



Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco
Facultad de Ciencias Naturales

Lugar de trabajo: Centro Nacional Patagónico, CENPAT-CONICET

**Caracterización molecular, genética poblacional y relación biológica del
nemertino *Malacobdella arrokeana* endocomensal de la almeja gigante
Panopea abbreviata.**

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad
Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

Lic. José Elías Fernández Alfaya

Director de tesis: Dr. Gregorio Bigatti

Co directora: Dra. Annie Machordom

Puerto Madryn, 2014

Caracterización molecular, genética poblacional y relación biológica del nemertino *Malacobdella arrokeana* endocomensal de la almeja gigante *Panopea abbreviata*.

Resumen.

Malacobdella arrokeana Ivanov *et al.*, 2002 es un nemertino que vive en la cavidad del manto de la almeja gigante *Panopea abbreviata*, ambas especies endémicas del Mar Argentino. Mediante la secuenciación y análisis del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI), se corroboró que *M. arrokeana* diverge genéticamente de *M. grossa* en un 11,6%, y 10,4% con respecto a *M. japonica*. Tanto *M. arrokeana* como *P. abbreviata* comparten el mismo nivel trófico y los mismos ítems alimentarios, compuestos en su mayoría por microalgas, diatomeas y pequeños crustáceos. Se registró la posición de *M. arrokeana* dentro de la cavidad del manto de *P. abbreviata* y la morfología de las estructuras utilizadas en la alimentación (probóscide y faringe). Ambas estructuras están compuestas de papilas que recubren toda su extensión. Por un lado la probóscide está compuesta por papilas con dos tipos de células glandulares diferentes, uno en la porción basal y otro tipo en la porción distal, en forma de “cepillo”, posiblemente con capacidad de secreción, mientras que las papilas de la faringe son evaginaciones del tegumento recubiertas de cilias. A partir de estos resultados se proponen dos mecanismos complementarios de alimentación en *M. arrokeana*, 1) de sucesivas contracciones musculares de la faringe que provocan una corriente incurrente hacia el esofago donde las partículas pequeñas son retenidas por la acción de las papilas de ambas estructuras (faringe y probóscide) y otro para la captura de partículas de mayor tamaño directamente con la probóscide. Se confirma que *M. arrokeana* no se alimenta del tejido de *P. abbreviata*. La población de *M. arrokeana* del golfo San José posee un ciclo reproductivo con desoves parciales a lo largo del año y un pico marcado durante el mes de septiembre. Este ciclo está dividido en dos etapas una de desarrollo gonadal y crecimiento del individuo (aumento de talla media, Lt), que dura 4 meses durante la época otoño - invierno, y una fase de reproducción que corresponde a la primavera acompañada de un descenso en la Lt de los individuos. Este descenso y el posterior aumento del Lt, durante

los siguientes cuatro meses primaverales, podrían indicar una estrategia semélpara de reproducción. Se logró obtener en condiciones de laboratorio larvas de *M. arrokeana* de 4 semanas de edad; esta larva es planuliforme, planctónica y no se alimenta, al igual que las larvas de otros hoplonemertinos conocidos. Se propone que el asentamiento de las larvas dentro de *P. abbreviata* podría ser a través de dos mecanismos complementarios, 1) por una retención larvaria dentro de los láminas branquiales de *P. abbreviata*, y 2) de re-infección por parte de larvas exógenas. El análisis de 4 poblaciones de *M. arrokeana* que habitan los golfos norpatagónicos (San Matías, San José y Nuevo), mostraron una escasa variabilidad en su estructura genética ($F_{st} = 0$) comparando porciones de los genes COI, ARNr 16S, y el marcador molecular ITS2. La escasa variabilidad podría ser causada por una falta de barreras naturales al flujo génico, la vida planctónica de las larvas (30 días) y un posible proceso de selección sobre los haplotipos comunes en las poblaciones. Con toda la información obtenida en esta tesis se propone que *M. arrokeana* presenta una asociación de tipo comensal, donde la especie encuentra en el hospedador, refugio y alimento, sin provocarle daños a *P. abbreviata*.

Palabras claves: Nemertea, *Malacobdella*, *Panopea abbreviata*, variabilidad genética, mecanismos de alimentación, isótopos estables, morfología de la probóscide, reproducción, desarrollo larval.

Abstract.

Malacobdella arrokeana Ivanov et al., 2002 is a nemertean living in the mantle cavity of the giant clam *Panopea abbreviata*, both endemic of the Argentine Sea. Using a portion of the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase I (COI), *M. arrokeana* showed a genetic divergence of 11.6% compared to *M. japonica* and 10.4% with respect to *M.grossa*. *M. arrokeana* and *P. abbreviata* share the same trophic level and the same food items, consisting mostly of algae, diatoms and small crustaceans. Through live observation of the position of *M. arrokeana* within the mantle cavity of *P. abbreviata* and the morphology of the structures used in feeding (proboscis and pharynx), it was observed that both structures are covered by papillae. Papillae's proboscis are composed of two different cellular types, one situated in the basal portion and the other cells from the distal portion with "brush" form, with possible secretion capacity. Meanwhile papillae's pharynx are evaginations of the tegument covered by cilia. Two complementary feeding behavior are proposed, 1) by successive muscle pharynx contractions that cause a water inward current into the pharynx, and small particles are retained by the action of papillae of both structures (pharynx and proboscis) and 2) using the proboscis to capture bigger particles stucked on the gill surface ("gill brushing"). The results obtained confirm, that *M. arrokeana* do not feeds on *P. abbreviata* tissues. *M. arrokeana* has a reproductive cycle with partial spawning events along the year and a marked peak spawning during September. The seasonal cycle of *M. arrokeana* can be roughly divided into two phases: the individual growth, followed by gonad development and the reproductive phase. The first one begins with an increase in average length size (Lt) and gonad maturing, during fall autumn and winter (four months), and the other phase corresponding to the spawning that begins in September and continues during spring and early summer. The decline and subsequent rise of mean population Lt, and the increase in the percentages of multiinfections during the next four spring months, might be indicating a semelparous reproductive strategy. Larval development was described for the first time for *M. arrokeana*. A four weeks planuliform, planktonic and not feeding larvae was obtained in laboratory conditions. Two complementary larval settlement mechanisms are proposed 1) by a larval retention in the host

lamellae gills, and 2) re-infection by the exogenous larvae (formed outside the host), probably mediated by a host signal cue. The analysis of the four populations of *M. arrokeana* living the north Patagonian gulfs (San Mafias, San José and Nuevo), showed no genetic difference among populations ($F_{st} = 0$) comparing portions of genes COI, 16S rRNA, and ITS2. The low variability registered may be explained by the lack of natural barriers to gene flow, long planktonic larval life (four weeks) and a possible selection process on common haplotypes in populations. Based on the results obtained, *M. arrokeana* presents a commensal association. *M. arrokeana* living into the host, obtain shelter and secure food source and not causing several damage to the host.

Keywords: Nemertea, *Malacobdella*, *Panopea abbreviata*, genetic variability, feeding behavior, stable isotopes, proboscis morphology, reproduction, larval development.

TABLA DE CONTENIDOS

ANTECEDENTES	1
<u>ÚLTIMOS AVANCES EN LA SISTEMÁTICA DE NERTINOS</u>	5
<u>MALACOBDELLA ARROKEANA IVANOV, BIGATTI, PENCHASZADEH Y NORENBURG, 2002</u>	14
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
PARTE EXPERIMENTAL Y TRABAJO DE CAMPO	20
INTRODUCCIÓN	20
<u>Área de Estudio</u>	20
<u>Biogeografía</u>	21
OBTENCIÓN DE MUESTRAS	23
<u>FOTOGRAFÍA Y MICROSCOPIA ÓPTICA</u>	26
<u>Microscopía electrónica de barrido (MEB)</u>	26
CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE MALACOBDELLA ARROKEANA	27
INTRODUCCIÓN	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
<u>Caracterización genética de Malacobdella arrokeana</u>	32
<u>Amplificaciones y análisis de secuencias</u>	33
<u>Programas utilizados</u>	34
RESULTADOS	35
<u>Caracterización genética de M. arrokeana</u>	35
DISCUSIÓN	38
<u>Caracterización genética de M. arrokeana</u>	38
DIETA Y POSICIÓN TRÓFICA DE M. ARROKEANA	40
INTRODUCCIÓN	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
<u>Estudio de la dieta mediante métodos directos</u>	45
<u>Determinación del contenido estomacal de M. arrokeana y P. abbreviata</u> ..	45
<u>Estudio de la dieta mediante métodos indirectos</u>	46
<u>Análisis de Isótopos Estables ¹³C y ¹⁵N</u>	46
RESULTADOS	49
<u>Estudio de la dieta mediante métodos directos</u>	58
<u>Estudio de la dieta mediante metodos indirectos</u>	61
<u>Análisis de Isótopos Estables δ¹³C y δ¹⁵N</u>	61
DISCUSIÓN	63
REPRODUCCIÓN Y DESARROLLO LARVAL	67
INTRODUCCIÓN	67
MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
<u>Muestreo</u>	73
<u>Desarrollo Larval</u>	74
<u>Acuarios</u>	74

<u>Fecundación in vitro</u>	75
<u>Experiencias de alimentación</u>	76
RESULTADOS	77
<u>Reproducción</u>	77
<u>Estudio histológico del ciclo gonadal</u>	79
<u>Machos</u>	83
<u>Hembras</u>	84
<u>Desarrollo larval</u>	87
<u>Estadios larvales</u>	87
<u>Experiencia de alimentación</u>	91
DISCUSIÓN	92
<u>Reproducción</u>	92
<u>Desarrollo larval</u>	96
<u>Metamorfosis y Asentamiento</u>	96
GENÉTICA POBLACIONAL	101
INTRODUCCIÓN.....	101
<u>Fuerzas evolutivas</u>	101
<u>Estructura genética de la población</u>	102
<u>Marcadores Moleculares</u>	102
<u>Redes haplotípicas</u>	105
<u>Aislamiento por distancia: Test de Mantel</u>	106
<u>Neutralidad versus Selección: Prueba de Tajima</u>	106
<u>Estasis versus expansión poblacional: Distribución mismatch</u>	107
<u>Genética de poblaciones en nemertinos</u>	108
MATERIALES Y MÉTODOS.....	109
<u>Recolección de muestras y extracción de ADN</u>	109
<u>Amplificación de fragmentos por PCR, secuenciación y análisis de las</u> <u>secuencias</u>	109
<u>Tratamiento de datos</u>	110
RESULTADOS.....	111
DISCUSIÓN	115
DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS.....	119
CONCLUSIONES	126
BIBLIOGRAFÍA.....	128
ANEXO	151
TRABAJOS PUBLICADOS	153

Antecedentes y objetivos

Antecedentes

Introducción

El phylum Nemertea es un grupo de gusanos con el cuerpo aplanado, en su mayoría marinos, con unas pocas especies que habitan en ambientes límnicos y algunas de ambiente terrestre. Muchos nemertinos de aguas someras viven debajo de conchas y rocas, sobre algas o son infaunales, mientras que otros, como las especies del género *Malacobdella* son endocomensales que habitan en la cavidad del manto de bivalvos (Ruppert *et al.* 2004). Con cerca de 1280 especies descritas (Gibson 1995; Kajihara *et al.* 2008; Andrade *et al.* 2012), el phylum Nemertea posee una gran variedad de formas y colores, comprendiendo desde el metazoo más largo conocido, *Lineus longissimus*, que puede medir más de 30 metros (Ruppert *et al.* 2004), hasta una gran cantidad de pequeños animales que son importantes componentes de la meiofauna, como los géneros *Ototyphlonemertes* y *Cephalotrix* (Norenburg 1988). La característica más importante de este grupo es su probóscide evertible que utilizan en la captura de sus presas, la que en algunos casos es mucho más larga que el propio animal. Esta probóscide (Fig. 1.1) está contenida dentro de una cavidad celómica llamada rincocela, y junto con el rincocelo, forman el aparato proboscideo, carácter sinapomórfico único en este phylum. Esta estructura puede ser armada (con estilete) o inerme (sin estilete).

La posición de la boca en relación con el poro de la probóscide es una característica taxonómica importante para distinguir las principales clases de nemertinos. En Paleo y Heteronemertinos, la boca y la probóscide comunican al exterior por poros separados, mientras que la mayoría de los Hoplonemertinos monostilíferos (con excepciones como los Duosnemertes) (Andrade *et al.*, 2012), la boca y el poro de la probóscide comparten un espacio común, antes de comunicarse con el exterior (Fig. 1.2).

La clasificación de nemertinos está en constante cambio, tanto a nivel intra-phylum, como en lo que se refiere a su posición dentro de los metazoos. Schultze (1851) fue el primero en entender correctamente la estructura y la función del complejo proboscideo, acuñando el término Rhynchocoela para el grupo.

Posteriormente, Schultze (1852 - 1853) propone los subórdenes Anopla y Enopla, basado en la ausencia o presencia de estiletes en la probóscide, respectivamente. Schultze, así como muchos otros autores antes y después de él, consideraron a los nemertinos como turbelarios con probóscide. Esta estrecha relación artificial con los platelmintos prevaleció hasta finales del siglo XIX. No fue sino hasta mediados de 1900 que el taxón se analizó como un phylum en sí mismo (por ejemplo, Coe 1943; Hyman 1951). Stiasny-Wijnhoff (1923, 1936) propuso una clasificación del grupo más inclusiva, que ha seguido siendo válida para la mayoría de los autores posteriores (ej. Coe 1943; Gibson 1994; Ax 1996; Ruppert *et al.* 2004). Estos autores mantienen las dos grandes divisiones propuestas anteriormente, pero le dan el estatus taxonómico de clase a Anopla (sin estilete) y los dividen en dos órdenes, Paleonemertea y Heteronemertea. Lo mismo sucede con Enopla (con uno o más estiletes) también en dos órdenes Hoplonemertea y Bdellonemertea. A su vez, los Hoplonemertinos están divididos en dos subórdenes Monostilífera (un estilete) y Polistilífera (más de un estilete accesorio, Fig. 1.1), este último a su vez, dividido en tribus Reptantia y Pelágica (por su modo de vida, bentónico y pelágico respectivamente). El grupo Bdellonemertea será tratado con mayor detalle más adelante.

Desde la década de 1980 han aparecido varios análisis cladísticos estudiando las relaciones internas del phylum Nemertea (Sundberg 1985; 1990; Sundberg y Hylbom 1994; Sundberg y Svensson 1994; Härlin y Sundberg 1995; Härlin y Härlin 2001; Maslakova y Norenburg, 2001; Schwartz y Norenburg 2001; Sundberg *et al.* 2003), con el objetivo de conocer la ubicación filogenética del phylum en Bilateria (Norenburg, 1985; Turbeville y Ruppert 1985; Turbeville 1986) y dentro de los Metazoos (Schram 1991; Eernisse *et al.* 1992; Nielsen *et al.* 1996).

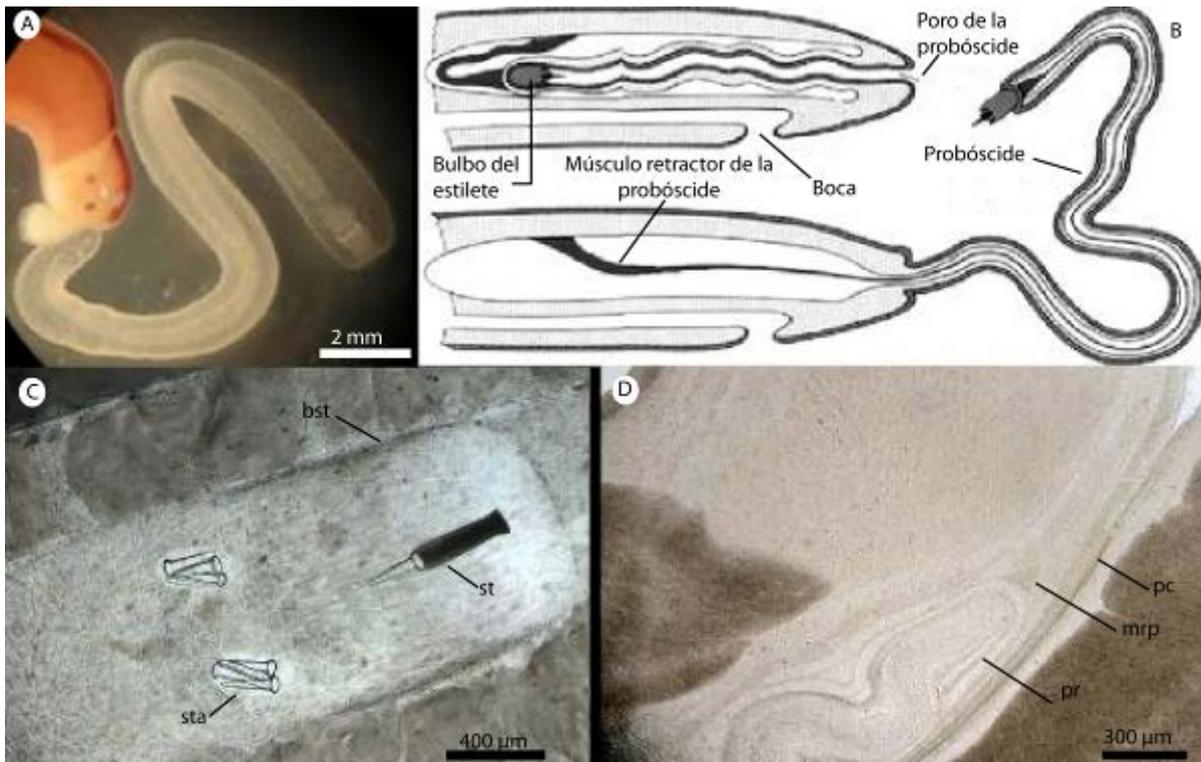


Fig.1. 1. A. Estructura de la probóscide, *Nemertopsis bivittata* con probóscide evertida, B, Detalle del aparato proboscideo (modificado de Ruppert *et al.* 2004). C. Detalle del estilete (st) de *Emplectonema echinodermata*, D. Detalle del músculo retractor de la probóscide (mrp) en *Zigonemertes sp.* Abreviaturas: bst = bulbo del estilete, pc = pared del cuerpo, pr = probóscide, sta. = estiletes accesorios. Todas las especies fotografiadas fueron obtenidas durante esta tesis.

Sin embargo, las relaciones entre las especies eran difíciles de definir basados sólo en la morfología, debido a su anatomía (cuerpo blando), la mala fijación de los ejemplares depositados en los museos y al alto grado de homoplasia observado en los caracteres del Phylum (Sundberg y Svensson 1994; Schwartz y Norenburg 2001; Sundberg *et al.* 2009). Con la llegada de la sistemática molecular, los nemertólogos rápidamente probaron las afinidades filogenéticas del phylum con los celomados (ej. Turbeville *et al.* 1992; Winnepenninckx *et al.* 1995; Giribet *et al.* 1996), así como relaciones entre ciertas especies seleccionadas. A partir de ahí, hubo una serie de artículos centrados en las relaciones genéticas y la genética de poblaciones de especies estrechamente relacionadas (Envall 1997; Envall y Sundberg 1998; Sundberg y Saur 1998; Strand y Sundberg 2005a, b; Mateos y Giribet 2008; Chen *et al.* 2010; Andrade *et al.* 2011; Alfaya *et al.* 2013), mientras que otros utilizaron los datos moleculares para estudios de taxonomía descriptiva (ej. Sundberg *et al.*

2003; Junoy *et al.* 2010; Puerta *et al.* 2010; Strand y Sundberg 2011), a menudo utilizando fragmentos de uno o dos marcadores moleculares.

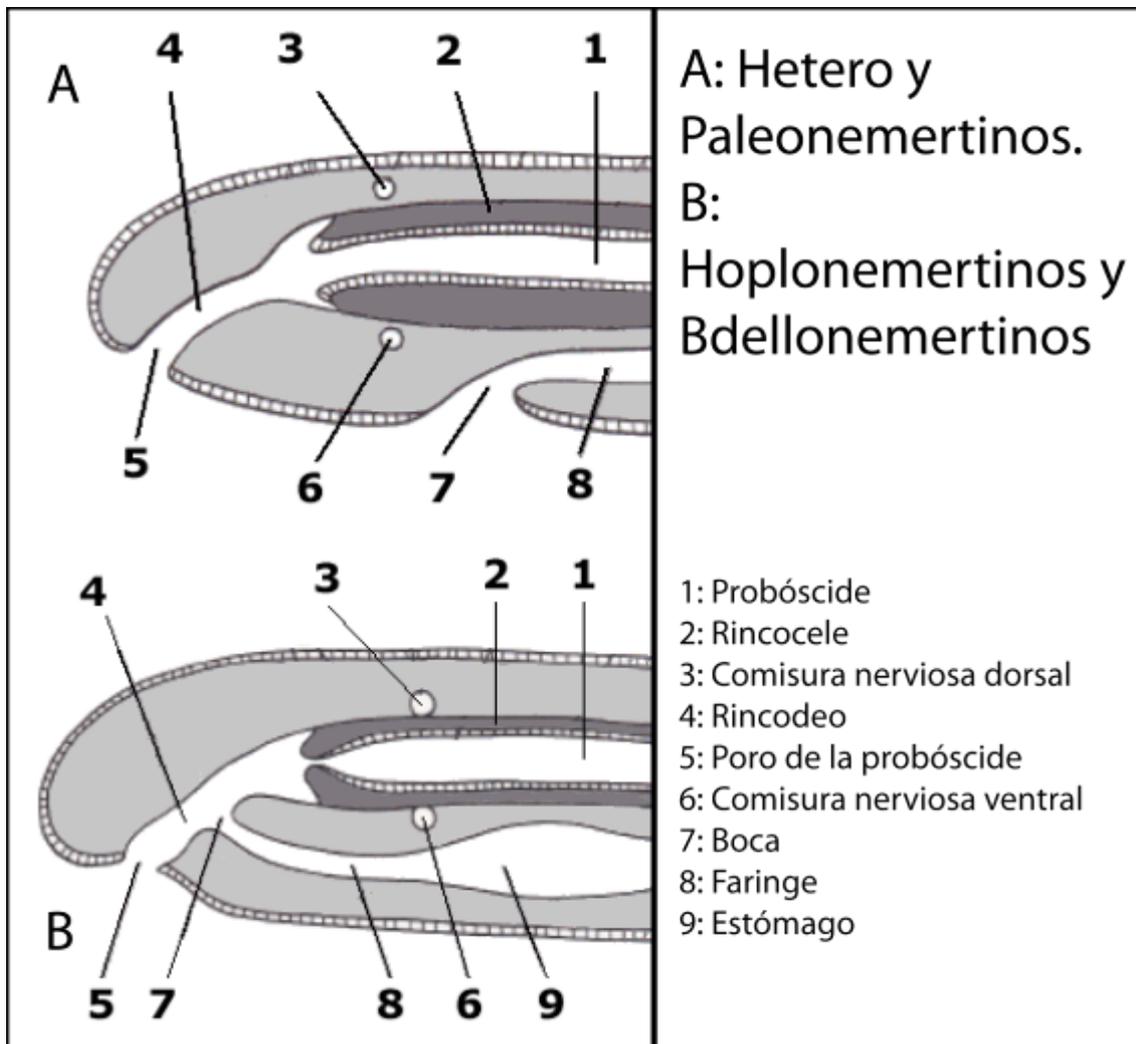


Fig. 1.2. Características morfológicas más distintivas de los órdenes más importantes del phylum. Modificado de Ruppert *et al.* (2004).

Últimos avances en la sistemática de nertinos.

A principios de este siglo se realizaron algunos trabajos para esclarecer la taxonomía de los grupos más representados dentro de los nemertinos, los últimos y de mayor importancia fueron los realizados por Thollesson y Norenburg (2003) y Andrade *et al.* (2012). En estos trabajos se hicieron los análisis filogenéticos más completos del phylum por medio de seis marcadores moleculares, corroborando las relaciones entre los niveles taxonómicos más altos.

Los cambios más importantes en la taxonomía del grupo fueron los siguientes: Ruppert *et al.* (2004) trataron a Paleonemertea como un grupo monofilético; en cambio, Thollesson y Norenburg (2003) lo consideran como parafilético y basal (conteniendo a los antepasados de los clados más recientes). Los integrantes de la clase Anopla ("desarmada") son considerados polifiléticos (incluyendo grupos con diferentes posiciones en el árbol filogenético), mientras que las especies de la clase Enopla ("armados") son considerados monofiléticos por ambos grupos de investigadores.

Como dato más relevante para esta tesis, Bdellonemertea siempre ha sido considerado como un clado separado de Hoplonemertea (Ruppert *et al.* 2004), sin embargo a partir de los trabajos de Thollesson y Norenburg (2003) y más recientemente Andrade *et al.* (2012), se cree que Bdellonemertea es parte de la sub clase Monostilifera (con un estilete), que está dentro de Hoplonemertea, lo que implica que "Enopla" y "Hoplonemertea" son sinónimos y el nombre Bdellonemertea, deja de ser válido. La subclase Polistilífera (con muchos estiletos accesorios) sigue siendo considerada como monofilética (Thollesson y Norenburg 2003; Ruppert *et al.* 2004; Andrade *et al.* 2012). Como resultado, los órdenes de la clase Enopla se renombraron en Monostilífera y Polistilífera, dentro de la sub clase Hoplonemertea. (Fig. 1.3).

A pesar de sus constantes cambios a nivel taxonómico, el aparato proboscídeo continua siendo la característica distintiva más importante del phylum y es considerado el punto de partida para cualquier ordenamiento. Su estructura y su función son determinantes a la hora de reconocer a las distintas especies del grupo. En cuanto a su estructura, existe una gran variedad de formas, desde simple con un único estilete (monostilíferos), hasta con muchos

de ellos (polistilíferos), así como también algunas especies con probóscide ramificada (Fernandez Alvarez y Anadon 2012, Fig. 1.4), sin estilete y otras recubiertas con papilas y mucus, con toxinas y sin toxinas (Brusca y Brusca 2003; Ruppert *et al.* 2004).

La función primordial de la probóscide es la alimentación, y su estructura ha cambiado a lo largo de la evolución, según las necesidades ó funciones que desarrolle. Por ejemplo la probóscide de las especies del género *Carcinonemertes* (depredador de huevos de cangrejos), es muy corta, ya que no necesita una estructura muy desarrollada por vivir sobre los huevos de los cuales se alimentan (Wickham y Kuris 1985). Por el contrario las especies del género *Lineus*, poseen una probóscide muy extensa y desarrollada lo que les permite ser cazadores muy activos en el intermareal.

En el caso de los malacobdélidos, su estilete ha desaparecido posiblemente debido a su modo de vida comensal, en cambio poseen una probóscide cubierta con papilas que resulta más efectiva en la captura de plancton y pequeñas partículas, dentro de sus huéspedes (Gibson y Jennings 1969; Mc Dermott y Roe 1985).

Los nemertinos son componentes muy importantes de la meiofauna y se encuentran tanto en el intermareal como en el submareal. Su importancia ecológica ha sido estudiada en muchas especies, en relación a su interacción con otros invertebrados bentónicos (Fig. 1.5). Tal es el caso de *Carcinonemertes epialti*, un nemertino depredador de huevos del cangrejo *Hemigrapsus oregonensis* a lo largo de la costa de América del Norte (Kuris 1978). Kuris observa un incremento en la cantidad de nemertinos presentes a medida que avanzan los estadios de la muda (Kuris 1978), alterando así la biología reproductiva del hospedador. Las relaciones entre especies de este género y cangrejos han sido ampliamente estudiadas, como lo realizado por Santos y Bueno (2001), en cangrejos del género *Callinectes* y también por Shields *et al.* (1990), en cangrejos del género *Cancer* entre otros (Fleming y Gibson 1981; Shields y Kuris 1988).

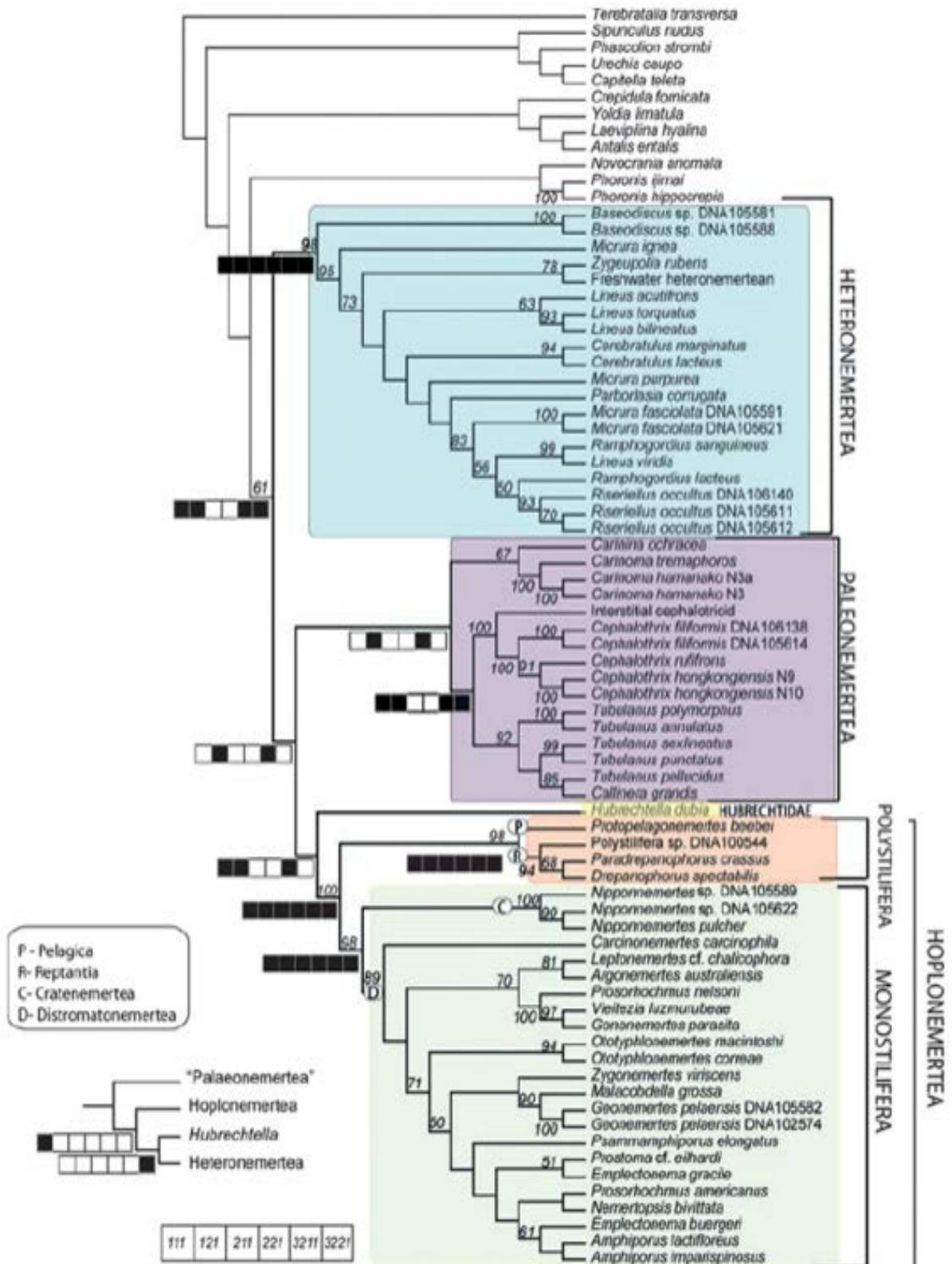


Fig.1. 3. Filogenia molecular del phylum Nematoda construida con 5 marcadores moleculares (ARNr 18S, 28S, H3, H4, ARNr 16S y COI). Tomado de Andrade et al, 2012.

El género *Gononemertes* también posee especies que mantienen una relación simbiótica con otros invertebrados, tal es el caso de *G. australiensis* en la ascidia *Pyura pachydermatina*. Gibson (1974) describe esta relación similar a la de *M. grossa*, con la diferencia de que el mayor número de nemertinos se encuentran en individuos maduros (Egan 1984a). Otro caso interesante es el de la especie hermafrodita *Vieitezia luzmurubae* en ascidias *Ciona intestinalis*, la cual utiliza el atrio de la ascidia para completar su ciclo reproductivo. La especificidad de esta especie no es tan alta como en *Malacobdella* ya que también se ha encontrado en otra especie de ascidia de la zona donde habita (Junoy *et al.* 2010) (Fig. 1.5).

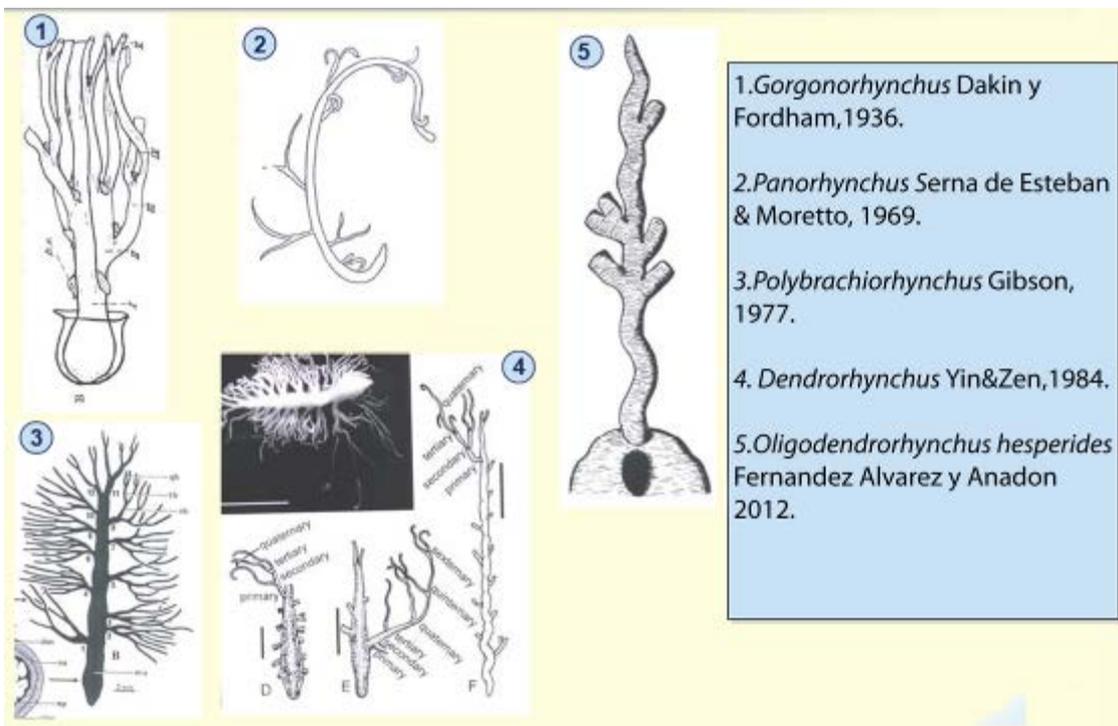


Fig. 1.4: Diversidad de probóscide ramificada de Heteronemertinos conocidos. Tomado de Fernández Álvarez y Anadón (2012)

Un caso particular de simbiosis es la que comparte la especie *Tetrastemma fozensis* con el bivalvo *Scrobicularia plana*, habitante de los estuarios del noreste de Europa. (Gibson y Junoy 1991). Este nemertino es beneficioso para su hospedador ya que su presencia evita el asentamiento de copépodos parásitos, como *Mytilicola intestinalis*, que infecta bivalvos de importancia comercial (Thiel y Zubillaga 1998). Estos autores sugieren también

que por sus características *T. fozensis* podría ser usado como bioindicador, ya que es muy sensible a condiciones de hipoxia (Thiel y Zubillaga 1998). En cuanto a los malacobdélidos existentes *Malacobdella grossa* es la especie más estudiada. Esta especie habita la cavidad del manto de al menos 27 especies diferentes de bivalvos (Gibson 1994; Jensen y Sadeghian 2005). Todas las especies de nemertinos que viven en asociación con otros invertebrados poseen características adaptativas, tanto morfológicas como fisiológicas, de ambos tipos de relaciones (parasitaria y endocomensal). Las características adaptativas, presentes en el género *Malacobdella*, se irán desarrollando a lo largo de la tesis.

En general los nemertinos son animales dioicos; existen sólo tres géneros marinos hermafroditas (*Vieitezia*, *Phrosoronchus* y *Notogaeaneimertes*), con pocas especies cada uno y algunas especies del género *Carcinonemertes* (por ejemplo *Carcinonemertes epialti*) son partenogenéticas (Roe 1986; Junoy *et al.* 2010).

Los nemertinos poseen ejemplos de las dos estrategias reproductivas más generales, semelparidad e iteroparidad. La semelparidad, implica que un organismo se reproduce una única vez en toda su vida, destinando un gran esfuerzo en la reproducción previo a la muerte del mismo (Young 1990). En la iteroparidad, en cambio, un organismo distribuye su esfuerzo reproductivo en varios momentos de su historia de vida. Por lo tanto, generalmente, la semelparidad está asociada con una estacionalidad en la reproducción y un tiempo de vida corto, mientras que la iteroparidad está asociada a una falta de estacionalidad y a periodos de vida más largos (Hendry y Berg 1999; Smith y Charnov 2001).

En nemertinos la semelparidad está ligada a organismos bentónicos y a los que poseen hábitos de vida parasitaria (Riser 1974), mientras que la iteroparidad está ligada a especies de vida libre y pelágicas (Norenburg y Roe 1998).

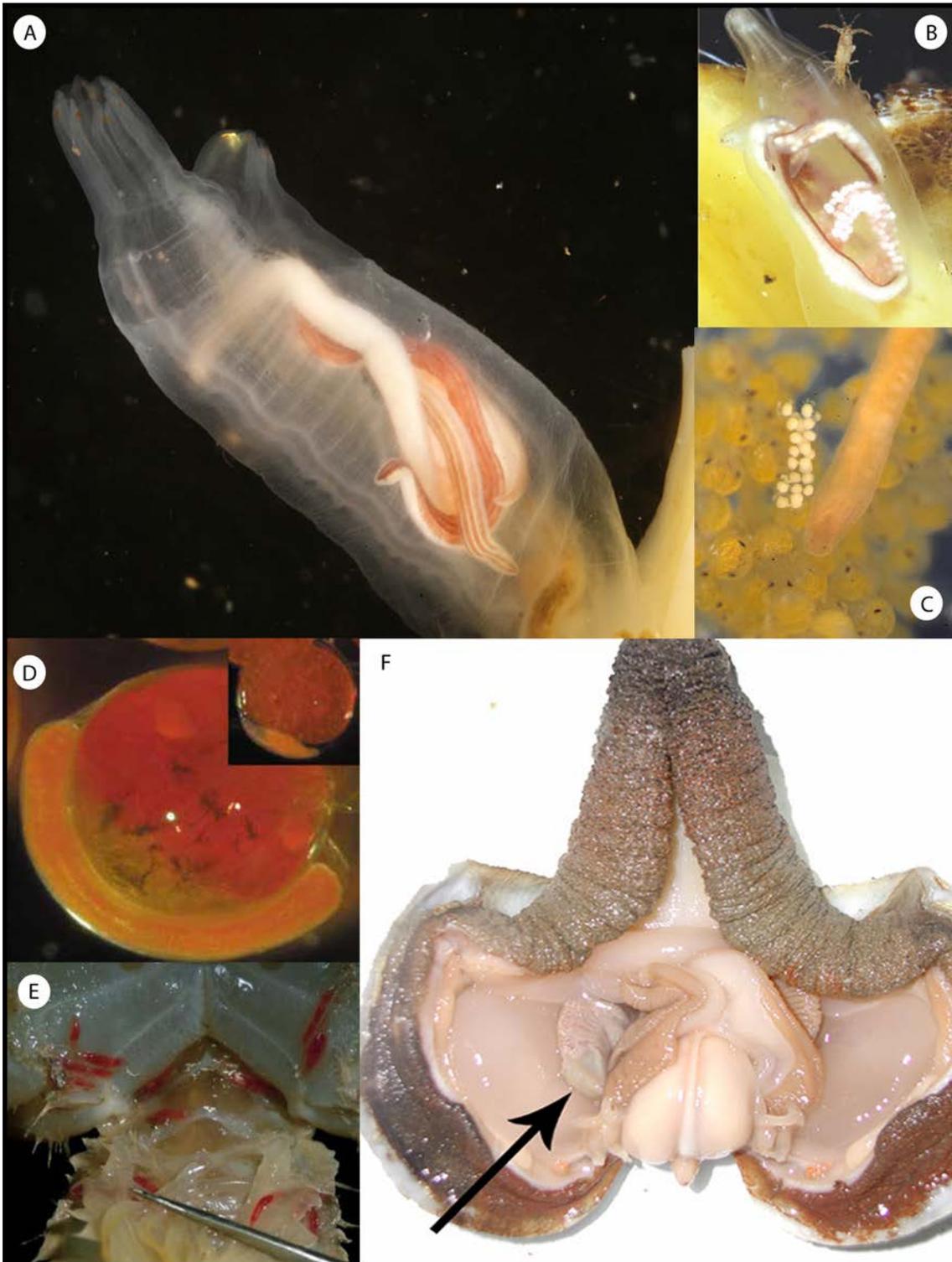


Fig.1. 5: Especies de nemertinos comensales. A - B. *Vieitezia luzmurubea* dentro de ascidia *Ciona intestinalis*. B. Hembra con huevos (Foto: Juan Junoy). C - D. *Carcinonemertes carcinophila*, sobre huevos de cangrejo (Foto C y D: Jon Nurenburg. E. *Ovicides jasoni* en pleon de cangrejo *Austinograea alayseae* (Shields y Segonzac 2007). F. *Malacobdella arrokeana*, en el bivalvo *Panopea abbreviata*.

Generalmente en este phylum, la fecundación es externa, algunas especies depositan los huevos en cápsulas mucosas, como la mayoría de los heteronemertinos, mientras que hay algunas especies que depositan sus huevos en hospedadores como las especies del género *Vieitezia* (Junoy *et al.* 2010). Las especies del orden Heteronemertea desarrollan una larva móvil planctónica denominada pilidio (Fig. 1.6), mientras que los ordenes Hoplonemertea y Paleonemertea poseen larvas planuliformes, que luego de una metamorfosis completa se transforman en juveniles; también hay algunos que son vivíparos como las especies del género *Prosorhochmus*

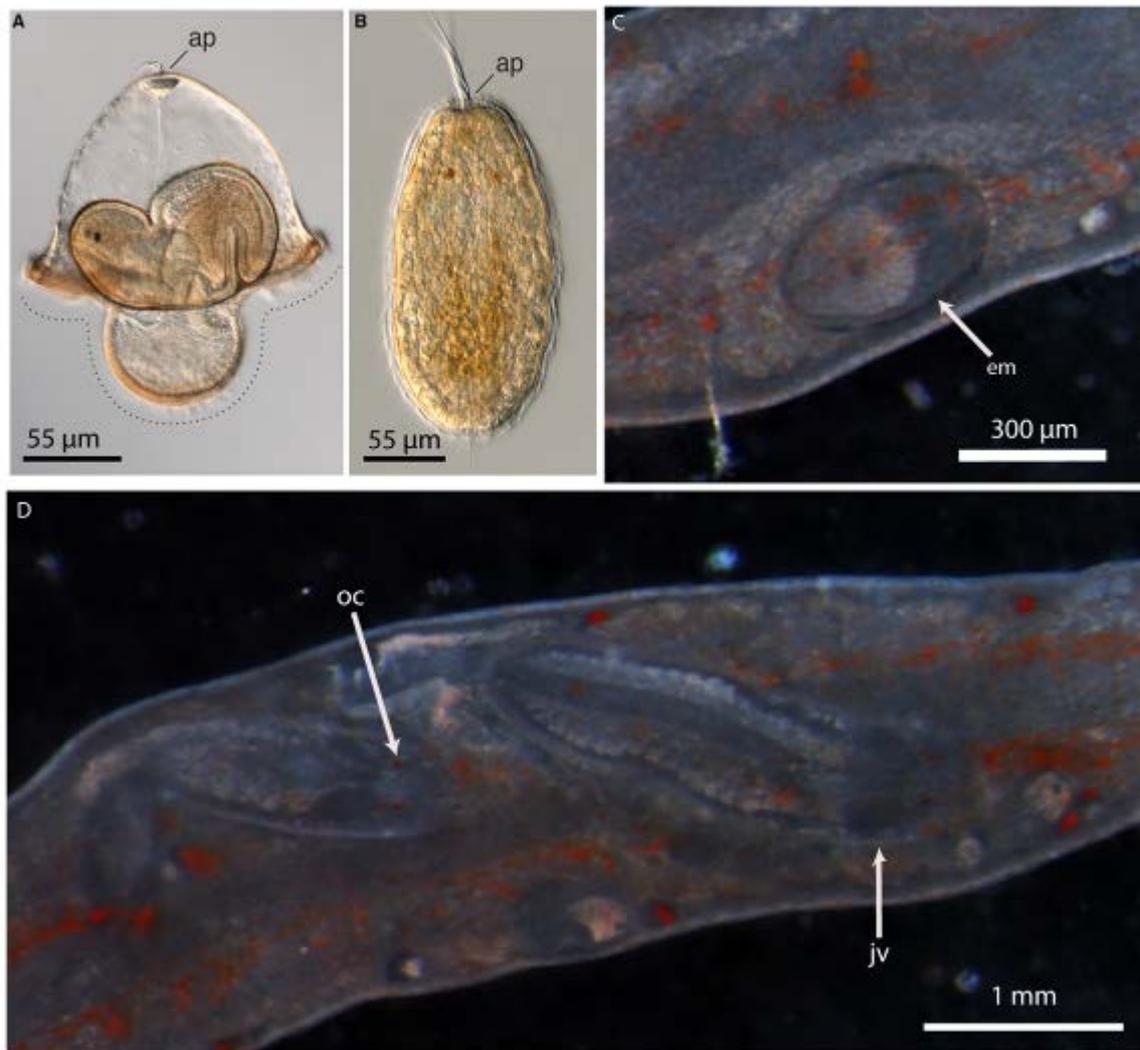


Fig. 1.6. A. Larva pilidium (*Lineus flavescens*). B. Larva planuliforme (*Pantinonemertes californiensis*) (tomado de Maslakova 2010). C y D. *Prosorhochmus claparedii* ejemplo de nemertino vivíparo. C. Ovario con embrión (em) en estadio temprano de desarrollo, D. Ovario con juveniles en estadio de desarrollo avanzado, se puede observar los ojos de los juveniles a punto de eclosionar (oc). ap = cirro apical.

Sobre la nemertofauna Argentina sólo se desarrollaron algunos trabajos en la década del 70', en algunas pocas especies de nemertinos marinos de vida libre, como lo realizado por de la Serna de Esteban y Moretto (1969a) en la albufera de Mar Chiquita (provincia de Buenos Aires), donde se describió *Panorhynchus argentinensis*, especie caracterizada por su probóscide ramificada. En pozas de marea de las costas bonaerenses aparecen juntas *Lineus bonaerensis* y *Quequenina gracilis*, registrándose también el paleonemertino *Procephalothrix quequenensis*. En la costa patagónica (prov. de Santa Cruz) y fueguina han sido documentadas en baja marea solamente *Parborlasia fueguina*, *Huiikia ushuaiensis* y *Wiotkenia friedrichi*, especies representativas de géneros que parecen ser endémicos (de la Serna de Esteban y Moretto 1968, 1969 a, b; Moretto 1970, 1971, 1974, 1998).

Luego de estos trabajos no se registró ninguna otra especie nueva en la Argentina, hasta el año 2002, donde Ivanov, Bigatti, Penchaszadeh y Norenburg (2002), describen la primera especie de malacobdélido para el hemisferio Sur (*Malacobdella arrokeana*). A partir de este descubrimiento algunos investigadores comenzaron a retomar el estudio de este phylum en nuestro país (ej. Teso *et al.* 2006; Vázquez *et al.* 2009; Alfaya *et al.* 2013). En la figura 1.7 se muestran algunas de las especies recolectadas durante esta tesis, las cuales se lograron identificar y corresponden a nuevos registros para las costas Argentinas.

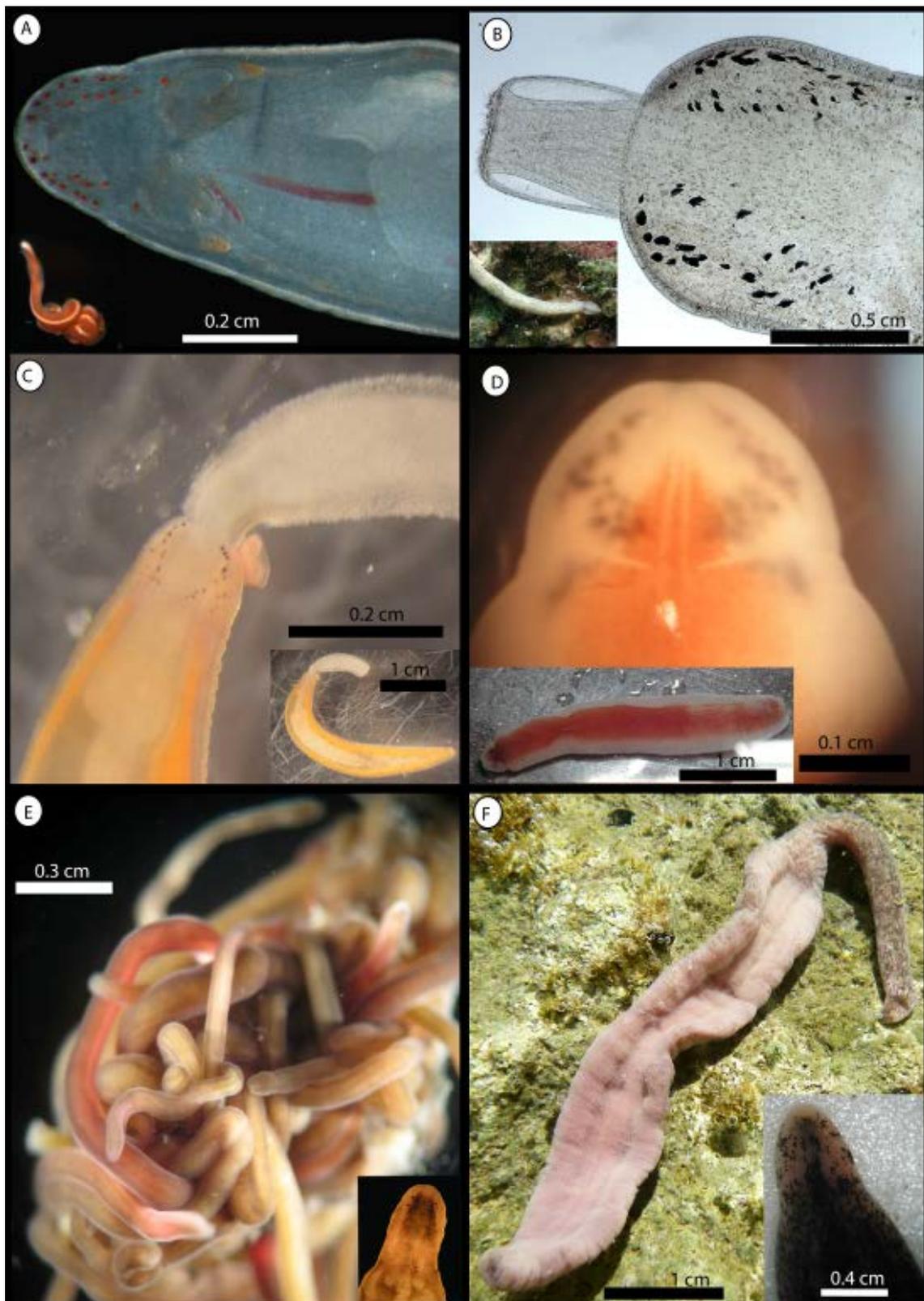


Fig. 1.7. A. Diversidad del phylum nemertea del Mar Argentino, recolectados durante esta tesis, los cuales corresponden a nuevas citas para el Mar Argentino. A. *Amphiporus allucens*. B. *Emplectonema echinodermata*. C. *Nipponnemertes* sp., D. *Nipponnemertes pulcher*, E. *Ramphogordius sanguineus*, F. *Neolineus* sp.

Malacobdella arrokeana Ivanov, Bigatti, Penchaszadeh y Norenburg, 2002.

Posición sistemática.

La sistemática del phylum, basada en información molecular (Fig. 1.3), no ha sido contrastada con estudios realizados utilizando los caracteres morfológicos en todas las especies pertenecientes a los grandes grupos en cuestión y hay puntos de vistas encontrados con respecto a la taxonomía molecular (ej. Sunberg *et al.* 2010; Kajihara *et al.* 2008). Sin embargo, la posición actual de la especie *M. arrokeana* según WoRMS (*World Register of Marine Species*) es la siguiente:

Phylum: Nemertea
Clase: Enopla Schultze, 1851
Subclase: Hoplonemertea Hubrecht, 1879
Orden: Monostilifera Brinkmann, 1917
Suborden: Eumonostilifera Chernyshev, 2003
Familia: Malacobdellidae Blanchard, 1847
Género: <i>Malacobdella</i> Blainville, 1827
Especie: <i>Malacobdella arrokeana</i> Ivanov et al., 2002

Malacobdella arrokeana, vive como endocomensal en la cavidad del manto del bivalvo *Panopea abbreviata* Valenciennes 1839 (Fig. 1.8). *M. arrokeana* presenta una marcada especificidad por su hospedador, ya que no se ha encontrado en ningún otro bivalvo de los golfos norpatagónicos (Ivanov *et al.* 2002, Vázquez *et al.* 2012) (Fig. 1.9).

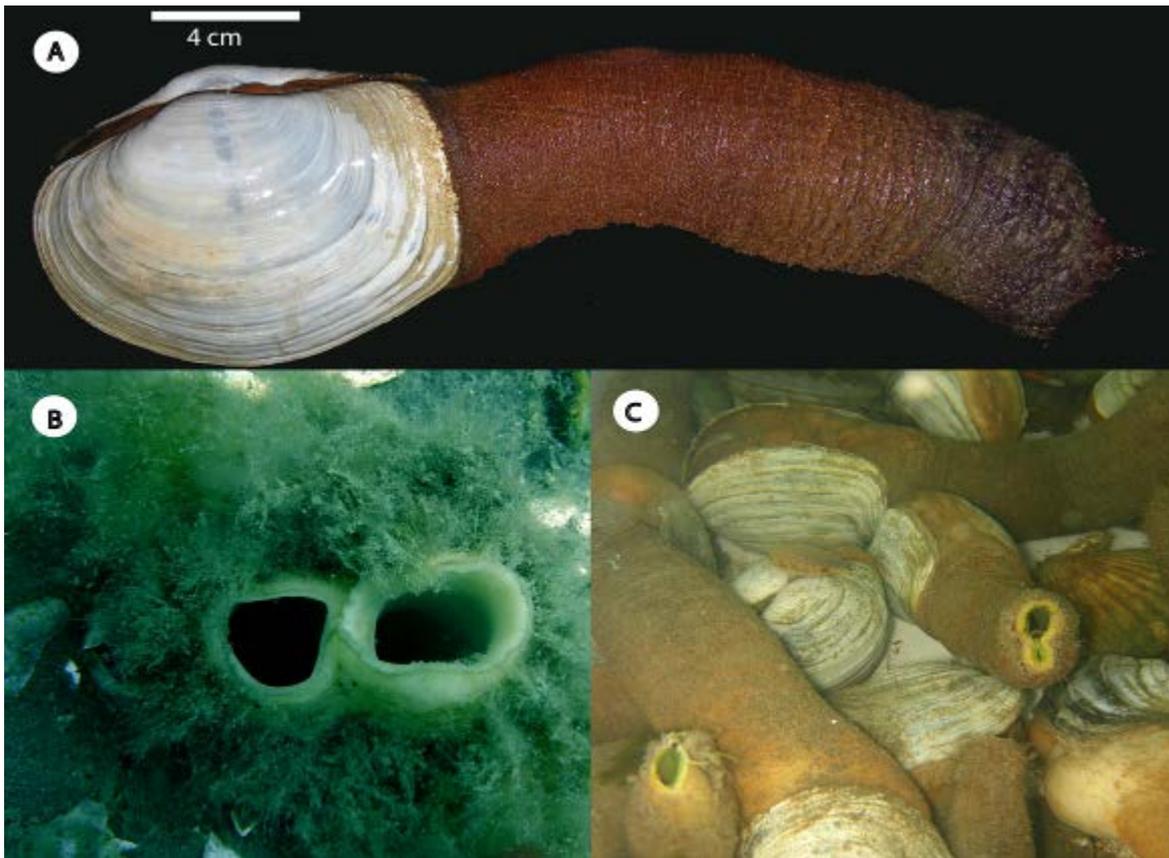


Fig. 1.8. A - C. Ejemplares de *P. abbreviata* recolectados durante este trabajo. B. Vista de sifones fusionados de *P. abbreviata* en estado natural.

La alta prevalencia de *M. arrokeana* en las poblaciones de *P. abbreviata* (100% de infestación, Teso *et al.* (2006)) es un caso poco común entre las relaciones simbióticas. Comúnmente las especies parasitas se distribuyen en forma agregada o en parches en las poblaciones hospedadoras (Wisnivesky 2003). Algunos ejemplos de distribuciones regulares en organismos son los mencionados por Bush *et al.* (2001), en parásitos del género *Gyrocotyle* (platelminto cestodario) que posee altas prevalencias. Los factores que determinan el tipo de distribución de un huésped son: 1) reducción en la probabilidad de infección por cambios ontogenéticos en la dieta o el hábitat del hospedador, 2) tasa de reclutamiento igual al de la muerte, 3) infecciones altas letales y nuevas infecciones que no prosperan por competencia intraespecífica, o 4) respuesta inmune del hospedador (Wisnivesky 2003). Sin embargo, el caso de *M. arrokeana* no se encuentra contemplado por ninguna de los mecanismos antes mencionados.

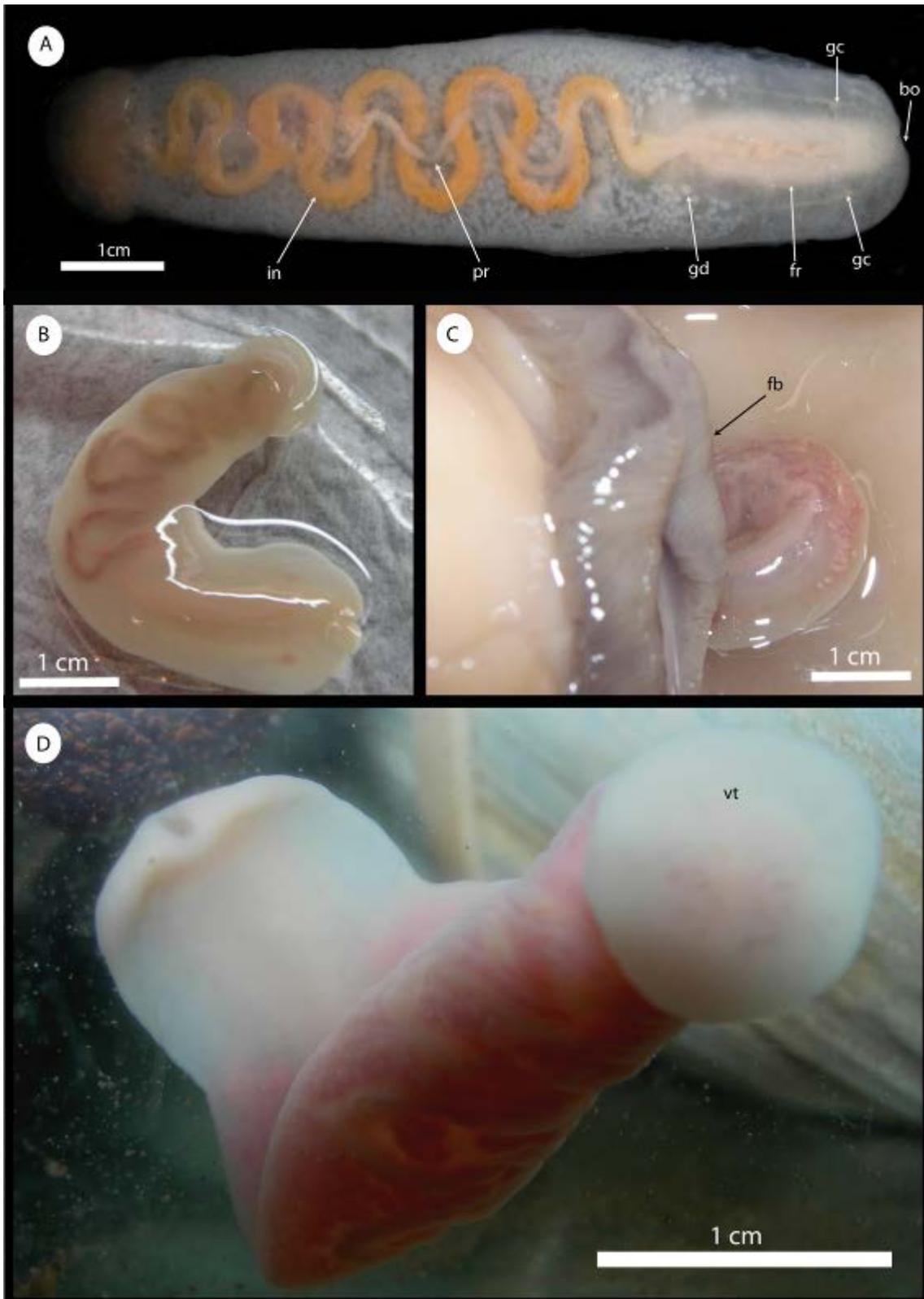


Fig. 1.9. *Malacobdella arrokeana*. A. Aspecto externo, B. Especimen fuera de su hospedador, C. Posición de *M. arrokeana* dentro de su hospedador, bajo láminas branquiales (fb). D. Hembra de *M. arrokeana* fuera de *P. abbreviata* adherida por medio de la ventosa posterior (vt). Abreviaturas: bo = boca, fr = faringe, gc = ganglios cerebrales, gd = gónadas, in = intestino, pr = probóscide.

Las poblaciones de *M. arrokeana* de los golfos norpatagónicos son abundantes, así como las del bivalvo gigante *P. abbreviata* que ha sido pescada en el norte de la Patagonia desde el año 1999 (Ciocco 2000). *P. abbreviata* es un recurso pesquero comercializado en el mercado asiático, cada bivalvo alcanza hasta 1,4 Kg. de carne (Ciocco 2000; Morsan y Ciocco 2004), pero hasta el momento no existen regulaciones pesqueras para este recurso.

En la presente tesis se estudia la estructura genética, las variables ambientales y biológicas que regulan la dispersión, la reproducción y la dieta en las poblaciones de *M. arrokeana* que habitan los golfos norpatagónicos. Con estos datos se analiza cuáles de todos estos aspectos son los más influyentes en la relación entre *M. arrokeana* y su hospedador *P. abbreviata*.

Objetivo general.

Estudiar la estructura genética, la estrategia reproductiva, el desarrollo larval, y los hábitos tróficos del nemertino *Malacobdella arrokeana*, endocomensal del bivalvo de interés comercial *Panopea abbreviata* en los golfos norpatagónicos (San Matías, San José y Nuevo).

Objetivos específicos.

1. Desarrollar y caracterizar marcadores moleculares (COI, ARNr16S y ITS2) del nemertino *Malacobdella arrokeana*.
2. Estudiar las relaciones filogenéticas entre tres especies del género *Malacobdella* (*M. arrokeana*, *M. grossa* y *M. japonica*) a través del marcador mitocondrial citocromo oxidasa I (COI).
3. Describir la dieta de *M. arrokeana* y el bivalvo *P. abbreviata* y evaluar diferencias dietarias entre ellos, mediante técnicas directas (observación de contenido estomacal) e indirectas (análisis de isótopos estables de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) en un modelo de huésped-hospedador. Específicamente se busca determinar la relación, endocomensal o parasitaria de *M. arrokeana*.
4. Estudiar bajo condiciones experimentales en acuarios el desarrollo larval de *M. arrokeana*, registrando tiempos y cambios morfológicos en su desarrollo y relacionarlo con su capacidad de dispersión.
5. Estudiar el ciclo gonádico y estacionalidad de la reproducción de *M. arrokeana* en el golfo San José.
6. Estudiar la variabilidad genética en las poblaciones de *M. arrokeana* que habitan los golfos norpatagónicos, para probar si existen diferentes *pools* genéticos relacionados con barreras oceanográficas y la historia demográfica de las especies.

Parte experimental y trabajo de campo

Parte experimental y trabajo de campo.

Introducción

Los muestreos para el desarrollo de esta tesis doctoral fueron efectuados en los golfos norpatagónicos (golfo San Matías, golfo San José y golfo Nuevo). También se hicieron muestreos en otros puntos de la costa Argentina (detallado en cada capítulo), pero siempre siguiendo la misma metodología de recolección. Debido a su alta longevidad y su endemismo, se intentó causar la menor mortalidad en las poblaciones de *Panopea abbreviata* encontradas, por lo tanto se intentó usar las mismas muestras para el desarrollo de todos los capítulos. Se extrajeron aproximadamente 350 individuos de *Panopea abbreviata* en total (6 poblaciones) y los ejemplares de *Malacobdella arrokeana* (N = 600) que se encontraban en su interior.

Área de Estudio

Los golfos norpatagónicos se encuentran ubicados en la región noreste de la provincia del Chubut entre las latitudes 41° 30' y 43° 30' S y comprenden los golfos San Matías (GSM), San José (GSJ) y Nuevo (GN). El GSM es el más extenso y más ampliamente conectado con la plataforma exterior. El GSJ es el de menor tamaño y profundidad (~40m) y se conecta con el GSM por una boca muy estrecha (~6,8 km) y profunda. El GN tiene una forma semicircular y también se conecta a la plataforma exterior por una boca relativamente estrecha (16 km). Las profundidades máximas del GSM y GN, son del orden de los 180 metros y exceden a las plataformas continentales adyacentes (Tonini y Palma 2011) (Fig. 2.1).

Las aguas que ingresan a estos golfos, tiene dos procedencias diferentes, lo cual le confieren condiciones oceanográficas bien diferenciadas, por un lado las aguas más costeras, frías y con menor salinidad provenientes del sur, fluyen en dirección norte, mientras que las aguas más cálidas y de mayor salinidad fluyen de norte a sur, (Rivas y Beier 1990). La circulación del agua en el GSM está dominada por dos masas de agua, una con giro ciclónico en el norte y otra con giro anticiclónico en el sur. Un marcado frente termohalino (Fig. 2.1) divide las aguas en dos masas con diferentes condiciones oceanográficas, una en el sur, dominada por aguas más densas y

frías, similares a la de la plataforma y otra en el norte de aguas más cálidas y de mayor salinidad (Piola y Scasso 1986). El GSJ está más influenciado por las masas de agua más frías del sur del golfo San Matías (Fig. 2.1). En ocasiones, esta masa de agua entra en el Golfo San José, haciendo que la temperatura del agua descienda, mientras que las aguas que salen se mezclan con las del sector sur del golfo San Matías (Gagliardini y Rivas 2004).

El GN se ve influenciado por las frías aguas del sur, similar a las de la plataforma. Más allá del aporte de agua desde el continente, las mareas afectan significativamente la dinámica del sistema. Las costas patagónicas están influenciadas por una amplitud de marea que corresponden a las más altas del mundo, de hasta 8m. (Glorioso y Flather 1997; Palma *et al.* 2004).

Biogeografía.

Desde el punto de vista de la biodiversidad, la región presenta una rica composición de especies de invertebrados, ya que en estas latitudes del Mar Argentino se encuentra la zona de transición entre dos Provincias Biogeográficas: la Argentina y la Magallánica (Scarabino 1977; Menni 1983, Boschi 2000). Es por ello, que es frecuente encontrar en aguas del GSM especialmente, la presencia de especies comunes a estas dos zonas. Esta riqueza de especies promueve la existencia de un complejo pesquero multiespecífico en la región, ya sea de peces como de moluscos comestibles.

La estrecha conexión que poseen estos golfos con la plataforma continental y las condiciones oceanográficas que dominan esta zona (fuertes vientos y grandes mareas), suponen una ruta de traslado de especies ya sea en sus etapas larvianas como en su estado adulto. Por este motivo conocer los movimientos de sus aguas es de suma importancia para comprender la dispersión de las especies que los habitan.

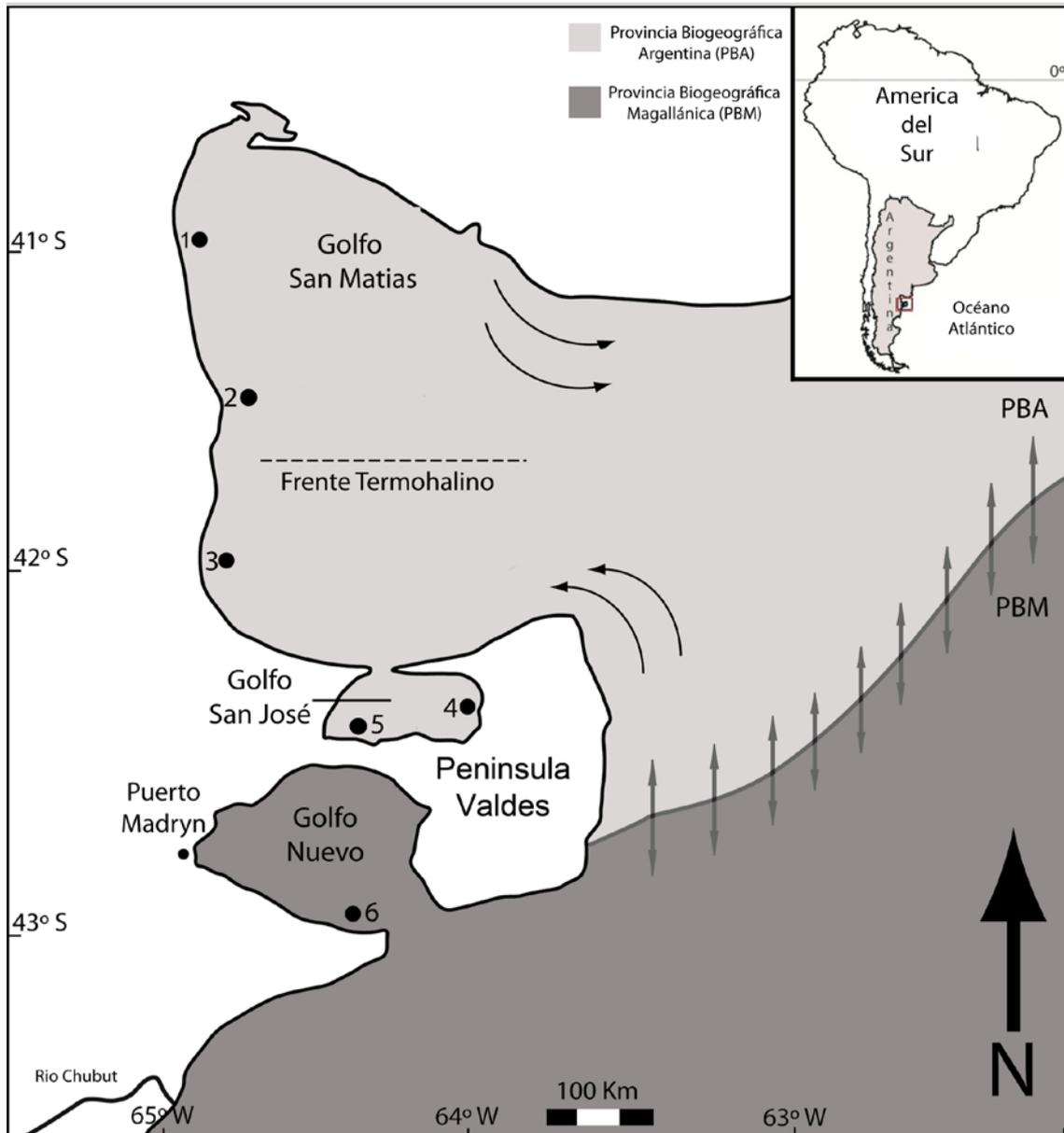


Fig. 2.1.: Golfos Norpatagónicos. Los números indican los sitios de muestreo. 1. El Sotano, 2. Playas doradas, 3. Puerto Lobos (GSM), 4. Punta Conos, 5. Playa Larralde (GSJ). 6. Bahía Craker (GN). Las flechas curvadas indican el intercambio de aguas entre la plataforma continental y los golfos. Las flechas de dos puntas indican el limite entre las dos provincias biogeográficas y la mezcla de sus aguas.

Obtención de muestras

Los ejemplares de *Panopea abbreviata*, y sus huéspedes, *Malacobdella arrokeana* utilizados para el desarrollo de esta tesis, se recolectaron en seis localidades separadas entre sí por más de 150 Km. Todas las poblaciones estudiadas se encuentran distribuidas en los golfos norpatagónicos: golfos San Matías (GSM), San José (GSJ) y Nuevo (GN). Los sitios y el método de muestreo utilizado se describen en la Tabla 1

Tabla 1. Sitios de muestreo realizados en esta tesis

Localidades de muestreo	Ubicación	Método de muestreo
Golfo San Matías		
El Sótano (1)	Río Negro, (40°50'S, 65°04'O)	Buceo
Playas Doradas (2)	Río Negro, (41°38'S, 65°01'O)	Buceo
Puerto Lobos (3)	Río Negro, (42°00'S, 65°04'O)	Buceo
Golfo San Jose		
Punta Conos (4)	Chubut, (42°20'S, 64°10'O)	Buceo
Playa Larralde (5)	Chubut, (42°24'S, 64°19'O)	Buceo
Golfo Nuevo		
Bahía Craker (6)	Chubut, (42°55'S, 64°30'O)	Buceo

Los ejemplares de *P. abbreviata* fueron recolectados manualmente mediante buceo autónomo (Fig.2.2), con el uso del *hidrojet* (Fig. 2.3), una bomba mecánica instalada sobre una embarcación que toma agua de mar por un extremo y la expulsa por el otro a mayor presión (Fig. 2.3, A), generando un gran caudal de agua que el buzo usa para remover el sedimento alrededor del bivalvo y así poder retirarlo (Fig. 2.2).

Esta herramienta de muestreo se utiliza para la recolección de bivalvos que viven muy enterrados en el sedimento, por ejemplo *Panopea abbreviata* y la almeja navaja *Ensis macha*. Es de uso frecuente entre los buzos marisqueros de la zona, debido a la velocidad con la que permite recolectar los individuos infaunales y al buen estado en que se los obtiene.

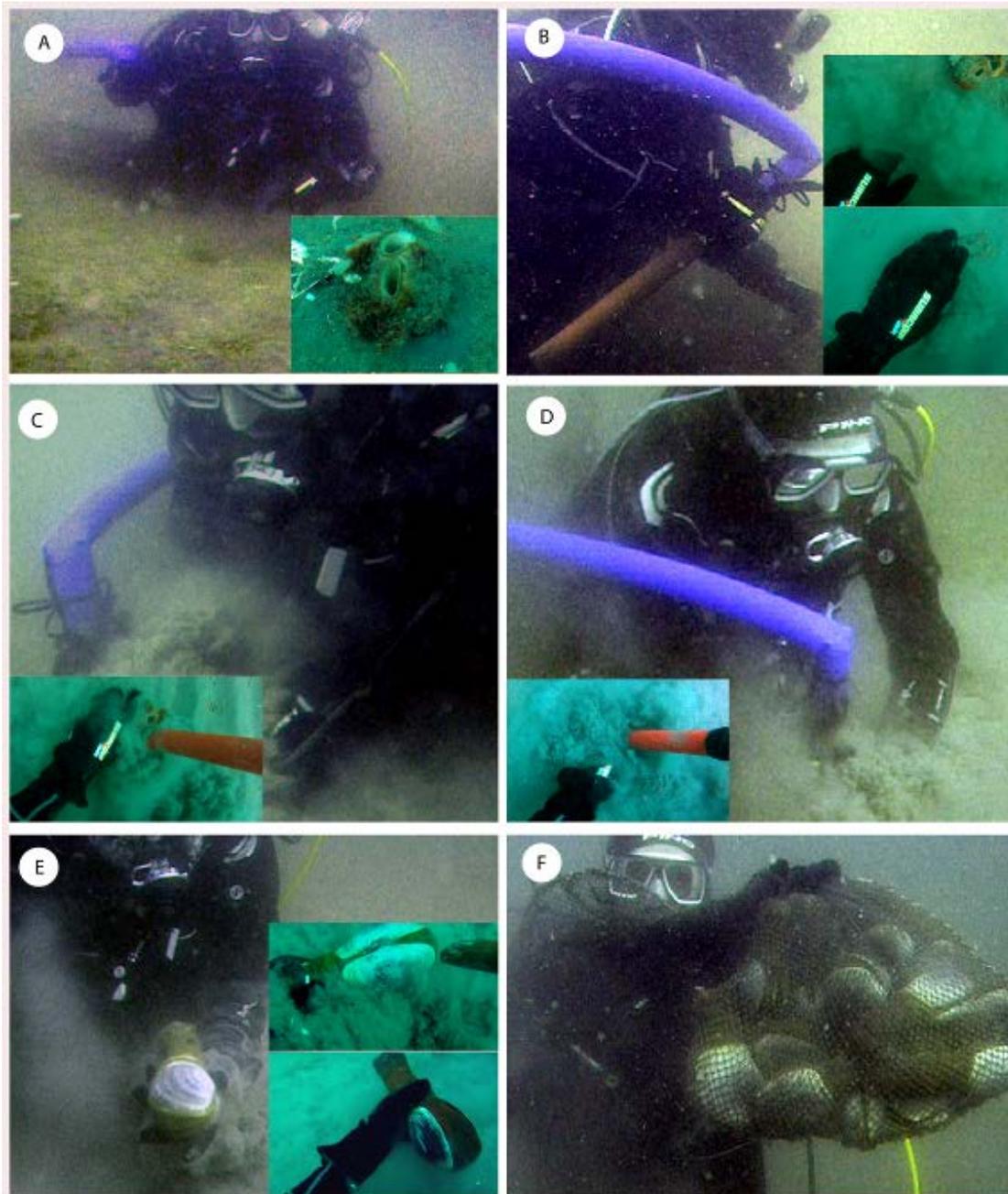


Fig. 2.2. Extracción manual de *P. abbreviata*. A. Búsqueda de ejemplares en el fondo y aspecto externo de los sifones en estado natural, B. Localización visual e inmovilización de sifones para evitar el enterramiento, C y D. Remoción del sedimento con *hidrojet*, E. ejemplar de *P. abbreviata* al ser desenterrado, F. Muestreo terminado.

En el caso de *P. abbreviata* este bivalvo vive hasta 40 cm enterrado en el sedimento, en profundidades que oscilan entre 9 y 25 metros (Ciocco y Elias 2001). Sin esta herramienta sería imposible recolectar la cantidad de individuos necesarios (al menos 30) en una sola inmersión de buceo.

Los muestreos se realizaron entre mayo del año 2007 y septiembre del año 2012. Las épocas de muestreo se eligieron siguiendo los objetivos particulares de cada capítulo de esta tesis.

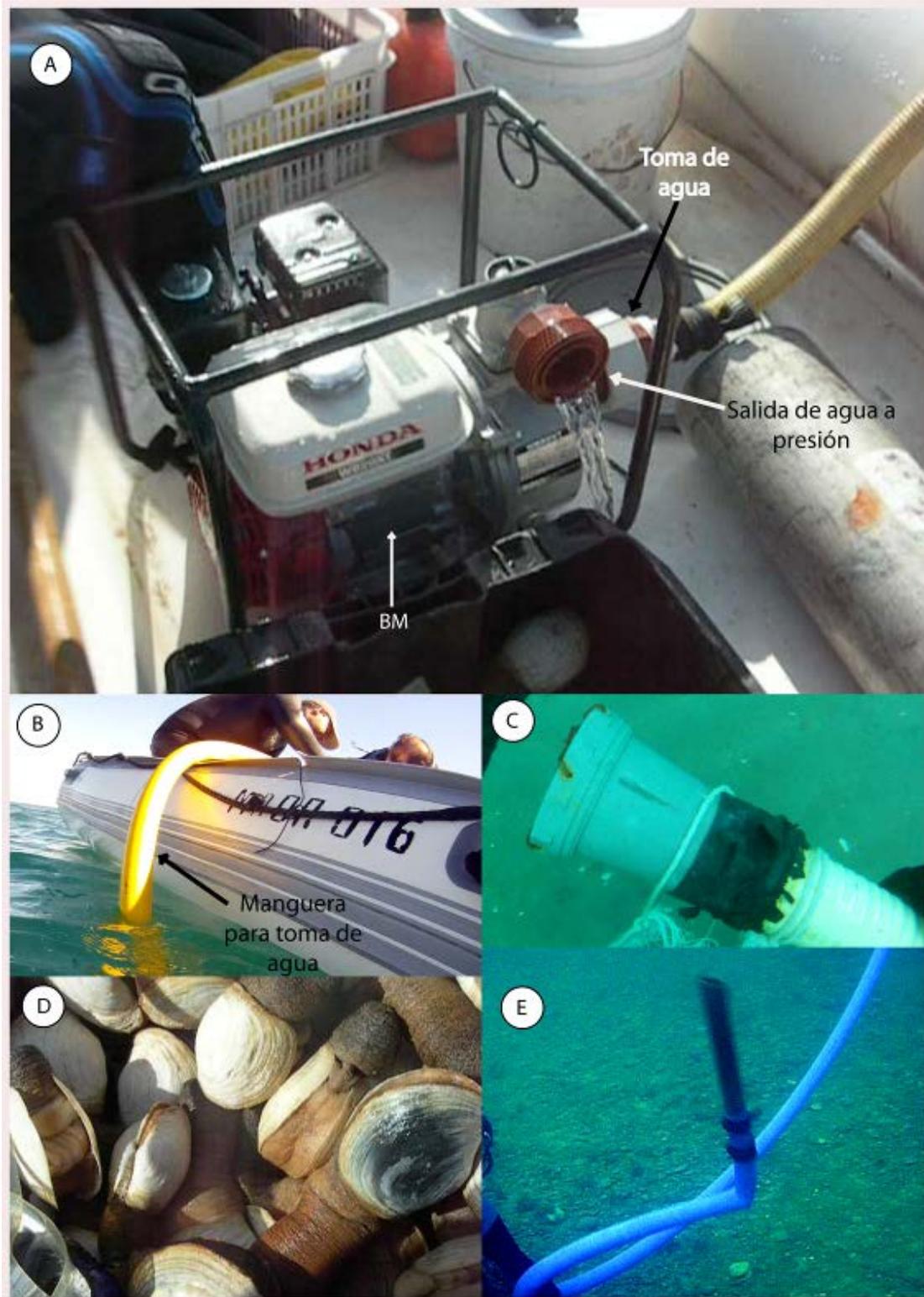


Fig. 2.3. Detalle de bomba *hidrojet*, usada en el muestreo de *P. abbreviata*, A y B. Detalle de la bomba sobre el bote, obsérvese las tomas de entrada y salida del agua, C. Toma de entrada de agua sumergida, D. Ejemplares muestreados, E. Extremo de salida de agua a presión. Abreviaturas: BM = Bomba mecánica.

Fotografía y microscopia óptica.

Todas las fotografías macroscópicas de los individuos analizados se realizaron con una cámara digital Nikon 3100 12 megapixels. Cuando fue necesario las fotografías se tomaron bajo una lupa Leica.

Las piezas de los tejidos que necesitaron procesamiento histológico (ver en cada capítulo) se deshidrataron en una serie creciente de etanol (70°-80°-90°-96°). A fin de poder incluir el material en paraplast (punto de fusión 56-58°) se sumergieron las piezas en alcohol butílico (líquido intermediario) que es miscible con el etanol y con el medio de inclusión. Las muestras se transfirieron posteriormente a una solución líquida 50:50 alcohol butílico-paraplast, conservada en estufa a 56° C. Finalmente, se procedió a la infiltración definitiva de los tejidos con paraplast 100%. Antes de la solidificación de las piezas se orientaron las mismas con el fin de obtener cortes transversales. Se realizaron cortes seriados de 5 y 6 µm de espesor con micrótomo de deslizamiento, los cuales fueron montados en portaobjetos previamente cubiertos por albúmina de Meyer, para su posterior coloración. Las técnicas de coloración topográficas realizadas fueron: hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson (Ver Anexo I).

Las observaciones posteriores fotografías de los preparados histológicos y las etapas de desarrollo larval fueron realizadas con una cámara digital Leica DFC 280, adosada a un microscopio Leica DM 2500 en el laboratorio de Parasitología del CENPAT y las mediciones se realizaron mediante el software Axio Vision v. 4.4.

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para los estudios realizados mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), los especímenes fueron fijados en glutaraldehído al 2,5% durante 4 horas a 4° C, y luego se transfirieron a buffer fosfato 0,1 M pH 7,4. Posteriormente, para todos los tejidos se procedió a una deshidratación en una serie creciente de etanol. Finalmente, el tejido fue deshidratado en hexametildisilazane (Fluka), de 5 a 10 minutos según el tamaño de la pieza, luego se monto en soportes adecuado y se metalizo con oro-paladio. Las observaciones se realizaron en el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) de la empresa de aluminio ALUAR S.A. (JEOL JSM-6460LV).

Caracterización genética de
Malacobdella arrokeana

Caracterización genética de *Malacobdella arrokeana*

Introducción.

El género *Malacobdella* incluye 6 especies descritas y cinco de ellas son específicas de un único hospedador (Ivanov *et al.* 2002) (Tabla 3.1). Los únicos casos de aparición de malacobdélidos en distintas especies de hospedadores fueron registrados por Gibson (1994) y Jensen y Sadeghian (2005), los cuales encontraron a *M. grossa* en 27 especies de bivalvos a lo largo de las costas de América del Norte y Europa. Sin embargo, no pudieron asegurar que todos los registros correspondan a *M. grossa* (J. Norenburg com. pers.). El principal problema a la hora de separar a las especies del género *Malacobdella* es la gran similitud en la morfológica externa (Ivanov *et al.* 2002).

Hasta finales de los años 90 se reportaban en la literatura 11 especies, nominales del género *Malacobdella*. De ellas, sólo cinco fueron consideradas válidas por Gibson (1994) : *M. grossa* (Müller 1776), *M. japonica* Takakura 1897 (Fig 3.1), *M. minuta* Coe 1945, *M. siliquae* Kozloff 1991, y *M. macomae* Kozloff 1991; las restantes, *M. anceps* (Dalyell 1853) y *M. valenciennaei* (Blanchard 1845), fueron consideradas sinónimos de *M. grossa* por Gibson (1994 y 1995), mientras que *M. cardii*, Hesse 1865; *M. obesa*, Verrill 1892 y *M. mercenaria* Verrill 1892 deben ser revisadas a partir del estudio del material tipo y localidades del hospedador, para confirmar su estatus taxonómico (Gibson 1994). La última, la especie llamada *M. auriculae* Blanchard 1847, vive asociada al gasterópodo pulmonado de agua dulce (*Chilina dombeyana*) en Chile. La única descripción está basada en un dibujo hecho por un colega de Blanchard, pero el espécimen se ha perdido y es probable que ni siquiera haya sido un nemertino (Kozloff 1991). *Malacobdella arrokeana*, es la sexta especie conocida para el género hasta el momento.

El problema de la taxonomía tradicional de nemertinos reside en la gran cantidad de trabajo que requiere, ya que está basada principalmente en el estudio histológico de su anatomía interna. En muchos casos, el investigador se encuentra con una gran cantidad de especímenes para su determinación y los caracteres externos no aportan suficiente información para resolver su estatus taxonómico. A su vez, los ejemplares están fijados de manera no adecuada y muchos de los caracteres internos no son apreciables, sumado a la

poca información suministrada en las descripciones originales (Fig. 3.1), lo cual lleva a erróneas identificaciones (Strand y Sunberg 2005b, Sunberg *et al.* 2009; Sunberg *et al.* 2010, entre otros).

Con la incorporación de nuevas técnicas en biología molecular, los marcadores moleculares son una importante herramienta a la hora de complementar la información morfológica, que fue la base de la taxonomía tradicional en nemertinos, y otros grupos zoológicos (Hebert *et al.* 2004; Sunberg y Strand 2010; Sunberg *et al.* 2010). Un punto clave en el uso de estas técnicas moleculares, 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. El “*DNA barcoding*” (código de barras genético) es un proyecto de investigación con financiamiento internacional el cual persigue el estudio específico de la secuencia del marcador mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) en la mayor cantidad de especies conocidas. Por sus características este marcador (COI) es muy útil en la delimitación entre especies, lo cual en cierta forma constituiría un código de barras de cada especie (Hebert *et al.* 2003 a, b).

El principal objetivo de este proyecto es su utilización en la identificación de especies 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 (Ball *et al.* 2005; Webb *et al.* 2006).

En el phylum Nemertea el proyecto *DNA barcoding* ha contribuido para resolver problemas taxonómicos, en una gran cantidad de grupos contribuyendo en la asignación a nivel específico y genérico de ejemplares previamente identificados (Sunberg *et al.* 2010; Strand y Sunberg 2005 a; Strand y Sunberg 2011; Sunberg *et al.* 2009 a; Puerta *et al.* 2010; Mahon *et al.* 2010). Chen *et al.* (2010) secuenciaron el gen COI para distintos representantes del género *Cephalothrix* distribuidos por casi todo el mundo,

con el objetivo de evaluar la diversidad del género y la posible existencia de especies crípticas o diversidad no descrita hasta el momento.

En este sentido las secuencias nucleotídicas pueden ser tomadas como un carácter más en la identificación taxonómica. El grado de diferencia entre cada especie analizada está dada por la diferencia entre las bases nucleotídicas de cada secuencia. A esta diferencia se la llama divergencia y cuanto más sea la diferencia entre las secuencias, mayor será el grado de divergencia entre las especies (Hebert *et al.* 2003 a).

Esta diferencia es calculada mediante la utilización de métodos estadísticos, que analizan cuán grande es la diferencia y agrupan estas secuencias para formar los árboles filogenéticos. Dependiendo de la información que quiera obtenerse se emplean distintos análisis filogenéticos, para este tipo de análisis los más adecuados son el análisis de Máxima Parsimonia, *Maxium Likelihood* e Inferencia Bayesiana.

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 y además ayudar a la detección de caracteres homoplásicos en el grupo.

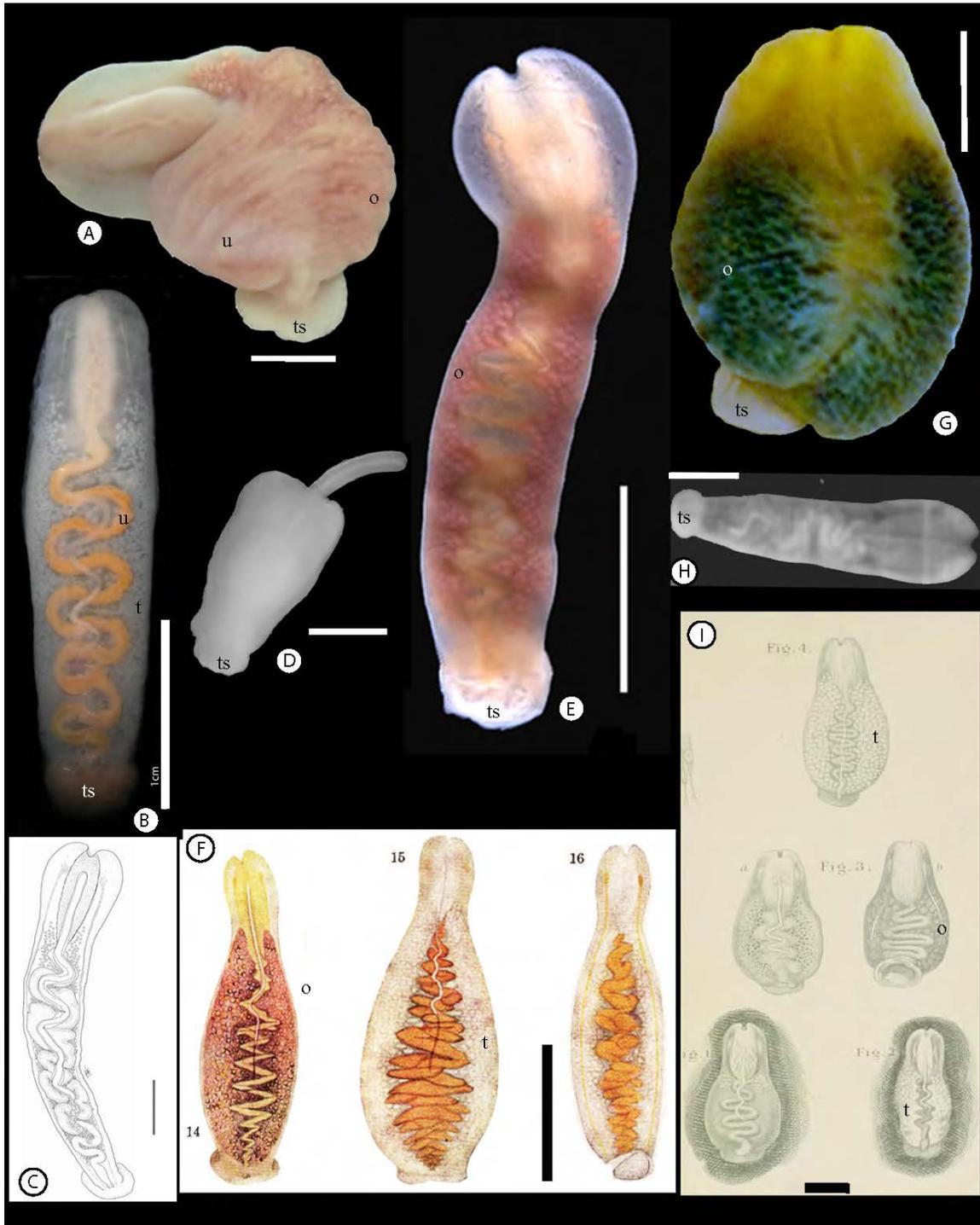


Fig. 3.1. Ejemplares de *Malacobdella arrokeana* (A-D). A: hembra madura, B: macho relajado, C: ilustración original (Ivanov et al. 2002), D: ejemplar inmaduro (Escala: A, B: 10 mm; C: 3.5mm, D: 1mm). *Malacobdella japonica* (E-F); E: hembra madura, F: Ilustración original (Yamaoka, 1940) (Escala: E: 10mm; F: 1mm). *Malacobdella grossa* (G-I); G: hembra madura, H: espécimen inmaduro, I: ilustración original (Riepen 1933) (Escala: A: 10mm, B: 4mm; C: 1mm). Abreviaturas: ventosa terminal (ts), ondulaciones del intestino (u), ovarios (o), testículos (t). Foto E: Hiroshi Kajihara, G: Per Sunberg

En esta tesis se aislaron y secuenciaron por primera vez el marcador mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) de *M. arrokeana* y *M. japonica* y se

compararon con secuencias de *M. grossa*, enviadas por un colega y con aquellas disponibles en el Gen Bank. Este resultado complementa la descripción morfológica de *M. arrokeana*, corrobora genéticamente la condición de nueva especie de *M. arrokeana* a través del uso de nuevas herramientas moleculares y contribuye al conocimiento de las relaciones filogenéticas dentro del género *Malacobdella*.

Materiales y Métodos.

Caracterización genética de *Malacobdella arrokeana*.

Los ejemplares de *M. arrokeana* utilizados en esta sección fueron extraídos de ejemplares de *P. abbreviata* de la localidad de Punta Conos (golfo San José, GSJ) y Puerto Lobos, (golfo San Matías, Ma). Los ejemplares de *M. japonica* Takakura 1897 fueron recolectados por el Dr. Hiroji Kajihara (Facultad de Ciencias, Universidad de Hokkaido, Sapporo, Japón) de las playas de Shinryu, Akkeshi, Hokkaido, Japón (n = 15) dentro del bivalvo *Pseudocardium sachalinense* y enviados frescos para su procesamiento en el Laboratorio de Sistemática Molecular y Genética de Poblaciones (LSMGP), del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid, España, durante una pasantía de quien suscribe, bajo la dirección de la Dra. Annie Machordom (Fig. 3.1).

Siete de las nueve secuencias pertenecientes a ejemplares de *M. grossa* fueron enviadas por el Dr. Per Sunberg (Departamento de Biología y Ciencias Ambientales, Universidad de Gothenburg, Gothenburg, Suecia), recolectadas del bivalvo *Arctica islandica*, en Tjärnö, Skagerak, Suecia, las dos secuencias restantes se encontraban disponibles en GenBank (Nº HQ848591(GB1), AJ436905 (GB2)). Luego de su recolección, los ejemplares de *M. japonica* y *M. arrokeana*, fueron fijados en etanol absoluto para posterior extracción de ADN, con DNAeasy kit (QiaGen).

Selección de “outgroups”.

Para probar la monofilia del género *Malacobdella*, y las relaciones filogenéticas preliminares se secuenciaron ejemplares muestreados por quien suscribe, recolectados del intermareal en playa Cerro Avanzado (Puerto Madryn, Chubut) en la costa argentina de *Ramphogordius sanguineus* (Li) y se utilizaron secuencias de COI pertenecientes a *Ramphogordius sanguineus* disponibles en GenBank (HQ848580 (R.s1)), AJ436938 (R.s2)) (Heteronemertinos), *Amphiporus lactifloreus* (HQ848611 (A.I)), *Paradrepanophorus crassus* (HQ848603 (P.c)) y *Geonemertes pelaensis* (HQ848592 (G.p1), EU255602(G.p2)), (Hoplonemertinos).

Amplificaciones y análisis de secuencias.

Las secuencias parciales de COI fueron amplificadas en el LSMGP, por PCR utilizando los siguientes cebadores o *primers*:

COI

LCOI (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') (Folmer *et al.* 1994) y

COI-H (5'-TCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Machordom *et al.* 2003).

La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l.

	Concentración (x)	Volumen (μ l)
Buffer con Mg ⁺⁺	10 x (2mM MgCl ₂)	5
Primers (LCOI)	10 μ M	0,8
Primers (COI-H)	10 μ M	0,8
Taq polimerasa	5 U/ μ l	0,4
dNTPs	10 mM (2,5 cada uno)	1
ADN genómico	Según muestra	1-4
Agua destilada	-	c.s.p. 50

Ciclo

Etapas	Temperatura (C°)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94	4 min	1
	94	45 seg	40
Hibridación	45	1 min	40
Extensión	72	1 min	40
Extensión final	72	10 min	1

En los casos en los que fue necesario se cambiaron algunos parámetros de la PCR para obtener mejor amplificación (uso de pre-ciclos -5 y 35-, gradientes de hibridación y diluciones del ADN genómico 1:100, 1:200, etc.). Los productos se sembraron en geles de agarosa (0,8 %) teñidos con SYBR Safe (Invitrogen); la migración de los fragmentos se visualizó bajo luz azul y se fotografió cada gel. El tamaño de los productos amplificados se estimó con marcadores de peso molecular de 100 pb o de 1Kb. Los productos de amplificación (alrededor de 700 pb) se purificaron por precipitación con etanol. La secuenciación de los fragmentos seleccionados se realizó en un secuenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems Inc.).

Programas utilizados

La edición de los fragmentos secuenciados se realizó con el programa Sequencher (Gene Code Corporation), la alineación se realizó con el programa Se-Al 2.0a11 (Rambaut 2002). El análisis filogenético (máxima parsimonia-MP, máxima verosimilitud-ML), se realizó con PAUP 4.0b10 (Swofford 2000), a través de una búsqueda heurística (mejorando la búsqueda con la opción *TBR branch swapping*) y 10 adiciones de los taxones al azar. La robustez de las topologías fueron verificadas por *bootstrap* (1000 réplicas) (Felsenstein 1973). El modelo de evolución molecular implementado fue TIM3+G+I (transicional), este modelo le da más peso a las transiciones que a las transversiones nucleotídicas. El modelo de evolución molecular más adecuado (TIM3+G+I) y los parámetros iniciales para el ML para cada set de datos fue elegido usando el test de Akaike implementado en *ModelTest* 3.06 (Posada y Crandall 1998).

El análisis Bayesiano fue llevado a cabo usando *Mr Bayes* 3.0 (Huelsenbeck 2000; Huelsenbeck y Ronquist 2001). El análisis de "*Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo*" (MCMCMC) se realizó en dos carreras paralelas de 5.000.000 de generaciones cada una, muestreando cada 1000. Posteriormente se eliminaron el 10% de los árboles obtenidos como "*burn-in*".

Resultados

Caracterización genética de *M. arrokeana*.

Aproximadamente 658 pares de bases fueron secuenciados para *M. arrokeana*, *M. grossa* y *M. japonica*. Estas secuencias fueron depositados en GenBank (Cod. acc. KF597241 hasta KF597264, Alfaya *et al* en prensa). Los análisis filogenéticos realizados siempre dieron la misma topología, con un alto soporte en todos los métodos aplicados para cada especie (Fig. 3.2). La divergencia genética (porcentajes de sustituciones nucleotídicas) entre *M. arrokeana*, *M. grossa* y *M. japonica*, fueron las siguientes *M. arrokeana* - *M. grossa*: 11,73%, *M. arrokeana* - *M. japonica*: 10,62% y *M. grossa* - *M. japonica*: 10,97%. Se observó una clara brecha – *gap* - entre la divergencia interespecífica e intraespecífica. La divergencia intraespecífica media dentro del grupo fue de 0,18% para *M. arrokeana* (rango 0 a 0,92%), 0,13% para *M. grossa* (rango 0-0,61%), y 0,02% para *M. japonica* (rango 0-0,15%). Las 5 sustituciones encontradas entre los haplotipos de *M. grossa* eran sinónimas, al igual que la única sustitución encontrada entre las secuencias de *M. japonica*, mientras que dentro de las 15 sustituciones encontradas entre los haplotipos de *M. arrokeana*, solo tres produjeron cambios de aminoácidos

La divergencia intraespecífica máxima encontrada entre las secuencias de COI extraídas de ejemplares *Ramphogordius sanguineus* de Cerro Avanzado (Li) y la secuencia R.s2 (Anglesey, Reino Unido) fue de 0,15%, mientras que la divergencia máxima encontrada entre las secuencias de esa rama y la secuencia R.s1 (Maine, E.E.U.U., Andrade *et al.* 2012) fue 100 veces mayor (15,75%), lo que sugiere que esta secuencia de COI - R.s1 - no pertenece a *R. sanguineus* (Fig. 3.2).

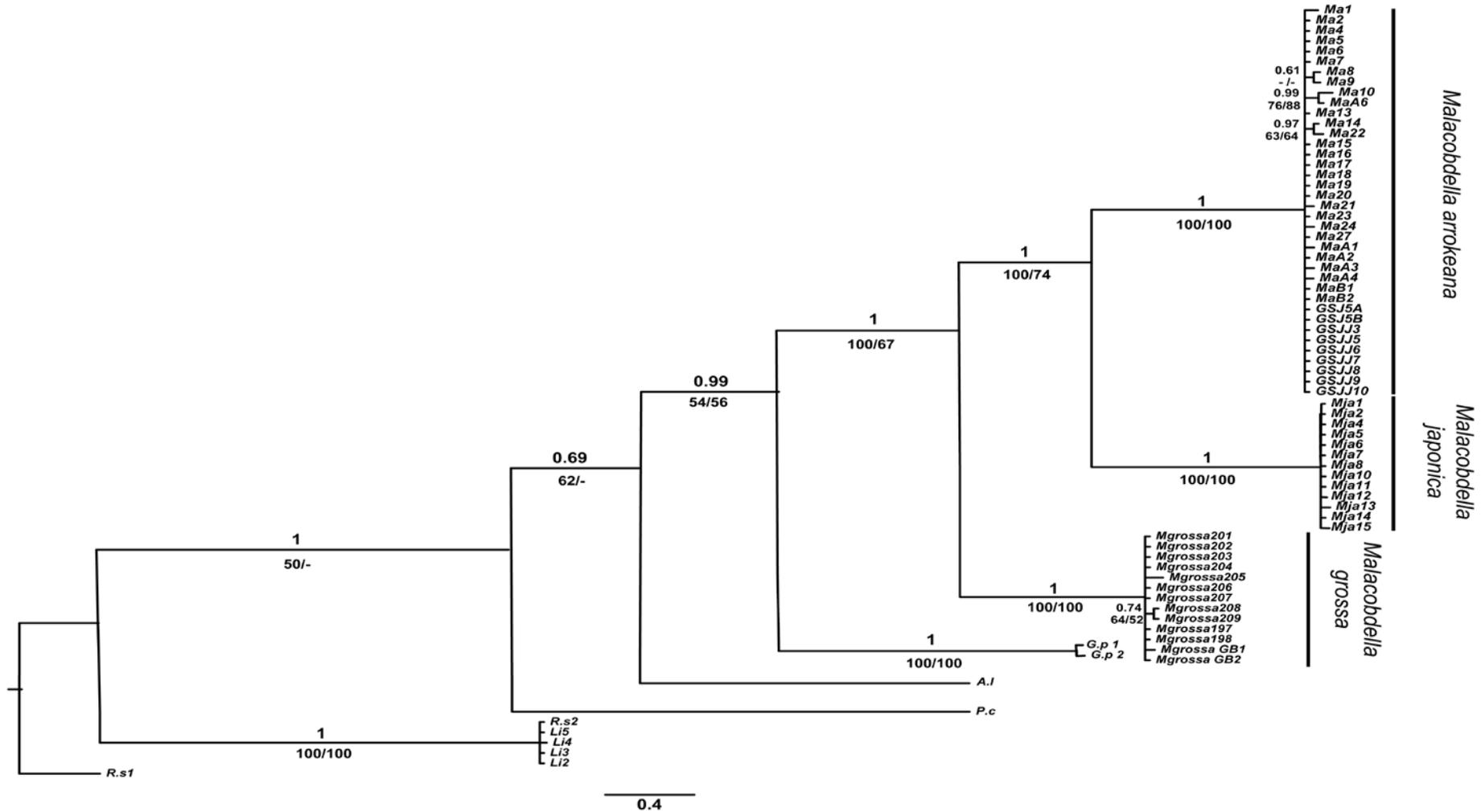


Fig. 3.2. Árbol filogenético consenso obtenido según inferencia bayesiana (IB), entre los especímenes de *Malacobdella arrokeana* (Ma y GSJ) y *M. grossa*, *M. japonica* (Mja) y otros nemertinos. Los números sobre las ramas representan probabilidades posteriores y los números bajos las ramas representan los porcentajes de *bootstrap* de MP y ML respectivamente. Li = *R. sanguineus*, heteronemertino, recolectado en Pto. Madryn. R. s = *R. sanguineus* de Gen Bank.

Tabla 3.1. Caracteres morfológicos de tres especies del género *Malacobdella* estudiados basados en las descripciones originales de cada especie. Los caracteres con cita bibliográfica diferentes, corresponden a trabajos posteriores a la descripción original de la especie o a revisiones posteriores.

Caracteres Morfológicos	<i>M. arrokeana</i> Ivanov <i>et al.</i> 2002	<i>M. grossa</i> (Müller 1776)	<i>M. japonica</i> Takakura 1897
Poros excretores	dorso-lateral (40% largo total)	ventro-lateral	dorso-lateral (25% del largo total) (Yamaoka 1940)
Largo de la probóscide	ocupa el 80-98% de la long. del rincocele.	2/3 de la longitud del rincocele	2/3 de la longitud del rincocele (Yamaoka 1940)
Músculo retractor de la probóscide	curvado y anclado dorsalmente a la pared del cuerpo	anclaje posterior y ventral, próximo a la ventosa terminal (Riepen, 1933)	ventral y terminal suelto en el parénquima (Yamaoka 1940)
Color de los ovarios (Maduro)	púrpura (Teso <i>et al.</i> 2006)	verde oliva o verde amarillento (Gibson 1968)	rosado (Yamaoka 1940)
Color de los testículos (Maduro)	rosa pálido (Teso <i>et al.</i> 2006)	rosado (Gibson 1968)	blanco (Yamaoka 1940)
Comisura nerviosa	dorsal en la parte posterior del intestino, justo anterior al ano	en la parte posterior de la ventosa sobre el ano	detrás del ano, a lo largo del margen posterior de la ventosa terminal (Yamaoka 1940)
Especificidad con el Hospedador	alta (<i>Panopea abbreviata</i>)	baja (27 especies)	alta (<i>Pseudocardium sachalinense</i>)

Discusión.

Caracterización genética de *M. arrokeana*.

Como se mencionó anteriormente, los nemertinos del género *Malacobdella* son difíciles de identificar basándose sólo en los caracteres externos (Fig 3.1). El estudio histológico riguroso de la morfología interna es lo que proporciona las características taxonómicas principales utilizadas para la identificación. El análisis genético realizado aquí muestra claramente que las diferencias morfológicas internas distintivas, utilizadas para separar las tres especies de *Malacobdella* analizadas, son concordantes con las diferencias mostradas en el análisis del gen COI. Sin embargo, estudios anteriores realizados con código de barras de ADN en los géneros *Tetrastema* y *Cerebratulus* revelaron una falta de concordancia entre los caracteres morfológicos y moleculares (ver Strand y Sundberg 2005a; Sundberg *et al.* 2010). Estos autores argumentaron que esta diferencia podría ser el resultado de la variación intraespecífica o cambios en la morfología externa durante el desarrollo (Cantell 1975; 1982). También concluyeron que tal vez los caracteres morfológicos utilizados para describir las especies del género *Tetrastema* y *Cerebratulus* no eran suficientes para identificar linajes evolutivos. Los resultados de esta tesis muestran que la divergencia encontrada entre las secuencias de las especie de *Malacobdella* analizadas (10 a 11% entre las tres especies), son coherentes con su diferenciación taxonómica, corroborando el estatus de especie a *M. arrokeana*. Los valores de divergencia intra e interespecíficas concuerdan con los valores encontrados para otros grupos de nemertinos (por ejemplo Sundberg y Strand 2005a; Sundberg *et al.* 2010; Chen *et al.* 2010; Andrade *et al.* 2012; Kvist *et al.* 2014). Los terminales correspondientes a las secuencias obtenidas de ejemplares de *R. sanguineus* (Li) de Cerro Avanzado, Chubut, se agrupan con la secuencia de *R. sanguineus* Rs2 (Anglesey, Reino Unido) formando un clado bien soportado, mientras que la secuencia *R. sanguineus* Rs1 (Maine, EE.UU), aparece como grupo basal (Fig. 3.2). Esta diferencia en la topología del árbol fue corroborada con el valor de divergencia intraespecífica – 100 veces menor – al grupo basal, que sugiere que la secuencia de COI disponible en GenBank (HQ848580-R.s1) no es en realidad perteneciente a *R. sanguineus*. Este

resultado amplía la distribución geográfica de *R. sanguineus* al Atlántico Sur y constituye el primer registro de esta especie en el Mar Argentino. Los errores entre las secuencias y los taxones de los *vouchers* asociados a estas, son muy recurrentes en este phylum, ya que la mayoría de las secuencias depositadas están asociadas a ejemplares no identificados correctamente (Fernandez Alvarez y Machordom 2013; Kvist *et al.* 2014). El análisis filogenético presentado aquí demostró que *M. arrokeana* y *M. japonica* están más estrechamente relacionados entre sí que con respecto a *M. grossa*.

Según la literatura disponible (Takakura (1897), Yamaoka (1940), Riepen (1933), Gibson (1967, 1968, 1994), Gibson y Jennings (1969), Kozloff (1991), Ivanov *et al.* (2002)) y el presente trabajo, la posición de la musculatura de la probóscide y la comisura nerviosa parecen ser buenos caracteres diagnósticos para la identificación de estas especies dentro del género (ya que son características únicas, autapomorfías). Varios autores han concluido que la identificación de especies nemertinos basada sólo en caracteres morfológicos podría ser poco fiable (ver Strand y Sundberg 2005a; Sundberg *et al.* 2009a; Thornhill *et al.* 2008; Chen *et al.* 2010; Fernández-Álvarez y Machordom 2013; Kvist *et al.* 2014), debido a los problemas metodológicos antes mencionados y que en algunos casos, éstos caracteres morfológicos externos no tienen importancia taxonómica (ej. color y forma) o van desapareciendo con el desarrollo del animal (ojos, ocelos) (véase Thornhill *et al.* 2008; Mahon *et al.* 2010; Sunberg *et al.* 2009a; Sunberg y Strand 2010).

Seleccionar caracteres morfológicos de importancia más la adición de información molecular, es la mejor manera de trabajar en el marco de una "evidencia total" o "taxonomía integradora" (Padial *et al.* 2010), proporcionando clasificaciones taxonómicas estables, propuestas filogenéticas, e inferir sobre los patrones biogeográficos de estas especies.

Los resultados presentados en este capítulo ayudarán a fortalecer la identificación de las otras especies restantes del género *Malacobdella* a través del uso del código de barras genético.

Dieta y posición trófica de
Malacobdella arrokeana

Dieta y posición trófica de *M. arrokeana*

Introducción

Para comprender la estructura y funcionamiento de los ecosistemas marinos es necesario tener información sobre las relaciones tróficas entre las especies (Paine 1988; Bertness y Leonard 1997; Bertness *et al.* 1999), ya que las interacciones tienen efectos directos sobre la dinámica poblacional y la estructura de la comunidad (Sih 1993). Por este motivo, la transferencia de materia y energía entre los organismos, permiten describir con precisión las comunidades biológicas (Hughes 1993), esta transferencia se ve reflejada en las redes alimentarias que se crean entre los diferentes niveles tróficos.

La evaluación de las redes alimentarias, es particularmente complicada ya que son un proceso dinámico con relaciones tróficas internas que podrían estar influenciadas por procesos ecológicos, como la competencia, la depredación, el mutualismo y la simbiosis (Paine 1974; Connell 1978; 1980; Hixon 1991; Bertness y Leonard 1997).

Las relaciones simbióticas incluyen comensalismo, mutualismo y parasitismo. Aunque estas interacciones son comunes en la naturaleza (Herre *et al.* 1999), es difícil de identificar que es lo que caracteriza cada tipo de interacción (Bronstein 1994). La dificultad se presenta principalmente cuando se intenta medir, por ejemplo, la dependencia metabólica de un organismo sobre el otro, o la relación coste/beneficio de esa dependencia. Cuando existe daño potencial al hospedador o una dependencia metabólica del mismo (i.e. alimentación directa sobre los tejidos del hospedador), se consideran a estas características del tipo parasitaria (Bush *et al.* 2001).

El estudio de la composición dietaria a través de métodos directos, provee una detallada resolución de los resultados, pero podría estar limitada en términos de la identificación de la composición de la dieta (Hyslop 1980; Duffy y Jackson 1986), en la dificultad de relacionar la comida ingerida y/o asimilada y con el gran esfuerzo de muestreo necesario para obtener una muestra representativa (Dubois *et al.* 2007; Newsome *et al.* 2009). Los datos de contenido estomacal reflejan la dieta más reciente y pueden no ser representativos de la dieta general (Parmentier y Das 2004).

Afortunadamente, la proporción de isótopos de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) y nitrógeno ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) en los tejidos del consumidor, proveen una visión interna de la estructura de la red alimentaria, que a su vez puede ser complementada por los estudios de dieta por métodos directos (Sydeman *et al.* 1997). El estudio de la dieta a través de la integración del análisis del contenido estomacal (métodos directos) e isótopos estables de C y N (métodos indirectos) es utilizado ampliamente para caracterizar las relaciones simbióticas en varias especies de invertebrados y peces (Doucet *et al.* 1999; Pinnegar *et al.* 2001; Parmentier y Das 2004; Zabala *et al.* 2013; Navarro *et al.* 2013), proporcionando información sobre el alimento asimilado (no solo el ingerido), así como también información integrada en el tiempo (Layman *et al.* 2012). Este enfoque se basa en que la proporción de N ($\delta^{15}\text{N}$) y de C ($\delta^{13}\text{C}$) transformados de las fuentes dietarias (presas) a los consumidores (predadores) puede seguirse de una manera predecible (Layman *et al.* 2012).

Los valores $\delta^{15}\text{N}$ son indicadores de las posiciones tróficas en la red, por lo tanto se espera que los consumidores estén enriquecidos en $\delta^{15}\text{N}$ en relación con sus presas (Post 2002). Los valores $\delta^{13}\text{C}$ muestran pocos cambios con respecto a las transferencias entre niveles (tróficos), pero son indicadores útiles con respecto a la fuente de carbono presente en los alimentos (De Niro y Epstein 1978). Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ se han utilizado con éxito para dar una visión de las relaciones tróficas huésped-hospedador (Deudero *et al.* 2002; Panmentier y Das 2004; O'Grady y Dearing 2006; Navarro *et al.* 2013).

El modelo de equilibrio dinámico propuesto por Olive *et al.* (2003) predice un rango de magnitudes en el cambio de nivel trófico basándose en el valor isotópico del ^{15}N , siguiendo la siguiente secuencia: el predador estará más enriquecido que el ectoparásito y este más que el endoparásito (predador > ectoparásito > endoparásitos), teniendo en cuenta su tasa de excreción y de asimilación (ver Olive *et al.* 2003 para más detalle). Los predadores suelen estar enriquecidos entre 3 ‰ y 3,4 ‰ en relación con su fuente de alimento (Mensaje 2002), mientras que los endoparásitos no mostrarían diferencias con respecto a su huésped o incluso podrían mostrar valores menores (Olive *et al.* 2003).

Al menos 40 especies de nemertinos viven en relación simbiótica con algún invertebrado marino (Jensen & Sadeghian 2005). La naturaleza de esta

asociación no es bien conocida, ya que han sido considerados tanto endocomensales como parásitos especializados en depredación de huevos (Berg y Gibson 1996). Las adaptaciones que presentan estos grupos están directamente relacionadas con la estructura y la utilización de su aparato proboscídeo, con la capacidad de apertura de la boca y con la estructura de la parte anterior del sistema digestivo (Mc Dermott y Roe 1985). Los nemertinos de vida libre y cazadores poseen probóscides más largas y más desarrolladas, ya que dependen de la caza de sus presas para sobrevivir. En este sentido, las especies de Heteronemertino cazadoras son capaces de tragar a sus presas enteras, mientras que algunos Hoplonemertinos (succionadores) inyectan toxinas y enzimas digestivas dentro de sus presas, reduciendo su tamaño y tragándolas (Mc Dermott y Roe 1985).

En el caso de los nemertinos que se alimentan de huevos de cangrejos (gen. *Carcinonemertes*), la probóscide es más corta ya que pasan su vida sobre su alimento (Jensen y Sadeghian 2005). La más estudiada, debido al daño provocado a la industria pesquera, es la de la especie *Carcinonemertes errans*, comensal del cangrejo explotado comercialmente *Cancer magister*. Esta especie es considerada parásito ya que un estudio mostro que la alta intensidad y prevalencia (100%) de esta especie sobre la masa ovígera de *C. magister*, provocó la muerte del 50% de los embriones, afectando dramáticamente la pesquería en las costas de California, Oregón y Washington (Wickham *et al.* 1984; Kuris y Wickham 1987; Kuris 1993; Shields *et al.* 1990b).

Por otro lado las especies de los géneros *Gononemertes* y *Vieitezia* viven en el atrio de varias especies de ascidias solitarias; estas especies comparten relaciones simbióticas con sus hospedadores, y también tienen sus estructuras de alimentación reducidas (pequeña probóscide) como el género *Carcinonemertes* (Roe 1988). Sin embargo *G. australiensis* no se alimentan de su huésped (Gibson y Egan 1976; Roe 1988; Junoy *et al.* 2010) y la fisiología digestiva de este animal no difiere con respecto a la de una especie típica de vida libre. Estas características llevarían a considerar estas especies como especies endosimbionte (Junoy *et al.* 2010).

Las especies del género *Malacobdella* pertenecen a la clase Enopla; en esta clase la probóscide armada con estilete es una característica general, sin embargo poseen modificaciones en su probóscide, relacionadas con sus

hábitos de alimentación suspensívoros (falta de estilete, recubrimiento por grandes papilas, faringe desarrollada y extensible, y gran capacidad de expansión de la boca) (Gibson y Jennings 1969; Mc Dermott y Roe 1985; Magarlamov y Chernyshev 2010). Sin embargo, Sundet y Jobling (1985) consideraron a la relación entre *M. grossa* y el bivalvo *Arctica islandica*, como parasitaria, ya que en los bivalvos infectados se registraban diferencias significativas en el tasas de crecimiento y el índice de condición. Los estudios anteriores en *M. grossa* muestran que esta especie es oportunista en cuanto a la calidad de alimento ingerido, Gibson y Jennings (1967) caracterizan las presas de *M. grossa*, predominando las algas, pequeñas partículas, bacterias, diatomeas y hasta larvas de crustáceos, también señalan el modo de alimentación diciendo que la probóscide no es ciliada y no participa ningún tipo de secreción mucosa en la captura de presas.

Malacobdella arrokeana posee un cuerpo aplanado, con una ventosa en el extremo terminal, la cual usa para adherirse al manto de su hospedador. La ubicación de *M. arrokeana* dentro de su hospedador, es variables pero mayoritariamente se ubica en la cavidad del manto bajo las branquias cerca del ano de *P. abbreviata*. El número de individuos de *M. arrokeana* registrado varía desde 1 a 190 en cada bivalvo, y el 100 % de los individuos de *P. abbreviata* tienen al menos un individuo de *M. arrokeana* en su interior (Ivanov *et al.* 2002; Teso *et al.* 2006; Vazquez *et al.* 2009; Alfaya *et al.* 2013).

En el caso de *M. arrokeana* no existen trabajos acerca de su alimentación ni selección de presas, pero si se han hecho estudios en relación al posible daño que pueda provocar al hospedador. Vázquez *et al.* 2009, registraron un daño tisular leve por la interacción entre la ventosa de *M. arrokeana* y el manto de su hospedador. Teniendo en cuenta el modo de vida de *M. arrokeana*, y el equilibrio dinámico propuesto por Olive *et al.* (2003), se esperaría que los tejidos de *M. arrokeana* estén enriquecidos en $\delta^{15}\text{N}$ en relación con los tejidos de *P. abbreviata* si es que *M. arrokeana* se alimenta de *P. abbreviata*, de una manera similar a una alimentación de predador sobre una presa ($\delta^{15}\text{N}$ simbiote - $\delta^{15}\text{N}$ hospedador = $\Delta\delta^{15}\text{N}$ s-h > 1). Por el contrario, si *M. arrokeana* se alimenta del plancton que ingresa en la cavidad del manto de su hospedador, no se esperaría ninguna diferencia entre la marca isotópica del hospedador y del huesped ($\Delta\delta^{15}\text{N}$ s-h ~ 0).

En este capítulo se analiza la dieta de *M. arrokeana* a través de métodos directos, como el contenido estomacal y la estructura de la probóscide, así como métodos indirectos mediante el análisis de las fracciones de isótopos estables de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$. Esta información se integra para conocer si ambas especies comparten los mismos ítems alimentarios, con el fin de aportar una nueva herramienta para dilucidar cual es el tipo de relación entre *M. arrokeana* y *P. abbreviata*.

Materiales y métodos

Alimentación: Estructuras y mecanismos.

La morfología de las estructuras asociadas a la alimentación (probóscide y faringe) fueron fotografiadas bajo microscopio óptico y microscopía electrónica de barrido (MEB). Además, se realizaron cortes histológicos seriados (9 μm), de la región cefálica; estas preparaciones fueron teñidas con tricrómico de Masson (anexo).

Con el fin de poder registrar el comportamiento de alimentación en *M. arrokeana* se tomaron fotos y videos mediante una exploración interna de la cavidad paleal de *P. abbreviata*, realizados con un endoscopio sumergible, dotado de una sonda de 9 mm de diámetro con una cámara de fibra óptica y luz LED en el extremo (W.I.C. Explorer, Mod. 8849AU). Para la exploración endoscópica, los individuos de *P. abbreviata* fueron colocados entre 2 y 5 horas para aclimatarse en un recipiente con agua de mar provista de aireación. Cuando los bivalvos estuvieron aclimatados (relajación de los sifones y de los músculos aductores), se impidió el cierre de las valvas mecánicamente y se introdujo la sonda, a través de la abertura pedal (parte anterior del animal).

Con el objetivo de comprender el mecanismo de alimentación de *M. arrokeana* se extrajeron 15 ejemplares fuera de su hospedador y se los colocó en recipientes separados con agua de mar filtrada (0,45 μm), posteriormente se les ofreció alimento (fito y zooplancton, Kent corp.), se fotografió y documentó el comportamiento bajo lupa. Algunos ejemplares se utilizaron para microscopía electrónica de barrido (MEB)

Estudio de la dieta mediante métodos directos

Determinación del contenido estomacal de *M. arrokeana* y *P. abbreviata*

Para el estudio de la dieta se recolectaron 30 ejemplares vivos de *P. abbreviata* del golfo San José (Punta Conos) y 30 ejemplares del golfo San Matías (Puerto lobos). Se recolectaron todos los ejemplares de *M. arrokeana* que se encontraban en su interior. En el laboratorio se realizó una disección macro anatómica del sistema digestivo para revisar el contenido estomacal de cada especie (30 ejemplares de *P. abbreviata* y 30 ejemplares *M. arrokeana*). El

contenido estomacal de cada uno de los individuos de cada especie, fue homogeneizado por separado y teñido con una solución acuosa de 0,1% de Rosa de Bengala durante 24 hs. El material se observó en su totalidad bajo lupa estereoscópica y microscopio óptico, y se contabilizó la cantidad de ítems identificables. El material identificado se separó en categorías (1, 2, 3, 4) y se lo fotografió con cámara digital montada sobre lupa o microscopio según fue necesario. El análisis de frecuencia de ocurrencia de cada categoría identificable (O%), se lo dividió por la cantidad de individuos muestreados y multiplicado por 100 (según Hyslop 1980). También se midió el pH de un homogenato de preparados de probóscides (n = 10), con tiras de pH (Merck).

Estudio de la dieta mediante métodos indirectos

Análisis de Isótopos Estables ^{13}C y ^{15}N

De los ejemplares de *P. abbreviata* y *M. arrokeana* recolectados para el estudio la dieta, se eligieron 20 ejemplares de *P. abbreviata* y sus respectivos ejemplares de *M. arrokeana* de cada sitio de muestreo (40 ejemplares de *P. abbreviata* y 30 ejemplares de *M. arrokeana* en total).

Para el procesamiento (corte, pesado, secado, análisis) del tejido de *M. arrokeana* y *P. abbreviata* se realizó la siguiente secuencia: a cada uno se les quitó un pedazo de aproximadamente 1 cm² de músculo de la ventosa en caso de *M. arrokeana* y de la pared interior de uno de los sifones en el caso *P. abbreviata*, se utilizó un bisturí para cada especie para evitar contaminaciones entre tejidos. Cada porción se colocó en bolsas individuales con su correspondiente rótulo y se mantuvieron en frío (-20° C) para luego ser procesadas en el laboratorio.

Las muestras de tejido de cada individuo de cada especie, fueron separadas por sitios (golfo San Matías (GSM) y golfo San José (GSJ)), y fueron colocadas en un sobre de papel aluminio para luego secarlos en estufa a 60°C hasta peso constante (aproximadamente 48 hs.). Cabe destacar que luego del secado algunas muestras de *M. arrokeana* no contaban con la suficiente masa, en esos casos se reunieron las muestras con otras (ver Tabla 1), pero siempre respetando los sitios independientes. Los análisis isotópicos fueron realizados para cada muestra (nemertino y bivalvo).

Los análisis de isótopos estables ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) se determinaron con un espectrómetro de masa en el Laboratorio de Isotopos Estables (Servicio Interdepartamental de Investigación, Universidad Autónoma de Madrid, España). Los resultados de las proporciones isotópicas se informaron como valores de δ , según la siguiente ecuación:

$$\delta X (\text{‰}) = [(R \text{ muestra} / R \text{ standard}) - 1] \times 1000$$

donde X es ^{13}C ó ^{15}N y R es la relación $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ o $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$ correspondiente. Como estándar se utilizó el “N₂” para el N y la Belemnita de Vienna Pee dee (V-PDB) para el $\delta^{13}\text{C}$ (Peterson y Fry 1987). Las unidades se expresaron como partes por mil (‰). Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ fueron normalizados según la ecuación propuesta por Post *et al.* (2007) para evitar efectos confundidos debido al contenido lipídico de la muestra.

Análisis de datos

La frecuencia de ocurrencia de presas (O%), se calculó como el porcentaje de individuos que se alimentan de cada categoría identificable observada y se calculó para todo el conjunto de datos para cada especie. Los intervalos de confianza (IC, 95 %) para las O%, se generaron por simulaciones de *bootstrap* no paramétrico (Tirasin y Jorgensen 1999) para las dos especies. Los cálculos se realizaron con el *software* R versión 2.15.3 (R Development Core Team) utilizando el método percentil implementado por *default* (Ripley 2005), se realizaron 9999 repeticiones.

En primer lugar, las comparaciones intraespecíficas se realizaron para probar si existían diferencias significativas entre los sitios de muestreo, si no hubiese diferencia se combinaron los datos de ambos golfos. Las comparaciones se realizaron mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon (*Wilcoxon rank sum test*, Crawley 2007) ya que los datos no mostraron homocedasia.

Las comparaciones entre las posiciones tróficas de *M. arrokeana* y *P. abbreviata*, consistió en estimar su nicho isotópico, utilizando la aproximación “*multivariate ellipse-based metrics*” (Jackson *et al.* 2011). Este análisis genera elipses con áreas estándar (*Standard Ellipses Area*, SEA) bivariantes, que son equivalentes a la desviación estándar en un análisis univariado. Se utilizaron

las áreas de las elipses estándar corregidas (SEA_C) debido al pequeño tamaño de la muestra. Para calcular el solapamiento de los nichos calculados (elipses) se generaron estimaciones bayesianas de SEA (SEA_B) para poner a prueba las diferencias entre los nichos tróficos, mediante su comparación con un IC de 95% (ver Jackson *et al.* 2012 y Zabala *et al.* 2013 como ejemplos). Teniendo en cuenta que el valor de fraccionamiento de los isótopos de carbono es mayor que el valor común asumido (1‰), para los animales acuáticos (por ejemplo $\Delta^{13}C = 2$; Dubois *et al.* 2007 y $\Delta^{13}C = 2,6$ McKnight 2009) y que las diferencias interespecíficas en el fraccionamiento trófico podrían llevar a conclusiones erróneas, se les restó 1 ‰ a todos los valores de $\delta^{13}C$ para *P. abbreviata*. El fraccionamiento isotópico para el nitrógeno ($\delta^{15}N$) se asumió similar para las dos especies (Dubois *et al.* 2007 $\Delta = 3.8$ y el promedio para organismos marinos $\Delta = 3.4$, Post *et al.* 2002) por lo cual no se realizaron correcciones.

La prueba de Wilcoxon (*Wilcoxon rank sum test*) se utilizó para comparar las diferencias en la composición isotópica ($\Delta\delta X_{s-h} \neq 0$ ‰) entre las especies. Los cálculos se realizaron con el software *R*, V.2.15.3 (R Development Core Team) y el paquete SIAR (Jackson *et al.* 2011)

Resultados.

Estructura de la probóscide:

La boca se ubica en el extremo anterior y se abre directamente a la cavidad de la faringe que ocupa hasta un tercio del animal. La boca carece de labios u otra estructura especializada, pero puede ser amplia ocupando casi la totalidad de la parte anterior del animal (Fig. 4.1 B).

La probóscide de *M. arrokeana* es pequeña comparada con la de otros hoplonemertinos. Su longitud ocupa la mayoría (85%) de la longitud del rincocele y, su ancho varía entre 0,3 y 0,5 mm. Se extiende dorsalmente a lo largo del cuerpo y desemboca en la parte dorsal de cavidad de la faringe, antes de salir por la boca. En su posición retraída, este órgano está formado por un epitelio externo fino, una capa muscular circular, una capa de parénquima con filetes nerviosos y un epitelio interno recubierto por papilas. Estas papilas, tienen un arreglo circular alrededor de toda la probóscide, son cónicas y su superficie es porosa (Fig. 4.1 F).

El músculo retractor de la probóscide recorre una corta distancia en el rincocele, luego atraviesa la pared del mismo e ingresa en el parénquima, anclándose dorsalmente a la pared del cuerpo cerca del ano. No se observan ni bulbo de estilete ni estiletos propiamente dichos.

Las papilas poseen una morfología característica, están compuestas por dos tipos de células glandulares, uno dispuesto en la parte basal – de anclaje al epitelio- y otro dispuesto en el extremo apical con la superficie cubierta de poros (Fig. 4.3. A, B), posibles canales (ca) de salida de secreciones (mt) producidas por las células glandulares (Fig. 4.5). El tamaño de las papilas es creciente hacia la parte distal de la probóscide, siendo las papilas más grandes y desarrolladas en el extremo terminal, su longitud varía entre 20 a 100 μm (Fig. 4.1 D). Las papilas están distribuidas uniformemente en forma de “cepillo” a lo largo de la probóscide (Fig.4.1. D, E).

Las secreciones de las células de la probóscide no registraron ningún compuesto ácido ($\text{pH} = 7$), lo cual descarta una secreción que podría estar involucrada en la pre digestión.

Estructura de la faringe.

La faringe está bien desarrollada y ocupa el 25 % de la longitud total del animal, es de forma cilíndrica y su tamaño varía entre 1 a 7 mm de largo y 0,4 a 1,5 mm de ancho (Fig. 4.2.). El lumen de la faringe está recubierto internamente por papilas cónicas ciliadas (Fig. 4.2. A, B). Estas papilas a diferencia de las de la probóscide no presentan una estructura diferenciada (base y ápice) (Fig. 4.2. C, E), sino que son proyecciones del parénquima, con una capa de células glandulares y un epitelio externo simple y ciliado (Fig. 4.4. C, E). La distribución de las papilas de la faringe no es uniforme (Fig. 4.2. A, C), en disecciones del animal fresco se pudo observar que las papilas de la faringe tienen la capacidad de moverse en todas direcciones (Fig. 4.2. B). El tamaño de las papilas de la faringe varía según la posición donde se encuentren, las más grandes se sitúan en la parte anterior, cerca de la boca y las más pequeñas en la parte posterior cerca del esófago.

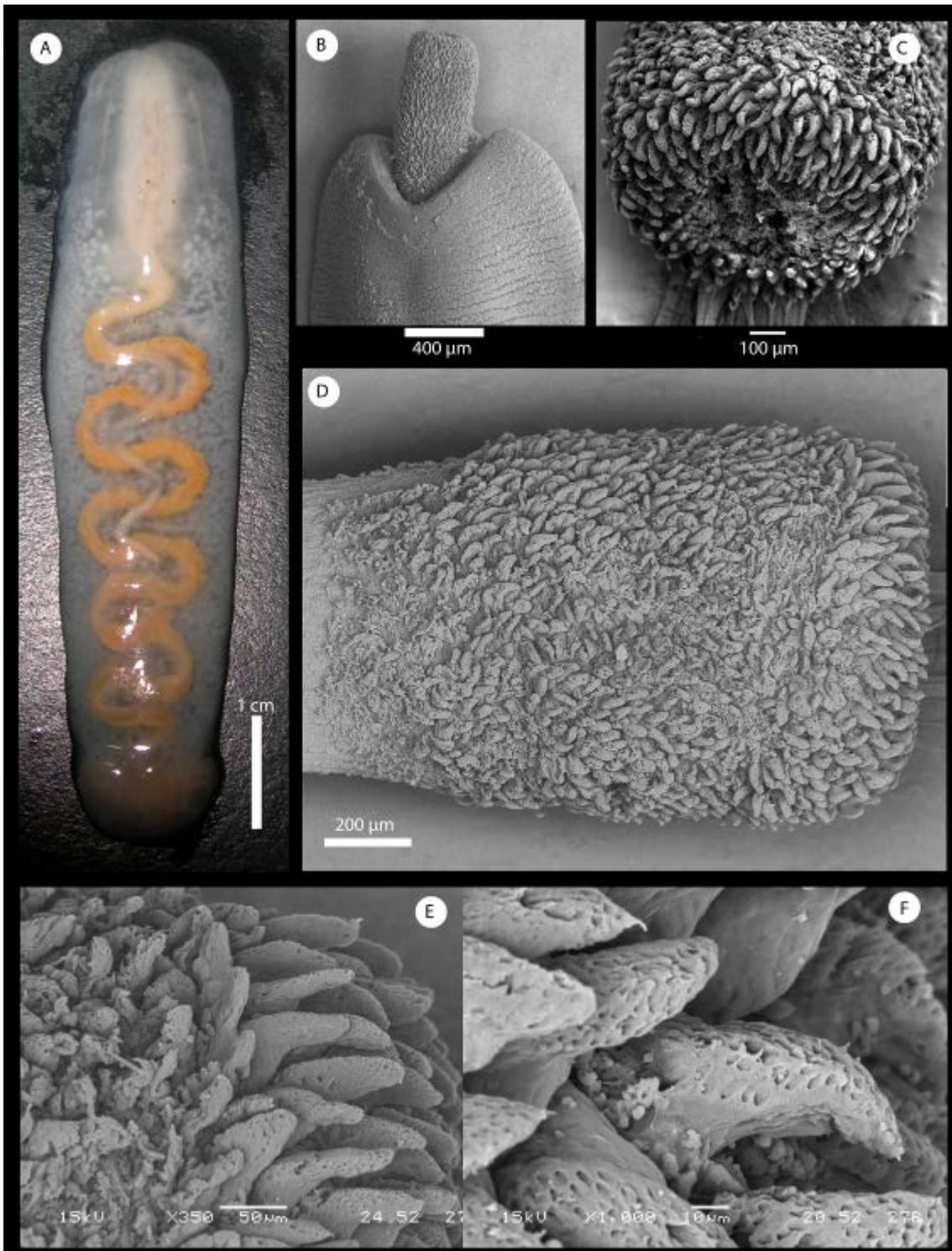


Fig. 4.1. *Malacobdella arrokeana* y detalle de la probóscide. A. Cuerpo completo, B-F. Fotos realizadas con MEB. B. Probóscide evertida, C. Distribución de las papilas D. Detalle del comienzo de la eversión, desarrollo gradual de las papilas. E, F. Detalle de la morfología de las papilas cónicas.

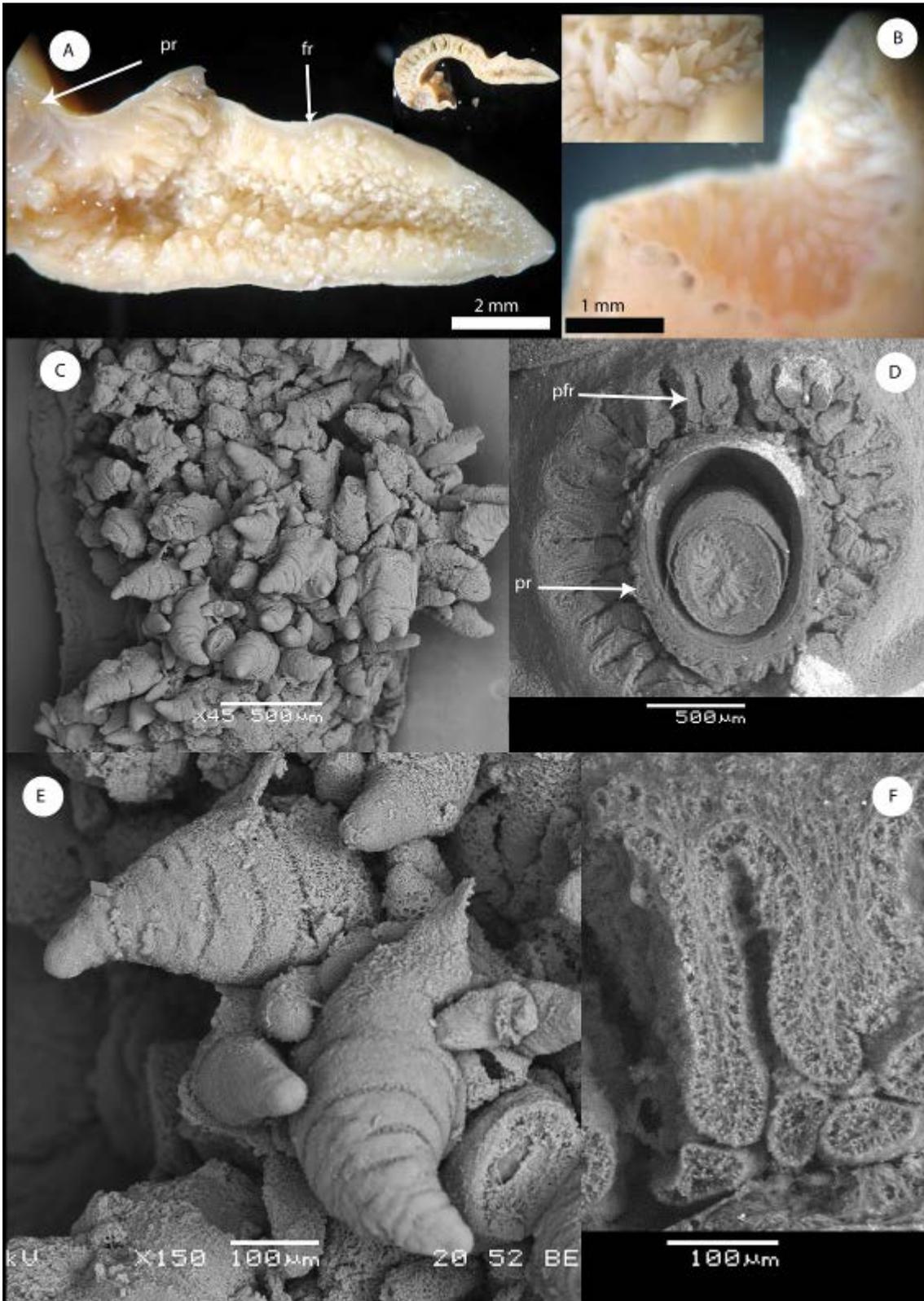


Fig.4.2. *M. arrokeana* y detalle de la faringe. Fotos A, B. Bajo lupa. C-F. Mediante MEB. A. Corte sagital de la región cefálica de *M. arrokeana*; nótese la relación de la faringe (fr) con respecto al cuerpo. B. Boca y detalle de las papilas a la lupa. C. Distribución no uniforme de las papilas internas de la faringe. D. Corte transversal de la región anterior, nótese el contacto de las papilas de la faringe (pfr) con la probóscide (pr). E. Papilas de la faringe. F. Corte transversal de una papila de la faringe.

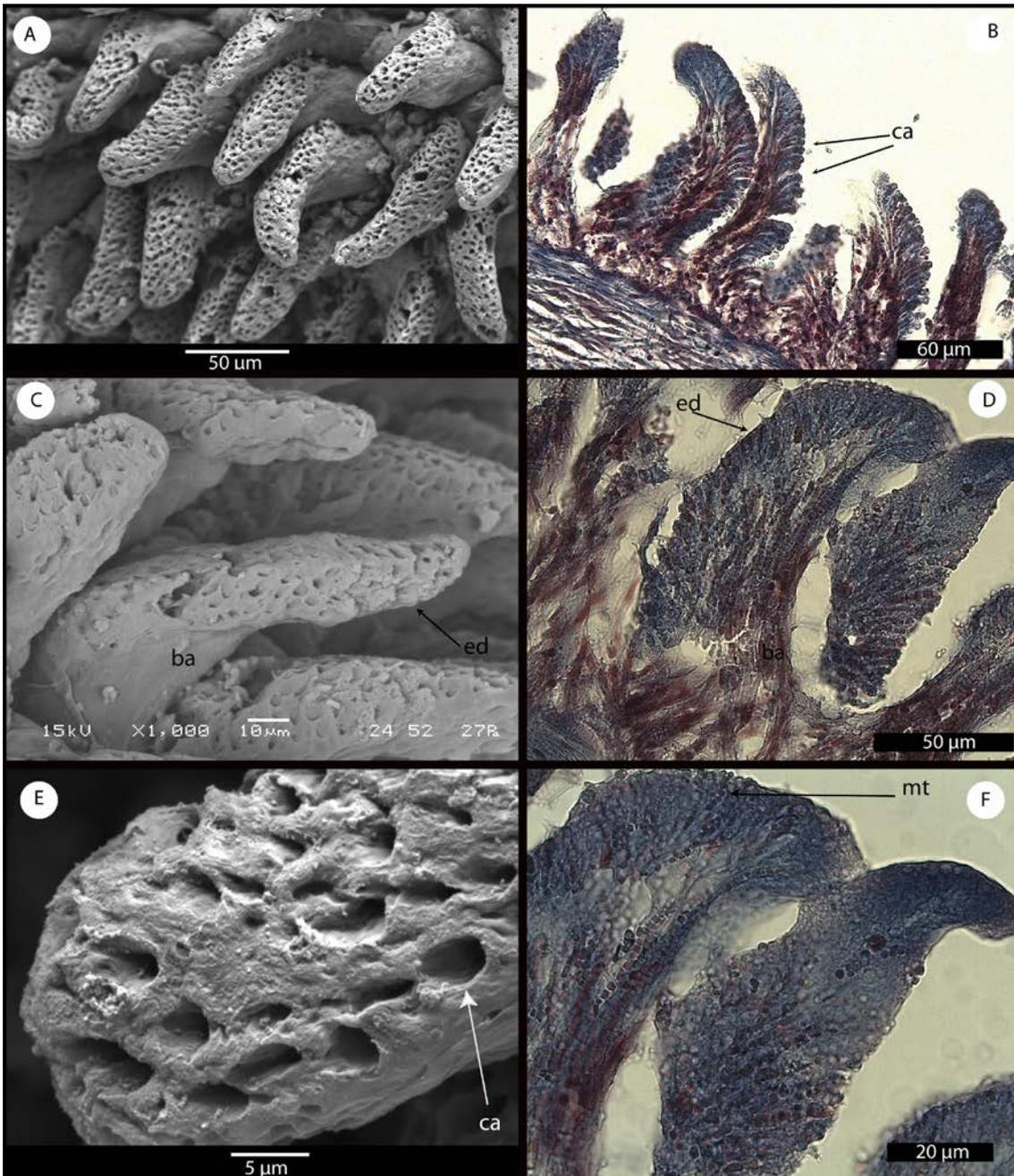


Fig. 4.3. Detalle morfológico de papilas "en cepillo" de la probóscide de *M. arrokeana*, fotos A, C y E MEB; B, D y E. Tricómico de Masson. A. Ordenamiento de papilas en la probóscide. B. Corte transversal de las papilas, C. Estructura de las papilas. C. Detalle del tipo celular que compone las papilas en corte transversal. E. Detalle del extremo apical (ed) de una papila nótese los poros en la superficie. F. Detalle de las células de las papilas en corte transversal de probóscide evertida. Abreviaturas: ba = base de la papila, ed = extremo apical, ca = poros, mt = secreciones.

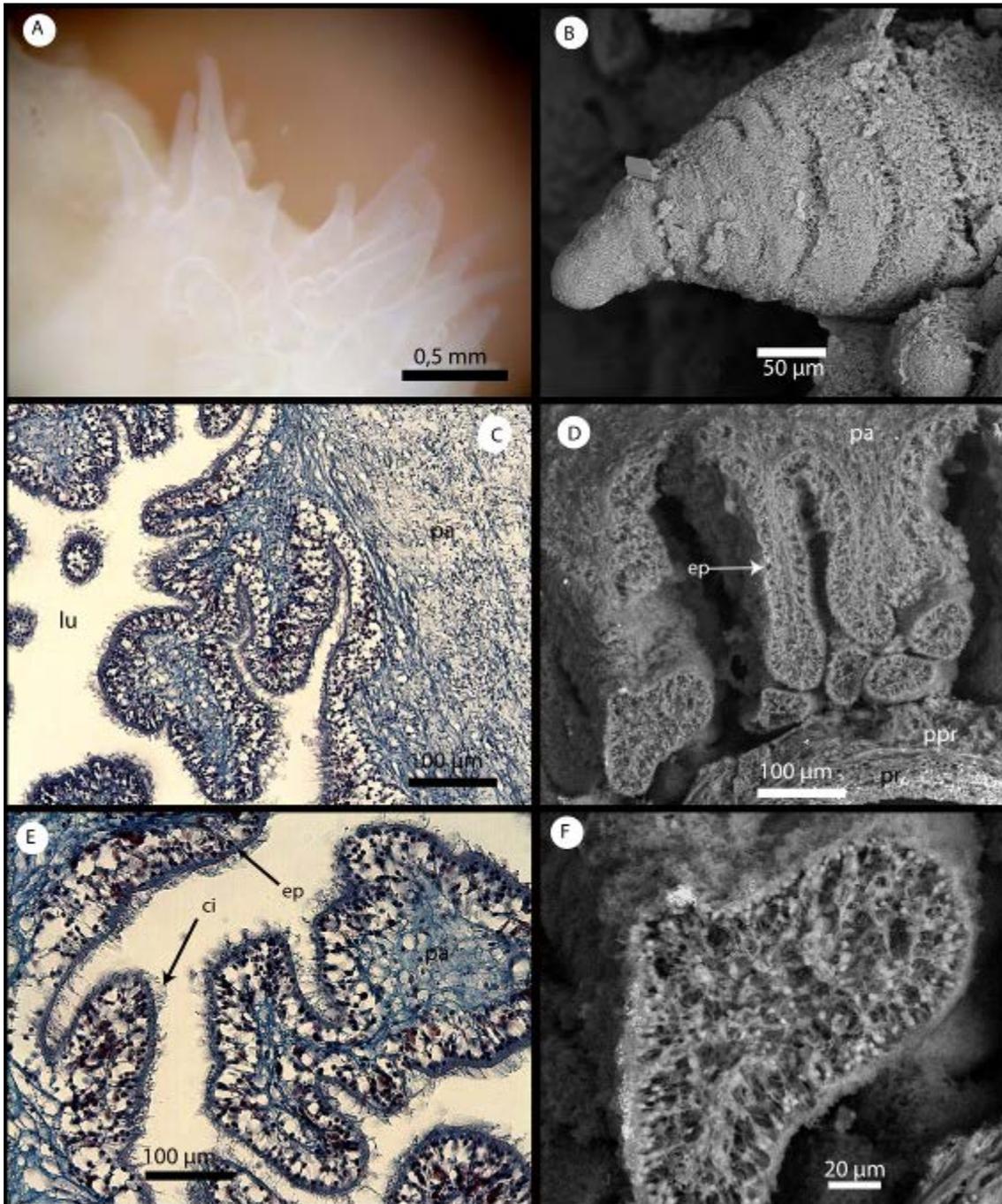


Fig. 4.4. Detalle morfológico de las papilas de la faringe de *M. arrokeana*, fotos A. Bajo lupa; C y E. Tinción con tricrómico de Masson; B, D y F. Mediante MEB. A. Papilas en material fresco. B. Detalle de una papila de la faringe. C. Detalle de la células de la faringe en corte longitudinal de la zona cefálica, D. Corte transversal de papila de la faringe, E. Detalle en corte transversal de una papila, F. Corte transversal de una papila de la faringe al MEB. Abreviaturas: ep = epitelio, ci = cilios, lu = lumen de la faringe, pa = parénquima, ppr = papilas de la probóscide, pr = probóscide.

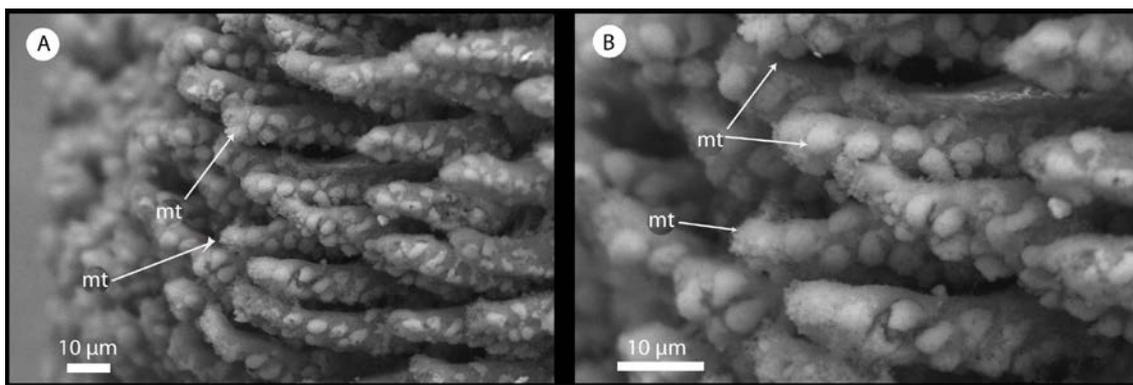


Fig. 4.5. Imágenes de MEB de papilas de la probóscide de individuos de *M. arrokeana*. A y B. Detalle de papilas de probóscide con secreciones ubicadas en los poros de la superficie.

Exploración endoscópica

Como resultado de la exploración endoscópica, no pudo registrarse a *M. arrokeana* alimentándose a través de la eversión, captura y reversión de su probóscide y capturando presas libres en el agua. Sin embargo, se confirmó su posición siempre en las cercanías de las branquias, adheridos al manto a través de su ventosa terminal (Fig. 4.6. C) con la zona cefálica dirigida hacia la base de las laminas branquiales de *P. abbreviata* (Fig. 4.6. A, B, C). Este comportamiento implica el contacto de la boca de *M. arrokeana* con el eje de la branquia y entre las láminas branquiales, recorriéndolas longitudinalmente (Fig. 4.6 D, E, F). En los casos donde había más de un individuo dentro de la misma *P. abbreviata*, la distribución de los individuos era diferente. Mientras que los más grandes se ubicaban adheridos al manto, los más pequeños se encontraron adheridos a las láminas branquiales de *P. abbreviata*. En pocos casos, los ejemplares de *M. arrokeana* se ubicaban próximos a los palpos labiales.

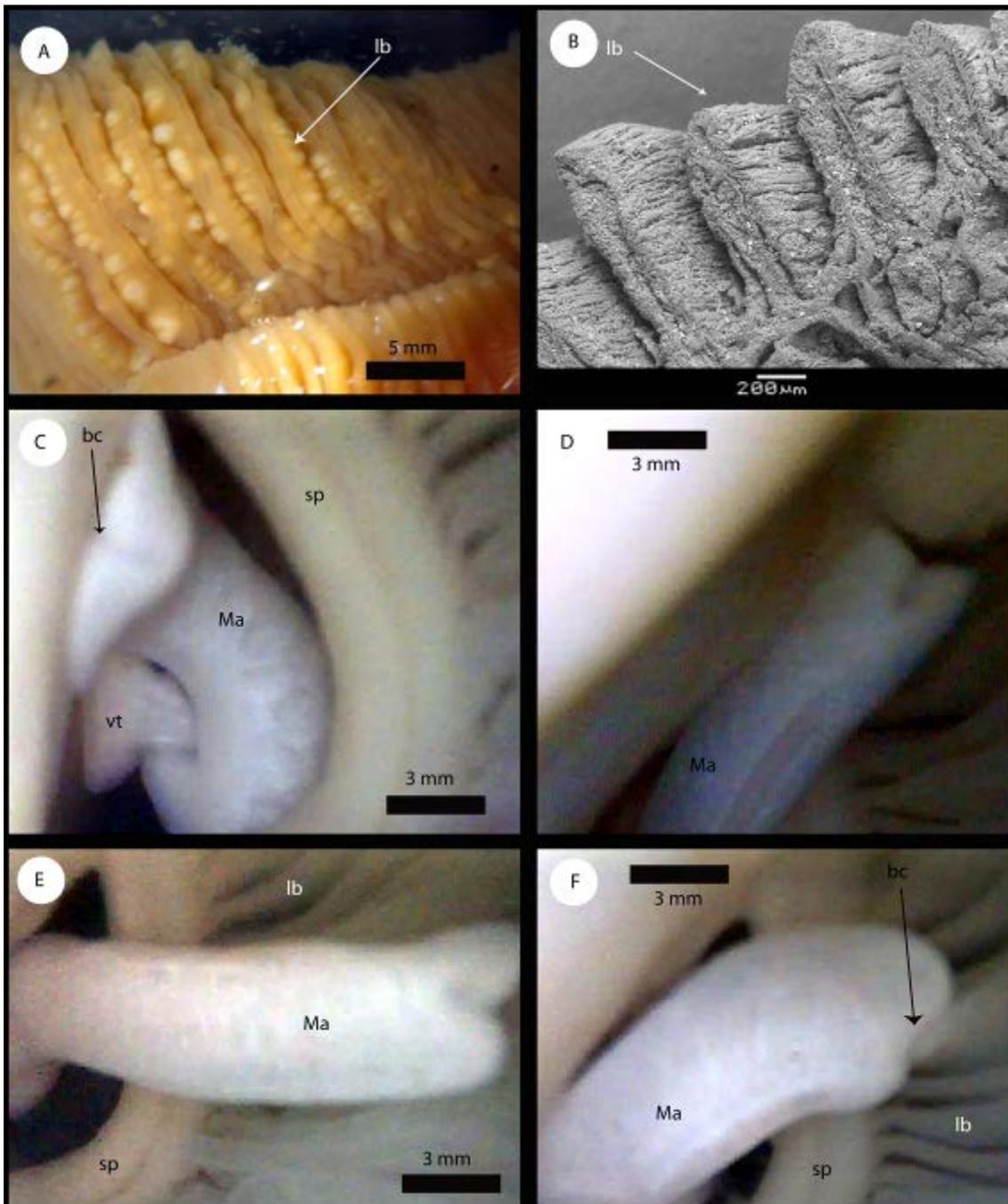


Fig. 4.6. C-D. Imágenes de *M. arrokeana* en vivo, obtenidas por endoscopia: A. branquias de *P. abbreviata*, B. imagen de MEB, corte transversal de laminas branquiales (lb) de *P. abbreviata*, C., *M. arrokeana* (Ma), adherida por medio de la ventosa (vt) al manto de *P. abbreviata*, D, E y F. Secuencia de recorrido de laminas branquiales de *P. abbreviata* ("cepillado"). Abreviaturas: bc = boca, sp = eje de la branquial.

Alimentación fuera del hospedador

Se observó que en presencia de alimento (fito y zooplancton), *M. arrokeana* comenzó a efectuar una serie de contracciones musculares en la zona de la faringe (Fig. 4.7 A) acompañada de un aumento y disminución en la apertura de la boca (Fig. 4.7 B, C y E), y un movimiento de la zona cefálica hacia los costados (Fig. 4.7 D). Estos movimientos generaron que las partículas que se encontraban suspendidas comenzaran a ingresar en la boca (Fig. 4.7).

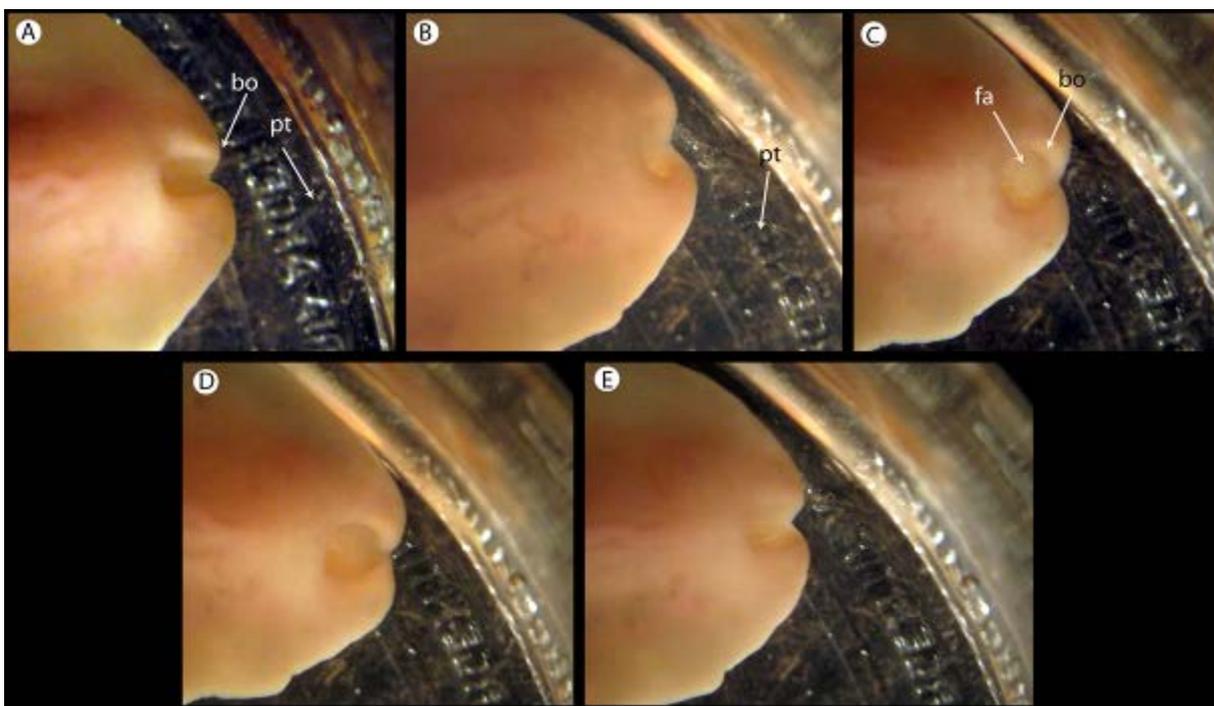


Fig. 4.7. Secuencia de alimentación a través de sucesivas contracciones musculares en *M. arrokeana*. A. Comienzo de la contracción, elevación de la pared dorsal de la faringe. B, C y D. Dilatación de la faringe y posterior apertura de la boca (bo), se puede observar la pared ventral de la faringe (fa), E. final de la contracción. Abreviaturas: pt = partículas en suspensión.

Estudio de la dieta mediante métodos directosContenido estomacal de *M. arrokeana* y *P. abbreviata*.

El análisis del contenido estomacal de *P. abbreviata* y *M. arrokeana*, recolectadas en el campo, se compuso mayoritariamente con ítems alimenticios característicos de animales suspensivos filtradores bentónicos. El 95% de los estómagos analizados tenían contenido identificable. El contenido se clasificó en cuatro categorías diferentes, 1) microalgas (*Nannochloropsis spp.*, *Isochrysis spp.*, *Tetraselmis spp.* entre otras), 2) diatomeas, 3) exoesqueletos de pequeños crustáceos, 4) detrito y arena. La frecuencia de ocurrencia (O%) de cada una de las categorías se muestra en la Figura 4.8. Los alimentos consumidos por ambas especies fueron similares. Para *P. abbreviata* el 40% de los contenidos pertenecieron a la categoría 2 (diatomeas, Fig. 4.9 B, C, F), mientras que un 30% correspondía a la categoría 1 (Fig. y 4.9 A, E), un 20% correspondió a detritos y arena (4, Fig. 4.9. A B) y el 10% restante a exoesqueletos de pequeños crustáceos (Fig. 4.9. C). Para *M. arrokeana* un 38% de los contenidos pertenecía a la categoría 1 (microalgas, Fig. 4.10. F y G), mientras que el 40% correspondió a la categoría 2 (Fig. 4.10. E y F), un 7% corresponde a exoesqueletos de pequeños crustáceos (3, Fig. 4.10. A, B y C) y el 15% restante de detritos y arena (4, Fig. 4.10. A y F).

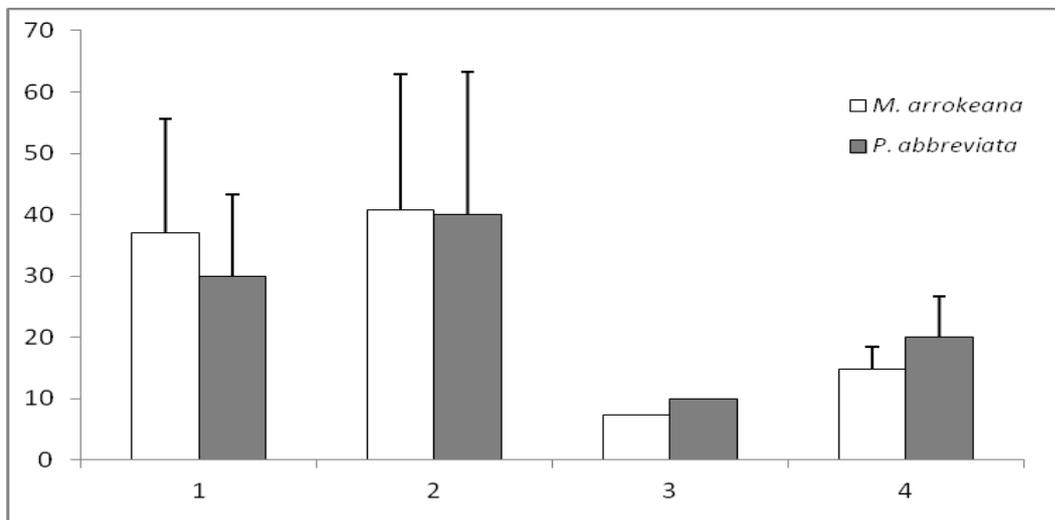


Fig.4.8. Porcentaje de ocurrencia (O%) de las categorías de alimentos encontrados en estómagos de *M. arrokeana* y *P. abbreviata*, para ambos golfos.

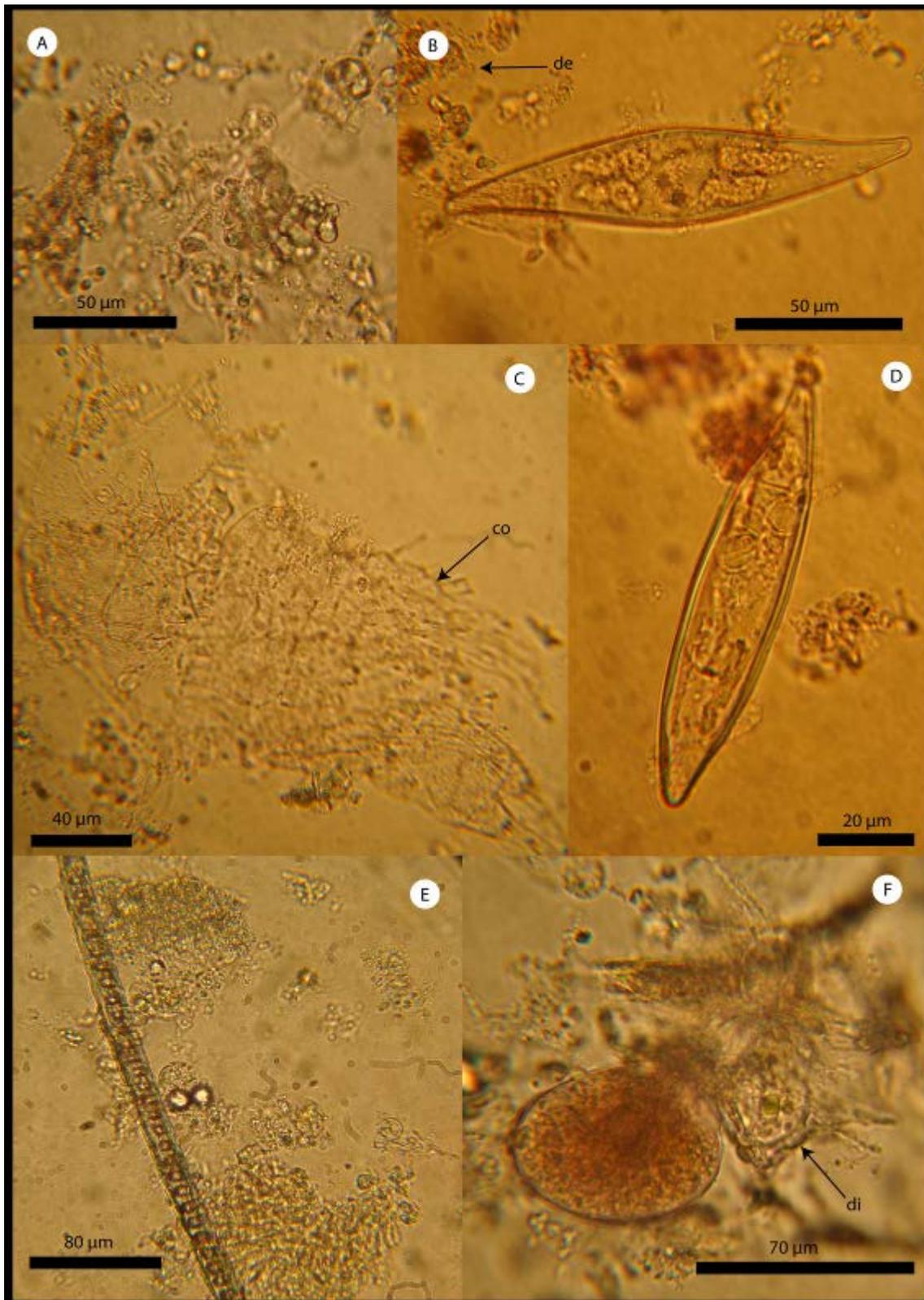


Fig. 4.9. Contenido estomacal de *P. abbreviata*, A y E. Detalles de algunas algas (categoría 1) encontradas en los estómagos. B y D. Diatomeas. C. exoesqueleto de crustaceo (co), F. Detalle de Silicoflagelado del género *Dictyocha* (di). Abreviaturas: de = detrito

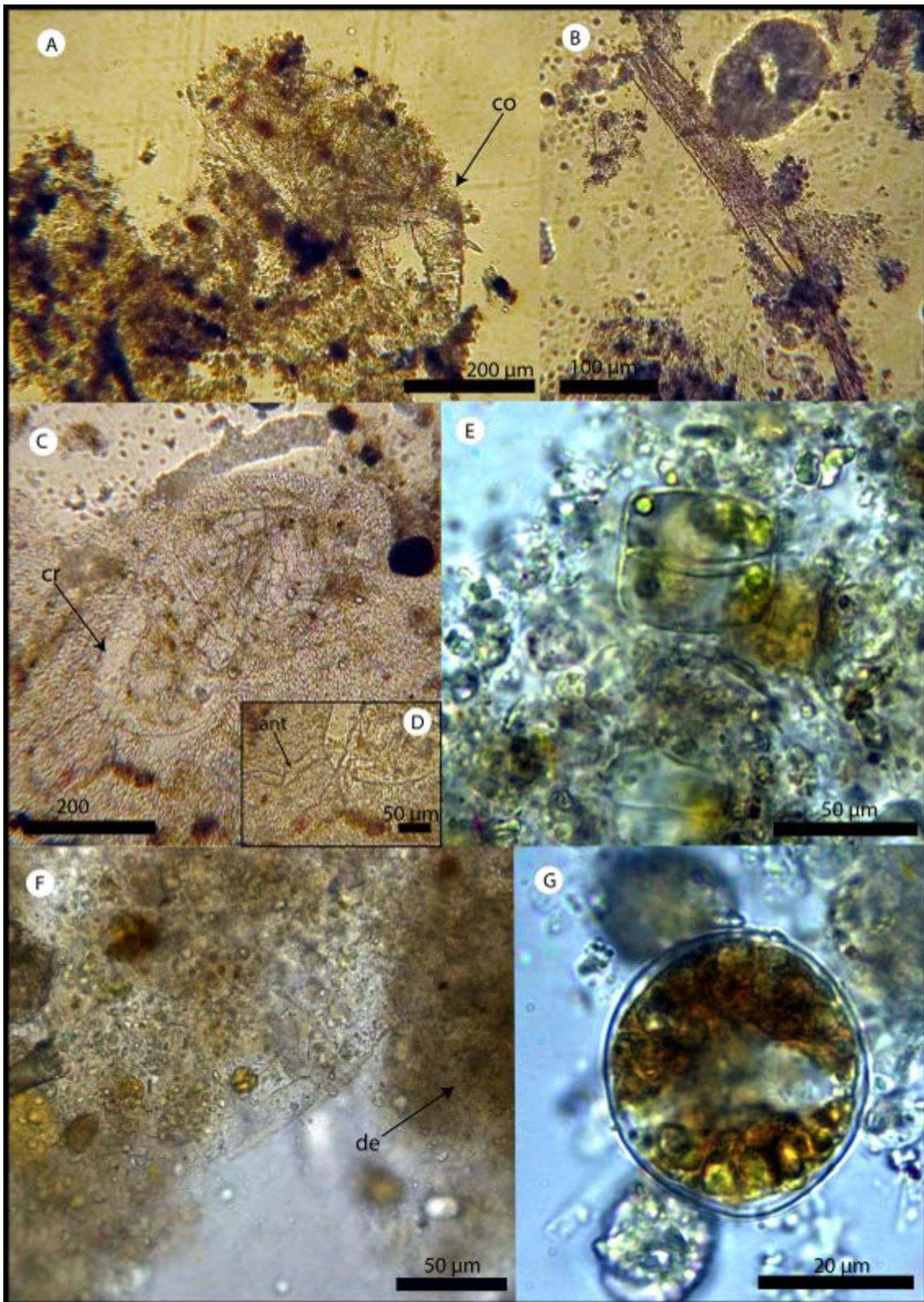


Fig. 4.10. Detalle de contenido estomacal de *M. arrokeana*. A, B, C y D. Detalle de exoesqueletos de crustáceos (cr) encontrados, copépodos (co) y otros sin identificar. D. Detalle de una antena (ant) de crustaceo. E. diatomea, F. Detalle de detrito (de) y algunas algas unicelulares. G. Detalle de alga unicelular

Estudio de la dieta mediante métodos indirectosAnálisis de Isótopos Estables $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$

Los valores isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ para *M. arrokeana* y *P. abbreviata* se expresan en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores medios isotópicos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ con su desvío estándar para todas las muestras en los dos golfos (San Matías y San José). N= número de muestras analizadas

Especie	N	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
<i>Golfo San Matías</i>			
<i>Panopea abbreviata</i>	20	-17,315 ± 0,365	13,815 ± 0,645
<i>Malacobdella arrokeana</i>	10	-17,297 ± 0,783	13,485 ± 0,563
$\Delta\delta X_{s-h}$		-0,33 ± 0,856	0,018 ± 0,863
<i>Golfo San José</i>			
<i>Panopea abbreviata</i>	20	-17,6 ± 0,645	13,797 ± 0,606
<i>Malacobdella arrokeana</i>	20	-17,209 ± 0,527	13,565 ± 0,425
$\Delta\delta X_{s-h}$		-0,232 ± 0,740	0,391 ± 0,832
Total			
<i>P.abbreviata</i>	40	-17,454 ± 0,535	13,806 ± 0,493
<i>M.arrokeana</i>	30	-17,238 ± 0,596	13,539 ± 0,456
$\Delta\delta X_{s-h}$		-0,267 ± 0,671	0,216 ± 0,8

Se analizaron las diferencias entre las fracciones de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ entre los dos sitios muestreados y entre las especies. Como no se encontraron diferencias intraespecificas significativas entre los sitios de muestreo, los datos se juntaron para el análisis (*P. abbreviata*: $W = 36$, $P = 0,31$ y $W = 49$, $P = 0,97$ para $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, respectivamente; y *M. arrokeana* $W = 22$, $P = 0,77$ y $W = 28$, $P = 0,77$ para $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, respectivamente). Ambas especies mostraron una dispersión similar en la composición isotópica, lo que indica que comparten el mismo nicho isotópico (Fig. 4.11). Los resultados no muestran diferencias significativas en la distribución de los nichos isotópicos (SEA_B , $P = 0,01$), y se observa un gran solapamiento entre las elipses calculadas (solapamiento SEA_B de 63%, Fig. 4.11). En concordancia, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ ($W = 199$, $P = 0,11$) y

los valores de $\delta^{13}\text{C}$ ($W = 118$, $p = 0,30$, Tabla 4), no mostraron diferencias significativas entre especies. Los diferentes golfos no tienen un efecto significativo en los valores de la $\Delta\delta X_{s-h}$ (Tabla 4). Ambas especies mostraron $\Delta\delta X_{s-h}$ similar para $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$, lo que confirma una relación de comensalismo, y que ambas especies tienen dietas típicas de organismos suspensívoros (*M. arrokeana*), filtradores (*P. abbreviata*).

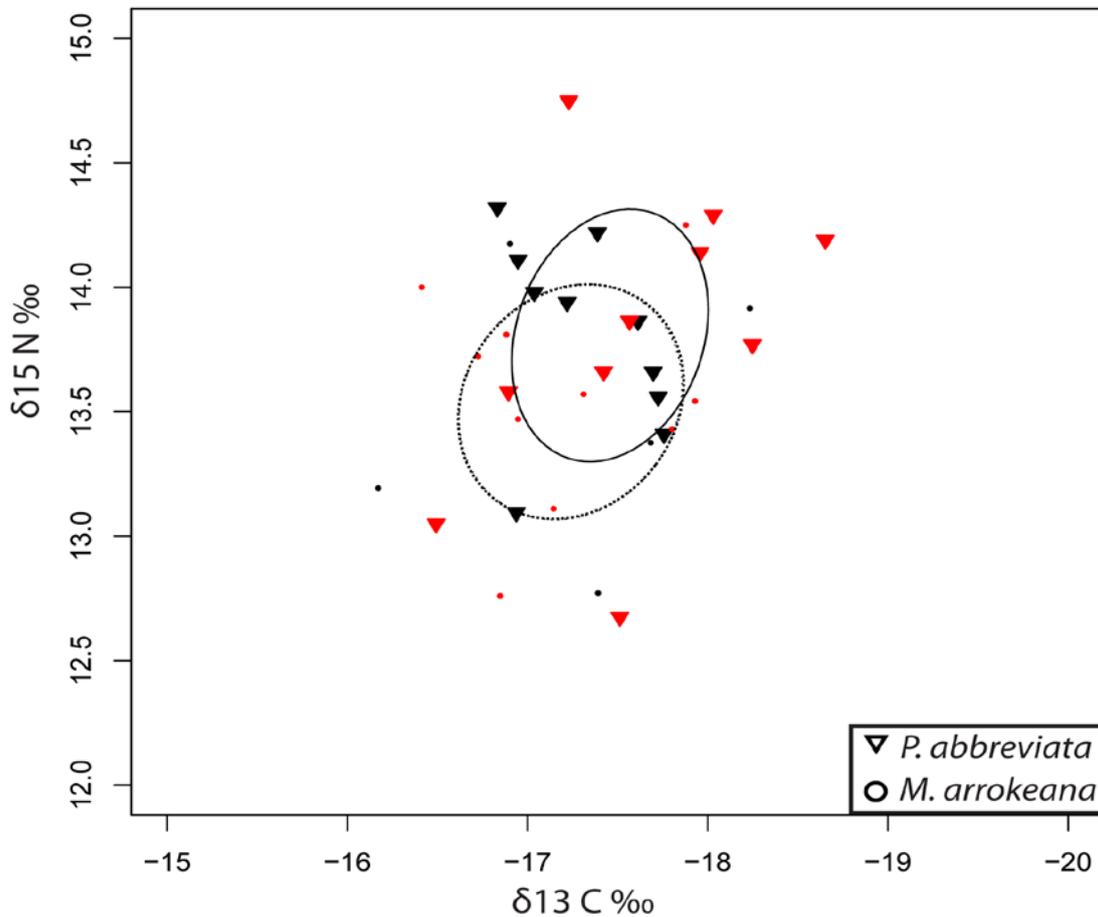


Fig. 4.11. Elipses estándar (SE_{AB}) calculadas para *P. abbreviata* (∇) y *M. arrokeana* (\circ). El color rojo corresponde a muestras del golfo San José y el negro al golfo San Matías.

Discusión

La anatomía de *M. arrokeana* ha sido descrita por Ivanov *et al.* (2002), y los ejemplares estudiados en esta tesis coinciden con dicha descripción en cuanto a la morfología de la probóscide y la faringe. En esta ocasión se obtuvo un detalle microanatómico.

Malacobdella arrokeana se alimenta preferentemente de algas microscópicas, pequeños organismos del plancton (dinoflagelados y diatomeas) y en pocas ocasiones de pequeños crustáceos. Es una especie omnívora oportunista, sin evidenciar preferencia alimenticia alguna. El detrito y partículas suspendidas en el plancton también forman parte importante de la dieta (15 %). No se registró material correspondiente al hospedador (tejidos o gametas) ni daño tisular en las branquias. Estos resultados coinciden con lo reportado por Gibson y Jennings (1967), para *Malacobdella grossa* y por lo registrado por Vázquez *et al.* (2009) en *M. arrokeana*, aunque éstos últimos describen un daño leve sobre el epitelio interior del manto del hospedador debido a la fijación de la ventosa terminal. En cuanto a lo observado para *P. abbreviata*, también comparte los mismos ítems alimenticios (microalgas, diatomeas y pequeños crustáceos), siendo individuos omnívoros, como otros organismos filtradores (Ruppert y Barnes 1994).

Las estructuras de la probóscide y la faringe de *M. arrokeana* cumplen un papel muy importante en la alimentación. La presencia de las papilas en cepillo en la probóscide brinda una mayor superficie de contacto y los poros de la superficie de las papilas estarían liberando secreciones producto de las numerosas células glandulares subepiteliales (Fig. 4.3 F y Fig 4.5). La presencia de células glandulares y de secreciones mucosas en la probóscide, ha sido registrada en *M. grossa* por Gibson y Jennings (1969) y más tarde por Magarlamov y Chernyshev (2010). Por su parte, la estructura de la faringe y las papilas que la recubren (de mayor tamaño ciliadas) son un buen complemento en la retención de partículas pequeñas que entran a la cavidad faríngea, y que luego son transportadas hacia el esófago mediante las cilias que recubren las papilas.

De la experiencia realizada con *M. arrokeana* fuera del hospedador, se observó un mecanismo de ingesta basada en una secuencia de contracciones

musculares en la zona de la faringe, este mecanismo fue también observado por Gibson y Jennings (1969) en *M. grossa*. En los casos donde las partículas de alimento fueran más grandes (ej. crustáceos), *M. arrokeana* utilizaría la probóscide de la manera tradicional en nemertinos, para capturar esas presas. Si las cilias no fueran capaces de transportar esas partículas grandes, la probóscide con movimientos de eversión y reversión ayudaría al ingreso de las mismas desde el lumen de la faringe hasta el esófago.

Como resultado de la inspección endoscópica que permitió observar a *M. arrokeana* en su estado natural (adherida al manto cerca de las láminas branquiales), es probable que *M. arrokeana* se alimente de partículas pegadas en las láminas branquiales, ya acumuladas por el bivalvo. *P. abbreviata* posee branquias del tipo C (1) según Atkins (1937), formadas por dos demibranquias, una externa y una interna y un canal alimenticio en el extremo de la interna (Signorelli y Alfaya, 2014), por donde se transporta el alimento retenido. Esta morfología de las branquias le proporciona una gran superficie de filtrado, y el alimento acumulado podría ser utilizado parcialmente por *M. arrokeana*. Desafortunadamente no pudo observarse a *M. arrokeana* capturando alimento con el uso de la probóscide, tal vez debido a dos factores experimentales, 1) el endoscopio trabaja con una luz y *M. arrokeana* vive continuamente en oscuridad, 2) la experiencia fue realizada en un ambiente anestesiado con $MgCl_2$ lo que probablemente pudo ocasionar un cambio de comportamiento del nemertino durante la inspección. Sin embargo se ha registrado la interacción de *M. arrokeana* con las láminas branquiales.

Los resultados del análisis de los valores de isótopos de $\delta^{13}C$ y $\delta^{15}N$, de *M. arrokeana* y *P. abbreviata* muestran una dispersión similar en sus valores isotópicos, evidenciando un importante solapamiento en sus dietas. Respecto a los valores de $\delta^{13}C$, se puede comprobar que los ítems alimenticios poseen el mismo valor de fraccionamiento para las dos especies, esto indica que la fuente de carbono de los alimentos consumidos por ambas especies es similar. Los valores negativos de $\Delta\delta^{15}N_{s-h}$ apoyan la condición de endocomensal y no parásito de *M. arrokeana*, coincidiendo con lo reportado por Gibson & Jennings (1979) para *M. grossa* y a su vez coincide con el modelo propuesto por Olive *et al.* 2003, para un predador. Ambas especies se alimentan de las mismas presas y *M. arrokeana* no se alimenta del tejido de *P. abbreviata* ($\Delta\delta^{15}N < 1$; \approx

0‰). Estos resultados fueron corroborados por el análisis del contenido estomacal. El gran solapamiento en sus nichos isotópicos (> 60%), confirma que ambas especies comparten el mismo nivel trófico y deben considerarse como consumidores del mismo nivel (Fig. 4.11; Jackson *et al.* 2011).

El estudio conjunto de los métodos indirectos y directos sobre la alimentación y la posición trófica de *M. arrokeana* con respecto a *P. abbreviata*, permitió conocer más en profundidad la relación entre estas dos especies. Finalmente, tomando en cuenta el contenido estomacal, la estructura de la probóscide, los mecanismos de alimentación y los valores isotópicos de ambas especies, se puede confirmar que *M. arrokeana* se alimenta de las partículas (fito y zooplancton) que ingresan con la corriente incurrente a la cavidad del manto de *P. abbreviata*, las partículas pequeñas son atrapadas por las papilas ciliadas de la faringe que a través de la corriente generada por las cilias las transportan hacia el esófago. Las partículas más grandes como crustáceos, serían atrapadas por la acción de la probóscide (cubiertas de papilas), y transportadas con la ayuda de las papilas de la faringe hacia el esófago. La posición de *M. arrokeana* dentro de *P. abbreviata*, la interacción con las láminas branquiales y la morfología de las branquias de *P. abbreviata* evidencian que *M. arrokeana* podría alimentarse de parte del alimento retenido por el bivalvo. A su vez, la posición de los ejemplares pequeños de *M. arrokeana* - entre las láminas branquiales - le proporcionaría un refugio y una fuente de alimento, durante su desarrollo.

Futuros estudios sobre las condiciones poblacionales del bivalvo servirían para conocer mejor los efectos que esta dependencia, podrían generar en las poblaciones de *P. abbreviata*.

Consideraciones en el uso de las técnicas

A pesar que las técnicas indirectas, tales como los isótopos estables y los análisis de ácidos grasos, ofrecen alternativas variables para dilucidar y entender los patrones dietarios y sus relaciones tróficas en numerosas especies (Paradis y Ackman 1977, Cahu *et al.* 1995, Brett y Müller-Navarra 1997, Newsome *et al.* 2009), los modelos computacionales utilizados para analizar estos resultados no incorporan factores relevantes como la disponibilidad de presas, palatabilidad, aporte energético o las interacciones por competencia. Por el otro lado, la información recibida por técnicas directas como el análisis de contenido estomacal (Cheng-Tze *et al.* 2007) y observaciones directa de campo para dilucidar la composición de la dieta, no ofrece información acerca del input nutricional de cada presa, como si otorgan los isótopos estables (Cheng-Tze *et al.* 2007). Por consiguiente, mientras los AIE proveen información de las relaciones tróficas y su estructura, los métodos convencionales para determinar dieta, proveen detalles de los patrones de utilización de la presa. Ambas técnicas utilizadas en forma conjunta, proveen una integración de los resultados. Este punto se vio ilustrado en los resultados de esta tesis, ya que sólo cuando se combinaron ambas técnicas fue posible describir y discutir la relación de estas dos especies.

Reproducción y desarrollo larval

Reproducción y desarrollo larval

Introducción

Como se ha mencionado en los antecedentes, los nemertinos poseen diversas estrategias en lo que se refiere a la reproducción, desde formas de dispersión por larvas planctónicas hasta especies con desarrollo directo y vivíparas. Cada una de estas estrategias está relacionada con su modo de vida, y los ambientes en donde estas especies se desarrollan. En este capítulo se hace referencia especialmente a los nemertinos que comparten algún tipo de dependencia, ya sea metabólica o simplemente reproductiva con alguna especie hospedadora, como es el caso de *Malacobdella arrokeana* con su hospedador, la almeja gigante *Panopea abbreviata*.

El huésped debe asegurar que la descendencia llegue a los hospedadores correctos, ya que los huéspedes por lo general son más pequeños que los hospedadores y el entorno entre hospedadores suele ser hostil (Prince 1980). Los parásitos han desarrollado varias adaptaciones reproductivas reduciendo este riesgo, entre ellas, un gran aumento en la producción de huevos, reproducción asexual, partenogénesis y hermafroditismo (Prince 1980).

Jennings y Calow (1975) argumentan que en parásitos, la alta fecundidad registrada en muchos de ellos es un resultado del modo de vida parasitaria (parasitismo) en lugar de ser una adaptación a la misma. Su argumento se basa en que, dado que los parásitos suelen tener un suministro estable y continuo de alimento más un ambiente relativamente predecible, pueden destinar una mayor producción de energía a la reproducción. En cambio, los animales de vida libre deben destinar mucha más energía para conseguir alimento y completar sus reservas para los momentos donde el alimento sea escaso; esto repercutiría en una menor inversión energética en reproducción. Ya sea que la alta fecundidad se vea como una adaptación, o como resultado del parasitismo, ambos argumentos apoyan la idea de que el aumento de la capacidad reproductiva es una característica de los parásitos.

En las hembras de nemertinos de vida libre - de la clase Anopla - los oocitos maduran simultáneamente en cada gónada. Por el contrario, en la

mayoría de las hembras de la clase Enopla, sólo un huevo grande madura por ovario, pero las hembras suelen tener muchos ovarios (Bierne 1983). Por lo general, los nemertinos tienen sexos separados (Riser 1974) y liberan sus gametas (oocitos y esperma) directamente en el agua o en masas gelatinosas o capullos (Riser 1974; Bierne 1983) que adhieren al sustrato.

Roe (1988), en una revisión sobre las características reproductivas de los nemertinos que viven en algún tipo de relación de dependencia con algún hospedador, enumera algunas de las adaptaciones a la vida parasitaria, diferentes a las encontradas en especies de vida libre. Asimismo, esta autora argumenta que los nemertinos que estén asociados a un hospedador y tengan estas adaptaciones, es posible que sean parásitos. Entre estas adaptaciones menciona, 1) el gran tamaño de las gónadas con respecto al tamaño corporal, 2) la gran cantidad de oocitos por ovario, comparado con otros nemertinos de vida libre, 3) la presencia de alguna modificación morfológica para la cópula 4) una alta sincronización en la reproducción con la del hospedador, 5) la capacidad de tener reproducción partenogenética y hermafroditismo, 6) la falta de estacionalidad en la etapa reproductiva y 7) el desarrollo directo o una vida larval corta que asegure rápido asentamiento de la siguiente generación.

Algunas especies que por sus características adaptativas, fueron las más estudiadas y consideradas parásitos verdaderos, como las especies del género *Carcinonemertes*, mas allá del daño directo que ocasiona sobre la especie hospedadora (se alimenta de los huevos y larvas de cangrejos), poseen algunas adaptaciones reproductivas importantes que difieren de otros nemertinos de vida libre. Entre ellas, las gónadas de las especies de este género se extienden a lo largo de todo el cuerpo, rodeando el intestino, casi hasta el cerebro (Coe 1902). Una hembra de *C. imminuta* puede producir más de 1000 oocitos en sus ovarios (Humes 1942), mientras que una de la especie *C. epialti* puede producir 17 sacos con 1500 a 3000 huevos en su interior, con tan solo 9 mm de largo total (Mc Demontt 1966). Ambos ejemplos superan a cualquier especie del género *Prostoma*, nemertino de vida libre que sólo produce 210 huevos (Moore y Gibson 1985). *C. epialti* también posee varios períodos de desove durante el año sin ninguna estacionalidad, su reproducción está relacionada con los períodos de muda de su hospedador (Kuris 1993). Otra adaptación que incrementa la reproducción es la capacidad de producir

larvas por partenogénesis cuando los machos están ausentes, esta característica fue registrada en al menos dos especies de este género (*C. errans*, y *C. epialti*), (Roe 1986).

Otro género también considerado como parásito es el *Pseudocarcinonemertes*, parásito que habita en las branquias de la langosta de mar (*Homarus americanus*), aunque el tamaño de sus gónadas y el número de huevos no es tan grande como en *Carcinonemertes*, posee características muy especializadas a la vida parasitaria. Por ejemplo, *P. homari* carece de larva planctónica y posee muchos eventos de desove durante el año; a pesar de no estar en sincronía con su hospedador, el tiempo entre generaciones de *P. homari* es relativamente corto (100 días) (Fleming y Gibson 1981), por lo que logra producir tres generaciones anualmente por cada generación de su hospedador (Bratney *et al.* 1985).

El género *Gononemertes* incluye especies que habitan en el atrio de ascidias. Estudios realizados por Gibson (1974), en dos especies de este género (*G. parasita* y *G. australiensis*), estiman que cada hembra produce de 6000 a 11000 oocitos en sus gónadas. Por su parte Egan y Anderson (1979), registraron que las hembras de *G. australiensis*, poseen oocitos maduros y periodos de desove durante todo el año. A su vez los ciclos reproductivos de ambas especies están altamente sincronizados, ya que la ascidia (*Pyura pachydermatina*) es una especie anual y cuando muere, *G. australiensis* muere también, por lo que la sincronización en su reproducción está ligada a su modo de vida y no a las condiciones ambientales circundantes.

Egan (1984a), también reporta adaptaciones a la vida parásita en *G. australiensis*, entre ellas, la presencia de individuos “maduros precoces” en la población; estos maduros precoces son individuos de tallas mucho más pequeñas que los individuos maduros normales (de 0,6 a 9 mm, vs. 6 cm), que tienen la capacidad de reproducirse. Las larvas de estos individuos maduros precoces se asientan rápidamente en las ascidias juveniles de la nueva generación, y entonces a pesar de tener menor capacidad reproductiva (menor fecundidad) que los normales, estos individuos aseguran la liberación de larvas en los períodos entre la muerte de las ascidias viejas y el nacimiento de las nuevas.

Egan y Anderson (1979), también hacen referencia a adaptaciones de las formas larvales de *G. australiensis* a una vida corta fuera del hospedador (3 a 5 días). Durante ese periodo no se alimentan y consumen las reservas de vitelo y la probóscide no se forma hasta que no se ha asentado en su hospedador, por otro lado luego de la formación de los ocelos (2 a 3 días), el comportamiento de la larva pasa de fotopositivo a fotonegativo, todo esto acompañado de un rápido desarrollo de la musculatura que permite un comportamiento de anclaje ante el estímulo de una corriente. Estos autores coinciden en que existiría algún tipo de señal química por parte del hospedador, para iniciar su etapa reproductiva, aunque esto no se ha podido probar

En cuanto al género *Malacobdella*, Roe (1988), en base a los trabajos de Gibson y Jennings (1969) sobre *M. grossa*, lo considera entre los géneros con especies comensales, no parásitas, ya que no provoca daño al hospedador. En general las especies de este género poseen dos picos reproductivos, y su reproducción está ligada a condiciones ambientales (épocas donde el alimento es abundante), como en la mayoría de los nemertinos de vida libre. Por su parte, Teso *et al.* (2006), describen la reproducción de *M. arrokeana*, y advierten la presencia de individuos en condiciones de reproducirse durante todo el año, con lo cual sugieren que no habría una estacionalidad en la reproducción. Asimismo destacan dos meses del año (mayo y septiembre), donde la proporción de hembras en condición de desovar es mayor, coincidiendo también con una mayor cantidad de alimento disponible, relacionándolo también como una época favorable para el asentamiento larval en los meses post evacuación. Sin embargo, en dicho trabajo se utilizaron pocos especímenes y no se hace referencia al desarrollo larval de esta especie

Las infecciones múltiples en un solo hospedador son frecuentes en las especies del género *Malacobdella*. Si bien estos casos no parecen estar asociados a ningún factor específico, todos los autores coinciden en que estos individuos son de menor tamaño y sexualmente indeterminados e inmaduros (Kennel 1878; Gibson 1967; 1968; Ivanov *et al.* 2002; Thiel y Junoy 2005; Teso *et al.* 2006; entre otros)

El modo en que una larva encuentra el camino hacia un hábitat adecuado para iniciar su nuevo modo de vida, es una de las etapas más

importantes de su desarrollo, y ha sido motivo de estudio desde principios de siglo pasado (ver Wilson 1952). Actualmente, se sabe que las larvas planctónicas son capaces de responder a diferentes estímulos para reconocer un hábitat propicio. Los estímulos pueden incluir factores físicos, como la luz, la gravedad, la presión hidrostática, temperatura, salinidad, y las propiedades del sustrato en sí mismo (Pawlik 1992). Otros estímulos también incluyen productos químicos biogénicos como los producidos por las películas microbianas, sus congéneres, y fuentes de alimentación (Crisp 1974). Estudios recientes han demostrado, que las larvas no sólo son capaces de detectar señales químicas disueltas en el flujo de agua, sino que pueden responder rápidamente a estas señales (Turner *et al.* 1994; Hadfield y Koehl 2004; Elbourne y Clare 2010; Koehl y Hadfield 2010).

El asentamiento es un evento importante para todas las larvas planctónicas de invertebrados marinos, pero es especialmente importante para las larvas de parásitos o simbioses que de no encontrar un hospedador adecuado podrían perecer (Pawlik 1992). El huésped potencialmente debería experimentar una fuerte selección a favor de la capacidad de localizar a un hospedador (Chia 1978; Pawlik 1992; Boone *et al.* 2004). En el caso de organismos simbioses, el propio hospedador representa tanto la fuente de alimento como un sitio potencial donde poder reproducirse.

El desarrollo larval de algunas especies de nemertinos ha sido ampliamente estudiado (Coe 1989; Peck 1993; Maslakova y Malakhov 1999; Norenburg y Stricker 2002; Maslakova 2010), la mayoría de ellos están relacionados con aquellas especies de vida libre que poseen larva pilidium (Heteronemertinos y Paleonemertinos). En general se han descrito su embriología (Maslakova y von Döhren 2009) pero no sus patrones de asentamiento.

Las especies de hoplonemertinos poseen una larva planuliforme rica en vitelo que puede pasar gran tiempo en el agua antes de asentarse (Norenburg y Stricker 2002). Los estudios más completos sobre el asentamiento de larvas de hoplonemertinos parásitos fueron llevados a cabo por Dunn (2011), en *Carcinonemerte errans*, donde aparentemente el asentamiento de la larva se produce 24 hs después de estar en contacto con el hospedador, y esta especie posee los dos tipos de asentamientos (asociativo y gregario), pero el

asentamiento es mas exitoso si el hospedador estuvo infectado previamente por al menos algunas otras larvas.

En cuanto al desarrollo larval del género *Malacobdella*, sólo *M. grossa* ha sido estudiada (Hammarsten 1918), presentando una larva planuliforme con gran cantidad de vitelo que luego de las primeras 70 hs de vida ya es activa nadadora. Este autor no describe el asentamiento de la misma.

Este capítulo abordará dos aspectos puntuales de estas adaptaciones: el ciclo gonadal y el desarrollo larval de *M. arrokeana*. Relacionando las etapas reproductivas y la capacidad de dispersión de sus larvas con los factores que podrían determinar su asentamiento y cuáles podrían ser los mecanismos involucrados en el mismo.

Materiales y Métodos

Muestreo.

Las muestras de *M. arrokeana* se recolectaron siguiendo la metodología general explicada en el capítulo 2.

Ciclo gametogénico

Treinta ejemplares de *P. abbreviata* fueron recolectadas mensualmente durante un año y llevadas al laboratorio. Los nemertinos fueron fijados en formol 4 % (en agua de mar) para su posterior estudio. En el laboratorio se procedió a retirar una porción media del cuerpo donde se encontraba la mayor cantidad de tejido gonadal, y esta porción se conservó en etanol 70% para posterior estudio histológico. Los muestreos se efectuaron entre mayo de 2007 y abril de 2008, en Punta Conos, golfo San José, Chubut. Se realizaron cortes histológicos de 7 a 9 μm de espesor (N = 331), los mismos se tiñeron con Hematoxilina – eosina (anexo), en el laboratorio de histología del Centro Nacional Patagónico (CENPAT – CONICET). En los casos de múltiples infecciones de *M. arrokeana* en un ejemplar *P. abbreviata*, sólo fueron analizados histológicamente algunos de los individuos más grandes. En este capítulo se hará referencia como “individuos indeterminados” a todo aquel individuo, donde no se apreciara un desarrollado de gametas y por consiguiente no pudiera ser identificado sexualmente (Fig.5.2).

La elección de los individuos que fueron destinados al estudio histológico y los cálculos posteriores fueron los considerados “maduros” – o en algún grado de madurez gonadal - esta condición fue determinada en primera instancia siguiendo las descripciones publicadas en cuanto a la presencia y a la coloración de la gónada (Ivanov *et al.* 2002; Teso *et al.* 2006).

En este capítulo no se estudia el grado de madurez gonadal de los individuos indeterminados, solo se utilizaran para inferir que porcentaje de la población de estudio, fue producto de los últimos asentamientos larvales.

Se determinó el largo y el ancho total de todos los ejemplares de *M. arrokeana* analizadas y sus respectivas *P. abbreviata*, con calibre digital. Para unificar un criterio de medición y teniendo en cuenta que las medidas de efectuaron a los individuos ya fijados, se calculó el Lt (largo + ancho/2).

Se analizó la proporción de estadios gonadales de cada mes, siguiendo la clasificación descripta por Teso *et al.* (2006).

Se realizó una prueba de Chi cuadrado (χ^2), para comprobar si la proporción de sexos se aleja de la esperada (50%), también se realizó un análisis de la varianza de la media (ANOVA), para comparar las diferencias observadas entre las proporciones de estadios gonadales en el período muestreado y las diferencias en las frecuencias de talla de los individuos analizados. Se analizó la correlación entre el tamaño del hospedador y la proporción de multi-infecciones, y entre la distribución media de Lt de *M. arrokeana* y los porcentajes de estadios gonadales a lo largo de los meses muestreados.

A su vez se analizó la variación estacional de infecciones de *M. arrokeana* en su hospedador a lo largo del periodo muestreado, estas proporciones fueron comparadas mensualmente con un análisis de la variación de la media (ANOVA, $\alpha > 0,05$). Los gráficos presentados y los análisis estadísticos, se realizaron con el programa *Statistica 7* (Stat – Soft corp.).

Desarrollo Larval

Se recolectaron veinte ejemplares de *P. abbreviata* en playa Larralde, golfo San José. Las mismas fueron llevadas a un acuario con temperatura controlada (Fig. 5.1 A), donde se mantuvieron en aclimatación por 10 días. Se corroboró la presencia de *M. arrokeana*, por inspección con endoscopio dentro de la cavidad del manto, y se contabilizó la cantidad de individuos. Los individuos de *P. abbreviata* que contenían un único ejemplar de *M. arrokeana*, fueron relajados en $MgCl_2$ (7%) en una solución 1:1 con agua de mar, durante 4 horas a 10°C. Posteriormente, se realizó una pequeña incisión en la abertura pedal y se retiró al ejemplar de *M. arrokeana* que se encontraba en su interior. Los individuos de *P. abbreviata* inspeccionados fueron regresados al acuario y mantenidos con vida. Todo el proceso de cultivo se realizó siguiendo las bibliografías actualizadas (Peck 1993; Norenburg y Stricter 2002; Maslakova y Von Dörhen 2009) y consultando con especialistas en el desarrollo larval de nemertinos (asesoramiento de Maslakova durante el período de cultivo).

Acuarios.

Los acuarios utilizados consistían en un tanque cilíndrico de 1 metro de diámetro, por 70 cm de alto, con 30 cm de sedimento (extraído de la zona de

muestreo). Los individuos de *P. abbreviata* fueron enterrados manualmente y cubiertos por arena. Los individuos que no fueron procesados (para la extracción de *M. arrokeana*), se conservaron en agua de mar común, mientras que los procesados fueron puestos en acuarios de 100 litros, separados con recirculación de agua tratada previamente con filtros y radiación UV para eliminar toda posibilidad de reinfección (Fig. 5.1 A).

Los individuos de *M. arrokeana* extraídos, (machos y hembras) fueron puestos en recipientes separados de 200 ml, con agua filtrada (0,45 μm), durante 2 días para que se aclimataran. Todo el material utilizado para este capítulo (peceras, cajas de petri, filtros, vasos de precipitado, pipetas, recipientes etc), fueron lavados previamente a ser utilizados con hipoclorito de sodio (30%), durante 24 hs y enjuagado con agua destilada, para evitar cualquier tipo de contaminación; sólo cuando fue necesario se utilizó antibiótico (cloranfenicol al 2%).

Fecundación in vitro.

Para la obtención de gametas se utilizaron dos técnicas distintas, choque de aire (*air shocking*) y la extracción manual directamente de las gónadas (*stripping*), ambas técnicas fueron usadas por otros autores con buenos resultados en nemertinos (Peck 1993; Maslakova y Von Döhren 2009 y otros). La primera técnica consiste en dejar al individuo fuera del agua por 20 minutos y luego ponerlo en agua de mar (Fig. 5.1 B). Esto provoca la expulsión de las gametas. La segunda técnica consiste en presionar las gónadas con una pinza hasta que las gametas son expulsadas, o se hace una incisión en la pared del cuerpo y se recoge el contenido (Fig. 5.1 C). En un evento de desove se contó la cantidad de ovas liberadas bajo la lupa.

Las gametas de *M. arrokeana* fueron inspeccionadas bajo microscopio óptico, previamente a la fecundación para corroborar su estado (*jelly coat* presente, conservación de la forma, vitelo presente, Maslakova com. pers). Los oocitos fueron colocados en cajas de Petri con distintas diluciones espermáticas (0,5:1, 1:1, 1:2, 1:3) en agua filtrada (0,45 μm), entre 8° y 10° C de temperatura. Durante las primeras 24 horas, los huevos fecundados fueron inspeccionados cada 30 minutos, luego cada 2 horas, luego una vez al día y los distintos estadios larvarios fueron fotografiados bajo microscopio. Se hicieron 6 réplicas distintas y el agua de las larvas fue cambiada en su totalidad cada dos

días. Cuando las larvas estuvieron desarrolladas se traspasaron a vasos de precipitado con un volumen de 50 ml cada uno.

A medida que las larvas desarrollaban, se las fue traspasando a mayor volumen hasta 300ml. Cuando las larvas empezaron a tener movilidad se usó una relación de 1 ml por larva.

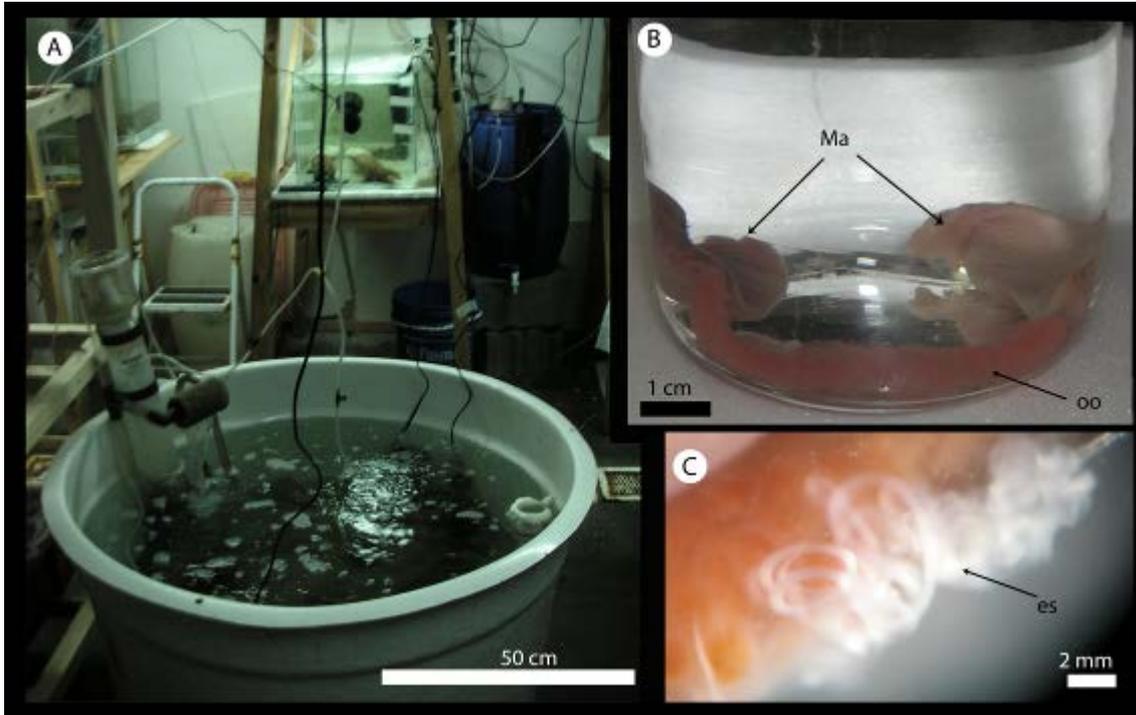


Fig. 5.1. A. Acuarios con condiciones controladas, B. Extracción de oocitos maduros (oo) de *M. arrokeana* (Ma) por técnica de “air – shocking”. C. Extracción manual de esperma (es) de *M. arrokeana*.

Experiencias de alimentación.

Con el objetivo de saber si las larvas de *M. arrokeana* eran capaces de alimentarse o sobrevivían con sus reservas hasta asentarse, se realizaron experiencias de alimentación, ofreciendo distintas microalgas de tamaños entre 2 y 15 μm (*Isochrysis*, *Tetrahymena* y *Nannochloris*; Zooplex, Kent Industries). Se hicieron 5 réplicas con 30 larvas móviles cada uno en un volumen de 50ml de agua de mar filtrada a 0,2 μm . Una solución de algas (1:1000) de aproximadamente 27500 algas /ml (calculada en cámara de Neubauer de 10 μl de volumen) se agregó en cada réplica, se las dejó durante dos días se procedió a contar la cantidad de algas que quedaron en el agua usando la misma técnica anterior. También se observaron al microscopio el comportamiento de las larvas en presencia de alimento.

Resultados

Reproducción

Un total de 608 individuos de *M. arrokeana* fueron obtenidos de 354 *P. abbreviata*. El largo total (Lt) de los individuos de *M. arrokeana* varió entre 6,5 y 24,72 mm ($16,21 \pm 2,75$ mm). El Lt de las hembras varió de 6,51 a 24,72 mm ($16,83 \pm 2,54$ mm, N = 148) y el de los machos de 8,36 a 23,31 mm ($16,17 \pm 2,36$ mm, N = 165). La talla del hospedador varió entre 54 y 117 mm ($82,65 \pm 11,03$ mm). Sólo se encontraron seis (1,7 %) *P. abbreviata* sin *M. arrokeana* en su interior. El porcentaje total de *P. abbreviata* con infecciones múltiples de *M. arrokeana* (multi-infección) fue del 11 % (N = 40), el resto de ellas (89%) contenían un solo nemertino en su interior, la mayor cantidad de nemertinos en un hospedador fue de 72 individuos, todos ellos eran indeterminados (Fig. 5.2). El Lt de los individuos indeterminados varió de 2 a 10 mm. Sólo en casos de multiinfección de *M. arrokeana* en una misma *P. abbreviata*, estos individuos se encontraban entre las láminas branquiales y en zonas adyacentes a ellas. De la variación mensual de multi-infecciones, por *P. abbreviata* (Fig. 5.3 A), se observa que el mayor porcentaje se registró en el mes de mayo (25 %). El análisis de ANOVA, no mostró diferencias significativas en la variación mensual de nemertinos por hospedador por mes ($p = 0,798$).

De la cantidad mensual de *M. arrokeana* por hospedador (Pa), se registró que en el mes de julio de 2007 la cantidad de individuos por hospedador fue la mayor con 3,5 ind/Pa, mientras que la menor se registró en el mes de agosto con 1 ind/Pa (Fig. 5.3 B).



Fig. 5.2. Ejemplares de *M. arrokeana* indeterminados, encontrados entre las laminas branquiales de *P. abbreviata*. Nótese la transparencia del ejemplar debido a la ausencia gametas.

Los meses de agosto, octubre y noviembre fueron los de mayor porcentaje de individuos maduros, mientras que los indeterminados estuvieron

más representados durante los meses de febrero a julio. (Fig. 5.4 A). El análisis de la variación de las medias (ANOVA) no mostró diferencias significativas entre los meses ($p = 0,456$).

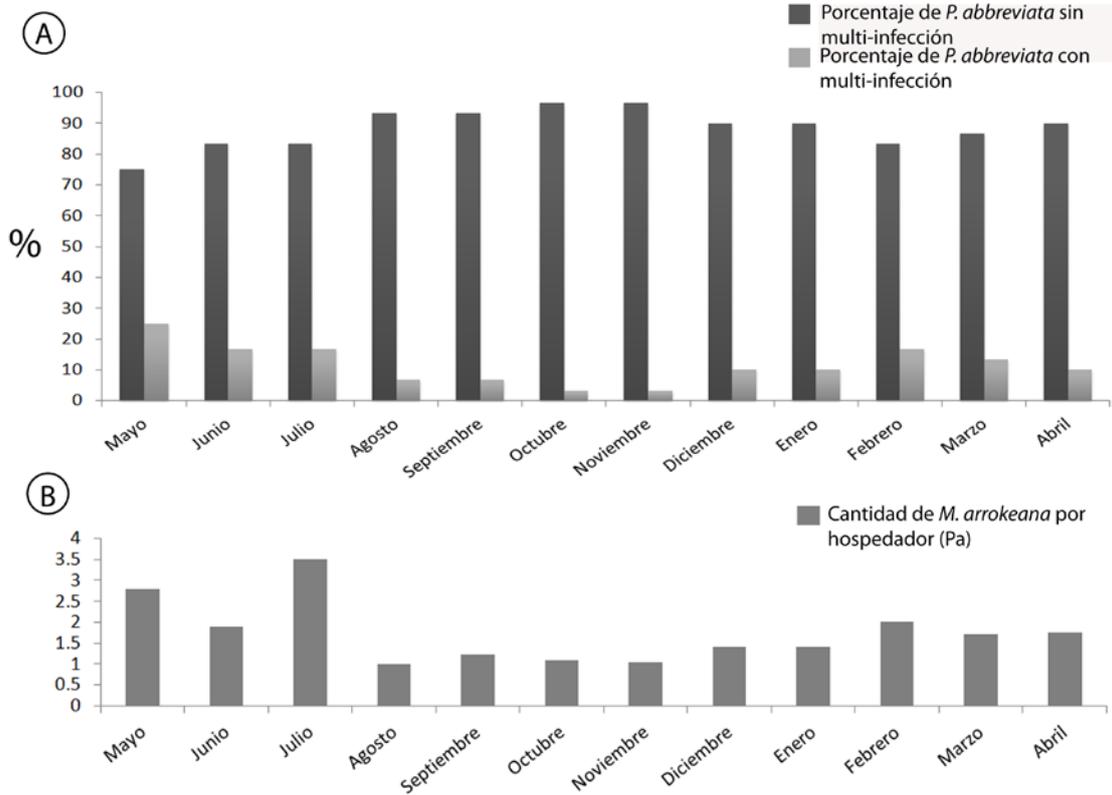


Fig. 5.3. A. Porcentaje mensual de *P. abbreviata* con/sin multi-infecciones de *M. arrokeana* B. Cantidad de *M. arrokeana* por *P. abbreviata* en los meses muestreados

Adicionalmente se trabajaron los datos en forma estacional (invierno – otoño – primavera – verano).

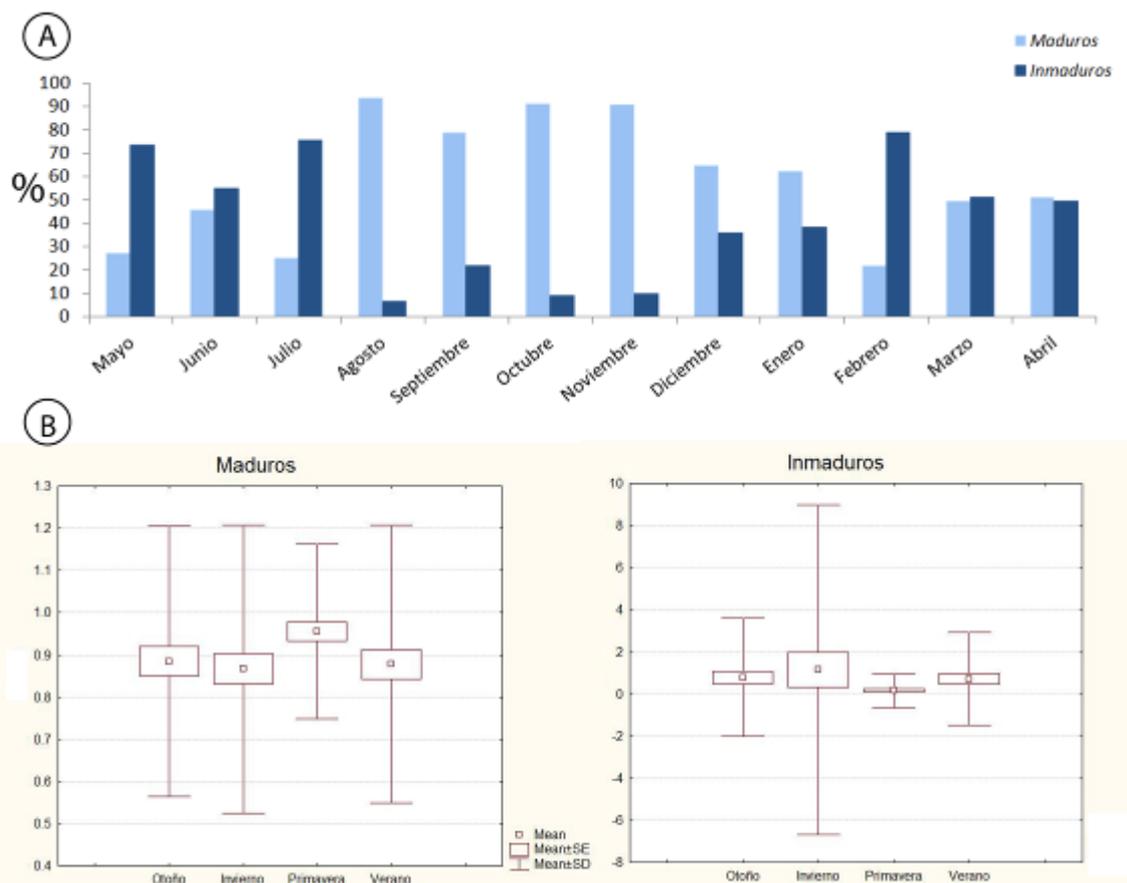


Fig. 5.4. A. Porcentaje de individuos maduros e indeterminados de la población de *M. arrokeana*. B. Variación estacional de la proporción de individuos maduros e indeterminados de *M. arrokeana* en el periodo muestreado.

Del análisis estacional de los individuos maduros surge que la primavera es la estación con mayor cantidad de individuos maduros (0,98 ind/Pa), mientras que la menor es el invierno con 0,8 ind/Pa, a su vez la cantidad de individuos indeterminados crece en el invierno y disminuye en la primavera (Fig.5.4 B). Los análisis de ANOVA no mostraron diferencias significativas entre estas estaciones para ambos estadios (maduros e indeterminados) ($p = 0,196$, $p = 0,486$, respectivamente).

No se observó correlación significativa entre el tamaño del hospedador y la cantidad de *M. arrokeana* en su interior ($R^2 = 0,25$).

Estudio histológico del ciclo gonadal.

Las gónadas de *M. arrokeana* ocupan la mayoría del cuerpo, desarrollándose desde la parte posterior de la faringe, extendiéndose hasta el comienzo de la ventosa terminal y rodeando el intestino. En vivo, las gónadas de los machos tienen una coloración que varía de blanco a amarroada, mientras que en las hembras varía de rosa a púrpura (Fig. 5.5). Las hembras, liberan alrededor de 1000 huevos en un evento de desove.

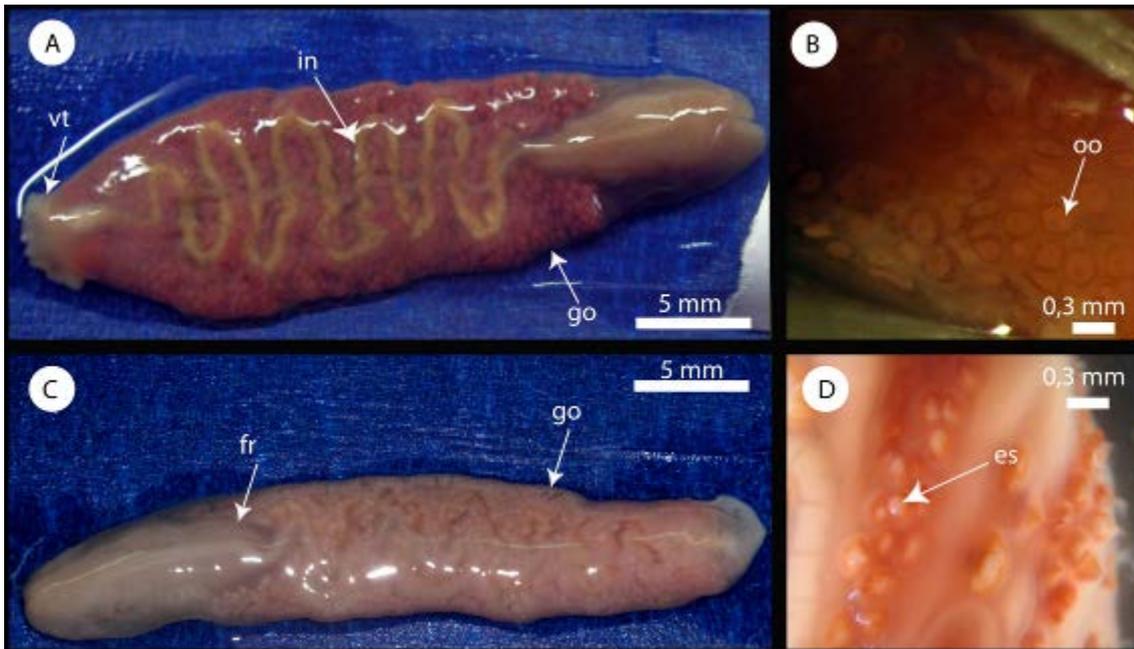


Fig. 5.5. Ejemplares maduros de *M. arrokeana*. A. Hembra madura. B. Detalle de los oocitos (oo) a través de la pared del cuerpo, C. Macho maduro, D. Masa espermatocítica (es), en liberación. Abreviaturas: go = gónada, fr = faringe, in = intestino.

Para el análisis histológico se analizaron 331 cortes de gónadas de *M. arrokeana*, la diferencia en el número de individuos extraídos (608) y analizados en esta sección, se debe a que los individuos indeterminados, provenientes de infecciones múltiples, en los cuales no se observaron gametas - previa corroboración histológica -, no fueron tenidos en cuenta en los cálculos.

La proporción de sexos de la población de *M. arrokeana* en este estudio no difirió significativamente de lo esperado (1:1, $p = 0.619$). Sin contar aquellos que no pudieron ser clasificados por sexo (indeterminados).

Los estadios gonadales fueron los mismos descritos por Teso *et al.* 2006, con la salvedad que no se apreciaron individuos en reabsorción, pero sí en estado de atresia gonádica.

Los estadios gonadales pueden observarse en la Fig. 5.6 y 5.8 y fueron definidos por Teso *et al.* 2006 como:

Indeterminados (I): Túbulo gonádico con células germinales, no identificables sexualmente.

Crecimiento (C): Gónadas visibles, algunas gametas todavía adheridas a la pared del túbulo y otras proyectadas dentro del lumen.

Maduración (M): Gónadas ocupando la mayoría del cuerpo, oocitos y espermatozoides densamente empaquetados, ocupando la mayor parte del lumen.

Liberación (L): Gónadas total o parcialmente vacías, no hay gametas adheridas a la pared del túbulo, presencia de gonoporos abiertos.

Atresia (A): Gónadas totalmente vacías, algunas gametas sueltas en el lumen, bordes del túbulo irregulares. Presencia de cuerpos residuales amarillentos en algunos casos.

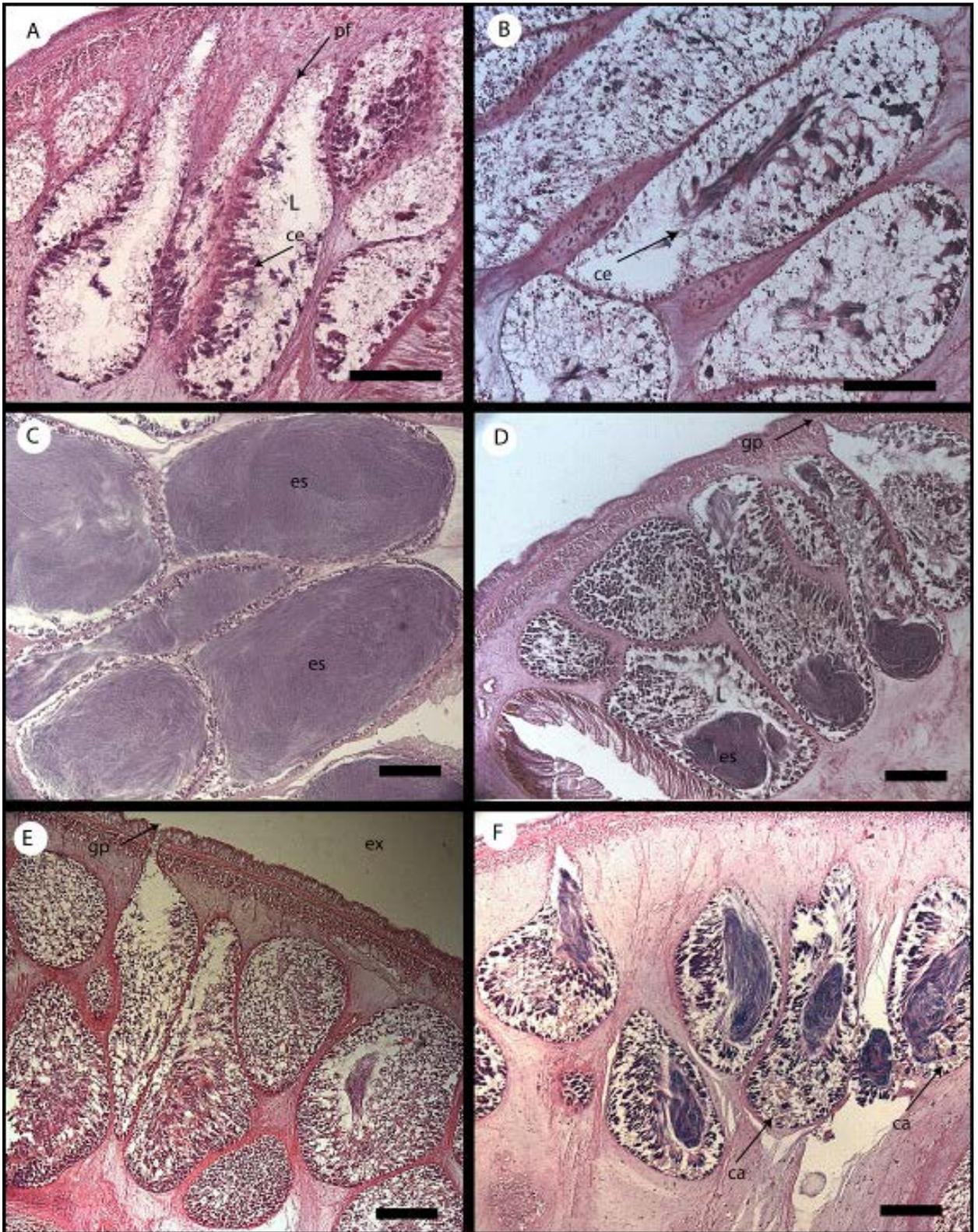


Fig. 5.6. Estadios de desarrollo gonadal en machos de *M. arrokeana*. A, B. Crecimiento. C. Maduración. D, E. Liberación. F. Atresia gonádica. Abreviaturas: ca = cuerpos amarillos, ce = células espermáticas, es = espermatozoides, ex = exterior, gp = gonoporo, L = lumen del folículo, pf = pared del folículo.

Machos

Del estudio del ciclo gonadal en los machos se registró que el mayor porcentaje de individuos en etapa de crecimiento (C), se presentan en el mes de mayo de 2007 (70 %) y el menor en el mes de octubre del mismo año. Se observan individuos en estado de maduración (M), durante todos los meses, con un máximo en el mes de diciembre (60%) y un mínimo en el mes de septiembre de 2007. El mes de mayor porcentaje de individuos en estado de liberación (L), fue septiembre (67%) y el mínimo en el mes de junio de 2007 (Fig. 5.7). Se observaron individuos en estado de atresia gonádica (A) durante todos los meses muestreados, con un máximo durante el mes de septiembre (13%) y un mínimo en el mes de junio de 2007.

Adicionalmente, se observa un aumento del valor medio de Lt con el aumento de los estadios de C y M, a lo largo de los meses muestreados (Fig. 5.7), mientras que se ve una disminución de la Lt en los meses donde el mayor porcentaje de individuos se encuentra en estadio L o A. El análisis de esta variación de la media (ANOVA) de Lt respecto de los meses, mostró diferencias altamente significativas ($p = 0,003$) y los posteriores contrastes de Bonferroni - Holm, mostraron diferencias entre los valores correspondientes al mes de diciembre y mayo, junio y octubre respectivamente.

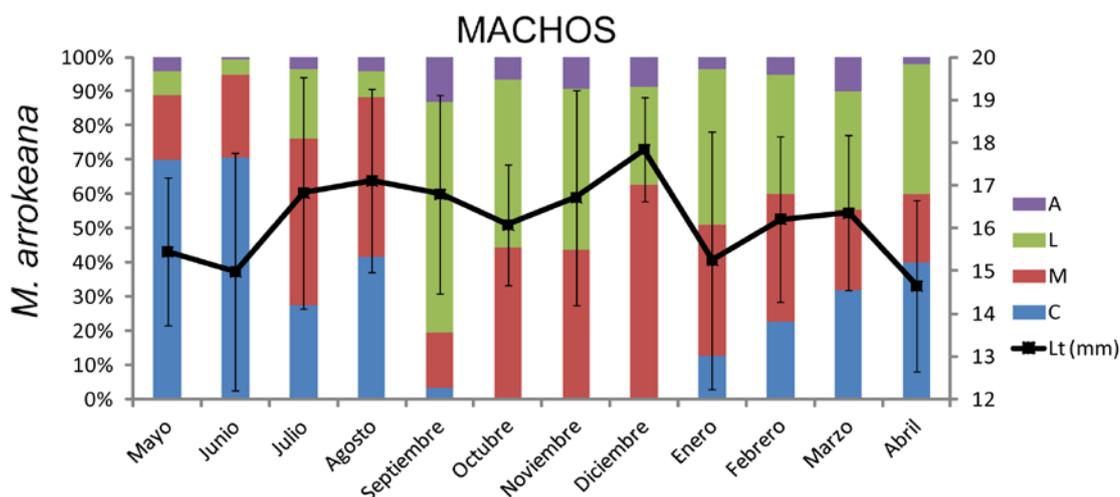


Fig. 5.7. Porcentaje de estadios gonadales en machos de *M. arrokeana* durante el periodo de estudio. Abreviaturas: A = Atresia gonádica, C = Crecimiento, L = Liberación, M = Maduración, Lt = Talla media de los machos. Barras de error = DS

Los resultados obtenidos a partir de relacionar la maduración gonádica con el Lt de los machos de *M. arrokeana* (Fig. 5.10), muestran que los individuos menores de 10 mm de Lt corresponden a individuos indeterminados (I), debido a la ausencia de espermatozoides. A partir de los 14 mm aproximadamente se comienza a observar la formación de gametas en los machos, siendo el estadio más representativo el de crecimiento (C, ~40%). A partir de los 16mm, el Lt de los machos aumenta al igual que el porcentaje de individuos con gónadas en estadio de maduración (M), alcanzando el valor máximo registrado de 18 mm en un 65% aproximadamente.

En el intervalo de tallas de machos mayores a 21 mm, se observa la ausencia de machos en estadio C, mientras que el porcentaje en estadio M y L aumentan notablemente llegando casi a la mitad de la población (43 y 48% respectivamente). Los machos con sus gónadas en estado atrésico solo representan el 9% de la población (Fig. 5.10).

Hembras

El porcentaje de hembras de *M. arrokeana* en estadio de crecimiento (C), es máximo durante el mes de mayo y desaparece en el mes de noviembre (Fig. 5.9). A su vez, el porcentaje mayor de hembras en estadio de maduración (M), se observó en el mes de enero de 2008 (77%) y el mínimo (10%) en septiembre de 2007. Este mes fue donde el porcentaje de liberación (L) alcanzó su pico máximo (Fig. 5.8. E y 5.9). La atresia gonádica (A), fue registrada en todos los meses con excepción del mes de mayo, y su porcentaje máximo se registró en el mes de octubre, con un valor de 20% (Fig. 5.8 F y 5.9).

Por otro lado, se observa una tendencia en el aumento de la Lt media, con el incremento del porcentaje M y C y un descenso con el aumento del porcentaje de liberación (L) y atresia gonádica (A) (Fig. 5.9 y 5.10). Sin embargo, el análisis de la varianza de las medias (ANOVA), de Lt, entre los meses no reflejó diferencias significativas ($P = 0,1333$).

El intervalo correspondiente a las hembras de menor talla (< 10 mm), está en su mayoría conformado por individuos en estadio indeterminado (I) (Fig. 5.10). Las hembras de Lt entre los 11 y los 15 mm, poseen sus gónadas

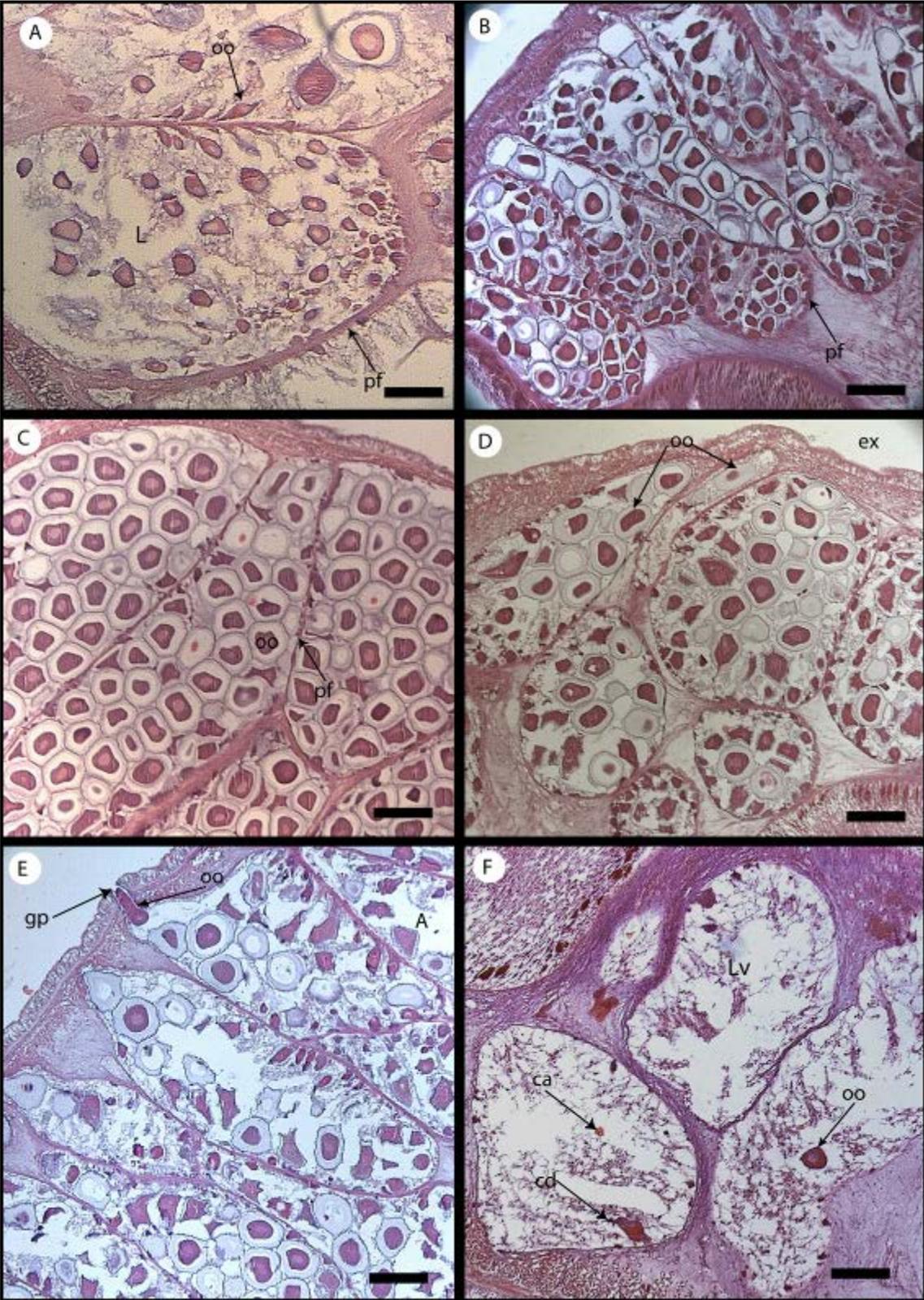


Fig. 5.8. Estadios de desarrollo gonadal en hembras de *M. arrokeana*. A, B. Crecimiento. C. Maduración. D, E. Liberación. F. Liberación total y atresia gonádica. Abreviaturas: ca = cuerpos amarillentos, cd = células atresicas, ex = exterior, gp = gonoporo, L = lumen del folículo, Lv = Lumen vacio, oo = oocito, pf = pared del folículo.

en estadio G y M, mientras que el porcentaje de hembras en I ha disminuido. A partir de los 16 mm, ya no se observan hembras en estadio indetrminado (I), por otro lado los porcentajes de M, D y A, continúan en aumento (Fig. 5.10). El intervalo correspondiente a Lt entre 21 y 25mm está compuesto en su mayoría por hembras en estadio M (63%), mientras que los porcentajes correspondientes a los estadios C y L han disminuido considerablemente. Se observa un porcentaje de A mayor a lo registrado en el intervalo anterior (16%) (Fig. 5.10).

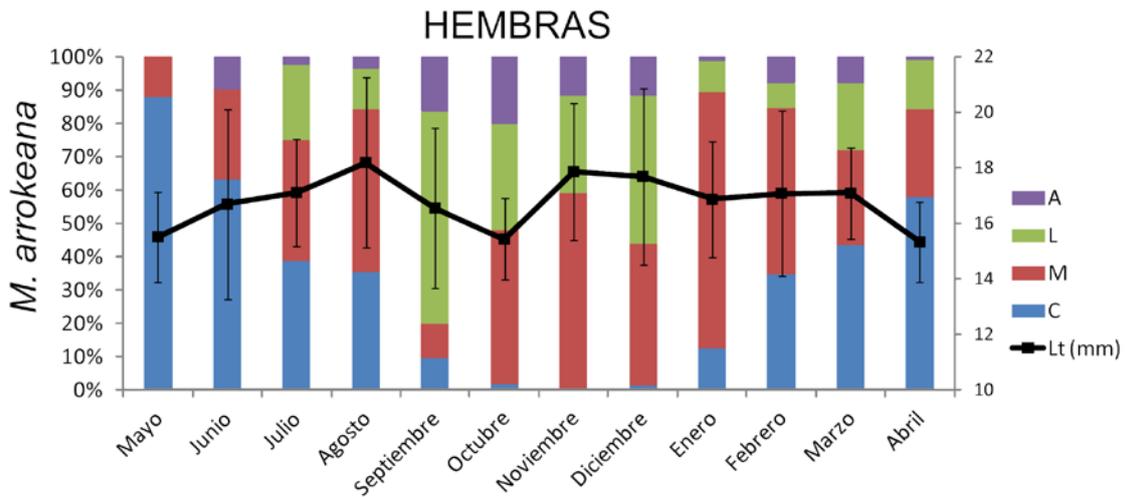


Fig. 5.9. Porcentaje de estadios gonadales en hembras de *M. arrokeana* durante el periodo de estudio. Abreviaturas: A = Atresia gonádica, C = Crecimiento, L = Liberación, M = Maduración. Lt = Talla media de las hembras.

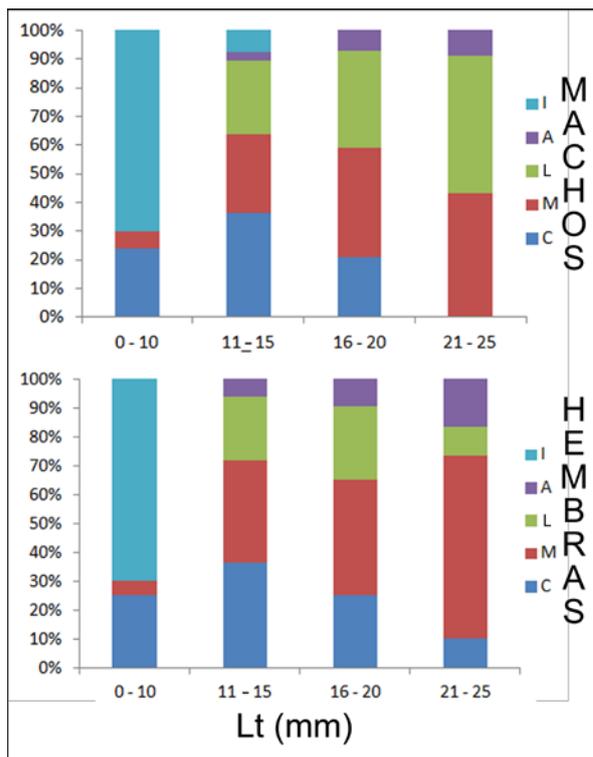


Fig. 5.10. Distribución de estadios de desarrollo gonadal a lo largo de las diferentes tallas de *M. arrokeana*. I = Indeterminados, A = Atresia gonádica, C = Crecimiento, L = Liberación, M = Maduración.

Desarrollo larval.

Estadios larvales

Las ovas de *Malacobdella arrokeana* se agruparon en una masa ovígera gelatinosa, pegajosa y con flotabilidad negativa (Fig. 5.1 B). Cada uno de las ovas que formaban esta masa, eran esféricas, opacas y ligeramente amarronadas (Fig. 5.11. A). Luego de separar las ovas de la masa ovígera por agitación, se observaron bien redondeados y conservados, mientras que los espermatozoides mostraron gran movilidad. Ambas técnicas de extracción de gametas dieron buenos resultados. Sin embargo, por la técnica de “*air shocking*” la fecundación fue exitosa en todas las réplicas, mientras que algunas de las réplicas realizadas con ovas obtenidas manualmente no consiguieron desarrollar larvas viables.

Las ovas de uno de los eventos de liberación midieron 106 μm de diámetro y estaban rodeados por una membrana gelatinosa (*jelly coat*) de 136 μm de grosor, todo el huevo media 244 μm de diámetro externo, en promedio (DE = $\pm 10,32$ mm) (n = 20) (Fig. 5.11 A). En los huevos fecundados a los pocos minutos aparece una capa entre la membrana externa (*jelly coat*) y el oocito de 13,6 μm de espesor, esta membrana se conoce con el nombre de membrana de fecundación e indica que el oocito ha sido fecundado (Fig. 5.13 C).

Luego de 45 min de la fecundación se pueden observar los cuerpos polares (2) (Fig. 5.11 D), la primera división celular aparece a los 120 min (9 a 10° C) después de la fecundación (Fig. 5.11 E), tres horas después de la fecundación se pudo observar la segunda división celular (cuatro células) (Fig. 5.11 F). A las cuatro horas de la fecundación los huevos estaban en estadio de 16 células (Fig. 5.11 G, H, I). A las seis horas continuaba la división y se pudo observar la gastrulación del embrión, donde se observó la formación del blastoporo, el blastocelo por invaginación a partir de las 15 hs, continuando así por 24 hs más (Fig. 5.12). A las 48 horas se observa la primera larva ciliada móvil pero todavía no sale de la envoltura del huevo (membrana gelatinosa - *jelly coat*), la misma es de forma redondeada mide 150 μm longitudinalmente y gira con dirección dextrógira (Fig. 5.13 A - C).

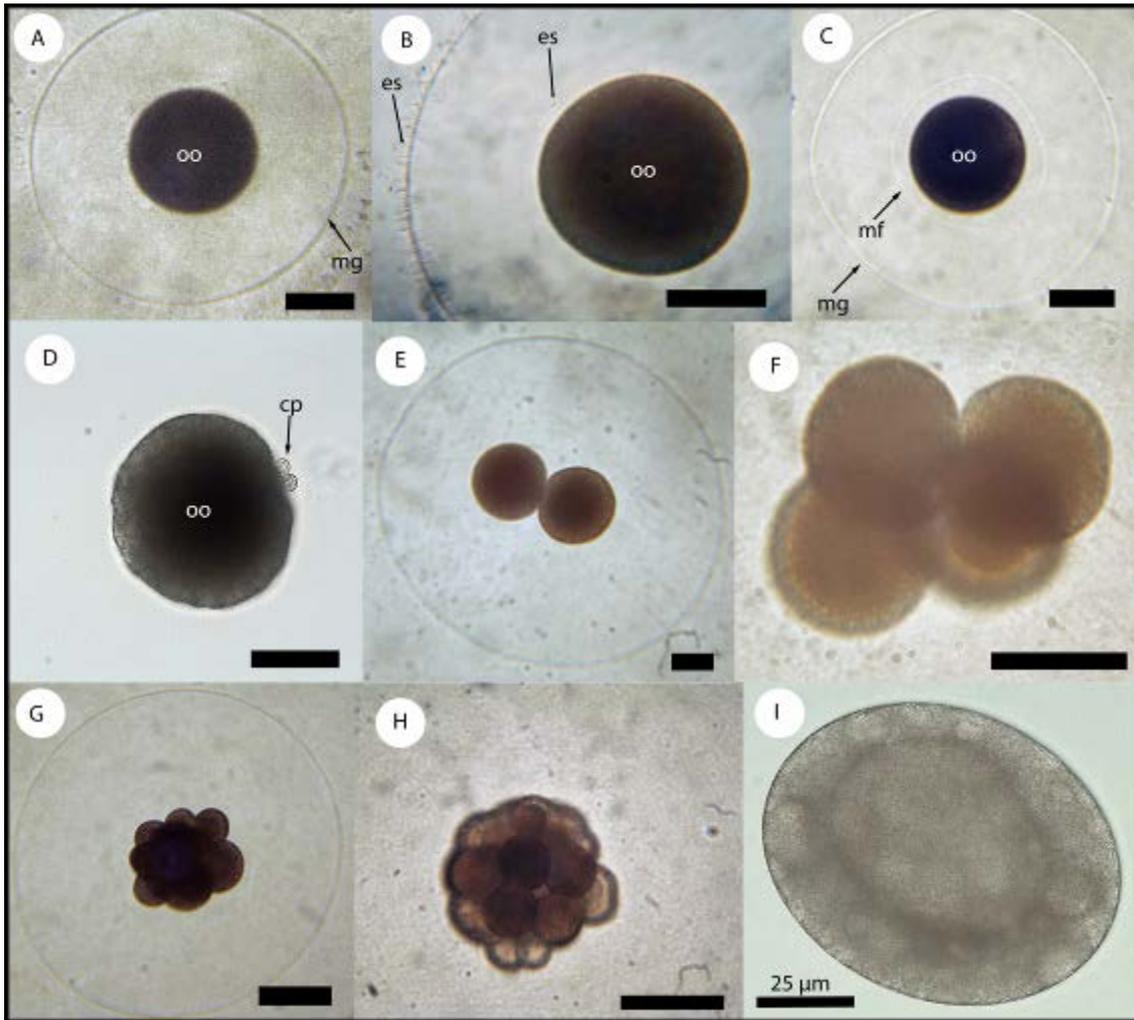


Fig. 5.11. *M. arrokeana*, durante las primeras 24 hs después de la fecundación. A. Ova (oo) sin fertilizar dentro de su membrana gelatinosa (mg), B. Oocito rodeado de espermatozoides (es) a punto de fertilizarlo. C. Oocito fertilizado, aparición de la membrana de fecundación (mf) D. Aparición de cuerpos polares (cp), 45 min después de la fecundación, E. Primera división celular (120 min), E. Segunda división celular (180 min), G, H, I. Sucesivas divisiones celulares formación de la mórula (24 hs después de la fecundación). Escala A – H, 50 μ m

Luego de 60 hs desde de la fecundación la larva ya es completamente móvil, mide entre 140 y 160 μ m longitudinalmente, aparece un penacho apical de cilias en el extremo (Fig. 5.13 D), ya abandonó la *jelly coat* y nada en la superficie del agua, este estadio se mantiene al menos por dos días más. A los cinco días de la fecundación, la larva ya toma forma alargada (180 - 198 μ m), su cuerpo aún sigue cubierto de cilias, pero el penacho apical se reduce considerablemente, aparecen dos ocelos o estatocistos y se mueve en todas direcciones en la columna de agua, haciendo incursiones hacia la superficie del recipiente, con movimientos espiralados (Fig. 5.13 E). En este estadio

permanece al menos cinco días más, y comienza a observarse el alimento en su interior. A los diez días de la fecundación, se pueden detectar la formación de las dos capas musculares (longitudinal y circular), ya que la larva se vuelve muy contráctil, su longitud en este estadio no varía mucho; relajada (en $MgCl_2$) la larva mide 200 a 250 μm . Los ocelos se vuelven más superficiales, posee una clara fototaxia negativa.

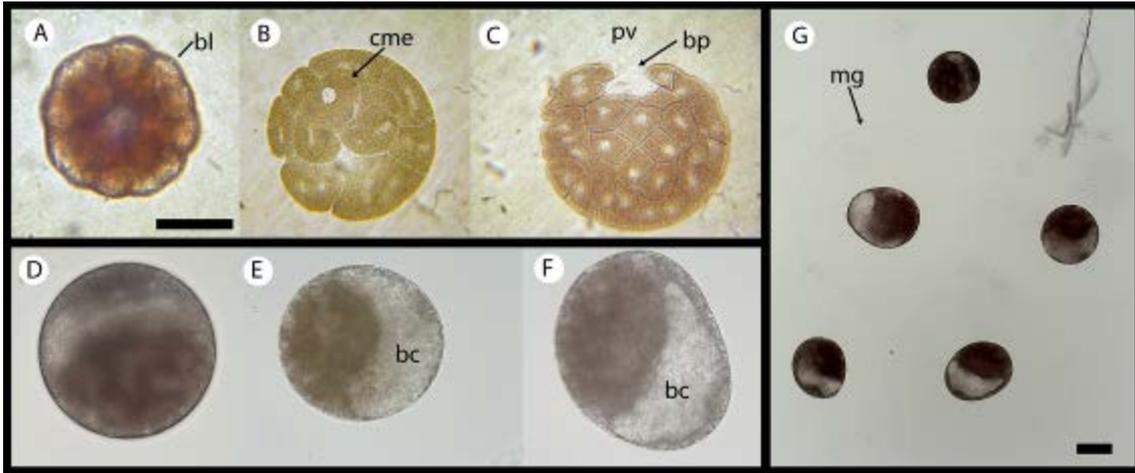


Fig. 5.12. Secuencia de gastrulación de *M. arrokeana*, 24 hs después de la fecundación. A. Blástula (bl). B. Comienzo de invaginación del ectodermo, se observa la célula madre del ectodermo (cme). C. Formación del blastoporo (bp). D, E, F. Formación del blastocele (bc). G. Fases de gastrulación. Escala 100 μm . Abreviaturas: mg = membrana gelatinosa, pv = polo vegetal.

En este momento la mayor cantidad de las larvas permanecen en el fondo del recipiente, ya pueden observarse los primeros esbozos de cordones nerviosos laterales y el intestino, aunque todavía no son visibles totalmente (Fig. 5.13 F). A los 20 días de la fecundación, la larva continúa en el mismo estadio, pero ya se observa que el contenido estomacal en su interior va disminuyendo, se puede observar el esbozo de la probóscide, a su vez se observa una intensa actividad de división celular en la zona posterior de la larva, posiblemente la ventosa en formación (Fig. 5.13 H).

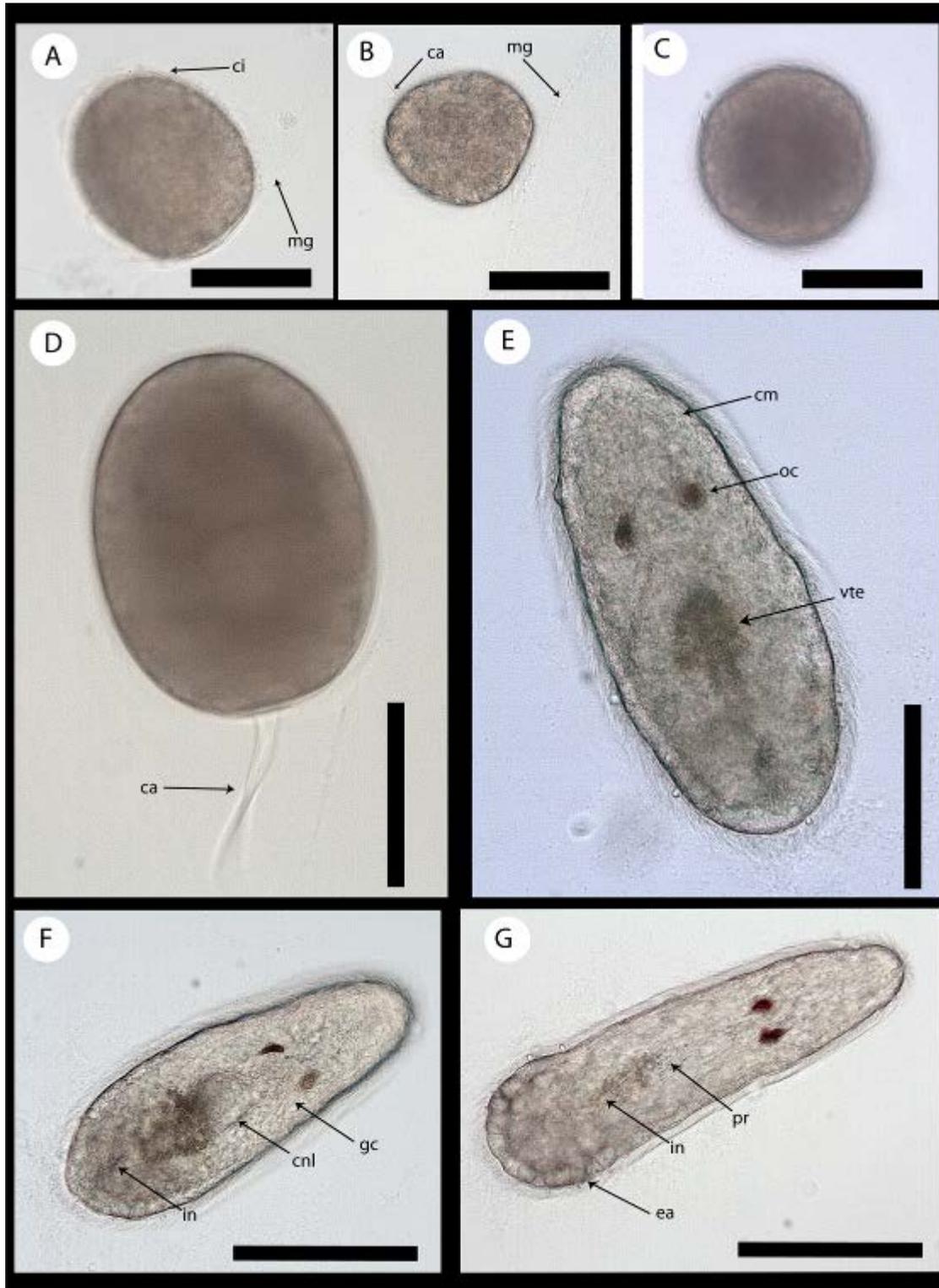


Fig. 5.13. Estadios larvarios avanzados de *M. arrokeana*. A, B, C. Larva ciliada (ci) móvil dentro de la membrana gelatinosa (mg). D. Larva ciliada móvil con penacho de ciliias apical (ca) fuera de la membrana gelatinosa (60hs después de la fecundación). E. Larva de cinco días de edad. F. Larva móvil de 10 días de edad, disminuye las reservas de vitelo (vte) en su interior. G. Larva de 30 días de edad, formación de engrosamiento celular posterior (ea). Escala 100 μ m. Abreviaturas: cm = capas musculares, cni = cordón nervioso lateral, gc = ganglio cerebral, in = intestino, oc = ocelos.

En esta etapa la larva nada activamente por el fondo del recipiente ya no hace incursiones a la superficie, su longitud sigue sin variar significativamente, relajada oscila entre los 200 y 300 μm por los próximos 10 días. Luego de cuatro semanas desde la fecundación, todas las larvas murieron.

Experiencia de alimentación

Tras una semana de experimentación, se procedió al conteo de las algas en la cámara de Neubauer, siguiendo el mismo procedimiento que se realizó al principio de la experiencia. No se observó diferencia significativa en el conteo de las algas ni entre las 5 réplicas ni entre el tiempo inicial y el final ($p = 0,087$, $0,675$ y $0,798$, respectivamente). En relación a las algas contadas al principio y al final de la experiencia, las larvas no se alimentaron durante esa semana, al microscopio se pudo observar que el contenido estomacal disminuyó (Fig. 5.13 E - G), pero no se pudo diferenciar si lo que se encontraba dentro de la larva eran las algas o vitelo remanente. Al microscopio las larvas de *M. arrokeana* no muestran ninguna respuesta especial al estar en presencia de alimento.

Discusión

Reproducción

Como se dijo en el capítulo 3 el color de las gónadas es un carácter que varía con el desarrollo de individuo, esto pudo confirmarse ya que la coloración de la gónada varía de acuerdo al estado de madurez gonadal. El color de las gónadas de *M. arrokeana* se confirma como un carácter distintivo para el reconocimiento externo del sexo de los individuos maduros (rosa – púrpura para hembras y blanco – amarronado para machos). La variación en la coloración registrada por Teso *et al.* 2006 (púrpura – hembras; rosa pálido en machos), puede deberse a que se han registrado en distintos estadios de maduración. El número de nemertinos por hospedador también pudo confirmarse como carácter de madurez sexual (uno = maduro – múltiples = indeterminados o inmaduros) y la coloración externa es blanca transparente.

Aunque un gran porcentaje de la población de machos y hembras de *M. arrokeana* poseen sus gónadas en condiciones de maduración sexual a partir de los 16mm de Lt, tanto la población de machos como la de hembras están en su mayoría maduros al alcanzar su mayor talla (21 a 25 mm), (Fig. 5.10) Sin embargo, el mayor porcentaje (60%) de la población muestreada, se encuentra dentro del rango de tallas correspondiente a 16 a 21mm. Teniendo en cuenta que sólo se analizaron aquellos individuos que provenían de infecciones simples - determinados sexualmente, y estos corresponden al 55% de la población estudiada, significa que la mayoría de la población se encuentra dentro de la talla reproductiva, antes de alcanzar su talla máxima. Con estos datos se puede inferir que *M. arrokeana* es una especie con períodos reproductivos cortos, rápidos y muy exitosos, destinando mucha de su energía en la reproducción. Esta característica fue registrada por Gibson (1968) para *M. grossa*. En cuanto a la prevalencia en la infección del hospedador, el mes con mayor porcentaje de *P. abbreviata* con multi-infección fue el mes de mayo de 2007, pero el mayor número de individuos registrados por hospedador fue durante el mes de julio. Este aumento en el número de individuos en el período invernal podría deberse a un período tardío de liberación de gametas (verano) y posterior reclutamiento de los juveniles. El mismo patrón también fue observado en el nemertino comensal *Tetrastema fozensis* por García y Anadón (2004).

A partir del mes de julio la cantidad de individuos y la proporción de infección por hospedador disminuyen hasta el mes de agosto donde la mayoría de los hospedadores tienen solo un huésped en su interior. Esta variación coincide con el desarrollo gonádico donde el mayor porcentaje de los individuos esta en maduración, tanto en machos como en hembras (Fig. 5.7 y 5.9). Estas condiciones se mantienen durante los meses de septiembre, octubre y noviembre (primavera), luego el número de nemertinos por hospedador comienzan a aumentar nuevamente como así lo hacen también las proporciones de individuos por hospedador (verano - otoño).

A pesar que el análisis de la variación de las medias de Lt, entre los meses, no arrojó diferencias significativas. Existe una tendencia de aumento de Lt media con el aumento de los porcentajes de crecimiento (C) y maduración (M) (mayo, junio, julio y agosto), así como un descenso de la misma (Lt), en los meses correspondientes a la primavera, donde la mayoría de los individuos ya alcanzaron la madurez sexual. Este patrón de variación entre la reducción de la abundancia y la disminución de la talla fueron observados en nemertinos con estrategias de reproducción semélparas, donde durante los meses invernales, la población destina su energía en la maduración de las gónadas, hasta que llegan a la madurez y luego la población muere (Thiel y Junoy 2006; García y Anadón 2004). Teniendo en cuenta estos resultados y que al menos un pequeño porcentaje de la población de *P. abbreviata* muestreada no tenía nemertinos (1,7 %), se podría inferir que *M. arrokeana* es también una especie semélpara, aunque habría que confirmar esta hipótesis con futuros estudios.

La variación mensual registrada entre el desarrollo gonádico y el número de individuos podría indicar la existencia de algún mecanismo de regulación de la población durante la madurez sexual. En este mecanismo podría mediar alguna señal química dada por aquel huésped que logra llegar primero a la madurez e inhibe el crecimiento de sus congéneres inmaduros o los elimina (multiinfecciones = inmaduros; infección simple = maduros). Teniendo en cuenta el tamaño y la capacidad de filtración del hospedador, la competencia por el espacio y/o alimento no parece ser la causa de esta regulación. Por otro lado, la presencia de compuestos químicos en nemertinos ya ha sido documentada para otras especies en numerosos trabajos (Kem 1970; Kem *et al.* 1971; Kem 1985; Asakawa *et al.* 2000).

Kem (1971 y 1985), descubre la presencia de la toxina anabasina y otra toxina paralizante de cangrejos en preparados de probóscide de *M. grossa*. Estas toxinas están asociados a células rabdíticas en el epitelio de la misma, aunque no posee alta toxicidad en relación a la concentración presente en otros nemertinos, es posible que esta toxina o una similar, esté presente en *M. arrokeana* (W. Kem com. pers.) y sea utilizada por aquel individuo que logre alcanzar la madurez para repeler a los demás que no maduraron.

Del estudio histológico del ciclo gonadal de *M. arrokeana* se puede observar un aumento y disminución de los porcentajes de estadios gonadales a lo largo de los meses, con un pico de liberación (L) en el mes de septiembre, para machos y hembras, si bien en los machos existe un porcentaje de la población en madurez (M) y liberación (L) durante todo el periodo muestreado. Por su parte las hembras aunque presentan porcentajes de M y L que varían durante todo el periodo, en los meses de mayo y junio no se observan individuos en estadio de liberación (L), y presentan un solo periodo de liberación importante (septiembre) durante los doce meses estudiados. Estos resultados no son del todo concordantes con lo registrado por Gibson y Jennings (1969), para *M. grossa*, donde observan dos picos de desove durante los meses de verano (julio y agosto en el hemisferio norte) y tampoco con Teso *et al.* (2006) para *M. arrokeana*, donde se propone un ciclo continuo de desove durante todo el año en el GSJ.

Hay que tener en cuenta que los resultados expresados por Gibson y Jennigs (1969) no fueron obtenidos por medio del estudio histológico del ciclo gonádico, mientras que lo referido al trabajo realizado por Teso *et al.* (2006), fueron obtenidos con menos cantidad de individuos y hubo meses que no fueron muestreados. Sin embargo, los meses de mayor porcentaje de estadio de liberación (L) coinciden con lo registrado por Teso *et al.* (2006), así como las posibles causas de liberación de gametas. Los perfiles de temperatura del agua de fondo en el golfo San José, muestran la menor temperatura durante el mes de septiembre aumentando gradualmente hasta el mes de marzo (Averbuj y Penchaszadeh 2010). Los eventos de liberación podrían estar relacionados con estos perfiles de temperatura ya que los meses correspondientes al otoño y primavera son aquellos donde se registran las grandes floraciones de planctónicas (*blooms*) en el golfo San José (Charpy y Charpy-Roubaud, 1980).

Este aumento de producción primaria daría un ambiente propicio para el desarrollo de los juveniles recién asentados, como lo registraran Gibson y Jennings (1969), para *M. grossa* y Teso *et al.* (2006), en *M. arrokeana*. Estos patrones de evacuación fueron también observados en los ciclos reproductivos de otros invertebrados de la región (Ciocco, 1991; Ciocco 1992; Amoroso 2004; Van der Molen *et al.* 2007; Averbuj y Penchaszadeh 2010, Zaidman *et al.* 2012).

Panopea abbreviata posee un ciclo de maduración gonadal que coincide con el registrado para *M. arrokeana*. Van der Molen *et al.* (2007) y Garcia Villalobos (2009), estudiaron el desarrollo gonadal de *P. abbreviata* en el golfo San José, y observaron que las hembras de esta especie, poseen dos periodos de evacuación durante el año, uno de abril a junio y otro de septiembre a noviembre, estos últimos coinciden con el periodo de liberación registrados aquí para *M. arrokeana*. Este tipo de adaptación en la reproducción (acoplamiento) entre hospedador y huésped es una característica de una relación parasitaria, ya que la continuidad del parásito, depende de nuevos hospedadores que colonizar, por lo que sus ciclos reproductivos deben estar sincronizados (Roe 1988; Norenburg y Roe 1998). A partir de los resultados de esta tesis, la sincronización de la reproducción observada en este caso parece estar más ligada a las condiciones ambientales externas que una adaptación al modo de vida parasitaria, ya que *P. abbreviata* no es una especie anual, tiene una tasa de crecimiento lenta y una vida muy longeva de hasta 86 años (Morsan y Ciocco, 2004). Por otro lado, teniendo en cuenta que las larvas de *M. arrokeana* tardan al menos 4 semanas en asentarse, no parece muy probable que la sincronización este ligada a un asentamiento de las larvas sobre la nueva generación del hospedador.

La relación entre la distribución de las tallas de *M. arrokeana* con respecto a su estadio de maduración gonadal muestran que el desarrollo está dividido en dos fases; una de crecimiento y desarrollo gonadal que comienza en mayo, destinando gran parte de su energía en el crecimiento y maduración de las gónadas hasta agosto (4 meses), y la otra de reproducción, cuando alcanza la talla mínima de maduración (16 a 21mm), y comienza la liberación de gametas (primavera). Este tipo de rápido crecimiento en cortas etapas se ha registrado en otros nemertinos con estilos de vida similares a los de *M.*

arrokeana, tal es el caso de *Tetrastema fozensis*, que habita al bivalvo *Scorbicularia plana*, el cual presenta una etapa de crecimiento rápido en los primeros meses de vida, y luego una notoria disminución del crecimiento pero un aumento en la maduración sexual (García y Anadón 2004; Thiel y Zubillaga 1998), y también fue observado en el nemertino de vida libre *Lineus viridis* (Von Döhren *et al.* 2011).

Desarrollo larval

El desarrollo larval y los estadios de desarrollo de *M. arrokeana* fueron descritos aquí por primera vez. Los estadios fueron similares a lo observado por Hammarsten (1918) para *M. grossa*, en cuanto a las características morfológicas de las larvas y el desarrollo larvario. *M. arrokeana* presentó los mismos estadios y el mismo tiempo de vida media que lo observado por Hammarsten (1918), con la diferencia que en esa ocasión no pudo mantener las larvas por tanto tiempo, por lo que no hace mención al último estadio aquí descrito (engrosamiento posterior).

M. arrokeana posee el mismo desarrollo larval que los demás hoplonemertinos especies *non-Pilidiophora* (Thollenson y Norenburg 2003), de zonas templadas bajo las mismas condiciones de laboratorio, descritos hasta ahora (Malaskova y Von Döhren 2009). Las cuales son, desarrollo directo y larva planuliforme que no se alimenta (Malaskova y Von Döhren 2009), características distintivas del grupo.

Metamorfosis y Asentamiento.

Aunque no se pudo lograr la metamorfosis fuera del hospedador, estos resultados coinciden con estudios en el asentamiento larval de otros hoplonemertinos con hábitos endocomensales y parásitos. Dunn (2011), al trabajar con larvas de *Carcinonemertes errans* tampoco consiguió el asentamiento de estas larvas criadas en laboratorio, aunque si lo consiguió con larvas extraídas del plancton, en este trabajo marca grandes diferencias entre la morfología de las larvas cultivadas en laboratorio y las naturales, como la longitud (hasta el doble de lo observado en el laboratorio), el color y el mayor desarrollo. A su vez también hace mención al hecho de la mortandad repentina de todo su cultivo después de pocas semanas, atribuyendo esta mortandad a las diferencias morfológicas de las larvas naturales y a las condiciones

ambientales distintas en el laboratorio. Por otro lado, Hammersten (1918) intentó lograr el asentamiento de las larvas de *M. grossa* criadas en laboratorio y las atrapadas del plancton, en ninguno de los casos logró conseguirlo exitosamente, incluso inyectando las larvas dentro del bivalvo.

La causa por la cual no se consiguió la metamorfosis total de las larvas de *M. arrokeana* pueden haber sido originados por varios de los factores antes mencionados, o por la combinación de todos ellos, incluyendo no contar con el sustrato de asentamiento adecuado, no proporcionar las condiciones adecuadas para el desarrollo (condiciones del agua, alimento), o la contaminación y posterior muerte de los cultivos. La última posibilidad parece poco probable basado en la coordinación constante de la muerte de casi todos los cultivos de larvas (entre 3 y 4 semanas) y el especial cuidado en la asepsia de los elementos empleados. En todos los casos, los cultivos parecían sanos durante varias semanas y luego se deterioraban rápidamente.

Teniendo en cuenta los resultados y las distintas explicaciones planteadas, parece evidente que otro factor es el responsable de la fallida metamorfosis. Por lo que existe la posibilidad de que la metamorfosis y posterior asentamiento de las larvas este dada por alguna señal química proveniente del hospedador, estas señales han sido descritas en otros nemertinos parásitos, como *Carcininonemertes*, asociadas al período de la muda del hospedador (Kurtis 1993), o en *Gononemertes*, asociada al ciclo de vida de la ascidia hospedadora (Egan y Anderson 1979; Junoy *et al.* 2010).

A partir la bibliografía disponible y lo que se conoce sobre las especies del género *Malacobdella*, las especies estudiadas tienen fecundación externa, liberan sus gametas al agua circundante y la larva se desarrolla en la columna de agua (Gibson 1969; Teso *et al.* 2006), e ingresa posteriormente a su hospedador. Esto podría ser una estrategia, pero los resultados aquí mostrados, referentes a las características de la masa ovígera, la cantidad de huevos por liberación, el modo de vida de la especie y los altos porcentajes de multi-infecciones registrados sólo en algunos meses, también permiten pensar en que debe existir una estrategia complementaria, en lo que al asentamiento de las larvas se refiere.

La masa ovígera posee una flotabilidad negativa y está recubierta por una sustancia mucosa pegajosa (Fig. 5.1), esta masa puede estar formada por

cientos de ovas, a su vez cada una está cubierta por una capa gelatinosa que protege a la larva hasta que posee movilidad propia (Fig. 5.13. A), esta capa también es pegajosa y mantiene a las larvas juntas durante las primeras etapas del desarrollo. Esta masa ovígera podría quedar adherida a las laminas branquiales del hospedador y ser fecundadas allí.

Por este motivo y con la información recogida durante este trabajo, se proponen dos estrategias complementarias para el asentamiento, por una parte se podría producir el asentamiento de las larvas formadas fuera de *P. abbreviata* (en la columna de agua, exógenas) que reingresen a un bivalvo, y por otra parte, la fecundación dentro del hospedador (endógenas), donde las hembras maduras de *M. arrokeana* desovarían dentro de la cavidad del manto de *P. abbreviata*, y parte de las gametas saldrían a la columna de agua, pero otra parte, quedaría retenido en las branquias del hospedador (Cap. 4). Este hecho provocaría una gran concentración de gametas en un espacio reducido, y una consecuente mayor probabilidad de éxito reproductivo, ya que las gametas de los machos son de menor tamaño y podrían entrar fácilmente y en mayor cantidad con el agua ingresante. Este mecanismo fue ampliamente visto en varias especies de invertebrados, incluido nemertinos (Levitan 1995; Thiel y Junoy 2006). Más específicamente este comportamiento fue observado en la especie *Vieitezia luzmurubae*, un hoplonemertino que utiliza el atrio de la ascidia *Ciona intestinalis*, para depositar sus huevos (Junoy *et al.* 2010).

Las larvas producidas por la fecundación en el interior del hospedador (endógenas), tendrían la señal química para el asentamiento, a su vez los juveniles gozarían de una mayor protección y alimento (Capítulo 4), hasta alcanzar el tamaño suficiente para poder adherirse al manto de su hospedador. Este mecanismo complementario de asentamiento donde interviene un evento externo y uno interno, fue documentada en muchos ciclos de vida de nemertinos parásitos, especialmente en las especies del género *Carcinonemertes*, donde las larvas reingresan a sus hospedadores luego de formarse en la columna de agua, pero hay una proporción importante de larvas de ese evento que permanecen en los hospedadores y se asientan en ellos (Kuris 1991; Kuris 1993).

Adicionalmente, Dumm (2011) verificó que el asentamiento de larvas naturales de *C. errans* sigue un patrón gregario, donde la cantidad de larvas

asentadas es mayor si la larva encuentra algún congénere ya asentado en ese hospedador. A su vez los juveniles recién asentados de estas especies de *Carcinonemertes* son capaces de moverse por el cuerpo del hospedador, desde la masa ovígera, donde se asientan y alimentan, hasta la cámara branquial donde secretan una cápsula protectora y se desarrollan sexualmente para luego volver a la masa ovígera con la próxima ovoposición del hospedador y reproducirse (Kuris 1991; Kuris 1993; Shields *et al.* 1990b).

Para el caso *M. arrokeana*, la ventaja adaptativa que le proporciona esta estrategia complementaria, es evidentemente evolutiva, ya que no necesitaría emplear energía en la construcción de una estructura protectora (capullo, cápsula), como si deben hacer otros nemertinos de vida libre; a su vez se asegura el éxito y la continuidad de la progenie.

A pesar de no haber reportado la presencia de larvas de *M. arrokeana* libres en el plancton, las características morfológicas de las larvas de *M. arrokeana* cultivadas en laboratorio no ofrecen muchas ventajas a la hora de permanecer libre en el plancton por mucho tiempo (un par de ojos, no se alimenta, aumento de división celular en las últimas etapas), es claro que la reinfección por larvas externas, es un proceso que efectivamente sucede (dispersión), pero esta estrategia complementaria podría ser de gran importancia en el éxito reproductivo de la especie.

Con toda la información resultante de este capítulo se puede decir que la reproducción de *M. arrokeana* sigue la siguiente secuencia, la fecundación es externa, las gametas son liberadas al agua circundante, los machos no poseen ninguna estructura para la cópula. Las larvas planuliformes no se alimentan y tienen una vida planctónica del al menos cuatro semanas, con una capacidad de movilización en toda la columna de agua y presentan fototaxia negativa. Morfológicamente las larvas desarrollan estructuras sensoriales (dos ocelos) y estructurales (engrosamiento terminal), relacionadas posiblemente con la búsqueda del hospedador. Las larvas tienen un asentamiento gregario (por ausencia de individuos inmaduros solos), que puede estar mediada por alguna señal química del hospedador.

Los posibles mecanismos complementarios de asentamiento son, 1) externo o exogeno donde las gametas se juntan en la columna de agua y reingresan al azar en otro hospedador o en el mismo, 2) una fecundación

dentro del hospedador, donde la masa ovígera de *M. arrokeana* por sus características estructurales (flotabilidad negativa y membrana pegajosa) queda retenida en las laminas branquiales del hospedador y es fecundada por las gametas masculinas que entran de con la corriente incurrente y se asientan. Las larvas de ambos mecanismos se asentarían y alimentarían sobre las láminas branquiales hasta desarrollarse, y luego migrarían hasta adherirse al manto en la cavidad paleal del hospedador. La presencia de un único nemertino maduro por hospedador sugiere un mecanismo de regulación poblacional, relacionado con maduración gonadal.

En cuanto al desarrollo gonádico, *M. arrokeana* posee un ciclo de vida separado en dos fases, una de maduración gonadal y una fase reproductiva. La primera está asociada con un rápido crecimiento (aumento de Lt) (Fig. 5.7, 5.9 y 5.10) del animal acompañado con un desarrollo gonádico durante el invierno y el otoño (mayo, junio, julio y agosto), y la segunda correspondiente a la liberación de las gametas en primavera (septiembre, octubre), y posible muerte del animal (disminución considerable de la Lt, semelparidad), seguido de un segundo reclutamiento menor en el verano, proveniente de los individuos más jóvenes tal vez dada por el mecanismo de asentamiento interno.

Genética poblacional

Genética poblacional

Introducción.

La genética de poblaciones se encarga del estudio de los procesos y mecanismos por los cuales ocurre la evolución en las poblaciones naturales, determinando cuanta variación genética existe entre estas poblaciones. Estas diferencias se reflejan a través de cambios en las frecuencias alélicas y secuencias nucleotídicas a través del tiempo (Eguiarte 1999).

Debido a que las poblaciones naturales son dinámicas en tiempo y espacio (cambian de tamaño, de densidad y tienen la capacidad de fragmentarse), para el estudio de genética de poblaciones se consideran a las poblaciones como "ideales". Estas poblaciones se caracterizan por ser: muy numerosas, sus organismos son diploides, tienen reproducción sexual, sus generaciones no se solapan y presentan apareamiento azaroso (Hartl y Clark 1997; Hedrick 2000).

Los modelos usados en los estudios evolutivos se centran en una porción de gen en los cromosomas con dos alelos (locus) como un marcador para detectar la variación en su secuencia (Aguirre 2007). Uno de los modelos más usados es la Ley de Equilibrio de Hardy - Weinberg (EHW), este modelo describe la relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas de un solo locus en un estado de equilibrio, de una población diploide, en donde sus organismos se aparean al azar (Gillespie 1998).

Según Hartl y Clark (1997), si en una población se cumplen los supuestos antes mencionados se espera que las frecuencias alélicas y la composición genotípica de la próxima generación no varíen con respecto a la anterior (no haya evolución). Este fenómeno solo ocurrirá en el supuesto caso que no hubiera fuerzas evolutivas actuando sobre la población y constituye uno de los supuestos más importantes del principio del EHW (Eguiarte 1999).

Fuerzas evolutivas.

Las fuerzas evolutivas son las responsables de la variación genética en las poblaciones naturales. La fuerza responsable del aumento de la variación es la mutación, mientras que la deriva disminuye esa variación. La migración o

flujo génico aumentan o disminuyen la variación según cada caso particular (Hedrick 2000). Por eso se dice que la variación genética es el resultado de la acción de una o varias de estas fuerzas (Aguirre 2007)

Estructura genética de la población

Las poblaciones de una misma especie pueden subdividirse en unidades pequeñas, debido a factores geográficos ecológicos y de comportamiento. La manera como se distribuye la variación genética dentro de esa población se conoce como estructura genética de esa población. Una población al estar dividida geográficamente puede presentar diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas en las subpoblaciones. Esta diferenciación dependerá del flujo génico efectivo entre estas subpoblaciones. Si el flujo génico es alto, estas subpoblaciones tenderán a homogeneizarse, por el contrario si es nulo, la acción de las otras fuerzas evolutivas (deriva, selección y mutación), pueden originar una diferencia mayor entre ellas (Hartl y Clark 1997; Hedrick 2000).

Wright (1943) definió el coeficiente F_{ST} , (*Fixation index*) para cuantificar la diferencia entre las subpoblaciones debida a la variación genética. Este índice toma valores entre 0 y 1.

Si F_{ST} es igual a cero, significa que la población total está bajo equilibrio HW. Por otro lado si es igual a uno, todas las subpoblaciones son diferentes entre sí, lo cual significaría que cada una de las subpoblaciones presenta fijo un alelo dado. Esta diferenciación puede ser producto de la deriva génica o de la selección natural (Wright 1988). Este coeficiente se obtiene a partir de H_S (heterocigosis esperada promedio a nivel subpoblacional) y H_T (heterocigosis esperada total de todas las subpoblaciones) (Hartl y Clark, 1997). Bajo EHW, F_{st} se calcula como:

$$F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

Marcadores Moleculares

Desde la década de los años 80s, la herramienta más usada para medir la variación genética ha sido las diferencias en las secuencias nucleotídicas de ADN (Aguirre 2007). A partir del desarrollo de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), se pudieron amplificar rápidamente porciones de ADN, que

sirvieron para el desarrollo de los que conocemos hoy como marcadores moleculares (Wolfe y Liston 1998). Al elegir los marcadores moleculares más apropiados deben tenerse en cuenta distintos parámetros, como el nivel de polimorfismo, la tasa de mutación y el modo de herencia (uniparental o biparental) (Avice 2004). Los diferentes marcadores no siempre mostrarán los mismos resultados, ya que estos marcadores pueden estar sometidos a efectos diferenciales de las fuerzas evolutivas (mutación o deriva) (Buonaccorsi *et al.* 2001). Los marcadores moleculares más utilizados son los marcadores mitocondriales, como citocromo oxidasa I (COI), los ribosomales ARNr 16S y el marcador nuclear ITS2 (“*second Internal Transcriber Spacer*”) y los microsatélites.

Marcadores mitocondriales.

El genoma mitocondrial (ADNmt) animal resulta muy adecuado para estudios poblacionales. Es una molécula haploide, con tasas de mutación altas, (hasta 10 veces más que los genes nucleares de copia única), no recombinante, con herencia predominantemente materna y su tamaño efectivo poblacional es mayor al de los loci nucleares (Alberts *et al.* 1999). Además posee una alta variabilidad incluso a nivel intraespecífico (Avice 2004). Los genes ribosomales ARNr 16S y el gen mitocondrial COI son los más utilizados tanto en estudios poblacionales como en filogenias (Avice 2004; Sotka *et al.* 2004). Una de las razones en el uso de estos marcadores es que existe una gran base de datos disponibles en plataformas como Gen Bank y BOLD, lo cual permite efectuar comparaciones y enriquecer los análisis; la otra es el uso de cebadores - *primers* - universales para efectuar las amplificaciones, lo que agiliza el tiempo de laboratorio.

Marcadores nucleares ribosomales.

El ADN ribosomal (ADNr) contiene la información genética que conforman los ribosomas y se encuentran en las mitocondrias, cloroplastos y núcleo de las células. El ADNr nuclear está conformado por tres subunidades muy conservadas (ADNr 18S, ADNr 5.8S y ADNr 28S), separadas por dos regiones internas (espaciadores) con elevadas tasas de sustitución (ITS1 e

ITS2) (Avise 2004). Estas repeticiones se encuentran a lo largo de todo un genoma y evolucionan concertadamente, lo que se atribuye a eventos recombinatorios como entrecruzamiento desigual y conversión génica (Avise 2004). Estas secuencias, presentan tasas de sustitución muy bajas por lo que son muy útiles para resolver relaciones filogenéticas de grupos con tiempos de divergencia muy antiguos (Hills y Dixon 1991, Avise 2004).

El uso de genes nucleares en combinación con genes mitocondriales aporta un nivel de resolución adicional a la filogenia, incrementando las posibilidades de poder reconstruir la verdadera historia de un grupo de especies. Los genes nucleares presentan un tamaño efectivo poblacional mayor y en promedio unas tasas de mutación menores que los genes mitocondriales (Moriyama y Powell 1997), por lo que son más adecuados para resolver las relaciones de los nodos filogenéticos más profundos (Machordom *et al.* 2003).

Análisis de la variación genética.

Para saber cómo se distribuye la variación genética dentro de la especie se utiliza un análisis de la varianza molecular “AMOVA” (*Analysis of Molecular Variance*) (Excoffier *et al.* 1992). Este método es lo suficientemente flexible como para permitir analizar varios tipos de matrices de entrada correspondientes a diferentes tipos de datos moleculares, así como también diversas suposiciones evolutivas sin modificar la estructura básica del análisis.

Este análisis estima los valores del estadístico F lo cual permite estimar el grado de variación genética entre los haplotipos estudiados (Excoffier *et al.* 1992).

Índices de diversidad genética.

Los índices de diversidad son especialmente útiles para realizar comparaciones entre poblaciones, y proporcionan una medida de la cantidad de variación genética de una población. A nivel poblacional los más utilizados en el estudio con marcadores mitocondriales son: la diversidad haplotípica de Nei (h) y la diversidad nucleotídica (π). La diversidad haplotípica de Nei (h) es la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar sean iguales, y la

diversidad nucleotídica (π) es el número promedio de diferencias por sitio entre dos secuencias tomadas de a pares (Aguirre 2007), y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\pi = \frac{n}{[n(n-1)/2]} \sum_{i < j} \pi_{ij}$$

donde π_{ij} , es el número de diferencias nucleotídicas entre la i -ésima y j -ésima y el denominador (n) es el número de pares posibles de secuencias.

Redes haplotípicas.

A partir del concepto de filogeografía propuesto por Avise (2004), las secuencias de ADN pueden usarse para inferir procesos evolutivos en el pasado a nivel poblacional. Este concepto examina la distribución de la genealogía de alelos o haplotipos en un contexto geográfico, utilizando la información histórica contenida en los genes y caracterizando la subdivisión de las poblaciones al reconocer patrones geográficos en la estructura genealógica a lo largo del rango de distribución de una especie (Aguirre 2007). El uso de redes haplotípicas para el estudio a nivel poblacional, provee más información que el tradicional árbol filogenético, ya que las relaciones filogenéticas requieren que las variaciones genéticas no formen linajes reticulados (Schaal *et al.* 1998; Aguirre 2007). Las relaciones evolutivas entre haplotipos permiten reconstruir los procesos evolutivos, basados en el concepto de que los haplotipos en una población pueden ser rastreados hacia atrás en el tiempo hasta el punto en el que coalescen en un alelo ancestral común (coalescencia) (Aguirre 2007). Existen diversos métodos para la confección de redes, entre los cuales se encuentran el método de parsimonia estadística.

El método de parsimonia estadística comienza con una búsqueda entre los haplotipos, estimando el número máximo de diferencias entre ellos. Estas diferencias son el resultado de simples sustituciones en un solo sitio de la secuencia con un 95% de significancia estadística. Este número se denomina límite de parsimonia (o límite de conexión de parsimonia). Luego conecta los haplotipos que difieran en más de un cambio mutacional (i.e. más de un cambio en la secuencia), posteriormente los que se diferencien por dos cambios, luego

por tres y así sucesivamente hasta alcanzar el límite de parsimonia o hasta que todos los haplotipos estén incluidos en una sola red (Aguirre 2007).

Aislamiento por distancia: Test de Mantel.

En especies con una baja tasa de dispersión y amplio rango geográfico de distribución, se espera encontrar una similitud genética más elevada entre poblaciones cercanas geográficamente, que con aquellas que se encuentran más alejadas. Wrigth (1943), describió este concepto como “aislamiento por distancia” basándose en la idea de que los individuos tienen más probabilidad de aparearse con aquellos más cercanos geográficamente de lo que se esperaría al azar.

Por otra parte, dos sitios adyacentes rara vez puedan intercambiar migrantes si se localizan a ambos lados de una barrera geográfica (Gilg y Hilbish 2003), y en el medio marino dos lugares distantes pueden estar bien conectados por una fuerte corriente entre ellos (Mitarai *et al.*, 2008). La prueba de Mantel es un procedimiento que se utiliza para corroborar la significancia estadística entre matrices de datos genéticos y de distancia (Sokal 1979). Con esta prueba se puede comprobar si la diferencia genética entre las poblaciones está relacionada con la distancia geográfica que los separa (Smouse *et al.* 1986).

Neutralidad versus Selección: Prueba de Tajima.

El propósito de la prueba de Tajima es distinguir si las secuencias de ADN han evolucionado al azar (bajo teoría neutralista), o su evolución está mediada por selección o deriva (selección direccional, purificadora, cuello de botella). Los parámetros usados para medir estas diferencias son la diversidad nucleotídica (π) (número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias tomadas al azar, y θ ($\theta = 4N\mu$, para organismos diploides o $\theta = 2N\mu$ para haploides o marcadores uniparentales, como el ADN mitocondrial, Kimura 1968). El parámetro π está afectado por los alelos de mayor frecuencia y es independiente del tamaño de la muestra, mientras que θ , por el contrario, sí es afectado por el tamaño de la muestra y por la deriva génica, por lo tanto, por los alelos menos frecuentes. Ambos parámetros están relacionados en la expresión de la D de Tajima, calculada a partir de la siguiente fórmula:

$$D = \frac{\pi - \theta}{\sqrt{V[\pi - \theta]}}$$

Si θ es mayor que π (D negativa) significa que estas secuencias están afectadas por la presencia de mutaciones deletéreas o exceso de alelos o haplotipos raros y, por lo tanto, se infiere una expansión poblacional o selección purificadora o negativa. En cambio, si π es mayor que θ (D positiva), significa la posibilidad de un cuello de botella poblacional o selección positiva, balanceadora o disruptiva. Si π es igual a θ (D igual a 0) quiere decir que las mutaciones que afectan a estas secuencias son las que se darían por azar y no afectarían el *fitnees* de los individuos, es decir bajo equilibrio neutral (Tajima 1983, 1989).

Estasis versus expansión poblacional: Distribución mismatch.

Las distribuciones “*mismatch*” se utilizan para distinguir si una población se encuentra bajo equilibrio demográfico o ha experimentado una reciente expansión poblacional. En resumen, cuenta el número de diferencias entre cada par de secuencias en una población (Rogers y Harpending 1992) y el resultado permite la construcción de un un histograma de frecuencias.

Si una población se encuentra bajo una expansión poblacional reciente, la distribución de las distancias entre sus haplotipos tendrá una forma unimodal, mientras que si sus haplotipos se encuentran en equilibrio con las distancias que los separan, esta distribución será multimodal (Rogers y Harpending 1992; Harpending 1994; Rogers 1995). Las distribuciones de “*mismatch*” pueden utilizarse para inferir eventos históricos de expansión poblacional basados en crecimientos recientes poblacionales (Brant y Ortí 2003; Alvarez-Castañeda y Patton 2004; Goropashnaya *et al.* 2004; Whorley *et al.* 2004).

Genética de poblaciones en nemertinos.

Pocos estudios se han centrado en la estructura genética de las poblaciones de nemertinos (Rogers *et al.* 1997, 1998; Sundberg y Strand 2007; Thornhill *et al.* 2008; Andrade *et al.* 2012). En este trabajo se presenta por primera vez la caracterización, diversidad genética, la estructura poblacional y la historia demográfica reciente de *Malacobdella arrokeana*.

Los Golfos del norte de la Patagonia están ubicados en el límite de las provincias biogeográficas Magallánica y Argentina. Cada una de estas provincias tiene diferentes condiciones oceanográficas (Scarabino 1977; Boschi 2000) (ver características de la zona de estudio en capítulo 2). Estudios realizados sobre invertebrados marinos en la zona de estudio, mostraron diferencias entre algunas poblaciones que habitan los golfos norpatagónicos. Por ejemplo, Real *et al.* (2004) reportaron diferencias genéticas entre poblaciones de la vieira *Aequipecten tehuelchus* del norte y el sur del golfo San Matías, estimando que las distancias genéticas fueron mayores entre las 2 poblaciones de San Matías, que entre estas poblaciones y la población del golfo San José. Por el lado de *Panopea abbreviata*, estudios sobre parámetros demográficos de sus poblaciones en el golfo San Matías, muestran diferencias en las tasas de crecimiento individual, entre los organismos de las poblaciones que habitan de uno y otro lado del frente termohalino (Morsan *et al.* 2010). Teniendo en cuenta la estrecha asociación de *M. arrokeana* con un bivalvo sésil y las particularidades de sus hábitats (golfos aislados geográficamente), se espera encontrar un cierto nivel de estructuración genética entre las poblaciones de *M. arrokeana*.

Materiales y métodos.

Recolección de muestras y extracción de ADN.

La recolección de muestras y posterior procesamiento (extracción de ADN y amplificación) se efectuó en las mismas localidades y siguiendo los mismos procedimientos que se explicaron en los capítulos 2 y 3, ver mapa en capítulo 2 (Fig. 2.1).

La cantidad de individuos de *M. arrokeana* analizada para cada sitio fue: dos poblaciones del golfo de San Matías, El Sótano (norte) (GSMN (1); n = 7) y Puerto Lobos (sur) (GSMS (2); n = 35). A su vez también se recolectaron muestras en el golfo San José Punta Conos (GSJ (3); n= 17) y en el golfo Nuevo, Bahía Craker (GN (4); n = 8), todas pertenecientes a los tres golfos norpatagónicos (Fig. 2.1). Sólo tres de los ejemplares de *P. abbreviata* encontrados (n=67) contenían más de un único ejemplar de *M. arrokeana* en su interior. Estas tres excepciones contenían 3, 6, y 7 *M. arrokeana* indeterminados, pero ninguno maduro. La diferencia en los n, entre cada población es debido a que en algunos pocos casos, se encontraron bivalvos sin nemertinos, en otros casos, la densidad de las poblaciones de *P. abbreviata* eran bajas.

Amplificación de fragmentos por PCR, secuenciación y análisis de las secuencias.

Las amplificaciones de estos fragmentos se realizaron en los mismos volúmenes (50 µl), y utilizando los mismos ciclos de amplificación utilizados en el capítulo 3. Solo se cambió la temperatura de hibridación (T° H), para cada fragmento.

Primers

16S

16sar-L (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3')

16sbr-H (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') (Palumbi *et al.* 1991).

T° H = 42 C°

ITS2

ITS2-3d (5'- GCA TCG ATG AAG AAC GCA G-3') (White 1990)

ITS2-4r (5'-AGT TTY TTT TCC TCC GCT TA-3') (modificado de White 1990).

T° H = 47 C°

Las condiciones de amplificación y los *primers* utilizados para COI fueron descritas en el capítulo 3

Tratamiento de datos.

Las redes haplotípicas se construyeron con el programa TCS 1.18 (Clement *et al.* 2000) y Network 4.5 (www.fluxus-engineering.com), con los parámetros por defecto, el 95% de límites de conexión y considerando el *gap* o la falta de dato como un quinto estado del carácter.

Para cada fragmento por separado o para una matriz concatenada con los datos de COI, 16S e ITS2, se calcularon todos los parámetros de diferenciación genética, número de haplotipos, diversidad haplotípica y nucleotídica, estadísticos *F*, AMOVA -considerando a cada localidad por separado y luego todas agrupadas como golfo, distribución mismatch (diferencias entre secuencias), parámetro *D* de Tajima, *Fu*'s y test de neutralidad. Estos análisis fueron realizados con los programas Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010) y DnaSP 4.0 (Rozas *et al.* 2003).

Para poner a prueba la hipótesis de correlación entre las diferencias genéticas y la distancia geográfica, se realizó el test de Mantel (Mantel 1967) con 1000 permutaciones, utilizando el programa ISOLDE en Genepop (Raymond & Rousset 1995; Rousset 2008), usando el parámetro *Fst* y el *Fst* linealizado (i.e. $Fst / (1 - Fst)$) contra el logaritmo de la distancia geográfica. El programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011), fue utilizado para calcular posiciones sinónimas no sinónimas en el gen COI, basado en el método de Nei y Gojobori (1986) (Z-test). La varianza entre las posiciones sinónimas y no sinónimas fue calculada con 1000 réplicas.

La historia demográfica de la poblaciones fue inferida comparando la distribución de los diferencias nucleotídicas con respecto a los haplotipos de cada gen y de todos los genes juntos, usando el programa Arlequin 3.5

Resultados.

Se secuenciaron aproximadamente 1.900 pares de bases para *M. arrokeana* (658 pb para el COI, 533 pb para el 16S –ambos mitocondriales- y aproximadamente 700 pb de la región nuclear ITS2) (las secuencias fueron depositadas en GenBank: números de acceso JX220535-JX220725). Se encontraron dieciséis haplotipos exclusivos de COI, doce para 16S y cuatro para ITS2. Los dos haplotipos más frecuentes observados en COI y 16S (apareciendo en 33 y 12 ejemplares los de COI y en 32 y 12 aquellos de 16S) se encontraron en todas las localidades. La diversidad de haplotipos (H_d) fue relativamente alta desde, 0,583 hasta 0,939 (Tabla 6.1). Las redes haplotípicas para cada gen o de la matriz que incluye las regiones de los tres genes (Fig. 6.1) revelaron un elevado número de haplotipos raros, que difieren principalmente por un solo paso mutacional con el haplotipo más frecuente. Por lo tanto, se observó una baja diversidad nucleotídica (π), de 0,001 a 0,002 (Tabla 6.1). La mayoría de los haplotipos raros pertenecen a los ejemplares indeterminados, que no tienen los haplotipos más frecuentes (el más frecuente se encuentran sólo en ejemplares maduros).

El análisis de AMOVA, para el análisis de cada población por separado o agrupados por golfos, reveló que la mayoría de la variación observada se debió a la variación intrapoblacional (100%, 100% y 94,39% para 16S, COI e ITS2, respectivamente). Los valores de F_{ST} para las cuatro poblaciones fueron negativos para ambos genes mitocondriales, indicando que no hay diferenciación entre las poblaciones. Para ITS2, F_{ST} fue 0,056, lo que tampoco fue significativo ($p = 0,067$). Las pruebas de Mantel no mostraron ninguna relación entre los valores F_{ST} ($Z = 0,0059$, $r = -0,1583$, $p = 0,62$) o los valores F_{ST} linearizados ($Z = 0,0132$, $r = -0,1611$, $p = 0,64$), con respecto a las distancias geográficas.

Las distribuciones *mismatch* para cada gen, para cada población y para la matriz concatenada de todos los genes, mostraron el mismo perfil unimodal de expansión/selección (Fig. 6.2) a excepción de las secuencias de COI pertenecientes a la población de golfo Nuevo (COI-GN) que mostraron un perfil binomial (Fig. 6.2). Además, F_s de F_u y valores D de Tajima fueron principalmente negativos (Tabla 6.1) y significativos cuando el número de

muestras analizadas fue lo suficientemente grande para ambos marcadores mitocondriales (COI y 16S). Considerando todas las poblaciones juntas, F_s de F_u y los valores de D de Tajima fueron significativos sólo para COI, y F_s de F_u fue sólo significativo para 16S. Ambos parámetros también fueron negativos pero no significativos para ITS2.

Tabla 6.1. Parámetros del análisis genético de las cuatro poblaciones analizadas de *M. arrokeana*. **GSMN** y **GSMS** = población norte y sur del golfo San Matías, **GSJ**= golfo San José, **GN**= golfo Nuevo, **n**= número de muestras, **Hd**= diversidad haplotípica, π = diversidad nucleotídica, F_u 's y $Ta'D$ valores obtenidos de los test de F_s de F_u y D de Tajima respectivamente. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

	GSMN	GSMS	GSJ	GN	TOTAL
16S					
n	5	32	16	8	61
Hd	0,700	0,671	0,683	0,607	0,673
π	0,002 -	0,002	0,002	0,001	0,002
F_u 's	0,475	-4,163*	-3,011	-0,478	-6,973***
$Ta'D$	0,243	-1,362	-0,793	-0,448	-1,436
COI					
n	7	32	35	30	63
Hd	0,714	0,778	0,569	0,954	0,687
π	0,001 -	0,002	0,001	0,001	0,002
F_u 's	0,237	-9,171***	-1,576	-11,974	-10,960***
$Ta'D$	0,206	-2,058*	-0,793	-1,867	-2,034
ITS-2					
n	7	15	17	13	67
Hd	0,809	0,447	0,323	0,871	0,583
π	0,001	0,001	0	0,001	0,001
F_u 's	-1,390	-0,064	-1,038	-5,391	-0,893
$Ta'D$	-0,654	-1,009	-1,069	-0,945	-0,387
3 juntos					
n	5	8	8	8	56
Hd	1	0,750	0,750	0,964	0,939
π	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001
F_u 's	-2,371	-0,197	-1,096	-2,870	-26,19
$Ta'D$	-0,190	-1,280	-0,304	-0,958	-1,727

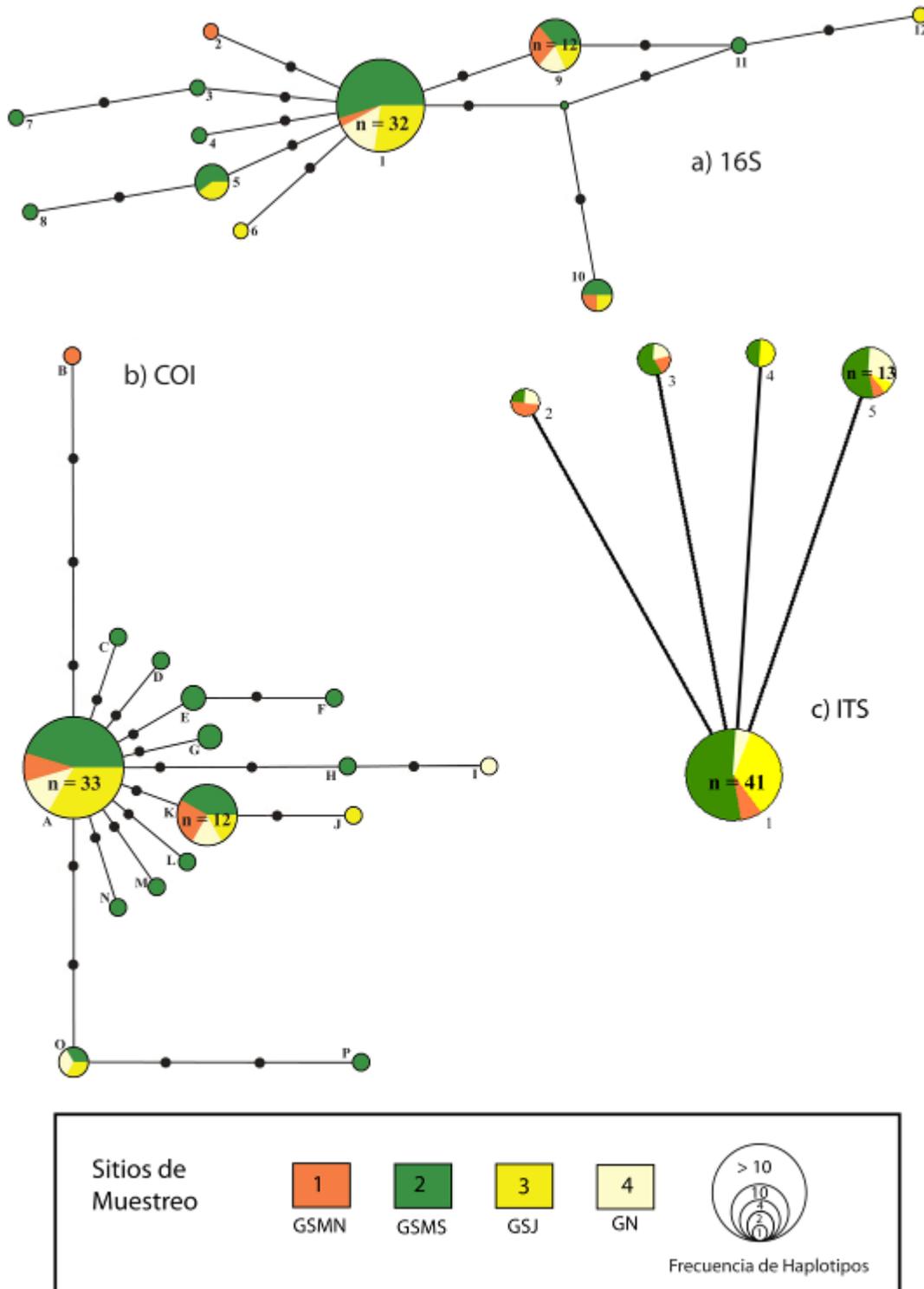


Fig 6.1. Redes de haplotipos de las poblaciones analizadas de *Malacobdella arrokeana* en los golfos norpatagónicos, utilizando 95% de nivel de conectividad. a) Red construida únicamente con secuencias de ADNmt 16S. b) Red construida únicamente con secuencias de ADNmt COI. C) Red construida únicamente con secuencias del espaciador del ADNr ITS. Los nombres alfanuméricos se proporcionan para cada haplotipo (las letras correspondientes a las secuencias de COI, y los números correspondientes a las secuencias 16S e ITS). Los haplotipos muestreados se indican mediante círculos de color, según la región geográfica de la que se tomó la muestra; los haplotipos que faltan o no fueron muestreados se indican con puntos negros. Cada rama indica una diferencia mutacional única. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de haplotipo observado; el número observado de haplotipos se indica por "n"= (cantidad de veces que cada haplotipo se obtuvo en la muestra analizada).

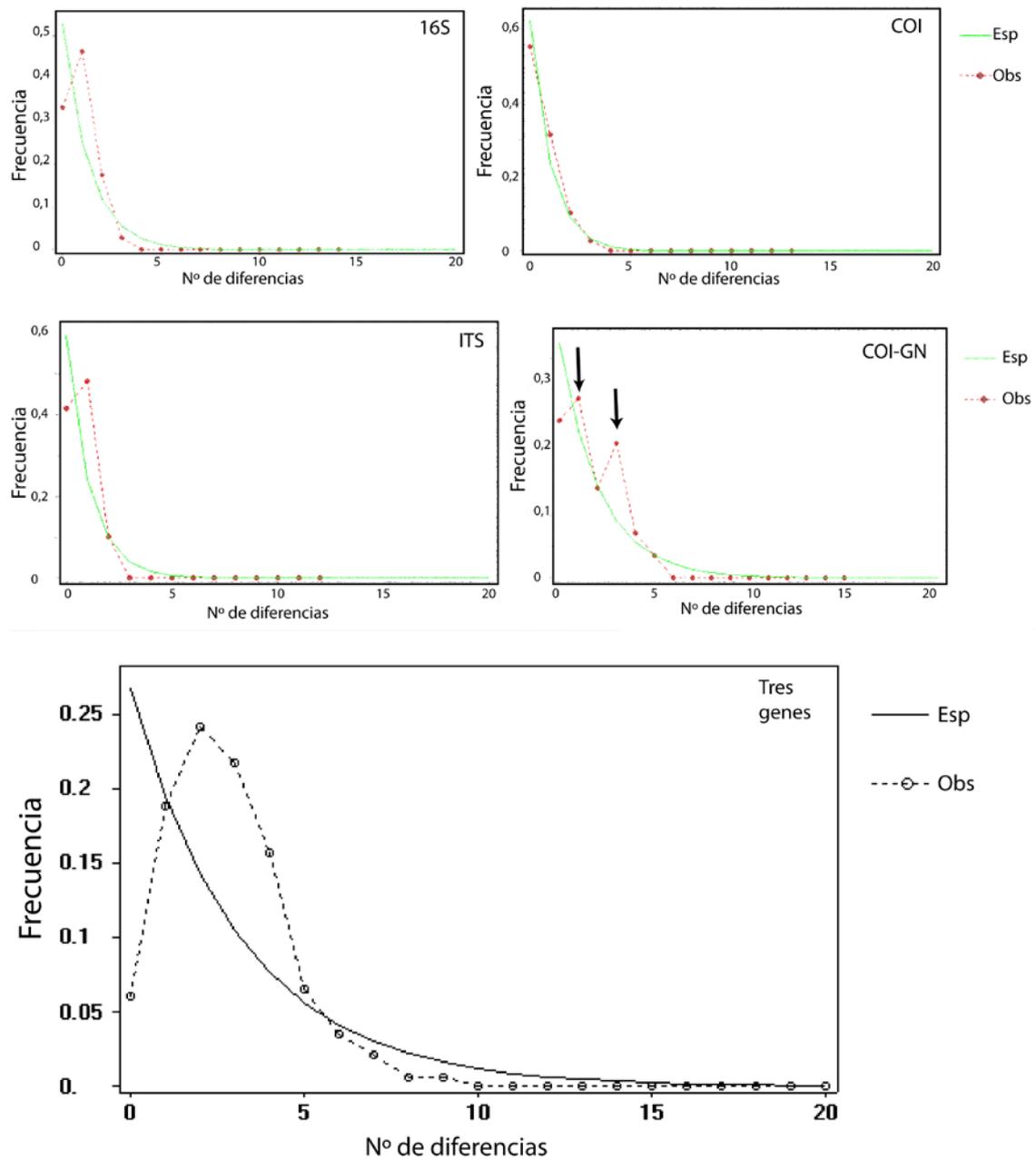


Fig. 6.2: Distribuciones *mismatch* para todos los marcadores analizados (16S, COI e ITS), por separado y para los tres marcadores juntos. Las flechas indican la distribución bimodal en la población del Golfo Nuevo con el gen del ADNmt COI.

Discusión

En este estudio, se observó una baja diferenciación entre las poblaciones que viven en los diferentes golfos norpatagónicos mediante el uso de los marcadores COI, 16S e ITS2. La utilidad y la exactitud de los marcadores utilizados han sido confirmados en nemertinos para diferentes propósitos, incluyendo la diversidad, taxonomía, o incluso la detección de especies crípticas (por ejemplo, Sundberg *et al.* 2009, 2010; Chen *et al.* 2010; Mahon *et al.* 2010).

Dado el rango de posibles valores de F_{ST} (0 a 1), los valores negativos usualmente corresponden a valores de F_{ST} muy pequeños. Tales valores deben considerarse como cero (Long 1986), indicando que no existen diferencias entre las poblaciones ($F_{ST} = 0$). Existen varios fenómenos que podrían contribuir a la falta de diferenciación y poca variación genética registrada en este estudio, como, los eventos demográficos pasados (cuellos de botella), la deriva genética, la expansión reciente y las presiones de selección (Harpending 1994).

La falta de diferenciación poblacional registrada es consistente con estudios previos de genética de poblaciones de nemertinos, como por ejemplo, Rogers *et al.* (1997), encontraron evidencia de baja diferenciación genética en poblaciones de dos especies de heteronemertinos de vida libre, *Lineus ruber* y *L. viridis* en las costas de Norte América, utilizando aloenzimas y marcadores moleculares (COI y 18S). Estas poblaciones se encontraban separadas por grandes distancias geográficas (miles de kilómetros), aunque estos autores atribuyen esta falta de estructura a la dispersión de sus larvas. Cabe destacar que la mayoría de los hetero y paleonemertinos poseen larva pilidium que es capaz de sobrevivir varias semanas en la columna de agua (Stricker 1987). Por otro lado, Thornhill *et al.* (2008) y Sundberg y Strand (2007), utilizaron COI y las secuencias parciales del gen 16S para detectar estructura genética en dos especies de heteronemertinos: *Parborlasia corrugatus* y *Riseriellus oculatus* respectivamente. En estos casos, Thornhill *et al.* (2008), compararon la estructura genética de *P. corrugatus* en poblaciones de América del Sur y la Antártida, encontrando sólo estructura a ambos lados del Pasaje de Drake, una fuerte barrera geográfica al flujo génico. En cambio, Sunberg y Strand (2007),

no encontraron estructuración genética en las poblaciones de *R. occulatus* entre España y Gales.

Varios aspectos de las condiciones oceanográficas costeras en los golfos norpatagónicos son consistentes con los patrones geográficos en el flujo génico observado en este estudio. A lo largo de la costa de la Patagonia, la amplitud de la marea es una de las más altas del mundo, lo que genera fuertes corrientes y variaciones significativas en el nivel del mar (Palma *et al.* 2004). El agua de la plataforma de baja salinidad y temperatura entra desde el sur del golfo San Matías, determinando un tiempo de residencia del agua en dicho golfo, de aproximadamente 300 días (Rivas y Beier 1990). A su vez la comunicación entre el GSM y GSJ, esta gobernada por la formación de turbulencias (*eddies*), producto de la diferencia de profundidad entre los golfos (GSM > GSJ), y lo estrecho de su boca. Estos *eddies*, generan unas corrientes turbulentas llamadas *jets* (Amoroso y Gagliardini 2010), desde el GSJ hacia el GSM. Amoroso y Gagliardi (2010), estudiando las metapoblaciones de la vieira patagónica (*Zygochlamys patagonica*) demostraron -por imágenes satelitales - que existen dos dominios dentro de las aguas del GSJ, uno Este y otro Oeste. Estos autores explican que los *jets*, generados en el dominio Este del GSJ, actúan como una bomba de agua, que arrastra partículas y larvas cientos de kilómetros dentro del GSM. Tonnini (2010), por medio de un modelo hidrodinámico demostró que el GSM expulsa durante los meses de otoño – invierno el 40% de las partículas en suspensión hacia la plataforma, siendo los meses de primavera – verano los de mayor retención de partículas.

La conexión entre el GN y los GSM y GSJ, no es clara, sin embargo a lo largo de la Plataforma Continental Patagónica, existe una corriente local, llamada Corriente Patagónica que transporta aguas de baja salinidad desde el Estrecho de Magallanes en dirección Norte (Brandhorst y Castello 1971). Su influencia, detectada por medio de la salinidad, se registra hasta el norte del GSM (Palma y Matano 2012). Los bajos niveles de diferenciación genética relacionada con la retención de las larvas y las condiciones oceanográficas se ha demostrado anteriormente en muchas poblaciones de especies de invertebrados a lo largo de la costa del Pacífico (Teske *et al.* 2008; Sotka *et al.* 2004; Kelly y Palumbi 2010).

Los registros fósiles de *Panopea* datan desde el Mioceno (10 Ma atrás), en asociación con el Mar "Enterrriense" (Del Río 1990; Aguirre y Farinati 1999). Martínez y Del Río (2002), sugieren que estos taxones no son los mismos que se encuentran actualmente en la Provincia Argentina, sino que la existencia de la Provincia Argentina está ligada al desarrollo de la Provincia Magallánica en tiempos post-Miocénicos, como consecuencia de los cambios neógenos en los patrones de paleocirculación oceánica (desarrollo de la Corriente Circumpolar Antártica y Corriente de Malvinas ca 15 a ca 6 Ma atrás, ver: Barker *et al.* 1982; Crame 1999, 2000), momento en el que se formaron y permanecieron con modificaciones menores hasta hoy. La propagación de las aguas más frías asociadas a la corriente de Malvinas hacia el norte provocó la extinción de esta fauna tropical en la costa patagónica (Aguirre y Farinati 1999; Martínez y Del Río 2002), dejando nuevos nichos disponibles para la colonización o expansión de nuevos taxones en la zona, como *P. abbreviata* y por su estrecha asociación tal vez también *M. arrokeana*. Trovant *et al.* 2013, utilizando marcadores moleculares mitocondriales (COI) y nucleares (28S e ITS), también encontraron bajos niveles de diferenciación genética entre las poblaciones del mejillín *Brachidontes purpuratus* ($F_{st} < 1$) a lo largo de la Provincia Magallánica - 5 poblaciones desde Puerto Madryn hasta el Canal de Beagle. El análisis de AMOVA realizado por Trovant *et al.* (2013) mostró un perfil característico de especie en reciente expansión. La expansión de poblaciones de zonas restringidas (refugios), en hábitats marinos recientes o nuevos es usualmente empleada como explicación en la pérdida de la estructura genética en peces e invertebrados que viven cerca de la costa (Sotka *et al.* 2004; Kelly y Palumbi 2010, Real *et al.* 2004, Trovant *et al.* 2013).

Como se ha indicado en el capítulo 5, debe existir algún mecanismo de regulación denso dependiente durante la maduración en la población de *M. arrokeana*, tal vez mediado por alguna sustancia química que inhiba el desarrollo entre los individuos. Curiosamente los resultados de esta tesis mostraron que los tres casos en que más de un nemertino fue encontrado por *P. abbreviata*, estos individuos correspondían a las muestras con un número proporcionalmente mayor de haplotipos raros (maduros-comunes, indeterminados-raros) (Fig. 6.1). Aunque esta suposición está basada en un número bajo de ejemplares indeterminados, además de los factores

mencionados anteriormente, posiblemente podría estar actuando una selección de haplotipos sobre estas poblaciones, seleccionando preferencialmente aquellos haplotipos comunes para fijarse en la población. Los futuros estudios, como el análisis de más casos de múltiples muestras en una sola *P. abbreviata*, en combinación con el análisis de marcadores altamente variables (por ejemplo, microsatélites), ayudará a dilucidar si existen presiones de selección que afectarían a estas poblaciones de *M. arrokeana*.

Discusión general de los resultados

Discusión general de los resultados.

A través de los estudios realizados en esta tesis doctoral, se ha avanzado considerablemente sobre el poco conocimiento que se tenía de la relación entre el nemertino *Malacobdella arrokeana* y su hospedador el bivalvo gigante *Panopea abbreviata* en los golfos norpatagónicos. Ambas especies son endémicas del Mar Argentino y representan un patrimonio biológico de nuestra diversidad. El estudio conjunto y las nuevas técnicas aplicadas en este estudio proporcionan una nueva mirada sobre la relación entre estas dos especies con hábitos de vida intensamente relacionados. Cabe destacar que la especie *Malacobdella arrokeana* fue descrita hace poco más de 10 años (Ivanov *et al* 2002), por lo que la creación de conocimiento de esta especie es importante para comparaciones con sus congénere del hemisferio norte, muchos de los cuales también son comensales de bivalvos de interés comercial, causando efectos negativos sobre sus hospedadores (Thiel y Zubillaga 2004; García y Anadón 2004).

Entre los resultados más relevantes de este trabajo, se pudo corroborar mediante técnicas moleculares y el esfuerzo conjunto con investigadores extranjeros, la gran divergencia nucleotídica (entre 10, 4% y 11,6%) que existe entre tres especies del género *Malacobdella* ampliamente distribuidas en otras regiones del mundo. A su vez se observó que *M. arrokeana* y *M. japonica* están más relacionadas genéticamente (grupos hermanos), que con respecto a *M. grossa*, la especie más cosmopolita del género. Esta caracterización genética permitió corroborar la validez de los caracteres morfológicos utilizados para la identificación - músculo retractor de la probóscide y posición de comisura nerviosa - verificando la utilidad del código de barras genético para este género y la necesidad de aplicar una taxonomía integradora en la delimitación de especies en nemertinos (Sunberg *et al.* 2010; Strand y Sunberg 2005 a; Strand y Sunberg 2011; Sunberg *et al.* 2009 a; Puerta *et al.* 2010; Mahon *et al.* 2010, Capítulo 3)

Los estudios de dieta y ecología trófica en ambas especies, con métodos directos (contenido estomacal, observación de eventos de alimentación) e indirectos (proporción de isótopos estables de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) (capítulo 4), se

realizaron con el fin de conocer la composición dietaria, teniendo en cuenta que si *M. arrokeana* se alimentara directamente del tejido de *P. abbreviata* (parásito), el $\Delta \delta^{15}\text{N}_{\text{s-h}}$ sería mayor a uno (según modelo planteado por Olive *et al.* 2003), y en el análisis de contenido estomacal deberían encontrarse porciones de tejido del hospedador. En base a los resultados obtenidos a través de la integración de ambos métodos, se pudo confirmar que *M. arrokeana* y *P. abbreviata* comparten el mismo nivel trófico (solapamiento SEA_B mayor al 60%, Fig. 4.11), además se vio que ambas especies comparten los mismos ítems alimenticios (diatomeas, pequeñas microalgas, pequeños crustáceos) y son consumidores omnívoros, con hábitos típicos de organismos suspensívoros filtradores.

Los métodos de alimentación aquí mostrados ("cepillado branquial" y contracciones musculares de la faringe), no parecen ser mecanismos que provoquen un daño al hospedador, sino que podrían ser beneficiosos, ya que el huésped podría consumir organismos perjudiciales para el bivalvo (bacterias, hongos, nematodos, etc). *Panopea abbreviata* es hospedador de varios tipos de organismos parásitos (Vazquez 2012), desde algas verdes (*Coccomyxa parasitica*, Vazquez *et al.* 2010), hasta platelmintos turbelarios como la especie *Paravortex panopea* (Brusa *et al.* 2011)

Teniendo en cuenta la posición en la cual fue registrada *M. arrokeana* dentro de la cavidad paleal, la morfología de las branquias de *P. abbreviata* del tipo C (1) - gran superficie y la presencia del canal alimenticio (Signorelli y Alfaya 2014) - es posible que *M. arrokeana* se alimente de las partículas de alimento adheridas a las láminas branquiales, utilizando el movimiento de cepillado branquial y atrapando partículas por medio de las papilas de la probóscide. La presencia de individuos indeterminados adheridos a las láminas branquiales en los casos de infecciones múltiples y la alimentación antes mencionada, pone de manifiesto que las branquias de *P. abbreviata* son de vital importancia en el desarrollo de *M. arrokeana* ya que ésta usa las branquias de su hospedador como refugio y fuente de alimento cuando es juvenil, para luego migrar al manto donde se alimenta y se reproduce. Hay que tener en cuenta que *M. arrokeana* si bien no se alimenta directamente de *P. abbreviata* si lo hace de su alimento, lo cual podría provocar algún efecto negativo indirecto en las poblaciones de *P. abbreviata*, aunque lamentablemente

no se encontraron poblaciones de hospedador libres de *M. arrokeana* para realizar comparaciones (Teso *et al.* 2006; Vázquez *et al.* 2009). El poco porcentaje de hospedadores libres que se registro en este trabajo (1,7%, capítulo 5), no fue suficientemente representativo para llevar a cabo ninguna comparación estadística. Sin embargo, las densidad poblacional y tasa de crecimiento, realizadas en las mismas poblaciones de *P. abbreviata* en la zona de estudio, no mostraron ninguna señal de daño al menos a nivel poblacional en los últimos años (Morsan y Ciocco 2004; Morsan *et al.* 2010; Gonzalez *et al.* 2010, Zaidman *et al.* 2012, Morsan com. pers) (Capítulo 4)

En cuanto a la reproducción, *M. arrokeana* (Capítulo 5), presenta un ciclo reproductivo con liberaciones de gametas todo el año y un evento de liberación de gametas más acentuado en el mes de septiembre (Fig. 5.7 y 5.11). Este ciclo está dividido en dos fases, la primera ligada al crecimiento y desarrollo de las gónadas, durante el periodo otoño-invernal, (con un aumento de la Lt de los individuos) y luego una etapa reproductiva propiamente dicha, en época primaveral donde las hembras y machos de *M. arrokeana* liberan sus gametas (septiembre octubre y noviembre), y su Lt disminuye considerablemente. La caída en la talla media (Lt), registrada durante la primavera, podría estar asociada a una incorporación de reclutas nuevos a la población (evento reproductivo de verano) y muerte de los individuos mayores después del evento de liberación de gametas (semelparidad).

A pesar que el análisis histológico de las gónadas no concuerde con una estrategia semélpara (atresia 100% en tallas mayores), la presencia de hospedadores sin huésped, la disminución de la talla después del desove y el rápido crecimiento de los juveniles (mayo - agosto) hasta la madurez sexual (agosto) (Fig. 5.7; 5.9 y 5.10), son características de especies semélparas. La semelparidad en nemertinos ha sido registrada en algunas especies (Riser 1974), especialmente en la especie *Tetrastema fozenzis* (García y Anadón 2004) y otras especies de nemertinos pelágicos (Norenburg y Roe 1998) (Capítulo 5).

Por otra parte, en los casos de multi-infecciones el hecho de que solo un individuo de *M. arrokeana* llegue a la madurez dentro de cada bivalvo, denota algún mecanismo de regulación durante el desarrollo de los mismos. La competencia por el alimento y el espacio no parece ser un motivo en este caso

debido al tamaño del hospedador y las altas tasas de filtración que supone, por lo que probablemente alguna señal química, por parte del individuo más maduro, inhiba el desarrollo de los demás individuos. La presencia de la toxina anabasina, aunque en una baja toxicidad, fue comprobada en *M. grossa*, proveniente de células glandulares (rabdites) presentes en el epitelio de la probóscide, (Kem 1970, 1971; Kem *et al.* 1985). Las células glandulares encontradas en las papilas de la probóscide de *M. arroekana* (Capítulo 4), tal vez podrían ser las productoras de estas toxinas o alguna otra, que podrían estar presente en individuos maduros de *M. arroekana* (Kem com. pers.), aunque no se han efectuado análisis para detectar la calidad de las secreciones producidas por estas glándula. Este tipo de regulación densodependiente, fue reportada en numerosas infestaciones de parásitos como es el caso del cestode *Hymenolepis diminuta* parasito del coleóptero *Tribolium confusum* (Wisnivesky 2003).

El registro del desarrollo larval de *M. arroekana* en condiciones de laboratorio fue realizado por primera vez en este trabajo (Fig 5.13 y 5.15), así como el planteo de las posibles estrategias de asentamiento de las larvas. Se logró obtener una larva de planuliforme de al menos cuatro semanas, para la cual se describieron los estadios y las estructuras larvales. Los resultados obtenidos coincidieron con otros hoplonemertinos estudiados, y también con el trabajo realizado por Hammersten (1918) en *M. grossa*.

La metamorfosis completa de las larvas no pudo lograrse, aunque este hecho es muy común cuando se realizan estudios similares, como el caso de *M. grossa* (Hammersten 1918) y *Carcinimerte errans* (Dunn 2011), atribuyendo el fallido a diferencias morfológicas entre las larvas criadas en cautiverio y las larvas en condiciones naturales. La posible falla en el asentamiento y metamorfosis de las larvas de *M. arroekana* tal vez este dado en parte, por los motivos explicados por los otros autores, ya que no pudo compararse la morfología con larvas naturales, o por la falta de sustrato adecuado para el asentamiento (hospedador). Este hecho indicaría la presencia de alguna señal química por parte del hospedador, que provocaría el asentamiento de las larvas, y también explicaría la alta especificidad vista en *M. arroekana* con respecto a su hospedador.

En base a las características de la masa ovigera de *M. arrokeana* (flotabilidad negativa, recubrimiento pegajoso), la posición en la que ésta se aloja en la cavidad del manto de *P. abbreviata* (cerca de las branquias) y la cantidad de individuos de *M. arrokeana* registrados en un solo hospedador, se proponen dos estrategias complementarias de asentamiento larval: 1) reingreso de las larvas luego de la fecundación externa (exógenas) al mismo hospedador o a otro diferente, lo que explicaría la gran dispersión y 2) una fecundación interna y posterior asentamiento y desarrollo de las larvas dentro del bivalvo en donde se produjo el desove (endógenas). Esta estrategia de concentrar las gametas en lugares reducidos se conoce como comportamiento gregario y es común en muchos invertebrados y también fue visto en varias especies de nemertinos con fecundación externa (Bierne 1983; Roe 1993; Stricker *et al.* 2001; Thiel y Junoy 2006). Este mecanismo, explicaría la diferencia en los porcentajes de multiinfecciones elevados en dos etapas del año diferentes (mayo y febrero) además de la ventaja evolutiva que la protección de los huevos le confiere a esta especie con tan alta afinidad con el hospedador (Levitan 1995; Thiel y Junoy 2006). Particularmente, este comportamiento fue observado en la especie *Vieitezia luzmurubeeae*, un hoplonemertino que utiliza el atrio de la ascidia *Ciona intestinalis*, para depositar sus huevos (Junoy *et al.* 2010).

Con los primeros marcadores moleculares para *M. arrokeana*, (ADNmt COI, ADNr 16S e ITS2) aislados en esta tesis, se realizó la caracterización genética de las poblaciones de *M. arrokeana* de los golfos norpatagónicos (GSM, GSJ y GN). Los resultados muestran que estas poblaciones son genéticamente homogéneas ($F_{st} = 0$) para los marcadores moleculares utilizados, siguiendo la tendencia observada para otras poblaciones de nemertinos (Rogerts *et al.* 1998; Sundberg y Strand (2007); Thornhill *et al.* 2008) (Capítulo 6).

Al observar la homogeneidad genética se evidencia que el límite entre las provincias biogeográficas Magallánica y Argentina no constituiría una barrera natural al flujo génico para las poblaciones de *M. arrokeana*, entre los golfos norpatagónicos. El intercambio de masas de agua entre el GSM y el GSJ, está gobernado por la formación de dos vórtices contracorriente, uno dentro del GSJ y otro al sur del GSM llamados *jets* (Amoroso y Gagliardi 2010).

La formación de estos *jets* provoca el intercambio de las aguas entre ambos golfos y arrastra grandes cantidades de partículas por largas distancias desde el GSJ hacia el GSM (Amoroso y Gagliardi 2010, Amoroso 2012).

Si bien no se ha comprobado la conectividad entre las aguas del GN y las del GSM y GSJ, los regímenes de circulación en el GN están dominados por la acción de los vientos (Tonini 2010), que en la región patagónica son preponderantes del oeste. La circulación sobre la plataforma continental está dominada en parte por la “Corriente Patagónica” (Piola y Rivas 1997), que es una corriente que circula sobre la plataforma continental, transportando aguas de menor salinidad desde el Estrecho de Magallanes en dirección Norte (Brandhorst y Castello, 1971). Teniendo en cuenta los patrones de circulación de las corrientes y el tiempo de vida media de las larvas de *M. arrokeana* (4 semanas) es probable que estas larvas se dispersen entre los golfos GN, GSM y GSJ.

En base a los resultados de las distribuciones “*mismatch*”, las poblaciones de *M. arrokeana* estudiadas muestran un patrón de población en expansión o bajo selección (Fig. 6.2). Los patrones de expansión reciente a lo largo de la provincia Magallánica han sido observado para otras especies de invertebrados en la zona de estudio (Real *et al.* 2004, de Aranzamendi *et al.* 2011, Trovant *et al.* 2013). También, algún proceso de selección podría estar actuando sobre los haplotipos / genotipos más frecuentes, fenómeno observado en los casos de múltiple infección por parte de individuos indeterminados de *M. arrokeana* en un solo individuo de *P. abbreviata*. Un balance entre selección, dispersión e historia demográfica es lo más sugerido para explicar los patrones de diversidad genética a través de gradientes ambientales (Sotka y Palumbi, 2006; Kelly y Palumbi, 2010, Trovant *et al.* 2015). Esto podría contribuir al empobrecimiento de la variabilidad genética poblacional. Sin embargo habría que contar con un mayor número de individuos indeterminados para confirmar esta teoría. El estudio de la genética poblacional de *M. arrokeana* y la diversidad genética de tres especies presentados en esta tesis corresponde al primero y más completo trabajo realizado con marcadores moleculares del género *Malacobdella* hasta ahora.

M. arrokeana encuentra en su hospedador un refugio seguro donde reproducirse y desarrollarse, ya que teniendo en cuenta su asentamiento

complementario (dentro del hospedador), se asegura la supervivencia de la progenie. Este mecanismo le proporciona mayor eficiencia durante la fecundación, sin embargo la fase de larva planctónica mas allá de tener características de larvas de nemertinos parásitos (no se alimenta, desarrollo de estructura de fijación), posee una gran capacidad de dispersión. Las larvas que se asientan ya sea por uno u otro mecanismo, encuentran en las branquias del hospedador un lugar seguro y con alimento donde desarrollarse, este tipo de comportamiento también fue documentado en especies de nemertinos con características parasitarias (*Carcinonemertes*).

Si bien *M. arrokeana* comparte características de parásito y simbiote, en esta tesis se propone a *M. arrokeana* como una relación comensal del bivalvo *P. abbreviata*.

Conclusiones

Conclusiones

- El uso del marcador molecular citocromo oxidasa I (COI) demostró ser una herramienta confiable en la diferenciación genética de *Malacobdella arrokeana*, *M. japonica* y *M. grossa* (porcentaje de divergencia entre 10,6 y 11,4%). A su vez permitió conocer por primera vez las relaciones filogenéticas de las tres especies del género y corroborar la validez de algunos caracteres morfológicos como herramientas para la delimitación taxonómica de las mismas. Por otro lado, demostró la necesidad de utilizar una taxonomía integradora (caracteres morfológicos y genéticos), para una identificación segura en nemertinos.

- Se registró a los ejemplares *M. arrokeana* adheridos al manto del hospedador por medio de su ventosa terminal, mientras que los ejemplares pequeños, presentes en los casos de multiinfección, se alojan entre las láminas branquiales. La probóscide *M. arrokeana* está compuesta por papilas formadas por dos tipos de células glandulares diferentes. En la superficie de las papilas se observan poros en toda su extensión que le ayudaría en la captura del alimento. Se observó que *M. arrokeana* interacciona con las láminas branquiales de *P. abbreviata* realizando un cepillado con la parte anterior (boca). Teniendo en cuenta la morfología de las branquias de *P. abbreviata*, las características y tamaño de las papilas de la probóscide y de la faringe, el tipo de alimento ingerido y que no se alimenta del tejido del hospedador, se propone que *M. arrokeana* se alimenta mayormente de las partículas adheridas en las láminas branquiales y del alimento en suspensión que ingresa con la corriente de agua, mediante el uso de la probóscide sin perjuicio directo aparente sobre el hospedador.

- Tanto *M. arrokeana* como *P. abbreviata* son consumidores planctónicos omnívoros, comparten los mismos ítems alimenticios (microalgas, diatomeas y pequeños crustáceos) y deben ser considerados consumidores del mismo nivel trófico.

- *Malacobdella arrokeana* posee un ciclo reproductivo caracterizado por periodos de desove a lo largo de todo el año, pero con un pico marcado en la primavera (septiembre). El ciclo anual está dividido en dos partes, una de desarrollo gonadal y aumento de la talla media (Lt), durante el otoño – invierno

(4 meses), y otro de reproducción propiamente dicho, con una disminución de la Lt y un desove de la mayoría de los individuos.

- La caída de la talla media (Lt) de los individuos en el mes posterior del desove y el aumento gradual de la Lt, durante los meses de primavera – verano, podrían indicar una estrategia semelpara de reproducción.

- Se logró obtener por primera vez una larva de *M. arrokeana* de 30 días de desarrollo, con características de una típica larva de hoplonemertino. Se pudieron identificar estructuras y etapas del desarrollo embrionario, aunque no se consiguió la metamorfosis ni el asentamiento de la misma.

- Se proponen dos estrategias de asentamiento larval, 1) proveniente de las larvas originadas en la columna de agua (exógenas) y posterior reingreso al mismo hospedador o a otro distinto, lo que explicaría la dispersión y, 2) una formación de larvas (endógenas) producidas por la fecundación dentro del hospedador y posterior asentamiento inmediato dentro del mismo, lo que explicaría la mayor proporción de multiinfecciones observada durante los meses de mayo y febrero.

- El análisis de la variabilidad genética realizado con tres marcadores moleculares (COI, 16S e ITS2), demostró la falta de estructura genética entre las poblaciones de *M. arrokeana* que habitan los golfos norpatagónicos (San Matías, San José y Nuevo), demostrando la ausencia de barreras naturales al flujo génico en la zona, debido a las características oceanográficas reinantes (fuertes vientos, grandes mareas, frentes oceánicos, la formación de *jets* y corrientes oceánicas locales), lo que provocaría la gran dispersión de sus larvas. Además, un posible proceso de selección sobre los haplotipos comunes encontrados, también podrían contribuir a la falta de variabilidad.

- Se propone que *M. arrokeana* presenta una relación comensal con *P. abbreviata*. Sin embargo, a lo largo de este estudio se pudo observar que *M. arrokeana* posee características de comensal - dieta y posición trófica, estructura de la probóscide - pero también características de nemertinos parásitos: larva de vida corta, gónadas grandes, gran producción de gametas, semelparidad, alto porcentaje de prevalencia e intensidad y especificidad en la elección del hospedador.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre E.P. (2007). El flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares. En: Ecología Molecular, Eguiarte L.E., Souza V., Aguirre X. (eds), México D.F., UNAM pp 49-62.
- Aguirre M.L. y Farinati E.A. (1999). Paleobiogeografía de las faunas de moluscos marinos del Neógeno y Cuaternario del Atlántico Sudoccidental. Revista de la Sociedad Geológica de España 12:93-112.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (1994). Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Science.
- Alfaya J.E.F., Bigatti G., Machordom A. (2013). Mitochondrial and nuclear markers reveal a lack of genetic structure in the entocommensal nemertean *Malacobdella arrokeana* in the Patagonian gulfs. Helgoland Marine Research, 67 (2), 407-412
- Alvarez-Castañeda S. T. y Patton J. L. (2004). Geographic genetic architecture of pocket gopher (*Thomomys bottae*) populations in Baja California, Mexico. Molecular Ecology, 13: 2287-2301
- Amoroso R (2004). Heterogeneidad espacial en la dinámica de la metapoblación de vieira tehuelche (*Aequipecten tehuelches*) del Golfo San José. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de la Patagonia, San Juan Bosco, 55 pp.
- Amoroso R. O. (2012). Dinámica poblacional de una metapoblación explotada y sus implicaciones para el desarrollo de estrategias robustas de manejo: El caso de la vieira tehuelche (*Aequipecten tehuelchus*) del golfo San José (Chubut, Argentina). Tesis Doctoral Universidad del Comahue. pp 289
- Amoroso R.O. y Gagliardini D.A. (2010). Inferring complex hydrographic processes using remote-sensed images: turbulent fluxes in the patagonian gulfs and implications for scallop metapopulation dynamics. Journal of Coastal Research 26(2):320-332.
- Andrade S.C.S., Norenburg J.L., Solferini V.N. (2011) Worms without borders: genetic diversity patterns in four Brazilian *Ototyphlonemertes* species (Nemertea, Hoplonemertea). Marine Biology 158:2109-2124.
- 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 28:141-159.
- Asakawa M., Toyoshima T., Shida Y., Noguchi T., Miyazawa K. (2000). Paralytic toxins in a ribbon worm *Cephalothrix* species (Nemertean) adherent

- to cultured oysters in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan. *Toxicon* 38, 763–773.
- Atkins D. (1937). On the ciliary mechanisms and interrelationships of Lamellibranchia. *Quarterly Journal of the Microscopical Science*, (n.s.),79(3): 375–421.
- Averbuj A. y Penchaszadeh P.E. (2010). Reproductive seasonality, spawn and development of the nasarid whelk *Buccinanops cochlidium* (Dillwyn, 1817) in Golfo San José (Patagonia, Argentina). *Journal of Molluscan Studies*, 76: 25-32.
- Avise J.C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA. 447 p.
- Avise J.C. (2004). *Molecular Markers, Natural History, and Evolution (Second Edition)*. Sinauer, Sunderland, MA. (684 pp.).
- Ax P. (1996). *Multicellular Animals, Volume I. A New Approach to the Phylogenetic Order in Nature*. Springer-Verlag, Berlin.
- Ball S.L., Hebert P.D.N., Burian S.K., Webb J.M. (2005). Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *Journal of the North American Benthological Society* 24:508-524.
- Barker P.F., Hill I.A., Weaver S.D., Pankhurst R.J. (1982). The origin of the eastern South Scotia Ridge as an intraoceanic island arc. En *Anctartic Geoscience Symposium on Anctartic Geology and Geophysics*, Craddock C. (ed.). Madison: University of Wisconsin Press pp. 203-211.
- Berg G. y Gibson R. (1996). A redescription of *Nemertosclex parasiticus* Greeff, 1879, an apparently endoparasitic heteronemertean from the coelomic fluid of the echiuroid *Echiurus echiurus* (Pallas). *Journal Natural History* 30: 163-173.
- Bertness M.D. y Leonard G.H. (1997). The Role of Positive Interactions in Communities: Lessons from Intertidal Habitats. *Ecology* 78:1976-1989.
- Bertness M.D., Leonard G.H., Levine J.M., Schmidt P.R., Ingraham A.O. (1999). Testing the relative contribution of positive and negative interactions in rocky intertidal communities. *Ecology* 80:2711-2726.
- Bierne J. (1983). Nemertina. En: Adiyodi K.G., Adiyodi R.G. (eds) *Reproductive biology of invertebrates: Oogenesis, oviposition and oosorption*. Wiley, London, 1: pp 147–167
- Blanchard E. (1847). Recherches sur l'organisarion des vers.-*Annales des sciences naturelles, Série 3.8*:1 19-149.

- Boone E.J., Boettcher A.A., Sherman T.D., O'Brien J.J. (2004). What constrains the geographic and host range of the rhizocephalan *Loxothylacus texanus* in the wild?. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 309:129-139.
- Boschi E. (2000). Species of decapod crustaceans and their distribution in the American marine zoogeographic provinces. *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero* 13:7-136.
- Brandhorst W. y Castello J. P. (1971), Evaluación de los recursos de anchoíta (*Engraulis Anchoita*) frente a la Argentina y Uruguay I: Las condiciones oceanográficas, sinopsis del conocimiento actual sobre la anchoíta y el plan para su evaluación, Proyecto de Desarrollo Pesquero. Serie de Informes Técnicos 29: 63 pp.
- Brant S.V. y Ortí G. (2003). Phylogeography of the Northern short-tailed shrew, *Blarina brevicauda* (Insectivora: Soricidae): past fragmentation and postglacial recolonization. *Molecular Ecology*, 12: 1435-1449.
- Bratley J., Campbell A., Bagnall A.E., Uhazy L.S. (1985). Geographic distribution and seasonal occurrence of the nemertean *Pseudocarcinonemertes homari* on the American lobster, *Homarus americanus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42:360-367.
- Brett M.T. y Müller-Navarra D.C. (1997) The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic food-web processes. *Freshwater Biology* 38: 483-499
- Bronstein JL (1994). Our current understanding of mutualism. *Quarterly Review of Biology* 69(1):31–51
- Brusa F., Vázquez N., Cremonte F. (2011). *Paravortex panopea* n. sp. (Platyhelminthes: Rhabdocoela) on clams from the northern Patagonian coast, Argentina: pathogeny and specificity. *Helminthology* 48, 94–100.
- Brusca R.C. y Brusca G.J. (2003). Nemertinos. En *Invertebrates* (2nd ed.). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. ISBN 978-0-87893-097-5
- Buonaccorsi V.P., McDowell J.R., Graves J.E. (2001). Reconciling patterns of inter-ocean molecular variance from four classes of molecular markers in blue marlin (*Makaira nigricans*). *Molecular Ecology*. 10: 1179-1196.
- Bush A.O., Fernandez J.C., Esch G.W., Seed J.R. (2001). *Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites*. Cambridge, Cambridge University Press, 566 pp.
- Cahu C.L., Cuzonf G., Quazuguel P. (1995). Effect of highly unsaturated fatty acids, cx-tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Comparative Physiology and Biochemistry*. 112: 417-424

- Cantell C.E. (1975) Anatomy, taxonomy, and biology of some Scandinavian heteronemertines of the genera *Lineus*, *Micrura*, and *Cerebratulus*. *Sarsia*, 58, 89–122.
- Cantell C.E. (1982) The anatomy and taxonomy of *Cerebratulus praealbescens* sp. n. (Nemertini) from the west coast of Sweden and Norway. *Sarsia*, 67, 11–20
- Charpy L.J. y Charpy-Roubaud C.J. (1980). La production primaire des eux du Golfe San José (Península Valdez, Argentina). III. Estimation de la production phytoplantonique annuelle. *Hydrobiologia* 75:225-229.
- 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.
- Cheng-Tze H., Shuh-Ji K., Chang-Feng D., Hwey-Lian H., Fuh-Kwo S., Rong-Quen J. (2007) Dietary separation between two blennies and the Pacific Gregory in northern Taiwan: evidence from stomach content and stable isotope analyses. *Marine Biology* 151: 729-736
- Chia F.S. (1978). Perspectives: settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae. In: Settlement and Metamorphosis of Marine Invertebrate Larvae. Chia FS, Rice ME, eds. pp. 283-285. Elsevier, New York.
- Ciocco N.F. (1991). La Pesquería de vieira tehuelche, *Chlamys tehuelcha* (d' Orb., 1846), del Golfo San José (Argentina): abundancia de clases anuales. *Scitia Marina*. 55: 569–575.
- Ciocco N.F. (1992). Differences in individual growth rate among scallop *Chlamys tehuelcha* (D'Orb. 1846) populations from the San José Gulf (Argentina): experiments with transplanted individuals. *Journal of Shellfish Research*. 11: 27–30.
- Ciocco N.F. (2000). Almeja Panopea, un nuevo recurso pesquero para el mar Argentino. En: Infopesca Internacional 6:36-39.
- Ciocco N.F. y Elías I. (2001). Explotación de la Almeja Panopea (*Panopea abbreviata*) en Chubut Consideraciones para su Manejo. G. S. Dirección General de Intereses Marítimos y Pesca Continental: Paola Ciccarone, Alberto Serdá Asociación de Pescadores Artesanales de Pto. Madryn: Pedro Oroquieta, Marta Piñeiro, CENPAT.
- Clement M., Posada D., Crandall K. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9:1657-1660.
- Coe W.R. (1902). The nemertean parasites of crabs. *The American Naturalist* 36:431-450.

- Coe W.R. (1943). Biology of the nemerteans of the Atlantic coast of North America. Transactions Connecticut Academy of Arts and Sciences 35:129-328.
- Coe W.R. (1945). *Malacobdella minuta*, a new commensal nemertean. Journal of the Washington Academy of Sciences 35:65-67.
- Coe W.R. (1989). Development of the pilidium of certain Nemerteans. Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences 10:235.
- Connell J.H. (1978). Diversity in tropical rain forests and coral reefs. Science 199: 1302-1310
- Connell J.H. (1980). Diversity and the coevolution of competitors, or the ghost of competition past. Oikos 35: 131-138
- Crame J.A. (1999). An evolutionary perspective on marine faunal connections between southernmost South America and Antarctica. Scientia Marina 63(1):1-14.
- Crame J.A. (2000). Evolution of taxonomic diversity gradients in the marine realm: evidence from the composition of recent bivalve faunas. Paleobiology 26:188-214.
- Crawley M.J. (2007) The R book. Wiley, Chichester
- Crisp D.J. (1974). Factors influencing the settlement of marine invertebrate larvae. In: Chemoreception in Marine Organisms. Grant PT, Mackie AM, eds. pp. 177-265. Academic Press, London.
- Dalyell J.G. (1853). The powers of the creator. Van Voorst, London, 327 pp.
- de Aranzamendi M.C., Bastida R., Gardenal C.N. (2011) Different evolutionary histories in two sympatric limpets of the genus *Nacella* (Patellogastropoda) in the South-western Atlantic coast. Marine Biology 158, 2405–2418.
- de la Serna de Esteban C. J. de la y Moretto H.J.A. (1968). Heteronemertea en la Bahía de Ushuaia. I. *Parborlasia fueguina* sp. nov. y *Huilikia ushuaiensis* gen. et sp. nov. Physis, Buenos Aires 28:171-181.
- de la Serna de Esteban C.J. de la y Moretto, H.J.A. (1969a). Un nuevo Heteronemertino con probóscide ramificada *Panorhynchus argentinensis* gen. et sp. nov. Ciencia e Investigación 25:166-171.
- de la Serna de Esteban C.J. de la y Moretto H.J.A. (1969). Heteronemertea en la Bahía de Ushuaia. II. *Wiotkenia friedrichi* gen. et sp. nov. Physis, Buenos Aires 28:371-379.
- de Niro M.J. y Epstein S. (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. Geochimica et Cosmochimica Acta. 42: 495-506

- Del Río C.J. (1990). Composición, origen y significado paleoclimático de la malacofauna 'Entrerriense' (Mioceno Medio) de la Argentina. *Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas Físicas y Naturales*. Buenos Aires 42:205-224.
- Deudero S., Pinnegar J.K., Poulain N.V. (2002). Insights into Wsh host–parasite trophic relationships revealed by stable isotope analysis. *Diseases of aquatic organisms* 52(1):77-86.
- Doucett R.R., Giberson D.J., Power G. (1999). Parasitic association of *Nanocladius* (Diptera: Chironomidae) and *Pteronarcys biloba* (Plecoptera: Pteronarcyidae): insights from stable-isotope analysis. *Journal of the North American Benthological Society* 18:514-523.
- Dubois S., Orvain F., Marin-Léal J.C., Ropert M., Lefebvre S. (2007) Small-scale spatial variability of food partitioning between cultivated oysters and associated suspension feeding species, as revealed by stable isotopes. *Marine Ecology Progress Series*. 336: 151-160
- Duffy D.C. y Jackson S. (1986) Diet studies of seabirds: a review of methods. *Colon waterbirds* 9: 1-17
- Dunn P.H. (2011). Larval Biology and Estuarine Ecology of the Nemertean Egg predator *Carcinonemertes errans* on the Dungeness Crab, *Cancer magister*. Tesis Doctoral, University of Oregon, USA. pp 166
- Eernisse D.J., Albert, J.S., Anderson, F.E. (1992). Annelida and Arthropoda are not sister taxa: a phylogenetic analysis of spiralian metazoan morphology. *Systematic Biology*. 41: 305–330.
- Egan E.A. (1984a). The seasonal reproductive cycle of the nemertean *Gononemertes australiensis* Gibson in relation to that of its ascidian host, *Pyura pachydermatina* (Herdman). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 76:225-246.
- Egan E.A. y Anderson D.T. (1979). The reproduction of the entozoic nemertean *Gononemertes australiensis* Gibson (Nemertea: Hoplonemertea: Monostylifera) Gonads, gametes, embryonic development and larval development. *Australian Journal of Marine & Freshwater Research* 30:661-681.
- Eguiarte L. E. (1999). Una Guía para Principiantes a la Genética de Poblaciones. En: J. Núñez Farfán y L. E. Eguiarte (eds.) *La Evolución Biológica*. México, D.F., UNAM: pp: 35-50.
- Elbourne P.D. y Clare A.S. (2010). Ecological relevance of a conspecific, waterborne settlement cue in *Balanus amphitrite* (Cirripedia). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 392:99-106.

- Envall M. (1997). General problems in estimating nemertean relationships on ribosomal sequence data—an example using six monostyliferous species and mitochondrial 16S rDNA. *Hydrobiologia* 365: 19–31.
- Envall M., Sundberg P. (1998). Phylogenetic relationships and genetic distances between some monostyliferous interstitial nemerteans (Ototyphlonemertes, Hoplonemertea, Nemertea) indicated from the 16S rRNA gene. *Zoological Journal of Linnean. Society.* 123: 105–115.
- Excoffier L., Smouse P. E., Quattro J. (1992). Analysis of Molecular Variance Inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier L. y Lischer H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564-567.
- Felsenstein J. (1973). Maximum Likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Systematic Zoology*, 22: 240-249.
- Fernández-Alvarez F.Á. y Anadón N. (2012). *Oligodendrorhynchus hesperides* gen. et sp. n. (Heteronemertea) from the Bellingshausen Sea. *Polish Polar Research* 33(1): 81–98
- Fernández-Álvarez FÁ, Machordom A (2013) DNA barcoding reveals a cryptic nemertean invasion in Atlantic and Mediterranean waters. *Helgoland Marine Research* 67: 599-605
- Fleming L.C. y Gibson R. (1981). A new genus and species of monostyliferous hoplonemerteans, ectohabitant on lobsters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 52:79-93.
- 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.
- Gagliardini D.A. y Rivas A.D. (2004). Environmental characteristics of San Matías Gulf obtained from LANDSAT-TM and ETM+ DATA. *Gayana* 68:186-193.
- García-Pérez, J.A. y Anadón, N. (2004). Seasonal abundance and reproductive strategy of *Tetrastemma fozensis* Gibson and Junoy, 1991 (Hoplonemertea, Nemertea) in the Villaviciosa estuary (Asturias, Northern Spain). *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* 60: 581-586
- García Villalobos L.L. (2009). Ciclo reproductivo de la almeja *Panopea abbreviata*, en el golfo San José (Chubut, Argentina). Tesis de

- Licenciatura, Universidad Nacional de la Patagonia, San Juan Bosco. Puerto Madryn. pp 48.
- Gibson R. (1968). Studies on the biology of the entocommensal rhynchocoelan *Malacobdella grossa*. Journal of Marine Biology Association United Kingdom 48:637-656.
- Gibson R. (1974). A new species of commensal hoplonemertean from Australia. Zoological Journal of the Linnean Society 55:247-266.
- Gibson R. (1994). Nemerteans: synopses of British fauna. Dorchester, UK: The Dorset Press. 224 pp.
- 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. y Jennings J.B. (1967). Occurrence of the entocommensal rhynchocoelan, *Malacobdella grossa*, in the oval Piddock, *Zirfaea crispata*, on the Yorkshire coast. Journal of Marine Biology Association United Kingdom 47:301-317.
- Gibson R. y Jennings J.B. (1969). Observations on the diet, feeding mechanisms, digestion and food reserves of the entocommensal rhynchocoelan *Malacobdella grossa*. Journal of Marine Biology Association United Kingdom 49:17-32.
- Gibson R. y Egan E. (1976). Some histochemical observations on digestive and other enzymes of the entozoic hoplonemertean *Gononemertes australensis* Gibson, with comments on its possible feeding behaviour. Journal of experimental marine biology and ecology. 24: 285–296.
- Gibson R., Junoy J. (1991). A new species of *Tetrastemma* (Nemertea: Enopla: Monostiliferoidea) from Ría de Foz, northwestern Spain, found living in the mantle cavity of the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*. Zoological Journal of Linnean Society. 103: 225–240.
- Gilg M.R. y Hilbish T.J. (2003). The geography of marine larval dispersal: coupling genetics with fine-scale physical oceanography. Ecology 84:2989-2998.
- Gillespie J. H. (1998). Population Genetics, A Concise Guide. USA, The Johns Hopkins University Press.
- Giribet G., Carranza S., Baguña J., Riutort M., Ribera C. (1996). First molecular evidence for the existence of a Tardigrada + Arthropoda clade. Molecular Biology and Evolution. 13: 76–84.

- Glorioso P.D. y Flather R.A. (1997). The Patagonian shelf tides. *Progress in Oceanography* 40:263-283.
- González R., Narvarte M., Verona C. (Editores). (2010). Principios, lineamientos generales y procedimientos para la elaboración, adopción, implementación, evaluación y revisión de los Planes de Manejo Ecosistémico para la pesca marítima de captura en el Golfo San Matías. ECOPEs (Iniciativa para un Ecosistema Pesquero Sustentable). Instituto de Biología Marina y Pesquera Almirante Storni. Universidad Nacional del Comahue. 170p.
- Goropashnaya A. V., Fedorov V. B., Seifert B., Pamilo P. (2004). Limited phylogeographical structure across Eurasia in two red wood ant species *Formica pratensis* and *F. lugubris* (Hymenoptera, Formicidae). *Molecular Ecology*, 13: 1849-1858
- Hadfield M.G. y Koehl M.A.R. (2004). Rapid behavioral responses of an invertebrate larva to dissolved settlement cue. *The Biological Bulletin (Woods Hole)* 207:28-43.
- Hammarsten O.D. (1918). Beitrag zur Embryonalentwicklung der *Malacobdella grossa* (Müll.), Inaugural dissertation, Zootomischen Institut der Hochschule zu Stockholm, Almqvist & Wiksells Boktryckeri A. B., Uppsala.
- Harpending R. C. (1994). Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66: 591-600.
- Hartl D. L. y Clark A. G. (1997). *Principles of Population Genetics*, Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.
- Härlin M. y Härlin C., (2001). Phylogeny of the eurentic nemertean revisited. *Zoological Scripta*. 30: 49–58.
- Härlin M.S. y Sundberg P., (1995). Cladistic analysis of the eurentic nemertean (Nemertea: Hoplonemertea). *Invertebrate Taxonomy* 9: 1211–1229.
- Hebert P.D.N., Ratnasingham S., de Ward J.R. (2003a). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 270:596-599.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., de Waard J.R. (2003b). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 270:313-321.
- Hebert P.D.N., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H., Hallwachs W. (2004). Ten species on one: DNA barcoding reveals species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS* 101:14812–14817.

- Hedrick W. (2000). *Genetics of Populations*. USA, Jones and Bartlett Publishers, Inc.
- Hendry A.P. y Berg, O.K. (1999). Secondary sexual characters, energy use, senescence, and the cost of reproduction in sockeye salmon. *Canadian Journal of Zoology* 77, 1663–1675.
- Herre E.A., Knowlton N., Mueller U.G., Rehner S.A. (1999). The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends Ecology and Evolution* 14(2):49–53
- Hillis D.M. y Dixon M.T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology* 66(4):411-453.
- Hixon M.A. (1991) Predation as a process structuring coral reef fish communities. En: *The Ecology of Fishes on Coral Reefs*. Sale P (ed), Academic Press, Inc. San Diego, CA, pp 475-508
- Huelsenbeck J.P. (2000). *MrBayes*: Bayesian inference of phylogeny. University of Rochester, Department of Biology, Rochester.
- Huelsenbeck J.P. y Ronquist F. (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Hughes R.N. (1993) *Diet Selection: an Interdisciplinary Approach to Foraging Behaviour*. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Humes A.G. (1942). The morphology, taxonomy and bionomics of the nemertean genus *Carcinonemertes*. *Illinois biological monographs* 18:1-105.
- Hyslop E.J. (1980) Stomach contents analysis, a review of methods and their application. *Journal of Fish Biology* 17: 411-429
- Ivanov V.A., Bigatti G., Penchaszadeh P.E., Norenburg J.L. (2002). *Malacobdella arrokeana* (Nemertea: Bdellonemertea), a new species of nemertean from the Southwestern Atlantic Ocean entocommensal in *Panopea abbreviata* (Bivalvia, Heterodonta, Hiatellidae) in Argentina. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 115:359-367.
- Jackson A.L., Inger R., Parnell A., Bearhop S. (2011). Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER— Stable Isotope Bayesian Ellipses R. *Journal of Animal Ecology*.
- Jackson M.C., Donohue I., Jackson A.L., Britton J.R., Harper D.M., Grey J. (2012). Population-level metrics of trophic structure based on stable isotopes and their application to invasion ecology. *PLoS One* 7:e31757
- Jennings J.B. y Calow P. (1975). The relationship between high fecundity and the evolution of parasitism. *Oecologia* 21:109-115.

- Jensen K. y Sadeghian P.S. (2005). Nemertea. En: Marine parasitology, Rohde K. (ed), Australia pp. 205-210.
- Junoy J., Andrade S.C.S., Giribet G. (2010). Phylogenetic placement of a new hoplonemertean species commensal of ascidians. *Invertebrate Systematics*. 24: 616–629.
- Kajihara H., Chernyshev A.V., Sichun S., Sundberg P., Crandall F. (2008). Checklist of nemertean genera and species (Nemertea) published between 1995 and 2007. *Species Divers* 13:245-274.
- Kelly R.P. y Palumbi S.R. (2010) Genetic structure among 50 species of the Northeastern Pacific rocky intertidal community. *PLoS ONE* 5(1):e8594
- Kem W. R. (1970). A study of the occurrence of anabaseine in *Paranemertes* and other nemertines. *Toxicon* 9:23-32.
- Kem W. R., Abbott B. C., Coates R. M. (1971). Isolation and structure of a hoplonemertine toxin. *Toxicon* 9:15-22
- Kem W. R. (1985). Structure and action of nemertine toxins. *American Zoologist*. 25: 99–111.
- Kennel J. von. (1877-78). Beiträge zur Kenntniss der nemertinien. *Arb Zool. Zoom. Inst. Würzburg*. Bd (4) 305-381.
- Kimura M. (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217: 624-626.
- Koehl M.A.R. y Hadfield M.G. (2010). Hydrodynamics of larval settlement from a larva's point of view. *Integrative and Comparative Biology* 50:539-551.
- Kozloff E.N. (1991). *Malacobdella siliquae* sp. nov. and *Malacobdella macomae* sp. nov., commensal nemerteans from bivalve mollusks on the Pacific coast of North America. *Canadian Journal of Zoology* 66:1612-1618.
- Kuris A.M. (1978). Life cycle, distribution, and abundance of *Carcinonemertes epialti*, a nemertean egg predator of the shore crab, *Hemigrapsus oregonensis*, in relation to host size, reproduction, and molt cycle. *Biological Bulletin (Woods Hole)* 154:121-137.
- Kuris A.M. (1991). A review of patterns and causes of crustacean brood mortality. En: A. M. Wenner & A. M. Kuris (ed.) *Crustacean Egg Production, Crustacean Issues* 6, Balkema, Rotterdam, pp. 117-141.
- Kuris A. M. (1993). Life cycles of nemerteans that are symbiotic egg predators of decapod Crustacea: adaptations to host life histories. *Hydrobiologia* 266:1-14.
- Kuris A.M., y Wickham, D.E. (1987). Effect of nemertean egg predators on crustaceans. *Bulletin of marine science*, 41(2), 151-164.

- Kvist S, Laumer CE, Junoy J, Giribet G (2014) New insights into the phylogeny, systematics and DNA barcoding of Nemertea. *Invertebrate Systematic* 28: 287–308
- Layman C., Araújo M., Boucek R., Hammerschlag-Peyer C., Harrison E., Jud Z.R., Matich P., Rosenblatt A., Vaudo J., Yeager L., Post D., Bearhop S. (2012). Applying stable isotopes to examine food-web structure: an overview of analytical tools. *Biological Reviews* 87, 545–562.
- Levitan D.R. (1995). The ecology of fertilization in free-spawning invertebrates. En: McEdward L, (ed). *Ecology of marine invertebrate larvae*. Boca Raton, FL: CRC Press. p 123–156.
- Long J.C. (1986). The allelic correlation structure of Gainj -and Kalam- speaking people. I. The estimation and interpretation of Wright's F-statistics. *Genetics* 112:629-647.
- Machordom A., Araujo R., Erpenbeck D., Ramos M.A. (2003). Phylogeography and conservation genetics of endangered European Margaritiferidae (Bivalvia: Unionoidea). *Biological Journal of the Linnean Society* 78:235-252.
- Magarlamov T.Yu. y Chernyshev A.V. (2010). Ultrastructural study of the proboscis of *Malacobdella grossa* (Nemertea, Hoplonemertea). *Journal of Natural History*. 2010. V. 44. P. 2349–2361.
- Mahon A.R., Thornhill D.J., Norenburg J.L., Halanych K.M. (2010). DNA uncovers Antarctic nemertean biodiversity and exposes a decades-old cold case of asymmetric inventory. *Polar Biology* 33:193-202.
- Mantel N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27:209-220.
- Martínez S. y Del Río C.J. (2002). Late Miocene Molluscs From the Southwestern Atlantic Ocean (Argentina and Uruguay): A Palaeobiogeographic Analysis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology* 188:167-187.
- Maslakova S.A. (2010). The invention of the pilidium larva in an otherwise perfectly good spiralian phylum Nemertea. *Integrative and Comparative Biology* 50:734–743.
- Maslakova S.A. y Malakhov V.V. (1999). Hidden larva in the Hoplonemertini order of nemerteans. *Doklady Akademii Nauk* 366(6):849-852.
- Maslakova S.A. y Norenburg J.L. (2001). Phylogenetic study of pelagic nemerteans (Pelagica, Polystilifera). *Hydrobiología* 456:111-132.
- Maslakova S.A. y von Döhren J. (2009). Larval development with transitory epidermis in *Paranemertes peregrina* and other hoplonemerteans. *Biological Bulletin* 216:273-292.

- Mateos E., Giribet G. (2008). Exploring the molecular diversity of terrestrial nemerteans (Hoplonemertea, Monostilifera, Acteonemertidae) in a continental landmass. *Zoological Scripta*. 37: 235–243.
- McDermott J.J. (1966). The biology of a nemertean parasite of pinnotherid crabs. *American Zoologist* 6:331.
- McDermott J.J. y Roe P. (1985). Food, feeding behavior and feeding ecology of nemerteans. *American Zoologist* 25:113-125.
- McKnight J. (2009). Trophic enrichment patterns of $\delta^{13}\text{C}$ in organic matter of molluscan shell: implications for reconstructing ancient environments and food webs. Master thesis Department of Geology College of Arts and Sciences, University of South Florida
- Menni R.C. (1983). Los peces en el medio marino. Estudio Sigma, Buenos Aires.
- Mitarai S., Siegel D.A., Winters K.B. (2008). A numerical study of stochastic larval settlement in the California Current system. *Journal of Marine Systems* 69:295-309.
- Moore J. y Gibson R. (1985). The evolution and comparative physiology of terrestrial and freshwater nemerteans. *Biological Review* 60:257-312.
- Moretto H.J.A. (1970). Sobre un Hoplonemertino monostilifero de la Bahía de San Julián (Patagonia). *Neotropica* 16:17-34.
- Moretto H.J.A. (1971). Un Heteronemertino de la costa Atlántica Bonaerense. *Neotropica* 17:5-11.
- Moretto H.J.A. (1974). Sobre un Hoplonemertino Bonaerense. *Physis*, Buenos Aires, Secc. A 33:351-360.
- Moretto H.J.A. (1998). A new Heteronemertean from the Argentine coast of the Southern Atlantic. *Hidrobiología* 365:215-222.
- Moriyama E.N., Powell J.R. (1997) Synonymous substitution rates in *Drosophila*: mitochondrial versus nuclear genes. *Journal Molecular and Evolution*; 45(4):378–391.
- Morsan E. y Ciocco N.F. (2004). Age and growth model of the southern geoduck, *Panopea abbreviata*, from Puerto Lobos (Patagonia, Argentina). *Fisheries Research* 69:343-348.
- Morsan E., Zaidman P., Ocampo-Reinaldo M., Ciocco N. (2010). Population structure, distribution and harvesting of southern geoduck, *Panopea abbreviata*, in San Matías Gulf (Patagonia, Argentina). *Scientia Marina* 74:763-772.

- Müller O.E. (1776). Zoologiae Danicae prodromus, seu animalium Daniae et Norvegiae indigenarum characters, nomina, et synonyma imprimis popularium. Typis Hallageriis, Havniae, 282 pp.
- Navarro J., Albo-Puigserver M., Coll M., Saez R., Forero M. G., Kutcha R. (2013). Isotopic discrimination of stable isotopes of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) and carbon ($\delta^{13}\text{C}$) in a host-specific holocephalan tapeworm. *Journal of helminthology*, 1-5.
- Nei M. y Gojobori T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution* 3:418-426.
- Newsome S.D., Tinker M.T., Monson D.H., Oftedal O.T., Ralls K., Staedler M.M., Fogel M.L., Estes J.A. (2009) Using stable isotopes to investigate individual diet specialization in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Ecology* 90: 961-974
- Nielsen C., Scharff N., Eibye-Jacobsen D. (1996). Cladistic analyses of the animal kingdom. *Biological Journal of Linnean Society*. 57: 385–410.
- Norenburg J. (1985). Structure of the nemertine integument with consideration of its ecological and phylogenetic significance. *American Zoologist*. 25: 37–51.
- Norenburg J.L. (1988). Remarks on marine interstitial nemertines and key to the species. *Hydrobiologia* 156, 87–92.
- Norenburg J.L. y Roe P. (1998). Reproductive biology of several species of recently collected pelagic nemerteans. *Hydrobiología* 365:73-91.
- Norenburg J.L. y Stricker S.A. (2002). Phylum Nemertea. In: Atlas of Marine Invertebrate Larvae. Young CM, ed., pp. 163-170. Academic Press, New York.
- O'Grady S.P. y Dearing M.D. (2006). Isotopic insight into host-endosymbiont relationships in Liolaemid lizards. *Oecologia*. 150:355-361.
- Olive P.J.W., Pinnegar J.K., Polunin N.V.C., Richards G., Welch R. (2003). Isotope trophic-step fractionation: a dynamic equilibrium model. *Journal of Animal Ecology* 72(4):608-617.
- Padial J.M., Miralles A., De la Riva I., Vences M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7:16.
- Paine R.T. (1974) Intertidal community structure: experimental studies on the relationship between a dominant competitor and its principal predator. *Oecologia* 15: 93-120.
- Paine R.T. (1988) On food webs: roadmaps of interactions or grist for theoretical development. *Ecology* 69: 1648-1654

- Palma E.D, Matano R.P., Piola R. (2004). A numerical study of the Southwest Atlantic Shelf Circulation: Barotropic response to tidal and wind forcing. *Journal of Geophysical Research* 109:CO8014.
- Palumbi S., Martin A., Romano S., McMillian W.O., Stice L., Grabowski G. (1991). The simple fool's guide to PCR. University of Hawaii, Honolulu.
- Paradis M., Ackman R.G. (1977) Potential for employing the distribution of anomalous non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in several marine invertebrates as part of food web studies. *Lipids* 12(2): 170-176
- Parmentier E. y Das K. (2004). Commensal vs. parasitic relationship between Carapini fish and their hosts: some further insight through $d^{13}C$ and $d^{15}N$ measurements. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 310: 45–58.
- Pawlik J.R. (1992). Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates. *Oceanography and Marine Biology: Annual Review* 30:273-335.
- Peck L.S. (1993) Larval development in the Antarctic nemertean *Parbolasia corrugatus* (Heteronemertea, Lineidae). *Marine Biology*, 116, 301–310.
- Peterson B.J. y Fry B. (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 18:293-320
- Pinnegar J.K., Cambell N., Poulain N.V.C. (2001). An evaluation of host-parasite relationships in fishes, using stable isotopes of nitrogen and carbon. *Journal of Fish Biology* 59:494-503.
- Piola A.R. y Scasso L.M. (1986). Circulación en el Golfo San Matías, Geoacta.
- Piola A.R. y Rivas A.L. (1997), Corrientes en la Plataforma Continental, El mar argentino y sus Recursos Pesqueros, Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, Argentina, 1:119-132.
- Price P.W. (1980). *Evolutionary Biology of Parasites*. Princeton University Press, New Jersey. 237 pp.
- Posada D., Crandall K. A. (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics Applications Note*, 14: 817-818.
- Post D.M. (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods and assumptions. *Ecology* 83(3):703–718.
- Post D.M., Layman C.A., Arrington D.A., Takimoto G., Quattrochi J., Montaña C.G. (2007). Getting to the fat of the matter: models, methods, and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analysis. *Oecologia* 152, 179–189.

- Puerta P., Andrade S.C.S., Junoy J. (2010). Redescription of *Lineus acutifrons* Southern, 1913 (Nemertea: Pilidiophora) and comments on its phylogenetic position. *Journal of Natural History* 44:37-40.
- Rambaut A. (2002). Se-AL v. 2.0a11: sequence alignment program. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>).
- Raymond M. y Rousset F. (1995). Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248-249.
- Real L.E., Julio N., Gardenal N.C., Ciocco N.F. (2004). Genetic variability of Tehuelche scallop, *Aequipecten tehuelchus* populations from the Patagonian coasts (Argentina). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 84:235-238.
- Riepen O. (1933). Anatomie und histologic von *Malacobdella grossa* (Miill.).- *Zeitschrift fiir wissenschaftliche Zoologie* 143:323-496
- Riser N.W. (1974). Nemertinea. En: *Reproduction of Marine Invertebrates*, Pearse J.S. y Giese A.C. (Eds.). Academic Press, NY 1:359-389.
- Rivas A.L. y Beier E.J. (1990). Temperature and salinity fields in the Northpatagonic Gulfs. *Oceanologica Acta* 13:15-20.
- Roe P. (1986). Parthenogenesis in *Carcinonemertes* spp. (Nemertea: Hoplonemertea). *Biological Bulletin (Woods Hole)* 167:426-436.
- Roe P. (1988). Ecological implications of the reproductive biology of symbiotic nemerteans. *Hydrobiologia* 156:13-22.
- Rogers A. R. (1995). Genetic evidence for Pleistocene population explosion. *Evolution*, 49: 608-615.
- Rogers A. R. y Harpending H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552-569.
- Rogers A.D, Clarke A., Peck L.S. (1998). Population genetics of the Antarctic heteronemertean *Parbolasia corrugatus* from the South Orkney Islands. *Marine Biology* 131:1-13.
- Rogers A.D., Thorpe J.P., Gibson R., Norenburg J.L. (1997). Genetic differentiation of populations of the common intertidal nemerteans *Lineus ruber* and *Lineus viridis* (Nemertea, Anopla). *Hydrobiologia* 365:1-11.
- Rousset F. (2008). Genepop'007: a complete reimplementaion of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8:103-106.
- Rozas J., Sánchez-DelBarrio J. C., Messeguer X., Rozas R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.

- Ruppert E.E., Fox R.S., Barnes R.D. (2004). Nemertea. En: Invertebrate Zoology, 7. Brooks / Cole. (ed.). Philadelphia, pp. 279-280.
- Ruppert E.E. y Barnes R.D. (1994) Invertebrate zoology. Sannders, New York
- Ripley B. (2005). Boot: Bootstrap R (S-Plus) Functions (Canty). R package Version 1.2-24. disponible en <http://cran.r-project.org/>
- Santos C. y Bueno S.L.S. (2001). Prevalence and mean intensity infestation by *Carcinonemertes carcinophila imminuta* (Nemertea: Carcinonemertidae) in the gills of *Callinectes danae* and *Callinectes ornatus* (Decapoda: Portunidae) from Sao Sebastiao, Brazil. *Hydrobiología* 456:65-71.
- Scarabino V. (1977). Moluscos del Golfo San Matías (Provincia de Río Negro, República Argentina). Inventario y claves para su identificación. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 4:177-285.
- Schaal B. A., Hayworth D. A., Olsen K. M., Rauscher J. T., Smith W. A. (1998). Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7: 465-474.
- Schram F.R. (1991). Cladistic analysis of metazoan phyla and the placement of fossil problematica. In: Simonetta, A.M., Conway Morris, S. (Eds.), *The Early Evolution of Metazoa and the Significance of Problematic Taxa*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 35–46.
- Schultze M.S. (1851). Beiträge zur Naturgeschichte den Turbellarien. C.A. Koch, Greifswald.
- Schultze M.S. (1852-1853). Zoologischen Skizzen. *Z. Wiss. Zool.* 4, 178–195.
- Schwartz M.L. y Norenburg J.L. (2001). Can we infer heteronemertean phylogeny from available morphological data? *Hydrobiologia* 456: 165–174.
- Shields J. D. y Kuris A. M. (1988). Temporal variation in abundance of the egg predator *Carcinonemertes epialti* (Nemertea) and its effect on egg mortality of its host, the shore crab, *Hemigrapsus oregonensis*. *Hydrobiologia* 156: 31-38.
- Shields J.D., Okazaki R.K., Kuris AM. (1990 b). Brood Mortality and Egg Predation by the Nemertean, *Carcinonemertes epialti*, on the Yellow Rock Crab, *Cancer anthonyi*, in Southern California. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47(7):1275-1281.
- Shields J.D., Segonzac M. (2007) New nemertean worms (Carcinonemertidae) on bythograeid crabs (Decapoda: Brachyura) from Pacific hydrothermal vent sites. *Journal of Crustacean Biology* 27 (4): 681-692
- Signorelli J.H. y Alfaya J.E.F. (2014). *Panopea abbreviata* (Bivalvia: Hiatellidae) in the southwestern Atlantic Ocean, taxonomic revision and anatomy. *Malacologia*. 57(2): 279-293.

- Sih A. (1993) Effects of Ecological Interactions on Foragers Diets: Competition, Predation Risk, Parasitism and Prey Behaviour. En: Diet Selection. Hughes RN (ed), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 182-212
- Smith F.A. y Charnov E.L. (2001). Fitness trade-offs select for semelparous reproduction in an extreme environment. *Evolutionary Ecology Research* 3, 595–602.
- Smouse P. E., Long J. C., Sokal R. R. (1986). Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zoology*, 35: 627-632.
- Sokal R. R. (1979). Testing statistical significance of geographic variation patterns. *Systematic Zoology*, 28: 227-232.
- Sotka E.E., Wares J.P., Barth J.A., Grosberg R.K., Palumbi S.R. (2004) Strong genetic clines and geographical variation in gene flow in the rocky intertidal barnacle *Balanus glandula*. *Molecular Ecology*. 13: 2143–2156
- Sotka E.E., Palumbi S.R. (2006) The use of genetic clines to estimate dispersal distances of marine larvae. *Ecology* 87: 1094–1103.
- Stiasny-Wijnhoff G., (1923). On Brinkmann's system of the Nemertea *Enopla* and *Siboganamertes weberi*, n.g.n.sp. *Q. J. Microscopical Science*. 67, 629–669.
- Stiasny-Wijnhoff G., (1936). Die Polystilifera der Siboga-Expedition. *Siboga Expedition*. 22, 1–214.
- Strand M. y Sundberg P. (2005a). Delimiting species in the hoplonemertean genus *Tetrastemma* (phylum Nemertea): morphology is not concordant with phylogeny as evidenced from mtDNA sequences. *Biological Journal of Linnean Society*. 86: 201–212.
- Strand M. y Sundberg P. (2005b). 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. y Sundberg P. (2011). A DNA-based description of a new nemertean (phylum Nemertea) species. *Marine Biology Research*. 7: 63–70.
- Sundberg P. (1985). Nemertean systematics and phenetic classification: an example from a group of hoplonemerteans. *Zoological Journal of the Linnean Society* 85:247-266.
- Sundberg P. (1990). Gibson's reclassification on the enoplus nemerteans (*Enopla*, *Nemertea*): a critique and cladistic analysis. *Zoologica Scripta* 19, 133–140.

- Sundberg P. y Hylbom R., (1994). Phylogeny of the nemertean subclass Palaeonemertea (Anopla, Nemertea). *Cladistics* 10, 347–402.
- Sundberg P. y Saur M. (1998). Molecular phylogeny of some European heteronemertean (Nemertea) species and the monophyletic status of *Riseriellus*, *Lineus*, and *Micrura*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 10: 271–280.
- Sundberg P. y Strand M. (2010) Nemertean taxonomy – time to change lane? *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 48(3): 283-284.
- Sundberg P. y Svensson M., (1994). Homoplasy, character function, and nemertean systematics. *Journal of Zoology*. 234: 253–263.
- Sundberg P., Gibson R., Olsson U., (2003). Phylogenetic analysis of a group of palaeonemerteans (Nemertea) including two new species from Queensland and the Great Barrier Reef, Australia. *Zoological Scripta* 32: 279–296.
- Sundberg P. y Strand M. (2007). Genetics do not reflect habitat differences in *Riseriellus occultus* (Heteronemertea, Nemertea) from Spain and Wales. *Marine Biology Research* 3:117-122.
- Sundberg P., Thuróczy Vodoti E., Zhou H., Strand M. (2009a). Polymorphism hides cryptic species in *Oerstedia dorsalis* (Nemertea, Hoplonemertea). *Biological Journal of the Linnean Society* 98:556-567.
- Sundberg P., Thuróczy Vodoti E., Strand M. (2010). DNA barcoding should accompany taxonomy – the case of *Cerebratulus* spp (Nemertea). *Molecular Ecology Resources* 10:274-281.
- Sundet J.H. y Jobling M. (1985). An investigation of the interactions between the nemertine *Malacobdella grossa*, and its bivalve host, *Arctica islandica*. En: *Marine biology of polar regions and effects of stress on marine organisms*. Gray J.S. y Christiansen M.E. (eds). Norway: Institute of Fisheries pp. 185-197.
- Sydeman W., Hobson K., Pyle P., McLaren E. (1997) Trophic relationships among sea- birds in central California: combined stable isotope and conventional dietary approach. *Condor* 99: 327-336
- Swofford D.L. (2000). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tajima F. (1983). Evolutionary relationship of ADN sequences in finite populations. *Genetics*, 105: 437-460.
- Tajima F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by ADN polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.

- Takakura U. (1897). On a new species of *Malacobdella* (*M. japonica*). *Annotationes Zoologicae Japonenses* 1:105-112.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* (in press).
- Teske P.R., Papadopoulos I., Newman B.K, Dworschak P.C., McQuaid C.D., Barker N.P. (2008). Oceanic dispersal barriers, adaptation and larval retention: an interdisciplinary assessment of potential factors maintaining a phylogeographic break between sister lineages of an African prawn. *BMC Evolutionary Biology* 8:341.
- Teso S.V., Bigatti G., Bazterrica M.C., Ciocco N.F., Penchaszadeh P.E. (2006). The reproductive cycle of the entocommensal nemertean *Malacobdella arrokeana* and its symbiosis with the geoduck *Panopea abbreviata*. *Invertebrate Biology* 125:314-324.
- Thiel M. y Junoy J. (2006). Mating behavior of nemerteans: present knowledge and future directions. *Journal of Natural History* 40(15-16):1021-1034.
- Thiel M. y Zubillaga G.F. (1998). The temporal and spatial occurrence of *Tetrastemma fozensis* (Hoplomentini) in intertidal bivalves. *Hydrobiología* 365:257-262.
- Thollessen M., Norenburg J.L. (2003). Ribbon worm relationships: a phylogeny of the phylum Nemertea. *Proceedings of the Royal Society of London (B)*. 270: 407–415.
- Thornhill D.J., Mahon A.R., Norenburg J.L., Halanych K.M. (2008). Open-ocean barriers to dispersal: a test case with the Antarctic Polar Front and the ribbon worm *Parborlasia corrugatus* (Nemertea: Lineidae). *Molecular Ecology* 17:5104-5117.
- Tirasin E.M. y Jorgensen T. (1999). An evaluation of the precision of diet description. *Marine Ecology Progress Series* 182:243-252
- Tonini M.H. (2010). Modelado Numérico del Ecosistema del los Gofos Norpatagónicos. Tesis de Doctorado en Ingeniería. *Universidad Nacional del Sur*. Bahía Blanca. 255pp.
- Tonini M.H. y Palma E.D. (2011). Respuesta barotrópica de los golfos norpatagónicos argentinos forzados por mareas y vientos. *Latin american journal of aquatic research* 39(3):481-498.
- Trovant B., Ruzzante D.E., Basso N.G., Orensanz J.M. (2013). Distinctness, phylogenetic relations and biogeography of intertidal mussels (*Brachidontes*, Mytilidae) from the south-western Atlantic. *Journal of Marine Biological Association of United Kingdom*. 93, 1843–1855

- Trovant, B., Orensanz J.M., Ruzzante D.E., Stotz W., Basso N.G. (2015). Scorched mussels (BIVALVIA: MYTILIDAE: BRACHIDONTINAE) from the temperate coasts of South America: Phylogenetic relationships, trans-Pacific connections and the footprints of Quaternary glaciations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 82 (A), 60-74
- Turbeville J.M. (1986). An ultrastructural analysis of coelomogenesis in the hoplonemertine *Prosorhochmus americanus* and the polychaete *Magelona* sp. *Journal of Morphology*. 187: 51–56.
- Turbeville J.M. y Ruppert J.E., (1985). Comparative ultrastructure and the evolution of nemertines. *American Zoologist*. 25: 53–71
- Turbeville J.M., Field K.G., Raff R.A. (1992). Phylogenetic position of phylum Nemertini, inferred from 18S rRNA sequences: molecular data as a test of morphological character homology. *Molecular Biology and Evolution*. 9: 235–249
- Turner E.J., Zimmer-Faust R.K., Palmer M.A., Luckenbach M., Pentcheff N.D. (1994). Settlement of oyster (*Crassostrea virginica*) larvae: effects of water flow and a water-soluble chemical cue. *Limnology and Oceanography* 39:1579-1593.
- Valenciennes A. (1839). Description de l'animal de la panopée Australe, et recherches sur les autres espèces vivants ou fossiles de ce genre. Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris), Archives 1: 1-38.
- Van der Molen S., Kroeck M., Ciocco N. (2007). Reproductive cycle of the southern geoduck clam, *Panopea abbreviata* (Bivalvia: Hiatellidae), in north Patagonia, Argentina. *Invertebrate Reproduction and Development* 50 (2): 75-84.
- Vazquez N. (2012). Patologías que afectan a poblaciones comercialmente explotadas de moluscos bivalvos del litoral norpatagónico y la vinculación con sus historias de vida. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Comahue. 228 pp.
- Vazquez N., Bigatti G., Ituarte C., Cremonte F. (2009). Attachment of the nemertean *Malacobdella arrokeana* to mantle tissues of the geoduck *Panopea abbreviata* and survival outside the host. *Journal of Shellfish Research* 28:1-4.
- Vázquez N., Rodríguez F., Ituarte C., Klaich J., Cremonte F. (2010). Host-parasite relationship of the geoduck *Panopea abbreviata* and the green algae *Coccomyxa parasitica* in the Argentinean Patagonian coast. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 254–260.
- Verrill A. E. (1892). The marine nemerteans of New England and adjacent waters.-Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Science. 8:382-456.

- Von Döhren J., Beckers P., Bartolomaeus T. (2011) Life history of *Lineus viridis* (Müller, 1774) (Heteronemertea, Nemertea). Helgoland Marine Research. 66 (3) 243-252.
- Webb K.E., Barnes D.K.A., Clark M.S., Bowden D.A. (2006). DNA barcoding: A molecular tool to identify Antarctic marine larvae. Deep Sea Research II 53:1053-1060.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. Academic Press, Inc., New York.
- Whorley J. R., Alvarez-Castañeda S. T., Kenagy G. J. (2004). Genetic structure of desert ground squirrels over a 20-degree-latitude transect from Oregon through the Baja California peninsula. Molecular Ecology, 13: 2709-2720.
- Wickham D.E., Roe P., Kuris A.M. (1984). Transfer of nemertean egg predators during host molting and copulation. Biological bulletin marine biology Laboratory. Woods Hole. 331-338.
- Wickham D.E. y Kuris A.M. (1985). The comparative ecology of nemertean egg predators. American Zoologist 25:27-134.
- Wilson D.P. (1952). The influence of the nature of the substratum on the metamorphosis of the larvae of marine animals, especially the larvae of *Ophelia bicornis* Savigny. Annales de l'Institut océanographique Monaco 27:49-156.
- Winnepeninckx B., Backeljau T., De Wachter R. (1995). Phylogeny of protostome worms derived from 18S rRNA sequences. Molecular Biology and Evolution. 12: 641-649.
- Wisnivesky C. (2003). Control de las poblaciones parasitarias. En: Ecología y epidemiología de las infecciones parasitarias. Consejo editorial. Libro Universitario Regional, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina 111-140.
- Wright S. (1943). Isolation by distance. Genetics, 28: 114-138.
- Wright S. (1988). Surfaces of selective value revisited. American Naturalist 131:115-123.
- Wolfe A. D., Liston A. (1998). Contributions of PCR-Based methods to Plant Systematics and Evolutionary Biology. En: Soltis, Soltis y Doyle (eds.) Molecular Systematics of Plants II, 45-82, Kluwer academic Publishers, USA.
- Yamaoka T. (1940). The fauna of Akkeshi Bay. IX. Nemertini.-Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University, Series 6, Zoology 7:205 - 261.

Young T.P. (1990). The evolution of semelparity in Mount Kenya lobelias. *Evolutionary Ecology* 4, 157-171.

Zabala S., Bigatti G., Botto F., Iribarne O., Galván D. (2013). Trophic relationships between a Patagonian gastropod and its epibiotic anemone revealed by using stable isotopes and direct observations. *Marine Biology*, 160 (4), 909-919.

Zaidman P.C, Kroeck M.A, Kissner E.M.O., Morsan E.M. (2012) Reproductive pattern of Southern geoduck, *Panopea abbreviata*, at El Sotano (San Matias Gulf, Patagonia, Argentina). *Marine Biology Research*, 8, 172-181.

ANEXO

Anexo

Fijadores

- ❖ Solución de Bouin acuoso:
 - 75 ml de solución acuosa saturada de ácido pícrico
 - 25 ml de formol puro (40%)
 - 5 ml de ácido acético glacial 1.5 M

- ❖ Formol 10% en agua de mar
- ❖ Glutaraldehído 2,5% en buffer fosfato, PH = 7,4

Coloraciones aplicadas a material incluido en paraplast

❖ Hematoxilina-Eosina

- 1) Desparafinar e hidratar
 - a) Xilol 2 cambios de 3 minutos cada uno
 - b) Alcohol 96 % lavado por 1 minuto
 - c) Colodionar
 - d) Alcohol 70 %, 50 %, 1 minuto cada uno.
 - e) Agua destilada por 1 minuto.
- 2) Coloración
 - a) Hematoxilina de Carazzi por 10 minutos.
 - b) Viraje en agua común hasta que tome color violeta.
 - c) Eosina alcohólica 0,25 % (en alcohol 70 %) por 2 minutos.
- 3) Deshidratar y montar
 - a) Pasaje rápido por alcohol 70 %
 - b) Alcohol 96 % pasaje rápido
 - c) Secar en estufa a 55° C
 - d) Xilol
 - e) Bálsamo

❖ Tricrómico de Masson

- 1) Desparafinar e hidratar
 - a) Xilol 2 cambios de 3 minutos cada uno
 - b) Alcohol 96 % lavado por 1 minuto

- c) Colodionar
 - d) Alcohol 70 %, 50 % 1 minuto cada uno.
 - e) Agua destilada por 1 minuto.
- 2) Coloración
- a) Hematoxilina de Carazzi por 10 minutos.
 - b) Viraje en agua común hasta que tome color violeta.
 - c) Fucsina ácida ponceau de xilidina por 30 segundos
 - d) Lavado con agua destilada
 - e) Ácido fosfomolibdico 1 % (diferenciador y mordiente) por 5 minutos
 - f) Sin lavar, colorear con azul de anilina acética por 5 minutos
 - g) Lavar con agua destilada.
- 3) Deshidratar y montar
- a) Pasaje rápido por alcohol 70 %
 - b) Alcohol 96 % pasaje rápido
 - c) Secar en estufa a 55° C
 - d) Xilol
 - e) Bálsamo

Trabajos publicados

Alfaya J.E.F., Bigatti G., Kajihara H., Strand M., Sundberg P., Machordom A. (2015). DNA barcoding supports identification of *Malacobdella* species (Nemertea: Hoplonemertea). *Zoological Studies*. (en prensa)

Alfaya J.E.F., Bigatti G., Machordom A. (2013). Mitochondrial and nuclear markers reveal a lack of genetic structure in the entocommensal nemertean *Malacobdella arrokeana* in the Patagonian gulfs. *Helgoland Marine Research*, 67(2), 407-412.

Alfaya J. E. F., Bigatti G., Machordom A. (2014). Erratum to: Mitochondrial and nuclear markers reveal a lack of genetic structure in the entocommensal nemertean *Malacobdella arrokeana* in the Patagonian gulfs. *Helgoland Marine Research*, 68: 199-200.

Alfaya J.E.F., López-Márquez V., García-Jiménez R., Fernández-Álvarez F.A., Bigatti G., Machordom A. (2014) Development and characterization of microsatellite loci in the entocommensal *Malacobdella arrokeana* (Nemertea: Bdellonemertea), from Patagonia (Argentina) and cross-amplification in 34 nemertean species. *Conservation Genetics Resources*, 6: 147-150.

López-Márquez V., **Alfaya J.E.F.**, García Jiménez R., Bigatti G., Machordom A. (2013). Isolation and characterization of microsatellite loci for the southern geoduck, *Panopea abbreviata* (Valenciennes, 1839) through 454 pyrosequencing. In Ahanchede, A.; Alfaya J.E.F.; Andersen, L. W.; Azam, D.; Bautista, M. A. M.; Besnard, A. L.; Bigatti, G.; et al.(2013). Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources. *Molecular Ecology Resources*, 13(1): 158-159.

Signorelli J.H. y **Alfaya J.E.F.** (2014). *Panopea abbreviata* (Bivalvia: Hiatellidae) in the southwestern Atlantic Ocean, taxonomic revision and anatomy. *Malacologia*. 57(2): 279-293.

1 DNA barcoding supports identification of *Malacobdella* species (Nemertea:
2 Hoplonemertea)

3 Jose E. F. Alfaya^{1,2}, Gregorio Bigatti^{1,2}, Hiroshi Kajihara³, Malin Strand⁴, Per Sundberg⁵ and Annie
4 Machordom^{6*}

5 ¹LARBIM, Centro Nacional Patagónico (CENPAT-CONICET). Bvd. Brown 2915,
6 U9120ACV Puerto Madryn, Chubut, Argentina. (Jose E. F. Alfaya:
7 joselias@cenpat.edu.ar)

8 ² Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco
9 (UNPSJB), Bvd. Brown S/N; U9120ACV Puerto Madryn, Chubut, Argentina (Gregorio
10 Bigatti: gbigatti@cenpat.edu.ar)

11 ³ Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo 060-0810, Japan
12 (kazi@mail.sci.hokudai.ac.jp)

13 ⁴ The Swedish Species Information Centre, SLU, Box 7007, SE-750 07 Uppsala. Sweden
14 (Malin.Strand@slu.se)

15 ⁵Department of Biological and Environmental Sciences, University of Gothenburg, PO
16 Box 463, SE-405 30 Gothenburg, Sweden (per.sundberg@bioenv.gu.se).

17 ⁶ Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN-CSIC). José Gutiérrez Abascal, 2. 28006
18 Madrid, Spain.

19 *Corresponding author: Annie Machordom. E-mail: annie@mncn.csic.es. Telephone: +34
20 914111328. Fax number: +34 915645078.

21

22

23

24 **Abstract**

25 **Background:** Nemerteans of the genus *Malacobdella* live inside of the mantle cavity of marine
26 bivalves. The genus currently contains only six species, five of which are host-specific and usually
27 found in a single host species, while the sixth species, *M. grossa*, has a wide host range, and has
28 been found in 27 different bivalve species to date. The main challenge of *Malacobdella* species
29 identification resides in the similarity of the external morphology between species (terminal sucker,
30 gut undulations number, anus position and gonad coloration) and thus, the illustrations provided in
31 the original descriptions do not allow reliable identification. In this article, we analyse the
32 relationships among three species of *Malacobdella*: *M. arrokeana*, *M. japonica*, and *M. grossa*,
33 adding new data for the *M. grossa* and reporting the first for *M. japonica*, analyzing 658 base pairs
34 of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I gene (*COI*). Based on these analyses, we
35 present and discuss the potential of DNA barcoding for *Malacobdella* species identification.

36 **Results:** Sixty-four DNA barcoding fragments of the mitochondrial *COI* gene from three different
37 *Malacobdella* species (*M. arrokeana*, *M. japonica* and *M. grossa*), are analysed (24 of them newly
38 sequenced for this study, along with four outgroup specimens) and used to delineate species.
39 Divergences, measured as uncorrected differences, between the three species were: *M. arrokeana*–
40 *M. grossa* 11.73%, *M. arrokeana*–*M. japonica* 10.62%, and *M. grossa*–*M. japonica* 10.97%. Mean
41 intraspecific divergence within the ingroup species showed a patent gap with respect to the
42 interspecific ones: 0.18% for *M. arrokeana*, 0.13% for *M. grossa*, and 0.02% for *M. japonica*
43 (ranges from 0 to 0.91%).

44 **Conclusion:** We conclude that there is a clear correspondence between the molecular data and
45 distinguishing morphological characters. Our results thus indicate that some morphological
46 characters are useful for species identification and support the potential of DNA barcoding for
47 species identification in a taxonomic group with subtle morphological external differences.

48 **Keywords:** DNA barcoding, *COI* gene, Bivalvia, entocommensal nemertean, *Malacobdella*.

49 **Background**

50 The phylum Nemertea is a group of organisms whose identification and taxonomy requires
51 specialized methods, mainly histology. Recently, molecular methods have been a useful
52 tool for ascertaining the actual biodiversity of these worms and increasing our knowledge
53 of several of the problematic species (Chen et al. 2010; Fernández-Álvarez and Machordom
54 2013; Kvist et al. 2013). The nemertean genus *Malacobdella* Blainville 1827 originally
55 contained 13 nominal species, of which six are currently regarded as valid (Gibson 1995;
56 Ivanov et al. 2002). The species of the genus are entocommensal in the mantle cavity of
57 marine bivalves, mainly from the subclass Heterodonta (Jensen and Sadeghian 2005). The
58 phylogenetic position of the genus *Malacobdella* is controversial within the phylum,
59 mainly because this genus is always represented by sequences belonging only to the species
60 *M. grossa* (Thollesson and Norenburg 2003; Andrade et al. 2012), the most studied and
61 cosmopolitan species. The *Malacobdella* species are distributed in distant locations around
62 the world: *M. japonica*, *M. macomae* and *M. siliquae* were described in the eastern (Japan)
63 and western Pacific Ocean (west coast of the United States); *M. grossa* was described in the
64 Pacific (western coast of the United States) and Atlantic Ocean (northern Europe); and *M.*
65 *arrokeana* was the only southern species described in the South Atlantic Ocean (Ivanov et
66 al. 2002 and references herein). The geographic distribution of the genus requires a huge
67 sampling effort to work with all species. Identifying *Malacobdella* species is difficult
68 because important diagnostic features were not initially recognized and thus not mentioned
69 in earlier descriptions (Ivanov et al. 2002). In addition, the similarity of the external
70 morphology between species (terminal sucker, number of intestinal loops -“undulations”-,
71 anus position and immature gonad coloration) and the illustrations provided in the original

72 descriptions of the species do not allow reliable identification. There is little knowledge
73 about the biology of *Malacobdella* species. The genus *Malacobdella* belongs to the
74 Hoplonemertean non-Pilidiophora species (Thollessen and Norenburg 2003); this group
75 presents direct development and non-feeding planuliform larvae (Maslakova and von
76 Döhren 2009). However there are no studies on its larval development, dispersion and
77 settlement.

78 The host specificity of the *Malacobdella* species is generally high; five of the six known
79 species have been reported from only one or two bivalve species: *M. arrokeana* Ivanov et
80 al. 2002 from *Panopea abbreviata* (Heterodonta: Hiatelloidea) (Ivanov et al. 2002; Alfaya
81 et al. 2013); *M. japonica* Takakura 1897 from *Spisula sachalinensis* (Heterodonta:
82 Mactroidea) (Takakura 1897); *M. macomae* Kozloff 1991 from *Macoma nasuta* and
83 *Macoma secta* (Heterodonta: Tellinoidea) (Kozloff 1991); *M. minuta* Coe 1945 from
84 *Yoldia cooperii* (Protobranchia: Nuculanoidea) (Coe 1945); and *M. siliquae* Kozloff 1991
85 from *Siliqua patula* (Heterodonta: Solenoidea) (Kozloff 1991). The sixth species, *M.*
86 *grossa*, is the type specimen of the genus, and was originally obtained from *Dosinia exoleta*
87 (Linnaeus 1758) (Heterodonta: Veneroidea) (Müller 1776). However, the most complete
88 morphological description of *M. grossa*, reported by Riepen (1933), was based on material
89 from *Arctica islandica* (Linnaeus 1767) (Heterodonta: Arcticoidea). Nemerteans are
90 traditionally identified and classified using morphological criteria, but the relatively low
91 number of qualitative morphological characters, the lack of adequate fixation procedures
92 for histological studies, vague descriptions in the original papers, and the paucity of
93 species-specific characters, make species delimitation problematic, especially when
94 comparing closely related species (Chen et al. 2010; Sundberg et al. 2010; Fernández-

95 Álvarez and Machordom 2013; Kvist et al. 2013). The difficulty of morphological
96 recognition of a great part of the more than 1280 species included in the phylum Nemertea
97 has been previously discussed (Andrade et al. 2012; Sundberg and Strand 2010; Kvist et al.
98 2013, among others), and different authors have advocated new tools and comprehensive
99 studies for correctly identifying species and thus providing accurate biodiversity
100 knowledge. The combination of molecular and morphological methods has been useful in
101 elucidating nemertean taxonomy in other genera (Sundberg et al. 2009; Junoy et al. 2010;
102 Puerta et al. 2010; Kajihara et al. 2011; Taboada et al. 2013). DNA barcoding accelerated
103 the discovery ratio of new species (Wiens 2007) and identified some inconsistencies
104 between species assignment and previously sequenced specimens (Kvist et al. 2013).
105 Nevertheless, only a small number of nemerteans have been analysed through DNA
106 barcoding (Sundberg et al. 2009; Chen et al. 2010; Fernández-Álvarez and Machordom,
107 2013; Kvist et al. 2013; Strand et al. 2014). The potential use of DNA barcoding needs to
108 be substantiated in well-established taxonomic groups before it can be fully exploited in all
109 nemertean genera. Currently, only 6% of the phylum Nemertea has an associated barcode
110 sequence (Bucklin et al. 2011; Fernández-Álvarez and Machordom 2013).

111 Our objective is to provide the most comprehensive molecular data set for the
112 *Malacobdella* genus and test the usefulness of this data in the delimitation of the three most
113 widely distributed species of the *Malacobdella* genus, and to provide for the first time *COI*
114 sequences for *M. japonica*. We also estimate the phylogenetic relationship between 64
115 individuals from the 3 species based on partial sequences of *COI*.

116

117

118 **Methods**

119 **Specimen collection and sequences used**

120 Thirty-eight sequences of *Malacobdella arrokeana* were obtained from specimens
121 collected at three northern Patagonian gulfs in Argentina (previously studied by Alfaya et
122 al. 2013): San Matías Gulf (n = 23), San José Gulf (n = 7) and Nuevo Gulf (n = 8) (Table
123 1). Each of the *M. arrokeana* specimens was collected from a different host specimen of
124 *Panopea abbreviata*. Specimens of *M. japonica* were collected from 15 different *Spisula*
125 *sachalinensis* bivalves at Shinryu Beach in Akkeshi, Hokkaido, Japan. Individuals of *M.*
126 *grossa* (n = 11) were obtained from different *Arctica islandica* clams in the waters of
127 Tjärnö, Skagerak, Sweden. Additionally, two *M. grossa* *COI* sequences from GenBank
128 (HQ848591 and AJ436905, from Tjärnö, Sweden and the White Sea, Russia, respectively)
129 were included in the analysis (Table 1). Fresh specimens were stored in absolute ethanol,
130 and DNA was extracted from preserved tissues using the DNeasy extraction kit (Qiagen,
131 Inc.), following the manufacturer's protocol.

132 To test for the monophyly of the genus we sequenced *Ramphogordius sanguineus*
133 specimens collected along the Argentinean coast to use as the outgroup. We also used *COI*
134 sequences available from GenBank for nemerteans that are closely related to *Malacobdella*
135 and have been previously used in other phylogenetic studies (Andrade et al. 2012; Mateos
136 and Giribet 2008; Thollesson and Norenburg 2003), including two *Ramphogordius*
137 *sanguineus* outgroup sequences (Table 1).

138

139 **PCR amplification and sequencing**

140 Partial *COI* sequences were amplified by PCR using the following primers:

141 LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') (Folmer et al. 1994) and *COI*-
142 H (5'-TCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Machordom et al. 2003). Amplification was
143 carried out in a 50 µl final volume reaction consisting of 5 µl buffer containing 10x 2mM
144 MgCl₂, 1µl dNTPs mix (10mM), 0.4 µl of *Taq* DNA polymerase (5U/ µl) (Biotools), 1-3 µl
145 of genomic DNA and 0.8 µl of each primer (10µM). Thermal cycling conditions were an
146 initial 4 min denaturation at 94 °C, followed by 40 cycles of 45 s at 94 °C, 1 min at 45 °C
147 and 1 min at 72 °C, ending with a final 10 min extension at 72 °C. The products were
148 visualized under blue light in 0.8% agarose gels stained with SYBR Safe (Invitrogen), with
149 co-migrating 100bp or 1Kb ladder molecular weight markers. The amplification products
150 (around 700 bp) were purified by ethanol precipitation. Both strands were sequenced using
151 the BigDye Terminator sequencing kit and an ABI PRISM 3730 DNA Sequencer (Applied
152 Biosystems).

153

154 **Data analysis**

155 Special alignment was unnecessary as the *COI* sequences from the analysed species
156 did not present any gaps. Phylogenetic analyses were performed with PAUP 4.0b10
157 (Swofford 2000) for maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML), and with
158 MrBayes 3.2 (Huelsenbeck 2000; Huelsenbeck and Ronquist 2001) for Bayesian inference
159 (BI). MP parameters included a heuristic search with tree bisection-reconnection (TBR)
160 branch swapping and 10 random additions. ML was also estimated through a heuristic
161 search, with stepwise-addition, applying the TIM3+G+I (transitional) model (Posada 2003).
162 Two runs of 5,000,000 generations were performed for BI, sampling one tree per 1000
163 replicates. The model that best fits the data (TIM3+I+G) was found with jModelTest

164 (Posada 2008). Branch supports for MP (1000 replicates) and ML (150 replicates) were
165 determined by bootstrapping (Felsenstein 1985) and by posterior probabilities (after a burn-
166 in of 20% of the obtained trees) for BI.

167

168 **Results**

169 According to original descriptions, the three studied species of the *Malacobdella*
170 genus are very similar in their external morphology, but differ in internal morphological
171 characters. *Malacobdella arrokeana* differs from *M. japonica* and *M. grossa* in the origin
172 of the proboscis retractor muscle. This muscle is curved dorsally and attaches to the internal
173 body wall in *M. arrokeana*, whereas in *M. grossa* it originates ventrally next to the terminal
174 sucker (Table 2). In *M. japonica*, the muscle also originates ventrally but ends freely in the
175 parenchyma (Table 2). *Malacobdella japonica* differs from *M. arrokeana* and *M. grossa* in
176 the position of the nerve commissure. In *M. japonica*, the posterior nerve commissure is
177 situated around the terminal sucker, while in the other two species the nerve commissure is
178 situated dorsally in the posterior part of the intestine just before the anus (Table 2).

179 *Malacobdella grossa* also differs from *M. arrokeana* and *M. japonica* in the
180 position of the excretory pores, being ventro-lateral in *M. grossa* and dorso-lateral in *M.*
181 *arrokeana* and *M. japonica*. The rhynchocoel occupies most of the body length in the three
182 species, up to 80-90 % with the proboscis occupying 2/3 of the rhynchocoel. Gonad
183 coloration varies according to species and stage of gonad development. Generally, the
184 gonads are dark olive-green in colour in mature specimens of *M. grossa*, rosy or purple in
185 mature *M. arrokeana* and rosy in mature *M. japonica* (Fig. 1, Table 2). However, gonad
186 coloration is always white in immature specimens (Fig 1 A).

187

188 The *COI* fragments sequenced for *Malacobdella arrokeana*, *M. grossa*, and *M.*
189 *japonica* were 658 bp in length. These sequences were deposited in GenBank under
190 accession numbers KF597241 to KF597264. The different phylogenetic analyses resulted
191 in the same topology, with high support within the ingroup (Fig. 2). The divergences,
192 measured as uncorrected distances (percentage of nucleotide substitutions), between the
193 three species were: *M. arrokeana*–*M. grossa* 11.73%, *M. arrokeana*–*M. japonica* 10.62%,
194 and *M. grossa*–*M. japonica* 10.97%. There was a clear gap between these interspecific
195 divergences and the intraspecific ones: mean intraspecific divergence within the ingroup
196 species was 0.18% for *M. arrokeana* (range 0-0.92%), 0.13% for *M. grossa* (range 0-
197 0,61%), and 0.02% for *M. japonica* (range 0-0.15%). It is noteworthy that within the
198 *Ramphogordius sanguineus* sequences selected as the outgroup (Table 1), the divergence
199 between one (GenBank accession number HQ848580) of the sequences and the rest of the
200 sequences of this species (GenBank AJ436938 and those collected by the authors) was
201 more than 15% (15.75%), while the maximum divergence between the others was 100-fold
202 lower (around 0.15%), suggesting that the *COI* sequence HQ848580 is not actually from *R.*
203 *sanguineus*. The 5 substitutions found among the *M. grossa* haplotypes were synonymous,
204 as was the unique change among specimens of *M. japonica*, while of the 15 substitutions
205 found among the haplotypes of *M. arrokeana*, three lead to amino acid changes.

206

207 **Discussion**

208 As previously mentioned, nemerteans of the *Malacobdella* genus are very difficult
209 to identify based only on external characters. Rather, it is the internal morphology that

210 provides the main taxonomic features used for identification, which can be differentiated
211 only after a rigorous histological procedure. The genetic analysis performed here clearly
212 shows that the distinguishing internal morphological differences used to separate the three
213 species of *Malacobdella* analysed are concordant with differences in a fragment of the *COI*
214 gene. However, previous DNA barcoding studies with nemerteans of the genera *Tetrastema*
215 and *Cerebratulus* revealed a lack of concordance between morphological and molecular
216 characters (see Strand and Sundberg 2005; Sundberg et al. 2010). These authors argued that
217 this difference could be the result of intraspecific variation or changes in the external
218 morphology during development (Cantell 1975). They also concluded that the
219 morphological characters used to describe *Tetrastema* and *Cerebratulus* species are
220 inadequate to identify evolutionary lineages. Our results showed that the divergence found
221 between the sequences of the *Malacobdella* species (10 to 11% between the three species),
222 are consistent with their status as distinct species. The values here found for intra- and
223 interspecific divergences are in agreement with values found for other nemertean groups
224 (e.g. Sundberg et al. 2010; Chen et al. 2010; Andrade et al. 2012; Kvist et al. 2013). The
225 only exception was the divergence obtained between samples of *Ramphogordius*
226 *sanguineus*, 100-fold higher than other intraspecific values, suggesting that the *COI*
227 sequence from GenBank (HQ848580) is not actually from *R. sanguineus*

228 The phylogenetic analysis presented here showed that *M. arrokeana* and *M.*
229 *japonica* are more closely related to each other than to *M. grossa*. Further studies using
230 more molecular markers could clarify the phylogeny of the *Malacobdella* genus, taking into
231 account the high host specificity of the majority of the species *versus* the cosmopolitan
232 distribution and low host specificity of *M. grossa*. In this sense, the sequence of this last

233 species from many hosts throughout its entire distribution would clarify whether *M. grossa*
234 is indeed a single cosmopolitan species or a complex of species.

235 Based on the available literature by Takakura (1897), Yamaoka (1940), Riepen
236 (1933), Gibson (1967, 1968, 1994), Gibson and Jennings (1969), Kozloff (1991), Ivanov et
237 al. (2002) and the present work, the positions of the proboscis muscle and the nerve
238 commissure appear to be good diagnostic characters for identifying species within the
239 genus *Malacobdella* (since they are unique characteristic autapomorphies).

240 Several authors have concluded that nemertean species identification based only on
241 morphological characters could be unreliable (see Strand and Sundberg 2005; Sundberg et
242 al. 2009; Thornhill et al. 2008; Chen et al. 2010; Fernández-Álvarez and Machordom 2013;
243 Kvist et al. 2013). More comprehensive future studies making use of the results presented
244 here may strengthen species identification of other *Malacobdella* species by DNA
245 barcoding.

246

247 **Conclusion**

248 Analysis of the *COI* (DNA barcoding) sequences presented in this work is clearly a
249 powerful tool for species identification, at least of the three *Malacobdella* species studied.

250 These molecular data are congruent with identifications based on internal morphological
251 characters used in the original descriptions and re-descriptions of these three species and
252 could be used to delineate between species in this genus with a similar external
253 morphology.

254

255

256 **Competing interests**

257 The authors declare that they have no competing interests.

258 **Authors' contributions**

259 The work presented here was carried out in collaboration among all authors. JEFA, GB and
260 AM defined the research theme and wrote the manuscript. JEFA, HK, MS and PS collected
261 the samples in Argentina, Japan and Sweden, respectively and took the photos. PS and MS
262 provided *COI* sequences from *M. grossa*. JEFA and AM carried out the laboratory work
263 (DNA extraction, PCR amplification, edition and sequences analysis), analysed the data
264 and interpreted the results. JEFA prepared the tables and figures. PS, MS and HK improved
265 the manuscript and made the English revision. All authors read and approved the final
266 manuscript.

267

268 **Acknowledgements**

269 The authors thank CONICET, Secretaría de Ciencia Tecnología e Innovación Productiva de
270 la Provincia de Chubut, Agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo
271 (AECID: A/023484/09 and A/032441/10) and the iBOL-CONICET project, for financial
272 support. We are grateful also to Melinda Modrell for her conscientious revision of the
273 English.

274

275

276

277

278

279 **References**

280 Alfaya JEF, Bigatti G, Machordom A (2013) Mitochondrial and nuclear markers reveal a
281 lack of genetic structure in the entocommensal nemertean *Malacobdella arrokeana* in the
282 Patagonian gulfs. Helgoland Mar Res 67 (2): 407-412.

283

284 Andrade SCS, Strand M, Schwartz M et al. (2012) Disentangling ribbon worm
285 relationships: multi-locus analysis supports traditional classification of the phylum
286 Nemertea. Cladistics 28: 141-159.

287

288 Bucklin A, Steinke D, Blanco-Bercial L (2011) DNA barcoding of marine metazoa. Annu
289 Rev Mar Sci 3: 471–508.

290

291 Cantell CE (1975) Anatomy, taxonomy, and biology of some Scandinavian
292 heteronemertines of the genera *Lineus*, *Micrura*, and *Cerebratulus*. Sarsia 58: 89-122.

293

294 Coe WR (1945) *Malacobdella minuta*, a new commensal nemertean. J Wash Acad Sci :35
295 65-67.

296

297 Chen H, Strand M, Norenburg J et al. (2010) Statistical parsimony networks and species
298 assemblages in Cephalotrichid nemerteans (Nemertea). PLoS ONE 5 (9): e12885.
299 doi:10.1371/journal.pone.0012885.

300

301 de Blainville HM (1827) Sangsue. In Levrault EG (ed). Dictionnaire des Sciences
302 Naturelles, 47. Normant, Paris, p 270-271.

303

304 Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.
305 Evolution 39: 783–791.

306

307 Fernández-Álvarez FÁ, Machordom A (2013) DNA barcoding reveals a cryptic nemertean
308 invasion in Atlantic and Mediterranean waters. Helgoland Mar Res 67 (3): 599-605.

309

310 Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification
311 of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol
312 Mar Biol Biotech 3: 294–299.

313

314 Gibson R (1967) Ocurrence of the entocommensal rhynchocoelan, *Malacobdella grossa*, in
315 the oval piddock, *Zirfaea crispata*, on the Yorkshire coast. J Mar Biol Assoc UK 49: 301-
316 317.

317

318 Gibson R (1968) Studies on the biology of the entocommensal rhynchocoelan
319 *Malacobdella grossa*. J Mar Biol Assoc UK 48: 637–656.

320

321 Gibson R (1994) Nemerteans. Synopses of the British Fauna (New Series, No 24), 2nd edn,
322 The Dorset Press, Dorchester, UK.

323

324 Gibson R (1995) Nemertean genera and species of the world: an annotated checklist of
325 original names and description citations, synonyms, current taxonomic status, habitats and
326 recorded zoogeographic distribution. J Nat Hist 29: 1-562.

327

328 Gibson R, Jennings JB (1969) Observations on the diet, feeding mechanisms, digestion and
329 food reserves of the entocommensal rhynchocoelan *Malacobdella grossa*. J Mar Biol Assoc
330 UK 49: 17-32.

331

332 Huelsenbeck JP (2000) MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Department of
333 Biology, University of Rochester, Rochester, NY.

334

335 Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogeny.
336 Bioinformatics 17: 754-755.

337

338 Ivanov VA, Bigatti G, Penchaszadeh PE, Norenburg JL (2002) *Malacobdella arrokeana*
339 (Nemertea: Bdellonemertea), a new species of nemertean from the Southwestern Atlantic
340 Ocean entocommensal in *Panopea abbreviata* (Bivalvia, Heterodonta, Hiatellidae) in
341 Argentina. P Biol Soc Wash 115: 359–367.

342

343 Jensen K, Sadeghian PS (2005) Nemertea. In: Rohde K, ed. Marine parasitology. CSIRO
344 press, Australia, p 205-210.

345

- 346 Junoy J, Andrade SCS, Giribet G (2010) Phylogenetic placement of a new hoplonemertean
347 species commensal on ascidians. *Invertebr Syst* 24:616-629.
- 348
- 349 Kajihara H, Olympia M, Kobayashi N, Katoh T, Chen HX, Strand M, Sundberg P (2011)
350 Systematics and phylogeny of the hoplonemertean genus *Diplomma* (Nemertea) based on
351 molecular and morphological evidence. *Zool J Linn Soc* 161: 695-722.
- 352
- 353 Kozloff EN (1991) *Malacobdella siliquae* sp. nov. and *Malacobdella macomae* sp. nov.,
354 commensal nemerteans from bivalve mollusks on the Pacific coast of North America. *Can J*
355 *Zool* 66: 1612–1618.
- 356
- 357 Kvist S, Laumer C, Junoy J, Giribet G (2013) New insights into the phylogeny, systematics
358 and DNA barcoding of Nemertea. *Invertebr Syst* 28:287-308.
- 359
- 360 Linnaeus C (1758) *Systema naturae per regna tria naturae: secundum classes, ordines,*
361 *genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Vol. I (10th ed.). 824 pp.
362 Stockholm: Laurentius Salvius.
- 363
- 364 Linnaeus C (1767) *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines,*
365 *genera, species, cum characteribus & differentiis*. Vol. II. 735 pp. Holmiae: Salvius.
- 366

367 Machordom A, Araujo R, Erpenbeck D, Ramos MA (2003) Phylogeography and
368 conservation genetics of endangered European Margaritiferidae (Bivalvia: Unionoidea).
369 Biol J Linn Soc 78: 235–252.

370

371 Maslakova SA, von Döhren J (2009) Larval development with transitory epidermis in
372 *Paranemertes peregrina* and other hoplonemerteans. Biol Bull 216: 273-292.

373

374 Mateos E, Giribet G (2008) Exploring the molecular diversity of terrestrial nemerteans
375 (Hoplonemertea, Monostilifera, Acteonemertidae) in a continental landmass. Zool Scr 37:
376 235–243.

377

378 Müller OF (1776) Zoologiae Danicae prodromus, seu Animalium Daniae et Norvegiae
379 indigenarum characters, nomina, et synonyma imprimis popularium. Typis Hallageriis,
380 Havniae. Copenhagen.

381

382 Posada D (2003) Using Modeltest and PAUP* to select a model of nucleotide substitution.
383 In: Baxevanis AD, Davison DB, Page RDM, Petsko GA, Stein LD, Stormo GD, editors.
384 Current Protocols in Bioinformatics. New York: John Wiley & Sons. p. 6.5.1–6.5.14.

385

386 Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic model averaging. Mol Biol Evol 25: 1253–
387 1256.

388

- 389 Puerta P, Andrade SCS, Junoy J (2010) Redescription of *Lineus acutifrons* Southern, 1913
390 (Nemertea) and comments on its phylogenetic position. J Nat Hist 44: 37-40.
391
- 392 Riepen O (1933) Anatomie und histologie von *Malacobdella grossa* (Müll.).-Z Wiss Zool
393 Abt A 143: 323-496.
394
- 395 Strand M, Sundberg P (2005) Delimiting species in the hoplonemertean genus *Tetrastemma*
396 (phylum Nemertea): morphology is not concordant with phylogeny as evidenced from
397 mtDNA sequences. Biol J Linn Soc 86: 201-212.
398
- 399 Strand M, Hererra-Bachiller A, Nygren A, Kånneby T (2014) A new nemertean species:
400 what are the useful characters for ribbon worm descriptions? J Mar Biol Assoc UK 94: 317-
401 330.
402
- 403 Sundberg P, Strand M (2010) Nemertean taxonomy – time to change lane? J Zool Syst
404 Evol Res 48: 283-284.
405
- 406 Sundberg P, Thuróczy Vodoti E, Zhou H, Strand M (2009) Polymorphism hides cryptic
407 species in *Oerstedtia dorsalis* (Nemertea, Hoplonemertea). Biol J Linn Soc 98: 556-567.
408
- 409 Sundberg P, Vodoti E, Strand M (2010) DNA barcoding should accompany taxonomy the
410 case of *Cerebratulus* spp (Nemertea). Mol Ecol Res 10: 274–281.
411

412 Swofford DL (2000) *PAUP**. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods),
413 Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.

414

415 Taboada S, Junoy J, Andrade SCS, Giribet G, Cristobo J, Avila C (2013) On the identity of
416 two Antarctic brooding nemerteans: redescription of *Antarctonemertes valida* (Burger,
417 1893) and description of a new species in the genus *Antarctonemertes* Friedrich, 1955
418 (Nemertea, Hoplonemertea). *Polar Biol* 36: 1415-1430.

419

420 Takakura U (1897) On a new species of *Malacobdella* (*M. japonica*). *Annot Zool Japon* 1:
421 105-112.

422

423 Teso SV, Bigatti G, Bazterrica MC, Ciocco NF, Penchaszadeh PE (2006) The reproductive
424 cycle of the entocommensal nemertean *Malacobdella arrokeana* and its symbiosis with the
425 geoduck *Panopea abbreviata*. *Invertebr Biol*, 125(4): 314 – 324.

426

427 Thornhill DJ, Mahon AR, Norenburg JL, Halanych KM (2008) Open-ocean barriers to
428 dispersal: a test case with the Antarctic Polar Front and the ribbon worm *Parborlasia*
429 *corrugatus* (Nemertea: Lineidae). *Mol Ecol* 17: 5104-5117.

430

431 Thollesson M, Norenburg JL (2003) Ribbon worm relationships: a phylogeny of the
432 phylum Nemertea. *P Roy Soc Lond B Biol* 270: 407–415.

433

434 Wiens JJ (2007) Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Syst Biol*
 435 56: 875-878.

436

437 Yamaoka T (1940) The fauna of Akkeshi Bay. IX. Nemertini. *J Fac Sci, U Hokkaido* 6, 7:
 438 205- 261.

439

440

441

442 Figures

443 **Figure 1.** Figure 1. Specimens of *Malacobdella arrokeana* (A-D). A: unrelaxed mature
 444 female, B: relaxed male, C: original illustration (Ivanov et al. 2002), D: immature specimen
 445 (Scale bars: A, B: 10 mm; C: 3.5mm, D: 1mm). *Malacobdella japonica* (E-F); E: relaxed
 446 mature female, F: original illustration (Yamaoka, 1940) (Scale bars: E: 10mm; F: 1mm).
 447 *Malacobdella grossa* (G-I); G: unrelaxed mature female, H: immature specimen, I: original
 448 illustration (Riepen 1933) (Scale bars: A: 10mm, B: 4mm; C: 1mm). Abbreviations:
 449 terminal sucker (ts), gut undulations (u), ovaries (o), testes (t).

450

451 **Figure 2.** Haplotype phylogeny estimated by Bayesian analysis of *Malacobdella* species
 452 studied. The numbers above branches represent the posterior probabilities; the numbers
 453 below branches represent the bootstrap percentages of the MP and ML analysis,
 454 respectively. When a certain node was not recovered by one of the methods, a hyphen was
 455 added. Abbreviations: Ma, GSJ = *M. arrokeana*; Mja = *M. japonica*; *M. grossa* = *M.*
 456 *grossa*; Li and R.s = *Ramphogordius sanguineus*, from Argentina and GenBank

457 respectively; A.l = *Amphiporus lactifloreus*; P.c = *Paradrepanophorus crassus* and G.p =
458 *Geonemertes pelaensis*.

459

460

461

462 Tables

463 **Table 1.** List of species used in the analysis, including the sample locality, number of
464 specimens analysed (N) and GenBank accession numbers.

465 **Table 2.** Characteristic features of the analysed *Malacobdella* species.

466 **Table 1.** List of species used in the analysis, including the sample locality, number of
 467 specimens analysed (N) and GenBank accession numbers. (1) Voucher numbers are given
 468 only for *Malacobdella arrokeana* specimens from the previous work of Alfaya et al.
 469 (2013), and for *M. grossa* and *M. japonica* newly sequenced here. MNCN= Museo
 470 Nacional de Ciencias Naturales (Madrid, Spain); CNP-INV Invertebrate Collection of the
 471 Centro Nacional Patagónico (Argentina).

Species	Specimen ID	Locations	Position	N	GenBank Acc. number	References or voucher numbers(1)
<i>Malacobdella arrokeana</i>	Ma1	San Matías Gulf, Argentina	40°50'S/65°04'W	23	JX220596	CNP-INV 1879
	Ma2				JX220597	CNP-INV 1880
	Ma4				JX220599	CNP-INV 1881
	Ma5				JX220600	CNP-INV 1882
	Ma6				JX220601	CNP-INV 1883
	Ma7				JX220602	CNP-INV 1884
	Ma8				JX220603	CNP-INV 1885
	Ma9				JX220604	CNP-INV 1886
	Ma10				JX220605	CNP-INV 1887
	Ma11				JX220606	CNP-INV 1888
	Ma13				JX220607	CNP-INV 1889
	Ma14				JX220608	CNP-INV 1890
	Ma15				JX220609	CNP-INV 1891
	Ma16				JX220610	CNP-INV 1892
	Ma17				JX220611	CNP-INV 1893
	Ma18				JX220612	CNP-INV 1894
	Ma19				JX220613	CNP-INV 1895
	Ma20				JX220614	CNP-INV 1896
	Ma21				JX220615	CNP-INV 1897
	Ma22				JX220616	CNP-INV 1898
Ma23	JX220617	CNP-INV 1899				
Ma24	JX220618	CNP-INV 1900				
Ma27	JX220620	CNP-INV 1901				
MaA1	Nuevo Gulf, Argentina	42°.55'S/64°30'W	7	JX220621	CNP-INV 1902	
MaA2				JX220622	CNP-INV 1903	
MaA3				JX220623	CNP-INV 1904	
MaA4				JX220624	CNP-INV 1905	
MaA6				JX220625	CNP-INV 1906	
MaB1				JX220626	CNP-INV 1907	
MaB2				JX220627	CNP-INV 1908	
GSJ5A	San José Gulf, Argentina	42°20'S/64°10'W	8	JX220629	CNP-INV 1909	
GSJ5B				JX220630	CNP-INV 1910	
GSJJ5				JX220638	CNP-INV 1911	
GSJJ6				JX220639	CNP-INV 1912	
GSJJ7				JX220640	CNP-INV 1913	
GSJJ8				JX220641	CNP-INV 1914	
GSJJ9				JX220642	CNP-INV 1915	
GSJJ10				JX220643	CNP-INV 1916	

<i>M. japonica</i>	Mja1	Hokkaido, Japan	43°3'N/144°51'E	13	KF597252	MNCN-5.02/3				
	Mja2				KF597253	MNCN-5.02/4				
	Mja4				KF597254	MNCN-5.02/5				
	Mja5				KF597255	MNCN-5.02/6				
	Mja6				KF597256	MNCN-5.02/7				
	Mja7				KF597257	MNCN-5.02/8				
	Mja8				KF597258	MNCN-5.02/9				
	Mja10				KF597259	MNCN-5.02/10				
	Mja11				KF597260	MNCN-5.02/11				
	Mja12				KF597261	MNCN-5.02/12				
	Mja13				KF597262	MNCN-5.02/13				
	Mja14				KF597263	MNCN-5.02/14				
	Mja15				KF597264	MNCN-5.02/15				
	<i>M. grossa</i>				Mgrossa197	Tjärnö, Sweden	58°53'N/011°5'E	12	KF597241	MNCN-5.02/16
					Mgrossa198				KF597242	MNCN-5.02/17
Mgrossa201		KF597243	MNCN-5.02/18							
Mgrossa202		KF597244	MNCN-5.02/19							
Mgrossa203		KF597245	MNCN-5.02/20							
Mgrossa204		KF597246	MNCN-5.02/21							
Mgrossa205		KF597247	MNCN-5.02/22							
Mgrossa206		KF597248	MNCN-5.02/23							
Mgrossa207		KF597249	MNCN-5.02/24							
Mgrossa208		KF597250	MNCN-5.02/25							
Mgrossa209		KF597251	MNCN-5.02/26							
Mgrossa GB 1		White Sea, Russia	1	HQ848591	Andrade et al. (2012)					
Mgrossa GB 2				AJ436905	Thollesson & Norenburg (2003)					
<i>Ramphogordius sanguineus</i>		R.s1	Maine, USA		1	HQ848580	Andrade et al. (2012)			
	R.s2	Anglesey, UK		1	AJ436938	Thollesson & Norenburg (2003)				
<i>Amphiporus lactifloreus</i>	Li2	Nuevo Gulf, Argentina		4	XX000000	CNP-INV 1917				
	Li3				XX000000	CNP-INV 1918				
	Li4				XX000000	CNP-INV 1919				
	Li5				XX000000	CNP-INV 1920				
	A.l				Anglesey, UK	53°17'N/04°03'W	1	HQ848611	Andrade et al. (2012)	
<i>Paradrepanophorus crassus</i>	P.c	Galicia, Spain		1	HQ848603					
<i>Geonemertes pelaensis</i>	G.p1	St. Davis, Bermuda		2	HQ848592					
	G.p2	Bermuda			EU255602	Mateos & Giribet (2008)				

472

473

474

475 **Table 2.** Characteristic features of the analyzed *Malacobdella* species.

Features	<i>M. arrokeana</i> Ivanov et al. 2002	<i>M. japonica</i> Takakura 1897	<i>M. grossa</i> (Müller 1776)
Excretory pores	dorso-lateral (40% of length)	dorso-lateral (25% of length) (Yamaoka 1940)	ventro-lateral
Proboscis length	most of the rhynchocoel, 80-90	two-thirds of the rhynchocoel length (Yamaoka 1940)	two-thirds of the rhynchocoel length
Proboscis retractor muscle	curved dorsally and attached to the body muscular wall	originates ventrally and ends freely in the parenchyma (Yamaoka 1940)	originates ventrally next to the terminal sucker (Riepen 1933)
Ovaries colour (Mature)	white or purple (Teso et al. 2006)	rosy (Yamaoka 1940)	olive-green or yellowish-green (Gibson 1968)
Testicles colour (Mature)	pale rose (Teso et al. 2006)	white (Yamaoka 1940)	rosy or pinkish hue (Gibson 1968)
Nerve commissure	dorsal in the posterior part of the intestine just before the anus	far behind the anus along the posterior margin of the sucker (Yamaoka 1940) (posterior around the terminal sucker)	dorsal in the posterior part of intestine, above the anus
Host specificity	high (only in <i>Panopea abbreviata</i>)	high (only in <i>Spisula sachalinensis</i>)	low (27 species)
Geographic distribution	South Atlantic Ocean (North Patagonian gulfs)	North Pacific Ocean (Northern Japan)	North Atlantic Ocean (Europe and North America) North Pacific Ocean (North America)

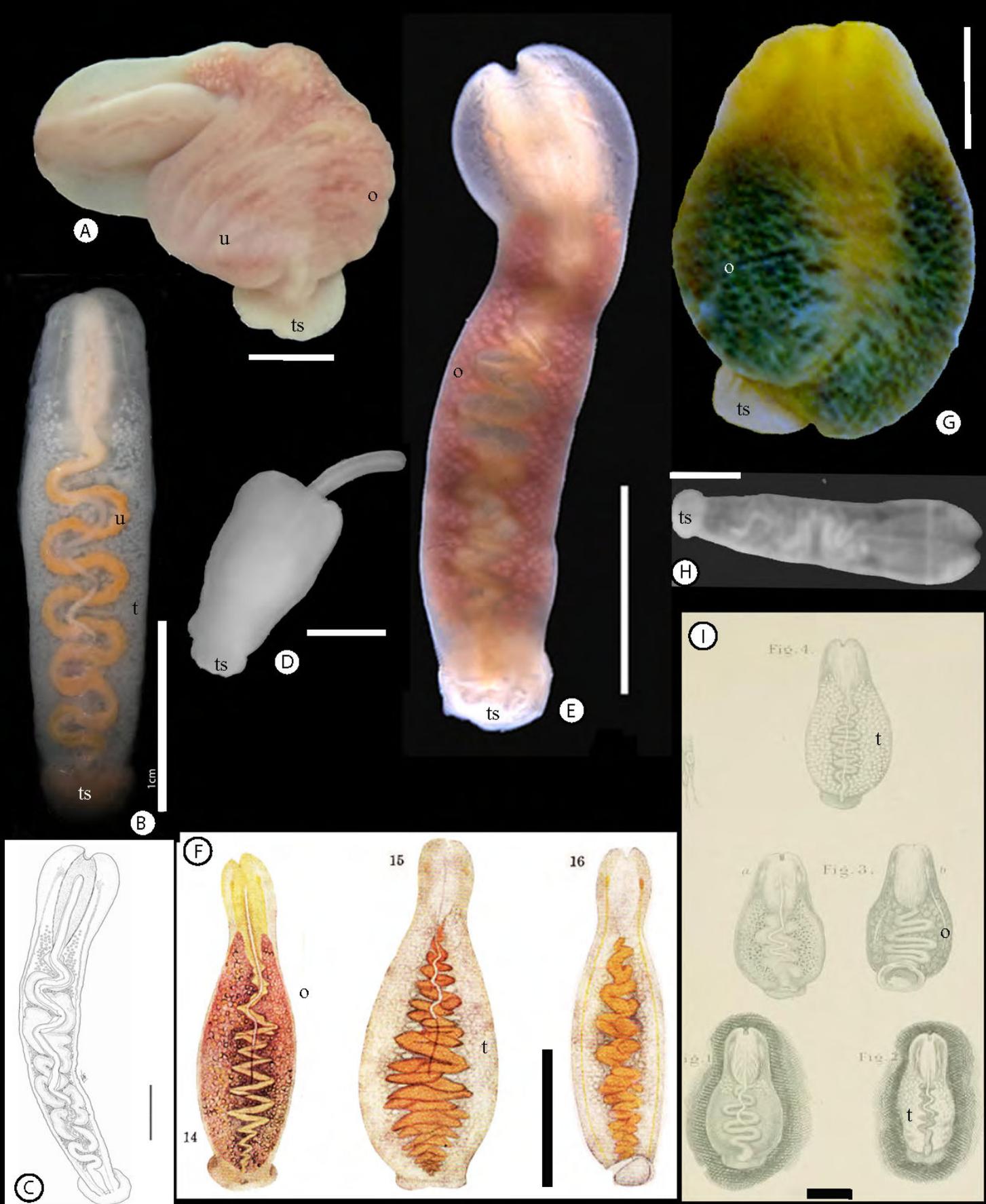


Figure 1

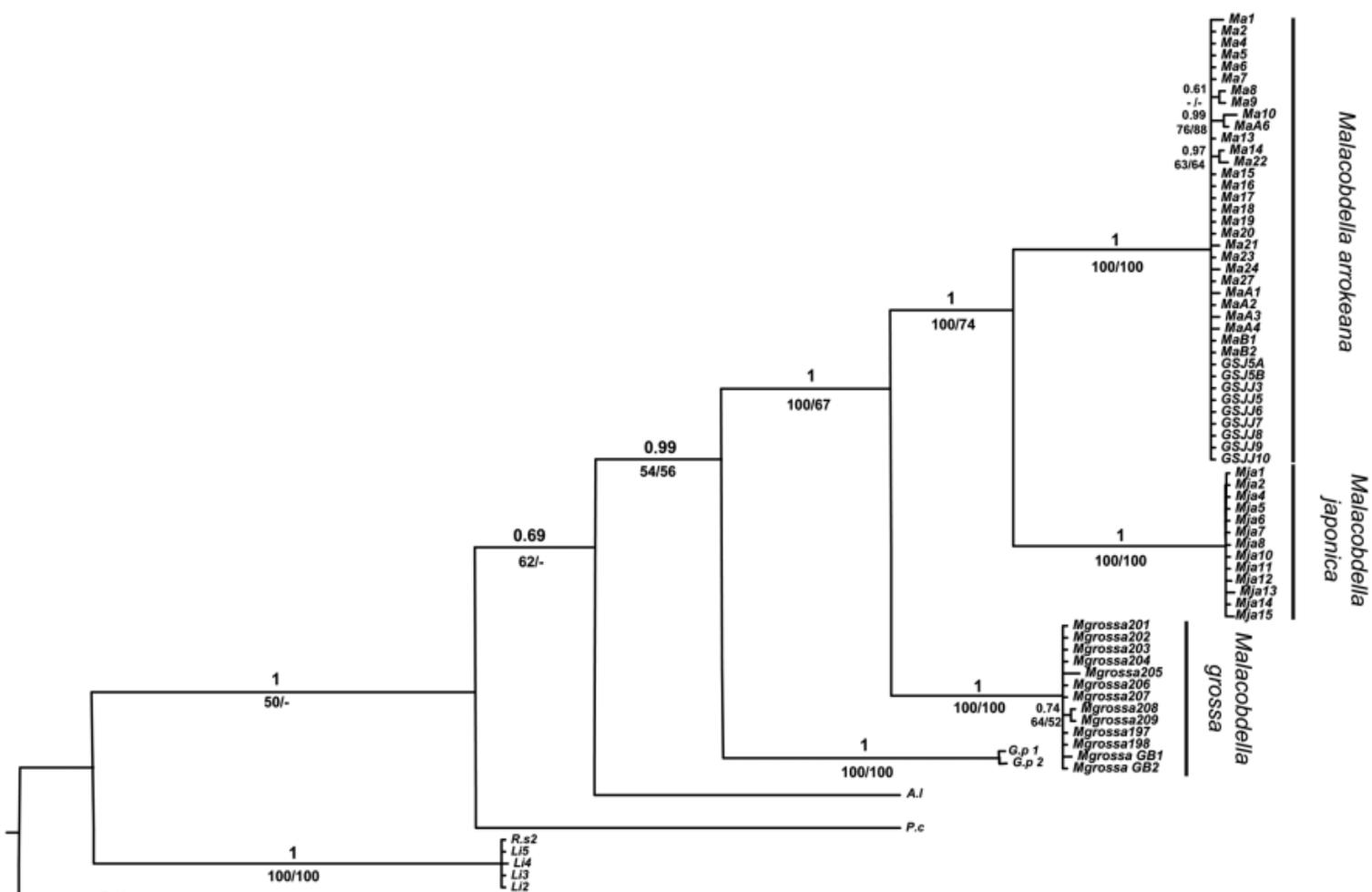


Figure 2

Mitochondrial and nuclear markers reveal a lack of genetic structure in the entocommensal nemertean *Malacobdella arrokeana* in the Patagonian gulfs

José E. F. Alfaya · Gregorio Bigatti ·
Annie Machordom

Received: 25 February 2012 / Revised: 2 August 2012 / Accepted: 4 August 2012 / Published online: 24 August 2012
© Springer-Verlag and AWI 2012

Abstract *Malacobdella arrokeana* is an entocommensal nemertean exclusively found in the bivalve geoduck *Panopea abbreviata*, and it is the only representative of the genus in the southern hemisphere. To characterize its genetic diversity, population structure and recent demographic history, we conducted the first genetic survey on this species, using sequence data for the cytochrome oxidase I gene (COI), 16S rRNA (16S) and the internal transcribed spacer (ITS2). Only four different ITS2 genotypes were found in the whole sample, and the two main haplotypes identified in the mitochondrial dataset were present among all localities with a diversity ranging from 0.583 to 0.939. Nucleotide diversity was low ($\pi = 0.001\text{--}0.002$). No significant genetic structure was detected between populations, and mismatch distribution patterns and neutrality tests results are consistent with a population in expansion or under selection. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that the largest level of variance observed was due to intrapopulation variation (100, 100 and 94.39 % for 16S, COI and ITS2, respectively). F_{st} values were also non-significant. The observed lack of population structure is likely due to high levels of genetic connectivity in combination with the lack or permeability of biogeographic barriers and episodes of habitat modification.

Keywords Nemertean · Entocommensal · Geoduck · Genetic variation · Patagonia

Introduction

Few studies in nemertean biology have examined the genetic structure of nemertean populations (Sundberg and Strand 2007; Thornhill et al. 2008; Andrade et al. 2011). Here, we present the first genetic characterization of the genetic diversity, population structure and recent demographic history of the entocommensal nemertean *Malacobdella arrokeana* Ivanov et al. 2002. Members of the genus *Malacobdella* belong to the order Hoplonemertea. Shared characteristics include direct development and non-feeding planuliform larvae (Maslakova and von Döhren 2009). *Malacobdella arrokeana* lives commensally within the mantle cavity of the bivalve geoduck *Panopea abbreviata* Valenciennes, 1839 and is the only species of the genus reported in the southern Atlantic Ocean (Ivanov et al. 2002). It attaches to host mantle tissues by means of its terminal sucker. In general, each bivalve hosts a single mature nemertean. Teso et al. (2006) and Vázquez et al. (2009) reported that from 99.4 to 100 % ($n = 762$ geoducks in total from the two studies) of *P. abbreviata* were inhabited by at least one specimen of *M. arrokeana* (with a maximum of 191 specimens in one clam). Populations of *M. arrokeana* and its host, *P. abbreviata* (also an endemic species of the South Atlantic Ocean), are abundant in the northern Patagonian gulfs; they live in aggregations, buried deeply (up to 40 cm in depth) in sand and mud substrata (Morsan et al. 2010 and references therein). The northern Patagonian San Matías, San José and Nuevo gulfs (Fig. 1A) occur at the limit of the Magellanic and

Communicated by M. Thiel.

J. E. F. Alfaya · G. Bigatti
LARBIM, Centro Nacional Patagónico (CENPAT-CONICET),
Bvd. Brown 2915, U9120ACV Puerto Madryn,
Chubut, Argentina

A. Machordom (✉)
Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN-CSIC),
José Gutiérrez Abascal, 2, 28006 Madrid, Spain
e-mail: annie@mncn.csic.es

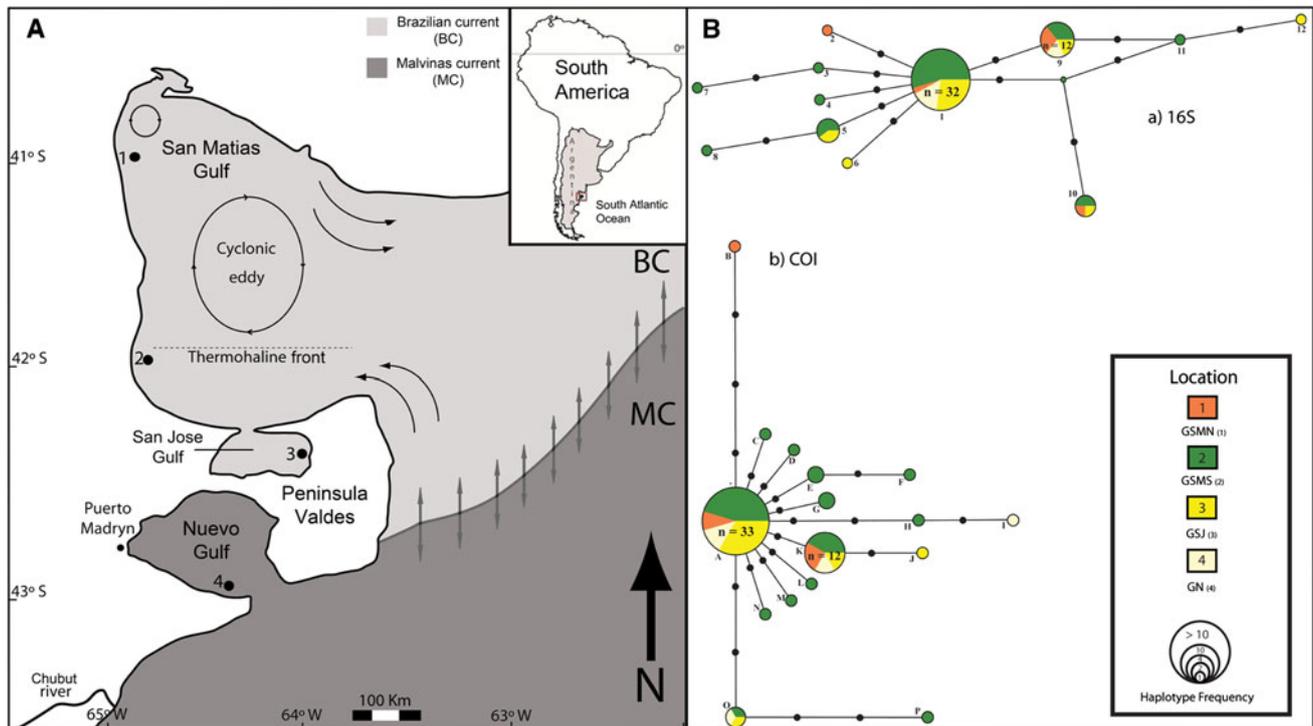


Fig. 1 **A** Southern Atlantic Ocean populations of the geoduck *Panopea abbreviata* were collected from: 1 El Sótano (northwest coast of San Matías gulf), 2 Puerto Lobos (southwest coast of San Matías gulf), 3 Punta Conos (San José gulf) and 4 Bahía Craker (Nuevo gulf). In all areas, samples were collected at depths between 5 and 25 m. **B** Networks of North Patagonian gulf populations of *Malacobdella arrokeana* analyzed, using 95 % connectivity level. **a** Network based on 16S mtDNA. **b** Network based on COI mtDNA. Alphanumeric names (designated by letters corresponding to COI

sequences and numbers corresponding to 16S sequences) are provided for each haplotype. Sampled haplotypes are indicated by colored circles, according to the geographical region from which the sample was collected as in **A**; missing or unsampled haplotypes are indicated by black dots. Each branch indicates a single mutational difference. Circle size is proportional to observed haplotype frequency; observed number of ancestral haplotypes is indicated by “n=” (the number of times each haplotype was obtained). GSMN northern San Matías gulf, GSMS southern San Matías gulf, GSJ San José gulf, GN Nuevo gulf

Argentinian biogeographic provinces. Each of these provinces has different oceanographic conditions (Scarabino 1977, Boschi 2000). The latitudinal thermal gradient in this area is controlled by the shallow and cold Malvinas current that flows northwards and by the warm Brazilian current that flows southwards (Martínez and del Río 2002). Peninsula Valdes is considered the confluence zone and a natural barrier. However, some taxa are represented in both provinces (Boschi 2000); this is the case for *M. arrokeana* and its host.

Previous studies on other marine invertebrates showed differences among Patagonian gulf populations. For example, Real et al. (2004) reported genetic variation between northern and southern San Matías populations of the scallop *Aequipecten tehuelchus*, estimating that genetic distances were higher between San Matías populations than between these populations and San José gulf population. *Panopea abbreviata* specimens from different populations of the San Matías gulf indicate different rates of individual growth between populations located on either side of the thermohaline front (Morsan et al. 2010). Considering the

supposedly limited larval dispersal capacity of *M. arrokeana*, its strict association with a sessile bivalve and the particularities of its habitats (in gulfs isolated due to different causes), a certain level of genetic structure among *M. arrokeana* populations is expected.

Materials and methods

Sampling

Malacobdella arrokeana specimens were sampled in an area that covers the entire Argentinian *P. abbreviata* distribution sensu Scarabino (1977), from Mar del Plata (800 km North of GSM, coast of Argentina 38°S) to Puerto Deseado (550 km south of the Nuevo gulf) at depths ranging from 15 to 20 m. Specimens were only found in three northern Patagonian gulfs: San Matías-north, El Sótano (GSMN, $n = 7$), and San Matías-south, Puerto Lobos (GSMS, $n = 35$); San José (GSJ, $n = 17$) and Nuevo (GN, $n = 8$) (Fig. 1A). The clams were collected by SCUBA

diving, using a hydro-jet to dislodge them from the substratum.

Clams were transported isolated in plastic bags and opened in the laboratory by severing both anterior and posterior adductor muscles. All of the *M. arrokeana* inside each clam were removed alive using a scalpel, and immediately fixed in absolute ethanol. The low numbers of samples from the GSMN and GN populations were due to low *P. abbreviata* population densities at greater depths (25–30 m).

DNA extraction, PCR amplification, and sequencing

Nemertean (and voucher geoducks) specimens were stored in absolute ethanol. DNA was extracted from preserved tissue using the DNeasy extraction Kit (Qiagen, Inc.) according to the manufacturer's protocol. Partial nemertean COI, 16S and ITS2 sequences were amplified by PCR using the following primers: 16sar-L and 16sbr-H (Palumbi et al. 1991) for 16S; LCO1490 (Folmer et al. 1994) and COI-H (Machordom et al. 2003) for COI and ITS2-3d (White et al. 1990) and ITS2-4r (5'-AGT TTY TTT TCC TCC GCT TA-3') (modified from White et al. 1990) for ITS2. Amplifications were carried out in a 50 µl of final volume reaction containing 5 µl of 10× buffer (containing 10 × 2 mM MgCl₂), 1 µl dNTPs mix (10 mM), 0.8 µl of each primer (10 µM), 0.4 µl of *Taq* DNA polymerase (5 U/µl) (Biotools) and 1–3 µl of genomic DNA. Thermocycling for the COI fragment included an initial 4 min denaturation step at 94 °C, followed by 40 cycles of 45 s at 94 °C, 1 min at 46.5 °C and 1 min at 72 °C. The cycle ended with 10 min of sequence extension at 72 °C. For 16S and ITS2, we used the same cycle parameters, but annealing temperatures were 42 and 47 °C, respectively. Products were visualized under blue light in 0.8 % agarose gels stained with SYBR Safe (Invitrogen), with co-migrating 100 bp or 1 Kb ladder molecular weight markers. The amplification products (approximately 700 bp for each gene) were purified by ethanol precipitation. Sequencing of selected fragments was performed for both strands in an automatic ABI 3730 sequencer (Applied Biosystems Inc.) using BigDye Terminator kits.

Approximately 1900 base pairs were sequenced for *M. arrokeana* (658 bp for the mitochondrial COI, 533 bp for 16S and approximately 700 bp for the nuclear ITS2) (GenBank accession numbers JX220535–JX220725).

Data analysis

Sequences of each sample analyzed were refined by strand comparison, and primers sequences cut using the Sequencher program (Gene Code Corporation) and aligned using Se-AL 2.0a11 (Rambaut 2002). Haplotype networks analyses were

performed using TCS 1.18 (Clement et al. 2000) and Network 4.5 (www.fluxus-engineering.com), with default parameters, 95 % limit connection and gaps considered as either a fifth character state or as missing data. Only the 16S data set presented a reticulation.

For each fragment, and when appropriate for a concatenated matrix of COI, 16S and ITS2 data, genetic parameters of differentiation (e.g., number of haplotypes, haplotype and nucleotide diversities, F-statistics, AMOVA [considering each locality separately and also grouped by gulf], mismatch distribution, Tajima's *D*, Fu's *F_s* tests of neutrality) were obtained using the following software: Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer 2010) and DnaSP 5.0 (Librado and Rozas 2009).

To test the hypothesis of correlation between genetic and geographic distance, we performed 1000 randomizations of a Mantel test using the program IBDWS (Jensen et al. 2005) and the *F_{st}* and linearized *F_{st}* (i.e., $F_{st}/(1 - F_{st})$) against the logarithm of geographic distance. Demographic population history was inferred by comparing mismatch distributions of pairwise nucleotide differences among haplotypes of each gene, both separately and combined, using Arlequin 3.5.

Results

Specimens of *P. abbreviata* were only found from the San Matías gulf to the Nuevo gulf, and no evidence of living or empty shells was reported south of the Nuevo gulf. All but 3 of the geoducks (2 from GSMS and 1 from GSJ) sampled contained a single adult specimen of *M. arrokeana*. The two mentioned clams from GSMS hosted 3 and 6, and the clam from GSJ 7 immature nemerteans, respectively, but no mature ones.

Sixteen exclusive haplotypes were found for COI, twelve for 16S and four for ITS2. The two most frequent haplotypes observed for COI and 16S (found in 33 and 12 specimens for COI and 32 and 12 for 16S) were shared among all localities. Haplotype diversity (*H_d*) was relatively high, ranging from 0.583 to 0.939 (Table 1). The different networks for each gene or for the matrix that included the 3 gene regions (Fig. 1B, ITS2 not shown) revealed a high number of rare haplotypes, differing primarily by a single mutational step with the most frequent haplotype/genotype. Therefore, low nucleotide diversity (π) of 0.001–0.002 was observed (Table 1). The majority of the rare haplotypes belonged to the immature specimens, which did not have the most frequent haplotypes (these were only found in mature specimens).

There was almost no genetic differentiation among populations: AMOVA, either examining each population separately or grouped by gulfs, revealed that most of the

Table 1 Genetic population parameters recorded for *M. arrokeana* in the four different populations

	16S					COI				
	<i>n</i>	Hd	π	Fu's	Ta'D	<i>n</i>	Hd	π	Fu's	Ta'D
GSMN	5	0.700	0.002	-0.475	0.243	7	0.714	0.001	-0.237	0.206
GSMS	32	0.671	0.002	-4.163*	-1.362	32	0.778	0.002	-9.171***	-2.058*
GSJ	16	0.683	0.002	-3.011	-0.793	15	0.447	0.001	-0.064	-1.009
GN	8	0.607	0.001	-0.478	-0.448	8	0.750	0.002	-0.197	-1.280
TOTAL	61	0.673	0.002	-6.973***	-1.436	63	0.687	0.002	-10.960***	-2.034*

	ITS-2					3 MARKERS				
	<i>n</i>	Hd	π	Fu's	Ta'D	<i>n</i>	Hd	π	Fu's	Ta'D
GSMN	7	0.809	0.001	-1.390	-0.654	5	1.000	0.001	-2.371	-0.190
GSMS	35	0.569	0.001	-1.576	-0.793	30	0.954	0.001	-11.974	-1.867
GSJ	17	0.323	0.000	-1.038	-1.069	13	0.871	0.001	-5.391	-0.945
GN	8	0.750	0.001	-1.096	-0.304	8	0.964	0.001	-2.870	-0.958
TOTAL	67	0.583	0.001	-0.893	-0.387	56	0.939	0.001	-26.19	-1.727

GSMN and GSMS northern and southern populations of the San Matías gulf, GSJ San José gulf, GN Nuevo gulf, *n* number of samples, Hd haplotype diversity, π nucleotide diversity, Fu's and Ta'D represent the values obtained in Fu's *F_s* and Tajima's *D* tests, respectively. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

observed variance was due to intrapopulation variation (100, 100, and 94.39 % for 16S, COI, and ITS2, respectively). F_{st} values for the four populations were negative for both of the mitochondrial genes and not statistically significant. Since the range for F_{st} values is 0–1, but due to software limitations, negative values are sometimes provided for very small F_{st} values, such figures should be considered zero (Long 1986), indicating no differentiation among populations. For ITS2, F_{st} was 0.056, which was also not significant ($p = 0.067$). Mantel tests showed no relationships between the different F_{st} values ($Z = 0.0059$, $r = -0.1583$, $p = 0.62$) or the linearized F_{st} values ($Z = 0.0132$, $r = -0.1611$, $p = 0.64$), with respect to geographic distances.

Mismatch distributions for each gene and population, and for combined matrices showed the same expansion/selection model profile, except for COI sequences from Nuevo gulf specimens, which resulted in a bimodal curve. In addition, Fu's *F_s* and Tajima's *D* values were mainly negative (Table 1) and significant when the number of specimens analyzed was sufficiently large for both mitochondrial markers. Considering all of the populations together, Fu's *F_s* and Tajima's *D* values were both significant only for COI, and Fu's *F_s* was only significant for 16S. Although both parameters were also negative for ITS2, no significance was detected.

Discussion

No *P. abbreviata* populations were found outside of the Patagonian gulfs, and *M. arrokeana* was never found

outside of its host or in other bivalves. The difficulty in host sampling (as animals are deeply buried in the sediment) makes extraction by trawling impossible, and the low visibility in waters outside the northern Patagonian gulfs makes manual extraction difficult. Furthermore, north of the Patagonian gulfs, *P. abbreviata* lives in deeper waters (at depths of 70–200 m) (F. Scarabino, personal communication). The low density observed in Nuevo gulf might denote the distribution limit of *P. abbreviata*.

In our study, a lack of genetic differentiation was observed among populations living in the different gulfs. This result is consistent with previous studies in nemertean genetic populations. Rogers et al. (1997) found evidence of low genetic differentiation in populations of two different free-living nemertean species, which are separated by large geographic distances (thousands of km). Thornhill et al. (2008) and Sundberg and Strand (2007), using partial COI and 16S gene sequences, also detected a homogeneous genetic structure in populations of the heteronemertean *Parborlasia corrugatus* from South America and of *Riseriallus oculatus* from Spain and Wales, respectively. Thornhill et al. (2008) only observed genetic structure on either side of Drake Passage, a strong barrier to gene flow.

Several aspects of nearshore oceanographic conditions in the Patagonian gulfs are consistent with the geographical patterns in gene flow observed in this study. Along the Patagonian coast, the tidal range is among the highest in the world, generating strong currents and significant variations in sea level (Palma et al. 2004). The shelf water of the Malvinas current enters from south of the San Matías gulf, determining a water residence time in the San Matías

gulf of approximately 300 days (Rivas and Beier 1990). Low levels of genetic differentiation related to larval retention and oceanographic conditions were previously shown in many invertebrate species populations along the Pacific coast (Sotka et al. 2004; Kelly and Palumbi 2010). Besides, the Argentinean coasts suffered several glacial periods (following the Pleistocene, as well as in the Late Miocene and Holocene) that resulted in changes in sea level, salinity and temperature (Martínez and del Río 2002). Due to such changes, new available niches might have led to the rapid expansion of cold-water species, such as *P. abbreviata* and therefore to its closely associated entocommensal, *M. arrokeana*. Population expansion from restricted areas into newly available habitats from marine refugia could explain the loss of genetic structure of nearshore fishes and invertebrates (Sotka et al. 2004 and references therein).

Interestingly, only one mature *M. arrokeana* is usually found inside a single geoduck. When more than one *M. arrokeana* were found inside a single *P. abbreviata*, those nemerteans were immature (Ivanov et al. 2002; Teso et al. 2006; Vázquez et al. 2009; this study). This finding indicates an exclusion process during maturation of the nemertean, likely due to intraspecific competition for space (see Bush and Lotz 2000), chemical inhibition of maturation between individuals (Teso et al. 2006), or both. Our results showed that the three cases in which more than one nemertean was found per geoduck, the corresponding specimens presented a proportionately larger number of rare haplotypes (mature-common, immature-rare). Although based on the low numbers of immature specimens examined here, we wonder whether, in addition to the factors mentioned above, a selection of common haplotypes could be acting on these populations. Future research efforts, such as analyzing more cases of multiple specimens in a single clam in combination with the analysis of highly variable markers (e.g., microsatellites), will help shed light on the potential selection pressures affecting populations of *M. arrokeana*.

Acknowledgments The authors thank Ricardo Vera, Miguel Ángel Díaz, Néstor Ortiz, Pilar Casado de Amezúa, Iván Acevedo and Ricardo García-Jiménez for providing samples and technical support, and David Buckley, Patricia Cabezas, three anonymous reviewers and Martin Thiel for their valuable comments. Ana Burton and Melinda Modrell revised the English. This study was financially supported by grants from the Fundación BBVA (Conservation Biology program), the Lerner-Gray Fund for Marine Research (AMNH), Ministerio de Educación de la provincial de Chubut and the Agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo (AECID: A/023484/09 and A/032441/10).

References

Andrade SCS, Norenburg JL, Solferini VN (2011) Worms without borders: genetic diversity patterns in four Brazilian

- Ototyphlonemertes* species (Nemertea, Hoplonemertea). Mar Biol 158:2109–2124
- Boschi E (2000) Species of decapod crustaceans and their distribution in the American marine zoogeographic provinces. Rev Investig Desarrollo Pesquero 13:7–136
- Bush AO, Lotz JM (2000) The ecology of “crowding”. J Parasitol 86:212–213
- Clement M, Posada D, Crandall K (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Mol Ecol 9:1657–1660
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol Ecol Resour 10:564–567
- 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. Mol Mar Biol Biotech 3:294–299
- Ivanov VA, Bigatti G, Penchaszadeh PE, Norenburg JL (2002) *Malacobdella arrokeana* (Nemertea: Bdellonemertea), a new species of nemertean from the Southwestern Atlantic Ocean entocommensal in *Panopea abbreviata* (Bivalvia, Heterodonta, Hiatellidae) in Argentina. Proc Biol Soc Wash 115:359–367
- Jensen JL, Bohonak AJ, and Kelley ST (2005) Isolation by distance, web service. BMC Genetics 6:13. v.3.23. <http://ibdws.sdsu.edu/>
- Kelly RP, Palumbi SR (2010) Genetic structure among 50 species of the Northeastern Pacific rocky intertidal community. PLoS ONE 5(1):e8594
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25:1451–1452
- Long JC (1986) The allelic correlation structure of Gainj- and Kalam-speaking people. I. The estimation and interpretation of Wright’s F-statistics. Genetics 112:629–647
- Machordom A, Araujo R, Erpenbeck D, Ramos MA (2003) Phylogeography and conservation genetics of endangered European Margaritiferidae (Bivalvia: Unionoidea). Biol J Linn Soc 78: 235–252
- Martínez S, del Río CJ (2002) Late Miocene molluscs from the southwestern Atlantic Ocean (Argentina and Uruguay): a palaeobiogeographic analysis. Palaeogeogr Palaeoecol 188:167–187
- Maslakova SA, von Döhren J (2009) Larval development with transitory epidermis in *Paranemertes peregrina* and other hoplonemerteans. Biol Bull 216:273–292
- Morsan E, Zaidman P, Ocampo-Reinaldo M, Ciocco N (2010) Population structure, distribution and harvesting of southern geoduck, *Panopea abbreviata*, in San Matías Gulf (Patagonia, Argentina). Sci Mar 74:763–772
- Palma ED, Matano RP, Piola R (2004) A numerical study of the Southwest Atlantic Shelf Circulation: Barotropic response to tidal and wind forcing. J Geophys Res 109:CO8014
- Palumbi S, Martin A, Romano S, McMillian WO, Stice L, Grabowski G (1991) The simple fool’s guide to PCR. University of Hawaii, Honolulu
- Rambaut A (2002) Se-AL v. 2.0a11: sequence alignment program. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>
- Real LE, Julio N, Gardenal NC, Ciocco NF (2004) Genetic variability of Tehuelche scallop, *Aequipecten tehuelchus* populations from the Patagonian coasts (Argentina). J Mar Biol Assoc UK 84: 235–238
- Rivas AL, Beier EJ (1990) Temperature and salinity fields in the northpatagonic Gulfs. Oceanol Acta 13:15–20
- Rogers AD, Thorpe JP, Gibson R, Norenburg JL (1997) Genetic differentiation of populations of the common intertidal nemerteans *Lineus ruber* and *Lineus viridis* (Nemertea, Anopla). Hydrobiologia 365:1–11
- Scarabino V (1977) Moluscos del Golfo San Matías (Provincia de Río Negro, República Argentina). Inventario y claves para su identificación. CSMU 4:177–285

- Sotka EE, Wares JP, Barth JA, Grosberg RK, Palumbi SR (2004) Strong genetic clines and geographical variation in gene flow in the rocky intertidal barnacle *Balanus glandula*. *Mol Ecol* 13: 2143–2156
- Sundberg P, Strand M (2007) Genetics do not reflect habitat differences in *Riseriellus occultus* (Heteronemertea, Nemertea) from Spain and Wales. *Mar Biol Res* 3:117–122
- Teso SV, Bigatti G, Bazterrica MC, Ciocco NF, Penchaszadeh PE (2006) The reproductive cycle of the entocommensal nemertean *Malacobdella arrokeana* and its symbiosis with the geoduck *Panopea abbreviata*. *Invertebr Biol* 125:314–324
- Thornhill DJ, Mahon AR, Norenburg JL, Halanych KM (2008) Open-ocean barriers to dispersal: a test case with the Antarctic Polar front and the ribbon worm *Parborlasia corrugatus* (Nemertea: Lineidae). *Mol Ecol* 17:5104–5117
- Vázquez N, Bigatti G, Ituarte C, Cremonte F (2009) Attachment of the nemertean *Malacobdella arrokeana* to mantle tissues of the geoduck *Panopea abbreviata* and survival outside the host. *J Shellfish Res* 28:759–761
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press Inc, New York, pp 315–322

Erratum to: Mitochondrial and nuclear markers reveal a lack of genetic structure in the entocommensal nemertean *Malacobdella arrokeana* in the Patagonian gulfs

José E. F. Alfaya · Gregorio Bigatti ·
Annie Machordom

Published online: 14 January 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg and AWI 2014

Erratum to: Helgol Mar Res (2013) 67:407–412
DOI 10.1007/s10152-012-0326-z

In the article, we noted some errors that we considered inaccurate and should be changed to prevent its spread.

The corrected figure and caption are given below:

In the page 408, Figure 1A, in the figure text “*Brazilian Current (BC)*”, should be “*Argentinean Biogeographic Province (ABP)*” and “*Malvinas Current (MC)*”, should be “*Magellanic Biogeographic Province (MBP)*” (Fig. 1).

Furthermore, the corrections in the discussion sections are:

In page 410, third paragraph, the last sentence of the page 410: “*The shelf water of the Malvinas current enters from south of the San Matías gulf, determining a water residence time in San Matías gulf of approximately 300 days (Rivas and Beier 1990)*”, should be: “The low salinity waters coming from the continental shelf enters to San Matias gulf through the southern part of its mouth and remains inside approximately 300 days (Rivas and Beier 1990)”.

The online version of the original article can be found under doi:[10.1007/s10152-012-0326-z](https://doi.org/10.1007/s10152-012-0326-z).

J. E. F. Alfaya · G. Bigatti
LARBIM, Centro Nacional Patagónico (CENPAT-CONICET),
Bvd. Brown 2915, U9120ACV Puerto Madryn, Chubut,
Argentina

A. Machordom (✉)
Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN-CSIC),
José Gutiérrez Abascal, 2, 28006 Madrid, Spain
e-mail: annie@mncn.csic.es

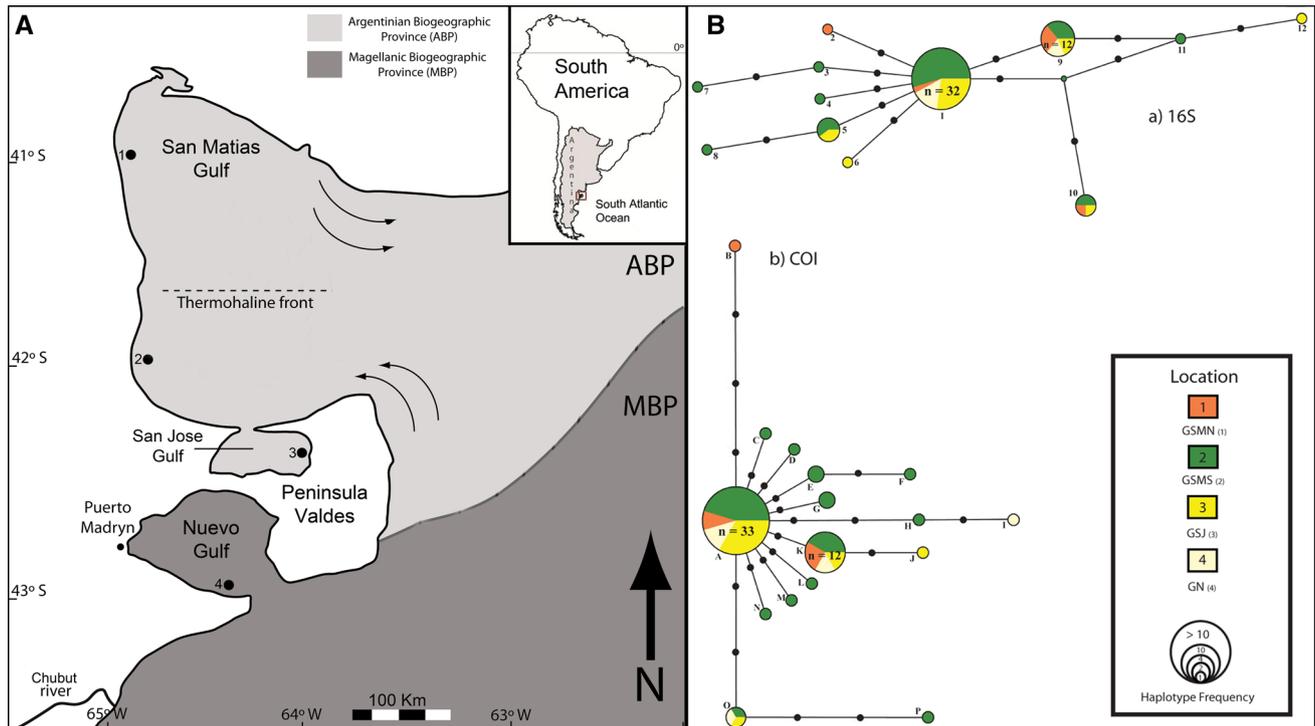


Fig. 1 **A** Southern Atlantic Ocean populations of the geoduck *Panopea abbreviata* were collected from: 1 El Sótano (northwest coast of San Matías gulf), 2 Puerto Lobos (southwest coast of San Matías gulf), 3 Punta Conos (San José gulf) and 4 Bahía Craker (Nuevo gulf). In all areas, samples were collected at depths between 5 and 25 m. **B** Networks of North Patagonian gulf populations of *Malacodella arrokeana* analyzed, using 95 % connectivity level. **a** Network based on 16S mtDNA. **b** Network based on COI mtDNA. Alphanumeric names (designated by letters corresponding to COI

sequences and numbers corresponding to 16S sequences) are provided for each haplotype. Sampled haplotypes are indicated by colored circles, according to the geographical region from which the sample was collected as in **A**; missing or unsampled haplotypes are indicated by black dots. Each branch indicates a single mutational difference. Circle size is proportional to observed haplotype frequency; observed number of ancestral haplotypes is indicated by “n=” (the number of times each haplotype was obtained). *GSMN* northern San Matías gulf, *GSMS* southern San Matías gulf, *GSJ* San José gulf, *GN* Nuevo gulf

Development and characterization of microsatellite loci in the entocommensal *Malacobdella arrokeana* (Nemertea: Bdellonemertea), from Patagonia (Argentina) and cross-amplification in 34 nemertean species

José E. F. Alfaya · Violeta López-Márquez ·
Ricardo García-Jiménez · Fernando Ángel Fernández-Álvarez ·
Gregorio Bigatti · Annie Machordom

Received: 6 August 2013 / Accepted: 13 August 2013 / Published online: 23 August 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Microsatellite loci (26 in total) were isolated for the first time for the entocommensal nemertean *Malacobdella arrokeana*, using 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. We developed conditions for amplifying these markers in 8 multiplex and 5 individual reactions. One to 14 alleles were detected per locus across 25 samples analyzed from San Matías Gulf, Patagonia (Argentina). For the 25 polymorphic loci, observed and expected heterozygosities ranged from 0.125 to 0.920 and 0.119 to 0.890, respectively; five loci deviated from Hardy–Weinberg equilibrium. Limited distribution and host specificity of *M. arrokeana*, which only inhabits *Panopea abbreviata*, have endangered this nemertean given the unregulated commercial exploitation of its host. These useful markers provide data for future conservation strategies. Cross-amplifications were also tested in 34 nemertean species, representing the major lineages in this phylum. In total, 18 of the 26 loci (from one to 11 per species) gave clear allelic profiles.

Keywords Nemertean · Population structure · Patagonia · 454 pyrosequencing

José E. F. Alfaya and Violeta López-Márquez contributed equally to this work.

J. E. F. Alfaya · G. Bigatti
LARBITM, Centro Nacional Patagónico (CENPAT-CONICET),
Bvd. Brown 2915, U9120ACV, Puerto Madryn, Chubut,
Argentina

V. López-Márquez · R. García-Jiménez ·
F. Á. Fernández-Álvarez · A. Machordom (✉)
Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN-CSIC),
José Gutiérrez Abascal, 2, 28006 Madrid, Spain
e-mail: annie@mncn.csic.es

The family Malacobdellidae (Nemertea: Bdellonemertea) comprises a single genus, *Malacobdella*, with 6 species, all of which inhabit the mantle cavity of bivalves (Ivanov et al. 2002). *Malacobdella arrokeana* Ivanov et al. (2002) lives commensally within the mantle cavity of the geoduck *Panopea abbreviata* (Valenciennes, 1839). It is the only *Malacobdella* species reported in the southern Atlantic Ocean, and indeed, the entire southern hemisphere. Previous work analyzing two mitochondrial (COI, 16S) and one nuclear (ITS) DNA marker in *M. arrokeana* showed no genetic structure between four nemertean populations, which were mainly distributed in separate, well-characterized gulfs of northern Patagonia (Alfaya et al. 2013). Contrasting hypotheses were raised to explain this lack of genetic structure (such as larval dispersion, selection pressure and lack of molecular marker resolution). Therefore, to validate these hypotheses and provide conservation guidelines for this species, more information related to its population genetic structure is needed. Hence, for the first time in nemerteans, we have isolated microsatellite markers for *M. arrokeana* using 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing.

Malacobdella arrokeana specimens were collected inside *P. abbreviata* clams inhabiting the San Matías Gulf (41°37.5'S, 65°1.25'W), northern Patagonia. DNA was extracted from tissue using the BioSprint 15 DNA Blood Kit (Qiagen), according to manufacturer's protocol. Genomic libraries were constructed at the Cornell Evolutionary Genetics Core Facility (EGCF, USA) using the same biotinylated repeat probes and conditions as described in López-Márquez et al. (2013) for *P. abbreviata*.

A total of 17,273 contigs (from 28,922 sequences) were obtained and analyzed with MSATCOMMANDER (Faircloth 2008), which searched for simple repeats with a minimum of 8 perfect repeats for di- (809 contigs) and

Table 1 Characterization of 26 microsatellite loci in *Malacobdella arrokeana*

Locus name	Primer sequences 5′–3′	Repeat motif	Clone size	Alleles range	PCR reaction	Na	Ho	He	NAF	GenBank Access. number
Ma3	F: 6FAM-AGTCCAATTGTGTAGTAGAT R: AATTCTTTTAGGAAATTAAC	(CT) ₁₄ CC (CT) ₄	249	251–271	1	7	0.520	0.710	0.111	KF434343
Ma6	F: PET-TATGCTGTGAAAAATATGGGCT R: TGTTTTCTAACATTTTGAATTCCTG	(GGTA) ₈	153	147–179	2	6	0.920	0.708	0	KF434344
Ma7	F: VIC-CAACCTCGTTGAAAAATCTA R: TCGGGTATTTAAAAGGTCTTC	(AATG) ₈	127	118–158	3	10	0.333	0.706 ^a	0.218	KF434345
Ma8	F: 6FAM-ACCAAATTATGATTGGATG R: AAAATTACAATCTAACGCAG	(AGTT) ₉	189	188–220	4	6	0.640	0.746	0.060	KF434346
Ma12	F: NED-TCGCTAGCGCCACAATTC R: AAACCTAATCACAATGACTACAATGG	(ACT) ₁₁	115	111–129	5	7	0.680	0.672	0	KF434347
Ma15	F: PET-AGTTCACGTGTAAGACTC R: TGACTACGGTACACCAA	(TGTC) ₆	130	139–143	6	2	0.250	0.330	0.060	KF434348
Ma16	F: VIC-GACAACCTAACGATGTATTC R: GGATTCATCACCTCACAG	(GAT) ₁₀	121	112–148	7	6	0.320	0.350	0.022	KF434349
Ma17	F: PET-TAAGTTGATTCGTCCTTCTC R: GATGACGTAAATAATATCAGAG	(CAT) ₁₅	282	260–302	8	10	0.640	0.726	0.050	KF434350
Ma18	F: VIC-ACATCACTGTCAGGATTTAC R: GAATATTCAAGGAATCAC	(TAC) ₁₁	317	317–341	8	7	0.680	0.741	0.035	KF434351
Ma20	F: PET-TACTCTCGTATTCAGACC R: GACGAGTAATAAGTGTTTGC	(ACG) ₇	352	360	5	1	0	0	0	KF434352
Ma21	F: NED-ATGTCTAATAAAAACGCAATC R: GTTACTCACCGTCGTATCT	(GGA) ₉	281	263–293	9	4	0.280	0.252	0	KF434353
Ma22	F: 6FAM-ACTTTGCTAAGGAAATGTTA R: GATAAAGTAACATCGTCGAA	(CAT) ₈ CGTAAC (CAT) ₆	199	205–211	3	3	0.320	0.274	0	KF434354
Ma24	F: 6FAM-CATCAGCTTACCGCAGAC R: ATTCAGACACGCTGGATT	(AAT) ₄ TAT (AAT) ₇	153	158–173	10	3	0.125	0.119	0	KF434355
Ma27	F: PET-GTTTAAAGAAACAATAAATGC R: TTGACTACGTGTGTATATGG	(GTAGT) ₁₁ TTAGN (GTAGT) ₃	151	113–166	11	14	0.792	0.890	0.052	KF434356
Ma28	F: 6FAM-ATTATAGTCCCTCCGAGAC R: GTAGGATTGATTCTTTCAGA	(TAC) ₁₁ T (TAC) ₄ (CAC) ₂ (TAC) ₁₅	166	99–228	5	13	0.720	0.882 ^a	0.086	KF434357
Ma29	F: PET-AATGCATCATATTTACACAC R: CTTCGTTTGTTCAC TAGAAT	(CCA) (CTA) ₂ (CCA) ₂ (CTA) ₂ (CCA) ₈	179	171–195	7	9	0.440	0.737 ^a	0.171	KF434358
Ma30	F: 6FAM-GACTGGACTTTCTCCATT R: ACTTCCTATGAACAGTAACG	(CTA) ₂ CAA (CTA) ₅ CCA (CTA) ₈	163	151–196	6	13	0.458	0.873 ^a	0.221	KF434359
Ma33	F: VIC-CATATTTTCCATCCAAC TAA R: TAATCTACAAAGACGGACAT	(ACT) ₁₀	165	172–181	1	4	0.583	0.520	0	KF434360
Ma34	F: PET-GAGTCACCTCTTCGATAAC R: TCATACTGTTTTATTTCGACTC	(AC) ₁₁	221	224–230	1	4	0.800	0.685	0	KF434361

Table 1 continued

Locus name	Primer sequences 5′–3′	Repeat motif	Clone size	Alleles range	PCR reaction	Na	Ho	He	NAF	GenBank Access. number
Ma35	F: NED-TATTCTTTCTTGATTCTTGG R: AGTATATCGTCTCCACTGC	(TC) ₁₀	236	233–251	12	5	0.625	0.707	0.048	KF434362
Ma36	F: VIC-CACAAATCCTACTCAAGGT R: CAAATATGATTTTTGTCTGC	(TA) ₁₀	101	100–106	2	4	0.560	0.678	0.070	KF434363
Ma38	F: VIC-GATAACAGCATTAGAAGGAC R: AAGGAAAGAGGGAATTAGTA	(TA) TAA (TA) ₉	239	227–249	11	6	0.560	0.506	0	KF434364
Ma39	F: PET-CCAAGGAGGCTATATGACT R: ACTATTCGTCTGTCTGGTCCA	(AG) ₁₀	178	178–190	3	5	0.680	0.658	0	KF434365
Ma41	F: NED-GGAATTGTAAATCATTCCG R: CACTCTGAATTGGTGAG	(AG) ₉	362	366–374	1	6	0.458	0.702	0.143	KF434366
Ma42	F: 6FAM-ACGTGTTTCAATGAGAAAT R: AAAGATGCTCATTGTCTATC	(GT) ₁₄	214	206–220	7	6	0.360	0.695 ^a	0.198	KF434367
Ma44	F: NED-AGCTATAATATCCAGTGAAGA R: GAATTGCCGAGTATAAAGT	(AC) ₁₀	108	98–112	11	6	0.480	0.572	0.058	KF434368

Primer sequences, repeat motifs, clone size (base pairs, bp, without pig-tail), alleles size range (bp). To facilitate genotyping, reverse primers were pig-tailed with 5′-GTTTCTT-3′. PCR reaction indicates multiplex (loci with the same number in this column were amplified and genotyped together) or individual reactions. GenBank accession numbers for each microsatellite

F Forward, R Reverse, Na number of alleles, Ho observed heterozygosity, He expected heterozygosity, NAF Null allele frequency (Brookfield method)

^a Significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium

trinucleotides (1678) and 6 repeats for tetra- (104) and pentanucleotides (46), focusing on tri- and tetra-repeat motifs. Of these contigs, 50 were chosen for primer design. Twenty-six of these microsatellites markers produced clear electropherogram patterns and were selected for multiplex PCR optimization and genotyping, performed using eight specimens from five different populations.

Multiplex PCRs were performed in a total volume of 10 µl, with between 1 and 4 ng of DNA and 1X Qiagen Multiplex PCR Master Mix (Qiagen), using conditions previously determined for *P. abbreviata* (López-Márquez et al. 2013).

Fluorescently labeled PCR products were run on an ABI PRISM 3730 DNA Sequencer (Applied Biosystems) with the GeneScan500 internal size standard and analyzed with the GeneMapper software (Applied Biosystems). Of the 26 microsatellites tested (GenBank Accession nos. KF434343 to KF434368), one was monomorphic (Ma20) in the San Matías Gulf population. The remaining 25 loci were deemed informative for further analysis. Number of alleles (Na), observed (Ho) and expected (He) heterozygosities, tests of Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium were calculated with GENEPOP (Raymond and Rousset 1995); data were reviewed for null alleles and

scoring errors using MicroChecker (Van Oosterhout et al. 2004).

A total of 166 alleles (2–14 alleles per locus) were detected across the 25 loci in the 25 genotyped specimens (Table 1). Observed and expected heterozygosities ranged from 0.125 to 0.920 and 0.119 to 0.890, respectively (Table 1). After sequential Bonferroni correction, five significant deviations from HWE were found, probably due, in part, to the existence of null alleles (estimated frequencies from 0.08 to 0.22); none of the loci showed linkage disequilibrium.

Cross-amplification tests of 34 species, representing all current nemertean orders, resulted in at least one positive amplification for all but two species (*Cephalothrix cf. filiformis* and *Micrura purpurea*). Eight of the 26 loci for *M. arrokeana* were not amplified in the other nemerteans (Ma6, Ma17, Ma18, Ma20, Ma27, Ma38, Ma41, and Ma44), and the other 18 provided interpretable profiles for at least one (usually locus Ma21), but up to 11 loci per species (Table 2).

These polymorphic microsatellite loci, together with the analysis of its host, will be used to study genetic structure, kinship and ecological traits in *M. arrokeana*, providing important information about infestation, genotype distribution and patterns of coevolution.

Table 2 List of species tested for cross-amplification. Loci with interpretable profiles among the 26 loci analyzed are indicated by grey blocks

Species / Loci	Ma 21	Ma 36	Ma 34	Ma 7	Ma 15	Ma 16	Ma 12	Ma 33	Ma 22	Ma 24	Ma 29	Ma 42	Ma 8	Ma 28	Ma 3	Ma 30	Ma 35	Ma 39	
Palaeonemertea																			
<i>Carinina ochracea</i>	■																		
<i>Cephalothrix</i> cf. <i>simula</i>	■		■																
<i>Cephalotrix</i> sp.	■		■	■			■		■	■			■				■	■	
<i>Cephalotrix</i> sp. A	■				■														
<i>Cephalotrix</i> sp. B	■																		
<i>Tubulanus banyulensis</i>	■						■						■						
Heteronemertea																			
<i>Cerebratulus marginatus</i>	■	■																	
<i>Cerebratulus</i> sp.	■	■			■		■												
<i>Lineus bilineatus</i>	■	■			■		■												
<i>Lineus longissimus</i>	■	■											■						
<i>Lineus ruber</i>	■	■																	
<i>Micrura fasciolata</i>	■	■																	
<i>Micrura</i> sp.	■	■					■												
<i>Parborlarsia corrugatus</i>	■	■					■		■	■									
<i>Ramphogordius sanguineus</i>	■	■					■		■	■									
Hoploneurtea																			
<u>Monostilifera</u>																			
<i>Amphiporus lactifloreus</i>	■																		
Cratenemertidae sp.	■					■		■											
<i>Emplectonema</i> aff. <i>gracile</i>	■	■																	
<i>Emplectonema gracile</i>	■	■																	
<i>Malacobdella japonica</i>	■				■				■	■						■			
<i>Nemertopsis</i> cf. <i>bivittata</i>	■								■	■									
<i>Oerstedia dorsalis</i>	■																		
<i>Prosorhochmus chafarinensis</i>	■				■														
<i>Prostoma</i> cf. <i>graecense</i>	■																		
<i>Tetrastemma fozensis</i>	■																		
<i>Tetrastemma melanocephalum</i>	■																		
<i>Tetrastemma</i> sp.	■																		
<i>Tetrastemma</i> sp.	■																		
<i>Vieitezia luzmurubeae</i>	■																		■
<i>Zygonemertes</i> sp.	■																		
<u>Polystilifera</u>																			
<i>Drepanophorus spectabilis</i>	■																		
<i>Paradrepanophorus crassus</i>	■																		

Acknowledgments We would like to thank Steve Bogdanowicz from the Cornell EGCF for his technical assistance during microsatellite isolation. Melinda Modrell revised the English. This research was funded by the Spanish Ministry of Foreign Affairs through AECID grants A/023484/09 and A/032441/10.

References

- Alfaya JEF, Bigatti G, Machordom A (2013) Mitochondrial and nuclear markers reveal a lack of genetic structure in the entocommusal nemertean *Malacobdella arrokeana* in the Patagonian gulfs. *Helgoland Mar Res* 67:407–412
- Faircloth BC (2008) MSATCOMMANDER: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Mol Ecol Resour* 8:92–94
- Ivanov VA, Bigatti G, Penchaszadeh PE, Norenburg JL (2002) *Malacobdella arrokeana* (Nemertea: Bdellonemertea), a new species of nemertean from the Southwestern Atlantic Ocean entocommusal in *Panopea abbreviata* (Bivalvia, Heterodonta, Hiatellidae) in Argentina. *Proc Biol Soc Wash* 115:359–367
- López-Márquez V, Alfaya JEF, García-Jiménez R, Bigatti G, Machordom A (2013) Isolation and characterisation of microsatellite loci for the southern geoduck *Panopea abbreviata* (Valenciennes, 1839) through 454 pyrosequencing. In: Ahanchédé A, Alfaya JEF, Andersen LW, et al. Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 August 2012–30 September 2012. *Mol Ecol Resour* 13:158–159
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86:248–249
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538

MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES

Isolation and characterization of microsatellite loci for the southern geoduck, *Panopea abbreviata* (Valenciennes, 1839) through 454 pyrosequencing

Journal:	<i>Molecular Ecology Resources</i>
Manuscript ID:	MER-12-0263.R1
Manuscript Type:	Permanent Genetic Resources Note
Date Submitted by the Author:	22-Aug-2012
Complete List of Authors:	López-Márquez, Violeta; Museo Nacional de Ciencias Naturales, Biodiversidad y Biología Evolutiva Alfaya, José; LARBIM, Centro Nacional Patagónico, García- Jiménez, Ricardo; Museo Nacional de Ciencias Naturales, Biodiversidad y Biología Evolutiva Bigatti, Gregorio; LARBIM, Centro Nacional Patagónico, Machordom, Annie; Museo Nacional de Ciencias Naturales, Biodiversidad y Biología Evolutiva
Keywords:	Population Genetics - Empirical, Invertebrates, Fisheries Management, Ecological Genetics

1 **Isolation and characterisation of microsatellite loci for the southern geoduck**
2 ***Panopea abbreviata* (Valenciennes, 1839) through 454 pyrosequencing**

3

4 Violeta López-Márquez^{1a}, José E. F. Alfaya^{2a}, Ricardo García-Jiménez¹, Gregorio
5 Bigatti² and Annie Machordom¹.

6

7 ¹Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN-CSIC). José Gutiérrez Abascal, 2.
8 28006 Madrid, Spain.

9 ²LARBIM, Centro Nacional Patagónico (CENPAT-CONICET). Bvd. Brown 2915,
10 U9120ACV Puerto Madryn, Chubut, Argentina.

11 ^aThese authors contributed equally to this work.

12

13 *Keywords: Patagonian geoduck, artisanal fisheries, 454 GS-FLX Titanium*
14 *pyrosequencing, population structure*

15

16 Correspondence: Annie Machordom. E-mail: annie@mncn.csic.es. Telephone: +34
17 914111328. Fax number: +34 915645078.

18

19 Short title: *Panopea abbreviata* microsatellite markers

20

21

22

23

24 **Abstract**

25 We have isolated the first, polymorphic microsatellite loci (21 in total) for the geoduck
26 clam *Panopea abbreviata* (Valenciennes, 1839) from San Matías gulf (Patagonia,
27 Argentina), using 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. We also developed
28 conditions for amplifying these markers in 5 multiplex and 7 individual reactions. Four
29 to 23 alleles were detected per locus across the 25 samples analysed. Observed and
30 expected heterozygosities ranged from 0.235 to 0.985 and from 0.528 to 0.937,
31 respectively. In the sampled population, only one locus deviated from Hardy–Weinberg
32 equilibrium. These markers are useful resources for future population structure studies
33 in this artisanal fishing species.

34

35 The genus *Panopea* Ménéard, 1807 (Bivalvia, Hiatellidae), has nine species, and its
36 populations naturally occur worldwide (Straus *et al.* 2008). These bivalves, called
37 geoducks, have one of the longest lifespans among exploited animals (Morsan *et al.*
38 2010). There is lucrative commerce based on geoduck fisheries, mostly from the North
39 Pacific Ocean. Probably due to this fact, the Pacific geoduck *Panopea generosa*,
40 previously known as *P. abrupta* (Vadopalas *et al.* 2010), was the first species of the
41 genus to have its genetic structure analysed (Vadopalas and Bentzen 2000; Vadopalas
42 *et al.* 2004).

43 Here, we focused on the southern Patagonian geoduck *Panopea abbreviata*
44 (Valenciennes, 1839), the largest bivalve found along the south-occidental Atlantic
45 coasts, with a distribution range from Rio de Janeiro, Brazil (23°S) to Nuevo Gulf,
46 Argentina (43°S) (Scaravino 1977, Alfaya *et al.* in press). These geoducks live from
47 shallow waters to depths of 75 m, and are buried (up to 70 cm) in sand and muddy
48 sediments (Ciocco 2000). It has been an incipient resource for the artisanal fisheries in
49 the Patagonian gulfs since 1999 (Ciocco 2000; Ciocco *et al.* 2001). However, there is
50 not much basic ecological or biological information about *P. abbreviata*, and there is no
51 regulation for its management. Recently, its reproductive cycle was described as having
52 a continuous gametogenetic cycle (Van der Molen *et al.* 2007; Zaidman *et al.* 2012).
53 This lack of resting in reproduction coupled with a pelagic larval stage could indicate a
54 lack of differentiation, but some differences in growth and age classes were reported
55 among populations (Morsan *et al.* 2010).

56 To disentangle the basis of such differences, including factors that may influence
57 dispersal and gene flow (Acevedo *et al.* 2009), and to provide a new tool that will aid in
58 the sustainable management of this species, we have developed the first series of

59 microsatellite markers for *P. abbreviata*. Thus, we isolated and screened the
60 microsatellites using high-throughput sequencing techniques. Multiplex-enriched
61 libraries and 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing are powerful tools for the isolation
62 of new markers in unknown genomes (Martin *et al.* 2010). This procedure has been
63 readily and successfully applied to a large variety of taxonomic groups (Malausa *et al.*
64 2011).

65

66 Genomic libraries were constructed at the Cornell Evolutionary Genetics Core
67 Facility (EGCF, USA). Total DNA was extracted from the siphon tissue of one *P.*
68 *abbreviata* specimen from San Matías gulf (Patagonia, Argentina), using the BioSprint
69 15 DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to manufacturer's tissue
70 protocol.

71 Five micrograms of extracted genomic DNA were completely digested with a
72 restriction enzyme (five-base cutter) that generated blunt-end fragments. Linkers were
73 ligated to the digested DNA, and the resulting fragments were enriched for
74 microsatellites by hybridization to and magnetic capture of biotinylated repeat probes
75 (representing two unique dimers –GT and TC; five unique trimers –TTC, GTA, GTG,
76 TCC and GTT; and five unique tetramers –TTTC, GATA, TTAC, GATG and TTTG).
77 Enriched genomic fragments captured by streptavidin-coated magnetic beads were then
78 amplified by PCR, ligated to Roche/454 Titanium Multiplex Identifier (MID) adapters
79 and size fractionated in an agarose gel.

80 Libraries with unique adapters were pooled, and sequences were generated with
81 Roche/454 GS FLX Titanium reagents, protocols and hardware. MID-sorted 454 reads
82 were trimmed of adapter sequences and assembled with SeqMan Pro (DNASTAR).

83 Consensus files and singleton reads were exported as FASTA files, and simple repeats
84 were detected with MsatCommander software (Rozen and Skaletsky 2000; Faircloth
85 2008), with a limit of at least 8 perfect motif repeats.

86 We primarily focused on finding tetranucleotide repeats as they typically provide
87 clear allele assignment. From the 1004 perfect tetranucleotide repeats obtained, 208
88 showed the possibility of designing primers under the requested conditions (e.g., length
89 20 ± 2 bases, melting temperature 60 ± 2 °C, GC content between 30% and 70%). Then,
90 we discarded the ligated microsatellites (that had more than one group of repeats per
91 contig), leaving 140 viable microsatellites, with 21 different motifs. To have a good
92 representation of all motifs, when possible, we selected at least 2 of each. Finally, we
93 tested 41 potential microsatellites markers in 7 samples from 5 localities from the
94 Patagonian gulfs using a nested PCR protocol modified from Schuelke (2000). Twenty-
95 two microsatellites markers produced clear electropherogram patterns in these 7
96 samples and were selected for multiplex PCR and genotyping optimization.

97 Multiplex PCRs were performed in a total volume of 10 μ l, which included
98 approximately 1 ng of DNA, 1X Qiagen Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Hilden,
99 Germany), and $MgCl_2$ at a final concentration of 3 mM. Primer concentrations ranged
100 from 0.2 to 0.8 μ M (0.6 for Pa19 locus primers, 0.8 for Pa45 locus primers and 0.2 for
101 the all other primers). The forward primer from each primer pair was fluorescently 5'
102 end labelled with 6-FAM, NED, VIC or PET, while the reverse primers were pig-tailed
103 with 5'-GTTTCTT-3' (Brownstein, 1996) to facilitate genotyping. The cycling profile
104 began with an enzyme activation step at 95 °C for 15 min (Qiagen Multiplex PCR Kit
105 specifications), followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 56 °C for 90 s (except for three
106 loci: Pa17, Pa31 and Pa33, for which the annealing temperature was 52 °C), 72 °C for

107 60 s and a final extension at 60 °C for 30 min. A Mastercycler gradient thermocycler
108 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) was used for all reactions.

109 Fluorescently labelled PCR products were run on an ABI PRISM 3730 DNA
110 Sequencer (Applied Biosystems) with the GeneScan-500 (LIZ) internal size standard
111 and analysed with the GeneMapper software (Applied Biosystems).

112 From the 22 loci surveyed, 21 loci were successfully amplified and genotyped in 25
113 specimens from San Matías gulf (40°50'S, 65°04'W; Patagonia, Argentina). Overall, 1
114 tetraplex, 2 triplex, 2 diplex and 7 monoplex were optimized to reduce the number of
115 PCRs performed to 12 (Table 1). Two of the amplified and genotyped microsatellites
116 were pentanucleotide repeats, while 19 were tetranucleotide repeats. These
117 microsatellite markers were then checked for accordance to Hardy-Weinberg
118 equilibrium (HWE) and the presence of linkage disequilibrium, using GENEPOP 4.1
119 (Rousset 2008) with a Markov chain method (5000 dememorization steps, 100 batches
120 and 5000 iterations per batch). Only one among the 210 tests was significant for linkage
121 disequilibrium, but no significance was found after sequential Bonferroni correction for
122 multiple testing (Holm 1979; Rice 1989). One locus (Pa 25) showed a significant
123 departure from HWE ($p= 0.0016\pm 0.0003$), due to heterozygosity deficit, which could be
124 because of the presence of null alleles, as was found using MICRO-CHECKER (Van
125 Oosterhout *et al.* 2004). This program found that all loci lacked apparent errors of
126 scoring, large allele dropout and the existence of null alleles, except for the
127 aforementioned Pa25. Null alleles were also identified at locus Pa17 by MICRO-
128 CHECKER, but not at significant frequencies. Basic parameters of genetic variability
129 were calculated using GenAlex (Peakal and Smouse 2006). Allele richness ranged from
130 4 to 23, while observed and expected heterozygosities ranged from 0.235 to 0.985 and

131 0.528 to 0.937, respectively (Table 1). The lowest observed heterozygosity value was
132 for the locus that showed the heterozygosity deficit (P25). Excluding this locus, the
133 heterozygosity indices obtained here for *P. abbreviata* were higher than those observed
134 in the 30 specimens of *P. generosa* (called before *P. abrupta*) analysed by Vadopalas
135 and Bentzen (2000), even though the 5 microsatellite markers they isolated had a higher
136 number of alleles per locus (7 to 33).

137 These markers will be valuable tools for population genetic studies that examine the
138 dynamics, connectivity and variability of populations of *Panopea abbreviata*, thus
139 helping managers to conserve and handle this artisanal fishery resource.

140

141 **Acknowledgments**

142 We would like to thank Steve Bogdanowicz from the Cornell EGCF for his technical
143 assistance during microsatellite isolation. Melinda Modrell revised the English. This
144 research was funded by the Spanish Ministry of Foreign Affairs through the AECID
145 grants A/023484/09 and A/032441/10.

146

147 **References**

148 Alfaya JEF, Bigatii G, Machordom A (in press). Mitochondrial and nuclear markers
149 reveal a lack of genetic structure in the entocommensal nemertean *Malacobdella*
150 *arrokeana* in the Patagonian gulfs. *Helgoland Marine Research*. DOI:
151 10.1007/s10152-012-0326-z

152 Acevedo I, Bloor P, Toledo C, Calvo M, Machordom A (2009) Development of
153 tetranucleotide microsatellite markers for the cushion star, *Asterina gibbosa*, and
154 cross-species amplification. *Molecular Ecology Resources*, **9**, 274-277.

- 155 Ciocco NF (2000) Almeja panopea, un nuevo recurso pesquero para el Mar Argentino.
156 *Infopesca Internacional*, **6**, 36-39.
- 157 Ciocco NF, de Garin N, Diaz MA, Vera R, Mazzanti R, Monsalve MA, Herrera G,
158 Sollazo S, Serda A, Diaz D, Signorelli C, Lopez J, Ascorti J, Diaz R, Bazterrica
159 MC, Escati G, Real L (2001). Relevamiento de bancos de moluscos bivalvos de
160 interés marisquero en el golfo San José. Resultados de la campaña Sanjo/01. Acta
161 Complementaria Convenio Provincia del Chubut- CENPAT-CONICET Ley 3315.
162 Inf. n° 11 del LAPEMAR, Laboratorio de Peces y Mariscos de Interés Comercial
163 (CENPAT): 1-69.
- 164 Faircloth BC (2008) MSATCOMMANDER: detection of microsatellite repeat arrays
165 and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources*, **8**,
166 92-94.
- 167 Holm S (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian*
168 *Journal of Statistics*, **6**, 65–70.
- 169 Malausa T, Gilles A, Meglécz E, Blanquart H, Duthoy S, Costedoat C, Dubut V, Pech
170 N, Castagnone-Sereno P, Délye C, Feau N, Frey P, Gauthier P, Guillemaud T,
171 Hazard L, Le Corre V, Lung-Escarmant B, Malé P-J, Ferreira S. Martin, J-F
172 (2011) High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium
173 pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources*, **11**,
174 638-644.
- 175 Martin J-F, Pech N, Meglécz E, Ferreira S, Costedoat C, Dubut V, Malausa T, Gilles A
176 (2010) Representativeness of microsatellite distributions in genomes, as revealed
177 by 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *BMC Genomics*, **11**, 560.

- 178 Morsan E, Zaidman P, Ocampo-Reinaldo M, Ciooco N (2010) Population structure,
179 distribution and harvesting of southern geoduck, *Panopea abbreviata*, in San
180 Matías Gulf (Patagonia, Argentina). *Scientia Marina*, **74**, 764-772.
- 181 Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population
182 genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 288-295.
- 183 Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223-225.
- 184 Rousset F (2008) Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software
185 for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 103–106.
- 186 Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist
187 programmers. In: Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular
188 Biology (eds Krawetz S, Misener S). Humana Press, Totowa, NJ.
- 189 Scarabino V (1977) Moluscos del Golfo San Matías (Prov. Río Negro, Argentina).
190 Inventario y claves para su identificación. *Comunicaciones de la Sociedad*
191 *Malacológica de Uruguay*, **IV**, 177-297.
- 192 Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labelling of PCR
193 fragments. *Nature Biotechnology*, **18**, 233–234.
- 194 Straus KM, Crosson LM, Vadopalas B (2008) Effects of geoduck aquaculture on the
195 environment: A synthesis of current knowledge. Washington Sea Grant Technical
196 Report WSG-TR 08-01.
- 197 Vadopalas B, Bentzen P (2000) Isolation and characterization of di- and tetranucleotide
198 microsatellite loci in geoduck clams, *Panopea abrupta*. *Molecular Ecology*, **9**,
199 1435-1436.

- 200 Vadopalas B, LeClair LL, Bentzen P (2004) Microsatellite and allozyme analyses reveal
201 few genetic differences among spatially distinct aggregations of geoduck clams
202 (*Panopea abrupta*, Conrad 1849). *Journal of Shellfish Research*, **23**, 693–706.
- 203 Vadopalas B, Pietsch TW, Friedman CS (2010) The proper name for the geoduck:
204 Resurrection of *Panopea generosa* Gould, 1850, from the synonymy of *Panopea*
205 *abrupta* (Conrad, 1849) (Bivalvia: Myoida: Hiatellidae). *Malacologia*, **52**, 169-
206 173.
- 207 Van der Molen S, Kroeck M, Ciocco N (2007) Reproductive cycle of the southern
208 geoduck clam, *Panopea abbreviata* (Bivalvia: Hiatellidae), in north Patagonia,
209 Argentina. *Invertebrate Reproduction & Development*, **50**, 75-84.
- 210 Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-Checker:
211 software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data.
212 *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535–538.
- 213 Zaidman PC, Kroeck MA, Kissner EMO, Morsan EM (2012) Reproductive pattern of
214 Southern geoduck, *Panopea abbreviata*, at El Sotano (San Matias Gulf,
215 Patagonia, Argentina). *Marine Biology Research*, **8**, 172 -181.

216 **Table 1** Characterisation of 21 microsatellite loci in *Panopea abbreviata*. Primer sequences, repeat motifs, clone size (bp), alleles size
 217 range (bp). PCR reaction indicates multiplex (loci with the same number in this column were amplified and genotyped together) or
 218 individual reactions. Na= number of alleles, H_O= observed heterozygosity, H_E= expected heterozygosity. GenBank accession numbers for
 219 each microsatellite. *indicates significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium.

Locus name	Primer sequences (5'-3')	Repeat motif	Clone size	PCR reaction	Alleles range	Na	H _O	H _E	Accession number
Pa6	F VIC-CATGTTTACAGAAGTTAGGC R ACAGCAAGATGTTGAAACT	(TACTC) ₁₁ (TACCC) ₅ (TACTC) ₂	329	1	318-368	10	0.840	0.866	JX416866
Pa8	F 6-FAM-ATAACATGTAATGTATCATTAGAG R TATTGACGTTAGGACGTTT	(CCATT) ₈	163	2	154-179	6	0.680	0.747	JX416867
Pa13	F 6-FAM-CGTTTACTCAAACATGGTAT R TGAACATCTTTCTATAATTTTATCT	(CAGA) ₁₂	143	3	123-179	11	0.760	0.859	JX416868
Pa14	F 6-FAM-AAAGGCAAGGTGGCTTGT R TTTCACGGATAGTGAATTTTCG	(CATA) ₁₁	166	4	161-315	22	0.880	0.924	JX416869
Pa16	F 6-FAM-CAATAGCTCGCCTTATTAC R CTGACCGTCTGATAGCTC	(GTTT) ₈	131	5	130-154	5	0.440	0.607	JX416870
Pa17	F PET-TTTGTAATATGACGTTCTTG R AATAAAACGTTACAGAGAC	(TTAC) ₉ (TTAA) ₄ TTAC TTAA (TTAC) ₃	246	6	203-679	14	0.720	0.899	JX416871
Pa18	F VIC-CGTTTGTCTAGTGTTGAG R GTACACCTGTAAATCAGACC	(TCCA) ₁₂	367	7	356-420	15	0.840	0.910	JX416872
Pa19	F 6-FAM-ATTTATAACCTCCATAATGC R ACAAACACAATTTAATAACG	(CATT) ₁₃	179	7	155-199	11	0.667	0.744	JX416873
Pa20	F PET-TGGACTGAGTTATTAAGG R CCATGAGACATGACATTG	(CCGT) ₈ CCAT (CCGT) ₃	252	1	241-261	4	0.560	0.573	JX416874
Pa23	F VIC-GACGTAATAATAGCGTGTTTC R ATAAGACATTGAACGGAAG	(CGCA) ₁₂	363	4	345-417	16	0.920	0.903	JX416875
Pa25	F PET-TTCTGTGTAAATGCATAGG	(GCGT) ₃ GTGT GGTT (GCGT) ₈	212	7	197-217	4	0.235	0.528*	JX416876

	R AGTAACGCGCTTATAGGT									
Pa27	F 6-FAM-TTTCTGAGCTTGTATCTGTT R GTTATACGGAATAATCGTGA	(CGTG) ₁₂	177	8	162-194	9	0.840	0.842	JX416877	
Pa28	F PET-CTCGATGACATAATACGG R ACGTACTTTGTTTATAGGTCA	(CAAT) ₁₀	205	9	189-217	7	0.680	0.693	JX416878	
Pa29	F 6-FAM-GCCAGTATTGACTATTTTGT R GACGTGAACAATTAAGTAGAG	(TGCG) ₉	194	1	194-226	7	0.520	0.576	JX416879	
Pa31	F PET-TCCTTTATCCCTGTATTTG R TATTATTGTACTGTCATGCAC	(GAGT) ₉	237	10	247-391	23	0.880	0.937	JX416880	
Pa32	F NED-GACGTGACATAAAACAC R AATGTCACTTTTATTACTTC	(CATT) ₉	115	9	119-179	11	0.880	0.874	JX416881	
Pa33	F NED-TTAAATGCTGCATATTTTG R AATTTAAAATAGGCAATTACTC	(TCTG) ₁₃	145	11	133-185	14	0.985	0.898	JX416882	
Pa35	F 6-FAM-TTAGGAGATTGTAACAGAGC R ATTATACTACGCAGGAGGA	(GGAT) ₉	161	9	157-189	8	0.640	0.774	JX416883	
Pa36	F 6-FAM-TTCACCATCATCTTTAAAAC R GAAGAAGGACATTACATTGA	(CGCA) ₁₂	161	12	136-164	8	0.800	0.812	JX416884	
Pa39	F NED-AGTGACGTTACATTTACAGG R GTTCGATCATTTTAACATCT	(GACT) ₃ (GGCT) ₈	137	8	146-210	14	0.880	0.890	JX416885	
Pa45	F VIC-GATTATTTAATAGTCTTAAATGG R CTAGTTAAAAGCAATGCTAA	(AAAC) ₁₁	268	9	240-292	8	0.640	0.589	JX416886	

PERMANENT GENETIC RESOURCES NOTE

Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 August 2012 – 30 September 2012

MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES PRIMER DEVELOPMENT CONSORTIUM,¹ ADAM AHANCHÉDÉ,² JOSÉ E. F. ALFAYA,³ L. W. ANDERSEN,⁴ DIDIER AZAM,⁵ MA. ANITA M. BAUTISTA,⁶ ANNE-LAURE BESNARD,⁷ GREGORIO BIGATTI,³ ANTHONY BOUÉTARD,⁷ MARIE-AGNÈS COUTELLE,⁷ EBEN-EZER B. K. EWÉDJÈ,^{8,9} REIKO FUSEYA,¹⁰ RICARDO GARCÍA-JIMÉNEZ,¹¹ M. HARATIAN,¹² OLIVIER J. HARDY,⁸ L.-E. HOLM,¹³ CASEY W. HOY,⁶ ERIKO KOSHIMIZU,¹⁴ V. LOESCHCKE,¹⁵ VIOLETA LÓPEZ-MÁRQUEZ,¹¹ CARLOS A. MACHADO,¹⁶ ANNIE MACHORDOM,¹¹ C. MARCHI,¹⁵ ANDREW P. MICHEL,⁶ CLAIRE MICHENEAU,^{8,17} OMPRAKASH MITTAPALLI,⁶ TAKAHIRO NAGAI,¹⁸ NOBUAKI OKAMOTO,¹⁴ YING PAN,¹⁹ F. PANITZ,¹³ N. SAFAIE,¹² TAKASHI SAKAMOTO,¹⁴ B. SHARIFNABI,²⁰ EN-WEI TIAN^{21,16} and HUI YU²¹

¹Molecular Ecology Resources Editorial Office, 6270 University Blvd, Vancouver, BC Canada, V6T 1Z4, ²Faculty of Agronomic Sciences, FSA, BP526, Université d'Abomey-Calavi, Bénin, Cotonou, Benin, ³LARBIM, Centro Nacional Patagónico (CENPAT-CONICET), Bvd. Brown 2915, U9120ACV Puerto Madryn, Chubut, Argentina, ⁴Department of Bioscience, Aarhus University, Grenåvej 14, DK-8410, Rønde, Denmark, ⁵INRA, U3E, Unité Expérimentale d'Ecologie et Ecotoxicologie Aquatique, 65 rue de Saint-Brieuc, Rennes Cedex, 35042, France, ⁶Department of Entomology, Ohio Agricultural Research and Development Center, The Ohio State University, 1680 Madison Ave., Wooster, OH 44691, USA, ⁷INRA, UMR0985 Ecologie et Santé des Ecosystèmes, INRA/Agrocampus-Ouest, Equipe EQMA, 65 rue de Saint-Brieuc, Rennes Cedex, 35042, France, ⁸Evolutionary Biology and Ecology Unit CP 160/12, Faculté des Sciences, Université Libre de Bruxelles, Av. F. D. Roosevelt 50, Brussels, B-1050, Belgium, ⁹Faculty of Sciences and Technics, FAST, Université d'Abomey-Calavi, BP 4521, Bénin, ¹⁰National Research Institute of Fisheries Engineering, Fisheries Research Agency, 7620-7, Hasaki, Kamisu, Ibaraki, 314-0408, Japan, ¹¹Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN-CSIC), José Gutiérrez Abascal 2, Madrid, 28006, Spain, ¹²Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, 14115336, Iran, ¹³Department of Molecular Biology and Genetics, Blichers Allé 20, Tjele, DK 8830, Denmark, ¹⁴Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, 4-5-7 Konan, Minato, Tokyo 108-8477, Japan, ¹⁵Integrative Ecology and Evolution, Department of Bioscience, Aarhus University, Ny Munkegade 114, Aarhus C, DK-8000, Denmark, ¹⁶Department of Biology, University of Maryland, College Park, MD 20742, USA, ¹⁷Australian Tropical Herbarium, James Cook University, PO Box 6811, Cairns, QLD 4870, Australia, ¹⁸Fisheries and Marine Technology Center, Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, Kure, Hiroshima 737-1207, Japan, ¹⁹College of Animal Science and Technology, Guangxi University, 100 Daxue Road, Nanning, 530004, China, ²⁰Department of Plant Protection, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, 8415683111, Iran, ²¹Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, 510650, China

Abstract

This article documents the addition of 83 microsatellite marker loci and 96 pairs of single-nucleotide polymorphism (SNP) sequencing primers to the Molecular Ecology Resources Database. Loci were developed for the following species: *Bembidion lampros*, *Inimicus japonicus*, *Lymnaea stagnalis*, *Panopea abbreviata*, *Pentadesma butyracea*, *Sycoscapter hirticola* and *Thanatephorus cucumeris* (anamorph: *Rhizoctonia solani*). These loci were cross-tested on the following species: *Pentadesma grandifolia* and *Pentadesma reyndersii*. This article also documents the addition of 96 sequencing primer pairs and 88 allele-specific primers or probes for *Plutella xylostella*.

This article documents the addition of 83 microsatellite marker loci and 96 pairs of single-nucleotide polymorphism (SNP) genotyping primers to the Molecular Ecology Resources Database. Table 1 contains information on the focal species, the number of loci

developed, any other species the loci were tested in and the accession nos for the loci in both the Molecular Ecology Resources Database and GenBank. The authors responsible for each set of loci are listed in the final column. Table 2 presents information on SNP

Correspondence: Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, editorial.office@molecol.com

Table 1 Information on the focal species, the number of loci developed, any other species the loci were tested in and the accession nos for the loci in both the Molecular Ecology Resources Database and GenBank. The authors responsible for each set of loci are listed in the final column.

Species	No. primers developed	Other species tested	MER database no.	GenBank accession no.	Authors
<i>Bembidion lampros</i>	15	n/a	49788–49802	JX173367–JX173380	Marchi, C. Andersen, L. W. Panitz, F. Holm, L.-E. Loeschcke, V.
<i>Inimicus japonicus</i>	10	n/a	49838–49847	AB531004–AB531013	Sakamoto, Takashi Pan, Ying Koshimizu, Eriko Okamoto, Nobuaki Nagai, Takahiro Fuseya, Reiko
<i>Lymnaea stagnalis</i>	9	n/a	49940–49948	JX287524–JX287532	Besnard, Anne-Laure Bouétard, Anthony Azam, Didier Coutellec, Marie-Agnès
<i>Panopea abbreviata</i>	21	n/a	49860–49864, 49876–49891	JX416866–JX416886	López-Márquez, Violeta Alfaya, José E. F. García-Jiménez, Ricardo Bigatti, Gregorio Machordom, Annie
<i>Pentadesma butyracea</i>	11	<i>P. grandifolia</i> , <i>P. reyndersii</i>	49865–49875	HE663069–HE663079	Ewédjè, Eben-Ezer B. K. Micheneau, Claire Ahanchédé, Adam Hardy, Olivier J.
<i>Sycoscapter hirticola</i>	8	n/a	49830–49837	JX125070–JX125077	Tian, En-Wei Machado, Carlos A. Yu, Hui
<i>Thanatephorus cucumeris</i> (anamorph: <i>Rhizoctonia solani</i>)	9	n/a	49779–49787	JQ671201–JQ671204, JQ671206–JQ671210	Haratian, M. Safaie, N. Sharifnabi, B.

Table 2 Information on the focal species, the sequencing primer pairs developed, the number of single-nucleotide polymorphisms observed and any other species the loci were tested in. The next columns contain the number of allele-specific primers and probes developed, and the Molecular Ecology Resources Database and GenBank accession nos, respectively. The authors responsible for each set of loci are listed in the final column.

Species	No. primer pairs	No. SNPs in sequence	Other species tested	No. Allele-specific primers/probe	Target gene(s)	MER database numbers	GenBank accession no	Authors
<i>Plutella xylostella</i>	96	88	n/a	88	See ms for details.	50058–50131	SRA039964.1	Bautista, Ma. Anita M. Mittapalli, Omprakash Hoy, Casey W. Michel, Andrew P.

genotyping resources added to the MER database and presents data on the focal species, the number of sequencing primer pairs, the observed number of SNPs, other species the loci were tested in and the number of allele-specific primers or probes. The MER

database and GenBank accession nos and the authors responsible are also listed. A full description of the development protocol for the loci presented here can be found on the Molecular Ecology Resources Database (<http://tomato.biol.trinity.edu/>).

PANOPEA ABBREVIATA (BIVALVIA: HIATELLIDAE) IN THE
SOUTHWESTERN ATLANTIC OCEAN, TAXONOMIC REVISION AND ANATOMY

Javier H. Signorelli* & José E. F. Alfaya

*Biología y Manejo de Recursos Acuáticos, LARBIM – CENPAT – CONICET,
Bvd. Brown 2915, U9120ACD, Puerto Madryn, Chubut, Argentina*

ABSTRACT

The taxonomy and anatomy of the southwestern Atlantic geoduck, *Panopea abbreviata* Valenciennes, 1839, are revised. Materials from several institutions, as well as new living specimens collected from the coast of Argentina were studied. Type materials of all related nominal species are illustrated. The shell morphology, shell ultrastructure, hinge, ligament and mantle cavity organs are described. The symbiotic relationship with the nemertean *Malacobdella arrokeana*, attached to host mantle tissues, is mentioned. *Panopea abbreviata* is abundant in the gulfs of northern Patagonia. It occurs in the subtidal zone from 8 to 25 meters deep, deeply buried in the sediment. It has a large thick shell, shortener at the posterior end, with exposed siphons covered by a dark brownish periostracum; a hinge plate characterized by a single cardinal tooth in each valve; and shell ultrastructure with three layers: an outer layer of nearly vertical and composite prisms, a middle, true homogeneous layer, and an inner layer of alternating sublayers of fine complex crossed lamellar and irregular simple prisms. The fused mantle is only interrupted in the pedal gape. Ctenidia and labial palps association belongs to the Category III and ctenidia type C(1). *Panopea antarctica* is its only synonym. The fossil taxa *Panopea truncata*, *P. inferior*, *P. hauthali*, *P. coquimbensis* and *P. guayacanicensis* are excluded from the synonymy.

Key words: *Panopea*, Argentina, taxonomy, anatomy, Hiatellidae.

INTRODUCTION

The suprageneric arrangement of the family Hiatellidae Gray, 1824, was revised by Carter et al. (2011), in which the new Order Hiatellida was introduced to group the superfamilies Edmondioidea W. King, 1850, and Hiatelloidea J. Gray, 1824. Other phylogenetic analyses confirm the relationship of Hiatellidae with the Solenidae and Pharidae (Solenioidea) as a sister group, and excludes it from the Myoida (Adamkewicz et al., 1997; Taylor et al., 2007, among others).

Nine genus-level names were included as valid in the Hiatellidae by Keen (1969). *Degrangia* Cossmann & Peyrot, 1909, and *Panomya* Gray, 1857, were considered subgenera of *Panopea* by Keen. However, they have since been regarded as valid genera (Yonge, 1971; Vaught, 1989; Huber, 2010).

The genus *Panopea* was introduced by Ménard de la Groye (1807). An historical review of this genus was carried out by Dall (1912). He reviewed the previous illustrations of this genus

from Aldrovandus in 1606 to Ménard de la Groye in 1807, who finally gave the name of *Panopea aldrovandi* to the Mediterranean species. Dall (1912) mentioned that *Panope*, published in a separate “Mémoire”, should be accepted instead *Panopea*, published in the *Annales du Muséum d’Histoire Naturelle*. This taxonomic issue was submitted to the International Commission on Zoological Nomenclature by Vokes & Cox (1961), and almost 25 years after their proposal, the ICZN ruled the correct name to be *Panopea* (ICZN, 1986; Opinion 1414).

Other members of this genus have been studied in different parts of the world. In the northeast Pacific Ocean, several aspects of the biology of *P. generosa*, such as, functional morphology, ecology, morphometry, aquaculture and taxonomic reviews have been carried out (Bower & Blackburn, 2003; Feldman et al., 2004; Fisher et al., 2008; Goodwin & Pease, 1991; Rocha Olivares et al., 2010; Marshall et al., 2012; Leyva-Valencia et al., 2012). In some publications, the name *P. abrupta* (Conrad, 1849) was

*Corresponding author: javierhsignorelli@gmail.com

considered as valid, with *P. generosa* regarded as a junior synonym. However, Vadopalas et al. (2010) recognized the Recent *P. generosa* as valid and excluded it from the synonymy of Conrad's fossil species. Arambula-Pujol et al. (2008) studied the reproductive biology of *Panopea globosa* (Dall, 1898) in the Gulf of California. The functional morphology of several species of this family was studied by Yonge (1971).

Along the southwestern Atlantic Ocean, the family Hiatellidae is represented by about 14 species (Carcelles, 1944; Carcelles & Williamson, 1951; Castellanos, 1970; Abbott & Dance, 1986; Scarabino, 2003; Rios, 2009), but only one species of *Panopea* is commonly cited. The geoduck *Panopea abbreviata* (Valenciennes, 1839) is an endemic species well represented all along the Argentine coast (Carcelles, 1944; Carcelles & Williamson, 1951; Castellanos, 1970). It was mentioned by Bernard (1983) as occurring in the Pliocene and as the senior synonym of several species described from the fossil record of Chile and Argentina.

In recent years, this species has been studied as a possible target of artisanal fisheries in north Patagonia (Ciocco et al., 2001; Morsán & Ciocco, 2004; Narvarte & Filippo, 2007; Morsán et al., 2010). The reproductive cycle of *P. abbreviata* was studied by Van der Molen et al. (2007) and Zaidman et al. (2012). The development of these fisheries allowed the study of biological interactions between the geoduck and other organisms. The most studied has been the presence of the symbiotic nemertean *Malacobdella arrokeana* Ivanov, Bigatti, Penschazadeh & Norenburg, 2002, in its mantle cavity (Ivanov et al., 2002; Martorelli et al., 2003; Vázquez et al., 2009, 2010; Teso et al., 2006; Alfaya et al., 2012). In addition, a new species of flat worm (Platyhelminthes) living in the intestine of *P. abbreviata* was recently described (Brusa et al., 2011). During an ongoing study of genetics, population structure and reproduction of the nemertean *Malacobdella arrokeana* the taxonomic revision and anatomical description of *Panopea abbreviata* was carried out. In addition, the type material of related nominal species was illustrated.

MATERIALS AND METHODS

Living specimens were collected by scuba diving at 20 m from San José gulf (42°24'11"S, 64°17'10"W) (Fig. 1). The microstructure of the valves was analyzed with a scanning electron microscope (JEOL JSM-6460LV, Aluar S.A).

The outer shell layer was revealed at posterior shell margin radial section, the middle layer just exterior to the pallial line and the inner layer in the umbonal region. All shell sections were polished with 500 grit sandpaper followed by 1,000 grit sandpaper, then etched the surfaces with 2% hydrochloric for 40 seconds. All type material and additional specimens studied are deposited in the following institutions: Centro Nacional Patagónico (CNP-Inv), Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" (MACN-In), Buenos Aires; Museo de la Plata (MLP); Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), Paris; Rio Grande do Sul; Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) and the National Museum of Natural History, Smithsonian Institution (USNM), Washington D.C., United States.

Morphological Abbreviations

a	anus
aa	ascendant arm
aam	anterior adductor muscle
cs	ctenidial septum
ct	cardinal tooth
da	descendent arm
dd	digestive diverticula
es	excurrent siphons
fs	fibrous sublayer
f	foot
fg	food groove
g	gonad
hd	hindgut
id	inner demibranch
ilp	inner labial palp
is	incurrent siphon
la	left auricle
lc	left caecum
ls	lamellar sublayer
m	mouth
mc	mantle cavity
md	midgut
od	outer demibranch
olp	outer labial palp
pam	posterior adductor muscle
pa	papillae
p	periostracum
pn	pseudonymphal ridge
r	rectum
ra	right auricle
sa	supporting axis
sae	supraaxial extension
sps	siphonal pallial septum
st	stomach
t	tentacle
v	ventricle

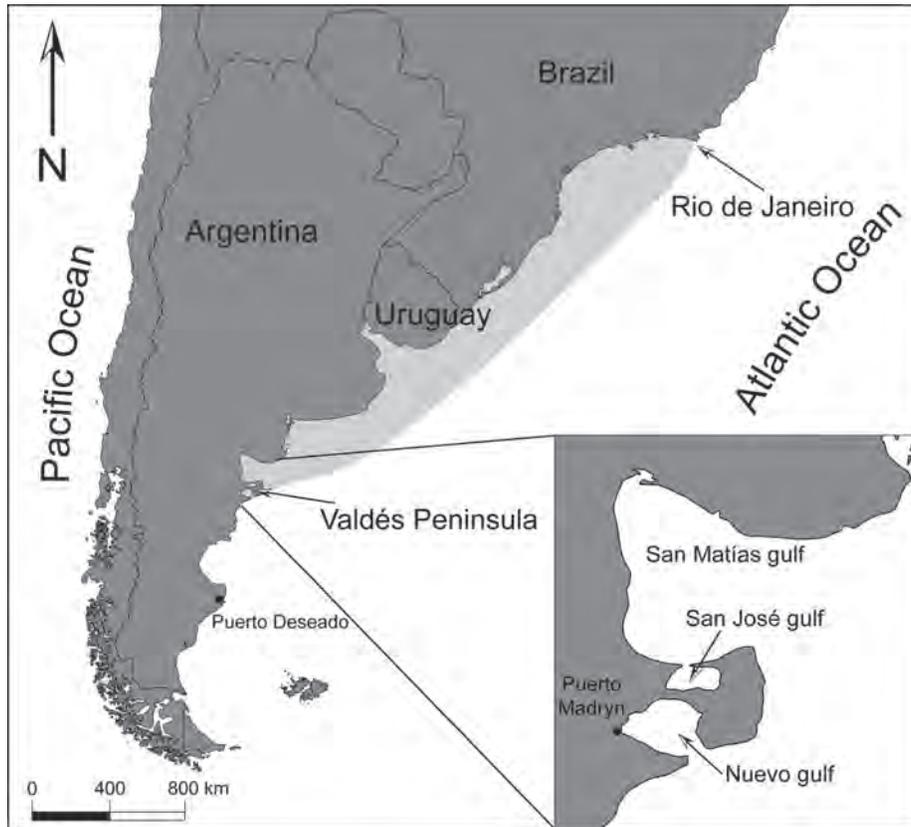


FIG. 1. Distribution map of *Panopea abbreviata* with a detail of collecting localities.

SYSTEMATIC RESULTS

Order Hiatellida Carter, 2011
 Superfamily Hiatelloidea J. Gray, 1824
 Family Hiatellidae J. Gray, 1824
 Subfamily Panopeinae
 Bronn, 1862

Genus *Panopea* Ménéard de la Groye, 1807 (p. 135)

[= *Glycimeris* Lamarck, 1799; type species: *Mya glycimeris* Born, 1778, by tautonymy (suppressed for the purposes of the Principle of Priority by the ICZN, 1986; Opinion 1414); *Panope* Ménéard de la Groye, 1807 (*nom. null.*); *Panodea* Oken, 1817 (*nom. null.*); *Panopaea* Lamarck, 1818 (*nom. null.*); *Myopsis* Agassiz 1840; type species: *Mya mandibula* J. Sowerby, 1813, by the subsequent designation of Cox, 1964; *Heteromya*

Mayer-Eymar 1884; type species: *Panopea* (*Heteromya*) *lessepsi* Mayer-Eymar, 1884, by monotypy; *Capistrocardia* Tate, 1887; type species: *Capistrocardia fragilis* Tate, 1887, by original designation].

Type species: Panopea aldrovandi Ménéard de la Groye, 1807 (= *Mya glycimeris* Born, 1778), by subsequent designation of Children, 1822. Pliocene-Recent, Europe.

Remarks

Panopea aldrovandi Ménéard de la Groye, 1807 (= *Mya glycimeris* Born, 1778) is regarded as having been fixed as the type species of the genus by the subsequent designation of Children (1822: 84). A few years prior, Fleming (1818) designated as type *Mya glycimeris* Born, 1778, a designation that was accepted by Winckworth (1929) and later by Keen (1969).

However, the ICZN (1986, Opinion 1414) concluded that Fleming's identification was invalid because *Mya glycimereis* Born was not originally included in *Panopea*.

Panopea abbreviata
Valenciennes, 1839
(Figs. 2–9)

Panopea abbreviata Valenciennes, 1839: 18, pl. 6, fig. 1a, b; Valenciennes, 1843: pl. 9, fig. 1; Lamy, 1925: 276; Castellanos, 1970: 265; Rios, 1975: 253, pl. 80, fig. 1213; 1994: 294, pl. 100, fig. 1433; 2009: 589, fig. 1628; Scarabino, 1977: 214; Lasta et al., 1998: 130, fig. 5d; Scarabino, 2003: 240; Scarabino et al., 2006: 164.

Panopea abbreviata (Valenciennes) – d'Orbigny, 1846: 509; Woodward, 1854: 220; Woodward, 1856: 378; Mayer-Eymar, 1870: 68; Woodward, 1870: 87; G. B. Sowerby II, 1873: pl. 6, fig. 10; Clessin, 1895: 50, pl. 18, fig. 3.

Panopea antarctica Gould, 1850: 214; 1852: 386; 1862: 74; H. Adams & A. Adams, 1856: 350.

Glycimereis abbreviata (Valenciennes) – H. Adams & A. Adams, 1856: 350; Tryon, 1868: 60.

Panopea abbreviata (Valenciennes) – Carcelles, 1944: 294, pl. 14, fig. 114; Carcelles & Williamson, 1951: 346; Barattini & Ureta, 1961: 183; Figueiras & Sicardi, 1970: 409.

Type Material: *Panopea abbreviata* Valenciennes, 1839, MNHN 25707, two syntypes (Figs. 2–7); *Panopea antarctica* Gould, 1850, USNM 17515, holotype (Figs. 8, 9).

Type Locality: Mouth of Rio Negro, Patagonia, Argentina.

Other Material Examined: Brazil – Niterói, Rio de Janeiro (MZUSP 106418, collected in 1969); São Sebastião, Barra Velha (MZUSP 189720130); Santa Catarina, Cabo Santa Marta (MZUSP 20131, 137 m depth); Santa Catarina Laguna (MZUSP 32714, 110–130 m depth, collected in 2000). Uruguay – Montevideo (MACN 15187); 85 miles southeast from Puerto La Paloma (MACN 16634). Argentina – Mar Chiquita (MLP 2565); Mar del Plata (MACN 377, 9361, 16688, 10309, 9361-38, 10229, 9154-8, 19162, 9379-14, 29560, 15781; MLP 1879, 2087, 2421, 4889); Puerto Quequén (MACN 21071, 416); Bahía San Blas (MACN 20232); Mouth of Río Negro

(MACN 20649); San Antonio Oeste (MACN 9379-12, 13345, 13135, 9151-12, 9379-13; MLP 2706; MZUSP 13134); San Matías gulf (MACN 21277); San José gulf (MACN 9175-24; MLP 2744, 13203); Puerto Pirámides, Nuevo gulf (MACN 26442); Punta Norte, Valdez peninsula (MACN 11492); Punta Ninfa, Nuevo gulf (USNM 869774).

Distribution

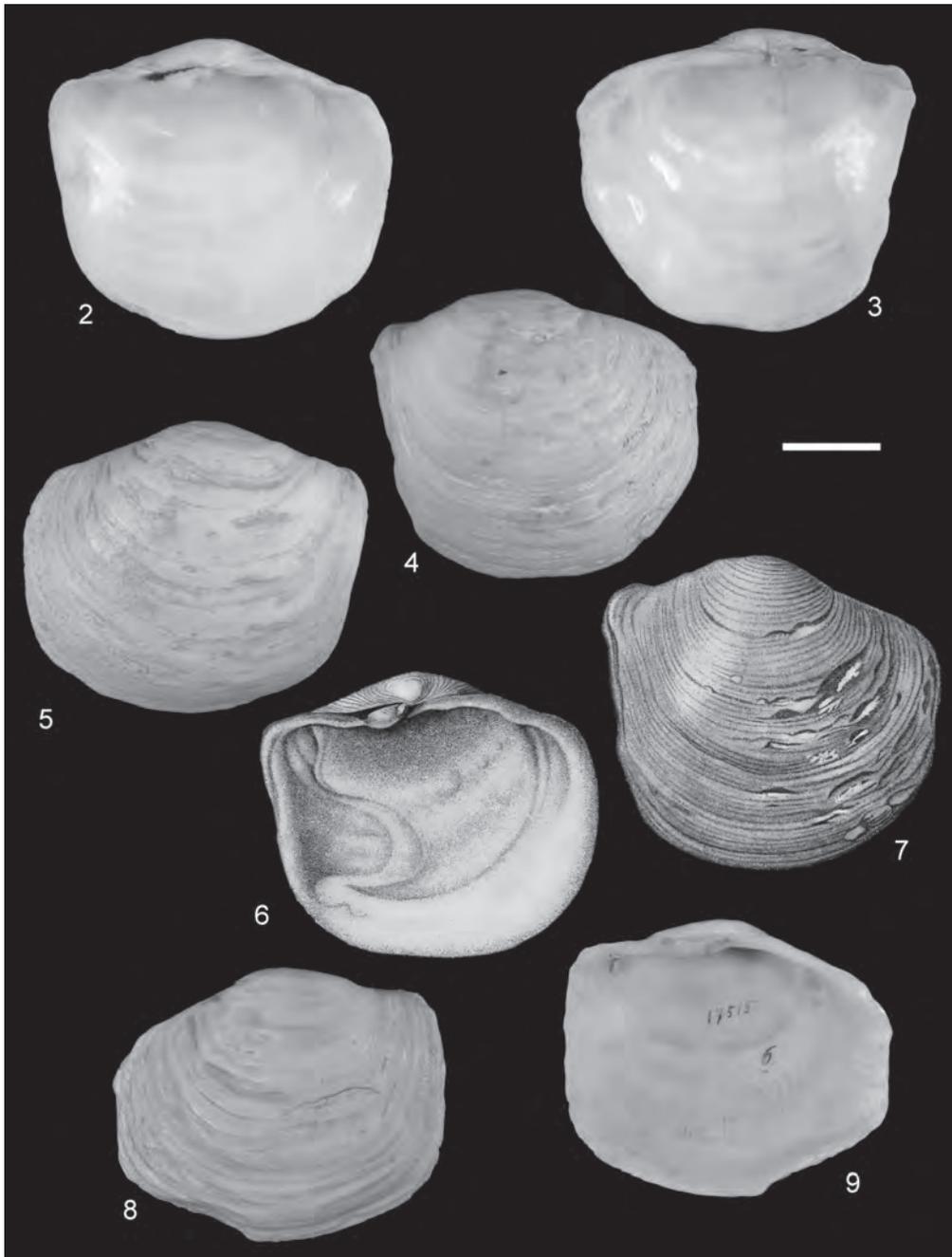
From Rio de Janeiro, Brazil, to Nuevo Gulf, Chubut Province, Argentina.

Diagnosis

Shell thick, rounded, large, up to 15 cm, gaping widely at both ends, elongated but posteriorly shortened, inflated; external ligament strong; periostracum dark brownish; ultrastructure outer prismatic, middle homogeneous and inner complex crossed lamellar (CCL) layers; cardinal tooth sharp, erect.

Description

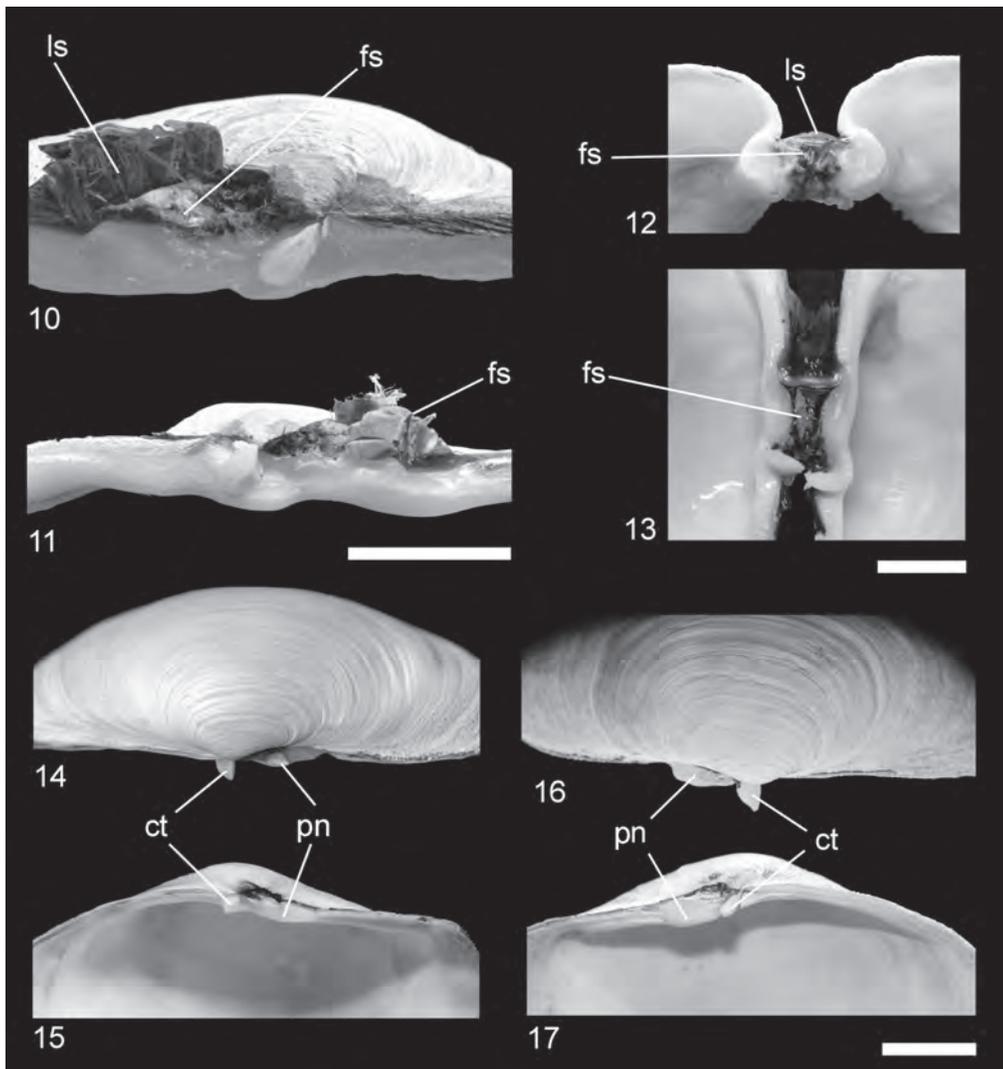
Shell: Thick, large, up to 15 cm length, externally white, surface smooth with irregular growth lines, covered by a thin, yellowish-green periostracum; umbo slightly inflated, prosogyrate; lunule and escutcheon not defined; antero-posteriorly elongated, but shortened at posterior end, anteriorly rounded, ventral margin rounded and usually eroded; widely gaping at both ends; all exposed siphons and tissues covered by dark brownish periostracum (Fig. 18); internally white, pallial line separated from ventral edge of shell about 1.5 cm, pallial sinus U-shaped, higher than deep; adductor muscle scar clearly visible, the anterior larger; nymphal ridge very prominent at posterior side of hinge; external ligament strong, quasiparivincular, wide, dark brown, opisthodontic, on strong pseudonymph, with fibrous sublayers attached to dorsal and lateral surfaces of pseudonymph and covered by the lamellar sublayer (Figs. 10–13); hinge plate characterized by sharp, erect single cardinal tooth in each valve, fitting into corresponding socket in other valve (Figs. 14–17); ultrastructure of the shell with three layers (Figs. 23–28): an outer layer of nearly vertical and composite prisms (Figs. 24, 25), a middle true homogeneous layer of rounded units (Fig. 26) and a complex crossed lamellar inner layer with intercalations of irregular simple prisms (Figs. 27, 28).



FIGS. 2–9. *Panopea* spp. FIGS. 2–5: *Panopea abbreviata* Valenciennes, 1839, MNHN 25707, two syntypes; FIGS. 6, 7: *P. abbreviata* original illustration; FIGS. 8, 9: *Panopea antarctica* Gould, 1850, USNM 17515, holotype. Scale bar = 2 cm.

Mantle Cavity Organs: The mantle fusion is only interrupted at the pedal gape, which is anteriorly positioned. Inside the large mantle cavity, two pairs of labial palps surround the mouth, the inner one longer than wider (Figs. 19, 33); the association of ctenidia and labial palps is Category III of Stasek (1963), wherein the ventral tips of the anterior filaments of the inner demibranch are not inserted into the distal

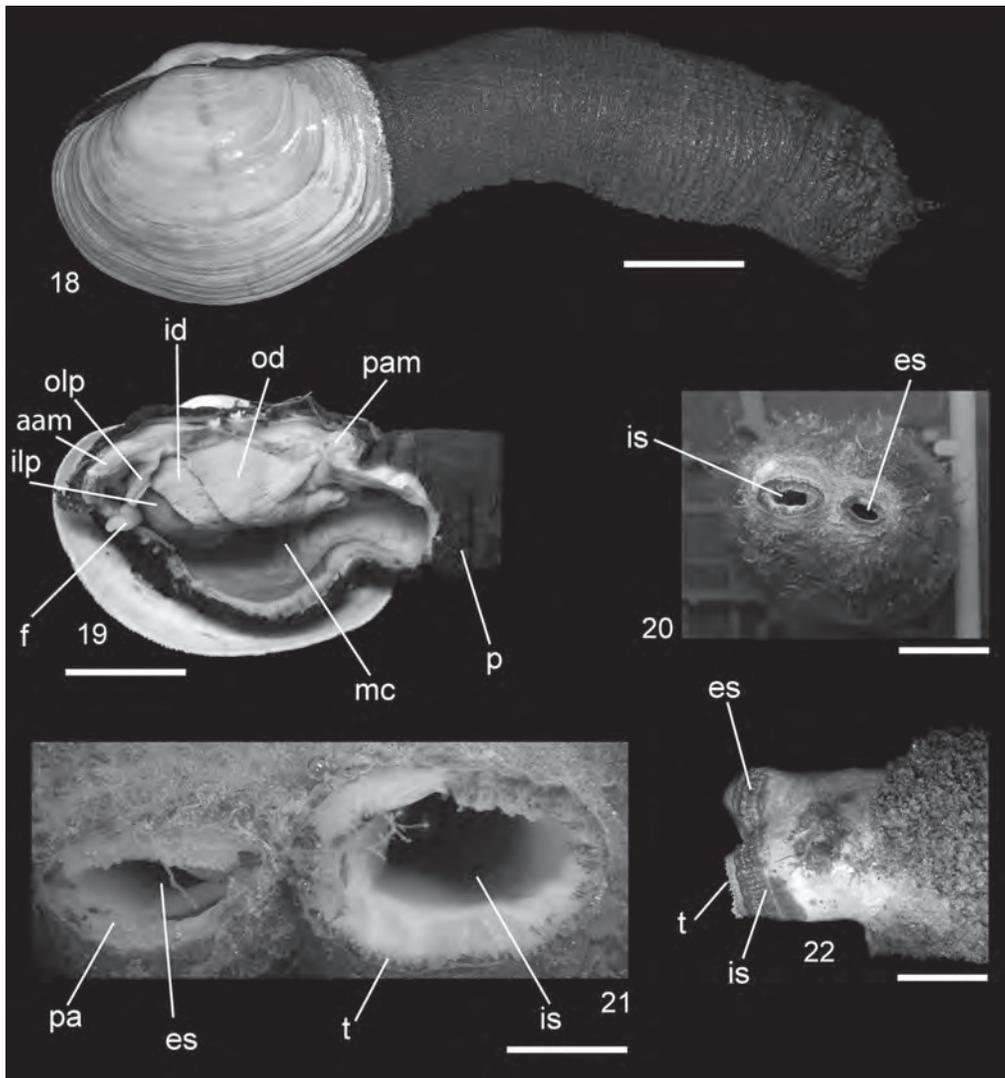
oral groove. However, the anteroventral margin of the inner demibranch is fused to the inner palp lamella. The ctenidia surround the visceral mass laterally (Figs. 29, 30); they belong to type C (1) of Atkins (1937), characterized by an outer demibranch with a distinct supra-axial extension and food groove only present in the inner demibranch (Fig. 31), the outer demibranch less deep than the inner. Frontal currents at



FIGS. 10–17. *Panopea abbreviata*. FIGS. 10–13: External ligament showing fibrous sublayers attached to dorsal and lateral surfaces of pseudonymph covered by lamellar sublayer. Scale bar = 1 cm; FIGS. 14, 15: Right hinge; FIGS. 16, 17: Left hinge.

both sides of inner demibranch go to the food groove. The oral current is observed along the groove as well as between the bases of the two demibranchs on each side of the body. In the outer demibranch, particles are carried ventrally on the ascending lamella and dorsally on the descending lamella (Fig. 31). Ctenidial septum with two rows of perforations that separate the suprabranchial and infrabranchial chambers

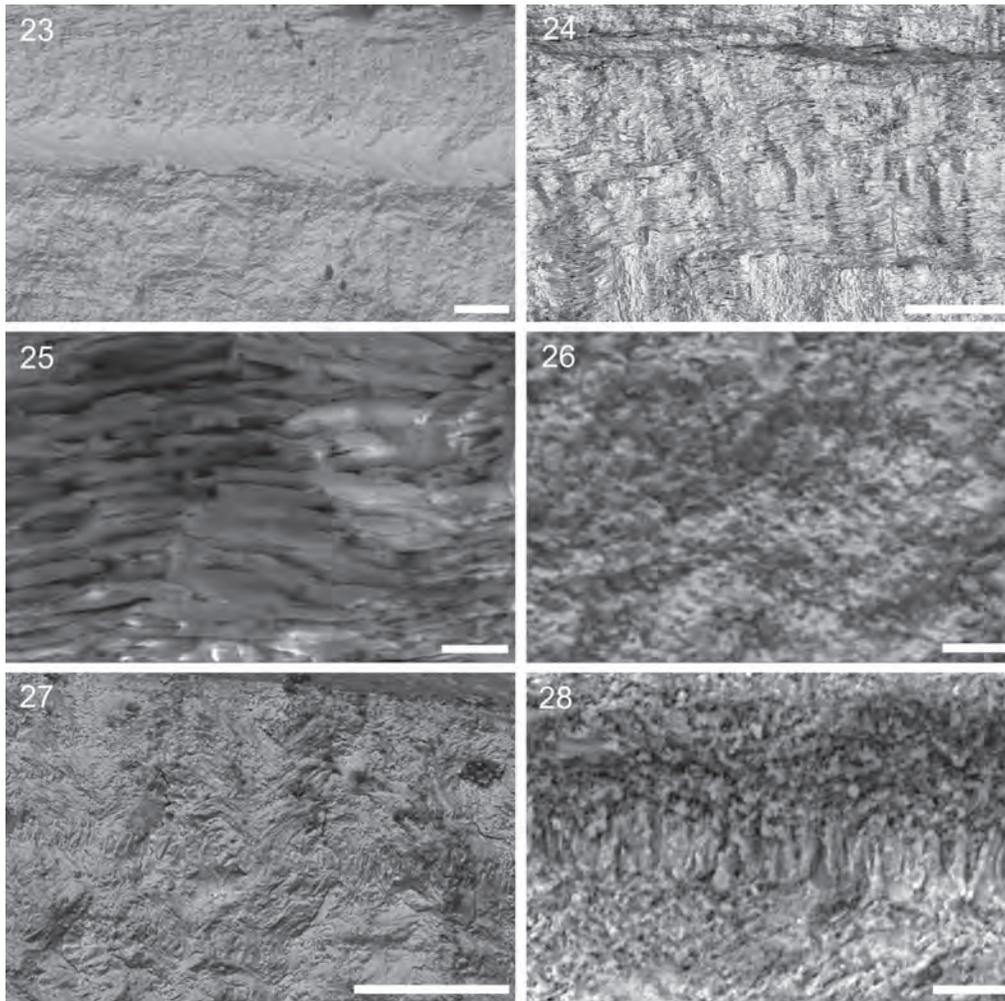
(Fig. 32). It is placed posterodorsal to the visceral mass, and behind it is positioned the base of the siphons. A short, anteriorly directed, rudimentary foot is present at the anterior side of the body (Figs. 29, 30). The adductor muscles are large, the anterior slightly larger than the posterior (Fig. 19); siphons large, hypertrophied, about two times shell length, completely covered, together with all pallial surfaces, with



FIGS. 18–22. *Panopea abbreviata*. FIG. 18: General aspect. Scale bar = 4 cm; FIG. 19: Mantle cavity organs. Scale bar = 4 cm; FIGS. 20–22: Excurrent and incurrent siphons with papillae and short tentacles along the aperture respectively. Scale bar Figs. 20, 22 = 1 cm, Fig. 21 = 5 mm.

a thick, wrinkled, dark brownish periostracum, near the aperture with symbiotic red algae (Figs. 20–22); with small papillae along aperture ring in the excurrent siphon; and with short, irregular tentacles surrounding the apertures in the incurrent siphon (Figs. 20–22); it belongs to type C of Yonge (1957, 1982) formed by fusion of all surfaces of the inner and middle mantle folds (*sensu* Yonge, 1982; Carter et al., 2012), evidenced by the posterior position of

the periostracal groove encircling both siphonal apertures; siphonal pallial septum strong separating the incurrent and excurrent channels by the fused left and right mantle tissue (Fig. 34). Alimentary canal with a mouth followed by a short esophagus that enters the stomach anterodorsally (Figs. 37, 38). The style sac and the midgut are combined leaving the stomach ventrally (Fig. 37); the coiled intestine passes backward through the right side of the visceral

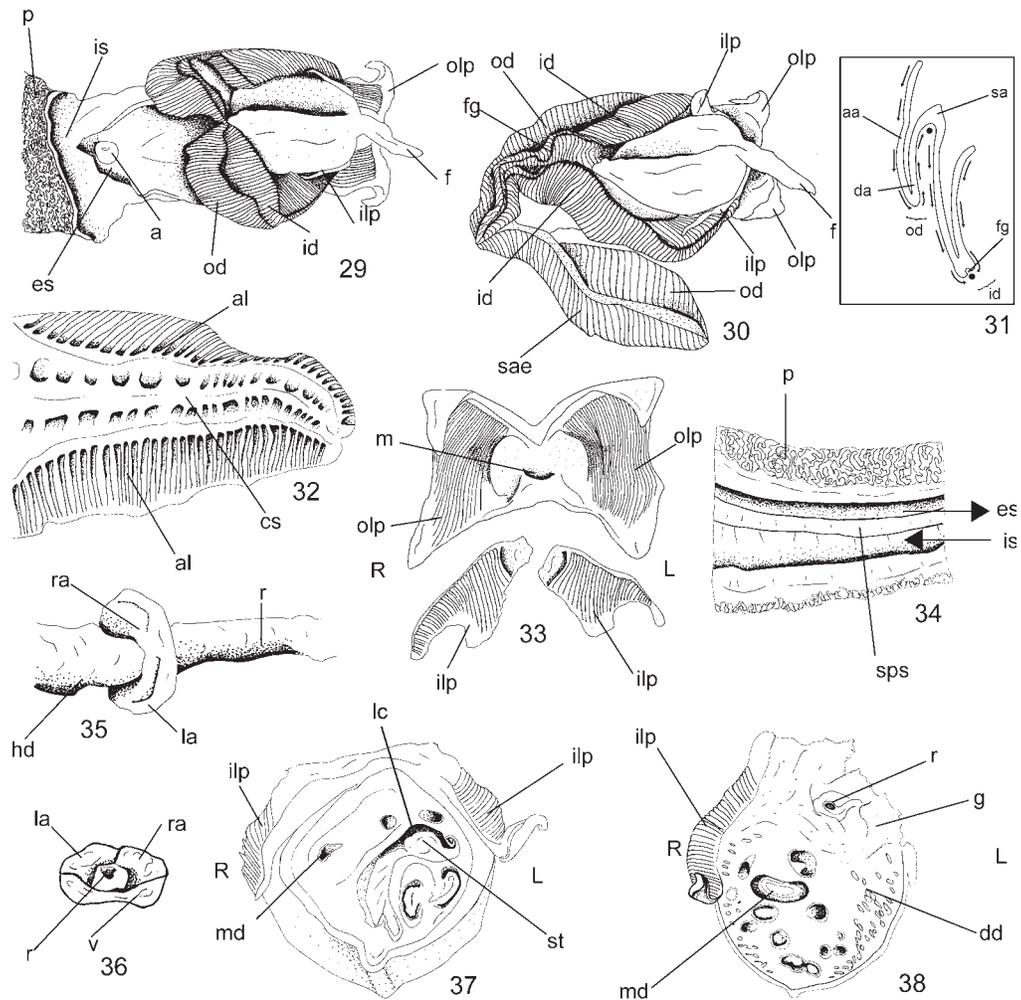


FIGS. 23–28. Shell ultrastructure. FIG. 23: Three layers. Scale bar = 100 μm ; FIGS. 24, 25: Detail of vertical and composite prisms of outer layer. Scale bar = 100 μm and 5 μm respectively; FIG. 26: Middle true homogeneous layer. Scale bar = 10 μm ; FIG. 27: Complex crossed lamellar inner layer. Scale bar = 100 μm ; FIG. 28: Detail of intercalations of irregular simple prisms in the inner layer. Scale bar = 10 μm .

mass ascending to the pericardial cavity as the hindgut, then it passes through the heart to end in the rectum and posteriorly in the anus. The stomach of *P. abbreviata* belongs to Type IVa *sensu* Purchon (1987, 1990) and Carter et al. (2012). The major typhlosole is curved to the left in an incomplete spiral; it goes together with the intestinal groove to its anterior end passing towards the left caecum (Fig. 37). Circulatory sys-

tem pumped by a muscular heart that surrounds the hindgut-rectum placed in a posterodorsal position between visceral mass and posterior adductor muscle in the pericardial cavity, with two inflated auricles, dorsally positioned and one ventral ventricle (Figs. 35, 36).

Symbiosis with Malacobdella arrokeana: The symbiotic relationship between *P. abbreviata*



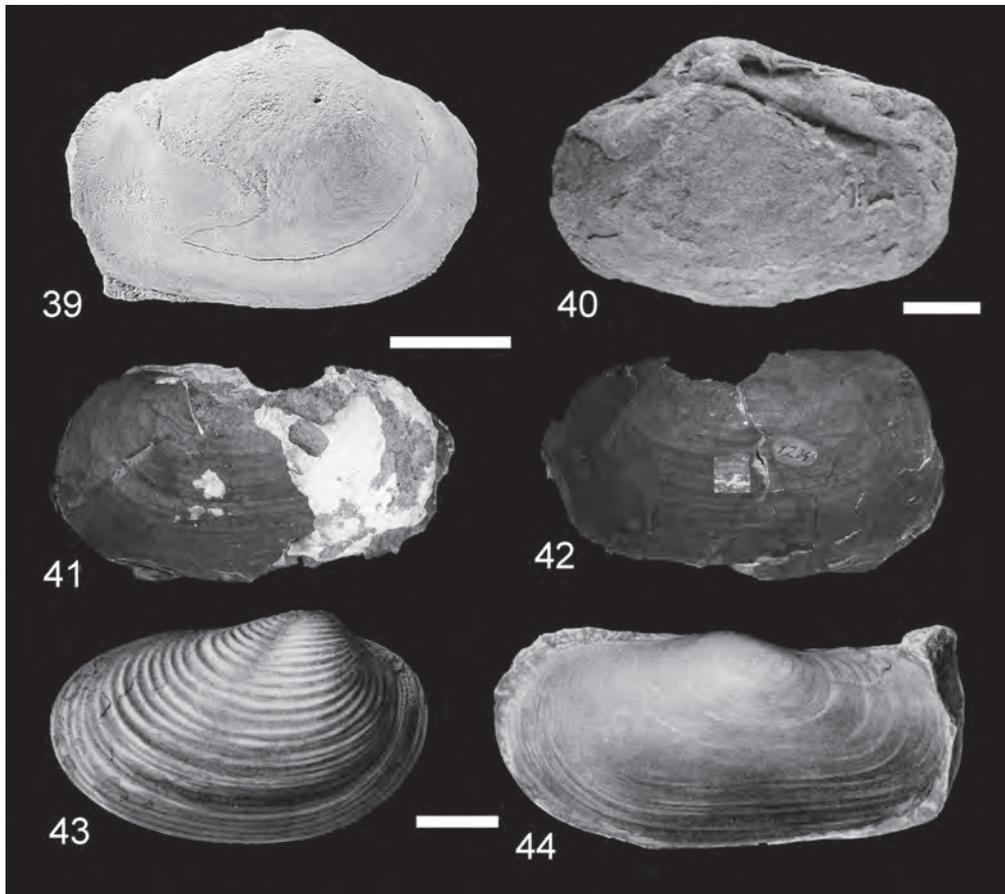
FIGS. 29–38. Anatomy of *Panopea abbreviata*. FIGS. 29, 30: General aspect showing a sectioned outer demibranch and anus aperture; FIG. 31: Diagrammatic transverse section showing the form of the ctenidia and frontal currents direction (from Atkins, 1837); FIG. 32: Ctenidial septum with two rows of perforations; FIG. 33: outer and inner labial palps; FIG. 34: Siphonal pallial septum strong separating the incumbent and excurrent channels; FIGS. 35, 36: Heart with two auricles and one ventricle surrounding the hindgut; FIGS. 37, 38: Transversal section of visceral mass showing digestive system.

and the nemertean *M. arrokeana* has been widely studied (Ivanov et al., 2002; Vazquez et al., 2009; Alfaya et al., 2012). These authors found that almost all collected specimens of *Panopea* (99.4%) were inhabited by the nemertean, which has host specificity, being found only in *P. abbreviata*. *Malacobdella arrokeana*, which lives attached by its terminal sucker, is the only member of the genus reported in the southern Atlantic Ocean (Ivanov et al., 2002). The association allows *M. arrokeana* to obtain food and shelter during its development inside *P. abbreviata*. Immature nemerteans were observed living attached to the gills laminae.

After its development, the nemertean moves and attaches to the mantle cavity by its terminal sucker. The main food source for both species is diatoms and small crustaceans.

Habitat

Panopea abbreviata has been collected from 8 to 25 meters, deeply buried, up to 40 cm in sand and mud substrata rich in organic matter. It is usually recorded with such other clams as *Ensis macha*, *Leukoma antiqua* and *Retrotapes exalbidus*.



FIGS. 39–44. South American fossil taxa of *Panopea*. FIG. 39: *Panopea coquimbensis* d'Orbigny, 1843, MNHN 13626, syntypes; FIG. 40: *Panopea guayacanensis* Philippi, 1887, MNHNC-Pi 247, holotype; FIGS. 41, 42: *Panopaea truncata* Borchert, 1901, MACN-Pi 2530, holotype; FIG. 43: *Panopaea inferior* Wilckens, 1907, original illustration; FIG. 44: *Panopaea hauthali* Wilckens, 1907, original illustration. Scale bar: Figs. 39, 41, 42 = 1 cm; Fig. 40 = 3 cm; Figs. 43, 44 = 2 cm.

Remarks

Type material examination revealed morphological differences between related nominal species that allow us to update the taxonomic status of *P. abbreviata*. *Panopea coquimbensis* d'Orbigny, 1843 (p. 126, pl. 15, figs. 7, 8), described from Tertiary sands around Coquimbo, in northern Chile was incorrectly synonymized with *P. abbreviata* by Bernard (1983). Study of the syntypes deposited at MNHN, represented by internal molds, shows a more elongate shell with a siphonal gap folding outwards more defined and with a pallial sinus V-shaped (Fig. 39). Herm (1969) synonymized *Panopea guayacanensis* Philippi, 1887 (p. 167, pl. 34, fig. 2) from Guayacan, Chile with d'Orbigny's species. Griffin & Nielsen (2008), after an examination of type material of both nominal species, confirmed the synonymy proposed by Herm. *Panopea guayacanensis*, described from Tertiary deposits of Guayacan, was also considered a junior synonym of *P. abbreviata* by Bernard (1983). The type material of Philippi species coincides with d'Orbigny species and clearly differs from the type material of Valenciennes (Fig. 40). *Panopaea truncata* Borchert, 1901 (p. 212, pl. 9, figs. 1, 2), described from Paraná Formation, was also synonymized in the literature (Bernard, 1983). The type material, as well as the original illustration, revealed that Borchert species must be excluded from the synonymy of *P. abbreviata* (Fig. 41, 42). *Panopea truncata* shows a more elongate, rectangular shell, with a straight ventral edge. However, its articulated valves do not allow the study of the hinge. In addition, del Río (1994) considered it to be a junior synonym of *P. regularis* (Ortmann, 1900). *Panopaea inferior* (p. 47, pl. 9, fig. 2) and *P. hauthali* (p. 49, pl. 9, fig. 3), both described by Wilckens (1907), were incorrectly cited as synonyms of *P. abbreviata* by Bernard (1983). The first was described from deposits exposed in Cerro Cazador, Sierra de los Baguales and Cancha Carrera in Santa Cruz Province, and the second from Sierra de los Baguales only. The characters observed in the original illustrations of Wilckens clearly differ with those of *P. abbreviata* (Fig. 43, 44 respectively). The type material of both species was not found in the collection of Freiburg, and they probably did not survive to the Second World War (Sven Nielsen, pers. comm.).

DISCUSSION

From six nominal species synonymized in the literature, only the recent *P. antarctica* Gould, 1850, can be considered a junior synonym of the Valenciennes species. The others are fossils names described along southern Patagonia of Argentina and Chile. The stratigraphic range of Miocene-Recent mentioned by Aguirre & Farinati (1999) is incorrect. The Recent geoduck was never mentioned in various revisions of the fossil mollusks in the Miocene of Argentina (Ihering, 1907; Martínez & del Río, 2002; del Río, 1992, 1994, 2002, 2004, Griffin, 1991, among others). This is a Quaternary-Recent species, well represented in north patagonian gulfs. The material examined shows a well defined distribution from Rio de Janeiro to Peninsula Valdés. Some lots were found in examined malacological collections from localities beyond this southern limit of distribution. The examination of those materials (MACN 17734; MZUSP 13138) revealed the presence of *Panopea aff. abbreviata* in Puerto Deseado, Santa Cruz Province, Argentina. After field work that included the localities of Bahía Camarones, Bahía Bustamante, Caleta Sara, Comodoro Rivadavia (Chubut Province), Punta Buque and Puerto Deseado (Santa Cruz Province), living specimens of *P. abbreviata* were not found. Within this context, the distribution mentioned by Carcelles & Williamson (1951) and Castellanos (1970) is at least uncertain in the southern localities from Peninsula Valdés to Puerto Deseado, as suggested by Alfaya et al. (2012).

The anatomy of this species is similar to other members of the genus. The mantle cavity organs observed by Yonge (1971) and Bower & Blackburn (2003) for the Pacific species *P. generosa* are similar to those in *P. abbreviata*. The examined morphology of the stomach of *P. abbreviata* agrees with that observed by Narchi (1973) and Purchon (1958) in *Hiatella solida* and *H. arctica* respectively. The shell morphology allows us to differentiate the valid American species of the genus. Additional morphological revisions of other species of the genus are necessary to understand the conservative morphology of this group of bivalves. *Panopea abbreviata* Valenciennes, 1839, constitutes together with *Panopea bitruncata* (Conrad, 1872), the two Recent western Atlantic species of the genus.

ACKNOWLEDGMENTS

Special thanks to Virginie Heros and A. Robin (MNHN), Alejandro Tablado (MACN), Cristina Damborenea (MLP), David Rubilar and Christian Salazar (MNHNC), Paula Spotorno (MORG) and Ellen Strong and Yolanda Villacampa (USNM) for their assistance in the revision of the type material and additional examined specimens. Special thanks to Leandro Pérez and Sven Nielsen for the images provided for this work. Many thanks to Leticia Mercante for their considerable suggestions and to Jaime Groizard (Aluar S.A.) for their assistance in SEM images. To "Idea Wild" for contributing with a 60-mm Nikkor micro lens. JHS and JEFA acknowledge CONICET of Argentina. This work was partially supported by the following projects: PICT-R01869 and PICT-0323 of Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Argentina and the Agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo (AECID: A/023484/09 and A/032441/10).

LITERATURE CITED

- ABBOTT, R. T. & S. P. DANCE, 1986, *Compendium of seashells*, revised ed. American Malacologists, Melbourne, Florida, USA, ix + 411 pp.
- ADAMKEWICZ, S. L., M. G. HARASEWYCH, J. BLAKE, D. SAUFDEK & C. J. BULT, 1997, A molecular phylogeny of the bivalve mollusks. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 619–629.
- ADAMS, H. & A. ADAMS, 1856 [1853–1858], *The genera of Recent Mollusca, arranged according to their organization*. Van Voorst, London, 2 vols. Vol. 1: xi + 484 pp.; Vol. 2: 1–604.
- AGUIRRE M. L. & E. A. FARINATI, 1999, Paleobiogeografía de las faunas de moluscos marinos del Neógeno y Cuaternario del Atlántico Sudoccidental. *Revista de la Sociedad Geológica de España*, 12(1): 93–112.
- ALFAYA J. E. F., G. BIGATTI & A. MACHORDOM, 2012, Mitochondrial and nuclear markers reveal a lack of genetic structure in the entocommensal nemertean *Malacobdella arrokeana* in the Patagonian gulfs. *Helgoland Marine Research*, DOI: 10.1007/s10152-012-0326-z
- ARAMBULA-PUJOL, E. M., A. R. GARCÍA-JUÁREZ, E. ALCÁNTARA-RAZO & E. ARAGÓN-NORIEGA, 2008, Aspectos de biología reproductiva de la almeja de sifón *Panopea globosa* (Dall 1898) en el Golfo de California. *Hidrobiológica*, 18(2): 89–98.
- ATKINS, D., 1937, On the ciliary mechanisms and interrelationships of Lamellibranchia. *Quarterly Journal of the Microscopical Science*, (n.s.), 79(3): 375–421.
- BARATTINI, L. P. & E. H. URETA, 1961 ["1960"], La fauna de las costas del este (invertebrados). *Publicaciones de Divulgación Científica, Museo "Damaso Antonio Larrañaga"*, Montevideo, Uruguay, 108 pp.
- BERNARD, F. R., 1983, Catalogue of the living Bivalvia of the eastern Pacific Ocean: Bering Strait to Cape Horn. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61: 1–102.
- BORCHERT, A., 1901, Die Molluskenfauna und das Alter der Parana-Stufe. In: G. STEIMANN, ed., Beiträge zur Geologie und Palaeontologie von Südamerika. *Neues Jahrbuch für Mineralogie, Geologie und Paläontologie*, 14: 171–245.
- BOWER, S. M. & J. BLACKBOURN, 2003, *Geoduck clam (Panopea abrupta): Anatomy, histology, development, pathology, parasites and symbionts*, URL: <http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/science/species-especies/shellfish-coquillages/geopath/index-eng.htm>
- BRUSA, F., N. VÁZQUEZ & F. CREMONTE, 2011, *Paravortex panopea* n. sp. (Platyhelminthes: Rhabdocoela) on clams from the northern Patagonian coast, Argentina: pathogeny and specificity. *Helminthologia*, 48(2): 94–100.
- CARCELLES, A., 1944, Catálogo de los moluscos marinos de Puerto Quequen. *Revista del Museo de La Plata, 3 - Sección Zoología*: 233–309.
- CARCELLES, A. & S. WILLIAMSON, 1951, Catálogo de los moluscos marinos de la provincia magallánica. *Revista del Instituto Nacional de Investigación de las Ciencias Naturales, 2 Ciencias Zoológicas*: 225–383.
- CARTER, J. G. & D. C. CAMPBELL, with contributions by C. R. ALTABA, L. C. ANDERSON, R. ARAUJO, A. BEU, A. S. BIAKOV, A. BOGAN, M. CAMPBELL, C. JIN-HUA, J. COPE, G. DELVENE, H. DIJKSTRA, F. ZONG-JIE, V. GAVRILOVA, I. GONCHAROVA, A. GUSHOV, P. HARRIES, J. H. HARTMAN, W. R. HOEH, J. HYLLEBERG, J. BAO-YU, P. JOHNSTON, L. KIRKENDALE, K. KLEEMANN, J. KOPPKA, J. KRÍŽ, D. MACHADO, N. MALCHUS, O. MANDIC, A. MÁRQUEZ-ALIAGA, J. MASSE, P. U. MIDDELFART, S. MITCHELL, L. A. NEVESSKAJA, S. ÖZER, J. POJETA, JR., I. V. POLUBOTKO, J. M. PONS, S. POPOV, T. SÁNCHEZ, A. F. SARTORI, R. W. SCOTT, I. I. SEY, S. JIN-GENG, J. H. SIGNORELLI, V. V. SILANTIEV, P. W. SKELTON, T. STEUBER, J. B. WATERHOUSE, G. L. WINGARD & T. YANCEY, 2011, A synoptical classification of the Bivalvia (Mollusca). *Paleontological Contributions* 4: 1–47.
- CARTER, J., P. HARRIES, N. MALCHUS, A. F. SARTORI, L. C. ANDERSON, R. BIELER, A. E. BOGAN, E. V. COAN, J. C. W. COPE, S. M. CRAGG, J. M. GARCÍA-MARCH, J. HYLLEBERG, P. KELLEY, K. KLEEMANN, J. KRÍŽ, C. MCROBERTS, P. MIKKELSEN, J. POJETA, JR., I. TĚMKIN, T. YANCEY & A. ZIERITZ, 2012, Illustrated glossary of the Bivalvia. *Treatise, Online: Treatise on Invertebrate Paleontology*, Part N, Revised, Vol. 1(31): 1–211.
- CASTELLANOS, Z. J. A. D., 1970, Catálogo de los moluscos marinos bonaerenses. *Anales de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires*, 8: 9–365.
- CHILDREN, J. G., 1822, Lamarck's genera of shells translated from French by J. G. Children,

- with plates from original drawings, by Miss Anna Children. *Quarterly Journal of Science, Literature and Arts*, 14(27): 64–86.
- CIOCCO, N., I. ELÍAS, J. M. ORENSANZ, A. PARMA, P. CICCARONE, G. SARSA, A. SERDÁ, P. OROQUIETA & M. PINEIRO, 2001, Explotación de la almeja *Panopea* (*Panopea abbreviata*) en Chubut Consideraciones para su Manejo. *Documento Técnico No 1 Comisión Técnica DGIMPC-CENPAT-APAPM*, 1: 18 pp.
- CLESSIN, S., 1895 [1893–1895], Mollusca Dimyaria. Gastrochaenacea, Gastrochaenaceae. Die Familie Gastrochaenidae. Systematisches Conchylien-Cabinet von Martini und Chemnitz, 2nd ed., Bauer & Raspe, Nürnberg. 11(4a): 1–58, pls. 1–21 [pls. 1–3 (1893)]; pp. 1–24, pls. 4–9 (1894); pp. 25–57 + [1], pls. 10–21 (1895).
- DALL, W. H., 1912, Note on the genus *Panope*, Menard. *Proceedings of the Malacological Society of London*, 10: 34–35.
- DEL RÍO, C. J., 1992, Middle Miocene bivalves of the Puerto Madryn Formation, Valdés Peninsula, Chubut Province, Argentina (Nuculidae – Pectinidae). Part 1. *Paleontographica*, 225A: 1–57.
- DEL RÍO, C. J., 1994, Middle Miocene bivalves of the Puerto Madryn Formation, Valdés Peninsula, Chubut Province, Argentina (Lucinidae – Pholadidae). Part 2. *Palaeontographica*, 231A: 93–132.
- DEL RÍO, C. J., 2002, Moluscos del Terciario Marino. In: *XV Congreso Geológico Argentino*. Geología y Recursos Naturales de Santa Cruz; M. J. Haller, ed., *Relatorio*, II–9: 1–22.
- DEL RÍO, C. J., 2004, Tertiary marine molluscan assemblages of eastern Patagonia (Argentina): a biostratigraphic analysis. *Journal of Paleontology*, 78: 1097–1122.
- FELDMAN, K., B. VADOPALAS, D. ARMSTRONG, C. FRIEDMAN, R. HILBORN, K. NAISH, J. M. ORENSANZ, J. VALERO, J. RUESINK, A. SUHRBIER, A. CHRISTY, D. CHENEY & J. DAVIS, 2004, *Comprehensive literature review and synopsis of issues relating to geoduck (Panopea abrupta) ecology and aquaculture production*. Washington State Department of Natural Resources, 134 pp.
- FIGUEIRAS, A. & O. E. SICARDI, 1970, Catálogo de los moluscos marinos del Uruguay parte 4. *Comunicaciones de la Sociedad Malacologica del Uruguay*, 2: 407–421.
- FISHER, J., M. MEADERS, S. LUCHESSA & K. MUELLER, 2008, *A supplemental analysis of the environmental concerns associated with intertidal geoduck clam aquaculture: effects on wild geoduck genetics, potential for toxin re-suspension and effects on soft-sediment associated communities*. ENVIRON Seattle, 40 pp.
- FLEMING, J., 1818 [1818–1819], Conchology. Pp. 284–316, in: Volume third of: *Supplement to the fourth, fifth, and sixth editions of the Encyclopaedia Britannica [1815–1824]. With preliminary dissertations on the history of the sciences. Illustrated by engravings*. Archibald Constable & Company, Edinburgh; Hurst, Robinson & Company, London [article signed “Q. Q.”].
- GOODWIN, C. L. & B. C. PEASE, 1991, Geoduck, *Panopea abrupta* (Conrad, 1849), size, density, and quality as related to various environmental parameters in Pudget Sound, Washington. *Journal of Shellfish Research*, 10: 65–77.
- GOULD, A. A., 1850, Shells from the United States Exploring Expedition. *Proceedings of the Boston Society Natural History*, 3: 214–218.
- GOULD, A. A., 1852–1861, Atlas. Mollusca and shells. In: *United States Exploring Expedition. During the years 1838, 1839, 1840, 1041, 1842. Under the command of Charles Wilkes, U.S.N.*, Vol. 12). C. Sherman & Son, Philadelphia, xv+ 510 pp.; 16 pp., 52 pls.
- GOULD, A. A., 1862, *Otia conchologica: descriptions of shells and mollusks, from 1839 to 1862*. Gould & Lincoln, Boston, 256 pp.
- GRIFFIN, M., 1991, Eocene Bivalves from the Rio Turbio Formation, southwestern Patagonia (Argentina). *Journal of Paleontology*, 65: 119–146.
- GRIFFIN, M. & S. NIELSEN, 2008, A revision of the type specimens of Tertiary molluscs from Chile and Argentina described by Orbigny (1843), Sowerby (1846) and Hupé (1854). *Journal of Systematic Paleontology*, 6(3): 251–316.
- HERM, D., 1969, Marines Pliozän und Pleistozän in Nord- und Mittel-Chile unter besonderer Berücksichtigung der Entwicklung der Mollusken-Faunen. *Zitteliana*, 2: 1–159.
- HUBER, M., 2010, *Compendium of bivalves*. Hackenheim, Germany, 901 pp.
- ICZN, 1986, Opinion 1414. *Panopea* Menard de la Groye, 1807 (Mollusca, Bivalvia): conserved. *Bulletin of Zoological Nomenclature*, 43(3): 258–261.
- IHERING, H. V., 1907, Les mollusques fossiles du Tertiaire et du Cretace Superieur de l'Argentine. *Anales del Museo Nacional de Buenos Aires*, Serie III: 1–611.
- IVANOV, V. A., G. BIGATTI, P. PENCHASZADEH & J. L. NORENBURG, 2002, *Malacobdella arrokeana* (Nemertea: Bdellonemertea), a new species of a nemertean from southwestern Atlantic Ocean entocommensal in *Panopea abbreviata* (Bivalvia, Heterodonta, Hiatellidae) in Argentina. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 115: 359–367.
- KEEN, A. M., 1969, Superfamily Hiatellacea Gray, 1824. Pp. N700–N702, in: R. C. MOORE, ed., *Treatise on Invertebrate Paleontology*. Part N: Mollusca 6, Bivalvia. Geological Society of America & University of Kansas Press, Boulder, Colorado & Lawrence, Kansas.
- LAMY, E., 1925, Révision des Saxicavidae vivants du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. *Journal de Conchyliologie (Paris)*, 68(4): 261–283.
- LASTA, M. L., N. F. CIOCCO, C. BREMEC & A. ROUX, 1998, Bivalve and gastropod molluscs. The Argentine Sea and its fisheries resources. Molluscs of interest for fisheries. *Culture and reproductive strategies of bivalves and echinoids*, 2: 115–142.
- LEYVA-VALENCIA, I., S. ÁLVAREZ-CASTAÑEDA TICUL, D. LLUCH-COTA, S. GONZÁLEZ PE-

- LÁEZ, S. PÉREZ-VALENCIA, B. VADOPALAS, S. RAMÍREZ-PÉREZ & P. HERNÁNDEZ CRUZ, 2012, Shell shape differences between two species and phenotypic variation among *P. globosa* at different sites using two geometric morphometrics approaches. *Malacologia*, 55(1): 1–13.
- MARSHALL, R., R. S. MCKINLEY & C. M. PEARCE, 2012, Effect of temperature on gonad development of the Pacific geoduck clam (*Panopea generosa* Gould, 1850). *Aquaculture*, 338–341: 264–273.
- MARTÍNEZ, S. & C. DEL RÍO, 2002, Las provincias malacológicas Miocenas y Recientes del Atlántico sudoccidental. *Anales de Biología*, 24: 121–130.
- MARTORELLI S. R., N. CIOCCO & M. BAZTER-RICA, 2003, *Nuevos aportes a la morfología y distribución de Malacobdella arrokeana (Nemertini: Malacobdellidae) un endocomensal del geoduck del sur Panopea abbreviata (Valenciennes, 1839)*. Segundo Congreso Virtual de Acuicultura. Zaragoza, España, pp. 399–419.
- MAYER-EYMAR, K. W., 1870, Catalogue systématique et descriptif des fossiles qui se trouvent au Musée Fédéral de Zürich, 4e cahier. Mollusques de la famille des Panopéides. *Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich*, 15: 31–82.
- MÉNARD DE LA GROYE, M., 1807, Mémoire sur un nouveau genre de coquille de la famille des solénoides. *Annales du Muséum d'Histoire Naturelle*, 9: 131–139.
- MORSÁN, E. & N. CIOCCO, 2004, Age and growth model for the southern geoduck, *Panopea abbreviata*, off Puerto Lobos (Patagonia, Argentina). *Fisheries Research*, 69(3): 343–348.
- MORSÁN, E., P. ZAIDMAN, M. OCAMPOS-REINALDO & N. CIOCCO, 2010, population structure, distribution and harvesting of southern geoduck, *Panopea abbreviata*, in San Matías Gulf (Patagonia, Argentina). *Scientia Marina*, 74: 763–772.
- NARCHI, W., 1973, On the functional morphology of *Hiattella solida* (Hiattellidae: Bivalvia). *Marine Biology*, 19: 332–337.
- NARVÁRTE, M., R. GONZÁLEZ & P. FILIPPO, 2007, Artisanal mollusk fisheries in San Matías Gulf (Patagonia, Argentina): an appraisal of the factors contributing to unsustainability. *Fisheries Research*, 87 (1): 68–76.
- ORBIGNY, A. D. d', 1843–1844, *Voyage dans l'Amérique méridionale ... exécuté pendant les années 1826, 1827, 1828, 1829, 1830, 1831, 1832, et 1833*, Vol. 3(4) [Paléontologie.]: 188 pp., 22 pls. [in Atlas]. Paris (Bertrand) & Strasbourg (Levrault).
- ORBIGNY, A. D. d', 1846 [1835–1847], *Voyage dans l'Amérique méridionale (Le Brésil, La République Orientale de L'Uruguay, La République Argentine, La Patagonie, La République du Chili, La République de Bolivie, La République du Pérou) exécuté pendant les années 1826, 1827, 1828, 1829, 1830, 1831, 1832 et 1833*, Vol. 3(4), *Paléontologie*. Pitois-Levrault, Ve. Levrault, Paris & Strasbourg.
- ORTMANN, A. E., 1900, Synopsis of the collections of invertebrate fossils made by Princeton expedition to southern Patagonia. *American Journal of Science* (Ser. 4), 10: 368–381.
- PHILIPPI, R. A., 1887, Die Tertiären und Quartären Versteinerungen Chiles. F. A. Brockhaus, Leipzig, 266 pp., 58 pls.
- PURCHON, R. D., 1958, The stomach in the Eulamellibranchia; stomach type IV. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 131(4):487–525.
- PURCHON, R. D., 1987, The stomach in the Bivalvia. *Royal Society of London, Philosophical Transactions (series B, Biological Sciences)*, 316(1177): 183–276.
- PURCHON, R. D., 1990, Stomach structure, classification and evolution of the Bivalvia. Pp. 73–82, in: B. MORTON, ed., *The Bivalvia – Proceedings of a Memorial Symposium in Honour of Sir Charles Maurice Yonge (1899–1986)*, Edinburgh, 1986. Hong Kong University Press, Hong Kong, viii + 355 pp.
- RIOS, E. C., 1975, *Brazilian marine mollusks iconography*. Rio Grande, 331 pp.
- RIOS, E. C., 1994, *Seashells of Brazil*. Editora da Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande, 368 pp.
- RIOS, E. C., 2009, *Compendium of Brazilian sea shells*. Rio Grande, R. S., Brazil, 676 pp.
- ROCHA OLIVARES, A., L. CALDERON AGUILERA, E. ARAGÓN NORIEGA, N. SAAVEDRA SOTELO & V. M. MORENO RIVERA, 2010, Genetic and morphological variation of north-east Pacific *Panopea* clams: evolutionary implications. *Journal of Shellfish Research*, 29: 327–335.
- SCARABINO, V., 1977, Moluscos del Golfo San Matías (Provincia de Rio Negro, Republica Argentina. Inventario y Claves para su identificación. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay*, 4: 177–285.
- SCARABINO, F., 2003, Lista sistemática de los bivalvia marinos y estuarinos de Uruguay. *Comunicaciones de la Sociedad Malacologica del Uruguay*, 8: 229–259.
- SCARABINO, F., J. C. ZAFFARONI, C. CLAVIJO, A. CARRANZA & M. NIN, 2006, Bivalvos marinos y estuarinos de la costa Uruguay: faunística, distribución, taxonomía y conservación. Pp. 157–169, in: R. MENAFRA, L. RODRIGUEZ-GALLEGO, F. SCARABINO & D. CONDE, eds., *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya*. Vida Silvestre Uruguay, Montevideo, xx pp.
- SOWERBY, G. B., II, 1873, Monograph of the genus *Panopaea*. Vol. 19: 6 pls., in: L. A. REEVE & G. B. SOWERBY, II, eds., 1843–1878, *Conchologia Iconica, or Illustrations of the shells of molluscos animals*. L. Reeve & Co., London, 20 vols. [unnumbered pages are captions for the plates].
- STASEK, C. R., 1963, Synopsis and discussion of the association of ctenidia and labial palps in the bivalved Mollusca. *The Veliger*, 6: 91–97.
- TAYLOR, J. D., S. WILLIAMS, E. GLOVER & O. DYAK, 2007, A molecular phylogeny of heterodont bivalves (Mollusca: Bivalvia: Heterodonta):

- new analyses of 18S and 28S rRNA genes. *Zoologica Scripta*, 36: 587–606.
- TESO, S. V., G. BIGATTI, M. C. BAZTERRICA, N. CIOCCO & P. PENCHASZADEH, 2006, The reproductive cycle of the entocommensal nemertean *Malacobdella arrokeana* and its symbiosis with the geoduck *Panopea abbreviata*. *Invertebrate Biology*, 125: 314–324.
- TRYON, G. W., JR., 1869, Catalogue of the families Saxicavidae, Myidae and Corbulidae. *American Journal of Conchology*, 4(5) [Appendix]: 57–68.
- VADOPALAS, B., T. W. PIETSCH & C. S. FRIEDMAN, 2010, The proper name for the geoduck: resurrection of *Panopea generosa* Gould, 1850, from the synonymy of *Panopea abrupta* (Conrad, 1849) (Bivalvia: Myoida: Hiatellidae). *Malacologia*, 52(1): 169–173.
- VALENCIENNES, A., 1839, Description de l'animal de la panopée Australe, et recherches sur les autres espèces vivants ou fossiles de ce genre. *Archives du Muséum National d'Histoire Naturelle*, 1: 1–38.
- VALENCIENNES, A., 1843, *Panopaea*. Panopée Ménard de la Groye. In: J. C. CHENU, 1842, 1843, 1846, ed., *Illustrations conchyliologiques ou description et figures de toutes les coquilles connues vivantes et fossiles, classées suivant le système Lamarck modifié d'après les progrès de la science, et comprenant les genres nouveaux et les espèces récemment découvertes*. Franck, Paris, 4 Vols., 215 pp., 482 pls.
- VAN DER MOLEN, S., M. KROECK & N. CIOCCO, 2007, Reproductive cycle of the southern geoduck clam, *Panopea abbreviata* (Bivalvia: Hiatellidae), in north Patagonia, Argentina. *Invertebrate Reproduction and Development*, 50(2): 75–84.
- VAUGHT, K. C., 1989, *A classification of the living Mollusca*. American Malacologists, Melbourne, Florida, xii + 195 pp.
- VÁZQUEZ, N., G. BIGATTI, C. ITUARTE & F. CREMONTE, 2009, Attachment of the nemertean *Malacobdella arrokeana* to the mantle of the geoduck *Panopea abbreviata* and survival outside the host. *Journal of Shellfish Research*, 28: 759–761.
- VÁZQUEZ, N., F. RODRÍGUEZ, C. ITUARTE, J. KLAICH & F. CREMONTE, 2010, Host-parasite relationship of the geoduck *Panopea abbreviata* and the green alga *Coccomyxa parasitica* in the Argentinean Patagonian coast. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105: 254–260.
- VOKES, H. E. & L. R. COX, 1961, Proposal to validate the generic name *Panopea* Ménard de la Groye, 1807 (Mollusca: Bivalvia) under the Plenary Powers, together with certain related proposals. *Bulletin of Zoological Nomenclature*, 18: 184–188.
- WILCKENS, O., 1907, Die Lamellibranchiaten, Gastropoden, etc., der oberen Kreide Südpatagoniens. *Berichte der Naturforschenden Gesellschaft zu Freiburg im Breisgau*, 50: 97–166.
- WINCKWORTH, R., 1929, The genotypes selected by Fleming in 1818 and 1822. *Proceedings of the Malacological Society of London*, 18: 224–229.
- WOODWARD, S. P., 1851, 1854, 1856, *A manual of the Mollusca; or, rudimentary treatise of Recent and fossil shells*. J. Weale, London, xvi + 486 pp., 24 pls., 1 map [published in parts and reissued in 1856 in one vol.].
- WOODWARD, S. P., 1870, *Manuel de conchyliologie, ou histoire naturelle des mollusques vivants et fossiles* [French translation of Woodward, 1866, the 2nd edition of *A manual of the Mollusca*... With appendix by Alois Humbert.]. F. Savy, Paris, iii + 657 p., 23 pls., 1 map.
- YONGE, C. M., 1957, Mantle fusion in the lamellibranchia. *Pubblicazione Stazione Zoologica di Napoli*, 29: 151–171.
- YONGE, C. M., 1982, Mantle margins with a revision of siphonal types in the Bivalvia. *Journal of Molluscan Studies*, 48: 102–103.
- YONGE, C. M., 1971, On functional morphology and adaptative radiation in the bivalve superfamily Saxicavacea (*Hiatella* (= *Saxicava*), *Saxicavella*, *Panomya*, *Panope*, *Cyrtodaria*). *Malacologia*, 11 (1): 1–44.
- YONGE, C. M., 1982, Mantle margins with a revision of siphonal types in Bivalvia. *Journal of Molluscan Studies*, 48(1):102–103.
- ZAIMAN, P. C., M. A. KROECK, E. M. OEHRENS KISSNER & E. MORSÁN, 2012, Reproductive pattern of southern geoduck, *Panopea abbreviata*, at El Sótano (San Matías Gulf, Patagonia, Argentina). *Marine Biology Research*, 8 (2): 172–181.