Revista Ibérica de Aracnología, nº **39** (31/12/2021): 73–79.
Grupo Ibérico de Aracnología (S.E.A.). ISSN: 1576 - 9518.

SOBRE UNA NUEVA ESPECIE DE *PANISUS* (ACARI, HYDRACHNIDIA) DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

Antonio G. Valdecasas, Ricardo García-Jiménez
& Mercedes Marín F-Campoamor

Museo Nacional de Ciencia Naturales, CSIC
c/José Gutiérrez Abascal, 2 28006-Madrid. España

Resumen: Se describe una nueva especie de *Panisus*, *P. chicamoi* **sp. nov**., del río Chícamo, en la cuenca del Segura (Murcia, España). Se incluye la descripción morfológica y la secuenciación molecular del fragmento citocromo c oxidasa subunidad I (COI), ADN barcode. Complementariamente se han realizado análisis filogenéticos con los métodos máxima verosimilitud (ML) y vecino más cercano 'neighbor-joining' (NJ) empleando secuencias del COI presentes en GenBank, identificadas a nivel de género pertenecientes a la familia Hydryphantidae. En ambos análisis filogenéticos, *P. chicamoi* **sp. nov.** queda incluido en el clado que conduce a *Panisus*, y dentro de este clado, claramente diferenciada de las otras dos especies presente en Europa, *P. michaeli* y *P. torrenticolous*.
Palabras clave: Ácaros acuáticos, especie nueva, taxonomía, río Chícamo

On a new species of *Panisus* (Acari, Hydrachnidia) from the Iberian Peninsula
Abstract: A new species of *Panisus*, *P. chicamoi* **sp. nov.**, from the Chícamo river, in the Segura basin (Murcia, Spain) is described. The morphological description and the molecular sequence of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) fragment, barcode DNA, are included. Phylogenetic analyzes have been carried out with maximum likelihood (ML) and neighbor-joining (NJ) methods using COI sequences present in GenBank, identified at the genus level belonging to the Hydryphantidae family. In both phylogenetic analyzes, *P. chicamoi* **sp. nov.** is included in the clade that leads to *Panisus*, and within this clade, clearly differentiated from the other two species present in Europe, *P. michaeli* and *P. torrenticolous*.
Keywords: Water mites, new species, Chícamo stream

Taxonomía/Taxonomy: *Panisus chicamoi* **sp. nov.**

Introducción

Como parte de un proyecto de elaboración de una Fauna Ibérica de ácaros acuáticos (Acari, Hydrachnidia), se está realizando la revisión de distinto material recogido a lo largo de varios años en distintas localidades de la Península Ibérica (P.I).

El entorno limnológico de la cuenca del río Segura (sureste de la P. I.) reúne características de un clima semiárido, con marcados extremos climatológicos en un ciclo anual (Belmar *et al*., 2013).

En el tramo superior de este río se ha encontrado un representante de la familia Hydryphantidae del género *Panisus*. La peculiaridad de sus placas dorsales y ventrales, entre otros caracteres, lo singularizan como una nueva especie. Por otro lado, la secuencia de su ADN *barcode* (Hebert *et al*., 2003), lo incluye dentro del conjunto de los *Panisus* europeos, pero su distancia genética confirma su naturaleza de nueva especie.

Material y métodos

Método de muestreo

Muestra tomada con una red circular de 30 cm de diámetro y 250 µm de luz de malla. En la zona de muestreo el arroyo era somero y tenía un fondo piedra, grava y limo (Fig. 1 muestra un aspecto del hábitat). En la zona de muestreo se midieron las siguientes variables pH, conductividad y temperatura del agua. La muestra obtenida se preservó a 4 °C en alcohol etílico 100 %, para su posterior estudio morfológico y molecular.

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación.

El aislamiento del ADN total se realizó con una sola muestra, empleando un método de extracción de ADN no destructivo según se describe en (Pesic *et al*., 2012). El método de extracción se realizó utilizando el kit de extracción de ADN, Qiagen BioSprint 15 DNA Blood Kit (Qiagen Iberia S.L., Madrid, Spain) según protocolo de tejidos. Al finalizar la etapa de digestión de la muestra, se recuperó el exoesqueleto del ejemplar, el cual constituye el holotipo de la nueva especie. La conservación del exoesqueleto como voucher morfológico se realizó en glicerina hasta la realización de una preparación permanente mediante un procedimiento estándar (Valdecasas, 2008). El voucher del holotipo se ha depositado en la colección de Hydrachnidia del Museo Nacional de Ciencias Naturales (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) con número de catálogo MNCN 20.02/19901.

Como marcador filogenético, se empleó el gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad 1 (COI). Mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificó un fragmento de 658 pares de bases del COI utilizando la pareja de cebadores LCO1490 y HCO2198 (Folmer *et al*., 1994). La PCR se realizó en un volumen de 25 µl con 1X de tampón de reacción (MyTaq™, Bioline), 0.5 µM de cada de uno de los cebadores y 1 U de la ADN polimerasa MyTaq™ (Bioline) empleando como ADN molde 2 µl de la extracción de ADN. Las condiciones del ciclo de la PCR fueron, una etapa de desnaturalización inicial a 95 ºC durante 1 minuto, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 ºC durante 30 segundos, hibridación a 45 ºC durante 30 segundos y una extensión a 72 ºC; seguida de una extensión final

de 72 ºC, durante 10 minutos. El amplicón resultante de la PCR se comprobó en un gel de agarosa al 2 %, purificándose con ExoSAP-IT (Thermofisher Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante. La reacción de secuenciación se llevó a cabo mediante la tecnología BigDye v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) procesándose en un ABI 3100 Genetic Analyzer (Secugen, Madrid). Los cromatogramas asociados a la secuencia se visualizaron y editaron con el programa Sequencher version 5.0 (Gene Codes Corporation, USA). La secuencia se verificó con la base de datos de GenBank (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) utilizando el 'software' en línea Nucleotide Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). La secuencia de ADN obtenida se depositó en la base de datos GenBank ('accession number' OL806731). La secuencia nucleotídica obtenida del COI, conjuntamente con las secuencias descargadas de GenBank para la familia Hydryphantidae, fueron alineadas empleando la metodología "multiple sequence comparison by log expectation" (Edgar 2004) implementada en el programa AliView (Larsson, 2014) con parámetros por defecto.

Análisis de datos moleculares

El análisis de reconstrucción filogenética para examinar las relaciones evolutivas se llevó a cabo mediante los métodos de máxima verosimilitud (ML) y vecino más cercano ('neighbor-joining', NJ) implementados en MEGA X (Kumar *et al*., 2018). Solo las muestras del alineamiento múltiple con un haplotipo único se incluyeron en el análisis. La selección del mejor modelo de sustitución de nucleótidos se realizó con el programa jModeltest (Posada, 2008). El análisis de máxima verosimilitud (ML) y vecino más cercano (NJ) se realizó considerando el modelo GTR+G+I, con un bootstrap de 500 réplicas implementados en el programa MEGA X (Kumar *et al*., 2018). La visualización y edición de los árboles filogenéticos se realizó mediante FigTree v.1.4.2 (Rambaut, 2014) (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

Las distancias genéticas entre las secuencias se calcularon utilizando el modelo de sustitución nucleotídica Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993), con una tasa uniforme de sustitución entre sitios para todas las posiciones usando el programa MEGA X (Kumar *et al*., 2018).

Tratamiento de imagen

Las imágenes han sido adquiridas con un microscopio confocal Leica SPE, a 10x, 20x y 40x seco, excitadas con un láser a 488 nm y recogida en la franja de los 546 – 670 nm. Las pilas de imágenes han sido procesadas con Amira ver 5.4.3 y Fiji/ImageJ ver 1.53f (ver Valdecasas, 2008 para más detalle sobre la metodología con este microscopio). Las imágenes en ultravioleta (UV) han sido obtenidas con el equipo descrito en Valdecasas (2021), consistente en una cámara Sony a7RIII con una lente zoom de 70 – 200 mm f2.8 y un objetivo Mitutoyo de 10x con 0,28 de Apertura Numérica (AN). La cámara y lentes estaban sobre un rail automático Wemacro, con tomas de imágenes, en este caso, espaciadas 4 µm. La secuencia de imágenes ha sido tratada con Helicon Focus ver. 7.7.5 Pro. La presentación final de las imágenes de ambos procedimientos ha sido mejorada con Photoshop ver. CS5 Extended, para realzar su visibilidad en pantalla e impreso.

La descripción morfológica es posterior a la etapa de digestión durante el procedimiento de extracción de ADN. Se incluyen las imágenes del idiosoma tanto dorsal como ventral obtenidas por microscopía confocal y con la luz UV. Dada la menor penetración de la luz UV ha sido posible, en este caso, obtener una mejor representación de la textura del idiosoma. El resto de estructuras han sido adquiridas con el microscopio confocal.

Para la terminología general, así como para la referente a las placas dorsales de la familia Hydryphantidae seguimos a Cook (1974: págs. 478 – 479). Las medidas se dan en µm.

Resultados

Familia: **Hydryphantidae**

Subfamilia: **Euthyadinae**

Género: ***Panisus***

Ver Smit (2020) para una diagnosis reciente del género.

***Panisus chicamoi* sp. nov.**

MATERIAL EXAMINADO. Holotipo: Hembra adulta colectada en el río Chícamo, La Umbría, municipio de Abanilla, Murcia (38.245620, -1.007237; 306m.s.n.m.), el 14-03-2019. Número en la colección de Hydrachnidia del Museo Nacional de Ciencias Naturales: MNCN 20.02/19901. En la zona de muestreo se obtuvieron los resultados de las siguientes variables: pH = 7,4; conductividad = 3,45 mS; temperatura del agua: 20,1 ºC. La Fig. 1 muestra un aspecto del hábitat.

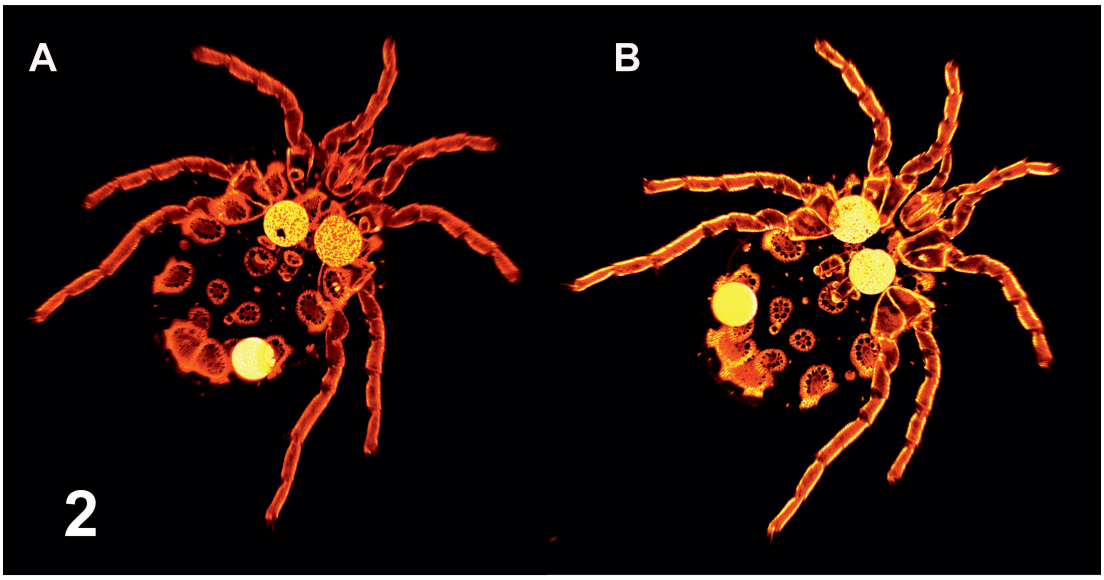
CARACTERES DIAGNÓSTICOS.

Estructura indentada de la placa dorsal anterior. Anchura uniforme de las placas acetabulares. Cutícula de las placas con 'porosidad' fina en el centro, muy grande rodeándolas y más finas en la periferia.

DESCRIPCIÓN. Hembra.

Color del cuerpo rojo. Longitud aproximada del cuerpo, 1101; anchura a la altura del IV par de patas 611. La estructura del dorso sigue el plan general del género, tal y como lo delimita Cook (1974) (Fig. 2 A y 3 A). Placa dorsal anterior indentada, ojo medio no detectable y postocularia localizada lateralmente en esta placa: longitud 214; anchura aproximada 230 (Fig. 4). Ojos laterales encapsulados. Dorsocentralias redondeados y el 5to par soldado, como es característico del género *Panisus*. Dorsolateralias redondeados con extensiones irregulares hacia la periferia exterior. El patrón de la escultura en las placas dorsales y ventrales es el mismo: 'poros' relativamente finos en el interior, rodeadas por un círculo de 'poros' grandes, seguidos de poros más pequeños hacia la periferia (Fig. 5). Las coxas ocupan la mitad de la cara ventral aproximadamente (Fig. 2 B y 3 B). El área genital está situada entre la 3^{era} y 4ta coxas. Solapas genitales de anchura constante; longitud/anchura: 130/46. Los acetábulas son esféricos, estando el segundo par cercano al tercero. Diámetro acetábulas: 27 – 37. Una seda en la parte anterior de las placas acetabulares, cerca del último tercio del primer par de acetábulas y una fila de sedas en el margen interior de las solapas acetabulares (Fig. 6). Longitud/máxima anchura capitulum: 175/136. Poro excretor rodeado de un anillo esclerotizado. Palpo típico del género *Panisus*, con una seda dorsal en P-I, 5 sedas en P-II, y 1 seda en P-III (ver, por ejemplo, Laska, 1957; Tuzovsky, 1994). Otras sedas menores quedan caracterizadas en la Fig. 7. Longitud dorsal de los segmentos del palpo: P-I: 35; P-II: 72; P-III: 42; P-IV: 107; P-V: 40. Quelíceros (Fig. 8), longitud de la base: 170; de la quela: 51. Patas sin sedas nadadoras, con seda cortas y gruesas como se ilustra en la Figs. 9 y 10. Longitud de los 4 últimos segmentos de las patas:





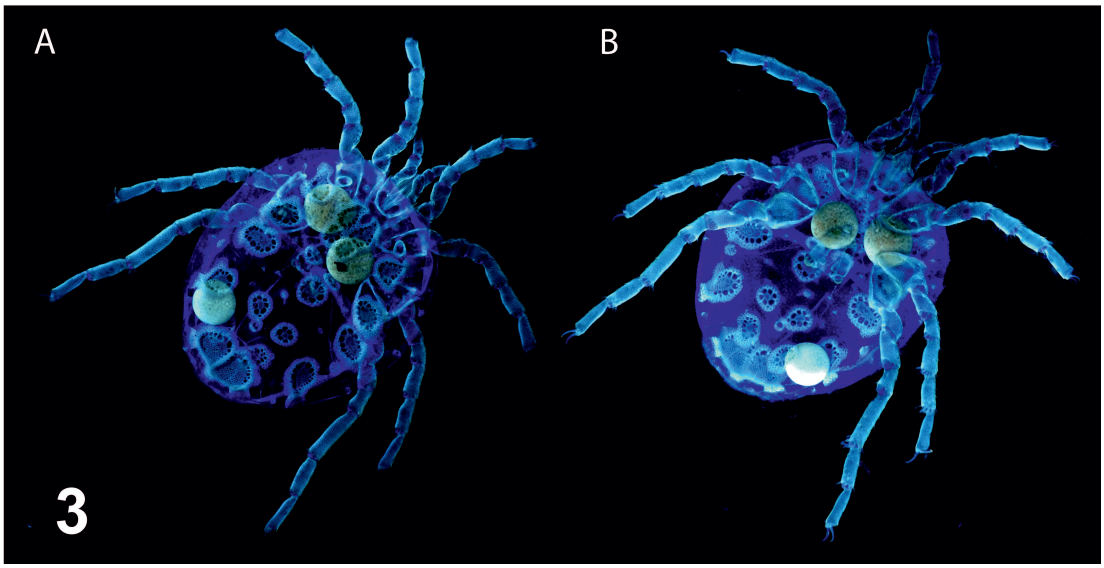


Fig. 1. Río Chícamo, La Umbría, Murcia. Hábitat donde se encontró *Panisus chicamoi* sp. nov. **Fig. 2.** *Panisus chicamoi* sp. nov. **A**) Visión dorsal. **B**) Visión ventral. Microscopio confocal. **Fig. 3.** *Panisus chicamoi* sp. nov. **A**) Visión dorsal. **B**) Visión ventral. Adquisición UV.

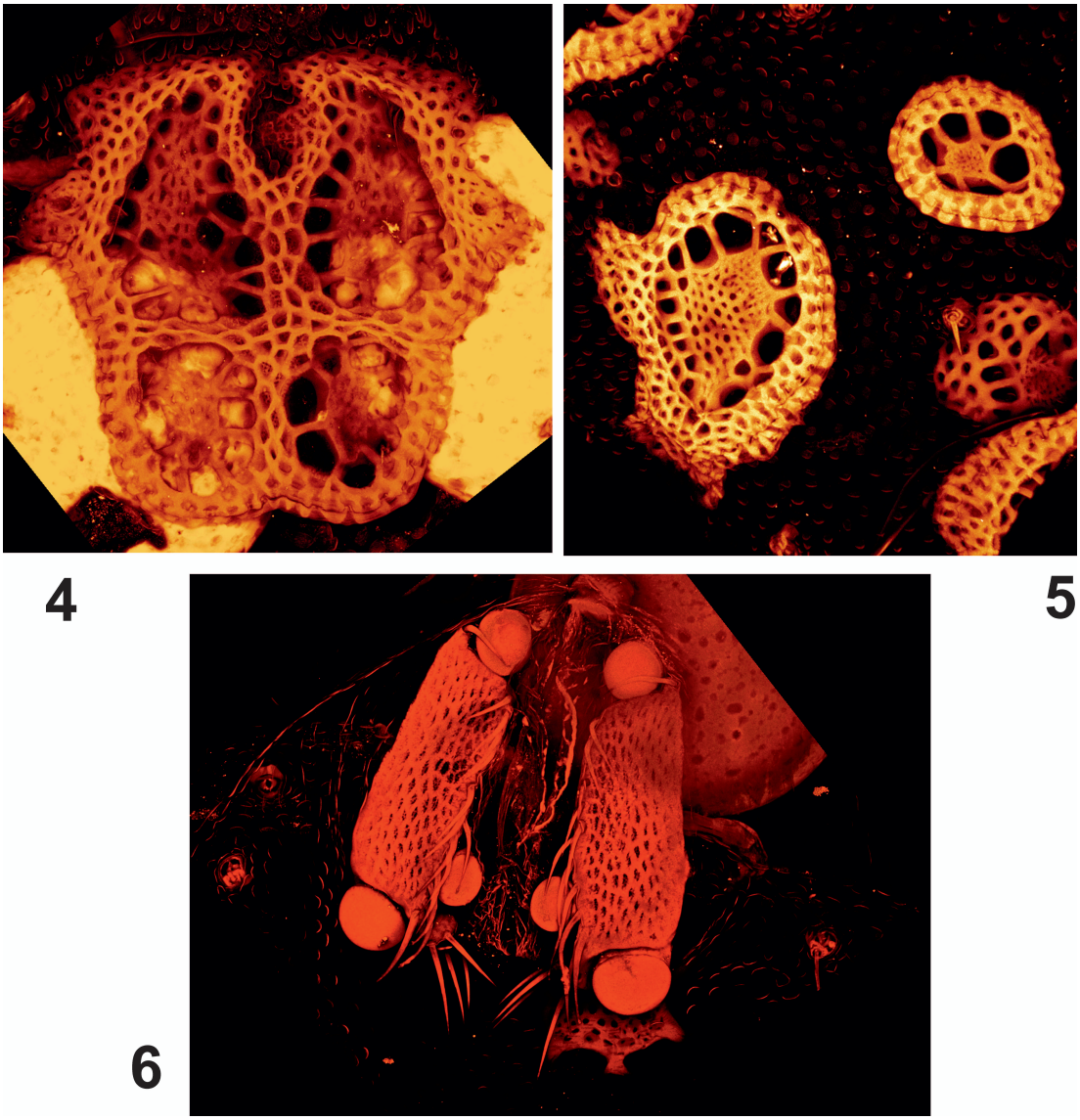


Fig. 4-6. *Panisus chicamoi* sp. nov. **4.** Placa dorsal anterior. Microscopio confocal. **5.** Dorsocentralia y dorsolateralia 4ta. Microscopio confocal. **6.** Solapas genitales. Microscopio confocal.

I-Leg: 70, 85, 101, 106; II-Leg: 80, 112, 113, 126; III-Leg: 81, 126, 124, 148; IV-Leg: 107, 223, 142, 147. La hembra tenía tres huevos en su interior. Diámetro de los huevos, 163 - 189.

ETIMOLOGÍA. El nombre de la especie hace referencia al río donde se ha encontrado, un medio acuático con una ecología singular.

EXTRACCIÓN DE ADN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN. La amplificación por PCR del único ejemplar de *P. chicamoi* sp. nov. fue positiva para el gen COI, obteniéndose una secuencia de 658 pares de bases, tras la eliminación de las secuencias de los cebadores de sus extremos, mediante el programa Sequencher version 5.0 (Gene Codes Corporation, USA). El alineamiento final fue de 597 pares de bases. *Hydrachna conjecta* (número acceso GenBank JN018103.1), se utilizó como grupo externo para posteriores análisis moleculares.

La verificación de la secuencia mediante el software en línea Nucleotide Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) con la base de datos de GenBank (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) obtuvo un porcentaje de identidad compatible con su pertenencia al género *Panisus*. La secuencia de ADN obtenida se depositó en la base de datos GenBank con el número de acceso (OL806731).

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

La Fig. 11 muestra un árbol basado en ML y la Fig. 12 el equivalente basado en NJ, ambos análisis basados en secuencias públicas para los géneros de la familia Hydryphantidae. La Fig. 13 muestra el detalle del clado correspondiente a las especies de *Panisus*. Los arboles filogenéticos obtenidos mediante máxima verosimilitud (ML) y neighbor-joining (NJ) presentaron una topología similar para el clado del género *Panisus*. En ambos casos, todas las especies de *Panisus* forman un clado monofilético, pero se diferencian claramente en los ejemplares correspondientes a *P. michaelis*, *P. chicamoi* sp. nov. y *P. torrenticolous*.

La distancia genética interespecífica osciló en el intervalo de 0.18–0.21, con una media de 0.19. La distancia genética entre *P. michaeli* y *P. torrenticolus* fue de 0.21, entre *P. michaeli* y *P.chimacoi* sp. nov. de 0.18 y entre *P. chimacoi* sp. nov. y *P. torrenticolus* de 0.21. La distancia genética intraespecífica solo se pudo determinar para *P. michaeli* siendo de 0 (un único haplotipo).

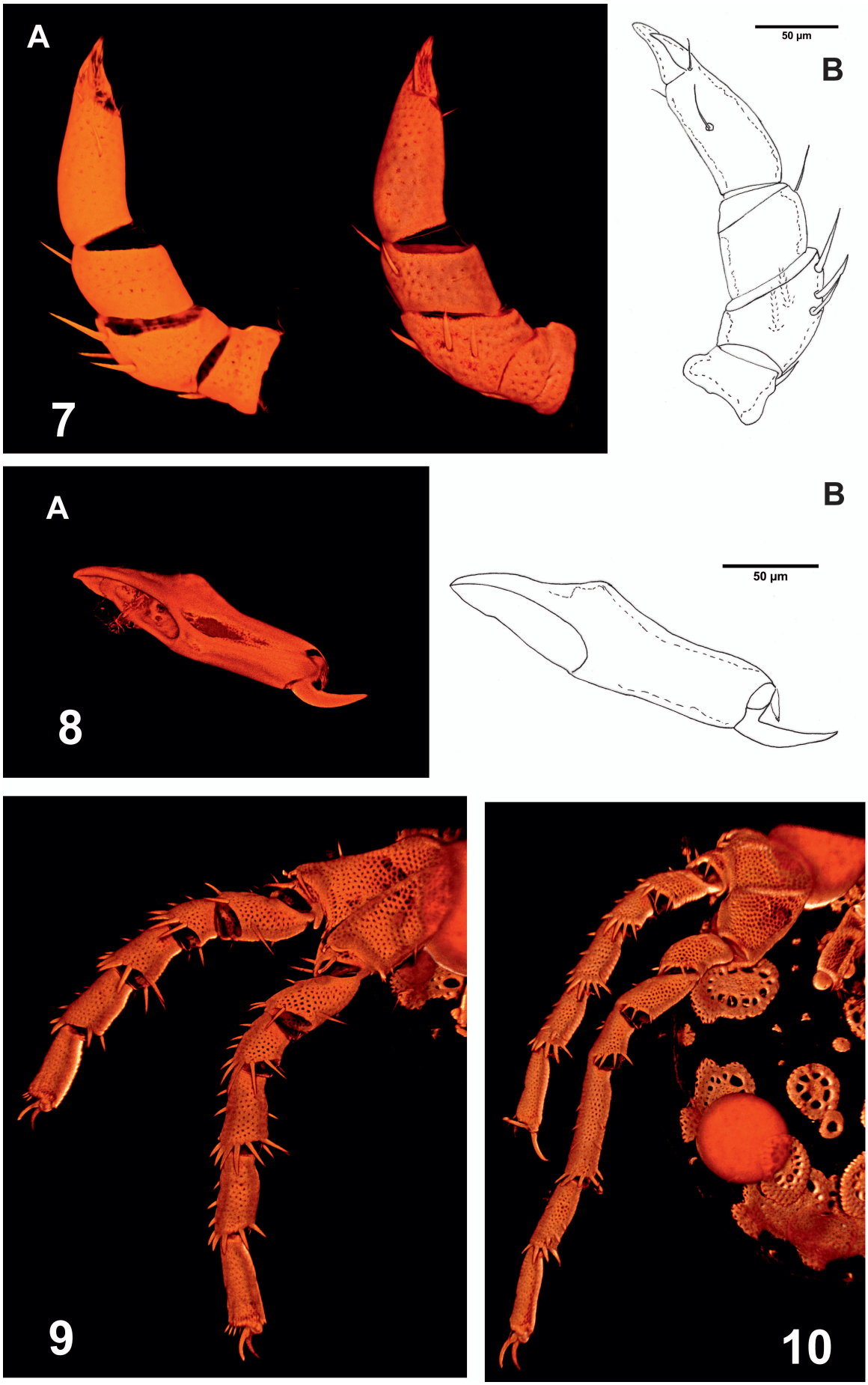


Fig. 7-10. *Panisus chicamoi* sp. nov. **7.** Palpo. **A**) Microscopio confocal. **B**) Dibujo con cámara clara. **8.** Quelícero. **A**) Microscopio confocal. **B**) Dibujo con cámara clara. **9.** I-Leg y II-Leg. Microscopio confocal. **10.** III-Leg y IV-Leg. Microscopio confocal.

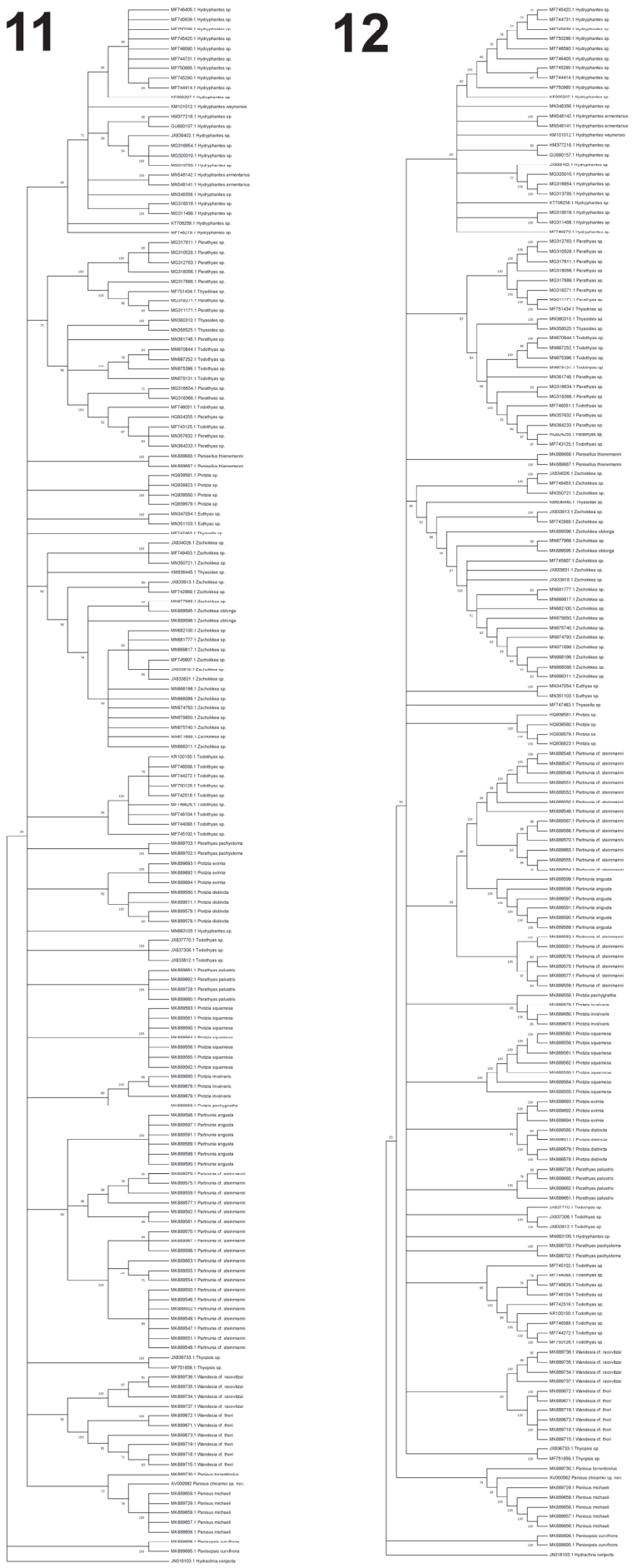


Fig. 11-12. Árbol filogenético generado usando el método: **11.** máxima verosimilitud (ML) con valores de bootstrap, a partir de secuencias COI para especies de la F. Hydryphantidae. **12.** neighbour-joining (NJ) con valores de bootstrap, a partir de secuencias COI para especies de la F. Hydryphantidae.

Discusión

Según Di Sabatino *et al*. (2010) hay tres especies de *Panisus* en la fauna europea, *P. michaeli* Koenike, 1896, *P. torrenticolus* Piersig, 1898 y *P. lundbladi* Bader, 1981. Esta última basada en un ejemplar recogido por Lundblad en España en un acueducto en Ribas (Girona) y que el mismo Lundblad había identificado como una hembra de *P. michaeli*. La estructura indentada de la placa dorsal anterior permite distinguir a *P. chimacoi* sp. nov. fácilmente de las otras tres especies, aun teniendo en cuenta que, según los autores mencionados, *P. lundbladi*, cercana a *P. michaeli*, no está bien delimitada y pudiera entrar en el rango de variación de *P. michaeli*. La reticulación de las placas dorsales y ventrales, con un patrón de dentro a fuera de retículos pequeños, grandes y pequeños es peculiar de *P. chicamoi* sp. nov. exclusivamente. Tuzovskiy (1994) describió *Panisus major* de la provincia de Kemerovo (Rusia). El rango de tamaño de las hembras duplica al único ejemplar de *P. chicamoi* sp. nov., y tiene una estructura de los así denominados 'poros cuticulares' muy diferentes a esta última especie.

Por otro lado, los análisis filogenéticos basados en NJ y ML delimitan un clado monofilético en las tres especies de *Panisus* de las que se han podido obtener datos moleculares. El porcentaje de similitud entre *P. chicamoi* sp. nov. con *P. michaeli* y *P. torrenticolus* permiten confirmar que el organismo encontrado en el río Chícamo merece la distinción de especie.

Finalmente, se confirma que, en determinadas circunstancias, como con vouchers fluorescentes a la luz ultravioleta que han sido sometidos a un procedimiento de extracción de ADN no destructivo, su visualización puede ser equivalente o superior a la de microscopía confocal, para caracterizar la textura de su cutícula (Valdecasas, 2021).

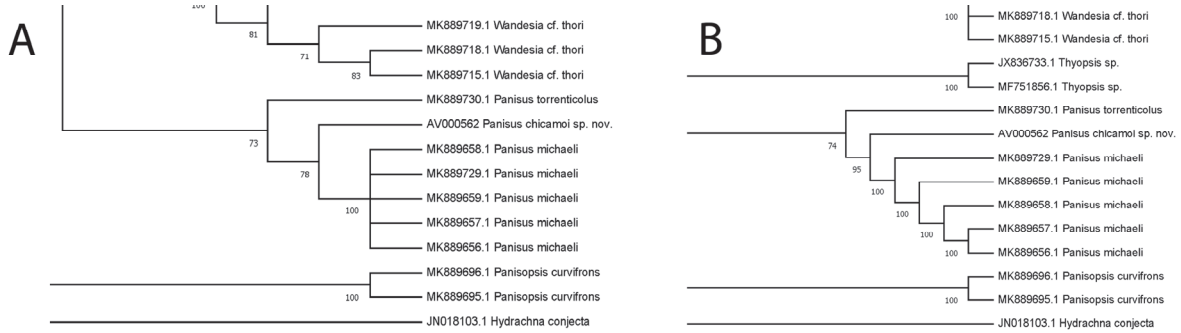


Fig 13. Detalle árboles filogenéticos de los géneros de F. Hydryphantidae basados en **A**) ML y **B**) NJ, con valores de bootstrap, a partir de secuencias COI. Sólo se muestra la parte correspondiente al clado *Panisus* y taxones hermanos adyacentes.

Agradecimiento

Petr Tuzovskiy por su amabilidad en el envío de una copia de su publicación de 1994 sobre *Panisus* y Miguel Ángel Alonso Zarazaga por su inestimable ayuda con cuestiones nomenclaturales. AGV agradece el apoyo a su investigación de su hermano Guillermo G. Valdecasas.

Referencias

BELMAR, O., D. BRUNO, F. MARTÍNEZ-CAPEL, J. BARQUÍN & J. VELASCO 2013. Effects of flow regime alteration on fluvial habitats and riparian quality in a semiarid Mediterranean region. *Ecological Indicators*, **30**: 52- 64.

COOK, D. R. 1974. Water mite genera and subgenera. *Mem. Amer. Ent. Inst.*, **21**: VII+1–860.

DI SABATINO, A., R. GERECKE, T. GLEDHILL & H. SMIT 2010 Chelicerata: Acari II. In: Gerecke, R. (Ed.), *Süßwasserfauna von Mitteleuropa*. Vol. 7. Elsevier GmbH, Spektrum

EDGAR, R.C. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5, 113. https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113

FOLMER, O., M. BLACK, W. HOEH, R. LUTZ & R. VRIJENHOEK 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.,* **3**(5): 294-299.

HEBERT, P.D., A. CYWINSKA, S.L. BALL & J.R. DEWAARD 2003 Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci.,* **270**(1512): 313-321. doi: 10.1098/rspb.2002.2218.

KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal Molecular Evolution*, **16**: 111-120.

KUMAR, S., G. STECHER, M. LI, C. KNYAZ & K. TAMURA 2018 MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution,* **35**: 1547-1549.

LARSSON, A. 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics,* **30**(22): 3276-3278. http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531

LÁSKA, F. 1957 Studie o torentikolních vodulích (Hydrachnellae, Acari) Rychlebských hor (Slezsko). *Prace Brnenske Zakladny* CSAV, **29**(7): 325-351.

PEŠIĆ, V., A. G. VALDECASAS, & R. GARCĬA-JIMENEZ 2012. Simultaneous evidence for a new species of *Torrenticola* Piersig, 1896 (Acari, Hydrachnidia) from Montenegro. *Zootaxa,* **3515**: 38-50.

POSADA, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.,* **25**(7):1253-6. doi: 10.1093/molbev/msn083.

RAMBAUT, A. 2014. FigTree v1.4.2. (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

SMIT, H. 2020. Water mites of the world, with keys to the families, subfamilies, genera and subgenera (Acari: Hydrachnidia). *Monogr. Nederl. Entomol. Ver.*, **12**: 1-774.

TAMURA, K. & M. NEI 1993 Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.,* **10**(3): 512-26. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023.

TUZOVSKIJ, P. 1994. Description of a new species of the genus *Panisus* (Thyasidae, Acariformes). *Zoologischeskiy Zhurnal,* **73**(11): 138-142.

VALDECASAS, A. G. 2008. Confocal microscopy applied to water mite taxonomy with the description of a new genus of Axonopsinae (Acari, Parasitengona, Hydrachnidia) from Central America. *Zootaxa*, **1820**: 41-48.

VALDECASAS, A. G. 2021 Extended depth of focus ultraviolet imaging compared with laser scanning confocal microscopy for the study of micro-Arthropoda surface texture, with the description of a new species of *Brachypodopsis* (Acari: Hydrachnidia). *Microscopy Research and Technique*: 1–6. https://doi.org/10.1002/jemt.23929