the molecular separation is not well defined. *A. fulvipes* is considered a good species. We admit that 12% is the threshold that marks the genetic separation between species of the genus *Arion*.

RESUMEN

Estudio comparativo de la anatomía y caracterización del ADN de los arionidos descritos por Torres Mínguez (1925) en Cantabria (España): *Arion cendreroi* y *A. fulvipes*, y la de *A. rufus* y *A. vulgaris* (Gastropoda Pulmonata: Arionidae). - En este trabajo se hace un estudio comparativo del sistema genital y del ADN entre topotipos de las especies que Torres Mínguez (1925) describió en Argoños (Cantabria, España), y especímenes europeos de *A. rufus* y *A. vulgaris*. Se constata la variabilidad intraespecífica del sistema genital y del órgano estimulador, y se demuestra que la lígula tiene valor taxonómico. La topografía del sistema genital de *A. cendreroi* coincide con la del *A. rufus* s. str. de Europa, mientras que la de *A. fulvipes* es distinta a la de las especies conocidas. Por los análisis del ADN mitocondrial, la p-Distance y el K 2-p entre especímenes de *A. rufus* de las zonas de estudio y especímenes de *A. rufus* de Francia y Polonia es del 16%, mientras que con especímenes de *A. ater* de Lituania y Portugal es del 21%. *A. fulvipes* tiene una distancia genética superior al 23% en relación a las especies del subgénero *Mesarion* de la Península Ibérica y del 30% con *A. vulgaris*. Se concluye que son necesarios nuevos estudios moleculares para definir el complejo *A. ater* / *A. rufus*. Provisionalmente consideramos *A. cendreroi* una sinonímia de *A. rufus*, y que la separación molecular no está bien definida. Se considera *A. fulvipes* una buena especie. Admitimos que 12% es el umbral que marca la separación genética entre especies del género *Arion*.

*Autor corresponsal.
Correu electrònic: jose.castillejo@usc.es

Introducción

En Cataluña siempre ha existido una gran tradición malacológica. El farmacéutico y malacólogo catalán Alejandro Torres Mínguez, basándose exclusivamente en la morfología externa de especímenes conservados en alcohol, describió *Arion cendreroi* Torres Mínguez, 1925 y *Arion fulvipes* Torres Mínguez, 1925 en Cantabria. La localidad tipo es Argoños, Santoña (Santander/Cantabria) [Argueños según Torres Mínguez (1925)]. Las babosas fueron recolectadas por el Catedrático de Santander D. Orestes Cendrero. Según Torres Mínguez (1925) en el envío había variedades del *Arion rufus* (Linnaeus, 1758), *Arion lusitanicus* Mabille, 1868, *Arion sulcatus* Morelet, 1845 y *Arion hibernus* Mabille, 1868. Las descripciones de las especies las hizo en latín, y matiza o resalta en castellano los caracteres anatómicos más significativos.

En la descripción en latín de *A. cendreroi* señala que es un ariónido de gran tamaño, en alcohol mide entre 7 y 8 centímetros, y dado su gran tamaño lo incluye dentro de su grupo «*majorium*». Es un ariónido de color marrón rojizo, con la suela pedia pálida unicolor. El dorso es siempre de color castaño rojizo uniforme. Los tubérculos de la piel están bien marcados, son gruesos, con relieve, y su conjunto asemeja a cordones (Figura 1, tomada de Torres Mínguez, 1925: 103, Fig. 1d). Recalca que la suela es de color amarillo pálido o de color oliváceo terroso, pero siempre unicolor. El margen del pie es rugoso, de color marrón, con pequeñas líneas o lineolas transversas de color castaño oscuro. Ya en castellano señala que “El *Cendreroi*, es de un color ocráceo fundamental con las arrugas pardo rojizas más oscuras por encima, casi negras en algunos ejemplares, con los surcos del color fundamental y espolvoreados de blanco. La coraza es granulosa, pardo oscuro uniforme con el borde ligerísimamente decolorado; la apertura respiratoria es blanquecina, casi mediana. El pie, así como su margen externo, son de un amarillo terroso oliváceo, pálido, completamente uniforme; en algún individuo si acaso la zona central es la que parece como sombreada” (Torres Mínguez, 1925: 102).

En la discusión de *A. cendreroi* indica que “su aspecto es el de *A. sulcatus* por lo general y por lo grosero de sus arrugas, aunque no por el tamaño ni por el color de su pie”. Añade además que el carácter de pie pálido de *A. cendreroi* “podría confundirlo con el pie de *A. hibernus*, aunque este lo tiene más amarillo y rojizo”, y los tubérculos “son ovales alargados con los surcos formando casi retículo”. Añade además que “el borde externo del pie en el *Cendreroi* es mucho más grueso y saliente que el del *A. hibernus* Mabille y las lineolas que lo atraviesan son más oscuras y recias que las de este (*A. hibernus*) que son finas y delicadas” (Torres Mínguez, 1925: 104). A continuación señala que “diferenciase el *A. cendreroi* de todos los del grupo «*majorium*» a que pertenece, en que todos ellos excepto el *A. hibernus* Mabille (rojizo) el *A. fulvipes*, mihi (negro) y el *A. Brevierei* Pollonera (que se distingue del de Mabille en que al sumergirlo en alcohol aparécele en dorso y coraza dos fajas longitudinales negras) y que como él tienen el pie unicolor pálido amarillento, en que en los demás las zonas laterales de su pie son más oscuras que la central, menos el *A. ruginosus* mihi que la tiene más oscura y de color gris azulado así como el *A. ater*, el *A. hispanicus*, el *A. sulcatus*, *A. nobrei*, y el *A. Brevierei* (var. *nigra*) que si alguna vez la tienen unicolor o casi unicolores este tono es muy oscuro o negro y el *A. Da Silvae* que lo tiene oliváceo, su extremo anterior es blanco y el margen negro con finas lineolas negras por debajo”. Finaliza diciendo que “por su aspecto general el *A. cendreroi* es al *A. sulcatus* Morelet, lo que el *A. hibernus* Mabille, es al *A. rufus* Linneo. (Torres Mínguez, 1925: 104).

Respecto a *A. fulvipes*, señala en latín, que el individuo conservado en alcohol es “un animal negro, de talla mediana (5 centímetros), con la suela pedia de color pálido uniforme. La cabeza, tentáculos, mufla y cuello son blanquecinos. El dorso es negro, rugoso. Los tubérculos están separados y son carenados. La suela pedia de color amarillo uniforme está dividida en tres zonas. El reborde de la suela en rojizo, con las lineolas transversales de color marrón rojizo”. En la discusión profundiza en algunos detalles y compara *A. fulvipes* con *A. cendreroi*,

así dice: “el *A. fulvipes* y el *A. cendreroi* son dos *Arion* que tienen la particularidad de tener las zonas de su pie de color pálido uniforme que junto el *A. hibernus* Mabille y al *Arion Brevierei* Pollonera (1887) son las cuatro especies de pie unicolor conocidas en el grupo «*majorium*». A pesar de esta coincidencia son perfectamente distintos. El *A. fulvipes* es negro con las arrugas dorsales aquilladas, a simple vista muy uniformes y alineadas y apretadas entre sí, y el *A. cendreroi* es pardo y las arrugas groseras (poco definidas). El pie, es de un color leonado uniforme, y a pesar de la contracción por el alcohol es finamente arrugado al través y su borde también cuando el *A. cendreroi* lo es muy groseramente. Su apertura respiratoria es bastante más anterior en este cuando en aquel es casi mediana. La coraza (escudo) anteriormente es más truncada y su borde delgado cortante y en esta parte la granulación finísima”.

Linneo (1758: 652) en su *Systema Naturae*, Tomo I, cita por primera vez *Limax ater* y *Limax rufus*. *Arion ater* (Linnaeus, 1758) es una babosa completamente negra que vive en zonas boscosas y umbrías, y *Arion rufus* (Linnaeus, 1758) es una babosa muy grande de color rojo que vive exclusivamente en zonas montañosas.

Pollonera (1889: 404, 405 y 418, Tav. IX, figs. 27 y 28) describe y dibuja el sistema genital de especímenes de *A. rufus* recogidos en Alemania, y de *A. ater* recogidos en Suecia. Según el autor, las características anatómicas que diferencian a las dos especies son: *A. rufus* tiene el atrio distal (Ad) más pequeño que el atrio proximal (Ap), la longitud del conducto deferente (Cd) es dos veces a la longitud de epifalo (Ep), el oviducto libre (Ol) tiene igual longitud y diámetro que el epifalo, y el Ol, Ep y receptáculo seminal (Rs) desembocan en el mismo plano. Para *A. ater* indica que el Ad es de mayor tamaño que el Ap, que la longitud del Ep es igual a la del Cd, y que el Ep y el canal del Rs desembocan en el Ap en un plano distinto al Ol. Al comparar las dos especies indica: en *A. ater* el Ep es más largo que el de *A. rufus*, que el Cd es más corto y más delgado que el de *A. rufus* al igual que el Ol.

A. ater y *A. rufus* son dos taxones nominales que, ya desde su instauración en 1758 por Linneo hasta nuestros días, han sufrido una historia azarosa. En la actualidad no existe consenso entre los especialistas respecto al tratamiento taxonómico que deben recibir los grandes *Arion* de lígula intraatrial. En este grupo no es posible diferenciar taxones basándose exclusivamente en la coloración. Según Chevallier (1977) la su coloración depende de factores externos del medio e indica que incluso aparecen en el seno de una misma población individuos. La categoría taxonómica que debe concederse a ambos grupos no está clara. Chevallier (1972) y Wiktor (1973) prefieren ver ambos taxones como especies distintas (*A. ater* y *A. rufus*), y el primer autor llega incluso a describir subespecies en el seno de *A. rufus*. Por el contrario, para Cain & Williamson (1958) los dos taxones deben considerarse como subespecies (*A. ater ater* y *A. ater rufus*), ya que encontraron en Gran Bretaña poblaciones híbridas en coloración y órganos copuladores. De la misma opinión es Quick

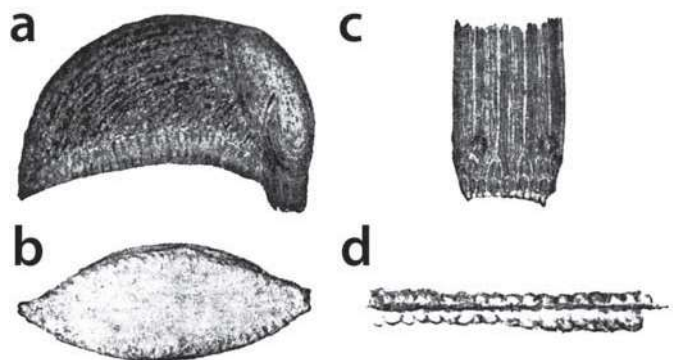


Figura 1. *Arion cendreroi* Torres Mínguez (1925). a) Lado derecho y pie (tamaño natural). b) Pie visto por debajo. c) Mandíbula; tubérculos de la mufla y cabeza y arrugas del cuello. d) Una arruga dorsal. [Tomado del original, Torres Mínguez (1925), pág. 103, Fig. 1]

(1960), a pesar de que atribuye a ambos grupos espermatóforos y cópulas diferentes. También Evans (1986), por medio de estudios electroforéticos y biométricos, llega a la conclusión de que ambos taxones son coespecíficos. Noble (1992), en vista de todos estos datos, argumenta que es probable que *A. ater ater*, dada su pobreza en las variantes enzimáticas presentes en *A. ater rufus* y las distribuciones adyacentes con frecuente hibridación de las dos formas, sea un descendiente inmediato de esta última, proceso que ha implicado la depauperación del genoma original.

A. sulcatus lo describió Morelet (1845) a partir de ariónidos completamente negros, que en extensión medían entre 15 y 16 centímetros. Señala que “cuando se les molesta se contraen y se balancean a la derecha e izquierda”. Pollonera (1889, 1890) considera que la morfología externa de *A. sulcatus* sensu Morelet (1845) es idéntica a la de *Arion empiricorum* Férussac, 1819, pero sin embargo el sistema genital de ambas especies es distinto, ya que el de *A. sulcatus* se asemeja al de *Arion nobrei* Pollonera, 1889, y puntualiza “que no cree oportuno figurar el sistema genital de *A. sulcatus* ya que es idéntico al de *A. nobrei* (Pollonera, 1890: 409).

A. lusitanicus lo describe Mabilille (1868) basándose en las variedades γ (gamma) y δ (delta) del *A. rufus* que Morelet (1845) encontró en la Serra de Sintra y Serra da Arrábida en Portugal. Al describirlo indica “es una forma más fina y más alargada que *A. rufus*, con tubérculos poco alargados acabados superiormente en una arista aguda cuando el animal se contrae, el margen del pie es gris claro, rojizo o amarillento, mucus amarillo, la coloración general es rojiza o ferruginosa, las bandas laterales son negras, a veces bermejas o menos oscuras” (Mabilille, 1868: 134). Pollonera (1890) describe su morfología externa y el sistema genital, e indica que *A. lusitanicus* se encuentra en todo Portugal.

Según Mabilille (1868), *A. hibernus* es una babosa que mide 50 mm, es de color púrpura como el del óxido, y lo encontró en los bosques del alrededor de París. Los tubérculos de la piel son delicados y no muy notorios, la suela pedia es de color blanquecino con tintes de óxido. Taylor (1907: 180) lo cita como *var. hiberna* de *A. ater*.

Pollonera (1887) describe la especie *Arion Brevierei* a partir de ariónidos conservados en alcohol procedentes del departamento francés de Nièvre en la región de Borgoña; según su autor los ejemplares conservados en alcohol recuerdan a *A. hibernus* y *A. rufus*.

Hesse (1926: 123) considera a *Arion Brevierei* y a *A. hibernus* dos especies próximas a *A. empiricorum*. En el apartado de Anotaciones Complementarias de la obra de Hesse (1926: 150), se reseñan los ariónidos publicados por Torres Mínguez entre 1924 y 1925, y entre ellos cita a *A. cendreroi* y *A. fulvipes*, pero no hace ningún comentario al respecto, simplemente recoge las citas.

Para Germain (1931: 73 y 74) *A. hibernus* es la variedad *hibernicus* de *A. rufus*, mientras que a *A. Brevierei* lo considera próximo a *A. rufus*, y lo clasifica dentro del subgénero *Arion* sensu stricto juntamente con *A. ater*.

Castillejo & Rodríguez (1991: 29 y 31) consideran *A. cendreroi* una sinonimia de *A. ater*, ya que la descripción de esta especie, según ellos, coincide con la del *A. ater* negro que recogieron en Santoña (Cantabria). Respecto a *A. fulvipes* indican que es un *A. lusitanicus* juvenil, negro, con dos bandas pardas en el dorso y suela pedia blanca, por lo que lo consideran una sinonimia de *A. lusitanicus*.

Castillejo (1992) cita por primera vez en la Península Ibérica *Arion flagellus* Collinge, 1893. Según el autor es una especie muy abundante en Galicia. Hace un estudio detallado de la morfología externa, del sistema genital y del espermatóforo. Además, describe una cópula.

Garrido (1995) cita en Argoños, en El Dueso y en Santoña (Cantabria) a *A. ater* y a *Arion fuliginus* Morelet, 1845, de esta última indica que es un ariónido que en vivo pueden alcanzar los 60 mm de longitud, tienen el dorso negro o acastañado oscuro con dos bandas separadas sobre el dorso y los tubérculos de la piel son relativamente pequeños. Para este autor *A. fulvipes* es una sinonimia de *A. fuliginus*.

Según Falker, Ripken & Falker (2002) *Arion (Mesarion) vulgaris* (Moquin Tandon, 1855) es un ariónido de posición taxonómica incierta. Anatómicamente se puede englobar dentro del complejo de *A. lusitanicus*. Se conoce su morfología externa y su ADN, pero en la bibliografía no existe iconografía clara y precisa sobre la topografía y variabilidad del sistema genital ni de la lígula.

Objetivo de este trabajo

El objetivo de este trabajo es hacer una revisión crítica de *A. cendreroi* y *A. fulvipes*, descritas por Alejandro Torres Mínguez en 1925 en Cantabria. Para ello es necesario localizar y analizar los tipos o los topotipos, con técnicas anatómicas y de análisis del ADN, con el fin de determinar el valor taxonómico de estas especies, y comparar los resultados con ejemplares europeos de *A. rufus* y *A. vulgaris*.

Material y métodos

No ha sido posible localizar los ejemplares tipo en la colección de Torres Mínguez conservados en el Museu de Ciències Naturals de Barcelona. El malacólogo catalán Sr. Artur Bofill i Poch, fue director de dicho museo desde el año 1893 hasta el principio del siglo XX, y creó una sala dedicada a la malacología, donde junto a su extensa colección, se agrupaban las colecciones básicas del patrimonio malacológico catalán, dadas por especialistas tales como J.B. Aguilar-Amat, J. Rosals, M.P. Graells, B. Serradell, J.M^a Salvañá, M. Chía, A. Torres Mínguez, A. Romaní entre otros. De la colección de Torres Mínguez solamente quedan algunos ejemplares de *A. fuscatus*, *A. ferruginus* y *A. nigraclamydae*, pero ninguno de *A. cendreroi* y *A. fulvipes*. Haas (1929: 74) considera Artur Bofill i Poch el “padre de la malacología catalana”.

Los topotipos: la localidad tipo de *A. cendreroi* y *A. fulvipes* es Argoños, municipio de Cantabria, que limita al este con Santoña. Argoños está enclavado dentro del Parque Natural Marismas de Santoña, Victoria y Joyel de Cantabria. Se hicieron en total cuatro muestreos entre 1989 y 2015. Fueron muestreos diurnos y nocturnos en épocas distintas del año. Se escogieron zonas para muestrear donde el impacto humano fuera escaso: Monte Mijedo, alrededores de Santoña y El Dueso. El área de muestreo se extendió hacia el sur del Parque Natural: alrededores del Santuario de La Bien Aparecida (Ampuero) y ambas vertientes del puerto de Campo El Hayal, en la Sierra de Brañas. Estas últimas zonas están próximas a la desembocadura del río Ansón en la Bahía de Santoña, y a una distancia de 15 km en línea recta de Argoños.

La metodología de nuestro fue la habitual en este grupo de animales: en los muestreos diurnos, se levantaron piedras, maderas, troncos, y cartones para buscar las babosas ocultas; en muestreos nocturnos, se emplearon linternas para localizar y recoger los especímenes activos. Se hicieron fotografías in situ de los especímenes más significativos. Los especímenes se conservaron en alcohol de 70°, después de haberlos mantenido en agua durante 24 h. Para los análisis del ADN, se conservaron en alcohol de 96°. Todo el material recogido en estos muestreos está depositado en el Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física (Facultad de Biología, USC, Santiago de Compostela, La Coruña, España).

Como material comparativo se dispuso de especímenes de *A. rufus* y *A. vulgaris* recogidos por nosotros mismos en Noruega y Francia, y de especímenes de estas especies que la Dra. Paulina Kramarz (Krakow, Polonia) nos envió de su país. Los estudios anatómicos y las fotografías son originales, y fueron realizados por el Dr. Castillejo. Los análisis de ADN se hicieron en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Santiago de Compostela.

Para los análisis moleculares o de ADN, siguiendo el protocolo de Quinteiro, Rodríguez-Castro, Castillejo, Iglesias-Piñeiro & Rey-Méndez (2005), se amplificaron secuencias del gen mitocondrial NADH 1 deshidrogenasa, empleando los primers MOL-NAD1F y MOL-NAD1R. Se alinearon las secuencias con otras especies siguiendo los criterios de Quinteiro et al. (2005). Con el programa MEGA v. 6

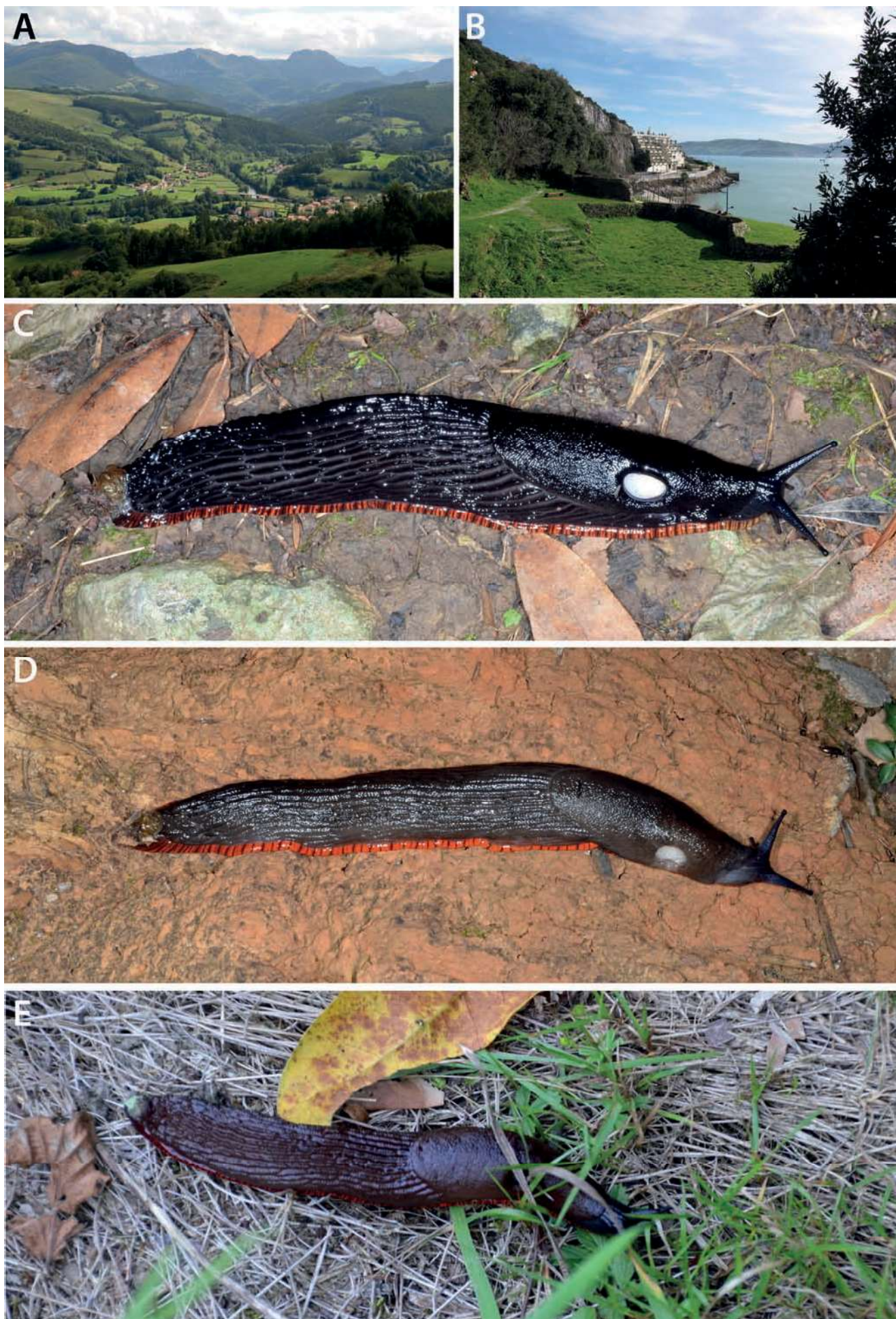


Figura 2. *Arion rufus*, localidades típicas y especímenes. 2A: vista de Argoños (Cantabria), localidad tipo de *A. cendreroi* y *A. fulvipes*. 2B: Punta de San Carlos (Santña, Cantabria). 2C – 2E: individuos en extensión con tubérculos bien marcados.



Figura 3. *Arion rufus* de Argoños (Cantabria). **3A:** individuos juveniles con bandas en el dorso. **3B:** reborde y suela pedia de color naranja. **3C:** suela pedia dividida en tres zonas, el color naranja persiste de fondo. **3D:** individuo conservado en alcohol de 70°, el tamaño y el aspecto de los tubérculos del dorso coincide con lo descrito por Torres Mínguez (1925).

(Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013) se analizaron las secuencias para determinar los mejores modelos y se construyó un árbol de máxima verosimilitud (ML, Maximun Likelihood) con el modelo Tamura 3 parameters con una distribución Gamma y sitios invariables, empleándose transiciones y transversiones. En caso de gaps y nucleótidos no disponibles se seleccionó la partial delection 95%. El valor de bootstrapping fue de 1000.

Resultados

A continuación, se proporciona información detallada de la anatomía externa de topotipos de las especies descritas por Torres Mínguez en Cantabria, con fotografías de la variabilidad del aspecto externo en función del desarrollo sexual, e información de la variabilidad del sistema genital, del órgano estimulador de *A. ater* y *A. fulvipes*. En el apartado de discusión estas dos especies se comparan con ejemplares europeos de *A. rufus* y *A. vulgaris*. La morfología descrita de estas especies está basada en nuestras propias observaciones, y no es objeto de este trabajo el analizar y discutir la anatomía de *A. rufus* y *A. vulgaris*, utilizadas simplemente como punto de referencia. En este sentido son necesarios nuevos estudios anatómicos y moleculares sobre estas especies para definir el estatus y sistemática de *A. ater*, *A. rufus* y *A. vulgaris*.

Sistemática

Familia ARIONIDAE Gray, 1840

Género *Arion* Férussac, 1819

Subgénero *Arion* s. str.

***Arion (Arion) rufus* (Linnaeus, 1758)**

(Figuras 2 a 7)

1889 *Arion rufus*: Pollonera, pp. 404-405, 418, Tav. IX, fig.27

1925 *Arion cendreroi*: Torres Mínguez, pp. 102, fig. 1

1972 *Arion rufus rufus*: Chevallier, pp. 8-14, figs. 1-6.

1998 *Arion rufus*: Castillejo, pp. 97, fig. 48, mapa 40.

Material examinado. Se examinaron especímenes de las siguientes localidades (Figura 17)

- Argoños (Cantabria; localidad tipo de *A. cendreroi* y *A. fulvipes*), alrededores del pueblo, al borde de caminos: 06/11/1989, 5 adultos y 1 juvenil.
- Monte Mijedo (Noja, Cantabria), bordes del camino terroso que por la cima va desde la Iglesia del Salvador (Argoños) hasta la Ermita de San Nicolás (Noja): 06/09/2015, 45 adultos.
- Santoña (Cantabria), zonas próximas a la bahía, sobre la hierba: 06/11/1989, 1 adulto.
- Fuerte San Carlos y jardines del Fuerte San Martín (Santoña): 18/02/2011, 8 juveniles.
- El Dueso (Santoña), caminos de la ladera Este del Monte Buciero: 06/11/1989, 25 adultos.
- La Aparecida (Ampuero, Cantabria), jardines del Santuario de la Bien Aparecida: 03/01/2015, 7 adultos; sobre el asfalto de la carretera, alrededores de la fuente donde nace el Arroyo de la Cueva: 05/09/2015, 31 adultos.

Caracteres diagnósticos

Incluimos dentro de la especie *A. rufus* los ariónidos con estas características: 1.- son de gran tamaño y con la lígula u órgano estimulador intraatrial. 2.- los individuos en fase ♀ tienen el atrio distal de mayor tamaño que el atrio proximal. 3.- el atrio proximal está dividido en dos zonas, una recibe el conducto de la espermateca y el epifalo y la otra el oviducto libre. 4.- la existencia de un canal longitudinal en la parte cóncava de la lígula, que nace en el punto

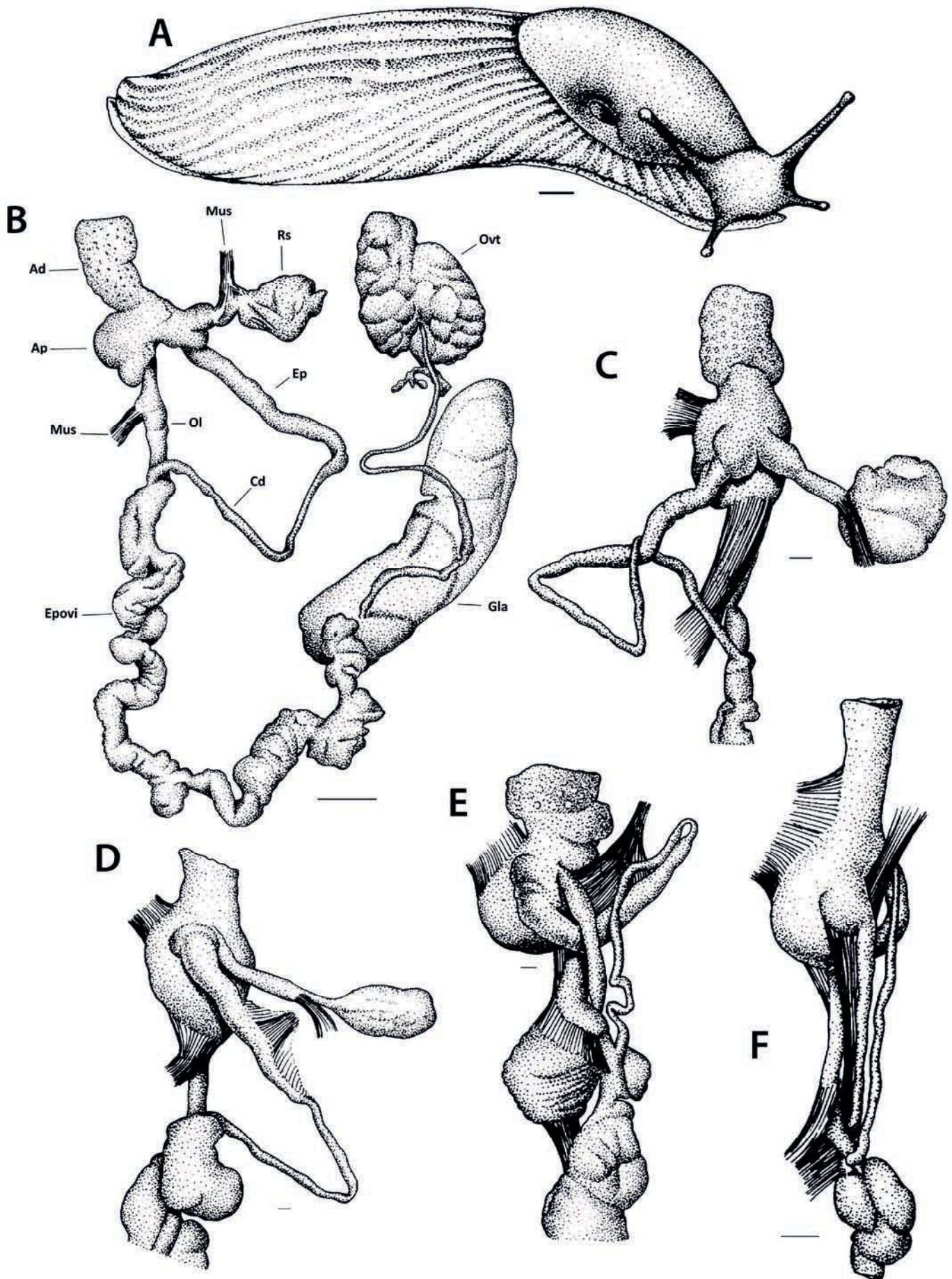


Figura 4. *Arion rufus*, dibujos de la morfología de ejemplares recogidos en noviembre de 1989 en El Dueso (Santoña, Cantabria). **4A:** vista lateral, resaltan los tubérculos del dorso que forman un cordón. **4B:** sistema genital de un espécimen adulto en fase femenina. **4C - 4F:** parte distal del sistema genital, el Ep y el Rs desembocan en el Ap en planos distintos. Las figuras 4D y 4F corresponden a individuos juveniles. **Ad** = Atrio distal. **Ap** = Atrio proximal. **Cd** = Conducto deferente. **Eforo** = Espermatóforo. **Ep** = Epifalo. **Epovi** = Espermoviducto. **Gla** = Glándula de la albúmina. **Mus** = Músculo. **OI** = Oviducto libre. **Ovt** = Ovotestis. **Rs** = Receptáculo seminal. Escala 1 mm. El punto de referencia de los términos "proximal" y "distal" es la ovotestis.

donde desemboca el oviducto libre (Ol) en el atrio proximal (Ap). El canal de la lígula diferencia *A. rufus* de *A. ater*.

Caracteres externos (Figuras 2, 3 y 4A)

En extensión los adultos alcanzan los 200 mm de longitud. El dorso es de color negro o castaño. Los tubérculos de la piel son gruesos, aquillados, muy largos. El reborde de la suela pedia es roja, marrón o anaranjada, con lineolas transversales negras. Suela pedia de color anaranjado o grisáceo, dividida en tres zonas, la central más clara. El mucus del cuerpo blanquecino. Cuando se les molestan se contraen y balancean el cuerpo lateralmente de derecha a izquierda. Los individuos juveniles tienen dos bandas oscuras sobre el dorso y la suela pedia es blanquecina.

Sistema genital (Figuras 4-5)

El tamaño de las distintas partes del sistema genital está en función del estado de la madurez sexual de los individuos. En fase ♂, cuando la ovotestis es grande y la glándula de la albúmina pequeña, el epifalo y conducto deferente son casi de igual longitud. En los individuos en fase ♀ la glándula de la albúmina es muy grande, la ovotestis se hace más pequeña, y el conducto deferente en ocasiones puede ser casi el doble de la longitud del epifalo (Tabla 1). En las formas seniles el epifalo se hace más delgado y gana en longitud, las proporciones relativas cambian. La lígula está alojada en el atrio proximal, es membranosa, cuando está plegada se asemeja a una castaña, completamente extendida se hace triangular y tiene en la parte cóncava un surco longitudinal que se origina en el orificio

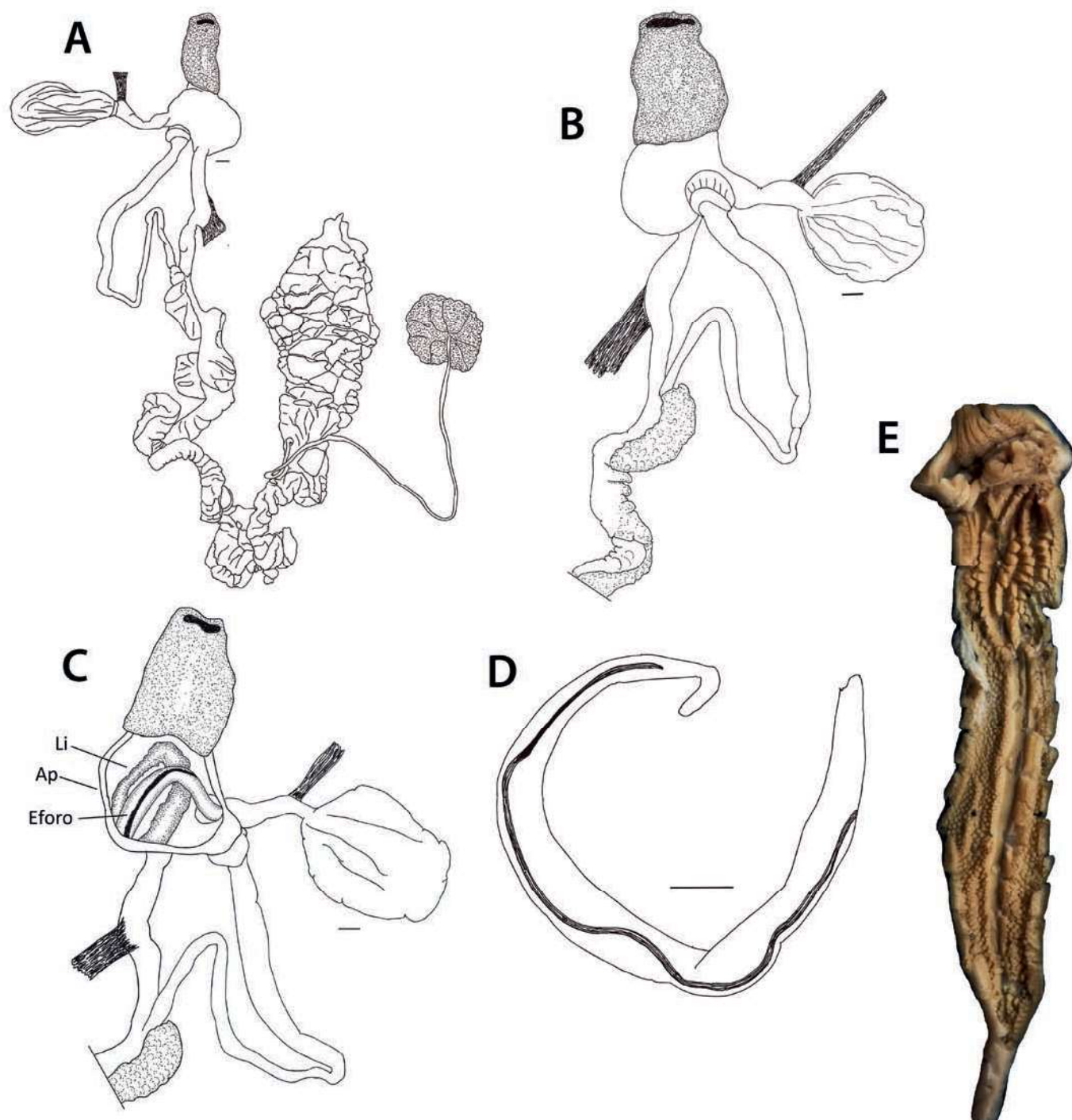


Figura 5. *Arion rufus*, morfología de ejemplares de El Dueso (Santoña, Cantabria), recogidos en noviembre de 1989. **5A – 5B:** sistema genital de un individuo adulto en fase femenina, el atrio distal (Ad) es de mayor tamaño que el atrio proximal (Ap). **5C:** detalle de un espermatóforo alojado en el atrio proximal, tiene un extremo introducido en el receptáculo seminal. **5D:** espermatóforo, los dientes de la quilla no están muy marcados. **5E:** interior del epifalo, las papilas piramidales son muy pequeñas, lo que está en relación con el tamaño de los dientes de la quilla del espermatóforo. Escala 1 mm.

donde desemboca el oviducto libre proximal (Ol_p) (Figura 6). Las paredes internas del epifalo (Figura 5E) están tapizadas con pequeñas papilas piramidales, en su interior se origina el espermatóforo (Figura 5D) con la carena sin dentición.

Distribución, hábitat y biología

Esta especie es muy frecuente en toda la zona de estudio, encontrándose en ambientes antropogénicos y ruderales. Conocer su distribución a nivel de la Península Ibérica y Europa es difícil, dada su confusión con *A. ater*. Los adultos son más frecuentes en el otoño y principio del invierno. Como en todas las babosas su actividad y ciclo biológico está ligado a la temperatura y humedad.

Comentarios

En el periodo comprendido entre 1989 y 2015 hemos muestreado la zona de Argoños y áreas limítrofes en varias ocasiones, y el único *Arion* de gran tamaño que hemos encontrado es *A. rufus*. Para este trabajo fue necesario estudiar especímenes del género *Arion* (*A. ater* y *A. rufus*) provenientes de Lituania, Noruega, Dinamarca, Polonia, Francia y Portugal, que tenían la lígula intraatrial, es decir alojada en el atrio proximal (Ap), por lo que se les clasifican dentro del subgénero *Arion* s. str. Al comparar nuestras observaciones anatómicas con los datos bibliográficos, y los análisis del ADN, deducimos lo siguiente: 1) que ni el color del cuerpo, ni el tamaño, ni la forma de los tubérculos, ni las proporciones relativas de las distintas partes del sistema genital tienen valor específico o discriminatorio, es decir que el tamaño, color y aspecto de la

morfología externa y de los tubérculos del cuerpo no son significativas. 2) que las proporciones entre Ad, Ap, Ep, Cd y Ol no son significativas (Tabla 1). 3) que tanto en *A. ater* como en *A. rufus* se observa el balanceo del cuerpo cuando se les molesta, por lo que no es específico. Según todo esto, a nuestro modo de ver, el único carácter anatómico específico que diferencia *A. ater* de *A. rufus* es el órgano estimulador o lígula, que en *A. rufus* es triangular y tiene un canal en la parte cóncava, que se inicia donde desemboca el Ol (Figuras 6 y 7), mientras que en *A. ater* no existe este surco, y la lígula puede tomar aspectos distintos: forma de naveta, corona de princesa, abanico o de mariposa, seguramente relacionados con el desarrollo sexual. No es objetivo de este trabajo el profundizar en las diferencias anatómicas entre *A. ater* y *A. rufus*, aunque sí adelantamos algunos datos sobre su distancia genética. Hemos podido constatar que la existencia del canal en el interior de la lígula de *A. rufus* es constante en los ejemplares de esta especie que hemos estudiado de Dinamarca, Polonia, Francia y España (Figuras 7H y 7I).

Torres Mínguez (1925) también compara *A. cendreroi* con *A. hibernus* y *A. Brevierei*. Además compara *A. cendreroi* con *A. sulcatus*, e indica que ambas especies se clasifican dentro de subgéneros distintos, ya que la anatomía externa e interna es distinta. Taylor (1907), Germain (1931) y Quick (1960) consideran *A. hibernus* como una variedad de *A. ater*.

Después de comparar la descripción que Torres Mínguez (1925) da de *A. cendreroi* con nuestras propias observaciones, llegamos a la conclusión de que *A. cendreroi* corresponde a un individuo juvenil de *A. rufus*. La morfología externa de los individuos no maduros de

Tabla 1. Medidas en milímetros del sistema genital de especímenes de *A. rufus* de distintas localidades, con indicación del tipo de lígula, de la longitud del atrio proximal (Ap) y el atrio distal (Ad), las *pairwise Distances* (p-Distance) y la *Distancia Kimura 2 parámetros* (K 2-p) con *A. rufus* (CASAN-001 Santoña - El Dueso, Cantabria).

Especie	Localidad	Fase Desarrollo	Epifalo (Ep)	Conducto deferente (Cd)	Atrio proximal (Ap) y Atrio distal (Ad)	Tipo de lígula	p-Distance en %	K 2-p en %
<i>A. rufus</i> CASAN-001	Santoña - El Dueso, (Cantabria)	♀	18	21	Ap = 6 Ad = 8	En forma de Cestilla con canal longitudinal en la parte cóncava	0%	0%
<i>A. rufus</i> CASAN-002	Santoña - El Dueso, (Cantabria)	♀	17	20	Ap = 5 Ad = 7	En forma de Cestilla con canal longitudinal en la parte cóncava	1.9%	1.9%
<i>A. rufus</i> NAEL-005	Señorío de Bertiz. Oronoz - Mugaire. (Navarra)	♀	23	41	Ap = 15 Ad = 7	En forma de Cestilla con canal longitudinal en la parte cóncava	3.8%	3.9%
<i>A. rufus</i> POLO-075	Lobodno (Polonia)	♂ Juv	11	23	Ap = 8 Ad = 3	Triangular con canal en el medio	16.2%	18.3%
<i>A. rufus</i> SCB-001	Brioude (Francia)	♂ Juv	17	26	Ap = 9 Ad = 7	Triangular con canal en el medio	16.4%	18.6%
<i>A. ater</i> LIAT-005	Kvedarna (Lituania)	♀	19	22	Ap = 10 Ad = 3	En forma de naveta	21.2%	25%
<i>A. ater</i> ASAJ-006	Saja (Cantabria)	♂ Muy Juvenil	9	7	Ap = 4 Ad = 3	Con forma de Bumerang / Media luna	20.7%	24.3%
<i>A. ater</i> AAN-022	Ancares (Lugo, Galicia)	♂	18	27	Ap = 6 Ad = 4	En forma de Naveta	21%	24.7%
<i>A. ater</i> APG-022	Serra do Gêres (Portugal)	♀	22	32	Ap = 14 Ad = 7	En forma de Naveta	21%	24.7%
<i>A. ater</i> BUBE-001	Villafranca Montes de Oca (Burgos)	♂	12	12	Ap = 7 Ad = 3	Con forma de Bumerang / Media luna	20.5%	24%

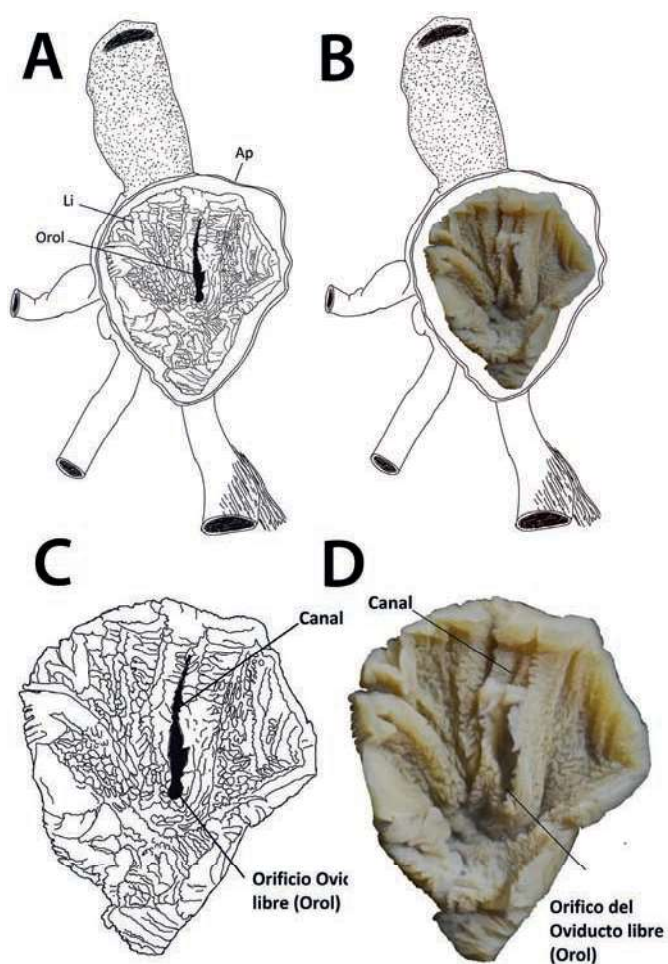


Figura 6. *Arion rufus*, dibujos y fotografías de la lígula de un espécimen de Argoños (Cantabria). En la parte cóncava de la lígula se observa un surco o canal que se inicia en el orificio donde desemboca el oviducto libre (Orol), ver figuras 7H y 7I.

A. rufus que nosotros hemos observado, tienen la suela pedía blanquecina, unicolor, con el margen del pie marrón con lineolas transversales oscuras que coinciden con la descripción de *A. cendreroi* de Torres Mínguez (1925). Esta especie corresponde, por tanto, a un individuo juvenil de *A. rufus*. Otro carácter que aproxima *A. cendreroi* a *A. rufus* son los tubérculos del dorso, que según Torres Mínguez son gruesos y parecidos a cordones (Figura 1d), como sucede en los especímenes de *A. rufus* de la zona (Figuras 3D y 4A)

Distancias genéticas, conclusiones

La distancia genética (p-Distance y K 2-p) que existe entre el *A. rufus* de Argoños (*A. cendreroi*) y especímenes de esta misma especie de Francia y Polonia vemos que es del 16%, mientras que con los *A. rufus* de Navarra es solo del 4% (Tabla 1 y Figura 18). Mayor distancia genética se observa con los *A. ater* de Lituania, Galicia, Portugal, Burgos, e incluso con los *A. ater* del Saja (Cantabria), que puede ser igual o superior al 20%. Nosotros hemos marcado el 12% como umbral de la distancia molecular entre especies. La distancia genética entre *A. rufus* de Argoños y los *A. rufus* de Francia y Polonia el de 16%, que sobre pasa el límite que nos hemos marcado para separar especies. El sistema genital de los *A. rufus* de Argoños (*A. cendreroi*) es idéntica a la de los *A. rufus* de Francia y Polonia. El considerar *A. cendreroi* una buena especie depende de donde pongamos el umbral de separación entre especies. En este trabajo se considera *A. cendreroi* una sinonimia de *A. rufus*, ya que hemos primado más las evidencias anatómicas que las moleculares, hasta que se defina con mayor exactitud el umbral molecular de separación de especies. Se puede concluir que el *A.*

rufus de Argoños (*A. cendreroi*) es distinto a las de los *A. rufus* de Francia y Polonia, y que posiblemente esté en fase de especiación. Somos conscientes que son necesario nuevos estudios del ADN ribosómico y nuclear de poblaciones de especímenes del complejo *A. ater/A. rufus*, y que también es necesario definir donde está el umbral de similitud que nos marca la separación entre especies. Sospechamos que este umbral no es universal, si no que cada grupo, cada género o cada familia tiene su propio umbral. Otro factor que hay que considerar es el proceso de especiación. De todo esto podemos sacar la conclusión que el ADN es una buena herramienta taxonómica, pero sus resultados tienen que estar sustentados por datos anatómicos, etológicos y de distribución, es decir, que el ADN es una herramienta taxonómica, pero no la única.

Subgénero *Mesarion* Hesse, 1926

Arion (Mesarion) fulvipes Torres Mínguez, 1923

(Figuras 8 - 13)

1995 *Arion (Mesarion) fulvipes*: Garrido, pp. 357-365, figs. 85-87, mapa 65.

1998 *Arion (Mesarion) fulvipes*: Castillejo, pp. 100-101, fig. 51, mapa 43.

Material examinado. Se examinaron especímenes de las siguientes localidades (Figura 17)

- Argoños (Cantabria; localidad tipo de *A. cendreroi* y *A. fulvipes*), alrededores del pueblo, al borde de caminos: 06/11/1989, 1 adulto
- Monte Mijedo (Noja, Cantabria), bordes del camino terroso que por la cima del monte va desde la Iglesia del Salvador (Argoños) a la Ermita de San Nicolás (Noja): 06/09/2015, 15 juveniles.
- Santoña (Cantabria), zonas próximas a la bahía, sobre la hierba: 06/11/1989, 6 adultos y 1 juvenil.
- La Aparecida (Ampuero, Cantabria), jardines del Santuario de la Bien Aparecida: 03/01/2015, 4 adultos; alrededores de la fuente donde nace el Arroyo de la Cueva, al borde del camino: 05/09/2015, 10 adultos.

Caracteres diagnósticos externos.

Los adultos en extensión pueden medir 110 mm

En los juveniles, el tronco o cola y el manto o escudo es de color anaranjado, gris o marrón, con dos bandas sobre el tronco y escudo. En los especímenes de color oscuro las bandas son claras, y viceversa, en los de color claro las bandas son oscuras. En ocasiones las bandas del tronco están representadas por una fila de tubérculos claros (Figura 8C y 8D). Sobre el escudo la banda de la derecha pasa por encima del neumostoma.

En los adultos, el tronco o cola y el manto o escudo son de color negro, gris o castaño claro u oscuro, sin bandas sobre el tronco y manto.

Los tubérculos son de tonos más oscuros que el color del cuerpo, pero no son negros.

Los tubérculos son pequeños en comparación con los de *A. rufus* (Figura 10C). Están bien delimitados y se separan claramente de los tubérculos contiguos. Cuando el animal se contrae los tubérculos tienen una quilla superior y la separación con los contiguos es clara. En los animales en extensión los tubérculos se hacen convexos, sin quilla, y con los bordes poco definidos (Figuras 9A, 10A, 10C y 11A)

En los juveniles, la suela pedía es blanquecina, con tintes naranjas o grises, pero sin zonas laterales de coloración distinta (Figura 9E). En los adultos la suela es oscura, con una zona central más clara (Figuras 9B y 10B)

El reborde de la suela pedía es rojizo o anaranjado, con lineolas transversales negras.

El mucus del cuerpo es blanquecino, muy pegajoso.

En los ejemplares conservados en alcohol de 70° se mantiene el color original. Con el tiempo se van oscureciendo tanto el dorso como la suela pedía y los tubérculos de la piel se hacen más patentes

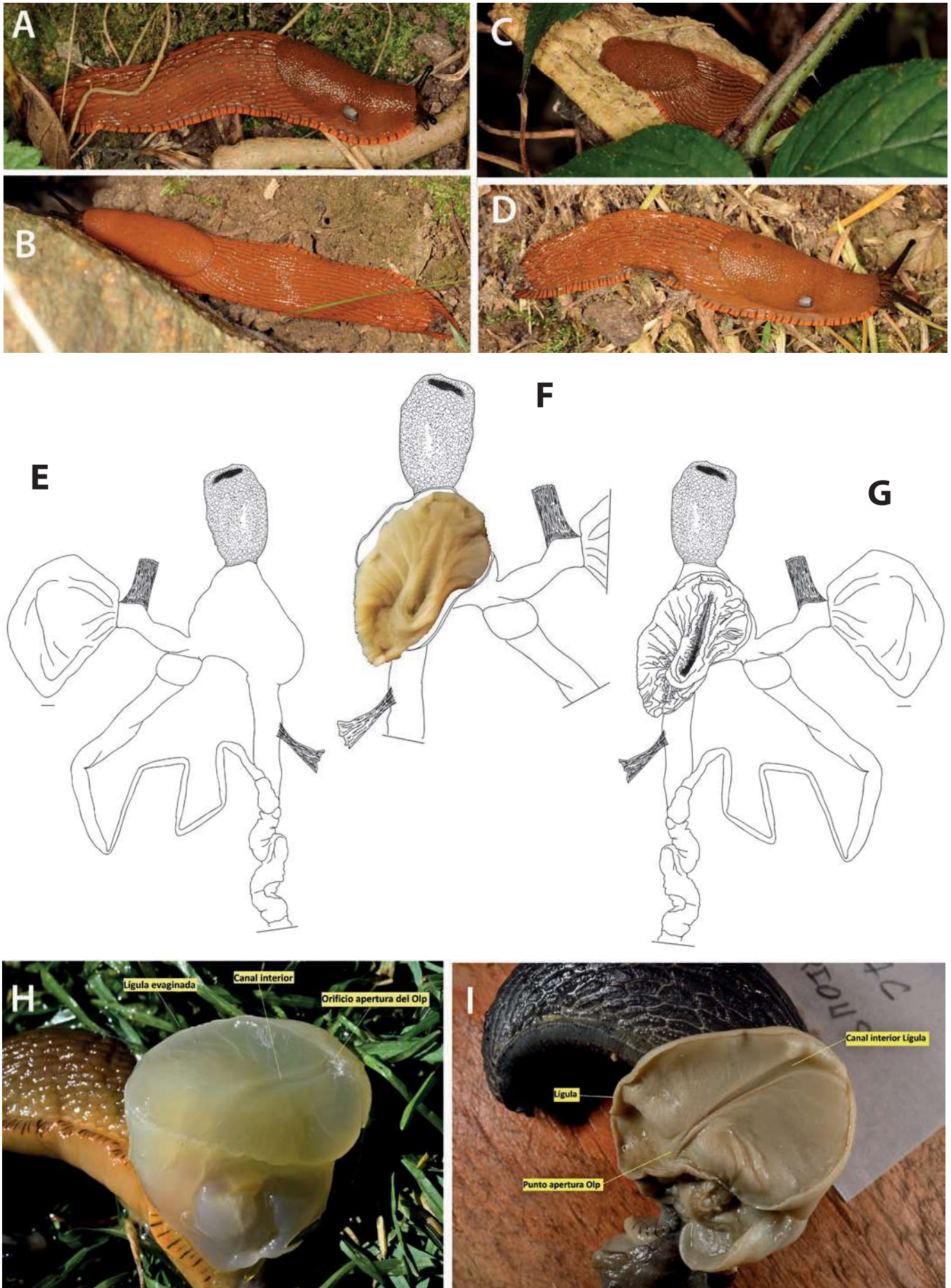


Figura 7. *Arion rufus* de Auzon (Parc Naturel Régional Livradois-Forez, Brioude, Francia) recogidos en octubre de 2015. **7A – 7D:** morfología externa con detalle del tamaño de los tubérculos en individuos contraídos o extendidos. **7E:** parte distal del sistema genital, con detalle del tamaño relativo del atrio distal. **7F -7G:** fotografía y dibujo de la lígula en el interior del atrio proximal. La lígula está extendida, con un canal en el centro como en los especímenes de Argoños (Figuras 6A-6D). **7H:** lígula recién evaginada de un individuo de *A. rufus* de Artigues (Pirineos Atlánticos, Francia). **7I:** lígula evaginada de un espécimen de Artigues (Pirineos Atlánticos, Francia) conservado de alcohol 70°. Escala 1 mm.

Tabla 2. Medidas en milímetros del sistema genital de *A. fulvipes* de distintas localidades, con indicación de la fecha de captura y la fase del desarrollo sexual.

Localidad y fecha	Fase sexual	Epifalo	Conducto deferente	Oviducto libre distal	Oviducto libre proximal	Conducto de la espermateca
Argoños 06/11/1989	Juvenil	13	8	4	6	3
Argoños 06/11/1989	Juvenil	16	8	5	6	4
Argoños 06/11/1989	♀	27	18	9	13	5
Argoños 06/11/1989	♀	32	19	10	11	7
La Aparecida 03/01/2015	♂ Cópula	30	22	11	16	7
La Aparecida 03/01/2015	♂ Cópula	27	24	10	13	5
La Aparecida 03/01/2015	♀	30	21	10	13	5
La Aparecida 03/01/2015	♀	28	21	13	14	6

(Figuras 10A y 10B), pero no son tan grandes como en *A. rufus* (Figura 3D)

Sistema genital (Figuras 11, 12 y 13). La topografía del sistema genital es la típica del subgénero *Mesarion*, con el atrio genital relativamente pequeño, oviducto libre dividido en dos partes separadas por un fuerte acodamiento. La lígula u órgano estimulador siempre está en el interior del oviducto libre distal.

El atrio genital está dividido en dos partes, el atrio distal (Ad), próximo a la abertura genital y alejado de la ovotestis, y el atrio proximal (Ap), donde desemboca el receptáculo seminal (Rs), el epifalo (Ep) y el oviducto libre distal (Old). El atrio distal está recubierto externamente por una masa de aspecto glanduloso. En la pared interna del atrio distal de los individuos adultos existe un abultamiento, que no se observa en los juveniles.

El oviducto libre distal (Old): es cilíndrico, alargado, y su diámetro y longitud dependen del desarrollo sexual. En los adultos en fase ♀ su longitud es similar a la del Olp, y la mitad de la longitud del epifalo. En la parte proximal del Old existe un acodamiento, que obliga al Olp a desembocar lateralmente. En el interior del Old se aloja el órgano estimulador o lígula.

El oviducto libre proximal (Olp) es cilíndrico y delgado, en su tercio distal, y por debajo del acodamiento del Old, se une una de las ramas del músculo retractor del oviducto. La otra rama se une al conducto del receptáculo seminal (Rs). Ambas ramas forman una especie de Y que se ancla dorsalmente a la pared del cuerpo en las proximidades de la cavidad paleal.

El epifalo (Ep) y el conducto deferente (Cd) son cilíndricos. La separación del Ep y Cd se marca por medio de un estrangulamiento causado por su diferencia de diámetro. En la desembocadura de Ep en el Ap se forma una dilatación musculosa anular que interviene en la transferencia del espermátforo. En la mayor parte de los individuos anatomizados, tanto juveniles, como en fase ♂ o fase ♀, se observa que el Ep puede tener 1,5 veces la longitud del Cd (Tabla 2). La pared interna de la parte proximal del Ep, está tapizada por papilas piramidales pequeñas y homogéneas, mientras que en la parte distal son gruesas (Figura 12C). El tamaño de los dientes de la carena del espermátforo está en relación directa con el tamaño de las papilas (Figura 12D).

En relación al espermátforo, solamente hemos encontrado trozos en el receptáculo seminal. En estos se aprecia el tamaño diminuto de los dientes de la quilla (Figura 12D)

El órgano estimulador o lígula (Li) (Figuras 12E y 13) está alojado en el interior del Old y se une al piso de la parte cóncava del Old. Tanto en juveniles como en adultos en fase ♂ o ♀ la lígula siempre es oval piriforme, con todos los bordes bien definidos, más finos en la parte proximal, alrededor del orificio del Olp, y más gruesos en la parte distal. La parte distal de la lígula es aguzada, su extremo es triangular y está libre, pudiéndose levantar a modo de lengua (Figuras 13A y 13C). Todo el reborde de la lígula está festoneado (como una faldilla muy fina), que al plegarse da el aspecto de formar ondas. En el interior de la lígula de los individuos en fase ♀, entre los bordes, y en el centro del piso, se forman dos pliegues longitudinales que forman un canal, que se inicia en el orificio donde abre el Olp en el Old (Figura 13). En los individuos juveniles la lígula sigue siendo oval, pero en ellos no aparecen los pliegues que forman el canal longitudinal, ni tampoco aparece el festoneado sobre los bordes de la lígula.

El espermoviducto es largo, con la parte espermática o masculina recubierta de una pared glandulosa o prostática, y la parte femenina u oviductal más fina y menos abultada.

El tamaño de la glándula de la albúmina depende del grado de desarrollo sexual. En los individuos en fase ♂ es pequeña, del mismo diámetro que el espermoviducto; en los individuos en fase ♀ es grande, abultada, con forma de almendra, blanquecina y compacta.

El conducto hermafrodita es muy largo y delgado

La ovotestis o glándula hermafrodita no llega al fondo del saco visceral, al estar oculta entre los lóbulos de la glándula digestiva. En los individuos juveniles es de mayor tamaño que la glándula de la albúmina, es de color blanquecino y los acini no están muy compactados. En los individuos en fase ♂ sigue siendo grande pero el epitelio que cubre los acini es oscuro. En los individuos en fase ♀ es pequeña, está recubierta por un epitelio de color negro y los acini están compactados.

Distribución, hábitat y biología. Solamente la hemos encontrado en el Parque Natural Marismas de Santoña, Victoria y Joyel, y en las estribaciones de la Sierra de Breñas en Cantabria (Mapa 17). Posiblemente esta especie ha sido citada como *A. lusitanicus* en la Cordillera Cantábrica y en Galicia. Aparece en zonas de prados, en bordes de arroyos, fuentes y caminos. Es una especie nocturna, no crepuscular. Se han observado cópulas al final del otoño y al principio del invierno.



Figura 8. *Arion fulvipes*, recogidos en septiembre de 2015 en el Monte Mijedo (Argoños, Cantabria). Morfología externa y detalle de los tubérculos del cuerpo. **8A:** individuo adulto, sin bandas sobre el cuerpo. **8B – 8D:** individuos juveniles con dos bandas sobre el dorso y escudo, los tubérculos son pequeños, bien marcados y sin quilla.



Figura 9. *Arion fulvipes* del Santuario de La Bien Aparecida (Ampuero, Cantabria). **9A:** cópula entre un individuo de color negro y otro grisáceo, los tubérculos del dorso están bien marcados y separados. **9B:** fotografías de los mismos individuos separados, el color del cuerpo y de la suela pedia es distinto en los dos individuos. **9C:** individuo adulto en extensión. **9D:** individuo juvenil con dos bandas sobre el dorso formadas por tubérculos blanquecinos. **9E:** suela pedia blanquecina en un individuo juvenil.

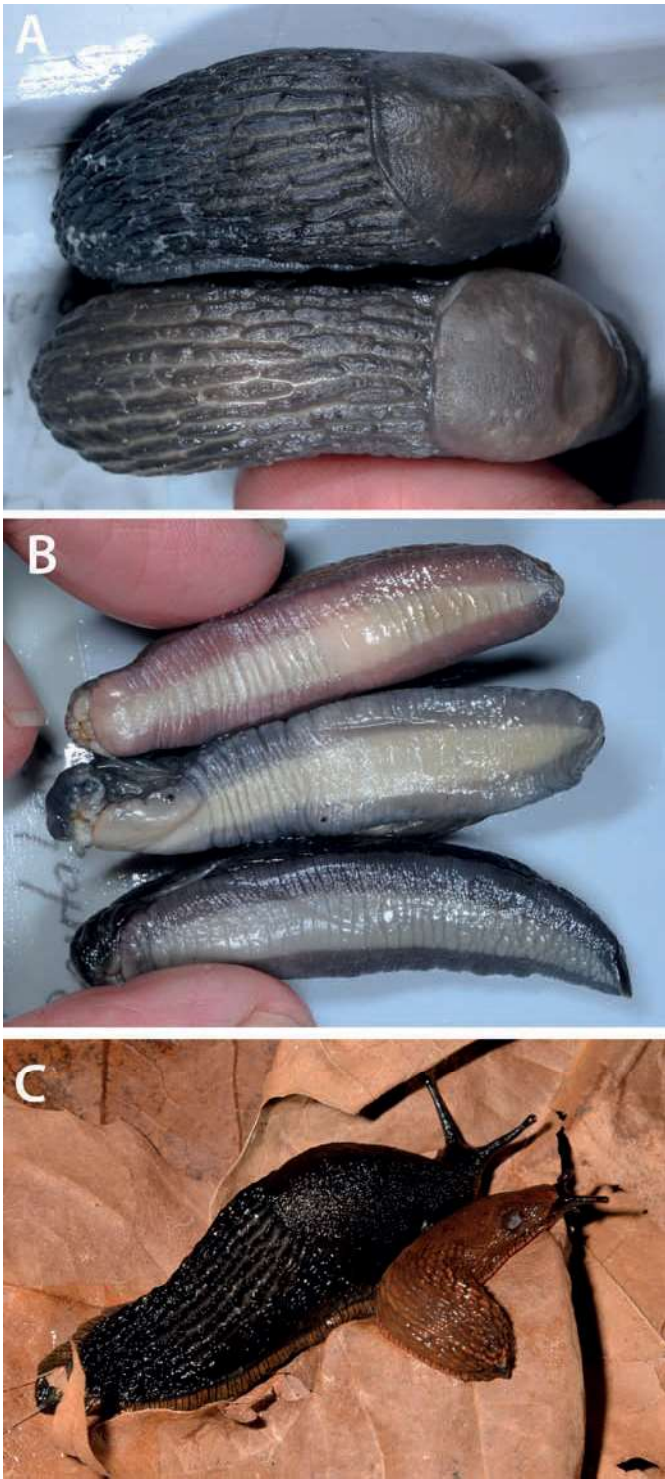


Figura 10. *Arion fulvipes* del Santuario de La Bien Aparecida (Ampuero, Cantabria). **10A:** individuos conservados en alcohol de 70°, los tubérculos de la piel son pequeños, bien definidos, coincidiendo con lo descrito por Torres Mínguez (1925). **10B:** variabilidad en el colorido de la suela pedia en individuos conservados en alcohol. **10C:** tamaño relativo de *A. rufus* (el negro) y *A. fulvipes* (el marrón), el espécimen grande y de color negro corresponde a *A. rufus* de Argoños, la babosa pequeña y de color castaño es un juvenil de *A. fulvipes*. El aspecto, la forma y el tamaño de los tubérculos del cuerpo en las dos especies es diferente.

Comentarios y comparaciones. Respecto a todas las especies descritas por Alejandro Torres Mínguez, y si se sigue el Código de Nomenclatura Zoológica, tal vez hubiera sido más fácil y rápido el obviarlas, considerarlas una sinonimia o crear nuevas especies. El hecho de disponer de herramientas taxonómicas moleculares como el análisis del ADN, nos ha movido a revisar y tomar de nuevo en consideración estas especies.

Al comparar nuestras observaciones con la descripción original de *A. fulvipes* de Torres Mínguez (1925), llegamos a la conclusión de que su morfología externa es idéntica a la de los especímenes que nosotros encontramos en Argoños, Monte Mijedo y en La Aparecida. Para ello nos basamos en las siguientes evidencias:

1. Por el tamaño: Torres Mínguez (1925) incluye *A. fulvipes* dentro de su grupo “*majorium*”, en los que agrupaba los ariónidos de gran tamaño, tipo *A. rufus* y *A. magnus*. Los ejemplares que nosotros observamos pueden medir 100 mm de longitud, y entrarían dentro de los *majorium*.
2. Por el color de la suela pedia: según Torres Mínguez la suela pedia es de color pálido uniforme, leonado, o amarillento, unicolor, de ahí su nombre específico “*fulvipes*”, (pie amarillento). Estas observaciones se corresponden con los juveniles que nosotros observamos (Figura 9F). Esto nos hace sospechar que los individuos en los que basó la descripción eran individuos juveniles, ya que en los adultos observados la suela pedia es oscura (Figuras 9B y 10B).
3. Por los tubérculos del cuerpo: Torres Mínguez indica que “las arrugas dorsales (tubérculos) son aquilladas, y a simple vista, muy uniformes y alineadas y apretadas entre sí”. Estos datos coinciden perfectamente con nuestras observaciones (Figuras 9A, 10A)

Basándose exclusivamente en datos anatómicos, Castillejo & Rodríguez (1991), consideraron *A. fulvipes* una sinonimia de *A. lusitanicus* y a *A. cendreroi* una sinonimia de *A. ater*. Hoy día, apoyándonos en análisis moleculares y nuevos datos anatómicos, se puede inferir que *A. fulvipes* se separa anatómicamente y molecularmente de todas las especies de los subgéneros *Arion* y *Mesarion* de la Península Ibérica y Europa (Tabla 3).

En toda manipulación de las partes blandas del sistema genital de los ariónidos, en el proceso de aislamiento y observación de la lígula, si los cortes no son acertados y precisos, se puede llegar a sacar conclusiones erróneas. En el caso de las especies del subgénero *Mesarion*, que tienen la lígula en el interior del Old, si corte no es el adecuado, se puede romper el borde proximal de la lígula, la que está alrededor del orificio del Old, y entonces da la sensación de que esta está formada por dos pliegues en forma de V invertida (Figura 12F), cuando en realidad es elíptica, oval o piriforme. Este error es frecuente encontrarlo en la bibliografía, cuando se indica que la lígula tiene forma de V invertida o está formada por dos pliegues paralelos.

En la Tabla 2 se recogen las medidas de las partes significativas del sistema genital en individuos de *A. fulvipes* en distinta fase de desarrollo. Llama la atención que la longitud del Ep siempre es mayor que la longitud del Cd, tanto en los juveniles, como en adultos en fase ♂ o en fase ♀. Generalmente es 1,5 veces mayor.

En la Tabla 3 se indican las longitudes del Ep, Cd y Old de especies del subgénero *Mesarion* que por su aspecto externo y área de distribución pudieran parecerse a *Arion fulvipes*. Estas especies son: *Arion flagellus*, *A. fulvipes*, *A. gilvus* Torres Mínguez (1925), *Arion iratii* Garrido, Castillejo & Iglesias (1995), *Arion lizarrustii* Garrido, Castillejo & Iglesias (1995), *Arion magnus*, *A. nobrei* y *A. vulgaris* (Moquin Tandon, 1855). En todas ellas la relación Ep/Cd es 1. Si comparamos las longitudes del Ep y Cd de *A. fulvipes* de individuos en distintas fases de desarrollo, vemos que estas podrían coincidir con las medidas del Ep y Cd de otras especies reseñadas en la Tabla 3. Igual sucede con la forma y aspecto de la lígula. Pese a estas semejanzas, las diferentes especies quedan claramente separadas a partir de las distancias genéticas. Así con *A. lizarrustii* llega al 36%, con *A. vulgaris* de Noruega llega al 30%, mientras que con *A. flagellus* de UK la distancia es del 31%. Es necesario profundizar en el concepto de especie y definir qué caracteres anatómicos y de distancia genética son útiles y fidedignos para delimitar especies, o separar una especie de otra.

A. vulgaris es una especie con amplia distribución en el norte de Europa, frecuente en jardines y zonas antropógenas. En algunas

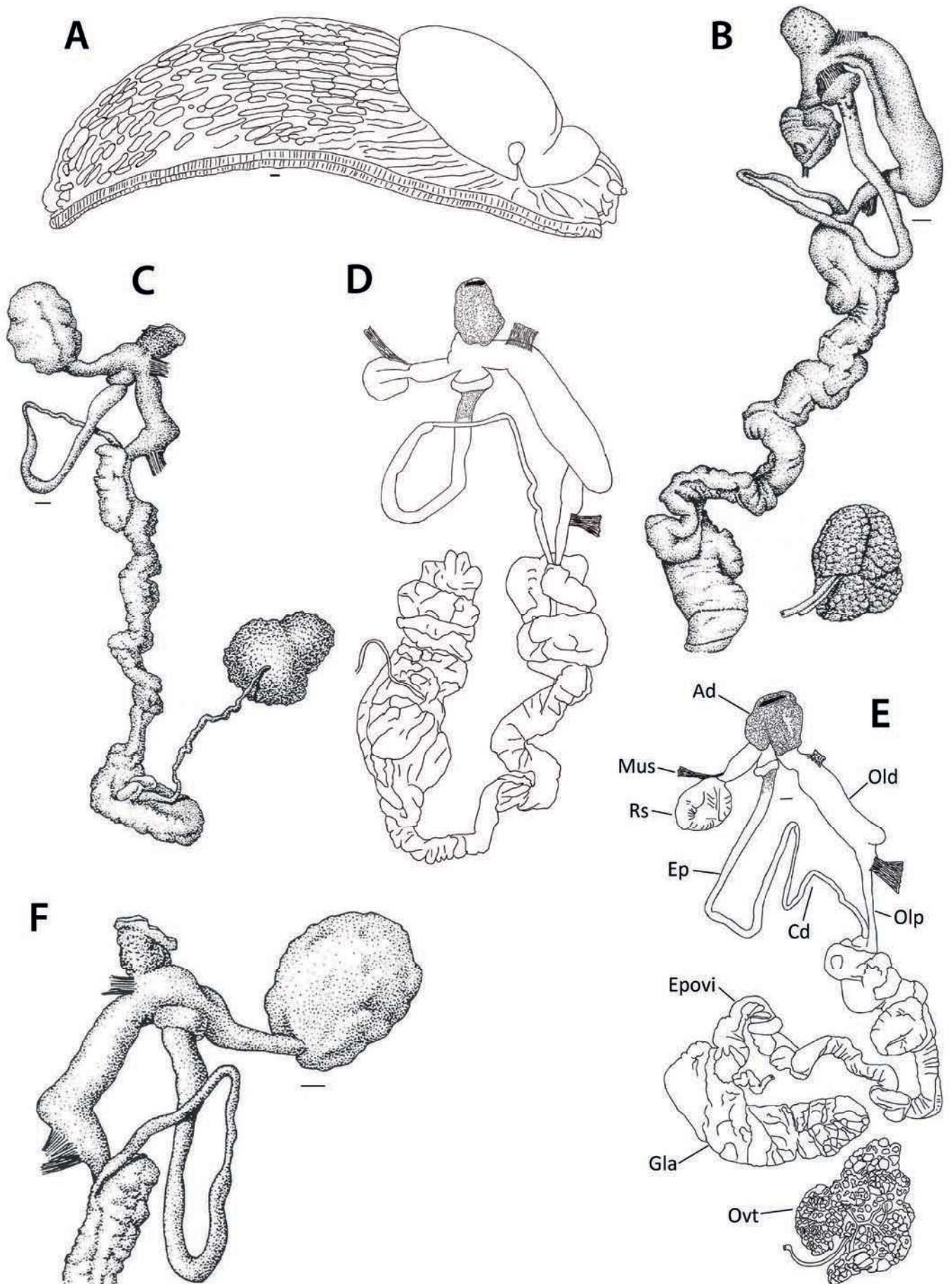


Figura 11. *Arion fulvipes* recogidos en noviembre de 1989 en El Dueso (Santoña, Cantabria). **11A**: morfología externa de un individuo conservado en alcohol 70°. **11B-11F**: sistema genital de individuos adultos en fase femenina, el epifalo distal está pigmentado de negro. **Ad** = Atrio distal. **Ap** = Atrio proximal. **Cd** = Conducto deferente. **Eforo** = Espermatóforo. **Ep** = Epifalo. **Epovi** = Espermooviducto. **Gla** = Glándula de la albúmina. **Mus** = Músculo. **Old** = oviducto libre distal. **Olp** = Oviducto libre proximal. **Ovt** = Ovotestis. **Rs** = Receptáculo seminal. Escala 1 mm.

Tabla 3. Comparativa de las medidas del sistema genital de especies del subgénero *Mesarion* de distintas localidades, con indicación del tipo de lígula, de la longitud del espermatóforo, la *pairwise Distances* (**p-Distance**) y la *Distancia Kimura 2 parámetros* (**K 2-p**) con *A. fulvipes* (Santoña, Cantabria 43I).

Especie	Localidad	Epifalo (Ep) (mm)	Conducto deferente (Cd) (mm)	Oviducto libre distal (Old) (mm)	Tipo de lígula	p-Distance en %	K 2-p en %
<i>A. fulvipes</i> 43I	El Dueso (Santoña, Cantabria)	18	15	19	Elíptica-Piriforme	0%	0%
<i>A. flagellus</i> 65D	Santiago de Compostela (Galicia)	21	18	8	Pequeña, circular, en el tercio proximal y con un surco en el interior. Espermatóforo: 20 mm	20.7%	24.4%
<i>A. fuliginus</i> APG-027	Serra do Gêres (Portugal)	19	19	17	Oval, con surco central	22.1%	26.4%
<i>A. gilvus</i> 49A	Alcoy (Alicante)	10	10	7	En forma de U. Orificio del Ol fuera de la lígula. Espermatóforo: fragmentos	29.3%	37.2%
<i>A. iratii</i> 46B	Selva de Irati (Navarra)	13	10	10	En forma de V. Espermatóforo: 15 mm	32.1%	42.2%
<i>A. lizarrustii</i> 47C	Alto de Lizarrusti (Navarra)	10	10	10	Oval/Elíptica-piriforme. Espermatóforo: 12 mm	36.5%	50.1%
<i>A. lusitanicus</i> Z-002	Serra da Arrábida (Portugal)	23	22	12	Oval/Elíptica -piriforme. Espermatóforo: 40 mm	23.6%	28.5%
<i>A. magnus</i> MS-001	Setcases (Girona)	38	37	32	Oval, ocupa todo el Old . Espermatóforo: 60 mm	30.7%	39.5%
<i>A. nobrei</i> 41A	Luso (Portugal)	29	29	12	Piriforme. Espermatóforo: 50 mm	23.3%	28.2%
<i>A. vulgaris</i> POBIE-118	Biesko (Polonia)	23	27	15	Elíptica-Piriforme	30.2%	38.7%
<i>A. vulgaris</i> FRMN-009	Montagne Noir (Francia)	16	22	15	Piriforme	30.2%	38.7%

zonas la densidad de las poblaciones es tan alta que puede constituir una verdadera plaga. En la bibliografía existe abundante información fotográfica sobre su morfología externa y caracterización de su ADN, pero son escasos los datos que disponemos sobre su sistema genital, y menos aún sobre la lígula, epifalo y espermatóforo. Por su aspecto externo se puede confundir con *A. rufus*, el color y tamaño son muy parecidos (Figura 14A), pero el sistema genital es completamente distinto (Figura 15). La morfología externa y sistema genital de *A. fulvipes* son parecidas a las de *A. vulgaris* (Figuras 14, 15 y 16), pero se diferencian en las proporciones relativas del Ep y Cd (Tabla 3). En *A. vulgaris* la longitud del Cd siempre es mayor que la longitud del Ep, la lígula es oval – piriforme, pero nunca presenta un canal en el centro (Figuras 16A y 16B). También se observan diferencias a nivel del espermatóforo y epifalo, en *A. vulgaris* los dientes de la quilla del espermatóforo y las papilas piramidales del interior del epifalo son grandes (Figuras 16C y 16D), mientras que en *A. fulvipes* son pequeños (Figuras 12C y 12D). Si comparamos la distancia genética (p-Distance y K 2p), entre el *A. fulvipes* de Cantabria y el *A. vulgaris* del norte de Europa, vemos que esta es superior al 30%. Creemos necesario el incluir en este trabajo datos originales sobre la morfología externa y sobre el sistema genital, lígula y espermatóforo de *A. vulgaris*, contribuyendo a su mejor conocimiento anatómico, y ayudando a los taxónomos en su identificación. La información que se proporciona sobre el ADN indica que la distancia genética entre *A. vulgaris* y las especies del subgénero *Mesarion* de la Península Ibérica, incluido el *A. fulvipes*, es significativa, superior al 20%”

En nuestra opinión *A. fulvipes* es una buena especie, ya que se separa claramente del resto de las especies del subgénero *Mesarion*

de Europa por su morfología externa, por el sistema genital y por la distancia genética que es superior al 20% con el resto de las especies.

Comparativa genética entre el ADN de *Arion cendreroi* (*A. rufus* de Argoños) y *Arion fulvipes*

En el árbol (Figura 18) se observan valores de “bootstrapping” altos, mayores del 75 %, a nivel de las especies y en la rama que agrupa *A. (A.) rufus/cendreroi* con *A. (A.) rufus*, la rama que los agrupa con *A. (A.) ater*, *A. (M.) vulgaris* y *A. (M.) magnus*. También en la que agrupa *A. (M.) fulvipes* y *A. (M.) flagellus*, la rama que agrupa *A. (M.) fuliginus*, *A. (M.) lusitanicus*, y *A. (M.) nobrei/sulcatus* y la rama que agrupa estas dos ramas con *A. (M.) hispanicus*.

Es complicado determinar los límites entre especies en los gasterópodos terrestres estilomatóforos (Stylommatophora), porque existe solapamiento y las variabilidades genéticas intraespecíficas son mayores que las que separan a otras especies.

El estudio bibliográfico de Breugelmans, Jordaens, Adriaens, Remon, Quintana & Backeljau (2013) muestra que hay mucha diversidad en las distancias intraespecíficas Kimura 2 (K 2-p): 3 % en Davison, Blackie & Scothern (2009), 27 % en Thomaz, Guiller & Clarke (1996) y Chiba (1999), y pueden llegar al 30% según Davison et al. (2009). Davison et al. (2009) calcula una distancia media interespecífica del 12%, y que usando el 4% para determinar especies diferentes se tendría un error del 32%. Por eso tal vez sea mejor hablar de MOTU (Molecular Operational Taxonomic Units) y después determinar su identidad con especies o subespecies.

En el caso del MOTU *A. (A.) rufus (cendreroi)* la distancia K 2-p va desde el 1,9 % al 3,9 %, con una media del 3,5 %. Los valores medios

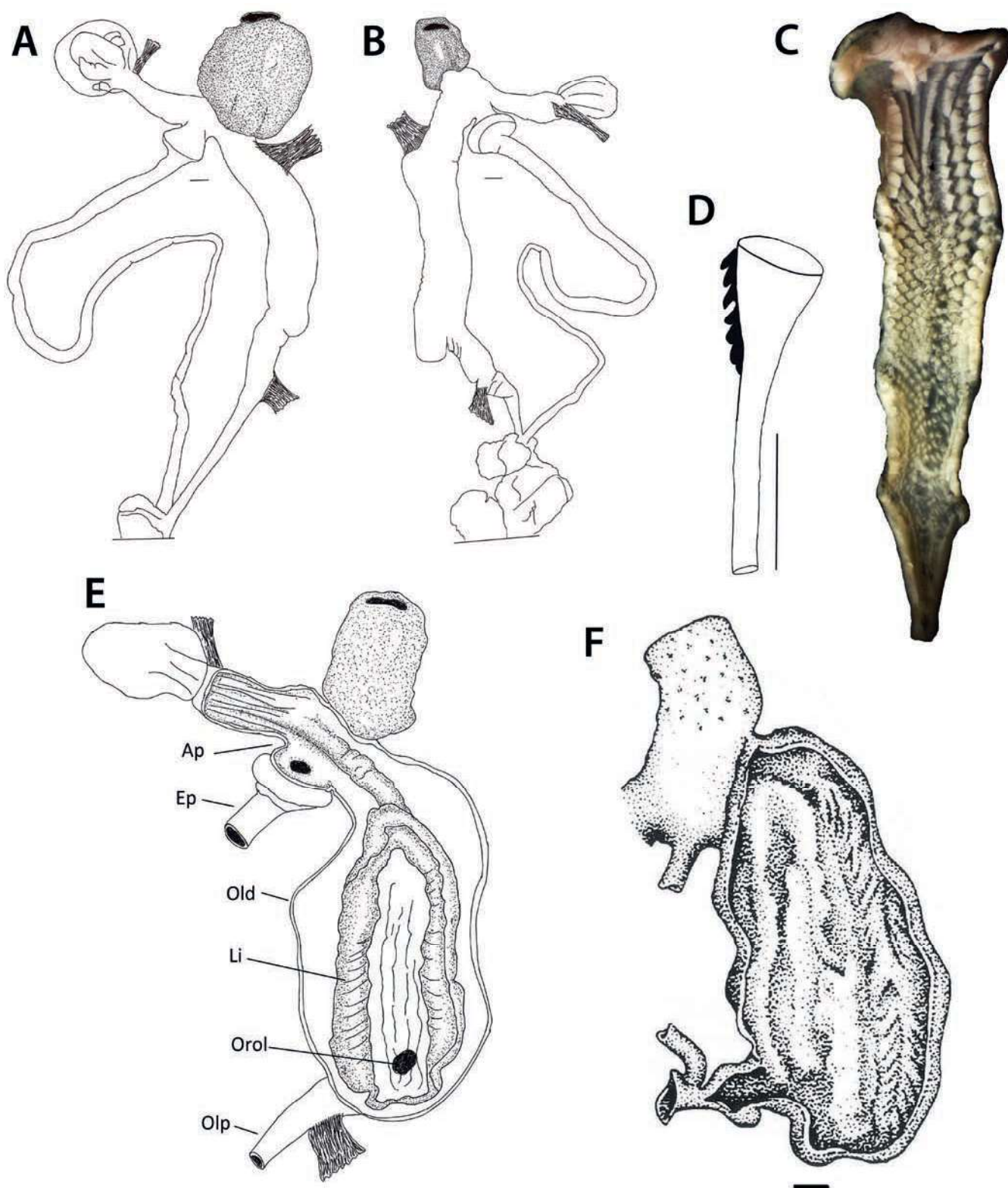


Figura 12. *Arion fulvipes* del Santuario de La Bien Aparecida (Ampuero, Cantabria). **12A – 12B:** detalle de la parte distal del sistema genital de individuos adultos en fase femenina. **12C:** fotografía del interior del epifalo tapizado con papilas pequeñas. **12D:** trozo de espermatóforo con dientes diminutos, el tamaño de los dientes está en relación con el tamaño de las papilas piramidales del epifalo. **12E:** lígula en el interior del Old, su forma es oval-piriforme, con un pliegue distal que llega hasta el Ap, cerca de la desembocadura del epifalo y receptáculo seminal. **12F:** lígula mal extraída, da la sensación que tiene forma de V invertida, el borde proximal está destruido. **Ap** = Atrio proximal. **Ep** = Epifalo. **Li** = Lígula. **Old** = Oviducto libre distal. **Olp** = Oviducto libre proximal. **Orol** = Orificio del oviducto libre. **Ovt** = Ovotestis. Escala 1 mm.

de distancia con los otros grupos van del 16,1 % con *A. (A.) rufus* (mínimo de 16,8 %) al 46,2 % con *A.(M.) fulvipes* 43I y 60,4 % con *Deroceras sp. from Benasque*. Los grupos con los que tiene una distancia media de menos del 30 % son: *A. (M.) magnus*, *A. (A.) ater* y *A. (M.) vulgaris*. Con *A. (M.) gilvus* la distancia es del 35,1 %.

En el árbol (Figura 18) también se aprecia la diferencia entre el *A.*

(M.) fulvipes 43I y el *A. (M.) flagellus* 65D, con una distancia de K 2-p de 24,4 %. Los grupos con los que tiene una distancia de menos del 30% son: *A. (M.) lusitanicus*, *A. (M.) nobrei-sulcatus*, *A. (M.) fuliginus* y *A. (M.) nobrei-sulcatus*. Con *A. (M.) hispanicus* es del 32,8%. Sus mayores distancias son del 50,1 % con *A. (M.) lizarrustii* 47C y del 58,8 % con *Deroceras sp. from Benasque*.

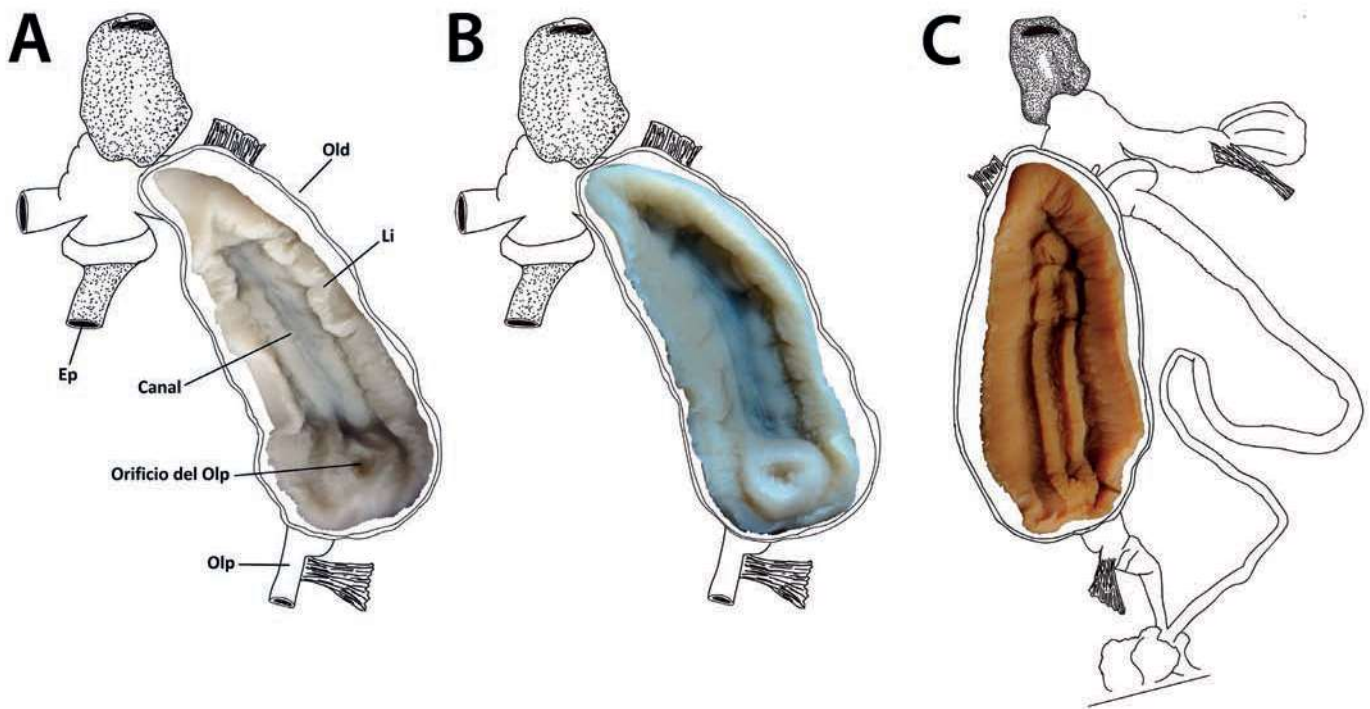


Figura 13. Lígula de *Arion fulvipes*. **13A y 13B:** lígula abierta y extendida en el interior del oviducto libre distal (Old), con el borde festoneado y el canal longitudinal del centro de la lígula no muy marcado. **13C:** lígula con el canal central bien marcado. El grado de desarrollo del canal interior de la lígula está en función de la fase sexual del individuo. La lígula y el canal abrazan el espermatozoido en el momento de la retracción del genital durante la cópula, y lo arrastran. **Ep** = Epifalo, **Li** = Lígula, **Old** = oviducto libre distal, **Olp** = Oviducto libre proximal.

Conclusiones:

1. Las distancias genéticas entre los *A. (A.) rufus* tipo *cedreroi* son menores del 12 %, (K 2-p de 3,9 %) y el MOTU más cercano es el *A. (A.) rufus* (K 2-p de 16,8 %). La diferencia intraespecífica estaría lejos del 12 %, y por debajo del punto de corte del 4%, por lo que las secuencias analizadas por nosotros podrían ser consideradas todas ellas como pertenecientes a una misma especie: *A. (A.) rufus* tipo *cedreroi*. Y su distancia con los *A. (A.) rufus* podrían hacerlas dos especies distintas a pesar de su parecido morfológico. Posibles causas de esta diferencia serían que estamos ante una especie críptica o que se tratan de dos líneas mitocondriales ancestrales. Para discernirlo haría falta analizar secuencias nucleares, para ver si se mantienen las diferencias entre los dos grupos, y realizar pruebas de cruzamiento, para comprobar si existe una barrera reproductiva.
2. La menor distancia de *A. (M.) fulvipes* 43I es con el *A. (M.) flagellus* 65D (K 2-p de 24,4 %). Pero siendo una distancia superior al 12%, consideramos que son dos especies distintas.

Sumario y conclusiones

La aplicación de los análisis del ADN como herramienta taxonómica y el otorgar a caracteres anatómicos concretos un mayor valor taxonómico, es imprescindible para conseguir una identificación correcta de las especies de babosas. En los albores de la malacología, la identificación de las especies se hacía por la morfología externa, más tarde se tomó en consideración el sistema genital. Hoy día se ha revelado como carácter taxonómico específico el considerar la variabilidad del sistema genital en función de la fase de desarrollo (fase juvenil, ♂, ♀ o senil), la variabilidad de la forma y aspecto de la lígula, las estructuras internas del epifalo y la ornamentación del espermatozoido. A estos datos anatómicos hay que sumar la información que nos proporcionan los análisis del ADN, información muy valiosa, pero con un problema de interpretación, ya que no tenemos definido donde está el umbral de la distancia genética que marca la separación entre especies del mismo género. Este umbral,

obviamente, tiene que variar de un grupo taxonómico a otro y de su grado de especiación, en una palabra, tenemos que definir el término especie, y cuál es el umbral de la distancia genética de separación.

En este trabajo se hace un estudio comparativo entre los topotipos de las especies del género *Arion* que el malacólogo y farmacéutico Barcelonés Alejandro Torres Mínguez describió en Argoños (Cantabria): *A. cedreroi* y *A. fulvipes*. Para ello se aplican técnicas de disección para estudiar su anatomía y se hacen análisis del ADN. Los resultados se comparan con la anatomía y con el ADN de ejemplares europeos de *A. rufus* y *A. vulgaris* recogidos y estudiados por nosotros. El sistema genital de *A. cedreroi* es muy parecido al de *A. rufus* de Francia y Polonia, pero la distancia genética entre ambas especies es del 16%, distancia que está en el límite que hemos fijado para separar especies. En el futuro, cuando se disponga de nuevos estudios sobre el ADN mitocondrial y nuclear de poblaciones de *A. rufus* y *A. ater* de Europa, y sobre todo de España, posiblemente haya que considerar a *A. cedreroi* una sinonimia de *A. rufus*. La distancia genética del *A. rufus* de Argoños (*A. cedreroi*) con los *A. rufus* de Polonia y Francia es del 16%, mientras que es del 21% con los *A. ater* de Lituania, Portugal e incluso con los del Saja (Cantabria). La distancia genética de *A. fulvipes* con *A. lizarrustii* es del 37%, del 22% con *A. fuliginus* de Portugal. En este trabajo se cree adecuado considerar la *p-Distance* del 12% la que marca el umbral de separación entre las especies del género *Arion*. También se llega a la conclusión de que *A. fulvipes* es una buena especie.

En nuestra opinión en los Ariónidos, la "lígula" no actúa como "órgano estimulador", sino que es una membrana que interviene en el arrastre del espermatozoido, lo abraza y tira de él a medida que se va invaginando el sistema genital. Durante la cópula, la lígula se evagina completamente cuando se va a iniciar la transferencia del espermatozoido, en el momento de la transferencia lo abraza y a medida que se va invaginando va arrastrando el espermatozoido del otro individuo hacia el interior de su sistema genital. En los Agriolimácidos, que no tienen espermatozoido, el "sarcobelum" sí que es un "órgano estimulador" ya que una vez evaginado "estimulan" con él al otro individuo durante la cópula.

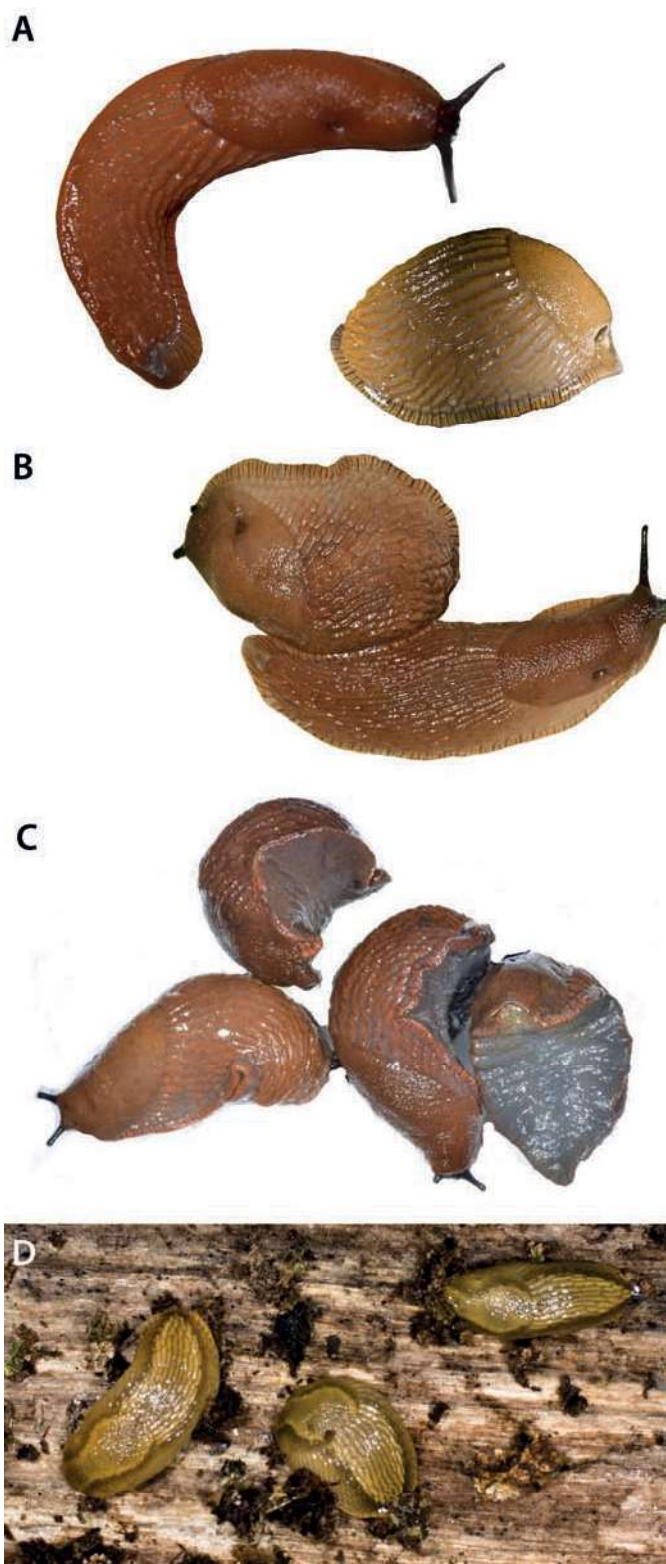


Figura 14. *Arion vulgaris* recogidos en mayo de 2016 en Bergen (Noruega). **14A-14C:** vista dorsal, lateral y ventral. Variación del aspecto, forma y tamaño de los tubérculos en función de grado de contracción, y del color de la suela pedia. **14D:** individuos muy juveniles con bandas oscuras sobre el dorso.

Agradecimientos.

Al Museo de Zoología de Barcelona, por habernos proporcionado en su día material de referencia.

Al Ilmo. Colegio de Farmacéuticos de Barcelona por la información que nos proporcionó sobre el farmacéutico Alejandro Torres Mínguez.

A los profesores de la USC, Javier Quinteiro y Manuel Rey Méndez,

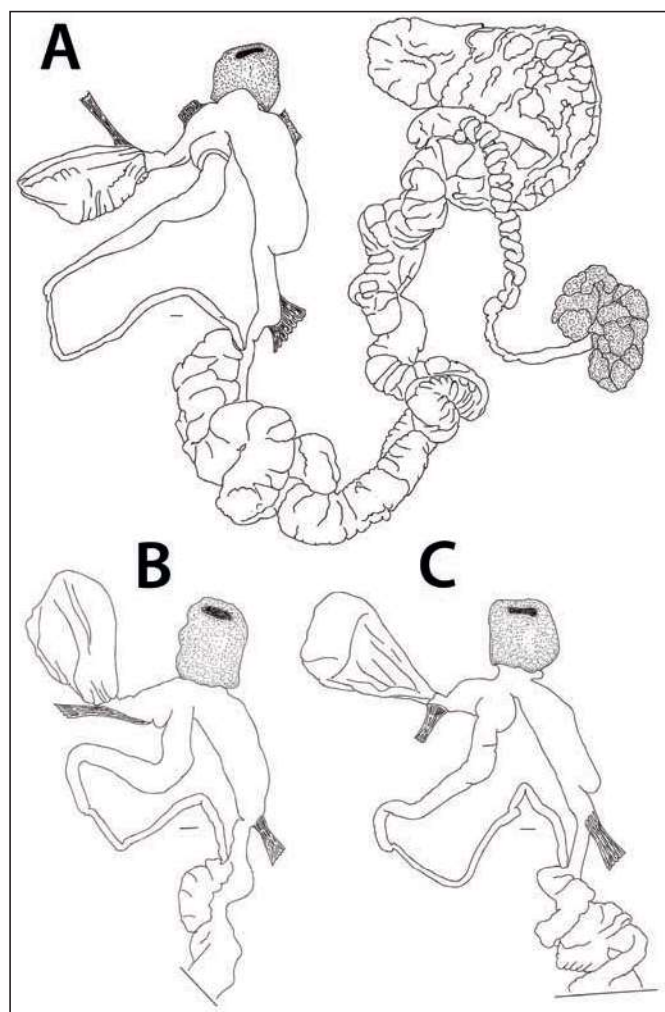
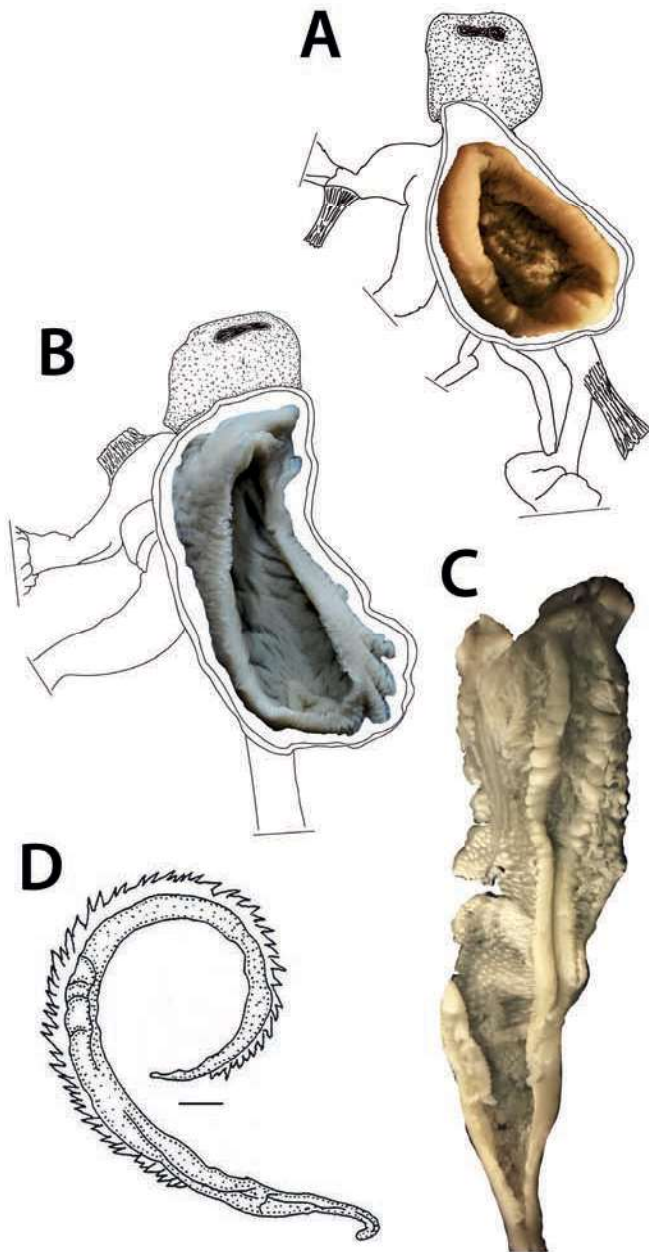


Figura 15. *Arion vulgaris* de Bergen (Noruega), sistema genital. **15A:** individuo adulto en fase femenina. **15B - 15C:** individuos adultos en fase masculina. Escala 1 mm.

por la ayuda prestada en los análisis moleculares de las especies y en la interpretación de los resultados.

Bibliografía

- Bruegelmans, K., Jordaens, K., Adriaens, E., Remon, J.P., Cardona, J.Q. & Bäckeljaun T. (2013). DNA barcodes and phylogenetic affinities of the terrestrial slugs *Arion gilvus* and *A. ponsi* (Gastropoda, Pulmonata, Arionidae). *ZooKeys* 365, 83-104.
- Cain, A. J. & Williamson, M. (1958). Variation and specific limits in the *Arion ater* aggregate. *Proceedings of the Malacological Society of London*, 33: 72-86.
- Castillejo, J. & Rodríguez, T. (1991). *Babosas de la Península Ibérica y Baleares. Inventario crítico, citas y mapas de distribución.* Monografías da Universidade de Santiago N° 162, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Santiago de Compostela.
- Castillejo, J. (1992). The anatomy of *Arion flagellus* Collinge, 1893, present on the Iberian Peninsula. *The Veliger*, 35(2):146-156.
- Castillejo, J. (1998). *Guía de las babosas ibéricas.* Real Academia Galega de Ciencias, Santiago de Compostela.
- Chevallier, H. (1972). Arionidae (Molusca, Pulmonata) des Alpes et du Jura français. *Haliotis*, 2 (1): 7-23.
- Chevallier, H. (1977). Observations sur le polymorphisme des limaces rouges (*Arion rufus* Linné et *Arion lusitanicus* Mabillet) et de l'escargot petit-gris (*Helix aspersa* Müller). *Haliotis*, 6: 41-48.
- Chiba S. (1999). Accelerated evolution of land snails Mandarinina in the oceanic Bonin Islands: evidence from mitochondrial DNA sequences. *Evolution*, 53:460-471



- Davison, A., Blackie, R.L.E. & Scotthern, G.P. (2009). DNA barcoding of stylommatophoran land snails: a test of existing sequences. *Mol. Ecol. Res.* 9, 1092-1101.
- Evans, N. J. (1986). An investigation of the status of the terrestrial slugs *Arion ater ater* (L.) and *Arion ater rufus* (L.) in Britain. *Zoologica Scripta*, 15 (4): 313-322.
- Falker, G., Ripken, T. E. & Falker, E. (2002). *Mollusques continentaux de la France. Liste de référence annoté et bibliographie*. Publications Scientifiques du M.N.H.N., Paris.
- Garrido, C. (1995). *Estudio taxonómico de la fauna de pulmonados desnudos ibéricos (Mollusca: Gastropoda)*. Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela.
- Garrido, C., Castillejo, J. & iglesias, J. (1995). The *Arion subfuscus* complex in the eastern part of the Iberian Peninsula, with redescription of *Arion subfuscus* (Draparnaud, 1805) (Gastropoda: Pulmonata: Arionidae). *Archiv für Molluskenkunde*, 124(1/2): 103-118.
- Germain, L., (1930). Faune de France. 21 Mollusques terrestres et fluviatiles. Première partie. Paris.
- Haas, F. (1929). Fauna malacológica terrestre y de agua dulce de Cataluña. *Trab. Mus. Cien. Nat. Barcelona* 13, 1-491.
- Hesse, P. (1926). Die Nacktschnecken der palaearktischen Region. *Abh. Arch. Molluskenkd.* 2, 1-152.
- Linnaeus, C. (1758). *Systema naturae, per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Editio decima. Holmiae, 1758, 2 vol. in-8. Editio duodecima. Holmiae, 1766 à 1767, 3 vol. in-8.
- Mabille, M. J. (1868). Des limaciens européens. *Revue et Magasin de Zoologie*. Sér. 2, vol. 19-20: 129-146.
- Moquin-Tandon, A. (1855). *Histoire naturelle des Mollusques terrestres et fluviatiles de France*. Paris, gr. in 8, 2 vol. y atlas: I, VIII + 416 pp.; II, 646 pp., Atlas, 82 pp. + 54 pl. color.
- Morelet, A. (1845). *Description des mollusques terrestres et fluviatiles du Portugal*. Paris. 1-113 pp.
- Noble, L. R. (1992). Differentiation of large arionid slugs (Mollusca, Pulmonata) using ligula morphology. *Zoologica Scripta*, 21(3): 255-263.

Figura 16. *Arion vulgaris*. **16A – 16B:** ejemplar de Bergen (Noruega), ligula con forma oval – piriforme en el interior de Old. **16C – 16D:** ejemplar recogido en septiembre de 1992 en Mazanet (Montagne Noir, Francia). **16C:** interior del epifalo tapizado con papilas gruesas que originarán los denticulos grandes de la quilla del espermatóforo. **16D:** espermatóforo con dientes grandes. Escala 1 mm.



Figura 17. Mapa de Cantabria. Los triángulos indican las ciudades Santander y Bilbao. Los círculos señalan los lugares donde se muestreó y en los que aparecieron *A. rufus* y *A. fulvipes*. Estas localidades están dentro del Parque Natural Marismas de Santoña, Victoria y Joyel y sus estribaciones (Cantabria). Las localidades de Santoña, El Dueso, Argoños y Monte Mijedo están muy próximas las unas de las otras. La localidad de La Aparecida está ubicada al sur del Parque Natural, a 15 km de Argoños.

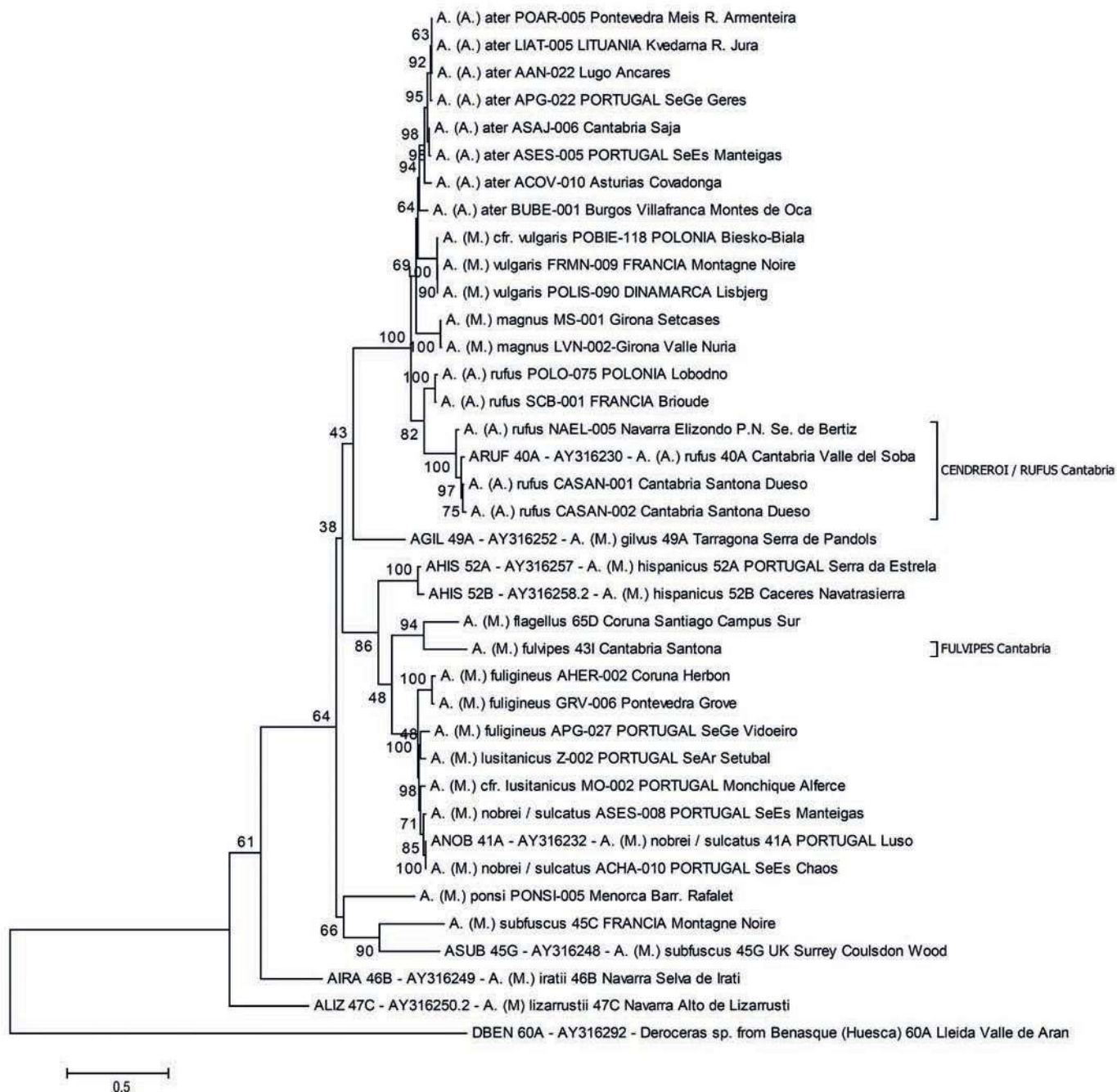


Figura 18. Árbol del fragmento de gen mitocondrial NADH1 deshidrogenasa: ML T3p+G+I, con transiciones y transversiones. Partial deletion 95 %. Bootstrapping = 1000.

Pollonera, C. (1889). Nuove contribuzioni allo studio degli *Arion* europei. *Atti R. Accademia delle Scienza di Torino*, 24: 623-640.

Pollonera, C. (1890). Appunti di malacologia. Recensement des ARIONIDAE de la Region Paléartique. *Bollettino dei Musei di Zoologia ed Anatomia Comparata della R. Università di Torino*. Vol. V, n° 87: 1-42.

Pollonera, C., (1887). Specie nuove o mal conosciute di *Arion* europei. *Atti della R. Accademia delle Scienze di Torino*. 22 (5): 188-211.

Quick, H. E. (1960). British slugs (Pulmonata; Testacellidae, Arionidae, Limacidae). *The Bulletin of the British Museum (Natural History)* 6 (3), 106-226.

Quinteiro, J., Rodríguez-Castro, J., Castillejo J., Iglesias-Piñeiro, J. & Rey-Méndez, M. (2005). Phylogeny of slug species of the genus *Arion*: evidence of monophyly of Iberian endemics and of the existence of relict species in Pyrenean refuges. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 43, 139-148.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.

Taylor, J. W. (1907). *Monography of the land freshwater Mollusca of the British Isles. Testacellidae, Limacidae, Arionidae*. Taylor Brothers, Leeds.

Thomaz, D., Guiller, A. & Clarke, B. (1996). Extreme divergence of mitochondrial DNA within species of pulmonate land snails. *Proc. R. Soc. Lond. B* 263, 363-368.

Torres Mínguez, A. (1925). Notas malacológicas. V. Tres nuevos *Arion* de España (Moluscos pulmonados desnudos). *Bull. Inst. Cat. Hist. Nat.* 25, 102-106.

Wiktor, A. (1973). Die Nacktschnecken Polens (*Arionidae, Milacidae, Limacidae*) (*Gastropoda, Stylommatophora*). Monographiae Fauny Polski, I. Warszawa-Kraków, 182 pp.