



Facultad de Ciencias/11-12

Máster en Biodiversidad



UNIVERSIDAD AUTONOMA











Valoración de la biodiversidad actual de la familia Cephalotrichidae (Nemertea: Palaeonemertea) en la península Ibérica Fernando Ángel Fernández Álvarez

Valoración de la biodiversidad actual de la familia Cephalotrichidae (Nemertea: Palaeonemertea) en la península Ibérica

Assessment of the current biodiversity of the family Cephalotrichidae (Nemertea: Palaeonemertea) in the Iberian Peninsula

Fernando Ángel Fernández Álvarez

Museo Nacional de Ciencias Naturales, C.S.I.C., c/ José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid, España.

Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Máster en Biodiversidad (Itinerario de Diversidad Animal).

f.a.fernandez.alvarez@gmail.com





Annie Machordom (directora)

Fernando Ángel Fernández Álvarez

Kanange

Índice

Resumen	1
Abstract	1
Introducción	2
La Familia Cephalotrichidae McIntosh, 1873-1874	3
Los códigos de barras como herramienta de aproximación a la biodiversidad real	4
Objetivos	6
Material y métodos	6
Muestreo	6
Estudio de la morfología externa y la anatomía	8
Extracción de ADN, amplificación y secuenciación	8
Análisis filogenéticos	9
Resultados	10
Datos morfológicos	10
Datos moleculares	13
Relaciones filogenéticas	14
Discusión	19
Nuevas citas para el área de estudio y reflexiones acerca de su posición filogenética	19
La invasión oriental	20
Deshaciendo un nudo gordiano: los nemertinos de Iwata	22
Futuras buenas prácticas en el uso de <i>DNA barcoding</i> con nemertinos: Cephalotrichidae como un grupo "bien conocido" molecularmente.	23
Consideraciones finales	25
Agradecimientos	25
Referencias bibliográficas	26

Resumen

La dificultad en la recolección, procesado e identificación de nemertinos (principalmente basada en métodos histológicos) ha derivado en una clara subestimación de su biodiversidad. Dentro del filo, Palaeonemertea suele carecer de caracteres morfológicos externos, de modo que un análisis de la anatomía suele ser imprescindible. La identificación de uno de estos grupos –Cephalotrichidae, familia monotípica integrada por 36 especies del género *Cephalothrix*– se basa en caracteres muy sutiles y de difícil interpretación, siendo la bibliografía previa bastante confusa en numerosas descripciones. Pese a ello, se trata del género más representado en las bases de datos para citocromo oxidasa I, por lo que la técnica del *DNA barcoding* pueden ser empleada en la evaluación de la biodiversidad del género para un área geográfica concreta, como la península Ibérica.

En el presente trabajo se han realizado estudios moleculares y morfológicos sobre ejemplares de 4 especies de la península Ibérica. *Cephalothrix filiformis* no coincide con ninguna de las secuencias asignadas para la especie en otros estudios moleculares, pese a que la identificación morfológica del material ibérico sea correcta. Por esta razón, las secuencias aquí presentadas son propuestas como los *barcodes* adecuados para la especie. *Cephalothrix* sp. A es la especie hermana de *C. rufifrons*, aunque estudios anatómicos deben ser llevados a cabo para determinar su estatus taxonómico. *Cephalothrix* sp. B podría constituir una especie nueva para la ciencia con una distribución anfiatlántica, aunque estudios histológicos deben llevarse a cabo para realizar una descripción formal. Por último, los ejemplares de una de las especies han sido identificados morfológica y molecularmente como *C. fasciculus*, una especie del Pacífico norte, constituyendo el primer registro de una invasión biológica por parte de un nemertino marino. Todos estos datos confirman que el *DNA barcoding* es una técnica apropiada para una primera aproximación a la diversidad real de un grupo taxonómico para una determinada área geográfica.

A pesar de que es el grupo mejor estudiado molecularmente, el 80% de las especies secuenciadas corresponden con especies no descritas o están mal determinadas. Por esa razón, se recomienda una serie de procedimientos para el estudio de la diversidad del género basado en caracteres morfológicos y moleculares.

Abstract

The difficulty in the sampling, processing and identification (mainly based on histological methods) of nemerteans has derived in a clear underestimation of their biodiversity. Within the phylum, Palaeonemertea often lacks of external morphological discriminant characters, so that an anatomical analysis is usually essential. Identification of one of these groups –Cephalotrichidae, monotypic family integrated by 36 species of the genus *Cephalothrix*– is based in very subtle and of hard interpretation characters. The previous bibliography is confusing in several descriptions. Nevertheless, this genus is the best represented in the cytochrome oxidase I databases, and thus DNA barcoding studies can be used in assessing its biodiversity in a determinate geographic area, such as the Iberian Peninsula.

In the present work, molecular and morphological studies have being carried out on four Iberian *Cephalothrix* species. *Cephalothrix filiformis* does not match any of the sequences assigned to this species in the previous literature, but morphological identification of the Iberian material is correct. For this reason, the sequences of the present work are considered the correct barcodes for this species. *Cephalothrix* sp. A is the sister species of *C. rufifrons*, although histological studies must be carried out for determining its taxonomic status. *Cephalothrix* sp. B may constitute a new species with an amphiatlantic distribution, although histological studies are needed for its formal description. Finally, the specimens of one of the species have been morphologically and molecularly identified as *C. fasciculus*, a Northern Pacific species, constituting the first record of a biological invasion by a marine nemertean species. All these data confirm that DNA barcoding is an appropriate method for a first approximation to the real biodiversity of a taxonomic group for a given geographic area.

Although it is the best molecular studied group, 80% of the sequenced species correspond to undescribed or misidentified species. For this reason, a series of recommendations is proposed for the study of the biodiversity of this genus based on morphological and molecular features.

Introducción

Tradicionalmente, los zoólogos no han prestado demasiada atención al filo Nemertea, razón por la que la diversidad de este grupo taxonómico es bastante poco conocida y está bastante subestimada. Las dificultades de su muestreo, conservación e identificación a nivel específico son las principales razones de esta laguna de conocimiento. Es relativamente frecuente encontrar nemertinos en listados faunísticos como <<Nemertea sp.>> y otras categorías ambiguas. Las técnicas de fijado convencionales de muestras marinas no son apropiadas para estos organismos, que requieren de una narcotización previa y el fijado en líquidos especiales para la preservación de sus tejidos. Si no hay un nemertinólogo en la expedición, lo más probable es que estos organismos no se analicen.

A pesar de ello, varios estudios sobre nemertinos litorales y estuarinos han sido llevados a cabo en las costas ibéricas por Anadón (1980, 1981, 1986-87), Vernet & Anadón (1991), Junoy & Gibson (1992), Junoy (1998), García-Pérez & Anadón (2004) y Junoy & Herrera-Bachiller (2009), incluyendo la descripción de algunas especies (Gibson & Junoy, 1991; Junoy & Gibson, 1991; Rogers *et al.*, 1993; Junoy *et al.*, 2010). Otros autores interesados en distintas cuestiones registraron algunas especies de nemertinos (Polo *et al.*, 1982; Saiz Salinas, 1987), incrementando significativamente el conocimiento de este grupo de organismos en esta área geográfica. Sin embargo, la biodiversidad de nemertinos en la península Ibérica sigue siendo poco conocida si la comparamos con otras regiones, como la de Reino Unido. Se conocen más de 80 especies de nemertinos británicos (Gibson, 1994), mientras que el número de especies ibéricas registradas hasta el momento es de 54 (Fernández-Álvarez & Junoy, listado no publicado), aunque la península Ibérica confluyen tres regiones biogeográficas, por lo que el número real de especies posiblemente sea muy superior.

Las identificaciones y clasificaciones tradicionales de nemertinos se basan en criterios morfológicos (por ejemplo: Fernández & Anadón, 2009; Fernández-Álvarez & Anadón, 2012a y 2012b). El relativamente bajo número de caracteres cuantitativos y la ausencia de sinapomorfías a nivel genérico y específico hacen las delimitaciones específicas muy problemáticas, especialmente cuando el taxón analizado se compara con especies próximas (Strand & Sundberg, 2005). Por si fuese poco, hasta hace poco no existían criterios homogéneos para evaluar los caracteres morfológicos de forma objetiva (Sundberg *et al.*, 2009), siendo muchas descripciones ambiguas, poco informativas e inválidas para estudios en sistemática. Un ejemplo de una descripción escasamente informativa es la de *Tubulanus mawsoni* (Wheeler, 1940), que no incluyó datos acerca de la probóscide, siendo éste un órgano de vital importancia en la taxonomía de nemertinos. Por estas razones, el uso de técnicas moleculares es de especial interés para

complementar, completar o contrastar la identificación de especies, la delimitación de las mismas y la detección de especies crípticas. Después de la confección de una buena base de datos, con identificaciones morfológicas contrastadas molecularmente, los marcadores moleculares podrían incluso llegar a apoyar estudios de no especialistas o confirmar asignaciones en caso de duda, utilizándose como única herramienta.

La Familia Cephalotrichidae McIntosh, 1873-1874

La clasificación actual de los nemertinos reconoce dos clases: Anopla y Enopla. La primera de ellas se divide en los órdenes Palaeonemertea y Heteronemertea, estando los Enopla constituidos por los órdenes Hoplonemertea y Bdellonemertea. La categoría taxonómica de estos grupos ha cambiado a lo largo del tiempo (ver en Andrade *et al.*, 2012), siendo la composición taxonómica de los paleonemertinos la más controvertida. Iwata (1960) propuso el orden Archinemertea para acomodar a Cephalotrichidae, la familia objeto de este estudio, previamente considerada dentro de los paleonemertinos. Trabajos posteriores han demostrado que esta clasificación sería parafilética (Sundberg & Hylbom, 1994; Thollesson & Norenburg, 2003), por lo que actualmente sigue considerándose a los cefalotrícidos como miembros del orden Palaeonemertea.

Más de 400 especies de nemertinos se conocen en Europa, de las cuales 52 pertenecen a la clase Palaeonemertea (Norenburg & Gibson, 2012). Por el momento, sólo seis paleonemertinos han sido citados en aguas ibéricas: *Cephalothrix filiformis* (Johnston, 1828), *C. oestrymnica* (Junoy & Gibson, 1991), *C. rufifrons* (Johnston, 1837), *Tubulanus annulatus* (Montagu, 1804), *T. banyulensis* (Joubin, 1890) y *T. superbus* (Kölliker, 1845).

La dificultad de identificación de los integrantes de la familia Cephalotrichidae radica, fundamentalmente, en que son animales con un limitadísimo número de caracteres morfológicos y las características que distinguen a las especies son muy sutiles (Chen *et al.*, 2010) y difíciles de describir sin ambigüedades (por ejemplo: Gibson, 1990; Gibson *et al.*, 1990; Junoy & Gibson, 1991), llegando a ocasionar problemas taxonómicos de difícil solución (Iwata, 1952, 1954; Kajihara, 2007). Como Kajihara (2007) comenta, las dos descripciones de *C. simula* (Iwata, 1952) de sendos artículos del mismo autor (Iwata, 1952 & 1954) son contradictorias en algunos de sus caracteres, imposibilitando el uso de estas descripciones en cladística o en la identificación de ejemplares (esta cuestión se abordará en la discusión).

La morfología externa de la mayoría de los cefalotrícidos es extremadamente similar: cuerpo pálido translúcido, blanquecino, amarillento, anaranjado o rojizo, exhibiendo en algunos casos algún tipo de patrón de coloración en la parte anterior. En ocasiones, incluso se ha utilizado la forma de contracción del cuerpo como un criterio taxonómico (Gibson, 1994). Actualmente, se conocen 36 especies de cefalotrícidos, agrupadas en un único género de distribución mundial (Gibson, 2011). De esas 36 especies, se tiene constancia de la presencia de tres en la península Ibérica (Tabla 1).

Tabla 1. Especies del género *Cephalothrix* citadas hasta el momento en la península Ibérica.**Table 1.** Species of the genus *Cephalothrix* currently found in the Iberian Peninsula.

Especie	Localidad	Referencia
C. filiformis (Johnston, 1828)	Playa de Patos, Vigo, Galicia.	Vernet & Anadón, 1991.
	Playa de Aramar, Luanco,	
	Asturias.	
	Cerca de la desembocadura del	
	río Piles, Gijón, Asturias.	
	Estuario de Villaviciosa,	
	Asturias.	
C. oestrymnica (Junoy &	Parque Nacional Marítimo –	Junoy & Gibson, 1991; Junoy &
Gibson, 1991)	Terrestre de las Islas Atlánticas	Herrera-Bachiller, 2009.
	de Galicia	
C. rufifrons (Johnston, 1837)	Playa de Los Fleitales, Vigo,	Vernet & Anadón, 1991;
	Galicia.	
	Parque Nacional Marítimo –	Junoy & Herrera-Bachiller,
	Terrestre de las Islas Atlánticas,	2009.
	Galicia	

Como ya se ha comentado, la influencia de tres regiones biogeográficas marinas en la península Ibérica, con distintos patrones hidrodinámicos, paramétros medioambientales e historia evolutiva hace pensar en la posibilidad de que el número de especies de nemertinos en la península Ibérica esté subestimado. Por si fuera poco, la enorme complejidad de los caracteres empleados en la delimitación de especies del género *Cephalothrix* (la longitud del rincocele, la forma y naturaleza de las glándulas cefálicas y detalles finos de la musculatura), así como los errores en identificaciones en buena parte de la bibliografía previa y la ambigüedad de ciertas descripciones, podría indicar la presencia de numerosas especies crípticas bajo el nombre de un único taxón.

Los códigos de barras como herramienta de aproximación a la biodiversidad real

El *DNA barcoding* (código de barras genético, en castellano) es una técnica utilizada para asignar a cada especie una determinada secuencia corta de ADN, su *barcode* (código de barras, en castellano). El principal cometido de esta técnica es su utilización en la identificación de ejemplares dentro de una clasificación ya conocida. Además, a través de este tipo de análisis o identificación, pueden llegarse a descubrir nuevos taxones y/o diversidad críptica, cuando los caracteres moleculares permiten establecer una divergencia entre dos organismos que no son distinguibles morfológicamente, o cuyas diferencias morfológicas son tan sutiles que han pasado desapercibidas.

En principio, el uso de ciertas secuencias de ADN en la identificación y descubrimiento de nuevos taxones no debería remplazar a la taxonomía tradicional, basada en caracteres morfológicos (como pretenden hacer ciertos autores en la taxonomía de nemertinos, ver, por ejemplo, Strand & Sundberg [2010] y Sundberg & Strand [2010]). Por otro lado, el uso del marcador genético puede estimular el estudio de la biodiversidad y ecología de

especies difíciles de determinar morfológicamente o con ciclos de vida complejos, en los que media una larva cuya morfología no se conoce o es indistinguible de otras larvas de especies próximas.

Un punto clave en el uso de esta técnica es la selección de un marcador apropiado que pueda utilizarse en todas las especies, que sea amplificable sin tener que recurrir al uso de *primers* (cebadores) específicos, lo suficientemente corto como para ser secuenciado fácilmente y con el suficiente poder resolutivo para discriminar entre especies. Debido a su alta variabilidad, el ADN de los orgánulos celulares es el más claro partidario para ser utilizado en estudios de este tipo. En animales ha sido seleccionado un fragmento del gen de la citocromo oxidasa I (COI), de 658 pares de bases, para ser usado como *barcode* (Hebert *et al.*, 2003). Entre sus características destaca que tiene una gran variabilidad entre especies, pero relativamente baja a nivel intraespecífico. Este fragmento está localizado en el extremo 5' del gen y está flanqueado por regiones muy conservadas, donde hibridan los *primers* "universales".

El alto grado de especialización necesario para trabajar con nemertinos hace interesante la generación de amplias bases de datos para la determinación correcta de ejemplares por no expertos. En la actualidad, el único estudio explícito de *DNA barcoding* en este grupo ha sido llevado a cabo por Sundberg *et al.* (2010), sin llegar a ningún tipo de resultado taxonómico concluyente. No obstante, en representantes de todo el filo la técnica del *DNA barcoding* ha demostrado su utilidad para la asignación a nivel específico y genérico (no siempre, pues muchos géneros de nemertinos son claramente para o polifiléticos) de ejemplares previamente identificados a través del habitus (Fernández-Álvarez, datos no publicados).

Chen *et al.* (2010) secuenciaron el gen COI para distintos representantes de *Cephalothrix* repartidos prácticamente por todo el mundo, con el objetivo de evaluar la diversidad del género y la posible existencia de especies crípticas o diversidad no descrita por el momento. Dicho estudio ha convertido a este género de nemertinos en el más representando dentro de las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para dicho *locus*.

En resumen, las características citadas para el género *Cephalothrix* (apariencia externa muy similar, anatomía difícil de describir y comparar, bibliografía previa muy confusa) y la gran cantidad de secuencias candidatas a desempeñar la función de *barcode* en GenBank lo convierten en un género muy apropiado para testar la utilidad de esta técnica en la caracterización de su biodiversidad para una determinada área, como la península Ibérica.

Objetivos

En el presente trabajo se presentan los datos de muestreos efectuados en el mar Cantábrico (norte y noroeste de la península Ibérica) y de una localidad mediterránea con los siguientes objetivos:

- 1. Incrementar el conocimiento sobre la distribución de las especies del género *Cephalothrix* en la península.
- 2. Aportar datos acerca de la biología de los animales, como la morfología externa, el estado gonadal y el hábitat.
- 3. Proporcionar el código de barras genético apropiado a cada una de las especies estudiadas.
- 4. Evaluar la utilidad del empleo de marcadores moleculares en la caracterización de la biodiversidad de nemertinos, para una determinada área geográfica.

Material y métodos

Muestreo

Los nemertinos fueron recogidos en nueve localidades (Fig. 1, Tabla 2), elegidas de forma que representen el mayor número posible de hábitats rocosos litorales. Varios sustratos fueron inspeccionados (gravas, arena, lodo, bajo piedras, entre algas y dentro de fisuras de rocas). El piso del intermareal donde las especies fueron recolectadas se codifica del siguiente modo:

- IS = Intermareal Superior.
- IM= Intermareal Medio.
- II = Intermareal Inferior.



Fig. 1. Localidades de muestreo. Los números están reflejados en la Tabla 2.Fig. 1. Sampling localities. Numbers are explained in Table 2.

Código	Localidad
1	San Vicente do Mar, O Grove, Galicia. 42° 27 N, 8° 55 O.
2	Cabo Vilán, Camariñas, Galicia. 43º 10'N, 9º 10'O.
3	Playa de Lobadiz, Ferrol, Galicia. 43° 30' N, 8° 19' O.
4	Playa de Las Represas, Tapia de Casariego, Asturias. 43° 34' N, 6° 56 O.
5	Playa de Los Chalanos, Muros de Nalón, Asturias. 43º 33'N, 6º 06 O.
6	Playa de Aramar, Luanco, Asturias. 43° 36 N, 5° 46 O.
7	Playa del Castiellu, Pendueles, Asturias. 43° 23' N, 4° 37 O.
8	Playa de Islares, Castro-Urdiales, Cantabria. 43º 24' N, 3º 17 O.
9	Colera, Cap de Creus, Cataluña. 42° 24' N, 3° 09' E.

Tabla 2. Localidades de muestreo.**Table 2.** Sampling localities.

Algunos nemertinos pudieron ser separados a simple vista en el campo. Aquellos que no pudieron serlo durante el muestreo fueron aislados siguiendo el procedimiento de Kirsteuer (1967): el sustrato recolectado se depositó en recipientes altos, de modo que debido al enrarecimiento de oxígeno, los nemertinos abandonan el sedimento y ascienden, pudiendo ser recogidos con una pipeta o una aguja mangada.

Para el estudio de la morfología se contó con un total de 23 individuos, mientras que 39 individuos fueron secuenciados. Para completar el análisis molecular, todos los

haplotipos de COI del género *Cephalothrix* en GenBank fueron descargados e incluidos en el análisis. También se emplearon los haplotipos disponibles para la familia Tubulanidae, utilizada como grupo externo, completando un total de 118 individuos. En los análisis en los que únicamente un taxón podía ser designado como grupo externo, *Carinina ochracea* fue la seleccionada, por ser la que mostró más divergencia con respecto al grupo de estudio. También se contó con la secuencia de "*Cephalothrix* sp. B", procedente de Argentina, amablemente cedida por José Elías Fernández Alfaya.

Todos los individuos disponibles del "clado 11" de Chen *et al.* (2010) fueron empleados en la matriz utilizada en la construcción de las redes de haplotipos.

Todos los especímenes empleados en el análisis aparecen resumidos en la Tabla S1 (ver en material suplementario), junto con sus códigos y los números de acceso de GenBank. Por razones prácticas, la nomenclatura de códigos de laboratorio y clados de cefalotrícidos utilizada por Chen *et al.* (2010) ha sido adoptada aquí, creando 3 nuevas categorías (clados 23, 24 y 25) que no aparece reflejadas en dicho trabajo.

Estudio de la morfología externa y la anatomía

Los ejemplares fueron anestesiados en cloruro magnésico al 7,5% para observar su morfología externa. El color, la forma del cuerpo, el estado de las gónadas y otros caracteres externos fueron anotados, dibujados y fotografiados.

En algunos casos se realizó un examen de la anatomía interna. Para ello, el animal narcotizado se fijó en líquido de Bouin durante 3-6 horas, tras lo cual se transfirió a etanol 70% hasta el momento de su procesado. Se realizaron cortes seriados en parafina de 7 μ m de grosor, que fueron teñidas con el método de la hematoxilina-eosina o el tricrómicro Para-pak [®] (Meridian Biosciences, Inc., Cincinnati, Ohio).

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

El ADN genómico total fue extraído de tejido preservado en etanol absoluto, a partir de un fragmento o del individuo completo, dependiendo de su tamaño, con el kit BioSprint 15 DNA (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante.

Se amplificó un fragmento de 658 pares de bases del *locus* COI, utilizando los *primers* LCO1490 (Folmer *et al.*, 1994) y COI-H (Machordom *et al.*, 2003). Las PCRs (por las siglas inglesas de Polymerase Chain Reaction) consistieron en un periodo de desnaturalización previo de 5 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94° C (45 segundos), una temperatura de anillamiento de 45° C (90 segundos) y una extensión a 72° C (1 minuto), seguidos de una extensión final de 10 minutos. Todas las PCRs se realizaron en un volumen total de 50µl, incluyendo 0,3µl de

polimerasa *Taq* (5U/ μ l, Biotools), 5 μ l de tampón de reacción (Biotools), 0,8 μ l de cada primer (10 μ M), 0,5 μ l de dNTPs (10mM) y 2 μ l ADN.

Los fragmentos amplificados fueron purificados mediante precipitación con acetato de sodio y etanol y enviados a secuenciar por en los sentidos en un secuenciador multicapilar ABI Prism 3730, en el Servicio de Secuenciación de la Fundación Parque Científico de Madrid.

Las secuencias de ADN fueron examinadas, eliminando las regiones de los *primers*, mediante el programa Sequencher (Gene Code Corporation) y alineadas directamente en el programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002). Como algunas de las secuencias obtenidas de GenBank son más cortas que las de este estudio, fue necesario completarlas mediante la adicción de una "N" por cada carácter perdido.

Análisis filogenéticos

El análisis de las secuencias se basó en los principios de Máxima Parsimonia (MP), Inferencia Bayesiana (BI) y Máxima Verosimilitud (ML). El modelo evolutivo que mejor se ajusta a los datos fue seleccionado mediante el programa jModeltest 0.1.1 (Posada, 2008).

Los análisis de MP y de ML se realizaron mediantes búsquedas heurísticas, complementadas con TBR (por las siglas inglesas de Tree Bisection Reconnection), para intentar alcanzar las mejores reconstrucciones filogenéticas. El soporte de los nodos fue evaluado a través de métodos de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), mediante 1000 pseudorréplicas. Para llevar a cabo estos análisis se utilizaron los programas PAUP (MP) y PHYML (Guindon & Gascuel, 2003; para ML). El último fue realizado online a través de la plataforma South of France Bioinformatics Platform (http://www.atgc-montpellier.fr/).

Para la obtención de las relaciones basadas en BI se utilizó el programa MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003), dejando que el programa evaluase los parámetros del modelo, como G (distribución de la variación en la secuencia), I (proporción de posiciones invariables), la frecuencia de las bases y las tasas de sustitución. Se realizaron 5.000.000 de réplicas (MCMCMC = Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo), guardando uno de cada 100 árboles generados, en dos carreras paralelas de 4 cadenas, tratando de forma independiente cada posición del codón. Tras comprobar la convergencia de las dos carreras y la estabilización de los valores de las probabilidades de cada búsqueda, se eliminaron el 10% de los primeros árboles obtenidos. La robustez de las propuestas se estima a través de probabilidades posteriores.

Ciertos datos fueron tratados también a través de parsimonia estadística, mediante redes de haplotipos que fueron obtenidas con los programas TCS 1.18 (Clement *et al.*, 2000)

y Network 4.5 (<u>www.fluxus-engineering.com</u>), con los parámetros por defecto y una conectividad límite del 95%.

Resultados

Datos morfológicos

La clasificación a todos los niveles taxonómicos ha sido extraída de Kajihara (2007).



Fig. 2. Habitus de las cuatro especies del género *Cephalothrix* estudiadas en este trabajo. A) *C. fasciculus*.
B) *C. filiformis*, el fragmento posterior está contraído en forma de espiral cerrada. C) *Cephalothrix* sp. A.
D-F) *Cephalothrix* sp. B. D) Fragmento anterior. E) Detalle de la cabeza, mostrando la pigmentación. F) Detalle de la parte posterior de la cabeza, mostrando la disposición de los ovarios. Barra de escala: B = 10 mm; A, C-F: 1 mm.

Fig. 2. Habitus of the four species of the genus *Cephalothrix* studied in this work. **A)** *C. fasciculus.* **B)** *C. filiformis*, the posterior fragment is contracted in a tight spiral. **C)** *Cephalothrix* sp. A. **D-F)** *Cephalothrix* sp. B. **D)** Anterior fragment. **E)** Magnification of the head, showing head pigmentation. **F)** Magnification of the posterior part of the body, showing the disposition of the ovaries. Scale bar: B = 10 mm; A, C-F: 1 mm.

Cephalothrix fasciculus (Iwata, 1952) (Fig. 2A)

<u>Material examinado</u>: Dos individuos de la localidad 1, entre *Corallina officinalis* y fango. IM. Tres individuos de la localidad 4. IM e II, entre *Lithophillum tortuosum* y fisuras de rocas. Un individuo de la localidad 5, entre arena debajo de una piedra. IS. Siete individuos de la estación 6, encontrados entre *L. tortuosum*. IM. Cuatro individuos de la localidad 8, entre *Corallina officinalis* (1) y detritos (3).

Longitud: 20-60 mm. <u>Anchura</u>: 0,5-0,8 mm. <u>Forma del cuerpo</u>: cilíndrico, en algunos casos aplanado en la parte posterior. Parte anterior lanceolada, con un par de hendiduras cefálicas someras, en ocasiones imperceptibles. Boca desarrollada en forma de ventosa. <u>Ojos</u>: ausentes. <u>Color</u>: amarillo oscuro, amarillo rojizo o naranja crema, con una mancha brillante de pigmento amarillento o anaranjado en el extremo anterior de la cabeza.

<u>Caracteres internos</u>: Pared del cuerpo con las capas musculares típicas de los cefalotrícidos (Figs. 3A, B), con una musculatura esplácnica formada por 2-3 fibras de musculatura circular. Esta forma presenta una placa muscular entre el rincocele y el tubo digestivo (Fig. 3C). La longitud del rincocele es variable, pero puede alcanzar más de 4/5 de la longitud total del cuerpo. La musculatura de la probóscide está compuesta por una capa muscular circular externa y una longitudinal interna (Fig. 3C). El vaso rincocélico es de tipo A, siguiendo la nomenclatura de Kajihara (2010). El nervio bucal (Fig. 3C) se origina justo detrás de la parte media de la comisura ventral, se bifurca (Fig. 3B) y desaparece inmediatamente después de la boca. Uno de los ejemplares de la localidad 4, recolectado en febrero de 2011 presenta gónadas en un estadío de desarrollo incipiente (Fig. 3D).

Clado en los análisis filogenéticos: 11.

<u>Distribución</u>: La localidad típica es Tomioka, Japón (Iwata, 1952). Los datos moleculares sugieren que su distribución natural se extiende por el Pacífico Norte (ver en la discusión). Estas citas constituyen la primeras para la península Ibérica.

Cephalothrix filiformis (Johnston, 1828) (Fig. 2B)

<u>Material examinado</u>: Un ejemplar de la localidad 4, entre los rizoides de *Corallina officinalis*. IM. Un ejemplar de la localidad 5, entre el sedimento atrapado en los rizoides de *Corallina officinalis*. IS. Un ejemplar de la localidad 7, encontrado entre grava bajo una piedra, dentro de un tubo mucoso construido con arena gruesa. IS.

Longitud: 60-100 mm. <u>Anchura</u>: 1 mm. <u>Forma del cuerpo</u>: con forma de hilo con una cabeza alargada y roma, boca muy alejada de los ganglios cerebroides. <u>Ojos</u>: ausentes. <u>Color</u>: blanquecino con tonalidades rosadas o anaranjadas, cabeza translúcida.

Clado en los análisis filogenéticos: 24.

<u>Distribución</u>: Islas Británicas, costa de Francia y norte de la península Ibérica. Las citas en Japón son dudosas debido a que están muy alejadas de su rango de distribución original (Kajihara, 2007; ver en discusión).

Observaciones: Se contrae en una espiral cerrada cuando es molestado (Fig. 2B).

Cephalothrix sp. A (Fig. 2C)

<u>Material examinado</u>: Un individuo de la estación 3, entre el rizoide de *Saccorhiza polyschides*. II. Un ejemplar de la localidad 4, entre *Corallina officinalis*. II.

Longitud: 6-15 mm. <u>Anchura</u>: 0,3-0,5 mm. <u>Forma del cuerpo</u>: con forma de hilo y la cabeza roma, con un par de hendiduras cefálicas someras. <u>Ojos</u>: ausentes. <u>Color</u>: blanquecino con una mancha de pigmento rojo variable en forma y tamaño en el extremo de la cabeza.

Clado en los análisis filogenéticos: 10.

Distribución: Roscoff (Francia) y norte de la península Ibérica.

<u>Observaciones</u>: El individuo de la localidad 4 es una hembra madura. En el análisis molecular, esta especie se agrupa con unos individuos no identificados de Roscoff, constituyendo el grupo hermano de *C. rufifrons* (ver en la discusión). La descripción basada en caracteres externos de estos ejemplares concuerda con los ejemplares de la península, pero ningún estudio de su anatomía interna ha sido realizado hasta el momento. La clarificación del estatus taxonómico de *Cephalothrix* sp. A require de estudios histológicos.

Cephalothrix sp. B (Figs. 2D-E)

<u>Material examinado</u>: Un individuo de la localidad 2, entre los rizoides de *Saccorhiza polyschides*. II. Un individuo en playa Unión, Rawson, Chubut, Argentina. 43° 19′ S, 65° 2′ W. Entre mejillones (*Mytilus edulis*). José Elías Fernández Alfaya *leg*.

<u>Longitud</u>: 60 mm. <u>Anchura</u>: 1 mm. <u>Forma del cuerpo</u>: con forma de hilo y con la cabeza apuntada y roma, con un par de hendiduras cefálicas. <u>Ojos</u>: ausentes. <u>Color</u>: blanco con una mancha roja de pigmento rodeando el extremo anterior de la cabeza y una línea naranja que recorre la totalidad de la superficie dorsal del cuerpo.

Clado en los análisis filogenéticos: 23.

Distribución: Noroeste de la península Ibérica y Argentina.

<u>Observaciones</u>: El individuo de la localidad 2 es una hembra madura, con sendas líneas irregulares de gónadas a ambos lados del cuerpo (Fig. 2F), formadas cada una por un

único ovocito. Desafortunadamente, las secciones histológicas de este individuo no están disponibles para su estudio taxonómico y la resolución de su estatus taxonómico requiere de más ejemplares.



Fig. 3. *Cephalothrix fasciculus.* Secciones transversales **A)** Región cerebral, mostrando la región impar del nervio bucal (BN). **B)** Región bucal, mostrando la disposición de la porción ramificada del nervio bucal. **C)** Región intestinal, mostrando la placa muscular (MP) y la pared del rincocele (RW). **D)** Región intestinal, mostrando la disposición del ovario incipiente (OV). BM, membrana basal; CL, laguna sanguínea cefálica; CM, capa muscular circular; DG, ganglio nervioso dorsal; EP, epidermis; FG, parte anterior del tubo digestivo; IN, intestino; LM, capa muscular longitudinal; LN, cordón nervioso lateral; LV, vaso sanguíneo lateral; MO, boca; PR, probóscide; RC, rincocele; RV, vaso rincocélico. Barra de escala: 100 μm.

Fig. 3. *Cephalothrix fasciculus.* Transverse sections. **A)** Cerebral region, showing the unpaired section of the buccal nerve (BN). B) Buccal region, showing the arrangement of the branched portion of the buccal nerve. C) Intestinal region, showing the muscle plate (MP) and the rhynchocoel wall (RW). D) Intestinal region, showing the arrangement of an incipient ovary (OV). BM, basal membrane; CL, cephalic blood lacuna; CM, circular muscle layer; DG, dorsal ventral ganglion; EP, epidermis; FG, foregut; IN, intestine; LM, body wall longitudinal muscle layer; LN, lateral nerve cord; LV, lateral blood vessel; MO, mouth; PR, proboscis; RC, rhynchocoel; RV, rhynchocoel vessel. Scale bar: 100 μm.

Datos moleculares

Se secuenciaron 658 pares de bases para todos los individuos, de los cuales 341 posiciones (51,82%) son variables. Dentro de esas posiciones variables, 296 (86,8%) ofrecen información parsimoniosa.

El modelo evolutivo que mejor se adapta a los datos resultó ser TIM3+I+G, según el criterio de Akaike (AIC; Akaike, 1974). Para los análisis de ML, el modelo seleccionado fue el más próximo a éste (GTR + G + I), al no estar presente entre las opciones del programa TIM3+I+G.

Las distancias genéticas (sin corregir y corregidas según el modelo TIM3+I+G) entre los clados 1, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 23 y 24 aparecen listadas en la Tabla 3. Por razones prácticas, sólo se reflejan las distancias entre esos clados, que son los relevantes para el presente trabajo.

Table 3. Distancias genéticas entre algunos de los clados del análisis no corregidas y obtenidas delmodelo evolutivo TIM3+I+G.

Table 3.	Uncorrected	genetic	distances	between	some	of the	clades	in the	analysis	and	corrected	by t	he
evolution	ary model TI	M3+I+C	J.										

	N1	N6	N8	N9	N10	N11	N13	N23	N24	
N1	-	14.2	14.8	14.4	6.8	14.8	14.3	12.7	15.8	
N6	49.2	-	5	8.6	13.9	4.4	12.9	11.4	13.6	
N8	51.1	7	-	7.8	14.7	5.5	12.7	10.5	14.4	
N9	50.7	16.6	12.3	-	14.5	8.1	12.1	9.7	13.9	Divergencias
N10	8.5	49	51.3	52.4	-	14.4	13.6	12.3	14.8	no corregidas
N11	53.6	5.4	7.4	14.6	52.2	-	12.7	10.6	13.4	
N13	42.9	35.9	38.6	38.4	39.1	38.7	-	11.5	11.1	
N23	37	32.4	26.9	25.1	35.7	31	34.2	-	14.2	
N24	51.9	42.4	51.4	45.8	47.7	43.1	21.3	51.6	-	
	I			Modelo ev	olutivo T	IM3+I+C	3			

Relaciones filogenéticas

La topología de los árboles filogenéticos obtenidos es fundamentalmente la misma en los métodos de MP, ML y BI, aunque se aprecian cambios menores en los clados con bajos valores de soporte. En la Figura 4 se muestra el árbol consenso obtenido por BI, donde se indican con los valores de probabilidad posterior (pp, para BI) y los porcentajes de bootstrap (bp, para MP y ML) para cada nodo.

En cuanto al grupo interno, su monofilia es únicamente apoyada por la BI (aunque con una pp=1). Un grupo bien soportado (pp=1; bp=100/100) formado por los clados 7 y 20 es basal al resto de los cefalotrícidos, tras el que se observa un un grupo relativamente mal soportado entre los clados 2, 14 y 25.

El resto de Cephalotrichidae es ya un grupo monofilético bien apoyado por todos los métodos (pp=0,99; bp=84/93), del que se desprende, en primer lugar, *Cephalothrix* sp. de Panamá (clado 17), tras el que se presenta una politomía basal que difiere en el número de indeterminaciones en función del análisis (los clados 5, 18, 21, 22 y 23 están colapsados en el análisis de MP, pero no en los de BI y ML). El clado 19 no se agrupa con ningún otro en ningún análisis. Los clados 18 y 22 forman un grupo con un soporte cercano a ser aceptable en el análisis de BI (pp=0,92). En el análisis de BI, el clado 5 es basal al grupo formado por los clados 3, 4 y 12, cuyas relaciones están perfectamente apoyadas en todos los análisis (pp=1; bp=100/100). Las relaciones dentro de los clados 3, 4 y 12 varían en función del análisis elegido: en los análisis de BI y ML, un nodo terminal agrupa los clados 4 y 12 (pp=0,97; bp= -/74); en el análisis de MP, los clados 3 y 4 se agrupan, pero dicha relación está pobremente soportada (bp=50).

El clado 16 aparece como basal (pp=1, bp=98/99) al grupo formado por los clados 1 y 10 (pp=0,96; bp=98/98), ambos con altos valores de soporte (pp=1; bp=100/100).

Los clados 21 y 23 se ubican en la base del grupo formado por los clados 6, 8, 9 y 11 (pp=0,93; bp=98/-) en los análisis de BI y MP. Las relaciones entre los clados 6, 8, 9 y 11 es estable y sus valores de soporte son pp=0,97-1 y bp=76-100. El clado 9 es basal al grupo formado por los otros 3 clados, formando los clados 6 y 11 un grupo terminal. Ningún clado se corresponde con la red de haplotipos 15 encontrada por Chen *et al.* (2010) y su haplotipo (h83 en Tabla S1 de Chen *et al.*, 2010) aparece integrado en el clado 11 en todos nuestros análisis.

Finalmente, los clados 13 y 24 forman un grupo bien soportado en todos los análisis de BI (pp=1; bp=85/96).



Fig. 4. Árbol filogenético consenso obtenido según inferencia bayesiana. Las líneas verticales representan los clados de Cephalotrichidae comentados en el texto, de acuerdo con la nomenclatura adoptada. Se aporta la localidad de la muestra y la identificación de la especie (cuando es posible). Los números sobre las ramas representan las probabilidades posteriores (pp), los números bajo las ramas representan los valores de bootstrap (bp) de los análisis de MP y de ML, respectivamente.

Fig. 4. Bayesian consensus phylogenetic tree. Vertical lines represent the clades of Cephalotrichidae discussed in the text, according to the adopted nomenclature. The locality of the sample and the species identity (when possible) is provided. Numbers above branches represent the posterior probabilities (pp), the numbers below branches represent the bootstrap percentages (bp) of the MP and ML analysis, respectively.

En la Figura 5 se muestra la red de haplotipos obtenida para el clado 11, junto con la distribución geográfica de los individuos secuenciados. Esta red muestra un haplotipo mayoritario y varios "satélite", que se diferencian del anterior como máximo en 2 caracteres, estructura que suele asociarse con especie en expansión. El haplotipo mayoritario está presente en 4 individuos del Pacífico (CHI-C, JAP-0, KOR2 y USA-CA1, como se indica en la Fig. S1 y en la Tabla S1), 3 del Atlántico (IBE-A1, A2 y A5) y 18 de las costas mediterráneas de la península Ibérica (IBE-M2-M5, M7-M14, M16, M17 y M20-M23). Se han observado dos haplotipos propios en individuos de las costas atlánticas y mediterráneas de la península, uno de ellos de 3 individuos del atlántico (IBE-A3, A4 y A6) y de uno del mediterráneo (IBE-M1), mientras que el segundo se encontró en un individuo atlántico (IBE-A7) y en cuatro del Mediterráneo (IBE-M15, M18, M24 y M25). Dos de los haplotipos se han encontrado exclusivamente en individuos de las costas mediterráneas de la península (IBE-M19 y M6) y otros tres en individuos japoneses (JAP-F30, SE6 y SH). El último haplotipo está compartido por un individuo japonés (JAP-SE3) y otro de Trieste (ITA). Se proporciona como material suplementario la Figura S1, que muestra la red de haplotipos con los códigos y las diferencias nucleotídicas que hay entre cada haplotipo.



Fig. 5. Red de haplotipos, construida con network 4.5. En el mapa se muestra las localidades de cada uno de los haplotipos. Los colores son consistentes con los de la red de haplotipos.

Fig. 5. Haplotype network, constructed with network 4.5. The map shows the localities of each haplotype. Colours are consistent with the haplotype network.

Discusión

Nuevas citas para el área de estudio y reflexiones acerca de su posición filogenética

No es algo infrecuente el aporte de nuevas citas de nemertinos para la fauna local cuando se llevan a cabo muestreos específicos. Esta situación puede explicarse por el bajo interés que los zoólogos han mostrado por los nemertinos y otros *phyla* menores de "gusanos". En el caso de los paleonemertinos, esta tendencia es aún mayor que en el resto del *phylum*, debido a que el examen de la anatomía interna es, en la mayor parte de los casos, indispensable para la determinación a nivel específico.

En este trabajo se presentan dos nuevas citas para una de las especies del grupo externo: *T. banyulensis* (Fig. S2) que previamente había sido citada en el Parque Natural Marítimo-Terrestre de las Islas Atlánticas (Galicia) por Junoy y Herrera-Bachiller (2009). Las citas aquí presentadas constituyen las primeras para el mar Cantábrico y la costa mediterránea de la Península y sus secuencias de COI son las primeras que se aportan para la especie, con lo cual se aporta un primer *barcode* apropiado.

Cephalothrix spp. A y B deben permanecer como no identificadas por el momento, hasta que más individuos sean obtenidos y procesados adecuadamente para estudios histológicos.

Cephalothrix sp. A (Fig. 2C, clado 10) incluye la secuencia de un individuo del mar Cantábrico y otras cuatro de Roscoff (Francia), cuya descripción es "cuerpo desde amarillo-rosado a anaranjado. Una brillante mancha (en ocasiones dos manchas laterales pueden distinguirse) de pigmento naranja cerca del extremo de la cabeza" (ver Tabla S1 de Chen et al., 2010). Dicha descripción concuerda perfectamente con los ejemplares del mar Cantábrico y con la de C. rufifrons, una especie que ya ha sido previamente citada en la península por Vernet & Anadón (1991) y Junoy & Herrera-Bachiller (2009). Cephalothrix sp. A es el grupo hermano del clado 1, formado por individuos de C. rufifrons de Suecia y Reino Unido. La divergencia entre estos dos clados es del 6,8% (p= divergencia sin corregir) y del 8,5 % (TIM3+I+G), como muestra la Tabla 3. La elevada estructuración de estos clados, junto con la divergencia genética comentada sugiere que pueden representar dos especies diferentes con una apariencia externa muy similar. El grupo hermano del clado constituido por los clados 1 y 10 es el clado 16, constituido por un único nemertino de Armintza (Bizkaia), cuya única descripción morfológica es "blanquecino" (ver Tabla S1 de Chen et al., 2010), por lo que no se puede aventurar nada acerca de su identificación.

Las relaciones filogenéticas entre *Cephalothrix* sp. B (Figs. 2D-F, clade 23) con el resto de los cefalotrícidos no está resuelta, pero lo cierto es que es una especie muy divergente con el resto de las especies muestreadas molecularmente hasta el momento. El clado está formado por dos ejemplares muy similares en cuanto a su morfología externa procedentes de la costa atlántica gallega y de Argentina, pudiendo tratarse de una especie con distribución anfiatlántica. Este tipo de distribución ha sido observado en otros miembros del filo, como *Emplectonema gracile* (Johnston, 1837) (Turbeville,

2011) y ha sido comprobada en alguna otra especie con métodos moleculares (Fernández-Alfaya, *comm. pers.*).

Cephalothrix filiformis fue descrito por Johnston en el siglo XIX (Johnston, 1828), dentro del género Planaria Müller, 1773-1774. Como ocurre en la inmensa mayoría de las especies del género, su historia taxonómica es complicada. Cephalothrix filiformis fue transferido al género Procephalothrix Wynhoff, 1913, pero estudios cladísticos (Sundberg & Hylbom, 1994) han invalidado el género. Esta especie ha sido registrada en Gran Bretaña (Johnston, 1828), la península Ibérica (Vernet & Anadón, 1991) y Japón (Iwata 1954). Kajihara (2007) ha sugerido que los registros japoneses están demasiado alejados del rango de distribución de la especie para pertenecer a la misma categoría específica, como prueban los datos moleculares (Chen et al., 2010, clado 12). Otros individuos de Rusia y Reino Unido, asignados a C. filiformis y C. linearis forman otro grupo independiente (clado 4). Estos datos sugieren que estos dos clados se corresponden con distintas especies, pero Chen et al. (2010) no clarifican si los individuos europeos deben asignarse a C. filiformis o C. linearis. Los especímenes de C. filiformis incluidos en este trabajo (Fig. 2B, clado 24) no se agrupan con los japoneses, apoyando la hipótesis de Kajihara (2007) y, curiosamente, no se agrupan con ninguna otra secuencia de COI asignada a C. filiformis disponible a día de hoy. El clado 24 se agrupa con el clado 13, un cefalotrícido no identificado de cuerpo amarillo rosado procedente de Roscoff. Su divergencia (p=11.1% y TIM3+I+G=21.3%) sugiere que cada clado representa una especie diferente. Una identificación basada en caracteres histológicos sitúa los ejemplares ibéricos en C. filiformis de acuerdo con los datos aportados por Sundberg y Hylbom (1994). Por tanto, se considera que la secuencia de COI aportada en este trabajo debería de ser utilizada como el barcode correcto de C. filiformis.

La invasión oriental

El clado 11 del análisis está compuesto por 5 ejemplares no identificados de *Cephalothrix* de Japón, sendos ejemplares no identificados de Corea y de Trieste (Italia), un ejemplar asignado a *C. fasciculus* de China, un ejemplar asignado a *C. simula* de California (EE.UU.) y los ejemplares de la península Ibérica (Figs. 4 y 5). Las características morfológicas externas que describen Chen *et al.* (2010 en la Tabla S1) para todos estos individuos coinciden con las de los individuos ibéricos. Otro ejemplar asignado a *C. fasciculus* de Japón forma un clado independiente (clado 22), pudiendo representar una identificación errónea o una señal de biodiversidad críptica.

La identificación morfológica de los individuos de la península como *C. fasciculus* (ver en la sección contigua "*Deshaciendo un nudo gordiano: los nemertinos de Iwata*") sugiere que este clado está integrado exclusivamente por esta especie. La distribución geográfica de los individuos del clado 11 (Fig. 5) sugiere que el área de distribución natural abarca el Pacífico norte, siendo los registros del mar Mediterráneo y del Atlántico norte fruto de una introducción artificial.

Poco se conoce acerca del desarrollo de los cefalotrícidos, pero las características de la larva de C. rufifrons (Smith, 1935) indican un desarrollo indirecto en el que media una larva lecitotrófica. A este tipo de larvas se les supone una capacidad dispersiva relativamente limitada, por lo que la hipótesis más probable para la introducción es el tráfico maritímo y las aguas de lastre, que transportarían larvas o adultos de algún punto del océano Pacífico. También podría haber llegado a través de la importación y mantenimiento de algas y/o animales del Pacífico en acuarios. La diversidad haplotípica presente en las costas atlánticas y mediterráneas (Fig. 5), equivaldría a la encontrada en con especímenes del Pacífico, con quien comparten haplotipos, lo que podría revelar numerosos eventos independientes de introducción. Este hecho se vería apoyado con la presencia del mismo haplotipo a ambos lados del Estrecho de Gibraltar y en las poblaciones de origen (Fig. 5). Además, la presencia de gónadas en desarrollo (Fig. 3D) en un individuo y el hecho de que la práctica mayoría de los individuos de Colera (Cataluña) fuesen juveniles indica que esta especie ya se está reproduciendo en aguas ibéricas. En la localidad mediterránea, C. fasciculus llega a suponer el 28% (n=121) de los nemertinos encontrados (Fernández-Álvarez, datos no publicados) y que no se haya encontrado ninguna otra especie del género podría indicar un posible desplazamiento de las especies autóctonas por parte de la especie alóctona al provechar recursos tróficos similares. Dado el comportamiento depredador de las especies del género Cephalothrix (Wu & Sun, 2006), la introducción de en una determinada comunidad puede afectar a distintas especies, incluso algunas de su mismo género, al ser desplazadas por exclusión competitiva.

Las citas de C. fasciculus aquí presentadas no sólo representan las primeras de esta especie en aguas ibéricas, sino también el primer caso conocido de un nemertino marino invasor. Además, el uso de marcadores moleculares en la documentación de una especie de nemertino invasor no se había llevado a cabo nunca. Por ahora, el poder invasor de ciertas especies de nemertinos terrestres ha sido únicamente postulado por Moore et al. (2001) al encontrar ciertas especies alóctonas para una determinada región asociadas a jardines y ambientes antropogénicos, probablemente debido al comercio de plantas exóticas. Por otro lado, Turbeville (2011) ha especulado sobre si cierta población de Emplectonema gracile que se ha observado en Carolina del Sur desde 2007 pudo haber sido introducida mediante aguas de lastre. A diferencia de C. fasciculus, E. gracile presenta una distribución prácticamente cosmopolita, habiendo sido citada en las costas del norte de Europa (océano Atlántico y Mar del Norte), de Madeira, de los mares Mediterráneo y Negro, así como en las costas pacíficas de Rusia (península de Kamchatka), Japón y Norteamérica (ver en Bürger, 1895; Coe, 1905; Gibson, 1995 y Iwata, 1960). Al ser una especie prácticamente cosmopolita se le supone bastante poder de dispersión, de modo que la cita de Carolina del Sur (costas del Atlántico este) podría también ser explicada mediante un proceso de colonización natural. Como el propio Turbeville (2011) sugiere, el origen de los E. gracile de Carolina podría ser testado mediante el uso de técnicas de filogeografía.

Deshaciendo un nudo gordiano: los nemertinos de Iwata

En los cefalotrícidos ibéricos del clado 11, la presencia de una placa muscular entre el rincocele y el tubo digestivo (Fig. 3C), el rincocele compuesto por una capa de musculatura circular externa y otra longitudinal interna (Fig. 3C), la estructura del nervio bucal (Figs. 3A y B), y la longitud y el color (Fig. 2A; Tabla S1 de Chen *et al.*, 2010) coinciden con los de la descripción original de Iwata (1952) de *C. fasciculus*. La longitud del rincocele es variable, pudiendo alcanzar hasta 4/5 de la longitud total del cuerpo. En la descripción original, la longitud del rincocele se prolonga hasta el final del cuerpo (Tabla 4), una característica que le diferencia del resto de las especies del género. Sin embargo, Kajihara (2007) considera que "*este estado de carácter pudo ser identificado erróneamente por una mala interpretación de un fragmento como un ejemplar completo*". La naturaleza frágil de Cephalotrichidae apoya la hipótesis de Kajihara (2007), pudiendo explicar la única incongruencia que existe entre la descripción original de *C. fasciculus* y los ejemplares ibéricos.

En clado 11 está incluido en un grupo monofilético también integrado por los clados 8 y 6 (Fig. 4). Estos dos últimos incluyen individuos del Pacífico asignados a *C. simula* o no identificados. Chen *et al.* (2010) interpretaron que los clados 6, 8 y 11 "*contienen haplotipos de la misma especie. La separación en 3 subredes en el análisis de parsimonia estadística podría ser el resultado de un muestreo escaso de la variación intraespecífica de haplotipos, produciendo un falso positivo". La alta estructuración de los clados de los análisis presentados aquí (Fig. 4), la baja divergencia dentro de cada uno de los grupos (ver Tabla 1 en Chen <i>et al.*, 2010) comparada con la existente entre cada uno de ellos (el mínimo es un 4,4% entre los clados 6 y 11) y la distribución geográfica solapada de los 3 clados sugiere la existencia de aislamiento reproductor entre cada uno de ellos, por lo que se considera que se trata de distintas especies, si bien muy relacionadas. Este hecho probablemente esté indicando un caso de diversidad críptica o un complejo de especies bajo el nombre científico de *C. simula*.

Una gran incertidumbre rodea las descripciones originales de *C. fasciculus* (Iwata, 1952) y *C. simula* (ver Iwata, 1952 y su redescripción de 1954), debido a lo breves y poco informativas que son y a las contradicciones entre dos descripciones del segundo taxón. En la Tabla 4 se resumen las diferencias entre estas tres descripciones, utilizando sólo los caracteres que aparecen reflejados en todas. En el artículo de 1952, Iwata diferencia ambos taxones por la presencia o ausencia de una placa muscular y la longitud del rincocele. Posteriormente, y en base a ejemplares de otra localidad, Iwata (1954) señala la presencia de una placa muscular entre el rincocele y el tubo digestivo de *C. simula*. En ambas descripciones de *C. simula*, Iwata señala un tamaño corporal al menos el doble de grande que *C. fasciculus*.

En las descripciones de la morfología externa de los individuos de los clados 6 y 8 (ver Tabla S1 en Chen *et al.*, 2010), el tamaño coincide, en algunos casos, con el tamaño reportado para las dos descripciones de *C. simula* (Iwata, 1952 & 1954). Algunos ejemplares presentan un tamaño corporal menor, pero podría tratarse de juveniles. Sin

embargo, el tamaño máximo de todos los ejemplares del clado 11 es de 6-7 cm, más cercano a la descripción de *C. fasciculus*, sugiriendo la presencia de gónadas en el material del Cantábrico que ése es el tamaño máximo de la especie.

La presencia de cierta diversidad críptica bajo el nombre de *C. simula* en los clados 6 y 8 revelada por los *barcodes*, junto con las incongruencias de las dos descripciones de la especie (Tabla 4), apoya la idea de que las dos descripciones se corresponden a las de dos especies diferentes, muy parecidas en su morfología externa y en los caracteres anatómicos. Por tanto, se propone que:

a) *C. fasciculus* se corresponde con los individuos del clado 11, pudiendo utilizarse esas secuencias como *barcode* en estudios futuros.

b) Bajo el nombre de *C. simula* se han descrito dos especies distintas, como revelan las diferencias morfológicas entre ambas descripciones y la diversidad críptica que apuntan los *barcodes*. Sólo tras un estudio combinado de la morfología externa, anatomía y marcadores moleculares (ver la sección contigua "*Buenas prácticas en el uso de* DNA barcoding *con nemertinos: Cephalotrichidae como un grupo "bien conocido" molecularmente*) permitirá asignar a la especie su *barcode* adecuado (aquella cuya anatomía coincida con la descripción de Iwata de 1952, en base al criterio de prioridad del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, y la descripción de la otra especie, que muy posiblemente coincida con la descripción de Iwata de 1954).

Tabla 4. Diferencias morfológicas entre las tres descripciones de especies del género *Cephalothrix* que forman parte del complejo de especies de los clados 6, 8 y 11.

Table 4. Morphological differences between different *Cephalothrix* species in the complex formed by clades 6, 8 and 11. genus *Cephalothrix* forming part of the species complex forming clades 6, 8 and 11.

Carácter morfológico	C fasciculus ¹	C. simula sensu Iwata 1952 ¹	C. simula sensu Iwata 1954 ²
	C. jusciculus	Iwata, 1752	Iwata, 1754
Longitud / anchura corporal	Hasta 10 cm / 1 mm	30 cm / 1-1,5 mm	20-40 cm / 2mm
Musculatura esplácnica en la			
región anterior del tubo digestivo	"Poco desarrollada"	"Grosor moderado"	"Bien desarrollada"
Longitud del rincocele	Hasta el final del cuerpo	Limitada a la mitad anterior del cuerpo	Limitada a la mitad anterior del cuerpo
Placa muscular entre el rincocele y el tubo digestivo	+	-	+

¹ Extraído de Iwata (1952).

 2 Extraído de Iwata (1952).

Futuras buenas prácticas en el uso de *DNA barcoding* con nemertinos: Cephalotrichidae como un grupo "bien conocido" molecularmente.

Ciertamente, la identificación y descripción de taxones de cefalotrícidos son las más dificultosas de todos los nemertinos –un grupo extremadamente dificil *per se-* y los errores en la determinación de ejemplares son frecuentes en la literatura (por ejemplo, *C. filiformis* sensu Iwata, 1954; Chen *et al.*, 2010; Kajihara, 2007 & 2010). Siendo o no

imprescindible la examinación histológica en otros nemertinos (Sundberg & Strand 2010; Strand & Sundberg 2010), es evidente que buenas descripciones basadas en caracteres histológicos y moleculares son indispensables en los miembros de la familia Cephalotrichidae para poder clarificar las especies incluidas en trabajos taxonómicos y listas de fauna.

A pesar de que el género *Cephalothrix* es el grupo de nemertinos que actualmente está mejor representado las bases de datos del NCBI, muchas de las secuencias de COI proceden de material no identificado (o identificado incorrectamente) y muchos de ellos esconden diversidad no descrita por ahora. Si el *DNA barcoding* nació con el propósito de identificar un espécimen desconocido en relación o basado en una clasificación conocida (Miller, 2007), iiiun buen conocimiento de la taxonomía del grupo no puede esperar más!!!

Por esta razón, en el presente trabajo se proponen las siguientes recomendaciones de trabajo, que si bien es extrapolable a la totalidad del filo, es imprescindible en el caso de los miembros de la familia Cephalotrichidae.



Fig. 6. Diagrama de las partes destinadas a cada uno de los estudios propuestos en este trabajo para los nemertinos.

Fig. 6. Schematic showing the proposed regions used for different techniques for the study of nemerteans.

- Antes de su fijado, todos los ejemplares serán observados vivos, anotando su tamaño, la forma del cuerpo, su color y la forma en la que se contrae. Se examinará la cabeza a la lupa o al microscopio (según el tamaño) en la búsqueda de ojos o hendiduras cefálicas. Este debe realizarse último paso siempre después de la narcotización. Fotografiar el ejemplar.
- Cada ejemplar se separará del resto y se le asignará un código que identificará todo el material que se extraiga del mismo individuo (Fig. 6).
- El fragmento del ejemplar con menor número de caracteres taxonómicos (la parte posterior, en este caso) se reservará para estudios moleculares y será conservado en etanol absoluto o congelado.
- La parte anterior será fijada de forma adecuada para estudios taxonómicos (narcotización previa y fijado lo más recto posible) y se fijará en un líquido apropiado para estudios histológicos, como líquido de Bouin. Si el animal evierte la probóscide en algún momento, ésta deberá ser fijada para estudios histológicos, dado que contiene caracteres de importancia taxonómica.

Por tanto, el *voucher* (ejemplar de referencia) morfológico asociado a las secuencias de GenBank no sería un ejemplar fijado sin anestesiar en etanol absoluto, totalmente inútil de cara a identificaciones futuras, sino fotografías del ejemplar vivo y series histológicas o un ejemplar fijado adecuadamente para su procesado mediante este tipo de técnicas.

Consideraciones finales

En este trabajo se evalúa la biodiversidad actual de especies del género *Cephalothrix* en la península Ibérica mediante el uso del marcador molecular COI. Las secuencias obtenidas de las cuatro especies se compararon con todos los datos moleculares previos de este marcador molecular disponibles en GenBank y se aportan nuevos datos de varios aspectos biológicos. Dos de las especies de *Cephalothrix* representan taxones no descritos. Las citas ibéricas de *C. fasciculus*, procedente del Pacífico norte, constituyen el primer registro confirmado de una invasión biológica por parte de una especie de nemertino marino. Por su lado, los representantes ibéricos de *C. filiformis* no se agrupan con ninguna de las secuencias de COI disponibles en GenBank para esa especie, pero la determinación histológica los emplaza en dicho taxón. De estos resultados se deduce que los *barcodes* constituyen una herramienta útil en el estudio de la biodiversidad de nemertinos, utilizando la familia Cephalotrichidae como taxón modelo.

Adicionalmente, se proporcionan las primeras citas de *T. banyulensis* para el mar Cantábrico y las costas mediterráneas de la península y se proporciona por primera vez su *barcode*.

De los 25 clados de Cephalotrichidae incluidos en los análisis, sólo 5 (clados 1, 2, 3, 11 y 24) pueden ser asignados a una única especie inequívocamente. De los 20 clados restantes, dos de ellos representan errores de identificación (clados 4 y 12) de *C. filiformis.* Estos datos implican que iijun 80% de las especies del género en las que se ha llevado a cabo estudios moleculares representan taxones no descritos o identificaciones erróneas!!! Futuros estudios que incluyan caracteres histológicos y moleculares deben ser llevados a cabo para poder tener un conocimiento más veraz de la diversidad de nemertinos de esta familia.

Agradecimientos

El trabajo de laboratorio ha sido financiado por los proyectos AECID REF: A/023484/09. 2010, su prórroga REF. A/032441/10. 2011 y DGI (MICINN) CGL2011-23306. Me gustaría expresar mi agradecimiento a Annie Machordom por sus labores como directora, por el interés demostrado en el proyecto, por sus buenos consejos y por su ayuda en los análisis de las secuencias; así como al apoyo de Eduardo López, tutor de este trabajo. José Elías Fernández Alfaya me proporcionó la secuencia y las fotos de

Cephalothrix sp. B de Argentina y prestó su ayuda en el laboratorio. Muchas gracias a Ricardo García por su ayuda en la extracción de ADN, amplificación y secuenciación de citocromo oxidasa I y por sus valiosos consejos. Anna M. Addamo ayudó en la construcción de redes de haplotipos con el software Network 4.5. Mi agradecimiento a Nuria Anadón por su ayuda en la realización de cortes histológicos y por prestarme sus conocimientos, su ayuda y buena parte de la bibliografía. Nuria Anadón, Luis Ángel Díaz Álvarez, Andrés Arias, Mario Fernández Pendás, Marta Espina Fernández y María Fernández Álvarez me han proporcionado "bichos", han prestado su apoyo en el campo o han contribuido de alguna forma en el procesado del material utilizado en este trabajo. Guillermo San Martín me proporcionó apoyo logístico y colaboró en la recolección de las muestras de Colera (Cataluña). Miguel Vela contribuyó en la maquetación de la portada. Amablemente, Melinda Modrell revisó las partes escritas en inglés. Finalmente, me gustaría expresar mi agradecimiento por el apoyo prestado a mi familia, a mis amigos, a la gente del MNCN y a mi "segunda familia" de Mesón de Paredes nº 5 (Madrid).

Referencias bibliográficas

Akaike, H. (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions* on Automatic Control, **19(6)**, 716–723.

Anadón, N. (1980) Primeros datos sobre la fauna de Nemertinos de la Península Ibérica: Asturias y sur de Galicia (N y NW. de España). *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biológica)*, **78**, 337-345.

Anadón, N. (1981) Nuevos datos sobre la fauna de Nemertinos del Norte de España (Asturias y Santander). *Boletín de Ciencias Naturales IDEA.*, **28**, 219-225.

Anadón, N. (1986-87) Dos nuevos Heteronemertinos para la fauna Ibérica, encontrados en la costa de Asturias (Norte de España): *Cerebratulus roseus* (Delle Chiaje, 1841) y *Micrura purpurea* (Dalyell, 1853). *Boletín de Ciencias Naturales IDEA.*, **37-38**, 41-44.

Andrade, S. C. S.; Strand, M.; Schwartz, M.; Chen, H.; Kajihara, H.; von Döhren, J.; Sun, S.; Junoy, J.; Thiel, M.; Norenburg, J. L.; Turbeville, J. M.; Giribet, G. & Sundberg, P. (2012) Disentangling ribbon worm relationships: multi-locus analysis supports traditional classification of the phylum Nemertea. *Cladistics*, **28** (2), 141-159.

Bürger, O. (1895) Die Nemertinen des Golfes von Neapel und der angrenzenden Meeres-Abschnitte. *Fauna und Flora des Golfes von Neapel*, **22**, 1–743.

Chen, H; Sundberg, P; Norenburg, J. L & Sun, S. (2009) The complete mitochondrial genome of *Cephalothrix Simula* (Iwata) (Nemertea: Palaeonemertea). *Gene*, **442**, 8-17.

Chen, H; Strand, M; Norenburg, J. L.; Sun, S; Kajihara, H; Chernyshev, A. V; Maslakova, S. A. & Sundberg, P. (2010) Statistical Parsimony Networks and Species

Assemblages in Cephalotrichid Nemerteans (Nemertea). *PLoS ONE*, **5(9)**, e12885. doi:10.1371/journal.pone.0012885.

Clement, M.; Posada, D. & Crandall, K. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**, 1657-1660.

Coe, W. R. (1905) Nemerteans of the west and northwest coasts of America. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College*, **47**, 1–318.

Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783-791.

Fernández, F. Á. & Anadón, N. (2009) A new heteronemertean with a branched proboscis from the Bellingshausen Sea (Antarctica). *7th International Conference on Nemertean Biology. Abstracts*, 8. Santa Bárbara, California, USA, VI-2009. [Exposición oral].

Fernández-Álvarez, F. Á. & Anadón, N. (2012a) *Oligodendrorhynchus hesperides* gen. et sp. n. (Heteronemertea) from the Bellingshausen Sea. *Polish Polar Research*, **33(1)**, 81-98.

Fernández-Álvarez, F. Á. & Anadón, N. (2012b) Redescription of *Carinina mawsoni* Wheeler, 1940 (Nemertea: Palaeonemertea: Tubulanidae) and discussion about its generic placement: is it a *Carinina* or a *Tubulanus* species? *I Congreso Ibérico de Sistemática Animal. Programa*, 43. Madrid, España, 17-19/I/2012 [Póster].

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

García-Pérez, J. A. & Anadón, N. (2004) Seasonal abundance and reproductive strategy of *Tetrastemma fozensis* Gibson and Junoy, 1991 (Hoplonemertea, Nemertea) in Villaviciosa estuary (Asturias, northern Spain). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **60**, 581-586.

Gibson, R. (1990) "The macrobenthic nemertean fauna of Hong Kong" *en* Morton, B. (Ed.): The marine flora and fauna of Hong Kong and southern China II. Hong Kong University Press. Hong Kong.

Gibson, R. (1994) Nemerteans. Field Studies Council, Shrewsbury.

Gibson, R. (1995) Nemertean genera and species of the world: an annotated checklist of original names and description citations, synonyms, current taxonomic status, habitats and recorded zoogeographic distribution. *Journal of Natural History*, **29**, 271–562.

Gibson, R. (2011) "*Cephalothrix* Örsted, 1843" *en* Gibson, R. World Nemertea database. Acceso a través de Costello, M.J.; Bouchet, P.; Boxshall, G.; Arvantidis, C. & Appeltans, W. (Ed.): European Register of Marine Species en

http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=122379 [consultado el 13-6-2012].

Gibson, R. & Junoy, J. (1991) A new species of *Tetrastemma* (Nemertea: Enopla: Monostiliferoidea) from Ría de Foz, north-western Spain, found living in the mantle cavity of the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **103**, 225–240.

Gibson, R.; Sánchez, M. & Méndez, M. (1990) A new species of Procephalothrix (Nemertea, Anopla, Archinemertea) from Chile. *Journal of Natural History*, **24**, 277–287.

Guindon, S. & Gascuel, O. (2003) PhyML: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, **52(5)**, 696-704.

Hebert, P. D. M.; Cywinsk, A.; Ball, S. L. & deWaard, J. R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London*. *Biological Series*, **270**, 313-321.

Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic tres. *Bioinformatics* **17**, 754-755.

Iwata, F. (1952) Nemertini from the Coasts of Kyusyu. *Journal of the Faculty of Science Hokkaido University Series VI. Zoology*, **11(1)**, 126-148.

Iwata, F. (1954) The Fauna of Akkeshi Bay: XX. Nemertini in Hokkaido. *Journal of the Faculty of Science Hokkaido University Series VI. Zoology*, **12(1-2)**, 1-39.

Iwata F. (1960) Studies on the comparative embryology of nemerteans with special reference to their interrelationships. *Publications from the Akkeshi Marine Biological Station*, **10**, 1–51.

Johnston, G. (1828) Contributions to the British fauna. *The Zoological Journal*, **4**, 52–57.

Johnston, G. (1837) Miscellanea Zoologica II. A description of some planarian worms. *Magazine of Zoology and Botany*, **1**, 529–538.

Joubin, L. (1890) Recherches sur les Turbellariés des côtes de France (Némertes). *Archives de zoologie expérimentale et genérale*, **2(8)**, 461-602.

Junoy, J. (1998) Phylum Nemertea. Fauna Ibérica en: <u>http://www.fauna-iberica</u>. [consultado el 13-5-2012].

Junoy, J.; Andrade, S. C. S. & Giribet, G. (2010) Phylogenetic placement of a new hoplonemertean species commensal on ascidians. *Invertebrate Systematics*, **24**, 616–629.

Junoy, J. & Gibson, R. (1991) A new species of *Procephalothrix* (Anopla, Archinemertea) from north-western Spain (Nemertea). *Zoologischer Anzeiger*, **226**, 185–194.

Junoy, J. & Gibson, R. (1992) Primeras citas de los nemertinos *Oerstedia dorsalis* (Abildgaard, 1806) y *Tetrastemma vermiculus* (Quatrefages, 1846) (Nemertea, Enopla, Monostiliferoidea) para las costas ibéricas. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biológica)*, **88**, 105-112.

Junoy, J. & Herrera-Bachiller, A. (2009) Los nemertinos del parque nacional marítimoterrestre de las islas atlánticas de Galicia. *Proyectos de investigación en parques nacionales: 2006-2009*.

Kajihara, H. (2007) A Taxonomic Catalogue of Japanese Nemerteans (Phylum Nemertea). *Zoological Science*, **24(4)**, 287-326.

Kajihara, H. (2010) Rhynchocoel vessel in Cephalotrichidae (Nemertea: Palaeonemertea). *Journal of Natural History*, **44(37-40)**, 2321-2329.

Kirsteuer E. (1967) Marine, benthonic nemerteans: how to collect and preserve them. *American Museum Novitates*, **2290**, 1-10.

Kölliker, A. (1845) Lieber drei neue Gattungen von Würmern. Verb. Schweiz. Nat. Ges. Chur., 89-93.

Machordom, A., Araujo, R., Erpenbeck, D., Ramos, M.A. (2003) Phylogeography and conservation genetics of endangered European Margaritiferidae (Bivalvia: Unionoidea). *Biological Journal of the Linnaean Society*, **78**, 235-252.

Miller, S. E. (2007) DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. *PNAS*, **104(12)**, 4775-4776.

McIntosh, W. C. (1873–1874) A Monograph of the British Annelids. Part I. The Nemerteans. Ray Society, London.

Montagu, G. (1804) Description of several Marine Animals found on the South Coast of Devonshire. *Transactions of the Linnean Society of London*, **7**, 1804, 72-74.

Moore, J., Gibson, R. & Jones, H. D. (2001) Terrestrial nemerteans 30 years on. *Hydrobiologia*, **456**, 1–6.

Müller, O. F. (1773-1774) "Vermivm terrestrium et fluviatilium, seu animalium Infusoriorum, Helminthicorum et Testaceorum, non marinorum succinct historia" *en* Havniae & Lipsiae (Ed.): Apud Heineck et Faber, Typis Martinus Hallaner, 1(32) XXXV, 214-224.

Norenburg, J. & Gibson, R. (2012) "Palaeonemertea" in Norenburg, J. & Gibson, R. World Nemertea database. Acceso a través de Costello, M.J.; Bouchet, P.; Boxshall, G.; Arvantidis, C. & Appeltans, W. (Ed.): <u>European Register of Marine Species</u> en

http://www.marbef.org/data/aphia.php?p=taxdetails&id=122307 [consultado el 11-5-2012].

Polo, L.; Olivella, I.; Gili, C.; Anadón, R.; Carbonell, J.; Altamira, C. & Ros, J. D. (1979) Primera aportación al sistema de la flora y fauna bentónicas del litoral de San Ciprián de Burela (Lugo, Galicia). *Actas del I Simposio Ibérico de Estudios del Bentos Marino*, **1**, 333-376.

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

Rogers, A. D.; Junoy, J.; Gibson, R. & Thorpe, J. P. (1993) Enzyme electrophoresis, genetic identity and description of a new genus and species of heteronemertean (Nemertea, Anopla) from northwestern Spain and North Wales. *Hydrobiologia*, **266**, 219 238.

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

Saiz Salinas, J. I. (1987) Verzeichnis der Meeres-Nemertinen (Nemertini) von der iberischen Küsten und den angrenzenden Meeren. *Bonner Zoologische Beiträge*, **38**, 129-146.

Smith, J. E. (1935) The Early Development of the Nemertean *Cephalothrix rufifrons*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, **s2-77**, 335-381.

Sundberg, P.; Chernyshev, A. V.; Kajihara, H.; Kanneby, T. & Strand, M. (2009) Character-matrix based descriptions of two new nemertean (Nemertea) species. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **157**, 264–294.

Sundberg P & Hylbom R. (1994) Phylogeny of the nemertean subclass Palaeonemertea (Anopla, Nemertea). *Cladistics*, **10**, 347–402.

Sundberg, P. & Strand, M. (2010) Nemertean taxonomy – time to change lane? *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **48(3)**, 283-284.

Sundberg, P.; Vodoti, E. T. y Strand, M. (2010) DNA barcoding should accompany taxonomy – the case of *Cerebratulus* spp (Nemertea). *Molecular Ecology Resources*, **10** (2), 274-281.

Strand, M. & Sundberg, P. (2005) Genus *Tetrastemma* Ehrenberg, 1831 (Phylum Nemertea) - A natural group? Phylogenetic relationships inferred from partial 18S rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37**, 144–152.

Strand, M. & Sundberg, P. (2010) A DNA-based description of a new nemertean (phylum Nemertea) species. *Marine Biology Research*, **7(1)**, 63-70.

Swofford, D. L. (2002) PAUP*. Phylogenetics analysis using parsimony (*and other methods). 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland. En <u>http://www.paup.scs.fsu.edu/</u> [consultado el 14-6-2012].

Thollesson, M. & Noremburg, J. L. (2003) Ribbon worm relationships: a phylogeny of the phylum Nemertea. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Series*, **270**, 407-415.

Turbeville, J. M. (2011) The first record of *Emplectonema gracile* (Nemertea. Hoplonemertea) on the Atlantic coast of North America. *Marine Biodiversity Records*, **4**, 1-4.

Turbeville, J. M & Smith, D. M. (2007) The partial mitochondrial genome of the *Cephalothrix rufifrons* (Nemertea, Palaeonemertea): Characterization and implications for the phylogenetic position of Nemertea. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **43**, 1056–1065.

Vernet, G. & Anadón, N. (1991) Continental shelf and litoral Nemerteans from the North and North-West Spanish Atlantic coasts. *Cahiers en Biologia Marina*, **32**, 45-56.

Wheeler, J. F. G. (1940) Nemerteans of Kerguelen and the southern ocean. *B.A.N.Z. Antarctic Research Expedition*, **IV(8)**. 235-255.

Wu, B. & Sun, S. (2006) Ammonia and urea excretion of the nemertean *Procephalothrix simulus* Iwata: effects of salinity, temperature, body weight and amputation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **337**, 13–18.

Wyjnhoff, G. (1913) Die Gattung *Cephalothrix* und ihre Bedeutung für die Systematik der Nemertinem. Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere, **34**, 291-320.

Material suplementario

Tabla S1. Especies, localidades y números de acceso de GenBank de los individuos utilizados en los análisis moleculares. Se indican los códigos y el nombre de la red de haplotipos.

Table S1. Species, localities and GenBank accession numbers of the individuals used in the molecular analysis. Labcodes and haplotype network names are indicated.

Especie	Código ¹	Localidad	Tamaño muestral	Número de acceso de GenBank	Red de haplotinos ²	Referencia
C. fasciculus	IBE-A1,	San Vicente do Mar, O	2	-	11	Presente
-	IBE-A2	Grove, Galicia. 42º 27 N, 8º 55 O.				estudio
	IBE-A3, IBE-A4	Playa de Aramar, Luanco, Asturias. 43°	2	-	11	Presente estudio
	IBE-A5	36 N, 5° 46 O. Plava de Islares	3	_	11	Presente
	hasta	Castro-Urdiales.	5		11	estudio
	IBE-A7	Cantabria. 43° 24' N, 3° 17 O				
	IBE-M1,	Puerto de Colera, Cap	2	-	11	Presente
	IBE-M2	de Creus, Cataluña. 42° 24' N, 3° 09' E.				estudio
	IBE-M3	L'illot del Faradell, Cap	23	-	11	Presente
	hasta	de Creus, Cataluña. 42º				estudio
	IBE-M25	20°16″ N, 3° 16°49″ E. Fukuo, Japón	1	GU726622	11	Chap at al
	JAP-F30	Fukue, Japon	1	GU720622	11	(2010)
	KOR2	Isla Jeju, Corea	1	GU726646	11	Chen <i>et al.</i> (2010)
	JAP-O	Oshoro, Japón	1	GU726619	11	Chen <i>et al.</i> (2010)
	JAP-SH	Shimoda, Japón	1	GU726620	11	Chen <i>et al</i> . (2010)
	JAP-SE3, JAP-SE6	Seto, Japón	2	GU726661, GU726662	11	Chen <i>et al</i> . (2010)
	ITA	Trieste, Italia	1	GU733830	11	Chen <i>et al.</i> (2010)
	CHI-C	Changdao, Shandong,	1	GU726615	11	$\begin{array}{c} (2010) \\ \text{Chen } et al. \\ (2010) \end{array}$
	USA-	San Diego, California,	1	GU726639	11	(2010) Chen <i>et al</i> .
<u> </u>	CA1	USA DI LIG CIL			24	(2010)
C. filiformis		Playa del Castiellu, Pendueles, Asturias. 43º 23' N. 4º 37 O	I	-	24	estudio
		Playa de la Furada,	1	-	24	Presente
		Muros de Nalón,				estudio
		Asturias. 43° 33' N, 6° 06' O.				
<i>C</i> . sp. A		Playa de Las Represas,	1	-	10	Presente
		Tapia de Casariego, Asturias 43º 34' N 6º				estudio
		56 O				
		Roscoff, Francia	4	GU726673- GU726676	10	Chen <i>et al</i> . (2010)
C. sp. B		Cabo Vilán, Camariñas,	1	-	23	Presente
		Galicia. 43° 10° N, 9° 10° O				estudio
		Playa Unión, Rawson,	1	-		José Elías
		Chubut, Argentina. 43°				Fernández
C rufifrons		Bonden Suecia	2	GU726713	1	Chen et al
C. 1 4/1/10/13		Bonden, Bueela	2	GU726726	1	(2010)
		Humlesäcken, Suecia	2	GU726605,	1	Chen et al.
				GU726590		(2010)
		Stångholmen, Suecia	2	GU726591-	1	Chen <i>et al</i> .
		Wembury/Salcomba	Λ	GU726592 GU726601	1	(2010) Chen <i>et al</i>
		Devon, Reino Unido	+	GU726604	1	(2010)
		Koster, Suecia	2	GU726595.	1	Chen et al.
		,		GU726738		(2010)
		Grötholmen, Suecia	2	GU726596-	1	Chen et al.
				GU726597		(2010)

	Suecia	1	EU489494	1	Turbeville &
	Suecia	1	EF140788.1	1	Smith (2007) Turbeville & Smith (2007)
	Vattenholmen, Suecia	2	GU726598- GU726599	1	Chen <i>et al.</i> (2010)
C. major	Oregon coast, E.E.U.U.	3	GU726689- GU726691	2	Chen <i>et al.</i> (2010)
C. spiralis	Mt. Desert Isl., Maine,	6	GU726697-	3	Chen et al.
	E.E.U.U.		GU726700,		(2010)
			GU726705- GU726706		
	Nahant, Massachusetts,	1	GU726707	3	Chen <i>et al</i> . (2010)
	Kachemak Bay, Alaska, E.E.U.U.	3	GU726709- GU726711	3	$\begin{array}{c} (2010) \\ \text{Chen } et al. \\ (2010) \end{array}$
	Isla de San Juan, Washington, E.E.U.U.	1	GU726712	3	Chen <i>et al.</i> (2010)
	Oregon coast, E.E.U.U.	4	GU726693-	3	Chen et al.
~ *			GU726696		(2010)
C. linearis	Mar Blanco, Rusia	4	GU726649- GU726653	4	(2010) Chen <i>et al.</i>
C. filiformis	Gales, Reino Unido	1	EU489496	4	Sundberg <i>et</i>
C. sp.	Kaneohe, Hawaii	2	GU726633-	5	<u>Chen <i>et al.</i></u>
ep.	E.E.U.U.	-	GU726634	U	(2010)
<i>C</i> . sp.	Akkeshi Bay, Japón	1	AJ436945	6	Thollesson &
					Norenburg
	Seto, Japón	1	GU726663	6	$\begin{array}{c} (2003) \\ \text{Chen } et \ al. \\ (2010) \end{array}$
	Vostok Bay Mar de	3	GU726641-	6	(2010) Chen <i>et al</i>
	Japón, Rusia	5	GU726643	Ũ	(2010)
	Shimoda, Japón	1	GU726662	6	Chen <i>et al.</i> (2010)
<i>C</i> . sp.	Bocas del Toro,	2	GU726677,	7	Chen et al.
	Panamá		GU726679	-	(2010)
	Carrie Bow Cay, Belice	I	GU/26682	7	(2010)
<i>C</i> . sp.	Sakhalin island, Rusia	1	GU726607	8	Chen <i>et al.</i> (2010)
	Qingdao, Shandong,	2	GU726624,	8	Chen et al.
	China Deterr the Creat Dev	1	GU726618	0	(2010) Chan at al
	Rusia	1	00/20008	0	(2010)
<i>C</i> . sp.	Starfish Bay, Hong	2	GU726611,	9	Chen et al.
	Kong, China		GU726613		(2010)
	Qingdao, Shandong,	4	GU726626,	9	Chen <i>et al</i> . (2000) Chen
	China		EI594739 1		(2009), Chen et al. (2010)
			NC_012821.1		
	Changdao, Shandong,	1	GU726614	9	Chen et al.
	China Shanghan Cuanadana	1	CU726610	0	(2010) Chan at al
	China	1	00720010	9	(2010)
	Isla Dachen, Zhejiang,	1	GU726617	9	Chen et al.
	China			0	(2010)
	Isla Jeju, Corea	1	GU/26644	9	(2010)
C. filiformis	Oshoro, Japón	1	GU726637	12	Chen <i>et al.</i> (2010)
	Akkeshi Bay Janón	2	GU726635-	12	(2010) Chen <i>et al</i>
	Tracisin Duy, supon	-	GU726636	12	(2010)
	Akkeshi Bay, Japón	1	AJ436944	12	Thollesson &
					Norenburg (2003)
<i>C</i> . sp.	Roscoff, Francia	2	GU726670-	13	Chen et al.
	a		GU726671		(2010)
<i>C</i> . sp.	Sanya, Hainan, China	2	GU726629-	14	Chen <i>et al.</i> (2010)
<i>C</i> . sp.	Armintza, Bizkaia,	1	GU726616	16	Chen et al.
-	Euskadi				(2010)
<i>C</i> . sp.	Bocas del Toro, Panamá	1	GU726680	17	Chen <i>et al.</i> (2010)
<i>C</i> . sp.	Bocas del Toro,	1	GU726681	18	Chen et al.

	Panamá				(2010)
<i>C</i> . sp.	Seto, Japón	1	GU726667	19	Chen <i>et al.</i> (2010)
<i>C</i> . sp.	Seto, Japón	1	GU726666	20	Chen <i>et al.</i> (2010)
<i>C</i> . sp.	Vietnam	1	GU726621	21	Chen <i>et al.</i> (2010)
<i>C</i> . sp.	Fukue, Japón	1	GU726623	22	Chen <i>et al.</i> (2010)
C. spiralis	Isla de San Juan, Washington, E.E.U.U.	1	AJ436946	25	Thollesson & Norenburg (2003)
Outgroup					
T. banyulensis	Playa de Las Represas, Tapia de Casariego, Asturias. 43° 34' N, 6° 56 O	1	-	-	Presente estudio
	L'illot del Faradell, Cap de Creus, Cataluña. 42° 20'16" N, 3° 16'49" E.	1	-	-	Presente estudio
Carinina plecta	Lago Hamanako, Honshu, Japón	1	EU489493	-	Sundberg et al. (2009)
Carinina ochracea	58°53'124"N, 11°07'275"E	1	EU489492	-	Sundberg et al. (2009)
T. annulatus	Tjärnö , Koster area, Skagerak, Suecia	2	HQ848622	-	Andrade <i>et</i> <i>al.</i> (2011)
	-		EU489497	-	Sundberg et al. (2009)
T. lutescens	-	1	EU489498	-	Sundberg et al. (2009)
T. pellucidus	Cattle Point, Isla de San Juan, Washington, E.E.U.U.	1	HQ848625	-	Andrade et al. (2011)
T. polymorphus	Cattle Point, Isla de San Juan, Washington, E.E.U.U.	1	HQ848621	-	Andrade <i>et al</i> . (2011)
T. punctatus	Vostok Bay, Mar de Japín, Rusia	2	AJ436947	-	Thollesson & Norenburg (2003)
	Pea Island, North Carolina, E.E.U.U.		HQ848624	-	Andrade <i>et</i> <i>al.</i> (2011)
T. rhabdotus	Fort Pierce, E.E.U.U.	1	AJ436948	-	Thollesson & Norenburg (2003)
T. sexlineatus	Isla de San Juan, Washington, E.E.U.U.	2	AJ436949	-	Thollesson & Norenburg (2003)
	Elliott Bay Marina, Dock N, Seattle, Washington E E U U		HQ848623	-	Andrade <i>et al.</i> (2011)



Fig. S1. Red de haplotipos, construida con TCS 1.18. **Fig. S1.** Haplotype network, constructed with TCS 1.18.



Fig. S2. *Tubulanus banyulensis*. A) Ejemplar completo. B) Parte anterior en visión dorsal. C) Detalle de la cabeza.

Fig. S2. *Tubulanus banyulensis*. A) Entire exemplar. B) Anterior fragment in dorsal view. C) Magnification of the head