



?

?

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN
(BIOLOGÍA MARINA)

Chloeia, Eurythoe y Notopygos (Polychaeta: Amphinomidae):
Revisión de las especies registradas en México y aspectos reproductivos

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. EN C. BEATRIZ YÁÑEZ RIVERA

TUTORES
DRA. MA. NURIA MÉNDEZ UBACH
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD ACADÉMICA
MAZATLÁN, UNAM
DR. SERGIO I. SALAZAR VALLEJO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

COMITÉ TUTOR
DR. MICHEL HENDRICKX RENERS
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD ACADÉMICA
MAZATLÁN, UNAM
DRA. BLANCA CLAUDIA FARFÁN
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
DR. EUGENIO CARPIZO ITUARTE
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

MÉXICO, D. F., MAYO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



CHLOEIA, *EURYTHOE* Y *NOTOPYGOS* (POLYCHAETA: AMPHINOMIDAE):
REVISIÓN DE LAS ESPECIES REGISTRADAS EN MÉXICO Y ASPECTOS
REPRODUCTIVOS

T E S I S

que para obtener el grado académico de

DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MARINA)

presenta

BEATRIZ YÁÑEZ RIVERA

Directores de tesis:

DRA. MA. NURIA MÉNDEZ UBACH
DR. SERGIO I. SALAZAR VALLEJO

Comité tutorial:

DR. MICHEL HENDRICKX RENERS
DRA. BLANCA CLAUDIA FARFÁN
DR. EUGENIO CARPIZO ITUARTE

MÉXICO, D. F., MAYO 2015

Índice

Índice	i
Agradecimientos	iii
Resumen	v
Abstract	vii
Capítulo I. Introducción	1
Capítulo II. Species of <i>Chloeia</i> from Mexico: morphological and barcode	9
Capítulo III. Reestablishment of <i>Notopygos megalops</i> McIntosh, description of <i>N. caribea</i> n. sp. from the Greater Caribbean and barcoding of “amphiamerican” <i>Notopygos</i> species (Annelida, Amphinomidae). Yáñez-Rivera, B. & Carrera-Parra, L. F. 2012. <i>Zookeys</i> 223: 69–84	45
Capítulo IV. Revamping Amphinomidae (Annelida: Amphinomorpha), with the inclusion of <i>Notopygos</i> . Borda, E., Yáñez-Rivera, B. et al. 2015. <i>Zoologica Scripta</i> 44: 324–333	63
Capítulo V. Evaluación de <i>Eurythoe complanata mexicana</i> Berkeley & Berkeley 1960	83
Capítulo VI. Regeneration in the stinging fireworm <i>Eurythoe</i> (Annelida): Lipid and triglyceride evaluation. Yáñez-Rivera, B. & Mendez, N. 2014. <i>Journal of Experimental Marine Biology and Ecology</i> 459: 137-143	105
Capítulo VII. Aspectos reproductivos de <i>Eurythoe</i> sp. A	115
Capítulo VIII. Discusión y conclusiones	139
Literatura Citada	147

Agradecimientos

Al Posgrado del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por las facilidades otorgadas durante mis estudios de doctorado y los apoyos económicos para estancias y congresos.

A CONACYT por la beca de posgrado 175321y la de movilidad estudiantil en el extranjero.

A mis directores Dra. Nuria Méndez (ICMyL) y Dr. Sergio I. Salazar (ECOSUR, Chetumal) por su gran apoyo, confianza y acertadas críticas.

A mi comité, la Dr. Claudia Farfán (CICESE), el Dr. Eugenio Carpizo (IIO) y el Dr. Michel Hendrickx (ICMyL) quienes evaluaron el desarrollo de la tesis con optimismo y severidad necesarios.

A la Dra. Elizabeth Borda (Texas A&M) por conjuntar esfuerzos para descifrar algunas interrogantes sobre los gusanos de fuego y su cordialidad durante mis estancias.

Al M. en C. Sergio Rendón por el apoyo en los muestreos, el soporte para el montado y mantenimiento del acuario. Al Dr. José Salgado M. por su apoyo en los muestreos y a los amigos que me acompañaron en los muestreos de algunos meses, incluyendo a TB y Vlad.

Al Dr. Carballo (ICMyL) por las facilidades para realizar los cortes de histología en el laboratorio que dirige, al Biol. Jesús Armando por su disponibilidad, asesoría y ayuda para lograrlo.

A la Dra. María Ana Tovar (GEOMARE, A. C.) por sus sugerencias y apoyo para empezar el doctorado, además de su amistad.

A mis compañeros del laboratorio Nuri, Sam, Nep, Tulio, Zaira, Néstor y agregados del Laboratorio Invertebrados II.

A Axa, Erandi y Socorro Molina por todo el apoyo y cariño durante mi formación de posgrado.

A mis padres Gloria y Roberto, a Tere, Beto y Vlad por su apoyo incondicional, gran cariño y comprensión total. También a Male M, a quien extraño tanto.

Resumen

Yáñez-Rivera, B. 2015. *Chloeia*, *Eurythoe* y *Notopygos* (Polychaeta: Amphinomidae): Revisión de las especies registradas en México y aspectos reproductivos. Tesis de Doctorado, Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, ICML, UNAM. 154 pp.

Los anélidos poliquetos del género *Chloeia*, *Eurythoe* y *Notopygos* pertenecen a la familia Amphinomidae que se caracteriza por la presencia de una carúncula, setas calcáreas y un cordón tetraneural. Se conocen comúnmente como gusanos de fuego; no obstante, la sensación de quemadura sólo la producen algunas especies. Los anfinómidos son comunes en zonas intermareales y abundan en zonas coralinas o rocosas, pero también se encuentran en el mar profundo y en ambientes quimiosintéticos. En relación con los otros grupos de poliquetos los anfinómidos han sido poco estudiados. Los objetivos de la tesis fueron contribuir al esclarecimiento de las especies registradas en México para los tres géneros incorporando atributos morfológicos y moleculares, y describir la biología reproductiva de *Eurythoe* sp. A, uno de los taxones más abundantes en Mazatlán, respecto a su ciclo reproductivo en el medio natural, caracterización del desarrollo larvario y regeneración en condiciones controladas. La inclusión de *Notopygos* en el análisis filogenético permitió reconocer dos subfamilias en Amphinomidae: Archinominae y Amphinominae. Este arreglo sistemático refleja los grupos naturales y se modifica el estatus de la familia Archinomidae porque reconocerla genera un grupo parafilético. Respecto a la problemática taxonómica se restablecieron las especies *C. euglochis* y *N. megalops*, se delimitaron *C. entypa*, *C. pinnata* y *C. viridis*, se elevó el estatus para nivel de especie de *E. complanata mexicana* y se describieron *Chloeia* spp. A y B, *N. caribea*, *N. kekooa* y *Eurythoe* spp. A y B. Con esta información se comprobó que varios registros eran erróneos y se determinó que las especies de anfinómidos pertenecientes a *Chloeia*, *Notopygos* y *Eurythoe* no presentan la amplia distribución previamente considerada. Sólo el taxón *Eurythoe* sp. B tiene una distribución anfiamericana, las especies *C. viridis*, *N. crinita*, y *E. carunculata* no son anfiamericanas (sólo se presentan en la costa Atlántica), mientras que *N. ornata* sólo en el Pacífico (sus registros en el Atlántico son erróneos). Se demostró que un gusano amputado de *Eurythoe* sp. A puede generar dos o tres organismos funcionales en 50 días. La formación del blastema en el inicio de la regeneración causa la mayor demanda de lípidos y triglicéridos en la regeneración anterior. También se observaron malformaciones en la carúncula y en el patrón de segmentación durante la regeneración. *Eurythoe* sp. A presenta un ciclo secuencial de reproducción sexual/asexual anual, de julio a octubre. La producción de gametos ocurre en julio, agosto y septiembre, los meses con mayor temperatura, mientras que en septiembre y octubre los organismos se reproducen asexualmente. Durante el seguimiento del desarrollo larvario no se observó la larva rostraria y se requieren más estudios para lograr la caracterización del ciclo de vida completo de la especie.

Abstract

Yáñez-Rivera, B. 2015. *Chloeia*, *Eurythoe* y *Notopygos* (Polychaeta: Amphinomidae): review of species from Mexico and reproductive topics. PhD thesis, Postgraduate program in marine science and limnology, ICML, UNAM. 154 pp.

Polychaete annelids of the genus *Chloeia*, *Eurythoe* and *Notopygos* belong to Amphinomidae. These worms are characterized by the presence of a caruncle, calcified chaetae and tetraneural nervous system. They are commonly known as fireworms; however, the burning sensation is produced only by some species. Amphinomids are abundant in intertidal zones from coral or rocky shores, but are also found in the deep sea and chemosynthetic environments. In relation to other groups of polychaetes amphinomids have been few studied. This thesis addressed amphinomids study from different scales, since taxonomic review of species from Mexico for three genera with molecular and morphological data to an annual reproductive cycle, characterization of larval development and regeneration study of the most abundant fireworm in Mazatlan *Eurythoe* sp. A. Phylogenetic analysis including *Notopygos* permit establish two subfamilies within Amphinomidae: Archinominae and Amphinominae. This systematic arrangement reflects the natural groups meanwhile the anteriorly Archinomidae family proposal, involving a paraphyletic group. In relation to taxonomic problems the species *C. euglochis* and *N. megalops* were reestablished, *C. entypa*, *C. pinnata* and *C. viridis* were delimited, *E. mexicana* was determinate as valid species, and *Chloeia* spp. A and B, *N. caribea*, *N. kekooa* and *Eurythoe* spp. A and B were described. This information reveals that several records were wrong and shows that species of *Chloeia*, *Eurythoe* and *Notopygos* not are widespread as traditionally thought. Only *Eurythoe* sp. B has a amphiamerican distribution, *C. viridis*, *N. crinita* and *E. carunculata*, are not amphiamerican (only are present on the Atlantic coast), while *N. ornata* only in the Pacific (Atlantic records are incorrect). One amputated worm of *Eurythoe* sp. A can generate two or three functional worms in 50 days. Blastema formation causes major demand of lipids and triglycerides reserves in anterior regeneration. Malformations in regeneration occur in the segmentation pattern and caruncle. From July to October a sequential cycle of sexual/asexual reproduction of *Eurythoe* sp. A was characterized. Gamete production occurs in July, August and September, months with higher temperatures, while in September and October organisms reproduce asexually. During the observed larval development the rostraria larva was not observed, more studies are required to achieve the characterization of complete life cycle.

Capítulo I

Introducción general

Los anélidos poliquetos del género *Chloeia* Savigny in Lamarck 1818, *Eurythoe* Kinberg 1857 y *Notopygos* Grube 1855 pertenecen a la familia Amphinomidae, la cual se caracteriza por la presencia de una carúncula, setas calcáreas y un cordón tetraneural (Salazar-Vallejo, 1997). Los anfinómidos se conocen comúnmente como gusanos de fuego; no obstante, la sensación de quemadura sólo la produce el contacto con las setas de algunas especies como *Eurythoe complanata* (Pallas 1766), mientras que el contacto con las especies de *Notopygos* no tiene efectos negativos (Kudenov, 1980). Se ha comprobado que los organismos del género *Eurythoe* originan la reacción de inflamación mediante la complanina (Nakamura *et al.*, 2008) y otros compuestos relacionados como las neocomplaninas A y B, sintetizados a partir de ácidos grasos y aminoácidos (Nakamura *et al.*, 2010). Es factible que otros miembros de la familia ocasionen la sensación de quemadura por toxinas adquiridas por alimentación, como la palitoxina (Gleibs *et al.*, 1995; Mebs, 1998). Además de la actividad de las sustancias inflamatorias, el grado de la afección puede combinarse con una reacción alérgica a los microorganismos asociados a las setas (Eckert, 1985). De cualquier manera, el apelativo de “gusanos de fuego” sólo es aplicable a las especies que producen la sensación de quemadura (Kudenov, 1995).

La mayoría de las especies de anfinómidos son comunes en zonas intermareales y abundan en zonas coralinas o rocosas (Hutchings, 2000), pero también se encuentran en el mar profundo y en ambientes quimiosintéticos (Barroso y Paiva, 2011; Borda *et al.*, 2012). Conforman un grupo morfológicamente diverso, presentan una pigmentación brillante y algunos pueden alcanzar grandes tamaños superiores a los 50 cm de longitud (Hutchings, 2000). En relación con los otros grupos de poliquetos los anfinómidos han sido poco estudiados, la información disponible sobre los aspectos ecológicos de esta familia es limitada, se desconocen los detalles de su reproducción y aún existen problemas taxonómicos incluso a nivel de género.

En esta tesis, además de contribuir al esclarecimiento taxonómico de las especies registradas en México para tres géneros de anfínómidos (*Chloeia*, *Eurythoe* y *Notopygos*), se describen algunos aspectos reproductivos de *Eurythoe* sp. A, uno de los taxones más abundantes en Mazatlán y que no corresponde a ninguna de las especies crípticas del complejo de *E. complanata* (Barroso *et al.*, 2010). Dichos estudios comprenden el seguimiento poblacional de un ciclo reproductivo anual, la caracterización parcial del desarrollo larvario y un estudio de regeneración.

Antecedentes

Taxonomía

La familia Amphinomidae incluye unas 130 especies reconocidas en 21 géneros (Borda *et al.*, 2011), sin embargo no existe una revisión taxonómica completa, estandarizada ni actualizada por lo que se continúan identificando sinonimias y es común encontrar especies erróneamente registradas como cosmopolitas o pantropicales (Salazar-Vallejo, 1997). Ante esta problemática, se ha enfatizado la necesidad de contar con una revisión actual (Hutchings, 2000; Pleijel, 2001). Los problemas taxonómicos se presentan en varios géneros de esta familia, pero dados la magnitud y grado de complejidad de la problemática, en este trabajo únicamente se revisaran los géneros *Chloeia*, *Notopygos* y *Eurythoe*, los cuales incluyen 10 especies registradas en México (Tabla I.1):

a) *Chloeia* Savigny in Lamarck 1818

Los organismos de las especies de *Chloeia* presentan un cuerpo ovalado y el corte transversal también es oval. La carúncula es prominente, más larga que ancha. Presentan branquias bipinadas a partir del cuarto y quinto setíferos y un cirro dorsal por notópodo que, en los primeros setíferos, puede ser doble (Kudenov, 1995). En este género se han descrito más de 40 especies; sin embargo, Hartman (1959) consideró unas 10 especies como sinonimos menores de dos especies de aparente amplia distribución: *C. flava* (Pallas 1766) y *C. viridis* (Schmarda 1861). En el país se han registrado cinco especies; dos

registros (*C. conspicua* Horst 1910 y *C. flava*) son cuestionables porque refieren especies que fueron descritas en el océano Índico, mientras que otros dos nombres (*C. entypa* Chamberlin 1919 y *C. pinnata* Moore 1911) presentan problemas de delimitación, ya que se ha considerado más de una especie bajo la misma denominación (Yáñez-Rivera, 2009).

Tabla I.1. Especies de *Chloeia*, *Notopygos* y *Eurythoe* registradas en México. Sólo se consideraron las especies válidas según Hartman (1959).

Especie	Autor	Localidad tipo	Colección y número de catálogo del material tipo
<i>Chloeia</i> Savigny in Lamarck 1818			
<i>Chloeia conspicua</i> C	Horst 1910	Indonesia	
<i>Chloeia entypa</i> ⁺ C	Chamberlin 1919	México, entre Guerrero y Oaxaca	USNM 19346
<i>Chloeia flava</i> C	(Pallas 1766)	Océano Índico	ZMB
<i>Chloeia pinnata</i>	Moore 1911	USA, California	USNM 16842
<i>Chloeia viridis</i> ⁺ C	(Schmarda 1861)	Jamaica	ZIUW
<i>Notopygos</i> Grube 1855			
<i>Notopygos crinita</i> ⁺	Grube 1855	Isla de Santa Helena	ZMB
<i>Notopygos hispidus</i> C	Potts 1909	Seychelles	---
<i>Notopygos ornata</i>	Grube 1856	Costa Rica	ZMB
<i>Eurythoe</i> Kinberg 1857			
<i>Eurythoe complanata</i> ⁺	(Pallas 1766)	Isla Antigua	Topotipos USNM 136536, 20269
<i>Eurythoe complanata mexicana</i>	Berkeley & Berkeley 1960	México, Baja California	USNM 32884

⁺ especies con distribución anfiamericana; C: registros cuestionables; USNM: The National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington; ZIUW: Zoologisches Institut, Universitat Wien, Viena; ZMB: Zoologisches Museum Berlin, cuyo material tipo se perdió durante la segunda guerra mundial (Hartwich, 1993).

b) *Notopygos* Grube 1855

Los organismos de las especies del género *Notopygos* presentan un cuerpo ovalado, una carúncula evidente con un gran borde central, branquias con ramificación dendrítica y dos

cirros dorsales por notópodo (Fauchald, 1977). Se han descrito 20 especies y en el país se han registrado tres, pero el registro de *N. hispidus* Potts 1909 en Baja California es cuestionable, ya que se trata de una especie que se distribuye naturalmente en el océano Índico (Yáñez-Rivera, 2009). Los registros para *N. crinita* Grube 1855 suponen una distribución anfiamericana; sin embargo, las descripciones de los ejemplares resaltan características que comparten varias especies.

c) *Eurythoe* Kinberg 1857

Los organismos de las especies de este género se caracterizan por presentar una carúncula larga con tres lóbulos, aunque en vista dorsal sólo se observa el central, ya que éste cubre los lóbulos laterales (Fauchald, 1977). El cuerpo es alargado, rectangular a cuadrangular en corte transversal, y tiene branquias ramificadas, parápodos birrámeos y cada lóbulo con un cirro (Bindra, 1927). Existen más de 20 especies nominales en *Eurythoe*; para México se han registrado *E. complanata* y la variedad *E. complanata mexicana* Berkeley & Berkeley 1960. A nivel mundial, la mayoría de los registros corresponden a *E. complanata*, una especie con supuesta distribución cosmopolita; sin embargo, con información molecular se han reconocido al menos tres especies dentro del complejo *Eurythoe* (Barroso *et al.*, 2010), por lo cual es fundamental evaluar las especies en México bajo esta perspectiva.

Taxonomía y genética

La delimitación, el descubrimiento y la identificación de las especies debe realizarse a partir de un enfoque integral, constituido a partir de diferentes tipos de caracteres (Will *et al.*, 2005). El enfoque morfológico constituye la aproximación tradicional, generalmente es el primer acercamiento y tiene una mayor aplicación práctica (Dunn, 2003); hasta los estudios filogenéticos-moleculares se derivan de datos de organismos que fueron identificados a través de sus atributos morfológicos (MacLeod y Forey, 2002). Sin embargo, en muchos organismos marinos, la diferenciación morfológica ha presentado limitaciones debido a la existencia de las especies crípticas (Knowlton, 1993; 2000). En éstas, la divergencia no se refleja en la morfología, por lo que resulta prácticamente

imposible distinguirlas a partir de caracteres morfológicos (Mayr y Ashlock, 1991; Sáez y Lozano, 2005). En algunos casos, se ha visto que es posible distinguirlas y separarlas a partir de su morfología externa con el uso de caracteres morfológicos apropiados, por lo que se han considerado como “pseudo-crípticas” (Knowlton, 1993; Sáez y Lozano, 2005). Estas especies, efectivamente, presentan diferencias morfológicas que no se habían considerado debido a un planteamiento inadecuado de los atributos morfológicos. No obstante, en los anélidos no hay un límite definido entre las especies crípticas y pseudo-crípticas, ya que, en ocasiones, las diferencias morfológicas son tan sutiles que sólo se identifican después de la incorporación de datos moleculares (Nygren, 2014).

La integración de atributos morfológicos y moleculares para el estudio de los anfinómidos es necesaria, ya que se ha demostrado la existencia de especies crípticas en *Eurythoe* (Barroso *et al.*, 2010) y en *Archinome* Kudenov 1991 (Borda *et al.*, 2013). Además, en *Hermodice* se demostró que las variaciones morfológicas en el número de filamentos branquiales y la forma del lóbulo anal, que permitieron identificar dos especies (Yáñez-Rivera y Salazar-Vallejo, 2011), en realidad no tienen validez taxonómica, ya que *H. carunculata* (Pallas 1766) representa una sola especie en todo el Atlántico (Ahrens *et al.*, 2013). Chatzigeorgiou *et al.* (2014) demostraron que poblaciones de *H. carunculata* en el Mediterráneo presentan cierto grado de aislamiento, pero también un flujo genético importante con las poblaciones del Atlántico, por lo que esta especie presenta una estructura poblacional definida en dos grupos pero con poca diferenciación genética.

Reproducción

El conocimiento sobre la biología reproductiva de los anfinómidos es limitado. Allen (1957) realizó observaciones preliminares sobre la estacionalidad y morfología de los gametos de *E. complanata*, *H. carunculata* y *N. crinita* del Caribe (Puerto Rico) pero sólo Kudenov (1974, 1977) ha reportado información sobre el ciclo reproductivo de *E. complanata* sensu lato e *Hipponoe gaudichaudi* Audouin & Milne-Edwards 1830. Para *H. gaudichaudi* una especie asociada a percebes, Kudenov (1977) caracterizó todo el ciclo con ejemplares de museos, determinó que hay cuidado parental y que se trata de una especie

hermafrodita protándrica. En *E. complanata* Kudenov (1974) caracterizó el ciclo anual asexual (regeneración) y sexual de poblaciones naturales, con observaciones sobre el desarrollo larvario. Recientemente, respecto a la ontogenia y desarrollo larval, Reish y Pernet (2009) reportan que no lograron llevar la larva planctónica de *E. complanata* a metamorfosis.

Los anélidos tienen la capacidad de regenerar. La regeneración posterior es la más común entre las familias (Bely, 2006). No obstante, los anfinómidos presentan tanto regeneración anterior como posterior (Müller *et al.*, 2003; Ahrens *et al.*, 2014). En los estudios con amputación experimental en *Eurythoe*, se ha caracterizado la reconfiguración del sistema nervioso (Müller *et al.*, 2003), la disminución en el número de segmentos regenerados por exposición al cadmio (Reish *et al.*, 1989) y el retraso en la cicatrización de las heridas producidas por efecto de la fracción soluble del aceite usado de vehículos, que contiene varios metales traza (Nusetti *et al.*, 2005). En *Hermodice* se ha estudiado a detalle la regeneración posterior y se ha visto que, con una amputación menor a 20 segmentos, se tiene un impacto mínimo en el sistema digestivo (Ahrens *et al.*, 2014).

En México los únicos trabajos experimentales que se han realizado con anfinómidos, son estudios ecotoxicológicos con una especie de *Eurythoe* de Mazatlán en los cuales se determinó la bioacumulación y la eliminación experimental de mercurio (Vázquez-Núñez *et al.*, 2007), y la mortalidad y las malformaciones ocasionadas por la exposición a este metal (Méndez *et al.*, 2009). Las estrategias para la manipulación y mantenimiento de los organismos de *Eurythoe* spp. derivadas de estos trabajos son avances importantes para retomar la reproducción en condiciones controladas y cultivo larval de este anfinómido.

Objetivos

1) Contribuir al esclarecimiento de las especies registradas en México para los géneros *Chloeia*, *Eurythoe* y *Notopygos* incorporando atributos morfológicos y moleculares.

2) Describir la biología reproductiva de *Eurythoe sp. A*, uno de los taxones más abundantes en Mazatlán, respecto a su ciclo reproductivo en el medio natural, caracterización del desarrollo larvario y regeneración en condiciones controladas.

Organización de la tesis

Cada capítulo de la tesis aborda una problemática particular e independiente, de tal forma que la tesis consta de seis capítulos en formato de artículo (Cap. II al VII) y un capítulo final integrando y discutiendo los resultados de manera global. Así, el segundo capítulo es la revisión taxonómica de las especies de *Chloeia*. Los capítulos III y IV se refieren a las especies de *Notopygos* (ambos publicados). Para el género *Eurythoe*, se presentan tres capítulos: el primero es la evaluación de la subespecie *Eurythoe complanata mexicana* (Cap. V), el segundo es el estudio sobre la regeneración (Cap. VI, publicado) y el tercero es la caracterización del ciclo anual con los experimentos de fertilización para caracterizar algunas de las etapas del desarrollo larvario (Cap. VII).

Capítulo II

Species of *Chloeia* from México: morphology and barcode

Introduction

Members of the genus *Chloeia* Savigny in Lamarck 1818 are found from shallow water to 1000 m (Barroso *et al.*, 2010). They have a fusiform body, bipinnate branchiae from the fourth or fifth chaetiger and bear a prominent caruncle (Kudenov, 1995). Forty-three species have been described but less than thirty are regarded as valid (Appeltans *et al.*, 2012). *Chloeia* is the genus with most species in Amphinomidae; however, it has received little attention in the recent literature. The last review was done by Horst (1910), who stressed the lack of knowledge of *Chloeia* species. Hartman (1959) considered 13 species as junior synonyms of *Chloeia flava* (Pallas 1766) and *Chloeia viridis* Schmarda 1861 mainly, and others species as indeterminable but her conclusions were not based on the study of type material. The morphologic variations have been poorly understood because several descriptions emphasized generic features, like the prominent caruncle and the violet dorsal cirri (see Table II.1). Widespread confusion has prevailed and, in consequence, some *Chloeia* species appear to have very wide distributions and probably this can be explained as a result of inaccurate identifications, causing the “cosmopolitan syndrome” (Bleidorn *et al.*, 2006).

In Mexico only five species have been recorded: *C. viridis*, *C. flava*, *C. conspicua* Horst 1910, *C. pinnata* Moore 1911 and *C. entypa* Chamberlin 1919. However, some records have been considered questionable due to deviation of morphologic features from the original description and/or descriptions were based on specimens from different biogeographic origins (Yáñez-Rivera, 2009). For example, *C. flava* and *C. conspicua* were described from the Indian Ocean, thus records in Mexican localities are away from their potential distribution. Furthermore, for *C. entypa* the prevalent characterization includes a reddish-brown continuous stripe as dorsal pigmentation pattern pigmentation (Hartman,

1940); however, in the original description, any dorsal pigmentation in segments was mentioned (Chamberlin, 1919). Similarly, some features of *C. viridis* shared with several species are the first appearance of branchiae on chaetiger fourth, and violet dorsal cirri. Hence, records of *C. viridis* imply an amphiamerican distribution, with records in the gulf of Mexico and in the gulf of California from intertidal to 3000 m (OBIS, 2014). Due to the poor taxonomic understanding of the genus, these wide geographic and bathymetric distributions probably stems from incorrect identifications rather than from the idea that the same species can live from the intertidal to the deep sea. Taxonomic problems remain in the genus in part because no standardized terminology has been followed, and also due to the fact that most original descriptions are incomplete and comparisons with type material were rarely made.

To clarify the taxonomic status of *Chloeia* species from Mexico we included morphological characterization of type specimens, if available, and non-type material with detailed observations, as well as the barcode analysis of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I (COI). The present study standardizes morphological terminology, provides descriptions of previously known species, describes three new species and incorporates a preliminary phylogenetic analysis based on COI sequences.

Material and methods

Materials belong to the following collections: National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington (USNM); Museum of Comparative Zoology, Harvard University (MCZ); Scripps Institution of Oceanography Benthic Invertebrates Collection (SIO); Marine Invertebrate Museum, Rosenstiel School, University of Miami (UMML); Polychaete Collection of Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, Mexico City (CP-ICML-UNAM), Regional Collection of Invertebrates ICML, UNAM, Mazatlán

(EMU); Reference Collection of Systematic of Marine Invertebrates Lab, Universidad del Mar (UMAR).

Specimens for molecular studies was collected by snorkelling and SCUBA diving from intertidal to 30 m depth. Worms were removed from coralline rocks and fixed in 96% ethanol. *Chloeia* sp. A was collected by Carlos Sánchez from UABCS. Deep sea *Chloeia* species were collected during scientific campaigns: *Chloeia pinnata* was collected by Greg Rouse from Scripps Institution (USA) and *Chloeia* sp. B was collected in a benthic sledge on board of the oceanographic vessel “El Puma” during the TALUD XIV cruise, headed by Michel Hendrickx from ICML.

Shirlastain A was used to observe some morphological attributes. Several measurements were obtained: body length from prostomium to pygidium, width in the widest part of the body (chaetae excluded), appendages length (antennae, palps and cirri) and the caruncle length and width. All measurements were done with the dissection microscope (LEICA S6E) using a micrometer (0.1 mm divisions). Material from MCZ had no morphometric data, thus brief diagnosis is provided. When specimens lacked appendages, no measurements were possible. Taxonomical features were captured by microphotography using a Cannon Rebel EOS camera and line drawing for caruncles. Semi-permanent slides in alcohol-glycerol of chaetae from chaetigers 1, 3, 10 and 15 (often including some additional chaetigers) were prepared to describe chaetal features. Chaetae were measured with micrometer under a compound microscope (LEICA DME; 10X y 40X). To examine differences between common and long ventral cirri, histological sections 7–8 μ were prepared and stained with the hematoxyline–eosin technique.

DNA extraction, PCR amplification and sequencing of COI were performed following Borda *et al.* (2012, 2013). Sequences were aligned with ClustalW interface MEGA version 5 (Tamura *et al.*, 2011). Sequence divergences were calculated with the Kimura two

parameter (K2P) distance model (Kimura, 1980) was used to generate distance matrices in BOLD. Neighbor-joining (NJ) tree was created as a representation of the divergence pattern between species (Saitou and Nei, 1987). *Notopygos* sequences from chapter IV (Borda *et al.*, 2015) were incorporated in the phylogenetic analysis.

Results

Morphological features –second ventral cirri–

Based on available information, Barroso and Paiva (2011) indicated that among the described *Chloeia* species, only *C. violacea* Horst 1912 and *C. kudenovi* Barroso and Paiva 2011 have a large second ventral cirrus. During our revision of the material, it was evident that other previously described species share this feature. In order to attempt to elucidate whether the difference is size-related or if is a special feature of this elongated appendage, a histological work was conducted. The analysis showed that the longer second ventral cirri have a different structure with interspaces that could be associated with a blood vessel (Fig. II.1A) while the tissue of the adjacent short ventral cirri is homogenous (Fig. II.1B). Thus, this feature is related to functional and structural divergence and could have phylogenetic significance. Descriptions provided here, include the relative size of second ventral cirri and was considered a relevant taxonomic feature.

Systematic

GENUS *Chloeia* Lamarck 1818

Type species

Amphinome capillata Brugière 1789, by monotypy.

Remarks

Brugière (1789: 45) listed *Amphinome capillata* as a new name for *Aphrodita flava* Pallas 1766. Consequently, even from the original proposal, his species name is a junior synonym for an older name. It must be emphasized that although the original description (Pallas, 1766: 97) and most other papers indicate this is an Indian Ocean species, de Blainville (1828: 452) listed the synonyms (not Fauvel, 1917 as stated in WoRMS), and indicated that “la seule espèce est de l’Amérique méridionale.” (the only species is from Central America). Furthermore, de Quatrefages (1866: 387) gave as its distribution the China Seas, and after that, the species was regarded as having a very wide distribution including at least the Indian and Pacific oceans.

Diagnosis

Body fusiform. Caruncle trilobate, medial lobe wide, plicate, lateral lobes narrow, plicate. Dorsal pigmentation patterns variable. Branchiae pinnate branchiae in most chaetigers, absent in first chaetigers. Dorsal cirri with cirrophores. Accessory dorsal cirri without cirrophores, present only in first chaetigers. Anus terminal in last chaetigers; posterior end margin with a pair of cirriform lobes.

List of valid species and type localities (after Horst, 1910 and Hartman, 1959)

Chloeia amphora Horst 1910, Indonesia/Samoa, Indo-Pacific

Chloeia australis Kudenov 1993, Campbell Plateau, Southern Ocean

Chloeia bistrinata Grube 1868, Specific locality unknown, Red Sea

Chloeia conspicua Horst 1910, Indonesia, Indo-Pacific

Chloeia entypa Chamberlin 1919, Mexico, Eastern Pacific

Chloeia flava (Pallas 1766), Bengal, Indian Ocean

Chloeia fusca McIntosh 1885, Moluccas, Indonesia

Chloeia kudenovi Barroso and Paiva 2011, Campos Basin, Brazil, Atlantic Ocean

Chloeia macleayi Haswell 1878, Queensland, Indo-Pacific

Chloeia maculata Potts 1909, Saint Brandon Rocks, Indian Ocean

Chloeia pallida Kinberg 1867, Brazil, Atlantic Ocean
Chloeia parva Baird 1868, Locality unknown, Indo-Pacific fide Fauvel (1953)
Chloeia pinnata Moore 1911, California, Northern Pacific
Chloeia pseudeuglochis Augener 1924, Costa Rica
Chloeia quatrefagesii Baird 1868, China, North Pacific Ocean
Chloeia rosea Potts 1909. Amirante Islands, Indian Ocean
Chloeia tumida Baird 1868, Specific locality unknown, Indian Ocean
Chloeia venusta Quatrefages 1866, Palermo, Mediterranean
Chloeia violacea Horst 1910, Indonesia, Indo-Pacific
Chloeia viridis Schmarda 1861, Jamaica, Caribbean

***Chloeia conspicua* Horst 1910**

Chloeia conspicua Horst, 1910: 173, pl. VII, fig. 5; pl. VIII, fig. 4, 5.

Remarks

Any specimen from Indonesian localities in the USNM collection belongs to this species, thus, no direct observations were possible. However, the original description provides a complete description and illustration of the pigmentation pattern, which is similar to a horseshoe with a median line on each segment. No specimens from Mexican localities show this pigmentation pattern.

***Chloeia entypa* Chamberlin 1919**

Fig. II.2

Chloeia entypa Chamberlin, 1919: 30, pl. XIII, figs. 7, 8; pl. XIV, fig. 1, 2.

Type material

Holotype [USNM-19346] off Mexico, between Guerrero and Oaxaca, eastern Pacific, 16°31'N, 99°52'W, Sta. 3418, R/V "Albatross", April 1891, 1207 m.

Description

Holotype complete, 22 chaetigers, 9 mm long and 4.2 mm wide. Body fusiform, pale (Fig. II.2A). Remaining pigmentation includes a dark region on buccal lips in front of lateral antennae.

Prostomium semicircular with four red eyes, anterior pair five times larger than posterior pair, in frontal area. All antennae of the same size, medial antenna arising from anterior margin of caruncle (0.6 mm long). Palps laterally on buccal lips, slightly shorter than antennae (0.5 mm). Mouth ventral on chaetiger 3.

Caruncle oblong (1.1 mm long, 0.4 mm wide). Medial lobe elevated with about seven folds. Lateral lobes narrow, each with seven folds, without pigmentation, hidden by medial lobe (Fig. II.2B). Branchiae from chaetiger 4, present throughout body.

Parapodia biramous. Notopodia with single cirri; accessory dorsal cirri along chaetigers 1-3. Neuropodia with single ventral cirri. Second ventral cirri (3 mm long) about three times longer than contiguous ones (1 to 1.2 mm).

All chaetae furcates, tines asymmetrical (Fig. II.2C-F). Length proportions between chaetal tines vary from 1:3 to 1:5. Notochaetae longer and wider than neurochaetae. Anus dorso-terminal in last chaetigers.

Remarks

The original description of *C. entypa* does not state the start of branchiae and the relative size of the second ventral cirri. The drawings by Chamberlin (1919) show a serrated edge in notochaetae; however, in the reexamination of the holotype, no serrated edge were observed in median notochaetae. Additionally, the dorsal cirri deep violet pigmentation has

been lost. Chamberlin (1919: 31) noted that “The depth is exceptional for the genus”, however a mistake was done since 66 ftm depth were recorded instead of 660 ftm, the correct sampling depth.

Hartman (1940), through the examination of six shallow water samples from Ecuador (1), Colombia (2), Panamá (1) and California (2), characterized this species with a dorsal reddish-brown, continuous stripe, and emphasized the deep purple dorsal cirri. The violet pigmentation in dorsal cirri is a shared feature among several species of the genus but the dorsal stripe pointed out by Hartman (1940) was not mentioned by Chamberlin (1919) in the original description, whose samples probably lost during the time stored in alcohol. However, the dorsal stripe is a feature used to characterize specimens from different habitats as *C. entypa*. Thus, *C. entypa* has been recorded as an intertidal species from California to Ecuador (Kudenov, 1975, Dean, 2004). However, *C. entypa* was described from deep waters probably lacks such dorsal stripe. Kudenov (1995) suggested that this species could be a junior synonym of *C. pinnata* from California, since both share violet pigmentation in dorsal cirri and the second ventral cirri is larger than the others; nevertheless, they have differences in the first appearance of branchiae, in chaetal features and in dorsal pigmentation pattern (Table II.1).

The most similar species is *C. kudenovi* from Brazil (Barroso and Paiva, 2011); both species were found in deep waters, they lack dorsal pigmentation patterns, have larger second ventral cirri, and their furcates are smooth. However, the position of the mouth in *C. kudenovi* is on chaetiger 2 and the dorsal cirri lack pigmentation and has dark purple eyes, while in *C. entypa* the mouth is on chaetiger 3, and has deep violet dorsal cirri and red eyes.

***Chloeia euglochis* Ehlers 1887 reinstated**

Fig. II.3

Chloeia euglochis Ehlers, 1887: 18–24, pl. I, fig. 1, 2; pl. II, fig. 1–8; pl. III, fig. 1–4.

Type material

Syntype [MCZ-617.664.720] Tortugas, Florida, U.S.A., Atlantic Ocean, 24°44'N, 83°46'W, wild caught, January 1869, 54 m.

Diagnosis

Syntype complete with 35 chaetigers. Body fusiform; dorsal pigmentation pattern visible (Fig. II.3A–B), resembling living pattern (Fig. II.3C). Each segment with irregular brown-orange transverse bar wider in the middle, like a cross with widened endings. Cirrophore of dorsal cirri violet. Chaetae with orange and yellow pigmentation. Live color pattern includes one pair of bright white to yellowish spots in each cross interspaced and on the dorsal side of branchiae (Fig. II.3C). Mouth ventral on chaetiger 3.

Prostomium semicircular with four black eyes located near the caruncle. Medial antenna longer than paired antennae and palps. Caruncle narrow, medial lobe elevated with about fifteen folds. Lateral basal lobes narrow. Branchiae start in chaetiger 4. Parapodia biramous. Notopodia with double cirri along chaetigers 1-3, single subsequently.

Neurochaetae furcates asymmetrical, long or short. Smaller tine very short, like a spur, even some chaetae lack it appearing as with a shattered side (Fig. II.3D–E). Notochaetae serrated, harpoon type (Fig. II.3F).

Remarks

This species was considered as a junior synonym of *C. viridis* after Monro (1933) contribution and later corroboration by Hartman (1938). Monro considered that the difference in pigmentation pattern was a “color-variant” (1933: 9) of *C. viridis*. In the same publication, he mentioned an erroneous pigmentation pattern of *C. viridis* with three bands (details in remarks of *C. viridis* and *Chloeia* sp. A). When Harman (1938: 6) reviewed the syntype of *C. euglochis* [MCZ-617.664.720], she considered that it is identical to *C. viridis* according to Monro’s description. However, the pigmentation pattern illustrated by Monro

is different from the one present in *C. euglochis*, with a cross mark on each segment and *C. viridis*, with only one line.

The syntype illustrated here (Fig. II.3A) is the same reviewed by Hartman and the pigmentation pattern is perfectly consistent with the illustration included in the original description by Ehlers (1887). The genetic evidence in other *Chloeia* species (discussed in barcode section, Fig. II.9) supports the fact that differences in the pigmentation pattern is a relevant feature to distinguish species and should not be regarded as polymorphism within species, as suggested by Monro. Other morphological features used to regard *C. euglochis* as junior synonym of *C. viridis* were that branchiae start in the same chaetiger, and both have violet cirri. Nevertheless, *C. euglochis* dorsal cirri have violet pigmentation only in the cirrophore and the first appearance of branchiae in chaetiger 4 is shared by several *Chloeia* species (Table II.1).

Both pigmentation patterns in cross mark and the chaetal features are distinctive for *C. euglochis*, since none of the other species present a shattered neurochaetae. Ehlers (1887) provided a precise description of the dorsal pigmentation pattern, which was overlooked by subsequent taxonomists probably due to the prevalent confusion and emphasis on generic attributes.

***Chloeia flava* (Pallas 1766)**

Fig. II.4

Aphrodita flava Pallas, 1766: 97–102, pl. VIII, fig. 7–11.

Chloeia flava.– Horst, 1912: 18–19, pl. VII, fig. 2; Fauvel, 1953: 96, fig. 46a; Day, 1967: 124, fig. 3.1r.

Additional material –Type material was unavailable.

[USMN-46277] Kottayan, India, July 1970, Coll. D. K. Massey (5). [USMN-17480] Sulu Archipelago, Tumindao Island, Philippines Expedition, R/V "Albatross", February 1908 (2).

Description

Based on well-preserved specimen. Complete, 38 chaetigers, 85 mm long, 15 mm wide. Body fusiform; dorsal pigmentation pattern consists of a central dark brown circle or round spots towards posterior border of each segment, and brown pigmentation around the lateral side under branchiae and notochaetal lobes of prededent segments (Fig. II.4A, C). Chaetae with yellowish coloration.

Prostomium semicircular with four black eyes (Fig. II.4B). Medial antenna arising from caruncle, longer than paired antennae and palps. Mouth ventral on chaetiger 3. Caruncle with V-shaped posterior margin (5.5 mm long); medial lobe elevated with about 30 folds. Lateral basal lobes spread, each with the same number of folds, without pigmentation. Branchiae from chaetiger 4, present throughout body.

Parapodia biramous. Notopodia with double cirri along chaetigers 1-4, subsequently single. Accessory dorsal cirri in chaetiger 4 smaller than the others. Neuropodia with single ventral cirrus, second ventral cirri as long as contiguous ones.

Neurochaetae furcates asymmetrical; relative length proportion between chaetal tines varies from 1:3 to 1:4 (Fig. II.4D). Notochaetae with serrated external border, small tine very short, like a spur (Fig. II.4E-G). Serrated external border consists few teeth (three to eight) or complete serrated border with more than 20 (Fig. II.4E-F).

Remarks

The original description by Pallas (1766) is adequate with good illustrations, but excludes chaetae characterization, probably due to unavailability of microscopes without spheric aberrations at this time. However, this feature was illustrated later by McIntosh (1885).

Thus, the delimitation of this species is unproblematic and several authors provided complete characterizations (Horst, 1912; Fauvel, 1953; Day 1967). However, the record from Mexico in San Francisquito Bay, Baja California in the gulf of California is questionable because Treadwell (1923) only provided species name, without any comment about its appearance and any collection contains specimens belonging to this species from Mexican localities. Thus, a figure of this species is provided here to facilitate its identification and to avoid future misidentifications in Mexican waters.

***Chloeia pinnata* Moore 1911**

Fig. II.5

Chloeia pinnata Moore, 1911: 239–243, pl. XV, figs. 1–6.

Type material

Holotype [USNM-16842] Monterey Bay, North Pacific, 36°38'N, 121°55'W, Sta. 4475, R/V “Albatross”, May 1904, 260 m. Paratype [USNM-16901] same data as for the holotype (92).

Additional material

Pacific: [USNM-15827] Off Bodega Head, 38°17'N, 123°29'W, Sta. 3170, R/V “Albatross”, March 1890, 305 m (30). [USNM-123116] Off California, 39°27'N, 123°57'W, Sta. SB30, “CARP”, November 1987, 195 m (30, most of them juveniles).

Description

Holotype complete, 25 chaetigers, 24 mm long and 7 mm wide, body fusiform, pale. Live color pattern reddish, dorsally continuous, with the exception of a dorsal longitudinal,

medial pale line, and dorsal cirri deep violet. Some paratypes preserve the pigmentation pattern (Fig. II.5E).

Prostomium semicircular with four black eyes, anterior pair larger in frontal area, posterior eyes half as large as anterior ones. Medial antenna arising from caruncle (1.5 mm long), longer than paired antennae (0.7 mm). Palps in lateral position on buccal lips, similar in size as antennae (0.6 mm). Mouth ventral on chaetiger 3.

Caruncle tapered into a conical tip (1.7 mm long, 0.5 mm wide). Medial lobe elevated with about eleven folds, a discontinuous band of subrectangular projections corresponding to folds (Fig. II.5A, C) [this row is darker in live specimens]. Lateral basal lobes narrow, with ten folds each. Branchiae from chaetiger 3, as single filaments or as small-size branchiae (Fig. II.5B), better developed from chaetiger 4 to the rest of the body.

Parapodia biramous. Notopodium with double cirri along chaetigers 1-3, thereafter single, accessory dorsal cirri from chaetiger 3 reduced (as long as cirrophore), and neuropodia with single ventral cirrus. Second ventral cirri (2.2 mm long) about twice longer than adjacent ones (1 to 1.3 mm).

Neurochaetae include long and short asymmetrical furcates, in first chaetigers all short and wide (Fig. II.5F) than those from posterior chaetigers (Fig. II.5G, H); posterior chaetigers also bear long capillary chaetae. Furcates with smaller tine very short, like a spur; relative length between neurochaetal tines varies from 1:7 to 1:16. Notochaetae furcated; relative length proportions between tines vary from 1:6 to 1:8. In first chaetigers some notochaetae with serrated inner borders (Fig. II.5I); in medial and posterior chaetigers, serrated border indistinct (Fig. II.5J).

Remarks

Chloeia pinnata was described with first appearance of branchiae on chaetiger 4 but Moore (1911) indicated that “They also possess a third much smaller cirrus situated immediately dorsal to the notocirrus and probably representing the gills...”, however, no more details were provided. The first appearance of branchial structure on chaetiger 3 allows

differentiating *C. pinnata* from other species with first appearance of branchiae in chaetiger 4. In some paratypes, only one side of the worm shows the vestigial branchial structure and no scar was observed on the other side (Fig. II.5D). No asymmetry in this feature information is mentioned in the literature.

Moore (1911) pointed out that the unworn state of notochaetae is slightly serrate; this species shows several kinds of chaetae, and the inner serrated border is evident mainly on anterior chaetigers mainly. In the original description, information about pigmentation patterns is extensive but inaccurate, since Hartman (1940: 206) stated that this species lacks pigmented dorsal patterns and only minute dark specks are present. Reexamination of type material shows that *C. pinnata* has a rather solid dorsal pigmentation with one mid-dorsal pale line and violet dorsal cirri.

***Chloeia viridis* Schmarda 1861**

Fig. II.6

Chloeia viridis Schmarda, 1861: 144–146, taf. XXXV, figs. 295–305.

Additional material

Atlantic: [USNM-52575] Magueyez Island, Boat Pier, Puerto Rico, August 1974, Coll. Larson, R.J. [USNM-4532] Pensacola, Florida, USA, 30°25'N, 87°13'W, Coll. Stearns, S. (7). [USNM-41565] Aguadilla, Crashboat Basin, Puerto Rico, July 1965, 12 m, Coll. Randall, J. [USNM-19643] Savannah, Georgia, USA Coll. Tompkins, I. R. [USNM-16490] Miami, Florida, USA, 1912, 110 m, Coll. Henderson, J. B. [USNM-15919] Puerto Rico, 18°13'N, 66°32'W, Sta. 3170, R/V "Fish Hawk", 1898 (2). [USNM-32385] Sapelo Sound, Georgia, USA, Coll. Gray, M., January 1962, 11 m. [USNM-24534] Bahamas, Bimini Island, Coll. Andrew, W. [USNM-24535] Bahamas, Bimini Island, Coll. Andrew, W. [USNM-23926] Cumberland Island, Camden County, Georgia, USA. [USNM-42757] Puerto Rico, 1963, Coll. Hulings, N.C. and Feray, D.E., 23 m (7). [USNM-98522]

Colombia, Cartagena, Coll. Laverde-Castillo, J.J., 25 m [UMML-22.913] Panama to Colombia, 09°31'N, 76°16'W, Sta. 365, Pillsbury Cruise 6607, July 1966, 57 m (3). [CP-ICML-UNAM-XXX] Campeche Bank, gulf of Mexico, Mexico, 18°49'N, 92°16'W, IMCA IV, Sta. 58, October 1989, 16 m, 26° C, 34‰, 1.250 OM, mud.

Description

One complete specimen with 21 chaetigers, 9 mm long and 4 mm wide. Body fusiform with one longitudinal, middorsal violet stripe surrounded by a yellowish band, and violet dorsal cirri (Fig. II.6C, D). In each segment, the longitudinal violet band has an anterior thin transverse line, like a “T”, which could be hiding by the respective anterior segment due to narrow size. Live color pattern on each segment includes an orange brown lateral pigmentation and a bright white to yellowish line around the main violet stripe. Branchiae greenish yellow, antennae, palps and anterior cirri violet (Fig. II.6A).

Prostomium semicircular with four black eyes, anterior ones twice as large as posterior ones. Medial antenna arising from the caruncle (1 mm long), longer than paired antennae (0.6 mm) and palps (0.4mm). Mouth ventral on chaetiger 3.

Caruncle tapered into a narrow posterior margin (1 mm long, 0.5 mm wide). Medial lobe elevated with more than 11 folds. Roundish projections between each pair of folds along longitudinal mid-line (Fig. II.6B), this line is brown in live specimens. Lateral basal lobes narrow. Branchiae from chaetiger 4 and continue throughout body.

Parapodia biramous, notopodium with double cirri; in the first three chaetigers, accessory dorsal cirri with a similar length of the cirrophore; in chaetiger 4 it is reduced, after the accessory dorsal cirri remains as violet papilla to chaetiger 7 or 8. Neuropodium with single ventral cirrus. Second ventral cirri (1.1 mm long) about twice longer than adjacent ones (0.4 to 0.5 mm).

Noto- and neurochaetae furcated in first chaetigers; proportion between tines varies from 1:2 to 1:3 (Fig. II.6E). Neurochaetae in median and posterior chaetigers, include long and short asymmetrically furcated chaetae; short chaetae show a small tine like a spur

(proportion between tines 1:7); long chaetae have a proportion between tines close to 1:2 (Fig. II.6F–G). Notochaeta of these posterior chaetigers include harpoon chaetae (Fig. II.6H–I).

Remarks

Hartman (1938) overlooked the original Schmarda's (1861) description and illustration (Fig. II.6C) and she based her identifications of *C. viridis* after Monroe's (1933) characterization; thus, she highlighted that the pigmentation pattern consists of three lines (this pattern corresponds to *Chloeia* sp. A). In addition, she called the attention on the presence of violet cirri, which is shared by several species in the genus (Table II.1). In the original description, Schmarda (1861) emphasized that the greenish pigmentation in live specimens turned violet when preserved in alcohol. In fact, the white greenish pigmentation is lost in preserved specimens, but the orange brown coloration and the main violet central line remains in both, live and preserved worms (Fig. II.6A, C–D).

Schmarda (1861) described and illustrated notochaeta from median chaetigers as serrated chaetae, while in anterior chaetigers, notochaetae are asymmetrically bifurcated as neurochaetae.

No type material is available, and a neotype with barcode is required preferably from Jamaica, the type locality. Here, we provided only a description of additional material that is consistent with the original description.

***Chloeia* sp. A**

Fig. II.7

Chloeia viridis.– Monroe, 1933: 9, fig. 4a-b (*partim* no Schmarda, 1861).

Type Material

Holotype [UMAR-XXX] Mexico, Oaxaca, Puerto Angel, playa Panteón, Coll. Villalobos-Guerrero T.F. January 2008.

Additional

Pacific: [USNM-15815] Mexico, Baja California, Puertecitos, 30°21'N, 114°25'15"W, Sta. 3035, R/V "Albatross", March 1889, 55 m. [USNM-15816] Baja California, San Jose island, 24°54'30"N, 110°39'W, Sta. 2999, R/V "Albatross", March 1889, 71 m. [USNM-15817] Baja California, Angeles bay, September 1876. [USNM-35061] Baja California, Ventana bay, Stranger M/S, Coll. W. Williams, April 1937, 9–18 m (6). [USNM-35063] Baja California, San Lucas bay, Stranger M/S, Coll. Lewis F., April 1937. [EMU-XXX] Playa Carreyeros, Nayarit, 24°45'N, 105°30'W, intertidal rocks, Coll. Salazar, P., March 2008. [UMAR-XXX] Oaxaca, Puerto Angel, playa Panteón, Coll. G.R.C., April 2005; [UMAR-XXX] Coll. A.H.O., May 2006; [UMAR-XXX] Coll. A.B.S.H., April 2007 (6); [UMAR-XXX] Coll. Villalobos-Guerrero T.F., February 2008.

Description

Body fusiform, complete, 34 chaetigers, 95 mm long, 32 mm wide. Live pigmentation pattern in the dorsum consists of three longitudinal broad orange-red strips and two narrow white yellowish strips around the median broad strip. In the posterior end of each segment all strips diminish and the pigmentation is interrupted, but continues at the beginning of each segment. Antennae and dorsal cirri deep violet, caruncle orange-red with the anterior part darker, branchiae red and chaetae with orange coloration in median region (Fig. II.7A). Preserved worms lost the yellowish coloration in the dorsum and contrasting pale lines appeared (Fig. II.7D).

Prostomium oval with two pairs of eyes, anterior pair larger and darker. Median antenna previous to caruncle in central position in the prostomium (2.7 mm long), longer than paired antennae (1.5 mm). Palps located laterally from the buccal lips (1.3 mm), similar to

antennae with anterior brown-violet pigmentation (Fig. II.7B–C). Mouth ventral on chaetiger 3.

Trilobed caruncle, oval (3 mm long, 1.5 mm wide). Median plicate lobe elevated with about 25 vertical folds. Lateral plicated basal lobes narrow each with the same number of folds. (Fig. II.7B–C). First appearance of bippinate branchiae on chaetiger 4, present throughout the body, last three are smaller.

Parapodia biramous, in the first three chaetigers notopodia have double dorsal cirri. All first ventral cirri with similar size (2.5–3 mm). Anus dorsal in the last two chaetigers with a pair of cirriform lobes in the posterior end margin.

Pointed chaetae in neuro- and notopodial lobes with the same shape first, medium and posterior chaetigers (Fig. II.7E, G). Asymmetrically furcate neurochaetae are scarce; proportion between tines varies from 1:3 to 1:4 (Fig. II.7F). Notochaetae with end serrated border like harpoon chaetae with few to several distal denticles (4-28, Fig. II.7H) are abundant after the first chaetigers.

Remarks

Monro (1933) characterized this species with material from Costa Rica but unfortunately used the name of *C. viridis* although he observed differences in the pigmentation pattern. He noticed the three longitudinal stripes and pointed out the two yellow lines according Crossland's collector notes from living specimens. However, Monro (1933: 9) regarded the pattern as colour variant of the Atlantic *C. viridis*. The barcode analyses (below) supports that the pigmentation pattern is a relevant character to distinguish *Chloeia* species (Fig. II.9) and variations in pigmentation patterns are not a polymorphism between the same species.

This species differs from other *Chloeia* on the basis of pigmentation pattern. It shares the absence of asymmetrically furcated notochaeta with *C. euglochis* but differs in the cross mark of pigmentation pattern, in the fact that it has only the violet cirrophore and it is found on the Atlantic side, while *Chloeia* sp. A shows three red stripes, it has complete violet cirri

and is present on the Pacific side. The first appearance of branchiae in chaetiger 4 is shared by several *Chloeia* species (Table II.1).

In the additional material [USNM-15817] J.E. Benedict added a note indicating that this specimen corresponds to a new species, nevertheless no publication followed.

***Chloeia* sp. B**

Fig. II.8

Type Material

Holotype [EMU-XXX] Mexico, gulf of California, 28°15'38"N, 111°58'33"W, TALUD XIV, Sta. 1, B/O "El Puma", April 2011, 210 m, 12° C, 34‰, oxygen 0.61 ml/l.

Additional

Pacific: [EMU-XXX] Mexico, gulf of California, 28°31'56"N, 112°18'12"W, TALUD XIV, Sta. 13, B/O "El Puma", April 2011, 181 m, 12° C, 34‰, oxygen 1.25 ml/l; [CP-ICML-UNAM-XXX] 21°38'N, 106°31' W, Cortes II sta. 62-B, B/O "El Puma", March 1985, 30 m, 22° C, 35‰, 4.2 OM, oxygen 5.29 ml/l; [CP-ICML-UNAM-XXX] 28°08'N, 112°41' W, Cortes III sta. 21, B/O "El Puma", August 1985, 112 m, 16° C, 35‰, 6.9 OM, oxygen 2.22 ml/l; [CP-ICML-UNAM-XXX] 31°04'N, 114°16' W, Cortes III sta. 38, B/O "El Puma", August 1985, 64 m, 26° C, 35‰, 3 OM, oxygen 3.51 ml/l (2).

Description

Body fusiform, complete, 31 chaetigers, 31.5 mm long, 7 mm wide. In the dorsum, live pigmentation pattern consists of one longitudinal broad reddish strip, violet dorsal cirri, reddish branchiae and black caruncle (Fig. II.8A, B, H). Preserved paratypes in ethyl alcohol maintained this pigmentation pattern. Worms fixed with formaldehyde are pale,

only in posterior end the reddish strip is visible; caruncle and dorsal cirri show the same pigmentation as live specimens.

Prostomium semicircular with four red eyes, anterior larger in frontal area, posterior reduced, one third the size of anterior. Median antenna anterior to caruncle (1.7 mm long), longer than paired antennae (1 mm). Palps located laterally on buccal lips, equal size to antennae (1 mm). Mouth ventral on chaetiger 2.

Trilobed caruncle, oval (2.5 mm long, 7 mm wide). Median plicate lobe elevated with about 21 vertical folds. Between each pair of these folds, a circular projection protruding in the middle of the caruncle. Lateral plicated basal lobes narrow, each with about 21 folds (Fig. II.8B, C). First appearance of bippinate branchiae on chaetiger 4 and continue throughout body.

Parapodia biramous, notopodium with double dorsal cirri in the first three chaetigers and after single ones. Accessory dorsal cirri longer than cirrophore. Second ventral cirri (4.5 mm) more than three times longer than contiguous (1 to 1.2 mm). Anus dorsal in last chaetigers with cirriform lobes on the posterior end margin (Fig. II.8I).

All chaetae asymmetrically furcated, proportion between chaetae tines vary from 1:4 to 1:5. Neurochaetae include long and short chaetae (Fig. II.8D, E). Notochaetae longer and wider than neurochaetae (Fig. II.8F, G).

Remarks

This species shares the longest second ventral cirri (proportion 3:1) and the red eyes with *C. entypa*, Nevertheless, it differs in the pigmentation pattern, caruncle features and size of eyes. In *C. entypa*, only dorsal cirri are violet and none pigmentation pattern was noticed in *Chloeia* sp B. *Chloeia entypa* has unpigmented caruncle with wide folds and one fifth the size of posterior eyes, while in *C. sp. B* the pigmentation pattern includes a broad longitudinal stripe, black to dark caruncle with thin folds and one third the size of posterior eyes. Both species are distributed on the Pacific side; however, *Chloeia* sp. B appears limited into the gulf of California.

The main differences between *C. pinnata* and the other three species in the Mexican Pacific are the dorsal pigmentation pattern and the branchial appearance (Table II.1). 1) *C. entypa* from deep waters between Guerrero and Oaxaca lacks pigmentation pattern and the first appearance of branchiae is on chaetiger 4. It also differs in the proportion of the length of second ventral cirri (3:1 whereas *C. pinnata* 2:1) and chaetal features. 2) *Chloeia* sp. A from the intertidal zone of Oaxaca has a different pigmentation pattern, which lacks a central pale line (Fig. II.7A), and has regular second ventral cirri. 3) *Chloeia* sp. B from the gulf of California differs in the pigmentation pattern showing only one central red line (Fig. II.8A, H), while in *C. pinnata* the dorsum shows a continuous reddish pigmentation except in the central pale line, and also differs in chaetal features, but both species shares the large second ventral cirri (proportion 2:1).

Barcode analyses

Eight nucleotide sequences between 590–680 bp of the section of COI gene were included from *Chloeia* specimens to calculate genetic divergence (three from *C. viridis*, three from *C. pinnata* and one from *C. flava*), and three *Notopygos* species (one each from *N. ornata*, *N. caribea* and *N. kekooa*; Borda *et al.*, 2015; see chapter IV). The K2P distance between *C. viridis* and *C. pinnata* shows a genetic divergence around 27%, the distance between *C. viridis* and *C. flava* was 28% and between *C. pinnata* and *C. flava* 31% (Fig. II.9). These *Chloeia* species share the first appearance of branchiae in 4 chaetiger and violet dorsal cirri and the morphological differences are related with the pigmentation pattern and chaetal features. The genetic divergence between these species corroborates the relevance of pigmentation pattern to differentiate them. Intraspecific genetic divergence in *C. pinnata* was between 0.7 to 1% and in *C. viridis* around 0.4%.

Discussion

The widespread in marine species is partially explained by an over-conservative tradition in taxonomy (Klautau *et al.*, 1999; Bleidorn *et al.*, 2006). The use of few morphological characters in early descriptions is the major cause for the inclusion of different species in an unique taxa, as in the case of *Chloeia* species. The quick identification based upon the presence of violet dorsal cirri and the branchiae beginning on chaetiger 4 has resulted in the apparent cosmopolitanism of *C. viridis*. Klautau *et al.* (1999) suggested that the cosmopolitan distribution should be regarded with suspicion and cryptic speciation with high endemism must be expected. Wide distribution appears to be rare and only few examples corroborate this phenomenon (see Westheide *et al.*, 2003; Ahrens *et al.*, 2013).

Usually, the application of molecular methods has turned out reports of wide distributional ranges. Genetic perspective has permitted to identify several species overlooked before, frequently shifting from one taxonomic entity to two or even more (Vogler *et al.*, 2008; Nygren and Pleijel, 2011). This situation is related with cryptic speciation and with the poor taxonomic understanding of a taxon, which has been called the cosmopolitan syndrome (Bleidorn *et al.*, 2006). Biogeographical patterns cannot be understood without considering the cryptic and pseudo-cryptic speciation (Nygren, 2014). The last one refers to the case when, after identification of genetic divergence, morphological differences that permit identification are found (Sáez and Lozano, 2005). In Polychaeta it has been demonstrated that the morphology alone can underestimate species richness and thus combined approaches are suggested to understand their biodiversity (Nygren, 2014). In this revision, detailed morphological observations were incorporated that had not been considered before, such as the variation in caruncular features, accessory dorsal cirri, first appearance of branchiae and the relative size of second ventral cirri. In addition, the pigmentation patterns were incorporated, considering that live coloration has been found to be a key morphological character and that is a rather conservative feature still visible in old museum specimens. Finally, the barcode divergence in three species, which support the genetic basis of morphological differences, was included.

Morphological features and the sequence divergence are consistent, since both show sufficient differences to distinguish *Chloeia* species. Previous studies in others amphinomids showed high genetic divergences among related species, like >20% in *Eurythoe* (Barroso *et al.*, 2010) and >25% in *Notopygos* (Borda *et al.*, 2015, chapter IV). Genetic divergence found in *Chloeia* species is similar to that of *Notopygos*, which is more closely related to *Chloeia* than *Eurythoe* (Borda *et al.*, 2015, chapter IV). Another common feature between *Chloeia* and *Notopygos* is the importance of the pigmentation pattern to distinguish species (Yáñez-Rivera and Carrera-Parra, 2012, chapter III; Borda *et al.*, 2015, chapter IV). Although both genus together with *Archinome* belong to the subfamily Archinominae (Borda *et al.*, 2015, chapter IV), such diagnostic features are not relevant in the latter one. Therefore, no generalization can be done about specific characters to identify species as demonstrated by the cryptic speciation in *Archinome*, where the pigmentation pattern and other characters variations are not considered diagnostic (Borda *et al.*, 2013). Thus, it is an evidence of cryptic and pseudo-cryptic speciation in Amphinomidae. None of *Chloeia* species analyzed here shows a cryptic speciation, and the main confusions to recognize and distinguish species are related to erroneous taxonomical features.

Intraspecific genetic divergence in *Chloeia* species is similar to what has been observed in populations of *Hermodice carunculata* along the Atlantic Ocean, where divergence ranged from 0.9 to 2.9% and the minor intrapopulational difference was around 0.2% (Ahrens *et al.*, 2013).

Chloeia flava and *C. conspicua* have been described from the Indo-Pacific region, but have been also recorded in Mexican localities (Treadwell, 1923; Fauvel, 1943;. Nevertheless, none of the specimens from Mexican waters which were reviewed from several collections belong to these species. This confirms that *Chloeia* species have not a wide distribution ranges as previously thought by several authors. Another example of distribution clearing up is *C. viridis*, which was considered as an amphiamerican species, based in an erroneous pigmentation pattern, and because it has been recorded from the western Atlantic and

Caribbean Sea, and in the eastern Pacific from the gulf of California to Panama (Fauchald, 1977; Gathof, 1984; Dean, 2004; Dean *et al.*, 2012).

In conclusion the contribution of this paper consists of the reestablishment of one species (*C. euglochis*); the description of two new species (*Chloeia* sp. A and B); the delineation of three species with the inclusion of morphological features that were hazy (e.g. *C. entypa*: the length of second ventral cirri, *C. pinnata*: the first appearance of branchiae and *C. viridis*: the pigmentation pattern). Moreover, distribution aspects of the studied *Chloeia* species were also clarified.

Table II.1. Morphological characters of species of *Chloeia* species included in this study. Characters were taken from the original description or observed in the type material when available.

Species	Authority	Type Locality	Depth	Distribution	Size of second ventral cirri	First appearance of branchiae	-middorsal segments	-cirri	Size of accessory dorsal cirrus in chaetiger 4	Neurochaetae	Notochaetae
<i>C. entypa</i>	Chamberlin 1919	Mexican Pacific	1200 m	Eastern Pacific	Large 3:1	4	Without coloration	Violet	No present	Furcated (Fig. II.2C–D)	Furcated (Fig. II.2E–F)
<i>C. euglochis</i>	Ehlers 1887	Florida, EUA	<80 m	Caribbean	Regular	4	Irregular transversal line in each segment, wider in the middle (Fig. II.3A–C)	Only cirrophore violet	No present	Furcated (Fig. II.3D–E)	Harpoon (Fig. II.3F)
<i>C. flava</i>	(Pallas 1766)	Indian Ocean	shallow waters	Indian Ocean	Regular	4	One central dark circle in each segment (Fig. II.4C)	Only cirrophore violet	Minor	Furcated (Fig. II.4D)	Furcated external serrated border in the larger tip (Fig. II.4E–G)
<i>C. pinnata</i>	Moore 1911	California, USA	500 m	Eastern Pacific	Large 2:1	3 branchial filament, 4 complete	One vertical central pale line, both lateral sides whole pigmented (Fig. II.5E)	Violet	No present	Furcated (Fig. II.5F–H)	Furcated internal serrated border in the larger tip (Fig. II.5I–J)

Table II.1 cont. Morphological characters of species of *Chloeia* species included in this study. Characters were taken from the original description or observed in the type material when available.

Species	Authority	Type Locality	Depth	Distribution	Size of second ventral cirri	First appearance of branchiae	-middorsal segments	-cirri	Size of accessory dorsal cirrus in chaetiger 4	Neurochaetae	Notochaetae
<i>C. viridis</i>	Schmarda 1861	Jamaica	<30 m	Caribbean	Large 2:1	4	One central dark line; each segment start with a thin transversal line, like a "T" (Fig.	Violet	Minor and continues to chaetiger 7 or 8	Furcated (Fig. II.6E–G)	Furcated and harpoon (Fig. II.6H–I)
<i>Choeia</i> sp. A	sp. nov.	Mexican Pacific	shallow waters	Eastern Pacific	Regular	4	Three irregular brown lines with two pale lines between ones (Fig. XG)	Violet	No present	Pointed and furcated (Fig. II.7E–F)	Pointed and harpoon (Fig. II.7G–H)
<i>Chloeia</i> sp. B	sp. nov.	Gulf of California	>200 m	Gulf of California	Large >3:1	4	One central wide dark line (Fig. XF)	Violet	No present	Furcated (Fig. II.8D–E)	Furcated (Fig. II.8F–G)

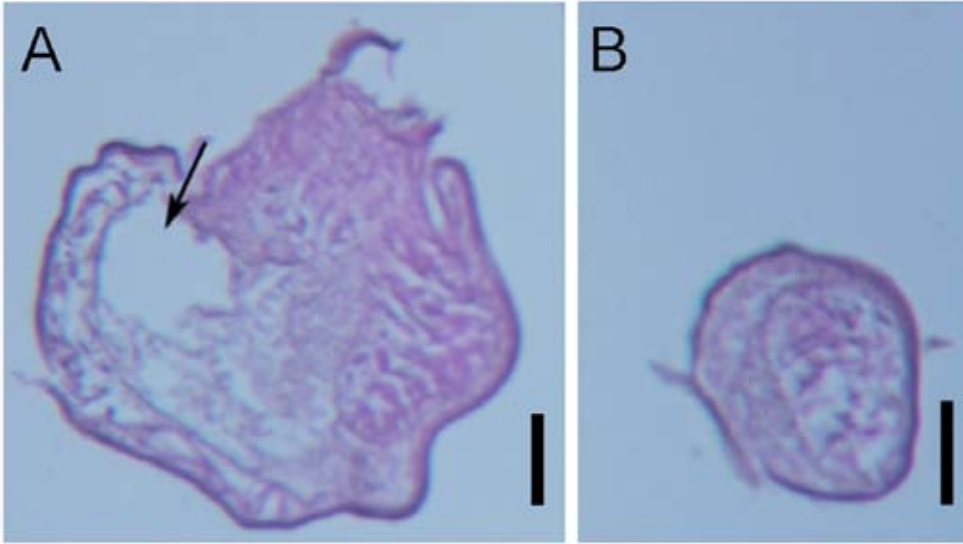


Figure II.1. Histological section of ventral cirri of *Chloeia* sp. B. A) Second chaetiger; B) third chaetiger. Arrow shows the interspaces. Scale 0.05 mm.

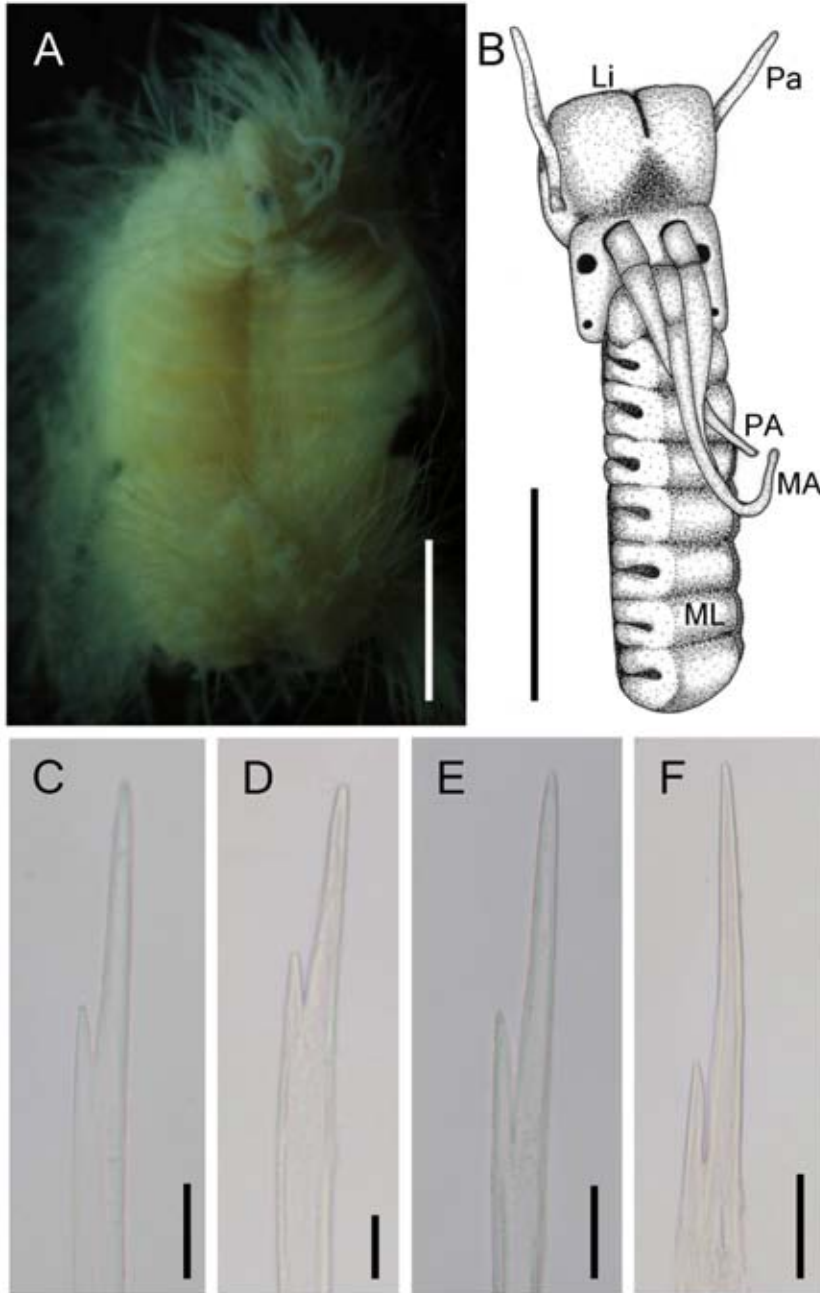


Figure II.2. *Chloeia entypa* A) Holotype, ventral view; B) prostomium and caruncle; C) neurochaeta from first chaetiger; D) neurochaeta from chaetiger 10; E) notochaeta from first chaetiger; F) notochaeta from chaetiger 10. Li: lips, MA: median antenna, ML: medial lobe, Pa: palps, PA: paired antenna. Scale: A) 2 mm, B) 0.5 mm, C-D) 5 μ , E) 2 μ , F) 10 μ .

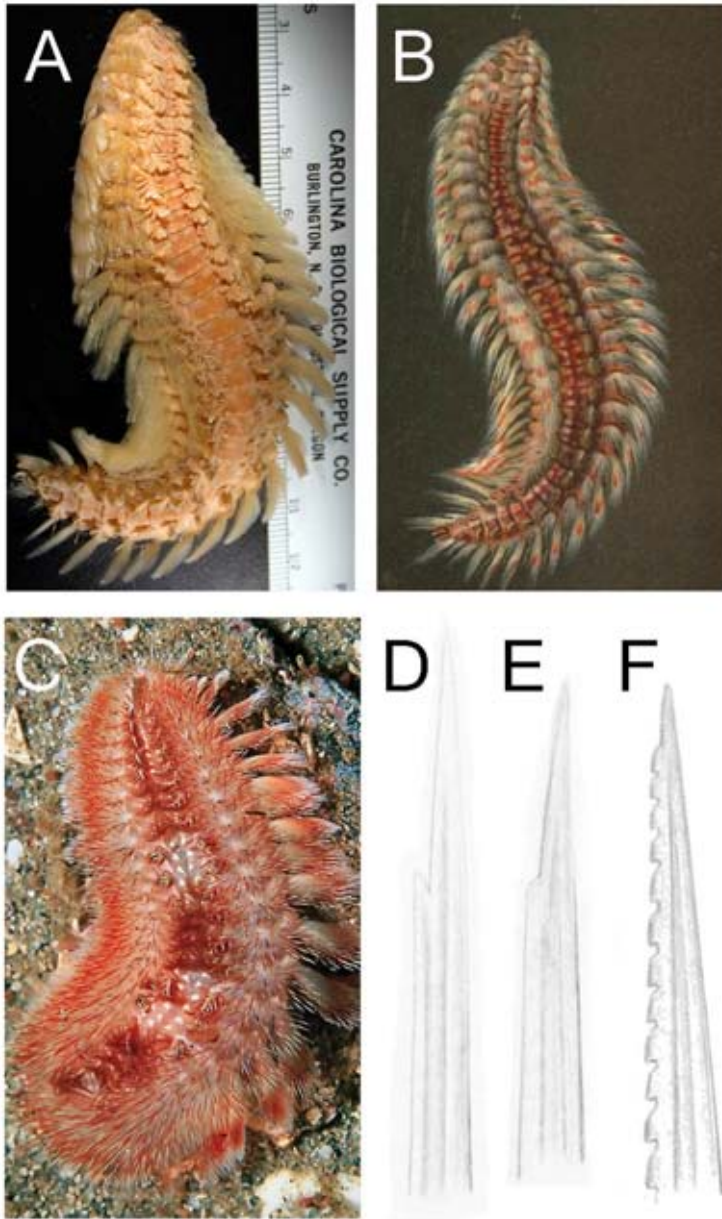


Figure II.3. *Chloeia euglochis*. A) Syntype complete, photo: Elizabeth Borda, dorsal view; B) illustration from Ehlers (1887); C) complete live specimen from Caribbean, photo: Paul Humann; D and E) neurochaetae; F) notochaetae, chaetae illustrations from Ehlers (1887).

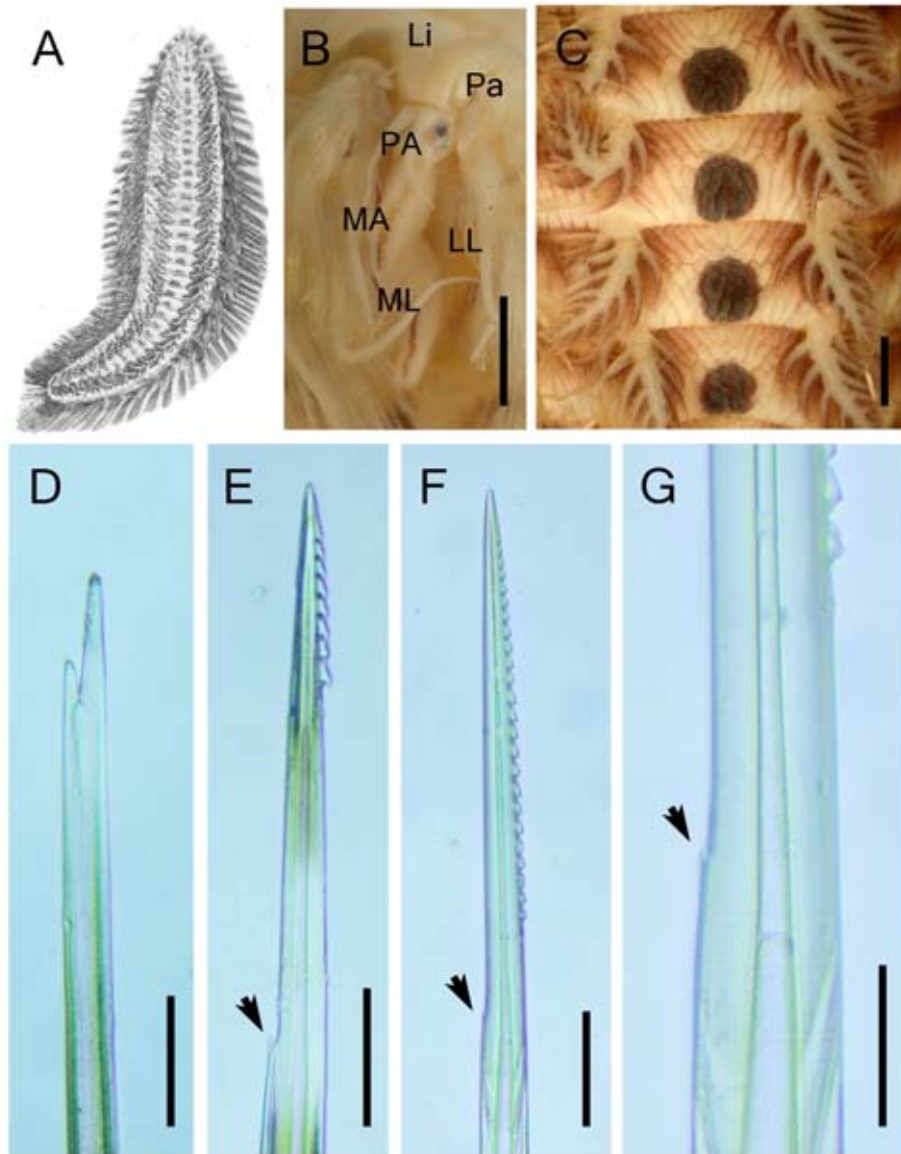


Figure II.4. *Chloeia flava* A) Illustration of complete specimen from Pallas (1766); B) anterior end, dorsal view; C) pigmentation pattern from median segments, photo: Elizabeth Borda; D) neurochaetae from median chaetigers; E-G) notochaetae, arrows show a spur. Li: lips, LL: lateral (plicated basal) lobes, MA: median antenna, ML: median (plicate) lobe, Pa: palps, PA: paired antennae. Scale: B) 2 mm, C) 1 mm, D-F) 20 μ , G) 10 μ .

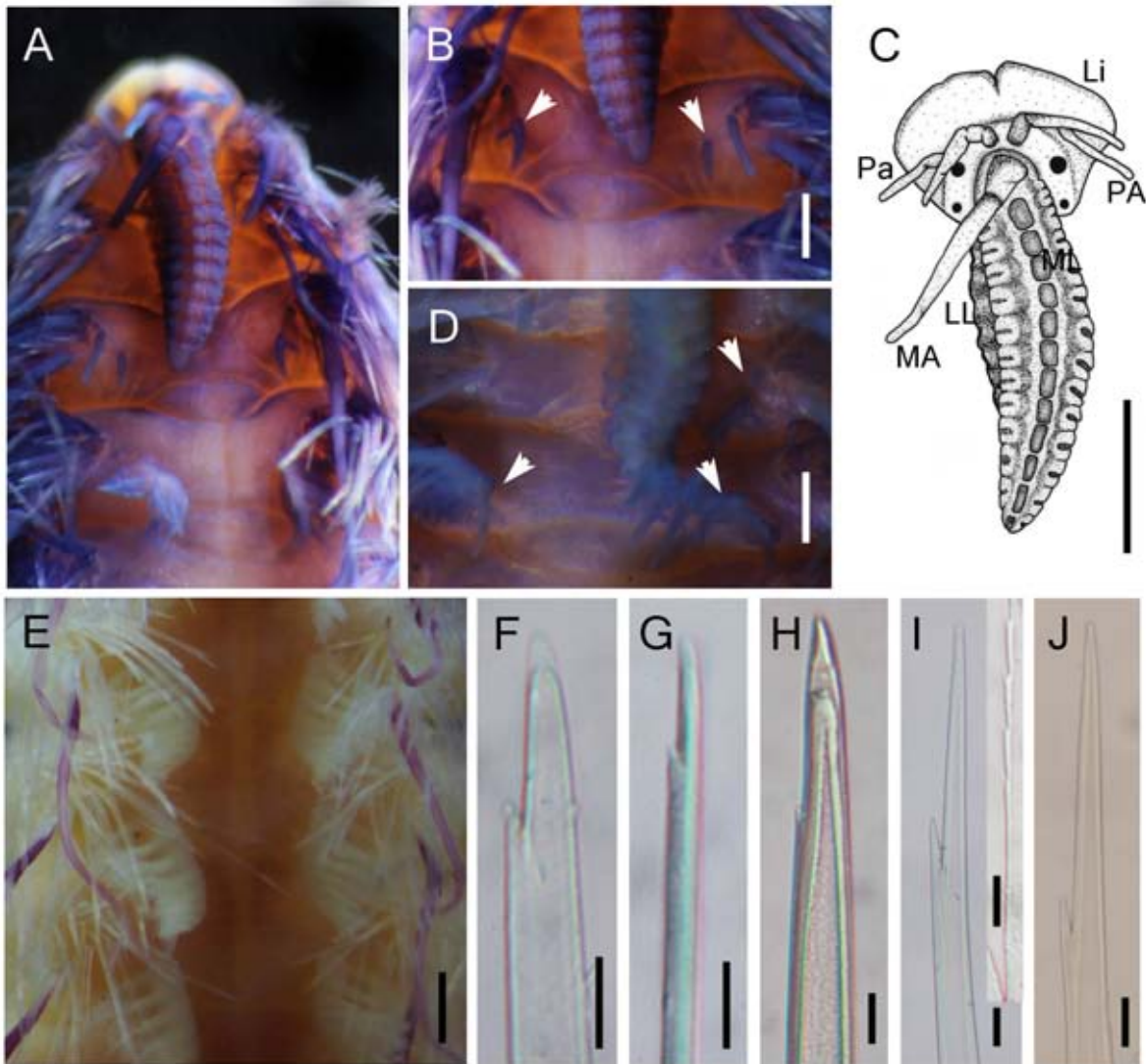


Figure II.5. *Chloeia pinnata* A) Anterior end, dorsal view; B) segment 3; C) prostomium and caruncle illustration; D); segments 3 and 4; E) pigmentation pattern from median segments; F) neurochaetae from first chaetiger; G) long neurochaetae from chaetiger 10; H) short neurochaetae from same chaetiger; I) notochaetae from first chaetiger, insert shows the serrated inner border; J) notochaetae from chaetiger 10. C) Paratype, all other holotype; B-C) arrows show branchiae; Li: lips, LL: lateral (plicated basal) lobes, MA: median antenna, ML: median (plicate) lobe, Pa: palps, PA: paired antennae. Scale: A, C, D) 1 mm, B, E) 0.5 mm, F-H) 10 μ , I) 40 μ , insert 25 μ , J) 50 μ .

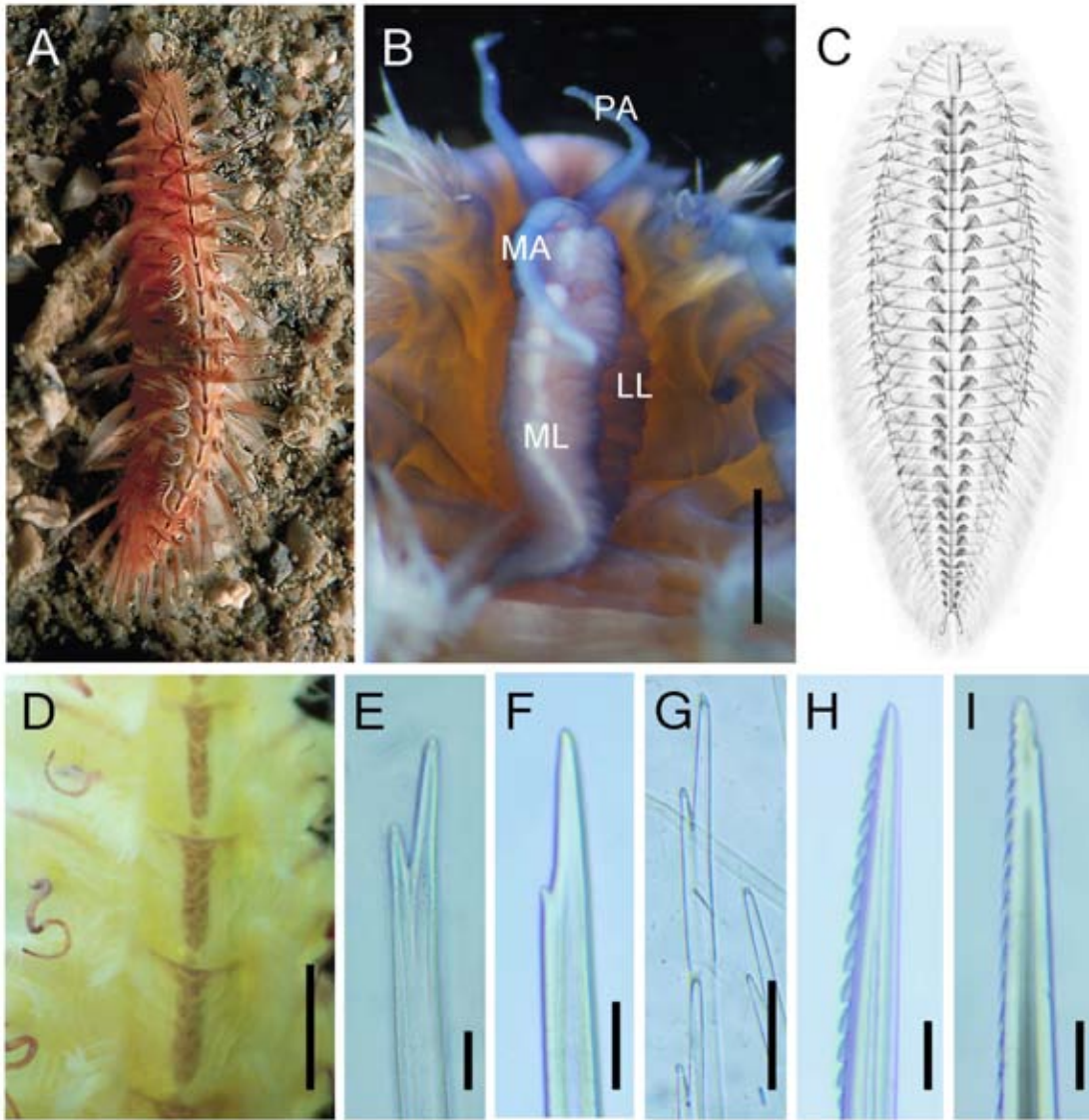


Figure II.6. *Chloeia viridis*. A) Complete live specimen, dorsal view; B) anterior end; C) illustration from Schmarda (1861); D) pigmentation pattern from median segments; E) neurochaetae from first chaetiger; F, G) neurochaetae from median chaetigers; H, I) notochaetae from median chaetigers. A, B) Specimens from Florida (photo A: Paul Human), D) specimen from Colombia, E-I) specimen from Puerto Rico. LL: lateral (plicated basal) lobes, MA: median antenna, ML: median (plicate) lobe, PA: paired antennae. Scale bar: B) 1 mm, D) 2 mm, E, F) 20 μ , G) 50 μ , H, I) 10 μ .

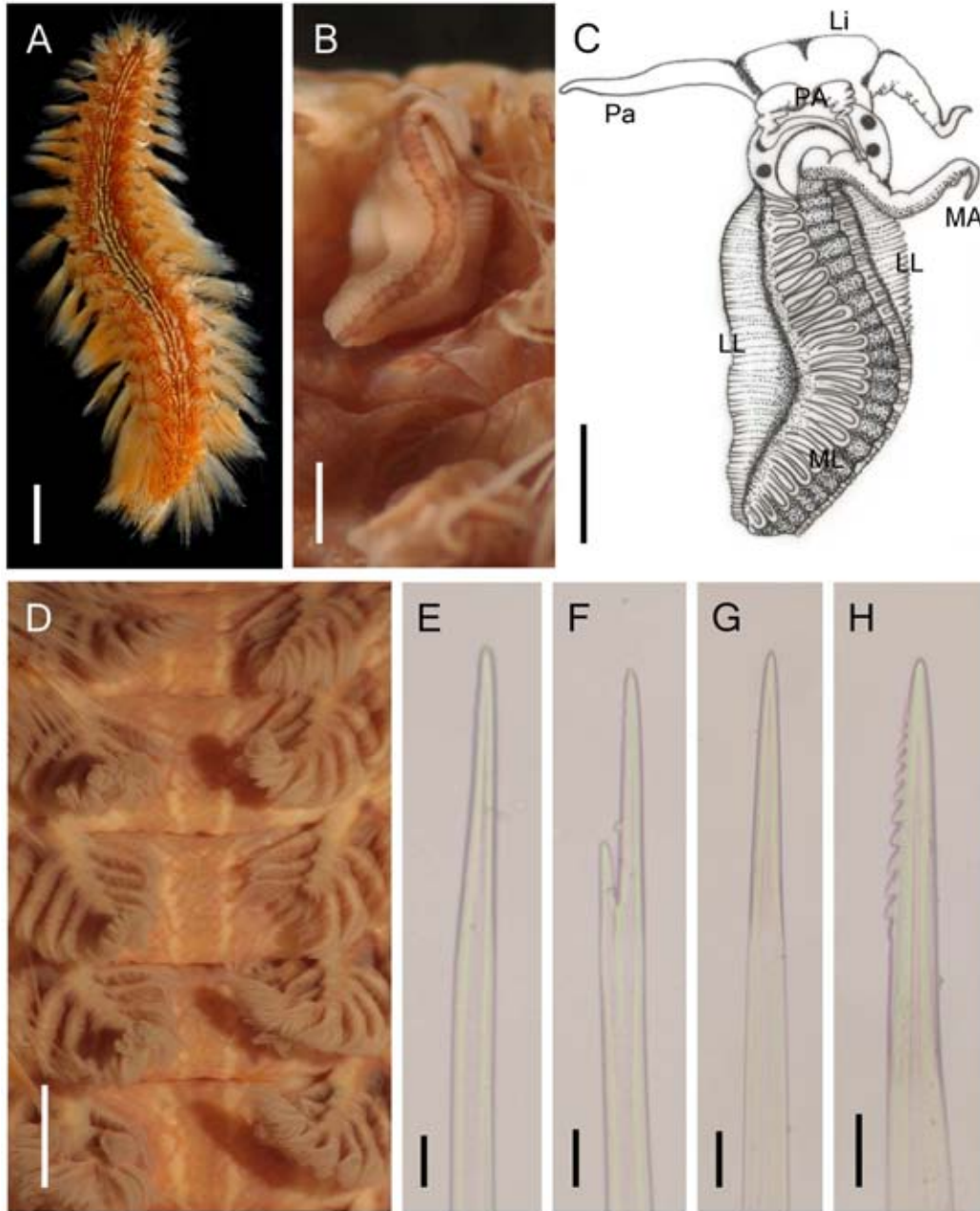


Figure II.7. *Chloeia* sp. A) Complete live specimen, dorsal view, photo: Carlos Sánchez; B) anterior end; C) prostomium and caruncle illustration; D) pigmentation pattern from median segments; E) pointed neurochaetae from chaetiger 10; F) furcated neurochaetae from same chaetiger; G) pointed notochaetae from same chaetiger; H) notochaetae from same chaetiger. A) Specimen from gulf of California, B-H) holotype. Li: lips, LL: lateral (plicated basal) lobes, MA: median antenna, ML: median (plicate) lobe, Pa: palps, PA: paired antennae. Scale: A) 1 cm, B, C) 1 mm, D) 2 mm, E, F) 20 μ , G, H) 50 μ .

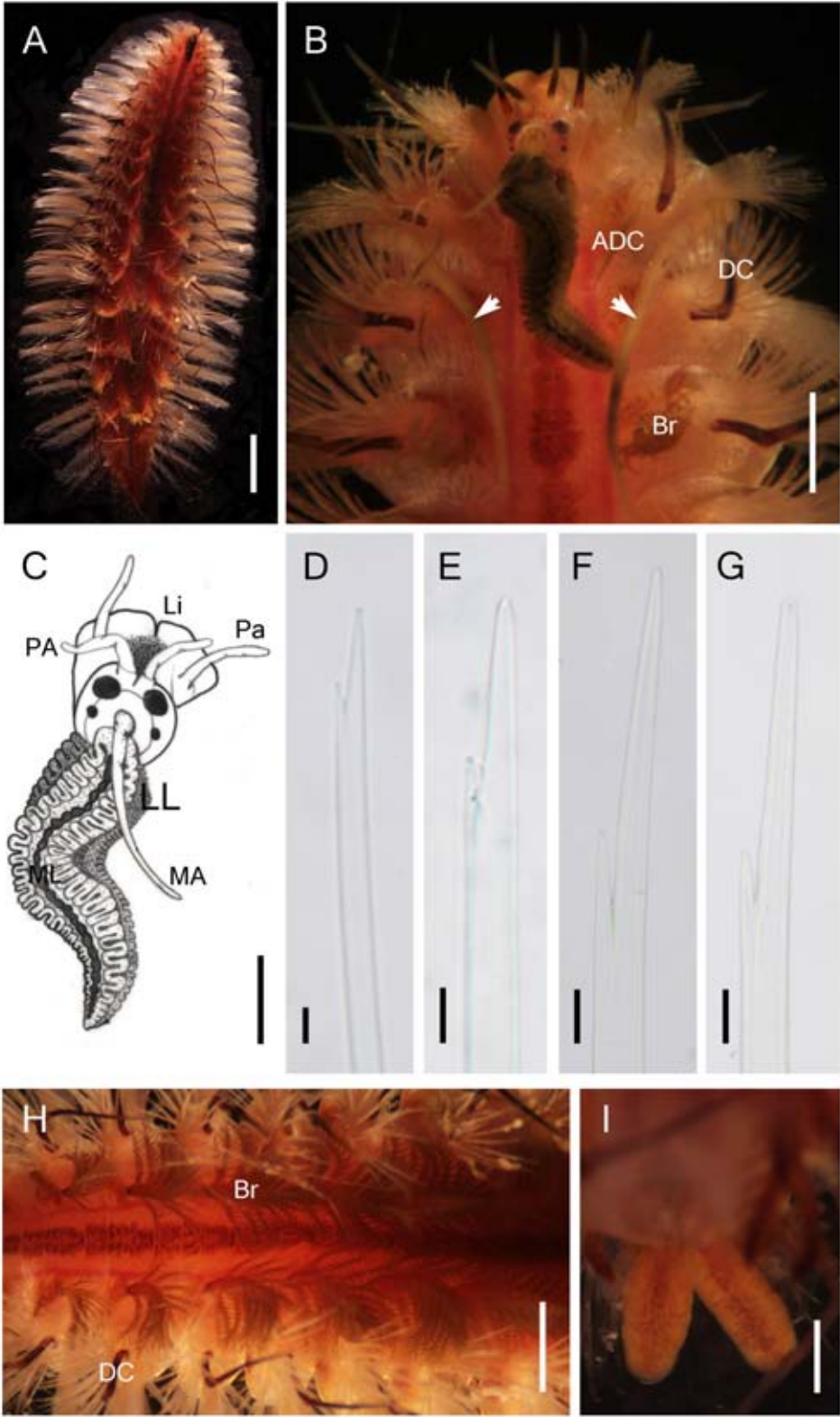


Figure II.8. *Chloeia* sp. B. A) Complete specimen, dorsal view; B) anterior end; C) prostomium and caruncle illustration; D) neurochaetae from first chaetiger; E) neurochaetae from same chaetiger 10; F) notochaetae from first chaetiger; G) notochaetae from chaetiger 10; H) pigmentation pattern from median segments; I) posterior end with cirriform lobes. A, D-I) Holotype, B, C) paratypes; C) arrows show the second ventral cirri; ADC: accessory dorsal cirri, Br: branchiae, DC: dorsal cirri, Li: lips, LL: lateral (plicated basal) lobes, MA: median antenna, ML: medial (plicate) lobe, Pa: palps, PA: paired antennae. Scale: A) 5 mm, B, C) 1 mm, D) 20 μ , E) 15 μ , F, G) 50 μ , H) 2 mm, I) 0.5 mm.

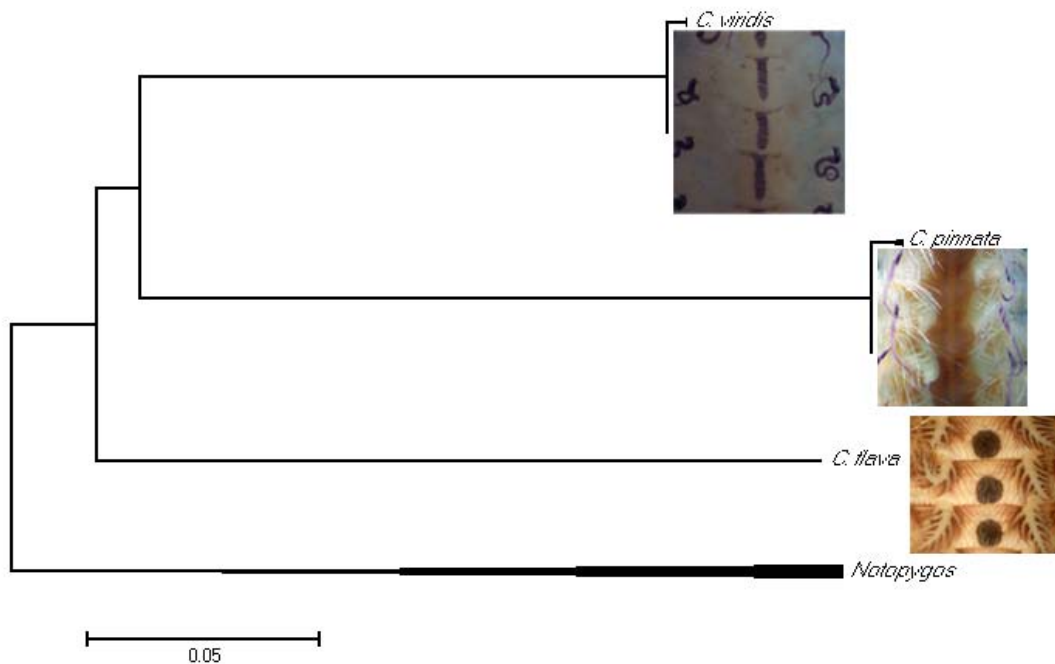


Figure II.9. Neighbor-joining tree of COI sequences of three *Chloeia* species (K2P); photo of *C. flava*: E. Borda.

Capítulo III

**Reestablishment of *Notopygos megalops* McIntosh, description of *N. caribea* n. sp.
from the Greater Caribbean and barcoding of “amphiamerican” *Notopygos*
species (Annelida, Amphinomidae)**

BEATRIZ YÁÑEZ-RIVERA and LUIS FERNANDO CARRERA-PARRA

2012

Zookeys 223: 69–84.

Corresponding Author:

Beatriz Yáñez-Rivera

Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Reestablishment of *Notopygos megalops* McIntosh, description of *N. caribea* sp. n. from the Greater Caribbean and barcoding of “amphiamerican” *Notopygos* species (Annelida, Amphinomidae)

Beatriz Yáñez-Rivera^{1,†}, Luis Fernando Carrera-Parra^{2,‡}

1 Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Académica Mazatlán, Joel Montes Camarena s/n, Ap. Postal 811, 82000, Mazatlán, Sinaloa, Mexico **2** El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal, Depto. Ecología Acuática, Av. Centenario km 5.5, 77014, Chetumal, Quintana Roo, Mexico

† [urn:lsid:zoobank.org:author:F85C0EFC-5EC5-4C48-853C-601604EA4E3D](https://zoobank.org/urn:lsid:zoobank.org:author:F85C0EFC-5EC5-4C48-853C-601604EA4E3D)

‡ [urn:lsid:zoobank.org:author:9773DA83-9DD1-42B0-B381-2343866F57F6](https://zoobank.org/urn:lsid:zoobank.org:author:9773DA83-9DD1-42B0-B381-2343866F57F6)

Corresponding author: Beatriz Yáñez-Rivera (beyariv7@gmail.com)

Academic editor: Chris Glasby | Received 21 June 2012 | Accepted 18 September 2012 | Published 28 September 2012

[urn:lsid:zoobank.org:pub:8BEF9457-F656-42F2-A64C-40BECB0E8824](https://zoobank.org/pub:8BEF9457-F656-42F2-A64C-40BECB0E8824)

Citation: Yáñez-Rivera B, Carrera-Parra LF (2012) Reestablishment of *Notopygos megalops* McIntosh, description of *N. caribea* sp. n. from the Greater Caribbean and barcoding of “amphiamerican” *Notopygos* species (Annelida, Amphinomidae). ZooKeys 223: 69–84. doi: 10.3897/zookeys.223.3561

Abstract

The species of the genus *Notopygos* Grube, 1855 are characterized by an ovate body, a prominent caruncle with three lobes, dendritic branchiae, and double dorsal cirri. Twenty-two species belonging to *Notopygos* have been described, mostly from the Indo-Pacific region. In America, few species are frequently recorded: *N. crinita* Grube, 1855 from St. Helena Island (Atlantic) and *N. ornata* Grube and Ørsted in Grube 1857 from Costa Rica (Pacific). *Notopygos crinita* is a widely distributed species in the Western Atlantic with additional reports in the Mediterranean Sea (as a questionable alien species) and in the Pacific Ocean. However, only the genus features have been considered, consequently some records could be misidentifications. During a revision of materials from collections and the barcode project, ‘Mexican Barcode of Life, MEXBOL’, we found specimens of *N. megalops* and an undescribed species from reef zones in the Caribbean; the former had been considered a junior synonym of *N. crinita*. Herein, *N. megalops* is reestablished and *N. caribea* sp. n. is described. A morphological and DNA barcode approach was used to explain the records of *N. ornata* in the Atlantic and to show the differences with the new species, since both species share features such as complex pigmentation patterns, and circular projections in the median lobe of the caruncle.

Keywords

Amphiamericana, DNA barcoding, pigmentation pattern, taxonomy, polychaete

Introduction

Polychaetes belonging to the family Amphinomidae are commonly known as fireworms (Hutchings 2000). However, members of *Notopygos* Grube, 1855 do not produce the burning sensation and can be manipulated without negative consequences (Kudenov 1980). Amphinomids are usually abundant in coral reefs and rocky areas; there are also some deep-water genera. *Notopygos* species are less common and some species have been collected in open waters at depths exceeding 200 m (Salazar-Vallejo 1997).

Notopygos was erected by Grube (1855) for the type species *N. crinita* Grube, 1855, from St. Helena Island. In the original description Grube did not mention one of the most important features of the genus: the presence of the double dorsal cirri. Nevertheless, two years later this omission was corrected in the description of *N. ornata* Grube and Ørsted in Grube 1857 from the Pacific coast of Costa Rica. Thus, the genus is characterized by an ovate body, a prominent caruncle with three lobes (one elevated central lobe and two flattened lateral lobes), dendritic branchiae, and double dorsal cirri (Fauchald 1977).

Twenty-two species of the genus have been described, most of them from the Indo-Pacific region. The original descriptions of several species are incomplete, since relevant features such as the beginning of branchiae, position of the anal opening and folds of the caruncle were omitted. Consequently, in some cases it is difficult to delimit and identify the species (Potts 1909). In the last revision of the genus, Horst (1911) pointed out the lack of knowledge about *Notopygos* species and included all the species that had been described. Regrettably, he omitted the illustration of the pigmentation pattern, even though Potts (1909) had emphasized the importance of pigmentation pattern to distinguish species. Thus, the group is still poorly known and the delimitation of some species is problematic. The lack of knowledge is evident in *N. ornata*, which was described in 1857, but some features were not characterized until almost eighty years later when Monro (1933) redescribed the species, including worms of different sizes, and found some variations in juvenile specimens. In addition, he observed that the pigmentation pattern does not deteriorate once the specimen has been preserved. That contribution included other important observations because it considered the variability in 18 specimens.

Notopygos crinita is widely distributed in the Western Atlantic. In addition, there are reports of the species in the central Mediterranean where it was considered to be alien (Zenetos et al. 2010) and as a non-established alien species on the Italian coast (Occhipinti-Ambrogi et al. 2011). It was even recorded in the Pacific Ocean (Cocos Island) by Treadwell (1928), but Dean (2004) regarded this record as doubtful. In the Western Atlantic region, only one more *Notopygos* species has been described, *N. megalops* McIntosh, 1885; this was described based on a juvenile specimen from Bermuda and it was differentiated from the other species by differences in the caruncle, the branchiae begin-

ning on chaetiger 6 and form of cirri. Hartman (1959) suggested that this species could be a junior synonym of *N. crinita*, although she did not review the type material of the two species; her statement was supported by Ebbs (1966). Salazar-Vallejo (1997) revised the holotype of *N. megalops* and some additional specimens collected in the Mexican Caribbean and validated the synonymy. Therefore, the only species of the genus recorded in the Greater Caribbean basin is *N. crinita*, with some doubtful records of *N. ornata*.

During a revision of preserved material from museum collections and newly collected material from the barcode project “Mexican Barcode of Life, MEXBOL”, we found an adult form of *N. megalops* and an undescribed species from reef zones in the Caribbean. Herein, *N. megalops* is reestablished and a new species of *Notopygos* is described. In addition, DNA barcoding was used to complement the morphological approach in order to explain the records of *N. ornata* in the Atlantic and to better differentiate the new species, since both have a similar pigmentation pattern.

Methods

Reviewed materials belong to the following collections: The Natural History Museum, London (BMNH); Reference Collection (ECOSUR) and collection of ethanol-fixed specimens (ECOSUR-OH) of El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal; Marine Invertebrate Museum, Rosenstiel School, University of Miami (UMML); and National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington (USNM).

Material from ECOSUR-OH was collected by snorkelling in the reef lagoons; worms were removed from coralline rocks and fixed in 96% ethanol. To observe the morphological attributes, we used Shirlastain A and methyl green to bring out details. Specimens were measured to record the width (in the widest part without chaetae), the body length (from prostomium to pygidium), appendage length, caruncle length and width, branchial filaments by branchiae and distal lobes length and width. All of the appendages and caruncle were measured directly under the microscope with a miniscale (0.1 mm divisions). Taxonomical features were illustrated with microphotography using a Cannon Rebel EOS and line drawing to caruncle and pigmentation pattern. Semi-permanent slides of chaetae from chaetigers 1, 3, 10 and 15 (often including some additional) were prepared to describe the chaetal features. Chaetae were measured with a calibrated microscope scale and SEM analyses were performed.

DNA barcoding for *N. ornata* and the new species followed standard protocols (Hajibabaei et al. 2005). The specifications for polychaetes are described in Carrera-Parra and Salazar-Vallejo (2011). Sequence data, electropherograms, trace files, primer details, photographs and collection localities for specimens are available within the project Polychaeta of Mexico II, Barcode of Life Data System BOLD (<http://www.barcodinglife.org>; Ratnasingham and Hebert 2007).

Sequences were aligned with ClustalW interface MEGA version 5 (Tamura et al. 2011). Anterior and terminal ends were removed. Sequence divergences were calculated with the Kimura two parameter (K2P) distance model (Kimura 1980)

as standard model for constructing genetic distance matrices in BOLD. Neighbor-joining (NJ) tree was created as a representation of the divergence pattern between species (Saitou and Nei 1987). The sequence from *Hermodice carunculata* (also in BOLD) was incorporated as outgroup.

Results

Family Amphinomidae Savigny in Lamarck 1818

Genus *Notopygos* Grube, 1855

Notopygos caribea sp. n.

urn:lsid:zoobank.org:act:6D3A9313-282E-4297-87B3-FDD4E6756370

http://species-id.net/wiki/Notopygos_caribea

Figures 2, 4c, f

Notopygos crinita Treadwell 1901:194 (*partim, non* Grube, 1855).

Type-material. Holotype [ECOSUR 0145 (ECOSUR-OH-0213)] Xahuayxhol, Quintana Roo, México, 18°30'30"N, 87°44'02"W, August 2004, 1 m, reef lagoon, coralline rock, Coll. LFCP. Paratypes (3) ECOSUR 0146, 0147, 0148] the same data as for holotype (Fig. 1).

Additional material. [ECOSUR P2641] Xcalak, Quintana Roo, México, sta. 4, 18°16'57"N, 87°49'8"W, in nightlight lift-net, August 2005, Coll. L. Vazquez. [USNM 15921] Sail Rock, Off Saint Thomas, 37 m, coral; [USNM 20296] Pillars of Hercules, English Harbor, Antigua; [USNM 15859] Puerto Rico; [USNM 20273] Barbados (Fig. 1); all as *Notopygos crinita*.

Description. Holotype (ECOSUR 0145) mature male, complete, with 30 chaetigers, 3 cm total length, 1 cm wide. Body fusiform, orange to light brown, with reddish-brown branchiae. Pigmentation pattern complex, triangular and rhomboid forms covering the dorsum (Figs 2C, 4F). Prostomium semicircular with four eyes in pigmented strip, anterior eyes twice size of posterior ones (Fig. 2A). Median antenna in central position on prostomium, long and slender (1.1 mm long, Figs 2A, 4C); pair of lateral antennae placed on anterior prostomial margin, size similar to median antenna (1 mm long). Lips with lateral palps, shorter than lateral antennae (0.7 mm). Mouth ventral between peristomium and chaetiger 3.

Caruncle oval (2.9 mm long, 1.7 mm wide), with an elevated central lobe with about 20 folds (Fig. 4C). Row of circular projection protruding between each pair of folds in middle of caruncle (Figs 2B, 4C). Lateral lobes flattened with pigmented base and folding edge with 19 and 22 folds (Fig. 4C).

Branchiae from chaetiger 5 (Fig. 2I), present throughout body. Each branchia with main short stem, branching in several filaments of various thicknesses and lengths (Fig. 2E). First branchia with 11 branchial filaments, second branchia with about 20,

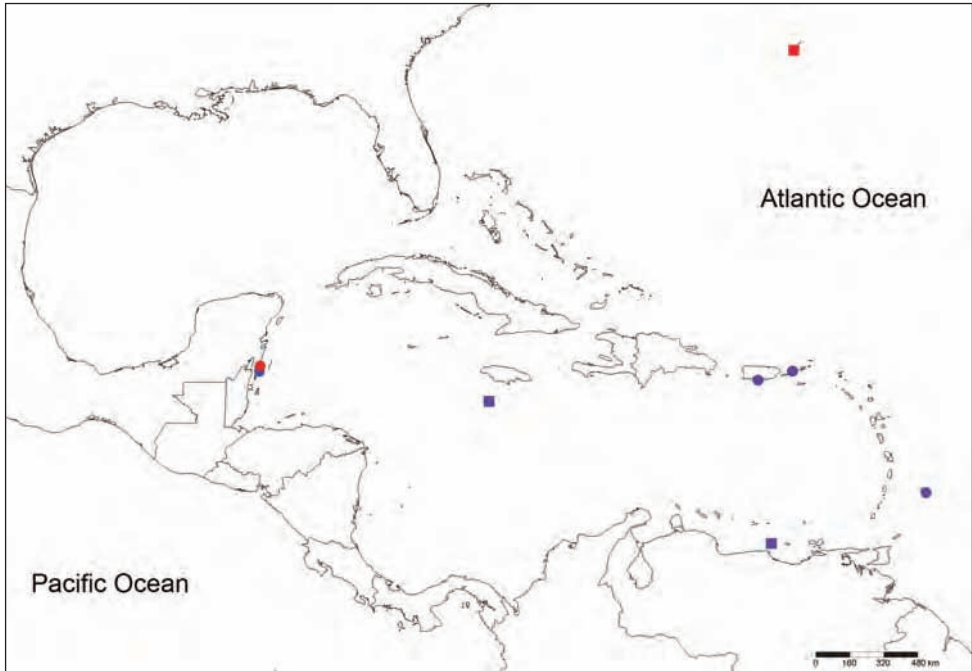


Figure 1. Localities from material reviewed. Circles: *Notopygos caribea* sp. n., squares: *N. megalops*, red: type material, blue: additional material.

middle one with about 40, posterior branchiae with 35–45 filaments up to the last chaetiger, where filaments are fewer. The large number of filaments causes a secondary ramification without a defined pattern.

Parapodia biramous, notopodium with double cirri and neuropodium with single ventral cirrus. Notopodial cirri differing; accessory cirrus (= branchial cirrus) simple with similar length along body (1.0–1.2 mm); dorsal cirrus with short, thick cirrophore (0.5 mm) in first chaetigers, subsequent ones with long slender cirrophore (1 mm) and cirrostyle (1.5 mm, Fig. 2F). Ventral cirri similar along body, cirrophore short (0.2 mm) and cirrostyle long (1 mm), decreasing towards last chaetigers.

Noto- and neurochaetae all asymmetrically furcated, slender (<0.03 mm), ratio of difference between short and long tines varies from three to four times (Fig. 2D). First chaetigers with some notochaetae with extra long tines, 10 to 30 times longer than short tines. Both neuro- and notochaetae include short and long types; shorter chaetae on exterior edge of chaetal lobe. Chaetae of first chaetigers with serrated margin. Some chaetae with an external “hard cover” that easily breaks up, giving the impression of being articulated (Fig. 2H).

Anus dorsal, on chaetiger 23. Posterior end margin with pair of distal lobes (0.5 mm long, 0.5 mm wide in the widest part, Fig. 2G).

Gametes: Gametes are located in the coelom. Oocytes are 40–57 μm in diameter (mean: $28.7 \pm 8.3 \mu\text{m}$, $n=20$, one paratype female). Spermatozooids have a spherical head ($\sim 3 \mu\text{m}$), ect-aquasperm type, aggregated in a mass (holotype).

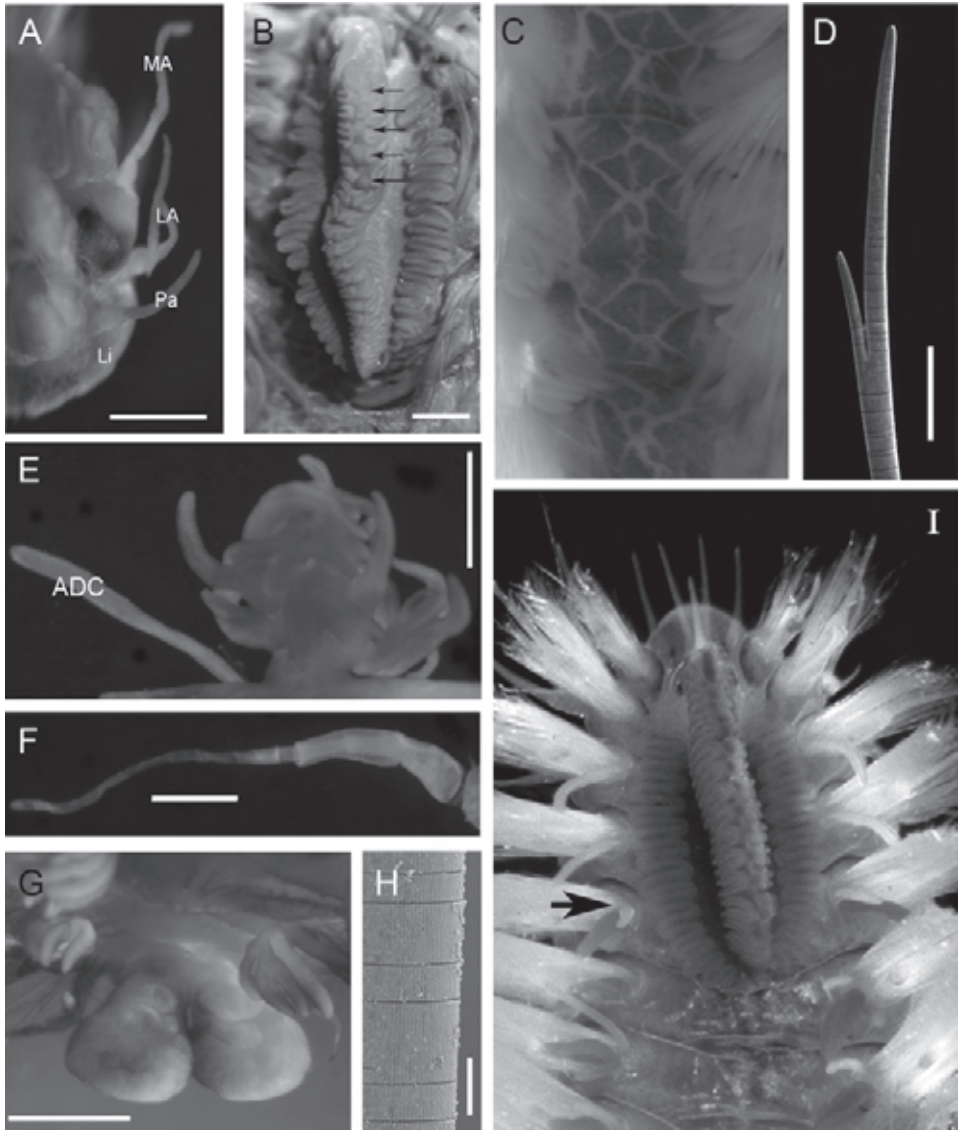


Figure 2. *Notopygos caribea* sp. n. **A** Prostomium, dorsal view **B** Caruncle, arrow showing circular projection in the middle of the caruncle **C** Pigmentation pattern between chaetiger 9–12 **D** Notochaeta from chaetiger 10 **E** Branchia and accessory dorsal cirrus from chaetiger 15 **F** Main dorsal cirrus from chaetiger 15 **G** Distal lobes **H** Chaetal fragmentation **I** Anterior part of live specimen from Guana Island, BVI (photo: Leslie Harris), arrows showing branchiae beginning. Holotype: **A, B, E–G**, paratype: **C, D, H**. ADC accessory dorsal cirrus LA lateral antennae Li lips MA median antenna Pa palps. Scale bar: **A, B, E–G**= 0.5 mm, **D**= 100 μ m.

Variation: Material examined varied in total length from 1.0 to 2.1 cm, in width from 0.3 to 0.5 cm, chaetigers from 23 to 26, and varies in the following features. Prostomium: median antenna similar length to lateral ones (from 0.4 mm to 1 mm), palps shorter (0.3–0.7 mm). In some worms the pigmented strip on the prostomium

continues to the buccal lips, around the palps, and even onto the ventral body with a dark region, although in holotype this pigmentation is faded. Caruncle fold number varies from 13 in smallest to 20; in all specimens number of folds between elevated lobe and laterals is very similar (± 2). Pigmented circular projections in mid-caruncle faded in some preserved specimens. Number of branchial filaments is size-dependent, smallest specimens having only three to nine, largest specimens having up to 25 filaments in median region. Branchiae from chaetiger 5 in both juvenile and adults.

Etymology. The specific name refers to the distribution area of the species.

Distribution. Greater Caribbean basin in shallow waters, related to coralline areas, particular associations are unknown.

Remarks. *Notopygos caribea* sp. n. is characterized by the complex pigmentation pattern covering the dorsum with triangular and rhomboid forms (Figs 2C, 4F), and by other features such as branchiae beginning on chaetiger 5, anus on chaetiger 23, and a prominent caruncle with a median keel with a series of highlighted points arranged in a longitudinal row of circles. The juvenile specimen also shows the coloration pattern and the distinctive caruncle. The coloration pattern on the caruncle of some specimens is faded; however, it is possible to distinguish the serial projections on the mid-caruncle.

The most common species recorded in the Atlantic is *N. crinita*. This species was briefly described by Grube (1855) from St Helena. He did not comment on pigmentation pattern and omitted the presence of the second dorsal cirri; furthermore, chaetae are described only as pale yellow, long and asymmetrically bifurcated. Unfortunately, the holotype of *N. crinita* [ZMB Verm. 3330] in the Zoologisches Museum, Berlin is lost (Hartwich 1993), so new topotypical materials are needed for a complete redescription, but this is beyond the scope of this study. However, the differences in anus position (21 vs. 23 in *N. caribea* sp. n.), size of the second cirri (indistinguishable vs. prominent in *N. caribea* sp. n.), pigmentation pattern (unstated, as not denoting vs. complex in *N. caribea* sp. n.) and caruncle (crenulated vs. well-defined structure in *N. caribea* sp. n.) allowed us to separate the two species.

Kinberg (1910) recorded one specimen from St Helena as *N. crinita*; however, the illustration shows one dorsal cirrus per notopodium and his description confirms this character. In addition, Kinberg stated that the specimen lacks the dorsal anus; thus we consider that this specimen does not belong to *Notopygos*, possibly a juvenile *Chloeia*.

Material from Puerto Rico on corals revised by Treadwell (1901) was identified as *N. crinita*; however, in the description he refers to the row of small dark brown bead-like elevations on the median fold of the caruncle. The mention of this characteristic feature of the caruncle in the Treadwell specimens allows us to assume that the Puerto Rico specimens belong to *N. caribea* sp. n.

In the Indo-Pacific region, eight *Notopygos* species have branchiae beginning on chaetiger 5 (Table 1):

1) *Notopygos rayneri* (Baird, 1870) from north-eastern Australia also has a complex pigmentation pattern but with white lines crossing in various directions, whereas *N. caribea* sp. n. lacks white lines even in live specimens (Figs 2I, 5). 2) *Notopygos flavus*

Table 1. Comparison of relevant features in some *Notopygos* species. For branchiae start and anus position, the numbers indicate chaetigers.

Species	Branchiae beginning	Caruncle	Pigmentation pattern	Anus location	Distribution
<i>N. crinita</i> Grube, 1855	5	Ovoid, crenulated, ornamented with elevated median lobe	–	21+ Ehlers, 1887 (intersegment 21–22)	Atlantic St Helena
<i>N. ornata</i> Grube & Ørsted in Grube 1857	4	About 20 folds in the elevated lobe with a row of ovals in the middle. Lateral lobes with pigmented areas (Fig. 4E)	Complex Triangular and rhomboid forms in symmetric pattern, 50% of cover (Figs 4E; 5)	24+ Monro, 1933 (23)	Eastern Pacific
<i>N. megalops</i> McIntosh, 1885	6	About 6 folds in the elevated lobe with a row of rectangles in the middle. Narrow lateral lobes (Fig. 3B)+ (folded structure)	Only in the cirrophore	18–19+ (undescribed)	Greater Caribbean
<i>N. rayneri</i> (Baird, 1870)	5	Three lobes strongly wrinkled. The central lobe detached.	Complex Dorsum violet with white lines crossing in diverse directions	22	Indo-Pacific
<i>N. flavus</i> Haswell, 1878	5	Elongated and sinuous. Details undescribed.	Lack of pigmentation	undescribed	Indo-Pacific
<i>N. variabilis</i> Potts, 1909	5	Three lobes with slack arrangement. Lateral lobes with pigmented areas (Fig. 4A)	Orange spots like chessboard (live), Unpigmented in preserved material.	22–25	Indian Ocean
<i>N. sibogae</i> Horst, 1911	5	Lateral lobes with a dark tone and 16–17 folds. Central lobe undescribed	Each segment colorless with an area having triangular shape. Violet band around the notopodium and only secondary cirri violet	23	Indo-Pacific
<i>N. cirratus</i> Horst, 1911	5	Lateral lobes with 11 folds without pigmentation. Central lobe undescribed	Each segment has three areas. Grey with a dark band around the base of each notopodium and violet cirrophore	Intersegment 23–24 on a papilla	Indo-Pacific
<i>N. gigas</i> Horst, 1911	5	Lateral lobes with 30 folds and pigmented areas. Central lobe undescribed.	Violet or brown in the middle of dorsum with several white lines. Branchiae and two dorsal cirri pigmented.	25	Indo-Pacific
<i>N. horsti</i> Monro, 1924	5	18 folds in the elevated lobe with two rows of small circles. Lateral lobes with light pigmented areas (Fig. 4B)	Dorsum marbled with a dark purple pigment, which covers the basal branchiae portion	Intersegment 22–23	Indo-Pacific
<i>N. andrewsi</i> Monro, 1924	5	More than 25 folds in the elevated lobe, without pigmented areas (Fig. 4D)	Dorsum with crossed lines and raised longitudinal ridges (Fig. 4G)	24	Indo-Pacific

Species	Branchiae beginning	Caruncle	Pigmentation pattern	Anus location	Distribution
<i>N. caribea</i> sp. n.	5	About 20 folds in the elevated lobe, with a row of circles in the middle. Lateral lobes with pigmented areas (Figs 2B, I, 4C)	Complex Triangular and rhomboid forms, 90% of cover (Figs 2C, I, 4F, 5)	23	Greater Caribbean

+ Modified after original description; in parenthesis, original data.

Haswell, 1878 from northern Australia lacks any pigmentation pattern. 3) *N. variabilis* Potts, 1909 from the Maldives differs from *N. caribea* sp. n. mainly in caruncle shape (Fig. 4A) and pigmentation pattern of live specimens, which is like a chessboard with orange spots (original description lacking illustration of pigmentation pattern). 4) *N. sibogae* Horst, 1911 from Indonesia differs in that the pigmentation pattern includes a violet band around the notopodium and violet secondary cirri (original description lacking illustration of pigmentation pattern). 5) *N. cirratus* Horst, 1911 from the Philippines differs in the pigmentation pattern grey with a dark band around the base of each notopodium and violet cirrophore, and in the intersegmentary location of the anus above an elevation. 6) *N. gigas* Horst, 1911 from the south coast of Timor differs in the dissimilar anus location and branchiae shape, being three large stems in *N. gigas*, while in *N. caribea* sp. n. the branchial ramification lacks a defined pattern. 7) *N. horsti* Monro, 1924 from northern Australia differs from *N. caribea* sp. n. by having two series of circular projections on the caruncle median lobe (Fig. 4B) instead of only one (Fig. 4C) and by the intersegmental anus position. 8) *N. andrewsi* Monro, 1924 from Christmas Island has a pigmentation pattern with crossed lines and raised longitudinal ridges and caruncle without pigmentation (Fig. 4D, G), different from *N. caribea* sp. n.

In addition, Horst (1911) suggested that *N. gardineri* Potts, 1909 (Amirante Islands) and *N. labiatus* McIntosh, 1885 (Philippine Islands) have the branchiae beginning on chaetiger 5. In Table 1, these species were omitted because the original descriptions do not provide this information. Therefore, to confirm this assertion it will be necessary to re-examine the types as part of a review the genus, with additional material from the Indo-Pacific region.

***Notopygos megalops* McIntosh, 1885, reinstated**

http://species-id.net/wiki/Notopygos_megalops

Figure 3

Notopygos megalops McIntosh, 1885: 17–19. Pl. 1, fig. 1, Pl. 2a, fig. 3, 4.

Notopygos crinita Salazar-Vallejo 1997:384–385 (*partim, non* Grube 1855).

Type material. Holotype (juvenile) [BMNH 1885.12.1.12] Bermuda, 32°07'N, 65°04'W, Sta. 36, “Challenger”, April 1873, 55 m. Broken into two parts, damaged (Fig. 1).

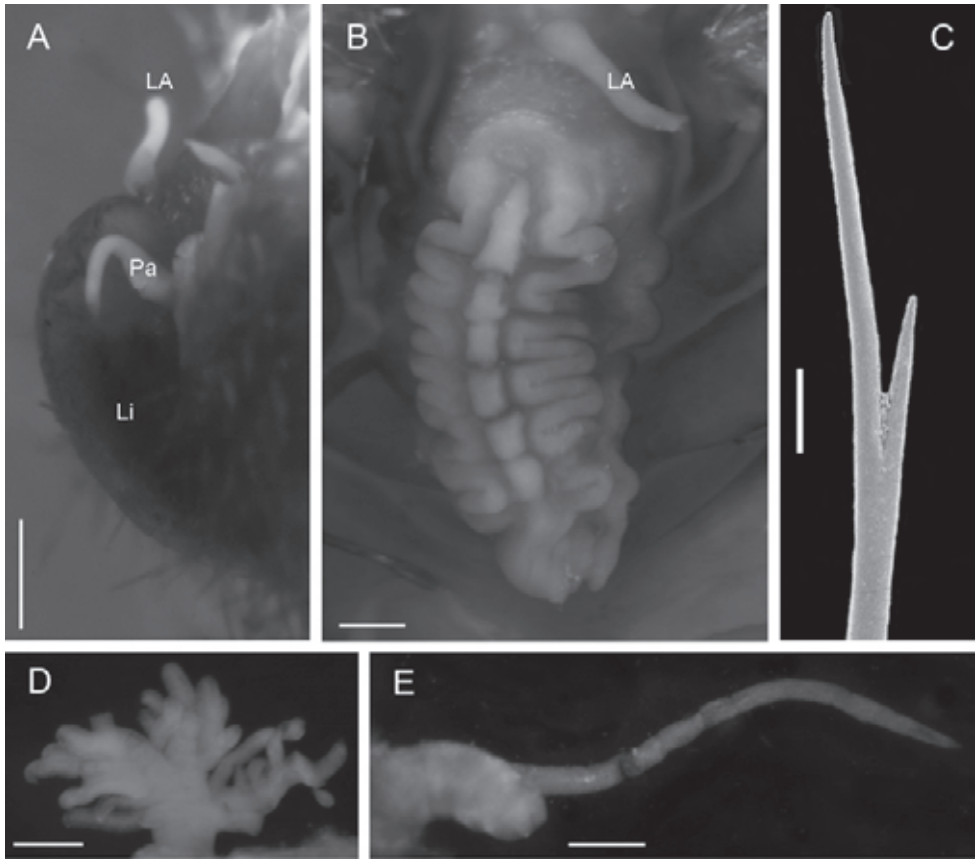


Figure 3. *Notopygos megalops* McIntosh, 1885. **A** Prostomium **B** Caruncle **C** Notochaeta from chaetiger 15 **D** Branchia chaetiger 10 **E** Main dorsal cirrus from chaetiger 15. **LA** lateral antennae **Li** lips **Pa** palps. Scale bar: **A, B, D, E**= 0.5 mm, **C**= 100 μ m.

Additional material. [UMML 22.909] Near Jamaica, 17°27'N; 78°10'W, Sta. 1256, “R/V Pillsbury”, July 1970, 590 m. [UMML 22.903] Venezuela, 10°57'N, 66°18'W, Sta. 739, “R/V Pillsbury”, July 1968, 257m, juvenile (Fig. 1).

Description. Adult specimen (UMML 22.909) complete with 23 chaetigers, damaged, gut exposed, broken, posterior end in poor condition; body fusiform; 3 cm total length, 1 cm wide in the widest part. Prostomium semicircular without pigmented areas, four eyes. Median antenna lost, in central position of prostomium, lateral antennae and palps of similar length (0.7 mm). With stain, ventral surface of buccal lips conserved the stain displaying a glandular zone (Fig. 3A). Mouth placed ventrally in chaetiger 3.

Caruncle oval (1.9 mm length, 0.8 mm wide), elevated lobe with about seven folds in the middle, a rectangular projection between each fold pair. Lateral lobes narrow, with a slightly folded edge, without pigmentation (Fig. 3B).

Branchiae from chaetiger 6, present throughout body. Each branchia as a tuft of slender branchial filaments. First branchiae with a main stem, with seven branchial

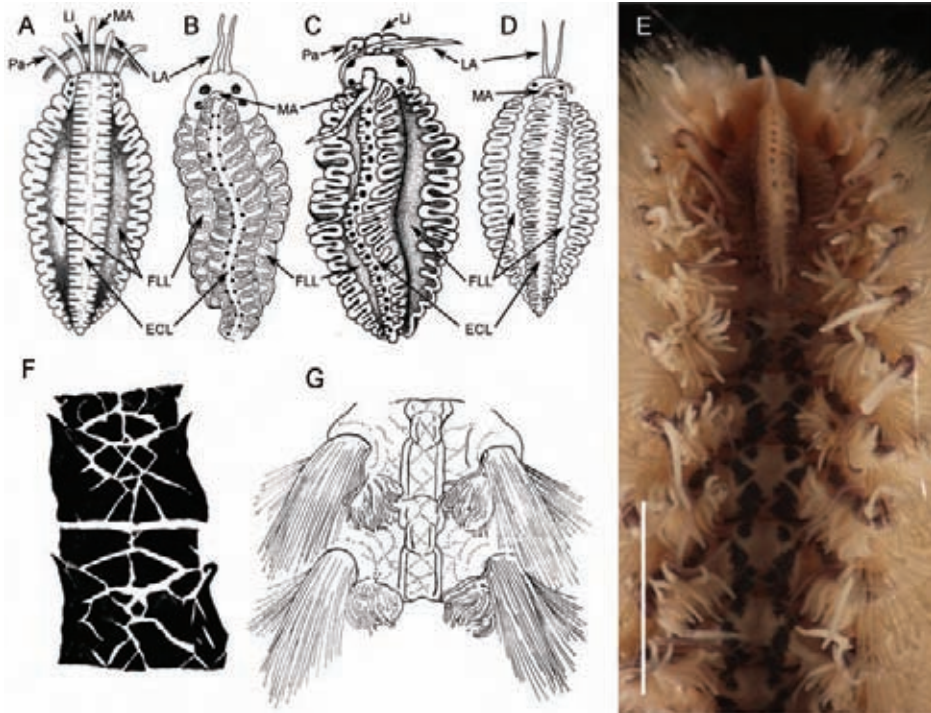


Figure 4. Caruncles and pigmentation pattern of some *Notopygos* species. **A** Caruncula of *N. variabilis* **B** Caruncula of *N. horsti* **C** Caruncula of *N. caribea* sp. n. **D** Caruncula of *N. andrewsi* **E** Caruncula and pigmentation pattern of *N. ornata* from Mexican Pacific **F** Pigmentation pattern of *N. caribea* sp. n. between chaetigers 6–7 **G** Pigmentation pattern of *N. andrewsi* anterior chaetigers. Redrawn from original descriptions: **A,B,D,G**. ECL elevated central lobe FLL flattened lateral lobe LA lateral antennae Li lips MA median antenna Pa palps. Scale bar: 3.5 mm.

filaments; in median chaetigers with a main short stem, branching in four stems with five to seven branchial filaments each (Fig. 3D).

Parapodia biramous, notopodium with double cirri and neuropodium with single ventral cirrus. Accessory cirrus simple, long (2 mm); main cirrus with robust short cirrophore (0.5 mm length) and slender and long cirrostyle (1.5–2.0 mm) in all chaetigers (Fig. 3E). Ventral cirri of similar length (1 mm) along the body, last one smallest (0.7 mm).

Chaetae in noto- and neuropodia of two sizes, short and long. All neurochaetae slender (<0.04 mm wide), long notochaetae (Fig. 3C) twice as thick as short notochaetae. All chaetae asymmetrical furcates; ratio of difference between small and large tines is similar in all chaetae, varying from three to four times.

Anus dorsal in the intersegment 18–19. Posterior end margin with pair of short distal lobes.

Gametes: Unknown.

Distribution. Greater Caribbean, 55 to 590 m.

Remarks. *Notopygos megalops* is characterized by branchiae beginning on chaetiger 6, with four main stems on median chaetigers; anus dorsal in the intersegment

18–19 and a short caruncle in comparison with other *Notopygos* species. The caruncle has a wide median lobe with seven wide folds and narrow lateral lobes. McIntosh (1885) indicated that only the cirrophore has a buff pigmentation; the material reviewed, including the holotype, lacks pigmentation, so we cannot corroborate this statement. McIntosh emphasized the serrations of neurochaetae, and the material examined enabled us to clarify that serrations are present in both noto- and neurochaetae on the first chaetigers.

The main attributes that permit us to associate the juvenile described in the original description with the adult forms are the caruncle, the position of the first branchiae, branchial branching, largest notochaeta and the stout cirrophore. McIntosh (1885:18) described the caruncle as a “usual folded structure, a little more lax than in *Chloeia*”. In *Chloeia* the lateral lobes usually are narrower than in *Notopygos*, which generally are large and flattened. The caruncle in *N. megalops* has narrow lateral lobes, and relaxed folds in the median lobe (Fig. 3B).

Hartman (1959) suggest that *N. megalops* is a synonym of *N. crinita*. Ebbs (1966) pointed out the differentiation in the details of branchial branching discussed by McIntosh (1855) to differentiate the two species; however, he considered that the differences in chaetae were only minor variations as in other amphinomids. Thus, he supported the statement by Hartman. Salazar-Vallejo (1997), despite having reviewed the holotype of *N. megalops*, followed Hartman’s opinion and regarded it as a junior synonym of *N. crinita*.

Only two species of the genus have branchiae beginning on chaetiger 6: *N. megalops* and *N. hispidus* Potts, 1909 from the Seychelles. The latter has a complex pigmentation pattern, and a well-developed caruncle with expanded lateral lobes, with about 20 folds and continuous projection between folds in the elevated lobe. In addition, the anus is on chaetiger 21. We consider that there are sufficient features to distinguish *N. megalops* from the other *Notopygos* species; thus, we regard it as a valid species.

The caruncle in juvenile specimens is not completely developed; however, the branchiae beginning on chaetiger 6 and the large size of the notochaetae permit species identification.

Amphiamerican species and DNA taxonomy: barcoding species delimitation

Amphinomid species have been reported from both the Atlantic and Pacific oceans of America; however, some misidentifications could have occurred because there is a lack of complete species descriptions, illustrated guides and identification keys. This is the case for *Notopygos ornata*: Fauchald (1977) indicated that this species occurs in warm waters in the western Atlantic and eastern Pacific. The similarity between *N. ornata* and *N. caribea* sp. n. involves the caruncle features and pigmentation pattern; in both species, the caruncle has row of circular forms in the medial keel (Fig. 4C, E) and a complex pigmentation pattern, which differs in the percentage cover and form. In ad-

dition, the beginning of the branchiae and location of the anus are other morphological differences that have not been considered before.

Eight nucleotide sequences between 618–690 bp of the section of COI gene were obtained to calculate genetic divergence (4: *N. caribea* sp. n., 3: *N. ornata* and 1: *H. carunculata*). The K2P distance between *N. caribea* sp. n. and *N. ornata* shows a genetic divergence around 11% (Fig. 5). Intraspecific genetic divergence in *N. caribea* sp. n. was around 0.8% and for *N. ornata* was 0.7%. Previous studies considered that sequences divergences among related polychaete species average from 8.4% to 21% (Jones et al. 2008, Vrijenhoek et al. 2009, Carrera-Parra and Salazar-Vallejo 2011). This result supports our morphological data in considering the two as different species: *N. ornata* with a distribution restricted to the Tropical Eastern Pacific and *N. caribea* sp. n. with a distribution throughout the Greater Caribbean basin.

Recently, a study of populations of *Eurythoe complanata* from the Caribbean, South America and Eastern Pacific has shown high levels of genetic divergence indicating three cryptic species, but the morphological evidence only recognizes one (Barroso et al. 2010). In another amphinomid genus, *Hermodice*, small differences in the general shape of the caruncle lack taxonomical relevance at species level (Yáñez-Rivera and Salazar-Vallejo 2011). However, in *Notopygos* there are enough morphological differences in the caruncle, such as lobe structure, presence/absence of circular projections, and pigmentation pattern, to distinguish species. In addition, the features of the caruncle combined with other morphological features, such as chaetae, branchial arrangement, and anus location, strongly support recognition of *Notopygos* species. The presence/absence of serrated chaetae as Potts (1909) discussed is not a relevant feature, since in all reviewed specimens this kind of chaetae is present in the first segments. One chaetal feature that must be evaluated in these amphinomids is the external cover along all chaetae; sometimes, broken at the tip of the chaetae, it looks like a small cap, as was noted and illustrated by Ebbs (1966). In addition, the fragmentation of this external cover at regular distances gives the impression of small subdistal teeth or serrations along the chaetae. Thus, morphological features should be reevaluated; all *Notopygos* species should be reviewed on the basis of type materials to obtain complete descriptions, and thereby to explain their taxonomic status and phylogenetic relationships within the genus.

The COI genetic divergence between *N. caribea* sp. n. and *N. ornata* is smaller than in another trans-isthmian amphinomids; in *Eurythoe*, the genetic divergence between Pacific and Atlantic clades was 22%; however, the divergence between the two Atlantic species was 10% (Barroso et al. 2010).

The morphological features and the sequence divergence are congruent; both show sufficient differences to distinguish the *Notopygos* species. Other polychaetes, such as in *Eunice* species, show a similar divergence value (12.9%), which has been supported by morphological features (Carrera-Parra and Salazar-Vallejo 2011). The new species described here shows how DNA barcoding can be fully integrated with the morphological approach to recognize species (Padial and de la Riva 2007) through an integrative taxonomy with different kinds of characters to delimit, discover and identify natural species (Will et al. 2005).

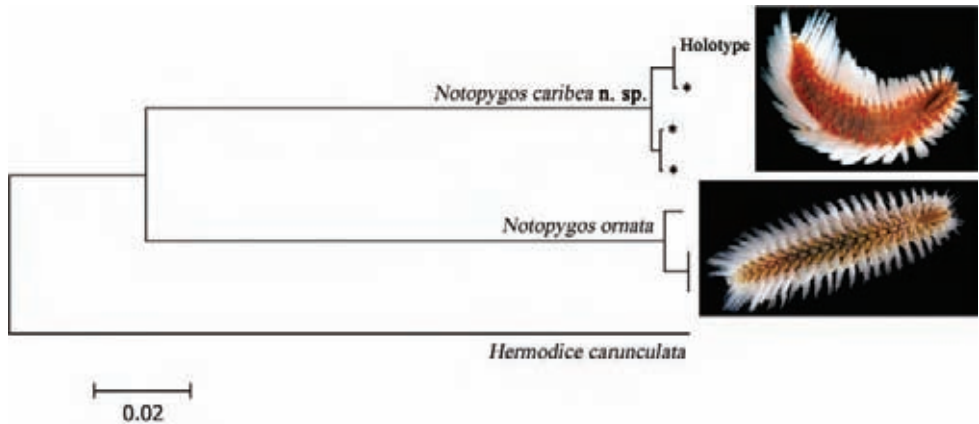


Figure 5. Neighbor-joining tree of COI sequences of two *Notopygos* species (K2P). * sequences from topotype specimens (photos: Leslie Harris).

Acknowledgments

This contribution was partially supported by CONACyT (61609) and is part of the PhD thesis of BYR (PCMyL–UNAM). Barcoding of Life Data System provided the sequences from Mexican material through Manuel Elías (ECOSUR) as part of Mexican Barcode of Life (MEXBOL). Emma Sherlock (BMNH) supplied photographs of the holotype of *N. megalops*. Nancy Voss (RSMAS–MBF) supplied the material from UMML. Leslie Harris (LACM–AHF) supplied photographs of the live specimens. Lourdes Vazquez (ECOSUR) supplied additional material from the new species. We thank Marcelo Silva (CCBAS–UAA) for SEM assistance and the librarian Clara Ramirez (ICMyL–UNAM). Nuria Méndez (ICMyL–UNAM), Sergio I. Salazar-Vallejo (ECOSUR) and two anonymous reviewers made useful recommendations to improve the manuscript. We also thank Ann Grant and Jacqueline Partridge for the revision of the English manuscript.

References

- Baird W (1870) Contributions towards a monograph of the species of *Annelides* belonging to the Amphinomacea, with a list of the known species, and a description of several new species (belonging to the group) contained in the national collection of the British Museum, to which is appended a short account of two hitherto nondescript annulose animals of a larval character. Transactions of the Linnean Society of London 10: 215–250.
- Barroso R, Klautau M, Solé-Cava AM, Paiva PC (2010) *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae), the ‘cosmopolitan’ fireworm, consists of at least three cryptic species. Marine Biology 157: 69–80. doi: 10.1007/s00227-009-1296-9
- Carrera-Parra LF, Salazar-Vallejo SI (2011) Redescriptions of *Eunice filamentosa* and *E. denticulata* and description of *E. tovarae* sp. n. (Polychaeta: Eunicidae), highlighted with morphological and molecular data. Zootaxa 2880: 51–64.

- Dean HK (2004) Marine biodiversity of Costa Rica: Class Polychaeta (Annelida). *Revista de Biología Tropical* 52: 131–181.
- Ebbs NK (1966) The coral-inhabiting polychaetes of the northern Florida reef tract. *Bulletin of Marine Science* 16: 485–555.
- Fauchald K (1977) The polychaete worms: Definitions and keys to the orders, families and genera. *Natural History Museum of Los Angeles County, Science Series* 28: 1–190.
- Grube AE (1855) Beschreibungen neuer oder wenig bekannter Anneliden. *Archiv Naturgesch.* 21: 81–136.
- Grube AE (1857) *Annulata Örstediana. Enumeratio Annulorum, quae in itinere per Indiam occidentalem et Americam centalem annis 1845–1848. Vidensk Medd Dan Natrh Foren København 1857: 44–62 (publ. 1858).*
- Hajibabaei M, DeWaard JR, Ivanova NV, Ratnasingham S, Dooh R, Kirk SL, Mackie PM, Hebert PDN (2005) Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 1959–1967. doi: 10.1098/rstb.2005.1727
- Hartman O (1959) *Catalogue of the Polychaetous Annelids of the World, Pt. 1. Allan Hancock Occasional Papers* 23: 1–353.
- Hartwich G (1993) Die Polychaeten-Typen des Zoologischen Museums in Berlin. *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum Berlin* 69: 73–154. doi: 10.1002/mmzn.19930690106
- Haswell WA (1878) On six new species of annelids, belonging to the Family Amphinomidae. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 3: 341–347.
- Horst R (1911) On the genus *Notopygos* with some new species from the Malay Archipelago collected by the Siboga-Expedition. *Notes from the Leyden Museum* 33: 241–247.
- Hutchings PA (2000) Family Amphinomidae. In: Beesley PL, Ross GJB, Glasby CJ (Eds) *Polychaetes & Allies: The Southern Synthesis Fauna of Australia 4a Polychaeta, Myzostomida, Pogonophora, Echiura, Sipuncula*. Melbourne: CSIRO Publishing. p. 107–110.
- Jones WJ, Johnson SB, Rouse GW, Vrijenhoek RC (2008) Marine worms (genus *Osedax*) colonize cow bones. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275:387–391. doi: 10.1098/rspb.2007.1437
- Kimura M (1980) A simple method of estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120. doi: 10.1007/BF01731581
- Kinberg JGH (1910) *Annulater. Kongliga Svenska Fregatten Eugenie Resa omkring jorden under befäl af C.A. Virgin aren 1851–1853*. Uppsala & Stockholm: Almqvist & Wiksells.
- Kudenov JD (1980) Annelida: Polychaeta (Bristleworms). In: Brusca RC (Ed) *Common Intertidal invertebrates of the Gulf of California*. 2nd ed. Tucson: Univ Arizona Press. 77–123.
- McIntosh WC (1885) Report on the Annelida Polychæta collected by H.M.S. Challenger during the years 1873–76. *Challenger Rep.* 12: 1–554.
- Monro CCA (1924) On the polychaeta collected by H.M.S. 'Alert', 1881–1882. Families Aphroditidae and Amphinomidae. *Journal of the Linnean Society of London, Zoology* 36: 65–77.
- Monro CCA (1933) The polychaeta errantia collected by Dr. C. Crossland at Colón, in the Panama region, and the Galapagos Islands during the expedition of the S.Y. St. George. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1933: 1–96.

- Occhipinti-Ambrogi A, Marchini A, Cantone G, Castelli A, Chimenz C, Cormaci M, Frogliola C, Furnari G, Gambi MC, Giaccone G, Giangrande A, Gravili C, Mastrototaro F, Mazzotti C, Orsi-Relini L, Piraino S (2011) Alien species along the Italian coasts: an overview. *Biological Invasions* 13: 215–237. doi: 10.1007/s10530-010-9803-y
- Padial JM, de la Riva I (2007) Integrative taxonomists will use and produce DNA barcodes. *Zootaxa* 1586: 67–68.
- Potts FA (1909) Polychaeta of the Indian Ocean, 1. The Amphinomidae. *Transactions of the Linnean Society of London* 12: 355–371. doi: 10.1111/j.1096-3642.1909.tb00147.x
- Ratnasingham S, Hebert PDN (2007) Barcoding bold: The Barcoding of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7: 355–364. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406–425.
- Salazar-Vallejo SI (1997) Anfinómidos y eufrosínidos (Polychaeta) del Caribe mexicano con claves para las especies reconocidas del Gran Caribe. *Revista de Biología Tropical* 45: 379–390.
- 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* 28: 2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121
- Treadwell AL (1901) The polychaetous annelids of Porto Rico. *Bulletin of the United States Fish Commission* 20: 181–210.
- Treadwell AL (1928) Polychaetous annelids from the Arcturus oceanographic expedition. *Zoologica* 8: 449–485.
- Vrijenhoek RC, Johnson SB, Rouse GW (2009) A remarkable diversity of bone-eating worms (Osedax; Siboglinidae; Annelida). *BMC Biology* 7: 1–13. doi: 10.1186/1741-7007-7-74
- Will WK, Mishler BD, Wheeler QD (2005) The Perils of DNA Barcoding and the Need for Integrative Taxonomy. *Systematic Biology* 54: 844–851. doi: 10.1080/10635150500354878
- Yáñez-Rivera B, Salazar-Vallejo SI (2011) Revision of *Hermodice* Kinberg, 1857 (Polychaeta: Amphinomidae). *Scientia Marina* 75: 251–262. doi: 10.3989/scimar.2011.75n2251
- Zenetos A, Gofas S, Verlaque M, Çinar ME, García-Raso E, Bianchi CN, Morri C, Azzurro E, Bilecenoglu M, Frogliola C, Siokou I, Violanti D, Sfriso A, San Martín G, Giangrande A, Katagan T, Ballesteros E, Ramos-Esplá A, Mastrototaro F, Ocaña A, Zingone A, Gambi MC, Streftaris N (2010) Alien species in the Mediterranean Sea by 2010. A contribution to the application of European Union's Marine Strategy Framework Directive (MSFD). Part I. Spatial distribution. *Mediterranean Marine Science* 11: 381–493.

Capítulo IV

Revamping Amphinomidae (Annelida: Amphinomida), with the inclusion of *Notopygos*

ELIZABETH BORDA, **BEATRIZ YÁÑEZ-RIVERA**, GABRIELA M. OCHOA,
JERRY D. KUDENOV, CARLOS SANCHEZ-ORTIZ, ANJA SCHULZE, and GREG
W. ROUSE

2015

Zoologica Scripta 44(3): 324–333.

Corresponding Authors:

Elizabeth Borda

Texas A&M University at Galveston

Beatriz Yáñez-Rivera

Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Revamping Amphinomidae (Annelida: Amphinomida), with the inclusion of *Notopygos*

ELIZABETH BORDA, BEATRIZ YÁÑEZ-RIVERA, GABRIELA M. OCHOA, JERRY D. KUDENOV,
CARLOS SANCHEZ-ORTIZ, ANJA SCHULZE & GREG W. ROUSE

Submitted: 6 August 2014
Accepted: 27 November 2014
doi:10.1111/zsc.12099

Borda, E., Yáñez-Rivera, B., Ochoa, G.M., Kudenov, J.D., Sanchez-Ortiz, C., Schulze, A., Rouse, G.W. (2015). Revamping Amphinomidae (Annelida: Amphinomida), with the inclusion of *Notopygos*. —*Zoologica Scripta*, 00, 000–000.

This study revises the taxonomic status of the formerly monotypic Archinomidae, which is nested within paraphyletic Amphinomidae according to recent phylogenetic work. We focused our taxonomic sampling to evaluate the affinities of *Notopygos* and genera classified as ‘fusiform’ in body shape, including *Archinome* and *Chloëia*. Prior to this study, the phylogenetic placement of *Notopygos* had not been evaluated. We inferred the phylogenetic relationships of *Notopygos* within Amphinomidae based on nuclear and mitochondrial markers, and cytochrome *c* oxidase subunit I genetic divergences of five *Notopygos* species, including the newly described *Notopygos kekooa* sp. n. from the Gulf of California. The phylogenetic and morphological evidence, now including *Notopygos* species, justified the establishment of two subfamilies within Amphinomidae. In accordance with ICZN Article 36 (Principle of Coordination), both subfamilies are presented as *status novus* in the nomenclature ranks.

Corresponding authors: *Elizabeth Borda*, Marine Biology Department, Texas A&M University at Galveston, Ocean and Coastal Science Building 3029, 200 Seawolf Parkway, Galveston, TX 77553, USA. E-mail: lizborda@gmail.com

Beatriz Yáñez-Rivera, Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, Unidad Académica Mazatlán, Joel Montes Camarena s/n, Mazatlán, Sinaloa 82000, México. E-mail: beyariv7@gmail.com

Elizabeth Borda, Marine Biology Department, Texas A&M University at Galveston, Ocean and Coastal Science Building 3029, 200 Seawolf Parkway, Galveston, TX, 77553, USA

Beatriz Yáñez-Rivera, Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, Unidad Académica Mazatlán, Joel Montes Camarena s/n, Mazatlán, Sinaloa, 82000, México

Gabriela M. Ochoa, Marine Biology Department, Texas A&M University at Galveston, Ocean and Coastal Science Building 3029, 200 Seawolf Parkway, Galveston, TX, 77553, USA. E-mail: g.ochoa.ft@gmail.com

Jerry D. Kudenov, Biological Sciences, University of Alaska Anchorage, 3211 Providence Drive, Anchorage, AK, 99508-4614, USA. E-mail: jdkudenov@uaa.alaska.edu

Carlos Sanchez-Ortiz, Biología Marina, Universidad Autónoma de Baja California Sur Carretera al sur km 4.5, CP, 23080, La Paz B.C.S., México. E-mail: csanchez@uabcs.mx

Anja Schulze, Marine Biology Department, Texas A&M University at Galveston, Ocean and Coastal Science Building 3029, 200 Seawolf Parkway, Galveston, TX, 77553, USA. E-mail: schulzea@tamug.edu

Greg W. Rouse, MBRD, Scripps Institution of Oceanography, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA, 92093, USA. E-mail: grouse@ucsd.edu

Introduction

Amphinomidae includes some large, charismatic coral reef-dwelling polychaetes, such as the common ‘fireworms’ *Eurythoe complanata* (Pallas, 1766) (e.g. Barroso *et al.* 2010)

and *Hermodice carunculata* (Pallas, 1766) (e.g. Ahrens *et al.* 2013). Although amphinomids are typically associated with rocky and soft bottoms of intertidal and continental shelf habitats, cryptic taxa are found in deep-sea chemosynthetic

ecosystems (Borda *et al.* 2012, 2013). Wiklund *et al.* (2008) found Archinomidae to be nested within Amphinomidae, rendering the family paraphyletic. Borda *et al.* (2012) corroborated this finding and proposed the division of Amphinomidae into ‘fusiform’ and ‘rectilinear’ clades. The former referring to spindle-shaped amphinomids (Fig. 1), such as *Archinome* and *Chloeia*, and the latter comprised of elongate taxa, including *Amphinome*, *Cryptonome*, *Eurythoe*, *Hermodice*, *Hipponoa*, *Paramphinome* and *Pareurythoe*. The phylogenetic placement of other ‘fusiform’ genera such as *Bathychloeia*, *Chloenopsis*, *Notopygos* and *Parachloeia*, for example, has not been evaluated. *Bathychloeia*, *Chloenopsis* and *Parachloeia* are monotypic and are recorded from difficult to access deep-sea benthic habitats and/or were last collected over a century ago (e.g. McIntosh 1885; Horst 1912). *Notopygos* is the most diverse, with 22 described species (Yáñez-Rivera & Carrera-Parra 2012), and is most notable for sharing morphological features with both *Archinome* and *Chloeia*, including the digitiform branchia (as in *Archinome*) and the ornate trilobed caruncle (as in *Chloeia*), (Kudenov 1991, 1995). In a continued effort to elucidate the biodiversity, systematics and phylogenetic relationships among amphinomids, we evaluated the placement of *Notopygos* within Amphinomidae, described a new species from the Gulf of California (GoC) and revised the taxonomic status of Archinomidae.

Materials and methods

Specimen collections and taxon sampling

To evaluate the placement of *Notopygos*, we included the taxonomic sampling from Borda *et al.* (2012) and expanded the sampling of ‘fusiform’ genera with the inclusion of five *Archinome* species (Borda *et al.* 2013), two *Chloeia* species and five *Notopygos* species (see also Table S1). Taxa new to this study include *Notopygos caribea* Yáñez-Rivera & Carrera-Parra, 2012 from Belize and Panama, *Notopygos ornata* Grube, 1856 from the eastern Pacific Ocean (Mexican coast) and GoC, *Notopygos mitsukurii* Izuka, 1910 from

Japan, *Notopygos* sp. from Vanuatu and *Notopygos kekooa* sp. n., described below, from the GoC (data sequence available from paratype only). See also Fig. S1 for a map showing geographic sampling in the Data S1. Amphinomidae was forced to be monophyletic relative to *Euphosine foliosa* Audouin & Milne-Edwards, 1833 and *Euphosine armadillo* Sars, 1851 (Amphinomida: Euphosinidae), which served as outgroup taxa (Wiklund *et al.* 2008; Borda *et al.* 2012). Voucher specimens were deposited in the Scripps Institution of Oceanography Benthic Invertebrates Collection, Florida Museum of Natural History Invertebrate Collection or El Colegio de la Frontera Sur. Collection localities, voucher information, sequence data sources and GenBank accession numbers (KM055006–KM055065, JX028116, JX028117, JX028119, JX028120) are listed in Table S1 (Data S1).

Morphological evaluation

Evaluation of morphological features for *Notopygos* species included maximum body width (excluding chaetae), body length (prostomium to pygidium), attributes of the branchiae and chaetal lobes. Diagnostic features of the new species were photo-documented and illustrated via line drawings of the caruncle and pigmentation pattern. Semi-permanent slides of chaetae from chaetigers 1, 3, 10 and 15 were prepared to analyse chaetal features. Cephalic terminology follows Orrhage (1990).

Molecular methods

DNA extraction, PCR amplification and sequencing protocols for nuclear 18S rDNA and 28S rDNA and mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) and 16S rDNA followed Borda *et al.* (2012, 2013). jMODELTEST 2.1.5 (Darriba *et al.* 2012) was used to infer appropriate evolutionary models for each gene [88 models: COI: TPMuf + I + G; TIM2 + I (*Notopygos* only); 16S: GTR + G; 28S: GTR + I + G; 18S: GTR + I; 24 models: COI: GTR + I + G; GTR + I (*Notopygos* only); 16S:

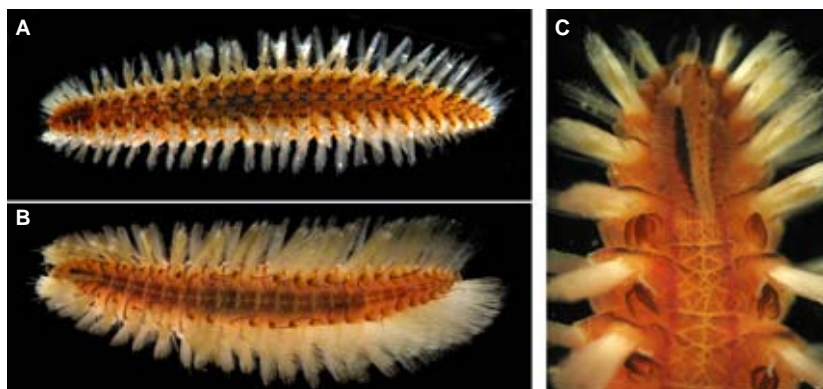


Fig. 1 *Notopygos* representatives included in this study. — (A) *Notopygos ornata*, (B) *Notopygos mitsukurii* (Japan) and (C) *Notopygos caribea* (Bocas del Toro, Panama). Image not available for *Notopygos* sp. (Vanuatu). Images provided by CSO (A), Frederik Pleijel (B) and GWR (C).

GTR + G; 28S: GTR + I + G; 18S:GTR + I] as selected by the Akaike's information criterion. DAMBE (Xia & Xie 2001) was used to estimate COI saturation via saturation plots of transitions/transversions against GTR-corrected genetic distances and using the Xia *et al.* (2003) saturation test. MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011) was used to calculate corrected TrN and uncorrected pairwise COI distances for *Notopygos* species. Phylogenetic relationships and clade support values (bootstrap, boot; posterior probabilities, pp) were estimated under the assumptions of maximum likelihood (boot) and Bayesian inference (pp) as described in Borda *et al.* (2012).

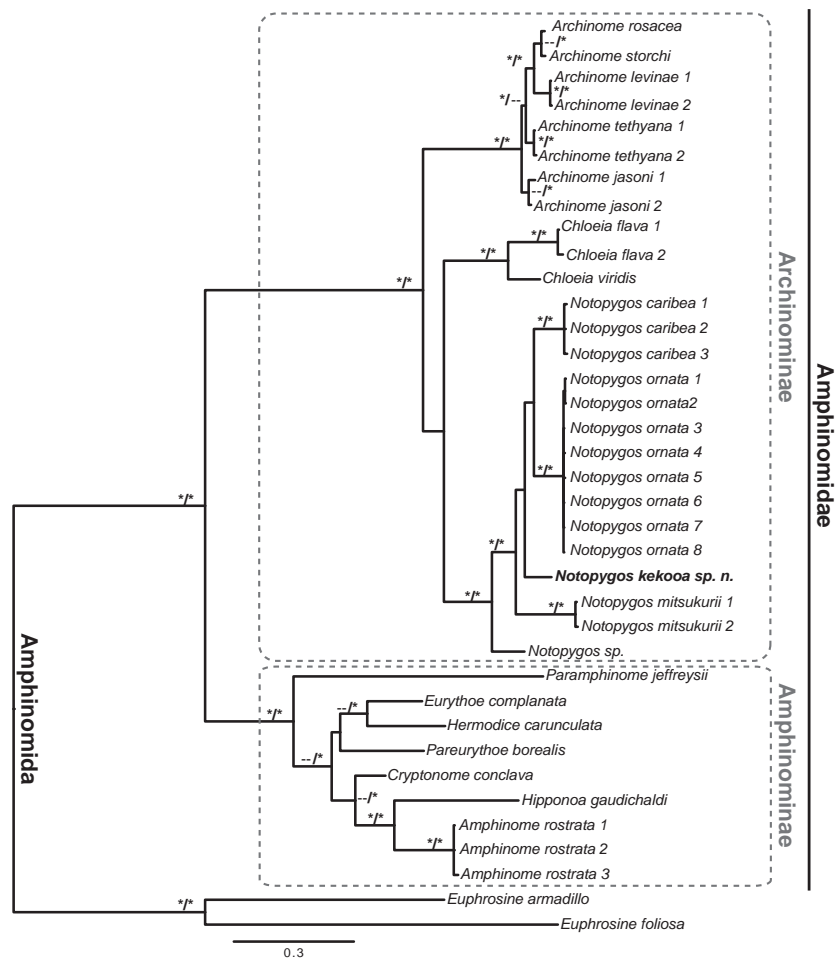
Results

Phylogenetic relationships

The relationships among 'fusiform' and 'rectilinear' taxa were re-evaluated based on COI (35 sequences; approximately 452 bp, with exclusion of 3rd codon position), 16S (37 sequences; 545 bp), 28S (37 sequences; 970 bp) and 18S (37 sequences; approximately 1736 bp) for a total of

3703 nucleotide characters (Fig. 2). Third codon positions were excluded from combined analyses due to significant transition saturation, which reach a plateau at approximately 26% corrected genetic distance (not shown). The average corrected COI pairwise distance among *Notopygos* species was 31%. *Archinome* + *Chloeia* + *Notopygos* (boot = 100; pp = 1.0) formed a clade that was highly supported as sister (boot = 100; pp = 1.0) to the 'rectilinear' clade (boot = 91; pp = 1.0). *Archinome* (boot = 100; pp = 1.0), *Chloeia* (boot = 100; pp = 1.0) and *Notopygos* (boot = 98; pp = 1.0) were each well supported as clades; however, the recovered sister relationship between *Chloeia* and *Notopygos* was poorly supported (boot < 50; pp < 0.65). Species relationships and clade topologies of *Archinome*, *Chloeia* and 'rectilinear' genera were as recovered by Borda *et al.* (2012, 2013). Inclusion of COI 3rd codon position in combined analyses recovered a similar topology as seen in Fig. 2 (not shown), except for (i) the position of *Archinome leviniae* Borda *et al.* 2013 as sister to the remaining *Archinome* species (see also Borda *et al.* 2013) and (ii) the

Fig. 2 Phylogenetic hypothesis of Amphinomidae, showing the Archinominae and Amphinominae subclades, respectively, and the placement of *Notopygos*. The BI topology shown is based on the combined analyses of cytochrome *c* oxidase subunit I (COI), 16S, 18S and 28S (COI 3rd codon position excluded). Support values at nodes were estimated from the ML bootstrap (boot) and BI posterior probabilities (pp), represented as boot/pp. *Nodes of high support, boot > 90%; boot > 0.95. Values <90% (boot) and <0.95 (pp) are not shown or indicated by “—”.



unresolved position of *N. kekooa* sp. n. as either sister to *N. ornata* (BI; pp = 0.83) or sister to *N. caribea* + *N. ornata* (ML; boot = 84).

Notopygos sp. (Vanuatu) was sister to remaining *Notopygos* representatives, while *N. mitsukurii* was sister (boot < 50; pp = 0.99) to *N. caribea* + *N. ornata* + *N. kekooa* sp. n. (boot < 50; pp < 0.80); interspecific relationships among the latter were poorly resolved. Multiple representatives (Table S1) of *N. caribea* (boot = 100; pp = 1.0) and *N. ornata* (boot = 100; pp = 1.0) clustered within their respective clades. Corrected TrN pairwise COI distances among *Notopygos* species ranged 24–40% (17–25% uncorrected; Table 1).

Systematics

Family Amphinomidae

Subfamily Archinominae Kudenov, 1991, *status novus*

Type genus. *Archinome* Kudenov, 1991

Included genera. *Archinome* Kudenov, 1991, *Chloeia* Savigny in Lamarck, 1818, *Notopygos* Grube, 1855. Provisionally included until further study: *Bathychloeia* Horst, 1912; *Chloenopsis* McIntosh, 1885, and *Parachloeia* Horst, 1912.

Diagnosis. Trilobate caruncle, with narrow and smooth lobes (Fig. 3A) or median plicate lobe with flat lateral plicate plates (Figs 3B and 4B,I). Branchiae ramified from single stem, bipinnate (Fig. 3G) or comprised of digitiform rami (Fig. 3H). Dorsal cirri with cirrophore (Fig. 3F–H). Accessory dorsal cirri, without cirrophore, present only on anterior chaetigers (Fig. 3F,G) or present on all chaetigers (Figs 1A,B and 4A). Anus position, dorsal on posterior chaetigers (Fig. 4K) or (dorso)terminal on last chaetiger (see also Borda et al. 2012).

Remarks. A fusiform body shape is seen in several amphinomid genera, although most have not been thoroughly evaluated phylogenetically, warranting further study. The accessory dorsal cirrus (Yáñez-Rivera & Carrera-Parra 2012), also referred to as dorsal cirrus (Kudenov 1991) or

(median) branchial cirrus (Horst 1912; Barroso & Paiva 2011), is lacking in Amphinominae (established below), but is present in *Bathychloeia*, *Chloenopsis* and *Parachloeia* (J. D. Kudenov, personal observation). We differentiate the accessory dorsal cirrus from the true dorsal cirrus (=lateral; Kudenov 1991, 1993, 1995) in lacking a cirrophore and the variable position relative to branchiae and notochaetal lobe. The dorsal cirrus is surrounded by notochaetae and is located on the edge of the notopodia as in other amphinomids (Fig. 3G–I). Branchiae can be bipinnate, as in *Chloeia*, or a tuft comprised of digitiform rami, as in *Archinome* and *Notopygos*. Digitiform branchial tuft arising from a single stem is also shared with members of Amphinominae. The dorsal position of the anus on posterior segments is unique to *Notopygos* and *Archinome*, while the (dorso)terminal position of the anus of *Chloeia* is shared with Amphinominae.

Based on the phylogenetic evidence (Wiklund et al. 2008; Borda et al. 2012; present study) and evaluation of key morphological features, we here establish Archinominae for the clade that includes genera with an accessory dorsal cirrus (i.e. *Archinome*, *Chloeia* and *Notopygos*), and provisionally includes other ‘fusiform’ genera, until further re-evaluation (i.e. *Bathychloeia*, *Bathynotopygos*, *Chloenopsis* and *Parachloeia*). Although fusiform body shape is consistent with members of this clade, several Amphinominae genera and their juvenile forms also exhibit ‘fusiform’ body shapes (B. Yáñez-Rivera, personal observation). Therefore, we restrict the use of body shape to genus- and species-level descriptions, unless evidence from combined genetic and morphological evaluation in future work shows that this feature is not convergent among amphinomids.

Genus *Notopygos* Grube, 1855

Type species. *Notopygos crinita* Grube, 1855

Diagnosis. Fusiform body shape. Trilobate caruncle, with plicate median lobe and flat lateral plicate plate (Fig. 4B,I). Dorsal pigmentation patterns variable. Branchial tuft arising from single stem, comprised of digitiform rami (Figs 3H and 4C). Dorsal cirri with cirrophore (Fig. 4D). Accessory dorsal cirri without cirrophore, present on all chaetigers (Fig. 4A, H). Anus position, dorsal on posterior chaetigers (Fig. 4A).

Included species. See Data S1 for complete list of *Notopygos* species (text and Fig. S1).

Notopygos kekooa sp. n. (Fig. 4)

Type material. Holotype SIO-BIC-2464, Angel de la Guarda, Baja California, Mexico, 29°33'N, 113°33'W, 06 July 2009, <5 m, rocky reefs under rocks. Paratype SIO-BIC-2274, Angel de la Guarda, Baja California, Mexico 29°33'N, 113°33'W, 06 July 2009, <5 m, rocky reefs under rocks.

Table 1 Corrected (TrN; below diagonal) and uncorrected (italics; above diagonal) pairwise genetic distances among *Notopygos* species; intraspecific TrN genetic distances (bold, italics) are found along the diagonal

	I.	II.	III.	IV.	V.
I. <i>Notopygos caribea</i>	0.008	0.184	0.207	0.197	0.195
II. <i>Notopygos kekooa</i> sp. n.	0.260	–	0.187	0.173	0.207
III. <i>Notopygos mitsukurii</i>	0.300	0.272	0.004	0.220	0.205
IV. <i>Notopygos ornata</i>	0.279	0.240	0.327	0.011	0.242
V. <i>Notopygos</i> sp. (Vanuatu)	0.285	0.304	0.300	0.395	–

Fig. 3 Morphological attributes of Amphinomidae. — (A) Narrow elongate trilobed caruncle: *Archinome levinae*, (B) trilobed caruncle with plicate plate: *Chloeia australis*, (C) heart-shaped caruncle: *Amphinome rostrata*, (D) caruncle with convergent folds: *Hermodice carunculata*, (E) caruncle: *Eurythoe complanata*, (F) parapodium from first chaetiger with accessory dorsal cirri: *Chloeia viridis*, (G) parapodium from chaetiger 10 with bipinnate branchiae: *Chloeia viridis* (note: accessory dorsal cirrus is absent from chaetiger 4); insert, bipinnate branchiae: *Chloeia pinnata*, (H) parapodium from chaetiger 10 with branchial tuft and accessory dorsal cirrus: *Notopygos ornata*, (I) parapodium from chaetiger 15 with branchial tufts and with accessory dorsal cirrus absent: *Hermodice carunculata*. Images provided by GWR (A, D, E) and BYR (B, C, F–I). ADC, accessory dorsal cirrus; Br, branchia; DC, dorsal cirrus; ML, median (plicate) lobe; PP, plicate plate; VC, ventral cirrus.



Description. *Holotype*: mature female, complete with 36 chaetigers, 6.5 cm long and 1.3 cm wide. Body fusiform, live colour pattern ranging from orange to brown with yellow–orange branchiae and dark pigmented caruncle (Fig. 4A,H). Accessory dorsal cirri and cirrophore of dorsal cirri deep violet (Fig. 4H). Complex pigmentation with trapezoidal and rhomboidal forms covering dorsum (Fig. 4H,J). Prostomium rounded with two pairs of eyes, similar size (Fig. 4B). Median antenna arising from posterior margin of prostomium (Fig. 4B,I). Paired antennae arising from anterior prostomial margin (Fig. 4B,I). All antennae equal length (1.5 mm long). Buccal lips extending from prostomium and reflect ventrally. Palps laterally directed on buccal lips, shorter than antennae (1.1 mm), damaged. Mouth ventral on chaetiger 3.

Trilobed caruncle (4 mm long, 1.8 mm wide). Median plicate lobe elevated with approximately 22 bilateral folds (Fig. 4B,I). Flat lateral plicate plates each with approximately 21 folds (Fig. 4B). Branchial tufts comprised

of digitiform rami, first appearance on chaetiger 4 (Fig. 4C,I), present to pygidium. Each branchia with short stem, branching in several digitiform filaments of variable thickness and length. First branchia with approximately 21 filaments, second branchia with approximately 50 filaments and mid-body branchiae with more than 100 filaments, decreases in number posteriorly.

Parapodia biramous, notopodia with accessory and dorsal cirri and neuropodia with single ventral cirrus. Accessory dorsal cirri, deep violet, similar length throughout body (2 ± 0.2 mm, Fig. 4H). Dorsal cirri with short deep violet cirrophores (0.5 mm long) and slender unpigmented cirrostyles (1.7 mm long) in first chaetigers, subsequent chaetigers, after 5, with longer cirrophores (1.0 mm) and cirrostyles (3.2 mm, Fig. 4D). Ventral cirri with short unpigmented cirrophores (0.2 mm long) and cirrostyles from 1.3 to 2.5 mm long. Cirrophore on second neuropodium 0.5 mm long. All chaetae asymmetrically furcate, smooth. Proportion between tines varies from 1:3 to 1:4

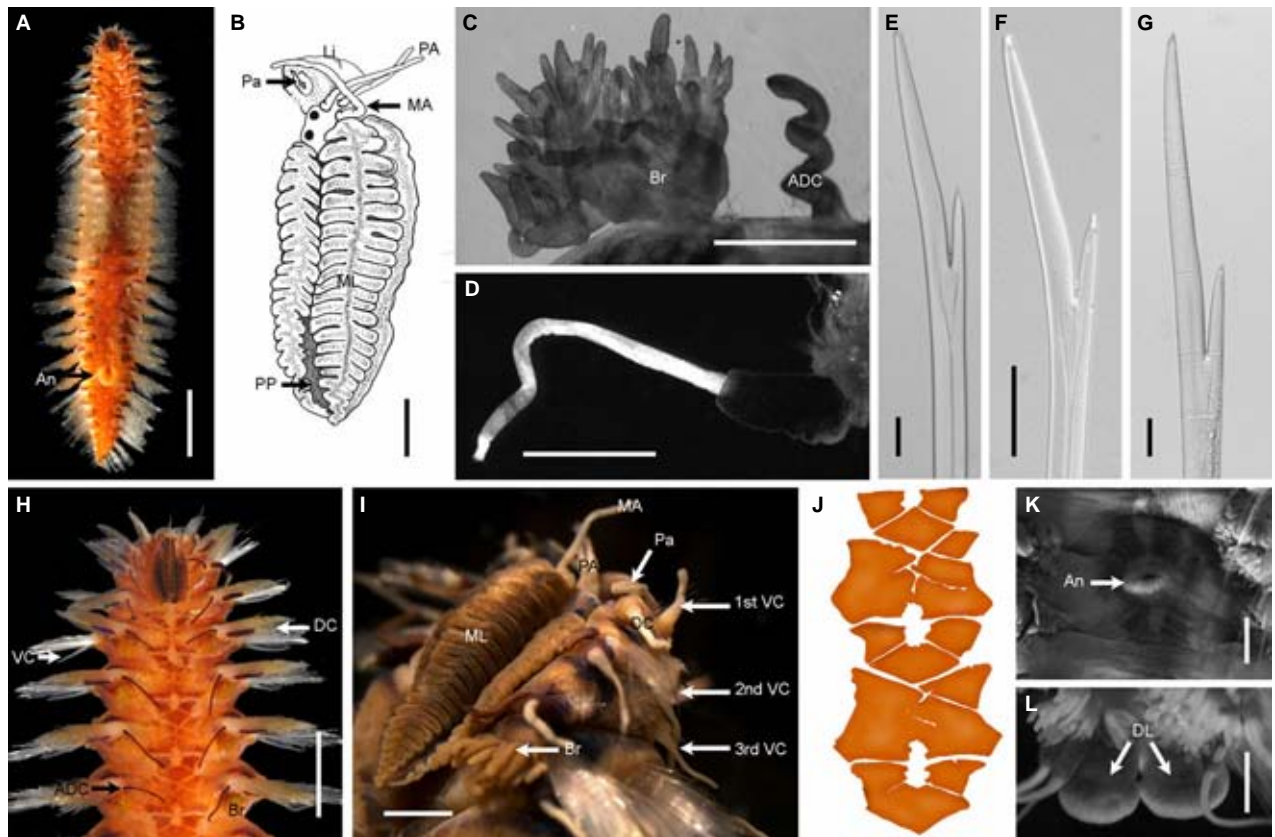


Fig. 4 *Notopygos kekooa* sp. n. — (A) Live specimen complete, dorsal view, (B) Caruncle illustration, (C) Branchiae and accessory cirrus from chaetiger 15, (D) Dorsal cirrus from chaetiger 15, (E) Notochaeta from chaetiger 3, (F) Neurochaeta from chaetiger 3, (G) Neurochaeta from chaetiger 10, (H) Anterior end of live specimen, dorsal view, (I) Anterior end lateral oblique view, (J) Pigmentation pattern, (K) Anus, dorsal view, (L) distal lobes. Scale bars: A, 1 cm; B–D; I, 1 mm; E–G, 50 μ m; H, 5 mm; K–L, 0.5 mm. Images and illustrations by BYR and GMO, CSO provided (A) and (H). ADC, accessory dorsal cirrus; An, anus; Br, branchia; DC, dorsal cirrus; DL, distal lobes (on last chaetiger); MA, median antenna; ML, median (plicate) lobe; Pa, palps; PA, paired antennae; PP, plicate plate; VC, ventral cirrus.

(Fig. 4E–G). Notochaetae from first chaetigers greater in length and width than neurochaeta, subsequently chaetae similar in size. Anus dorsal, located on chaetiger 29 (Fig. 4K). Posterior end margin with a pair of distal lobes (0.8 mm long, 0.8 mm wide; Fig. 4L).

Gametes. Gametes present within coelom, entire length of body. Oocytes 99–119 μ m in diameter (mean: 108 ± 5.5 μ m, $n = 30$).

Etymology. The specific name refers to an adjective form derived from the kiliwa word ‘kekoo’ meaning woman and refers to the holotype being a mature female. The kiliwa is an ancient language from a native community from northern Baja California (Estrada & Farlow 2004).

Distribution and abundance. Angel de la Guarda, Gulf of California, Mexico. This species appears to be rare. In two scientific expeditions in Gulf of California Islands (2009,

2010) with more than 100 dives, only two specimens were collected.

Remarks. *Notopygos kekooa* sp. n. is distinguished from other *Notopygos* species on the basis of its complex pigmentation pattern consisting of rhomboidal and trapezoidal forms (Fig. 4H,J) and also supported as distinct by the molecular data. *Notopygos kekooa* sp. n. shares the first appearance of branchiae starting on chaetiger four and an overlapping distribution within the GoC with *N. ornata* (see Table 2). In both species, the dorsal pigmentation pattern is complex, differs in the percentage cover and form. *Notopygos ornata* shows triangular and rhomboid forms in a symmetrical pattern with 50% coverage, while in *N. kekooa* sp. n., trapezoidal forms are predominant and the percentage cover is greater (80%). In addition, the former species has circular projections on the crest of the median lobe of the caruncle, similar to *N. caribea* (Fig. 1C), while the species described here lacks these projections (Fig. 4B,I).

Table 2 Traditional diagnostic characters for *Notopygos* species. *indicates characterization of anus position after the original description

Species	1st appearance of branchiae	Anus position	References
<i>N. albisetia</i>	Unspecified	22/23	Holly (1939)
<i>N. andrewsi</i>	5	24	Monro (1924)
<i>N. caribea</i>	5	23	Yáñez-Rivera & Carrera-Parra (2012)
<i>N. cirratus</i>	5	23/24	Horst (1911)
<i>N. crinita</i>	5	21*	Grube (1855), Ehlers (1887)
<i>N. flavus</i>	5	Unspecified	Haswell (1878)
<i>N. gardineri</i>	Unspecified	24	Potts (1909)
<i>N. gigas</i>	5	25	Horst (1911)
<i>N. gregoryi</i>	Unspecified	28/29	Holly (1939)
<i>N. hispidus</i>	6	21	Potts (1909)
<i>N. horsti</i>	5	22/23	Monro (1924)
<i>N. kekoa</i> sp. n.	4	29	Here
<i>N. labiatus</i>	5*	Unspecified	McIntosh (1885), Horst (1911)
<i>N. megalops</i>	6	18*	McIntosh (1885), Yáñez-Rivera & Carrera-Parra (2012)
<i>N. mitsukurii</i>	5	26	Izuka (1910)
<i>N. ornata</i>	4	24*	Grube & Ørsted in Grube (1857), Monro (1933)
<i>N. parvus</i>	3	Unspecified	Haswell (1878)
<i>N. rayneri</i>	5	22	Baird (1870)
<i>N. sibogae</i>	5	23	Horst (1911)
<i>N. splendens</i>	Unspecified	Unspecified	Kinberg (1857)
<i>N. subpragigas</i>	5	29	Uschakov & Wu (1962)
<i>N. variabilis</i>	5	22–25	Potts (1909)

The anus position on chaetiger 29 (Fig. 4A) is a feature shared with *N. subpragigas*, but they differ in the start of the branchiae (see Table 2).

Subfamily Amphinominae Savigny in Lamarck, 1818, *status novus*

Type genus. *Amphinome* Brugière, 1789

Included genera. *Amphinome* Brugière, 1789, *Cryptonome* Borda et al., 2012, *Eurythoe* Kinberg, 1957, *Hermodice* Kinberg, 1957, *Hipponoa* Audouin & Milne-Edwards, 1830, *Paraurythoe* Gustafson, 1930 and *Paramphinome* Sars, 1869. Provisionally included until further study: *Bentboscolex* Horst, 1912, *Branchamphinome* Hartman, 1967, *Linopherus* Quatrefages, 1865, and *Pherecardia* Horst, 1886.

Diagnosis. Caruncle variable (Fig. 3C–E). Branchial tuft from single or double stems (Fig. 3D), comprised of digitiform rami (Fig. 3E). Dorsal cirri and ventral cirri present. Accessory dorsal cirri absent. Anus position (dorso)terminal on last chaetiger.

Remarks. Based on the phylogenetic evidence (Wiklund et al. 2008; Borda et al. 2012; present study) and evaluation

of key morphological features (Borda et al. 2012; present study; J. D. Kudenov, personal observation), we here use the name Amphinominae for the clade that includes genera that lack the accessory dorsal cirrus. Although rectilinear body shape was characterized by Borda et al. (2012) to be associated with members of this clade, several genera, namely *Bentboscolex* and *Branchamphinome*, and juvenile stages of amphinomids exhibit ‘fusiform’ bodies (B. Yáñez-Rivera, personal observation). Therefore, we restrict the use of body shape to genus- and species-level descriptions, unless evidence from combined genetic and morphological evaluation in future work shows that the ‘rectilinear’ body shape is a fixed synapomorphy among members of this clade.

Discussion

Taxonomic status of Archinomidae and Amphinomidae

Archinomidae, and the genus *Archinome*, were established by Kudenov (1991) because *Euphrosine rosacea* Blake, 1985 (originally placed in Euphrosinidae due to the similarity in shape and form of the caruncle) exhibited a mixture of diagnostic features from both Amphinomida families, Amphinomidae and Euphrosinidae. This species was removed from Euphrosinidae due to lacking the branchial arrangements in transverse rows and lacking ringent chaetae, typical of *Euphrosine* species. *Archinome*/Archinomidae is now recognized as a lineage within Amphinomidae (Wiklund et al. 2008; Borda et al. 2012), and the inclusion of *Notopygos* species confirms their membership within the ‘fusiform’ clade as proposed by Borda et al. (2012). According to Article 36, Principle of Coordination Article (ICZN 1999), each clade can be considered a subfamily and classified as *status novus*, when any rank in the family group formed from the stem of the name of the type genus, with appropriate change of suffix, and has the same authorship and date. Therefore, we propose that Borda et al.’s (2012) ‘fusiform’ (Clade I) and ‘rectilinear’ (Clade II) clades be designated as subfamilies of Amphinomidae, Archinominae and Amphinominae, respectively (Fig. 2). The genera evaluated to date group within reciprocally monophyletic clades and are morphologically distinguished based on the presence (Archinominae) or absence (Amphinominae) of the accessory dorsal cirrus (Fig. 3F,H). We here delineate Archinominae as a clade that includes *Archinome*, *Chloeia* and *Notopygos*, and Amphinominae a clade that currently includes *Amphinome*, *Cryptonome*, *Eurythoe*, *Hermodice*, *Hipponoa*, *Paramphinome* and *Pareurythoe*. Evaluation of the morphology and phylogenetic placement of other unrepresented ‘fusiform’ (e.g. *Bathychloeia*, *Chloenopsis* and *Parachloeia*) and ‘rectilinear’ (e.g. *Linopherus* and *Pherecardia*) genera aligns with the diagnoses provided above for both subfamilies and will be addressed elsewhere.

Phylogenetic affinities of *Notopygos*

Kudenov (1991, 1995) classified *Notopygos* as part of a '*Chloeia-Notopygos* species complex' within Amphinomidae, consistent with Gustafson (1930). While the idea of a 'species complex' was, in retrospect, a vague formulation, the discovery of *Archinome* provided new insights that questioned the monophyly of Amphinomidae, based on morphology. The three genera were considered allied in part by having similarly positioned accessory dorsal cirri and branchia. *Notopygos* shares a prominent and ornamented trilobed caruncle, as in *Chloeia* (Fig. 3B), and both digitiform branchiae (Fig. 3A) and a dorsal anal position, as in *Archinome* (terminal in *Chloeia*). Only recently, a close relationship between *Chloeia* and *Archinome* was shown on the basis of molecular evidence (Wiklund *et al.* 2008; Borda *et al.* 2012), and now, the inclusion of *Notopygos* corroborates its placement within Archinominae. Although the phylogenetic hypothesis did not indicate high support for a '*Chloeia-Notopygos* species complex', it did support the monophyly of each genus and provided support for their evolutionary affinities.

Taxonomy of *Notopygos*

Little has changed since Potts (1909) discussed the limited systematic value of some diagnostic features used to distinguish *Notopygos* species. For example, the segments of the first appearance of branchiae and the position of the dorsal anus were considered traditional morphological features (Horst 1911; Yáñez-Rivera & Carrera-Parra 2012). However, at least half of the known species share the same segment of the first appearance of the branchiae in segment 5 (Table 2). Similarly, evaluation of the morphology of *Archinome*, where the position of the anus was formally considered to be diagnostic (Fiege & Bock 2009), was shown to not be a fixed feature among and within species, but rather size dependent of the specimen (Borda *et al.* 2013). Available evidence in *Notopygos* suggests that the position of the dorsal anus shows low variation (Monro 1933). Nevertheless, this feature alone may be unusable for diagnosis due to some species sharing the anus position or this information left unspecified in others (Table 2).

Poor taxonomic knowledge and the lack of a standardized taxonomy for *Notopygos* have contributed to misidentification and questionable species records, thus confounding biodiversity estimates. *Notopygos crinita*, for example, described from St. Helena Island, in the South Atlantic Ocean, is reported as widespread in the western Atlantic (Yáñez-Rivera & Carrera-Parra 2012) and documented as an invasive in the Mediterranean (Occhipinti-Ambrogi *et al.* 2011). While this species is described as lacking any dorsal pigmentation pattern (Grube 1855), the presence of an accessory dorsal cirrus was not mentioned and the first branchiae appear on chaetiger 5 (Yáñez-Rivera 2009);

species records beyond the type locality remain ambiguous for this taxon.

Morphological features, including dorsal pigmentation pattern (live and after preservation) and aspects of the caruncle, were extensively documented in this study. We consider pigmentation patterns to be an important diagnostic feature that appears to be discrete among species (e.g. Yáñez-Rivera & Carrera-Parra 2012; Figs 1 and 4H,J); however, their description can be subjective and confusing without proper illustration and/or photo documentation prior to fixation. As specimens tend to lose their pigmentation after preservation, gross morphological features that are left for diagnosis tend not to be species specific. Thus, evaluation of morphology alone for *Notopygos* is of limited value without live documentation of dorsal pigmentation patterns and the inclusion of genetic data analyses (see also Yáñez-Rivera & Carrera-Parra 2012).

Conclusions

We continue to advocate that molecular data be evaluated simultaneously with morphology for improved taxonomic diagnoses, with the incorporation of documentation of pigmentation pattern, as well as of the integration of ecological and reproductive data when possible. The use of pigmentation pattern to distinguish *Notopygos* species is supported by molecular data. The lack of a standardized taxonomy and understanding of the phylogenetic relationships of Amphinomidae have led to confusion in other amphinomid taxa, including *Amphinome* (Borda *et al.* 2012), *Chloeia* (Barroso & Paiva 2011) and *Archinome* species (Borda *et al.* 2013). We consider this study a step forward to begin shedding light on *Notopygos* and a continuing contribution towards clarifying Amphinomida systematics.

Acknowledgements

Many thanks to Fredrick Pleijel (*N. mitsukurii*) and Gustav Paulay (*Notopygos* sp., Vanuatu) for providing specimens, and special thanks to Hsiu-Chin Lin and Grant R. Galland for assisting in the collection of GoC *Notopygos*. We also thank the helpful comments and suggestions from the reviewers, which greatly improved the manuscript. Harim Cha kindly accessioned the material into the SIO-BIC. Karen Osborn and Linda Ward for their assistance in the USNM material revision (BYR). Funding for this study was provided by NSF DBI-0706856, SSB Mini-PEET and EOL Rubenstein Fellowship (EB), with additional support from UCMEXUS (GWR, CSO, EB), CONACYT PhD grant 175321 (BYR) and NSF DBI-1036186 (AS).

References

- Ahrens, J. B., Borda, E., Barroso, R., Paiva, P. C., Campbell, A. M., Wolf, A., Nuges, M. M., Rouse, G. W. & Schulze, A.

- (2013). The curious case of *Hermodice carunculata* (Annelida: Amphinomidae): evidence for genetic homogeneity throughout the Atlantic Ocean and adjacent basins. *Molecular Ecology*, 22, 2280–2291.
- Baird, W. (1870). Contributions towards a monograph of the species of Annelides belonging to the Amphinomacea, with a list of the known species, and a description of several new species (belonging to the group) contained in the national collection of the British Museum, to which is appended a short account of two hitherto nondescript annulose animals of a larval character. *Transactions of the Linnean Society of London, Series 2*, 10, 215–250.
- Barroso, R. & Paiva, P. C. (2011). A new deep-sea species of *Chloea* (Polychaeta: Amphinomidae) from southern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 91, 419–423.
- Barroso, R., Klautau, M., Solé-Cave, A. M. & Paiva, P. C. (2010). *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae), the ‘cosmopolitan’ fireworm, consists of at least three cryptic species. *Marine Biology*, 157, 69–80.
- Borda, E., Kudenov, J. D., Beinhold, C. & Rouse, G. W. (2012). Towards a revised Amphinomidae (Annelida: Amphinomida): description and affinities of a new genus and species from the Nile Deep-sea Fan, Mediterranean Sea. *Zoologica Scripta*, 41, 307–325.
- Borda, E., Kudenov, J. D., Chevaldonné, P., Blake, J. A., Desbruyères, D., Fabri, M. C., Hourdez, S., Pleijel, F., Shank, T. M., Wilson, N. G., Schulze, A. & Rouse, G. W. (2013). Cryptic species of *Archinome* (Annelida: Amphinomida) from vents and seeps. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 280, 20131876.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9, 772.
- Ehlers, E. (1887). Report on the Annelids 31. Reports on the results of dredging, under the direction of L.F. Pourtalès, during the years 1868–1870, and of Alexander Agassiz, in the Gulf of Mexico, and in the Caribbean Sea, in the United States coast survey steamer “Blake”. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College*, 15, 1–335.
- Estrada, A. & Farldow, L. (2004). *Diccionario práctico de la lengua kiliwa*. XVIII Ayuntamiento de Ensenada, CDI. http://www.cdi.gob.mx/dmdocuments/diccionario_kiliwa.pdf
- Fiege, D. & Bock, G. (2009). A new species of *Archinome* (Polychaeta: Archinomidae) from hydrothermal vents on the Pacific-Antarctic Ridge 37°S. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89, 689–696.
- Grube, A. E. (1855). Beschreibungen neuer oder wenig bekannter Anneliden. *Archiv für Naturgeschichte*, 21, 81–136.
- Grube, A. E. (1857). Annulata Örstediana. Enumeratio annulorum, quae in itinere per indiam occidentalem et Americam centralem annis 1845–1848 suscepto legit cl. A.S. Örsted, adjectis speciebus nonnullis a cl. H. Krøyer in itinere Americam meridionalem collectis. *Videnskabelige Meddelelser fra Dansk naturhistorisk Forening i København*, 1857, 44–62.
- Gustafson, G. (1930). Anatomische studien über die polychätenfamilien Amphinomidae und Euprosynidae. *Zoologiska bidrag från Uppsala*, 12, 305–471.
- Haswell, W. A. (1878). On six new species of annelids, belonging to the Family Amphinomidae. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, 3, 341–347.
- Holly, M. (1939). Ueber zwei neue Arten der Amphinomidae-Gattung *Notopygos*. *Zoologischer Anzeiger*, 126, 265–268.
- Horst, R. (1911). On the genus *Notopygos*, with some new species from the Malay Archipelago collected by the Siboga-Expedition. *Notes from the Leyden Museum*, 33, 241–247.
- Horst, R. (1912). Polychaeta errantia of the Siboga Expedition. Part 1, Amphinomidae. *Siboga-Expeditie Uitkomsten op Zoologisch, Botanisch, Oceanographisch en Geologisch gebied verzameld in Nederlandsch Oost-Indië 1899–1900*, 24a, 1–43.
- International Commission on Zoological Nomenclature. (1999). *International Code of Zoological Nomenclature*. London, UK: International Trust for Zoological Nomenclature.
- Izuka, A. (1910). [On *Notopygos mitsukurii*, a new species of the Amphinomidae]. *Zoological Magazine (Dobutsugaku zasshi)*, Tokyo, 22, 45–47.
- Kinberg, J. G. H. (1857). Nya släkten och arter af annelider. *Öfversigt af Königlich Vetenskaps-Akademiens Förhandlingar, Stockholm*, 14, 11–14.
- Kudenov, J. D. (1991). A new family and genus of the order Amphinomida (Polychaeta) from Galapagos hydrothermal vents. In M. E. Petersen & J. B. Kirkegaard (Eds) *Proceedings of the 2nd International Polychaeta Conference, Copenhagen, 1986. Systematics, Biology and Morphology of World Polychaeta* (pp. 111–120). *Ophelia Supplement 5*, 111–120.
- Kudenov, J. D. (1993). Amphinomidae and Euprosinidae (Annelida: Polychaeta) principally from Antarctica, the Southern Ocean, and subantarctic regions. *Antarctic Research Series, Biology of the Antarctic Seas XXII*, 58, 93–150.
- Kudenov, J. D. (1995). Family Amphinomidae Lamarck, 1818. In J. A. Blake, B. Hilbig & P. H. Scott (Eds) *Taxonomic Atlas of the Benthic Fauna of the Santa Maria Basin and Western Santa Barbara Channel*, Vol. 4–7 (pp. 207–215). Santa Barbara: Santa Barbara Museum of Natural History.
- McIntosh, W. C. (1885). Report on the Annelida Polychaeta collected by H.M.S. Challenger during the years 1873–76. Report on the Scientific Results of the Voyage of H.M.S. Challenger, 1873–1876. *Zoology*, 12, 1–554.
- Monro, C. C. A. (1924). On the polychaeta collected by H.M.S. ‘Alert’, 1881–1882. Families Aphroditidae and Amphinomidae. *Zoological Journal of the Linnean Society, London*, 36, 65–77.
- Monro, C. C. A. (1933). The polychaeta errantia collected by Dr. C. Crossland at Colón, in the Panama region, and the Galapagos Islands during the expedition of the S.Y. St. George. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 1933, 1–96.
- Occhipinti-Ambrogi, A., Marchini, A., Cantone, G., Castelli, A., Chimenz, C., Cormaci, M., Frogli, C., Furnari, G., Gambi, M. C., Giaccone, G., Giangandre, A., Gravili, C., Mastrototaro, F., Mazziotti, C., Orsi-Relini, L. & Piraino, S. (2011). Alien species along the Italian coasts: an overview. *Biological Invasions*, 13, 215–237.
- Orrhage, L. (1990). On the microanatomy of the supraoesophageal ganglion of some amphinomids (Polychaeta Errantia), with further discussion of the innervation and homologues of the polychaete palps. *Acta Zoologica*, 71, 45–59.
- Potts, F. A. (1909). Polychaeta of the Indian Ocean. Pt. 1. Amphinomidae. *Transactions of the Linnean Society of London, Series 2*, 12, 355–371.
- 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*, 28, 2731–2739.
- Uschakov, P. V. & Wu, B. L. (1962). [Studies on the polychaeta from the Yellow Sea. 4. The polychaetous annelids of the families Syllidae, Hesionidae, Pilargidae, Amphinomidae and Eunicidae from the Yellow Seas]. *Studia Marina Sinica*, 1, 57–88 (in Chinese and Russian).
- Wiklund, H., Nygren, A., Pleijel, F. & Sundberg, P. (2008). The phylogenetic relationships between Amphinomidae, Archinomidae and Euphrosinidae (Amphinomida: Aciculata: Polychaeta), inferred from molecular data. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88, 509–513.
- Xia, X. & Xie, Z. (2001). DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92, 371–373.
- Xia, X., Xie, Z., Salemi, M., Chen, L. & Wang, Y. (2003). An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26, 1–7.
- Yáñez-Rivera, B. (2009). Familia Amphinomidae Savigny in Lamarck, 1818. In J. A. de León-González, J. R. Bastida-Zavala, L. F. Carrera-Parra, M. E. García-Garza, A. Peña-Rivera, S. I. Salazar-Vallejo & V. Solís-Weiss (Eds) *Poliquetos (Annelida: Polychaeta) de México y América Tropical* (pp. 77–87). Monterrey, Mexico: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Yáñez-Rivera, B. & Carrera-Parra, L. F. (2012). Reestablishment of *Notopygos megalops* McIntosh, description of *N. caribea* n. sp. from the Greater Caribbean and barcoding of “amphiamerican” *Notopygos* species (Annelida, Amphinomidae). *ZooKeys*, 223, 69–84.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Type localities of *Notopygos* species (red symbols), and collection localities of *Notopygos* specimens included in this study (black symbols).

Table S1. Taxa and new sequences included in this study, with collection locality or sequence source, voucher information and GenBank accession numbers.

Data S1. Results.

Electronic Supplementary Material:

Revamping Amphinomidae (Annelida: Amphinomida), with the inclusion of *Notopygos*.

ELIZABETH BORDA, BEATRIZ YÁÑEZ-RIVERA, GABRIELA M. OCHOA, JERRY D. KUDENOV, CARLOS SANCHEZ-ORTIZ, ANJA SCHULZE, and GREG W. ROUSE

Corresponding Authors: lizborda@gmail.com; beyariv7@gmail.com

PDF includes:

Results: Systematics (*Notopygos* species list)

Results: Provisional Key to Amphinomidae genera

Figure S1

Table S1

RESULTS

Systematics

FAMILY Amphinomidae

SUBFAMILY Archinominae Kudenov, 1991, *status novus*

GENUS Notopygos Grube, 1855

Type species: Notopygos crinita Grube, 1855

Included species (letter indicates type locality in Fig. S1):

Notopygos albiseta Holly, 1939; type locality: Hawaii (A)

Notopygos andrewsi Monro, 1924; type locality: Christmas Island (B)

Notopygos caribea Yáñez-Rivera & Carrera-Parra, 2012; type locality: Quintana Roo, México (C)

Notopygos cirratus Horst, 1911; type locality: Malay Archipelago (D)

Notopygos crinita Grube, 1855; type locality: St Helena (E)

Notopygos flavus Haswell, 1878; type locality: Darnley (Erub) Island, Australia (F)
Notopygos gardineri Potts, 1909; type locality: Amirante Islands (G)
Notopygos gigas Horst, 1911; type locality: Timor (Malay Archipelago) (H)
Notopygos gregoryi Holly, 1939; type locality: Hawaii (I)
Notopygos hispida Potts, 1909; type locality: Amirante Islands (J)
Notopygos horsti Monro, 1924; type locality: Northern Australia (K)
Notopygos kekooa sp. n., designated below; type locality: Isla Angel de la Guarda, Gulf of California (L)
Notopygos labiatus McIntosh, 1885; type locality: Philippines (M)
Notopygos megalops McIntosh, 1885; type locality: Bermuda (N)
Notopygos mitsukurii Izuka, 1910; type locality: Okinawa, Japan (O)
Notopygos ornata Grube & Ørsted in Grube, 1857; type locality: Punta Arenas, Costa Rica (P)
Notopygos parvus Haswell, 1878; type locality: Tacking Point, Australia (Q)
Notopygos rayneri (Baird, 1870); type locality: Northern Australia (R)
Notopygos sibogae Horst, 1911; type locality: Malay Archipelago (S)
Notopygos splendens (Kinberg, 1857); type locality: Tahiti (T)
Notopygos subpragigas Uschakov & Wu, 1962; type locality: China (U)
Notopygos variabilis Potts, 1909; type locality: Maldives (V)

The species below are here considered non-valid, after material type revision (USNM-18954) and for being a homonym of Potts's (1909) species.

Notopygos hispida Hoagland, 1928; Type locality: Philippines

The following subspecies is here considered questionable, pending examination of type material.

?*Notopygos hispidus serratus* Fauvel, 1917; Type locality: Gulf St Vincent, Australia

Provisional key to Amphinomidae genera

Only phylogenetically evaluated genera are considered here.

- 1 Trilobate caruncle; accessory dorsal cirrus present at least on anterior chaetigers Archinominae ... 2
 - Caruncle variable; accessory dorsal cirrus absent Amphinominae ... 4
- 2 Caruncle, smooth, narrow elongate; midventral muscular scutes present; dorsal pigmentation pattern absent *Archinome*
 - Caruncle, with median plicate lobe and flat plicate bilateral plates; midventral muscular scutes absent; dorsal pigmentation patterns variable 3
- 3 Bipinnate branchia present; accessory dorsal cirrus present on anterior chaetigers only; anus position (dorso)terminal on last chaetiger *Chloeia*
 - Digitiform branchia present; accessory dorsal cirrus present on all chaetigers; anus position dorsal on posterior chaetigers *Notopygos*
- 4 Median ciliated nuchal organ present; caruncle absent; neuropodia arising from ventral body surfaces; neurochaetae hooks *Hipponoa*
 - Nuchal organ as ciliated bands in the caruncle; caruncle variably developed; neuropodia arising from lateral body surfaces; neurochaetae hooks absent 5
- 5 Caruncle small and inconspicuous, not extending beyond 2 external chaetiger posteriorly ... 6
 - Caruncle large and conspicuous, extending beyond 3 external chaetigers posteriorly 9
- 6 Caruncle stalked, broadly triangular to heart-shape with free lateral wings; neurochaetae unidentate *Amphinome*
 - Caruncle sessile, low-lying ridge without free lateral wings; neurochaeta several types 7
- 7 Stout, distally curved hooks present in notopodia of chaetiger 1; caruncle having three superficial longitudinal ridges *Paramphinome*
 - Stout, distally curved hooks not present; caruncle smooth without superficial ridges 8
- 8 Caruncle rounded, lobe completely fused to dorsum; xylophile habits *Cryptonome*
 - Caruncle narrow, sinusoidal; habits variable substrate, no woods *Pareurythoe*
- 9 Caruncle wider than large without a median lobe, with paired lateral lobes forming a complex monopodial-like pattern of bipinnate chevrons opening anteriorly *Hermodice*

- Caruncle larger than wide with a smooth median lobe, pronounced, overlapping lateral lobes, folded lateral lobes *Eurythoe*

Figure S1. Type localities of *Notopygos* species (red symbols), and collection localities of *Notopygos* specimens included in this study (black symbols). Letters refer to the type localities described in the *Systematics* section (i.e., *Notopygos*).

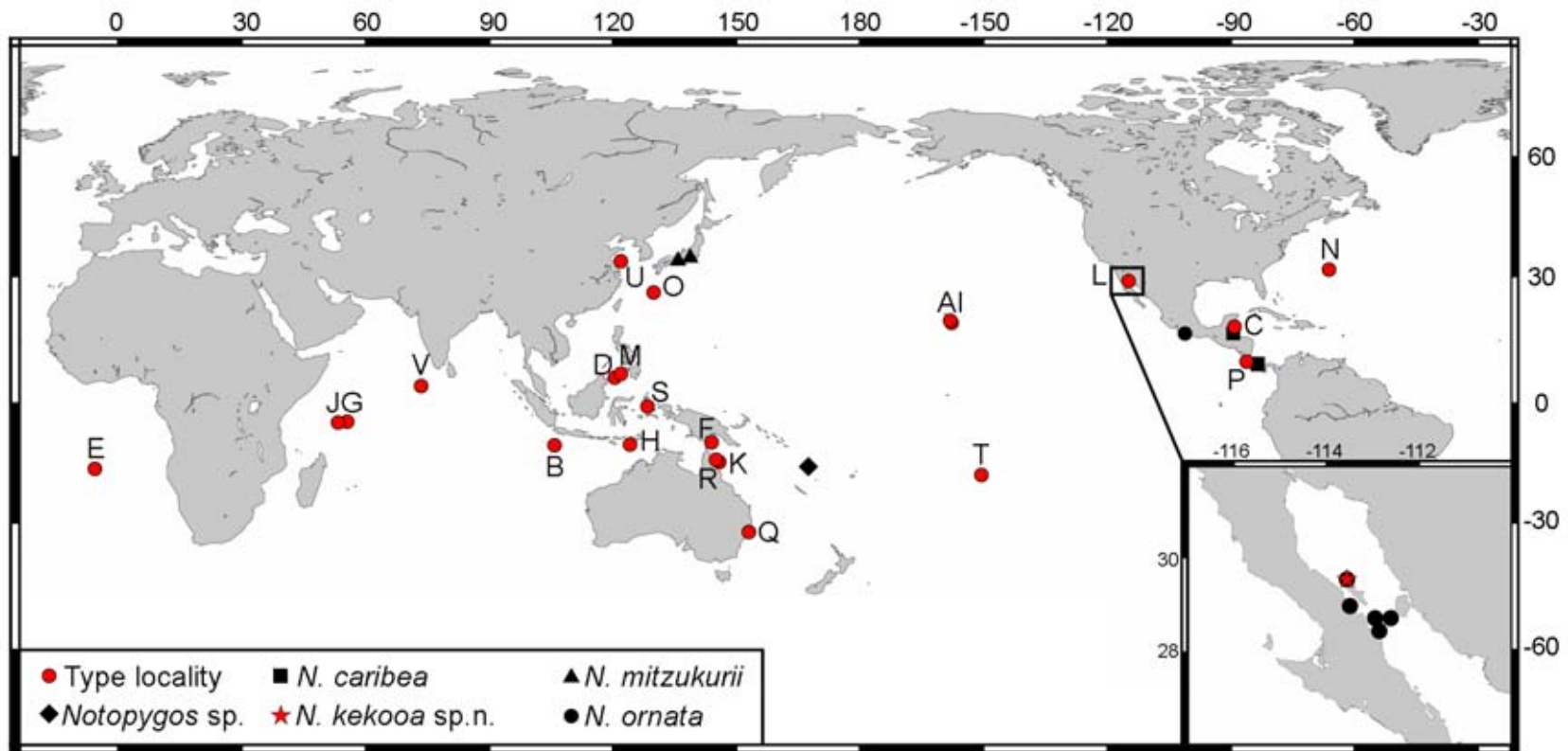


Table S1. Taxa and new sequences included in this study, with collection locality or sequence source, voucher information and GenBank accession numbers. Sources for Genbank data from previous work: ¹28S, COI and 16S from Borda et al. 2013; ²Borda et al. 2012; ³Wiklund et al. 2008; ⁴ Struck et al. 2006; ⁵Norlinder et al. 2012.

Taxon	Collection Locality / Source	18S	28S	COI	16S	Voucher
<i>Amphinome rostrata</i>	Australia ²	JN086534	JN086524	JN086544	JN086560	SIO-BICA2385
<i>Amphinome rostrata</i>	Mariana Islands ²	JN223396	JN223400	JN223394	JN223398	UF_Annelida427
<i>Amphinome rostrata</i>	Mexico ²	JN223397	JN223401	JN223395	JN223399	ECOSUR-OH-P0382
<i>Archinome jasoni</i> 1	Lau Basin ¹	KM055050	JX028131	JX028092	JX028027	SIO-BIC A2375
<i>Archinome jasoni</i> 2	Central Indian Ridge ¹	KM055051	JX028136	JX028104	JX028039	SIO-BIC A2315
<i>Archinome levinae</i> 1	Costa Rica Margin ¹	KM055048	JX028127	JX028077	JX028012	SIO-BIC A1482
<i>Archinome levinae</i> 2	Guaymas Basin ¹	JX028117	JX028123	JX028063	JX027998	SIO-BIC A2309
<i>Archinome rosacea</i>	Galapagos Rift ¹	JX028116	JX028121	JX028058	JX027993	WHOI 4115-3-2
<i>Archinome storchi</i>	East Pacific Rise ¹	JN086533	JN086523	JN086543	JN086552	SIO-BICA2389
<i>Archinome tethyana</i> 1	Mid Atlantic Ridge ¹	JX028119	JX028139	JX028113	JX028054	SIO-BIC A2873
<i>Archinome tethyana</i> 2	Mid Atlantic Ridge ¹	KM055049	JX028140	JX028114	JX028055	SIO-BIC A2874
<i>Chloeia flava</i>	Japan ²	JN086536	JN086526	--	JN086554	--
<i>Chloeia flava</i>	Japan ^{3,5}	EF076780	EF076781	JN852944	JN852917	SMNH95025
<i>Chloeia viridis</i>	Florida, USA ²	JN086537	JN086527	JN086546	JN086555	UF_Annelida478
<i>Cryptonome conclava</i>	Nile Deep Sea Fan, Egypt ²	JN086535	JN086525	JN086545	JN086553	SIO-BICA2383
<i>Eurythoe complanata</i>	Bocas del Toro, Panama ²	JN086539	JN086529	JN086548	JN086557	SIO-BICA2380
<i>Hermodice carunculata</i>	Carrie Bow Cay, Belize ²	JN086540	JN086530	JN086549	JN086558	SIO-BICA2382
<i>Hipponoa gaudichaudi</i>	San Diego, CA, USA ²	JN086542	JN086532	JN086551	JN086561	SIO-BICA2384
<i>Notopygos caribea</i> 1	Carrie Bow Cay, Belize	KM055052	KM055020	KM055006	KM055034	--
<i>Notopygos caribea</i> 2	Bocas del Toro, Panama	KM055064	KM055032	KM055018	KM055046	--
<i>Notopygos caribea</i> 3	Bocas del Toro, Panama	KM055065	KM055033	KM055019	KM055047	--
<i>Notopygos kekoa</i> sp. n.	Gulf of California 220	KM055055	KM055023	KM055009	KM055037	SIO-BIC A2274
<i>Notopygos mitsukurii</i> 1	Shirahama, Japan	KM055053	KM055021	KM055007	KM055035	SIO-BIC A2462
<i>Notopygos mitsukurii</i> 2	Cape Koganezaki, Japan	KM055054	KM055022	KM055008	KM055036	SIO-BIC A2463
<i>Notopygos ornata</i> 1	San Esteban, Gulf of California	KM055056	KM055024	KM055010	KM055038	SIO-BIC A5399
<i>Notopygos ornata</i> 2	San Francisquito, Gulf of California	KM055060	KM055028	KM055014	KM055042	SIO-BIC A5403
<i>Notopygos ornata</i> 3	Angel de la Guarda, Gulf of California	KM055057	KM055025	KM055011	KM055039	SIO-BIC A5400
<i>Notopygos ornata</i> 4	Bahia de Los Angeles, Gulf of California	KM055058	KM055026	KM055012	KM055040	SIO-BIC A5401
<i>Notopygos ornata</i> 5	San Lorenzo, Gulf of California	KM055059	KM055027	KM055013	KM055041	SIO-BIC A5402
<i>Notopygos ornata</i> 6	Guerero, Mexico	KM055061	KM055029	KM055015	KM055043	ECOSUR-OH-P0221
<i>Notopygos ornata</i> 7	Guerero, Mexico	KM055062	KM055030	KM055016	KM055044	ECOSUR-OH-P0222
<i>Notopygos ornata</i> 8	Guerrero, Mexico	JX028120	JX028141	JX028115	JX028056	ECOSUR-OH-P0223

<i>Notopygos</i> sp.	Vanuatu	KM055063	KM055031	KM055017	KM055045	UF_Annelida399
<i>Paramphinome jeffreysii</i>	Unknown ⁴	AY838856	AY838865	AY838875	AY838840	--
<i>Pareurythoe borealis</i>	Trondheimsfjord, Norway ²	JN086541	JN086531	JN086550	JN086559	SIO-BICA2379
OUTGROUP						
<i>Euphrosine armadillo</i>	Trondheimsfjord, Norway ³	EF076782	EF076783	--	--	SMNH95017
<i>Euphrosine foliosa</i>	Banyuls, France ²	JN086538	JN086528	JN086547	JN086556	SIO-BICA2381

Capítulo V

Evaluación de *Eurythoe complanata mexicana* Berkeley & Berkeley 1960

Introducción

A nivel mundial, existen más de 20 especies nominales en el género *Eurythoe*, sin embargo la mayoría de los registros corresponden a *E. complanata* (Pallas 1766), descrita para la isla de Antigua, pero con supuesta distribución pantropical (Kudenov, 1975; Salazar-Vallejo, 1997; Dean, 2004; Dean *et al.*, 2012). Recientemente, se han reconocido al menos tres especies con métodos moleculares: dos con distribución simpátrica en el Caribe y una limitada al Pacífico (Barroso *et al.*, 2010). La idea generalizada de su distribución pantropical fue aceptada, considerando que los gusanos de fuego presentan una larva pelágica rostraria de amplia duración (Pleijel, 2001) y que en especial *Eurythoe* presenta una combinación de estrategias sexual y asexual (Kudenov, 1974; Cap. VII). No obstante, la estrategia reproductiva y la larva de larga duración como tales no permiten explicar la amplia distribución de esta especie, ya que se ha demostrado con modelaje y estudios genéticos que la dispersión larval de algunos invertebrados bentónicos opera a escalas geográficas menores, con un máximo estimado de 100 km (Levin, 2006).

La contribución de Barroso *et al.* (2010) sugirió restablecer dos especies que se habían considerado sinónimos menores de *E. complanata* por Hartman (1948, 1959) y Ebbs (1966), respectivamente: en el Atlántico: la especie *E. laevisetis* Fauvel 1914, descrita para la isla de Saint-Thomas y en el Pacífico *E. armata* (Kinberg 1867) descrita para Panamá. Aparentemente, *E. laevisetis* presenta una distribución restringida a las islas en el Atlántico tropical y puede distinguirse de *E. complanata*, que habita tanto en las costas como en las islas, porque carece de las setas tipo arpón presentes en prácticamente todas las especies del género (Fauvel, 1914). Por otro lado, entre *E. armata* y *E. complanata* Barroso *et al.* (2010) no encontraron diferenciación morfológica, aunque no revisaron el material tipo pero con los resultados moleculares consideraron que *E. complanata* es un complejo de especies crípticas. Es factible que entre estas especies existan diferencias conductuales que involucran diversas señales

químicas o, incluso, morfológicas, pero en diferentes estadios de desarrollo. Ya que en los complejos de especies las diferencias morfológicas resultan prácticamente imperceptibles, las formas simpátricas regularmente presentan claras diferencias en la historia de vida y en su ecología (Knowlton, 2000). Cabe destacar que no hay un límite definido entre las especies crípticas y pseudo-crípticas, ya que, en ocasiones, las diferencias son tan sutiles que sólo se identifican después de la incorporación de datos moleculares (Knowlton, 1993; Nygren, 2014). Básicamente, se consideran especies crípticas cuando diferentes linajes evolutivos son indistinguibles morfológicamente entre sí; mientras que en las especies pseudo-crípticas, después de una detallada comparación morfológica, se logran identificar caracteres clave para su identificación (Knowlton, 1993; Sáez y Lozano, 2005).

En México, los registros del género corresponden a *E. complanata* sensu lato y a *E. complanata mexicana* Berkeley & Berkeley 1960 (Hartman, 1940; Kudenov, 1975; Salazar-Vallejo, 1997; Yáñez-Rivera, 2009). La subespecie *E. complanata mexicana* se puede distinguir morfológicamente por la presencia de una seta distalmente ensanchada en lugar de la seta en forma de espina (Berkeley y Berkeley, 1939, 1960). Se considera como subespecie valida de acuerdo al art. 45.6.4, del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, porque fue publicada antes de 1961 (ICNZ, 1999). Kudenov (1974) sugirió que la seta distalmente ensanchada puede estar ligada a los procesos de regeneración porque no la observó en todos los ejemplares; sin embargo, en los estudios que analizaron el proceso de regeneración en *Eurythoe* no se halló este tipo de seta por lo que no sería necesariamente una anomalía (Müller *et al.*, 2003; Yáñez-Rivera y Méndez, 2014, Cap. VI). Las variaciones en las setas registradas por Barroso *et al.* (2010) tampoco documentaron este tipo de seta, por lo que su evaluación es pertinente. Gustafson (1930) indicó que los diferentes tipos de setas en el género muestran un arreglo espacial particular en el haz de setas, consideración que no se ha tomado en cuenta en la clasificación de las especies de *Eurythoe*. Este sería un aspecto importante ya que la delimitación morfológica en estos anélidos tiene algunos problemas particulares: por su gran musculatura, la región anterior se contrae y los atributos pueden ser alterados durante la fijación, además, presentan variaciones relacionadas con el tamaño y procesos de regeneración, y carecen de mandíbulas (Barroso *et al.*, 2010; Yáñez-Rivera y Salazar-Vallejo, 2011; Ahrens *et al.*, 2013). Por su naturaleza calcárea,

las setas sufren erosión y las variaciones sutiles no deberían considerarse diagnósticas (Poots, 1909; Fauvel, 1923; Day, 1967). Por ello, la incorporación de atributos moleculares puede ser relevante para distinguir las especies de anélidos cambiando de una sola especie nominal a varios taxones (Vogler *et al.*, 2008; Nygren y Pleijel, 2011; Nygren, 2014).

El objetivo de este trabajo es evaluar si la subespecie *E. complanata mexicana* presenta una diferenciación morfológica y divergencia genética suficientes para reconocerla como especie y determinar si las especies en México corresponden a alguno de los tres taxones identificados por Barroso *et al.* (2010): *E. complanata*, *E. laevisetis* y *E. armata*; o bien, a otros taxones aún no identificados dentro del complejo de *Eurythoe*.

Método

Se revisó material de las siguientes colecciones en el país: Colección de Referencia de Invertebrados del ICML, Unidad Académica Mazatlán, Mazatlán (EMU), Colección de Referencia de El Colegio de la Frontera Sur, Chetumal (ECOSUR), además de la colección del The National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington (USNM) y Scripps Institution of Oceanography Benthic Invertebrates Collection (SIO; indicado como DNA-CODE). El análisis se dirigió a las setas, ya que observaciones mensuales de organismos en vivo (Cap. VII) mostraron una variación continua en caracteres como la forma de la carúncula y la sección transversal del cuerpo por contracción. Estos atributos se consideraron relevantes para la diferenciación de las especies de *Eurythoe* en el océano Índico por Bindra (1927), mientras que el inicio de las branquias, los ojos y la posición de la boca y del ano son constantes en el género. El procedimiento consistió en la extracción de parápodos de los setígeros 2, 5, 10 y 50, o de una posición posterior, utilizando el microscopio de disección (LEICA S6E) y la revisión del arreglo de los diferentes tipos de setas. Asimismo, se realizaron preparaciones semipermanentes de las setas en alcohol-glicerol para su revisión en el microscopio óptico LEICA DME (10X y 40X). Se tomaron microfotografías del

parápodo y de las setas utilizando una cámara fotográfica Cannon Rebel EOS y los adaptadores MARTIN MICROSCOPE.

El material fijado en alcohol al 95% para la extracción del ADN, básicamente se obtuvo de dos proyectos: 1) CONACYT 61609 “Taxonomía de poliquetos del Gran Caribe y evaluación molecular de especies anfiamericanas (Annelida: Polychaeta)” a cargo del Dr. Sergio I. Salazar Vallejo, ECOSUR y 2) UCMEXUS “Towards a molecular baseline for marine invertebrates of the Gulf of California: An assessment of biodiversity, evolution and conservation” a cargo del Dr. Gregory W. Rouse, SCRIPPS. El material en México tiene una mayor cobertura espacial en el océano Pacífico, ya que las localidades de recolección incluyeron islas del golfo de California y la zona costera de Baja California, Baja California Sur, Sinaloa, Guerrero y Nayarit, mientras que en el Atlántico sólo se incluyeron localidades de Quintana Roo y muestras del acuario Xcaret. Fuera del país se incluyeron muestras de Belice, Panamá, Florida y de un acuario en Alemania. Adicionalmente, se incorporaron las secuencias del gen citocromo *c* oxidasa subunidad I (COI) trabajadas por Barroso *et al.* (2010) disponibles en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Para obtener las secuencias del material del ECOSUR se siguieron los protocolos estándar para el código de barras de DNA (Hajibabaei *et al.*, 2005). Las secuencias, los electroferogramas, los detalles de los primers, las fotografías y las localidades de los especímenes se encuentran disponibles en el proyecto “Polychaeta of Mexico II”, Barcode of Life Data System BOLD (<http://www.barcodinglife.org>; Ratnasingham y Hebert, 2007). Para el material del proyecto del golfo de California se siguió la metodología indicada en Borda *et al.* (2012). La extracción del DNA se realizó con el kit Dneasy Blood and Tissue (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), se utilizaron los primers LCOI490/HCO2198, para la purificación de la amplificación del PCR se usó ExoSAP-IT (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA) y, finalmente, para la secuenciación se utilizó el servicio de la Universidad de Hawai en Manoa, Advanced Studies in Genomics, Proteomics and Bioinformatics (ASGPB).

Las secuencias se alinearon con Clustal W utilizando la interfase MEGA versión 5 (Tamura *et al.*, 2011). Las divergencias entre las secuencias se calcularon con el modelo de distancia (K2P) (Kimura, 1980) y se construyó un árbol con el método del vecino más cercano (neighbor-joining, NJ) como un patrón representativo de la divergencia entre las especies (Saitou y Nei, 1987). Se incorporaron cuatro secuencias de dos géneros de anfinómidos como referencia y comparación (2 de *Hermodice* y 2 de *Notopygos*).

Resultados

Código de barras de ADN

Se analizaron un total de 117 secuencias del gen COI de *Eurythoe* 121 (≈663 pb). La divergencia genética esquematizada en el árbol de distancia NJ muestra cinco especies dentro del género (Figs. V.1, V.2). El material proveniente de las localidades mexicanas corresponde solamente a cuatro de estas especies; la especie que no se recolectó en México corresponde al taxón identificado por Barroso *et al.* (2010) como *E. laevisetis*, con distribución restringida a las islas del Atlántico (Saint-Thomas, islas Abrolhos, archipiélago Fernando de Noronha y archipiélago de San Pedro y San Pablo). En la especie identificada como *E. complanata* (Fig. V.2) se encuentran agrupadas muestras provenientes de Florida, Panamá, Belice y de México (varias localidades de la costa de Quintana Roo e isla Contoy), así como algunas de las secuencias trabajadas por Barroso *et al.* (2010) de varias localidades de Brasil y Bocas del Toro en Panamá. La mayoría de las muestras del golfo de California se agruparon en el taxón identificado como *E. complanata mexicana*. Estos especímenes también se pudieron diferenciar por la presencia de la seta distalmente ensanchada (ver sección de sistemática y Fig. V.3B, E). El material de Nayarit y Sinaloa corresponde a la especie denominada aquí como *Eurythoe* sp. A, y no presenta atributos morfológicos particulares. Finalmente, en el taxón denominado como *Eurythoe* sp. B se agrupan las secuencias de: la muestra identificada como *E. armata* (Barroso *et al.*, 2010) proveniente de isla Taboga en el Pacífico de Panamá, las muestras recolectadas en Guerrero, dos muestras de Baja California Sur (islas San Marcos y Santa Cruz), dos de isla Contoy y una proveniente de

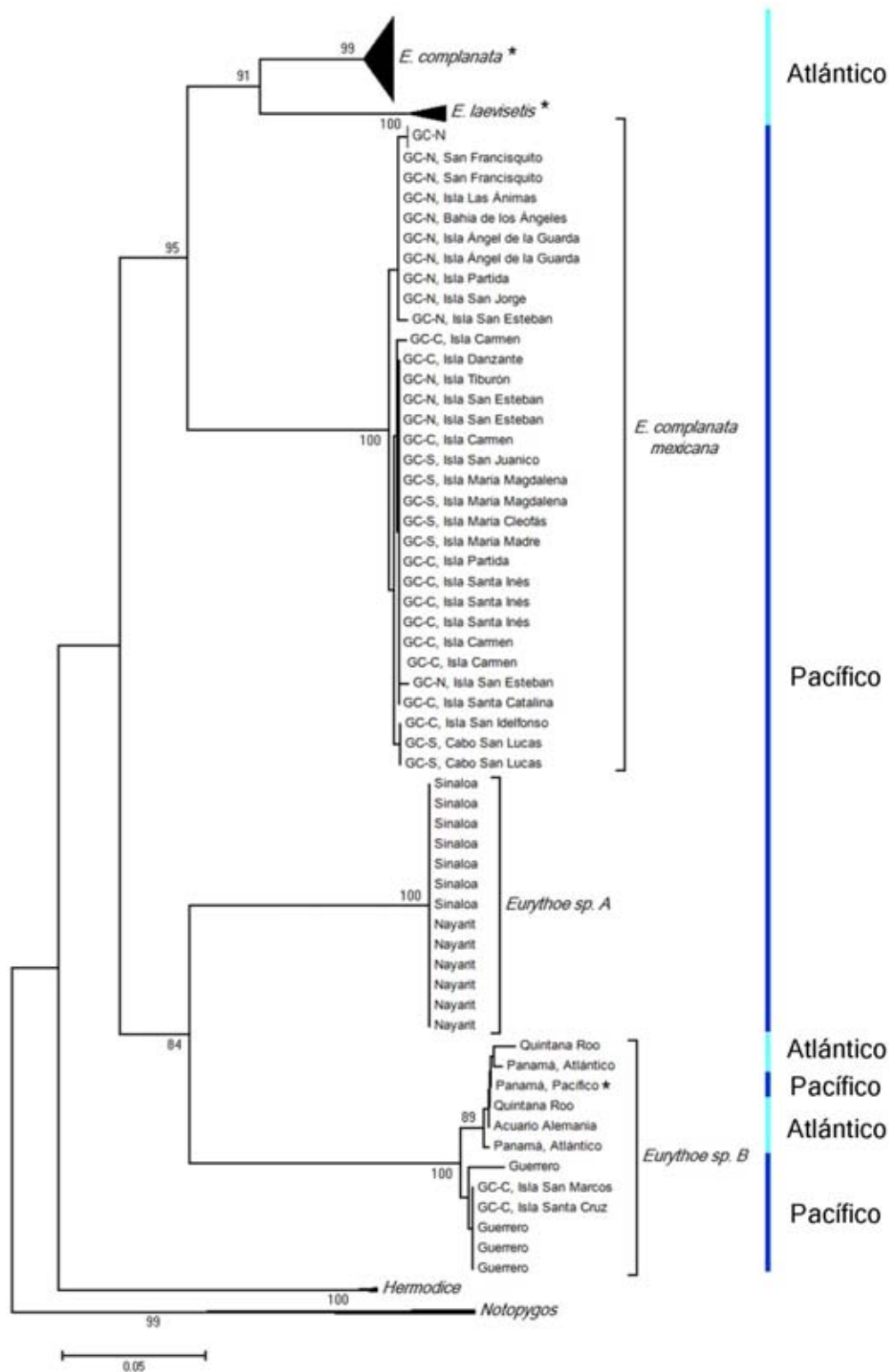


Figura V.1. Árbol de distancia (Neighbor-joining) con la secuencia del gen COI de cinco especies de *Eurythoe* (K2P). *Eurythoe complanata* y *E. laevisetis* compactadas. * indica las secuencias de Barroso *et al.* (2010) y las barras de color, el área de distribución. Escala: distancia genética.

un acuario en Alemania (Fig. V.2). Por lo tanto, la especie *Eurythoe* sp. B se encontró tanto en las costas del Pacífico este como en el Atlántico oeste. Cabe destacar que no es posible conservar el nombre de *E. armata* para estos especímenes porque no muestran los atributos caracterizados con el material tipo (Hartman, 1948; ver sección de sistemática).

Tabla V.1. Distancia genética promedio K2 entre las especies de *Eurythoe* y distancia intraespecífica.

	<i>E. complanata</i>	<i>E. laevisetis</i>	<i>E. c. mexicana</i>	<i>Eurythoe</i> sp. A	<i>Eurythoe</i> sp. B
<i>E. complanata</i>	0.009				
<i>E. laevisetis</i>	0.104	0.013			
<i>E. c. mexicana</i>	0.144	0.149	0.011		
<i>Eurythoe</i> sp. A	0.179	0.219	0.237	0.001	
<i>Eurythoe</i> sp. B	0.221	0.225	0.231	0.203	0.011

La distancia genética entre las especies de *Eurythoe* va del 10 al 23% (Tabla V.1). Las especies con menor divergencia son *E. complanata* y *E. laevisetis* (10%, Barroso *et al.*, 2010), ambas con distribución en el Atlántico oeste, mientras que la mayor divergencia corresponde a *E. c. mexicana* y *Eurythoe* sp. A (23%), ambas con distribución en el Pacífico este. La distancia intraespecífica en las cinco especies es menor al 1.5%.

Sistemática

GÉNERO *Eurythoe* Kinberg 1857

Especie tipo

Eurythoe capensis Kinberg 1857, por designación subsecuente (Hartman, 1948: 42).

Comentarios

La designación de la especie tipo la realizó Hartman (1948: 42). Ebbs (1966) indicó que el tipo de fijación le era desconocido a pesar de contar con la publicación de Hartman (1948). No obstante, se considera como designación subsecuente de acuerdo al art. 69.1, del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, ya que *E. capensis* fue seleccionada posteriormente (ICNZ, 1999). Cabe destacar que se consideraron los atributos caracterizados por Kinberg (1857) y Hartman (1948), basados en el material tipo. Day (1934) mencionó esta especie pero la caracterización morfológica que proporcionó no corresponde a la descripción original (por ejemplo, indicó que los ojos no son evidentes).

Diagnosis

Cuerpo alargado, deprimido, rectangular en corte transversal. Prostomio redondeado con cuatro ojos, una antena media corta y un par de antenas laterales. Branquias desde el setífero dos. Carúncula alargada hasta el tercer setífero, trilobulada, el borde medio liso cubre los bordes laterales. Palpos digitiformes sobre los labios bucales.

Notosetas furcadas asimétricas en los primeros setíferos; posteriormente, espinas en la periferia, setas tipo arpón y notosetas capilares largas con espolón. Neurosetas furcadas asimétricas. Acículas en notópodo y neurópodo.

***Eurythoe complanata* (Pallas 1766)**

Fig. V.3A, D

Aphrodita complanata Pallas, 1766: 109–112, pl. 8, fig. 19–26.

Eurythoe complanata.– Ebbs, 1966: 512–518, fig. 7.

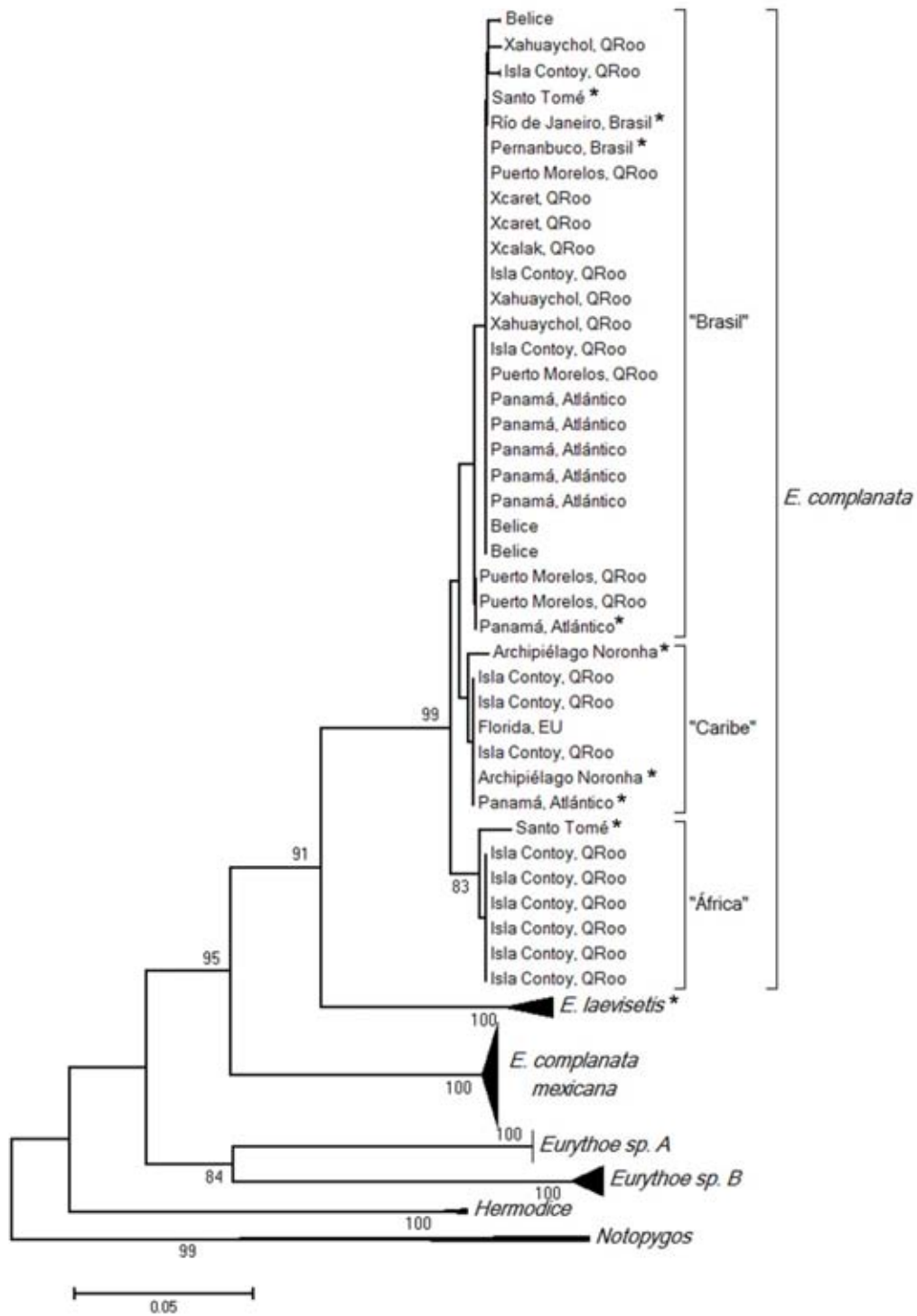


Figura V.2. Árbol de distancia (Neighbor-joining) con la secuencia del gen COI de cinco especies de *Eurythoe* (K2P). Detalle de *E. complanata* donde se muestran las poblaciones caracterizadas por Barroso *et al.* (2010), * indica sus secuencias. Escala: distancia genética.

Material

[ECOSUR-OH-P0197] USA, **Florida**, Miami, playa del acuario, 25°44'7" N, 80°09'59.1" W, Mayo 29, 2008, en esponja. [ECOSUR-OH-P0189, P0190, P0198, P0195] México, **Quintana Roo**, isla Contoy, 21°28'32" N, 86°47'30" W, Febrero 26, 2008, rocas coralinas; [ECOSUR-OH-P0199, 200, 201] 21°27'34" N, 86°47'7" W, Febrero 22, 2008, Punta Sur; [ECOSUR-OH-P0193, 194, 202-204, 269, 270] arrecife Ixlache, 21°26'2" N, 86°46'56" W, Febrero 25, 2008. [ECOSUR-OH-P0196, 205, 206] Xahuaychol, 18°30'15" N, 87°45'32" W, Agosto 30, 2004, rocas coralinas. [ECOSUR-OH-P0388, 394] Puerto Morelos, 20°49'56" N, 86°53'13" W, Mayo 08, 2008, rocas coralinas. [ECOSUR-OH-P0389], Xcalak, 18°15'20" N, 87°49'48" W, Mayo 09, 2008, rocas coralinas. [ECOSUR-OH-P0391, P0393] acuario Xcaret, 20°33'47" N, 87°8'21" W, Junio 04, 2005. [DNA-CODE-75, 81, 83, 85-86] Panamá. [DNA-CODE-114, 116] Belice.

Diagnosis

Morfología- como se describió para el género. Genética- secuencias diagnósticas tomadas de Barroso *et al.* (2010), COI (FJ429262-63, FJ429266-67, FJ429269, FJ429271-73). Variación intraespecífica con ejemplares del Caribe mexicano 0.9%, variación interespecífica de 10 a 22%.

Comentarios

La caracterización morfológica de las setas corresponde a lo indicado por Barroso *et al.* (2010), las notosetas furcadas predominan en los primeros setíferos y son reemplazadas por los otros tipos: las espinas, las capilares con espuela y las tipo arpón. Las setas tienen un arreglo específico en el haz setal: en la periferia se ubican las espinas, las acículas alrededor del cirro dorsal y los otros tipos en el resto del haz setal (Gustafson, 1930; Fig. V.3C). Las espinas en *E. complanata* son ligeramente curvas como en *Eurythoe* sp. A (en el Pacífico mexicano) y como las ilustradas por Gustafson (1930) con ejemplares de Japón, Haití e islas Marshall, por lo que no presentan ninguna diferencia morfológica respecto a estas especies. Hartman (1948) destacó que la diferencia entre *E. complanata* y *E. capensis* radicaba en el grosor de las notosetas, no obstante el grosor de las setas tipo arpón varía incluso en el mismo setífero (Ebbs,

1966; obs. pers.), por lo que esta diferencia no representa un carácter diagnóstico. El otro atributo que Hartman (1948) señaló fue la ramificación branquial; no obstante, en *Hermodice*, generó cercano a *Eurythoe* (Borda *et al.*, 2015, Cap. IV), se evidenció que la variación en la ramificación branquial puede ser un carácter adaptativo relacionado a las concentraciones de oxígeno (Ahrens *et al.*, 2013).

Es necesario determinar la secuencia de los ejemplares topotípicos (isla Antigua); sin embargo, las secuencias de Barroso *et al.* (2010) incluyen localidades diversas, tanto en el continente (desde Panamá en el Caribe hasta el sur de Brasil) como en las islas del Atlántico tropical. Las secuencias provenientes de Quintana Roo se agruparon en las tres poblaciones caracterizadas en la Fig. V.2 (la población de Brasil, la del Caribe y la de África), lo cual es indicativo que el intercambio genético en el Caribe mexicano tendrá que analizarse con detalle a nivel poblacional.

Cabe destacar que los registros de *E. complanata* en el Pacífico este son cuestionables; no obstante, con los atributos morfológicos como única evidencia, resulta complicado diferenciar las especies (Dean, 2012). Se debe considerar que estos registros se hicieron bajo una consideración de *E. complanata* sensu lato, pero que dentro de este grupo se encuentran especies con distribuciones geográficas particulares y que el taxón *E. complanata* del Caribe descrito por Pallas (1766), como tal, no se ha confirmado en el Pacífico.

Distribución

Océano Atlántico. México: Quintana Roo. EUA: Florida. Belice. Panamá: Bocas del Toro. Brasil: Río de Janeiro, Cabo Frío, PERNANBUCO, archipiélago Abrolhos, archipiélago Fernando de Noronha, archipiélago San Pedro y San Pablo. Saint-Thomas.

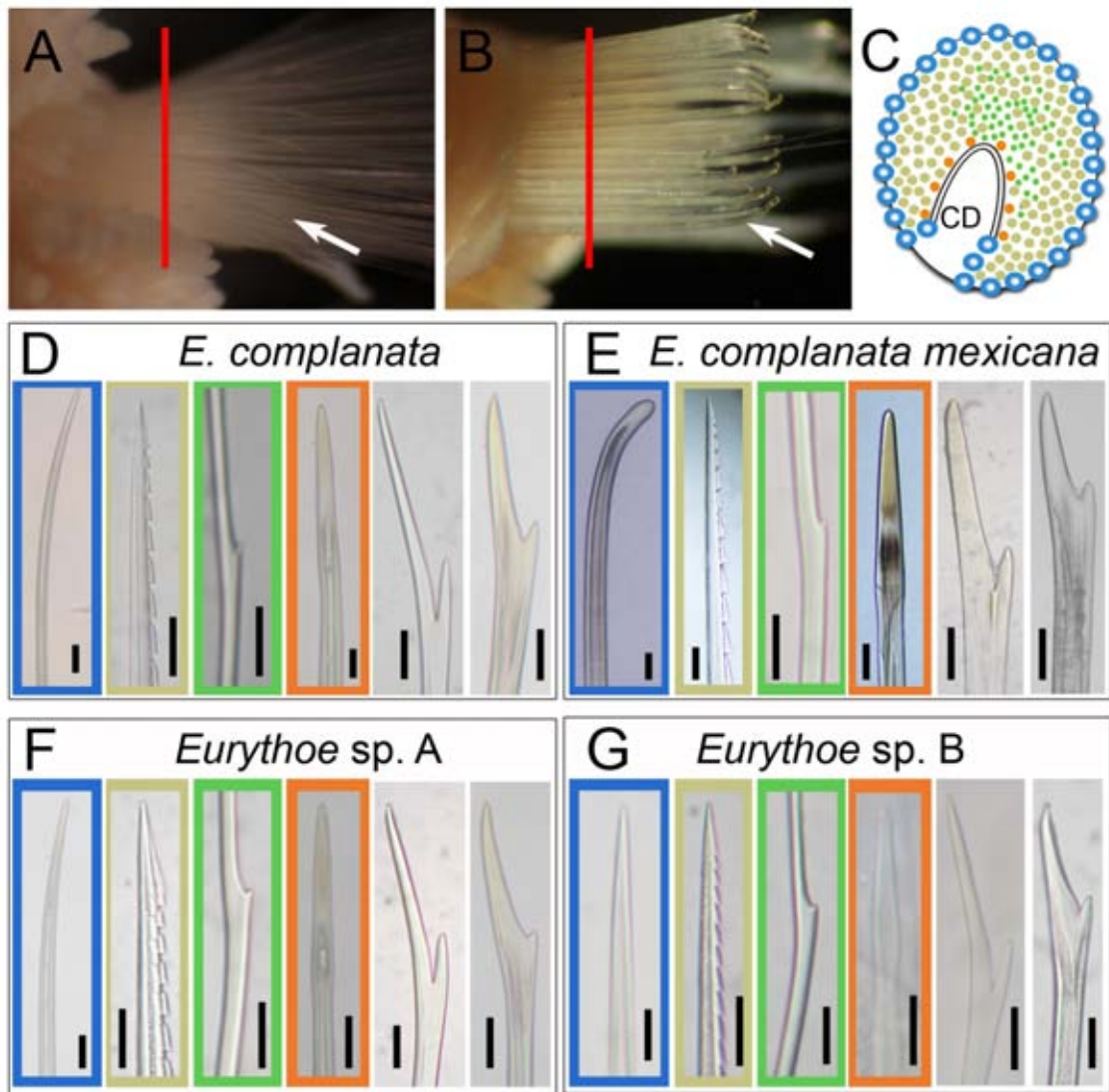


Figura V.3. Especies de *Eurythoe* en México. A) Notopodio, vista lateral de *E. complanata*, la flecha indica las notosetas externas en forma de espina curvada; B) notopodio, vista lateral de *E. c. mexicana*, la flecha indica las notosetas externas distalmente ensanchadas, en ambas la línea roja indica la línea de corte para el esquema C; C) esquema de la distribución de los diferentes tipos de setas en el notópodo con color azul las notosetas externas, café claro las setas tipo arpón, con verde la seta capilar con espuela y con naranja las acículas; D) setas de *E. complanata*; E) setas de *E. c. mexicana*; F) setas de *Eurythoe* sp. A; G) setas de *Eurythoe* sp. B. Orden de las setas en D-G: notoseta externa, tipo arpón, capilar con espolón, acícula, notoseta furcada del 2 setífero (en E del quinto), neuroseta furcada. Escalas, de izquierda a derecha: D) 30 μ , 25 μ , 15 μ , 40 μ , 25 μ , 50 μ ; E) 50 μ , 30 μ , 15 μ , 25 μ , 40 μ , 70 μ ; F) 60 μ , 30 μ , 15 μ , 60 μ , 25 μ , 50 μ ; G) 30 μ , 30 μ , 20 μ , 25 μ , 20 μ , 25 μ ; CD= cirro dorsal.

Eurythoe mexicana Berkeley & Berkeley 1960 status novo

Fig. V.3B, E

Eurythoe complanata.– Berkeley y Berkeley, 1939: 323–324, fig. 1. Kudenov, 1974: 23–24, fig. 7.

Eurythoe complanata mexicana Berkeley y Berkeley, 1960: 358.

Material tipo

Holotipo [USNM-32884] Baja California Sur, isla Espíritu Santo, 1937, coll. Lewis, F. E., litoral; Paratipos [USNM-32883] Sonora, bahía San Carlos, septiembre 05, 1959, coll. Arai, H.P. (2).

Material adicional

Golfo de California, norte [DNA-CODE-177-183] **Baja California**, isla Ángel de la Guarda 29°33' N, 113°34' W; [DNA-CODE-185-186, 188-189] bahía de los Ángeles; [DNA-CODE-176], La Partida, 28°49' N, 113°19' W; [DNA-CODE-04-06, 174-175] San Esteban, 28°43' N, 112°36' W; [DNA-CODE-190-191] isla Las Ánimas, 28°41' N, 112°55' W; [DNA-CODE-192] San Francisquito, 28°26' N, -112°52' W. [DNA-CODE-03] **Sonora**, San Jorge, bahía San Jorge, 31°01' N, 113°15' W; [DNA-CODE-02] isla Tiburón, 29° N, 112°25' W. *Golfo de California, centro* [DNA-CODE-194-195] **Baja California Sur**, Santa Inés, 27°03' N, 111°54' W; [DNA-CODE-170-171] San Idelfonso, 26°37' N, 111°26' W; [DNA-CODE-07-08,196,198] isla del Carmen, 25°58' N, 111°09' W; [DNA-CODE-197] isla Danzante, 25°47' N, 111°14' W; [DNA-CODE-199] Santa Catalina, 25°39' N, 110°49' W; [DNA-CODE-201] La Partida sur, 24°33' N, 110°23' W. *Golfo de California, sur* [DNA-CODE-09] **Baja California Sur**, San Juanico, 21°46' N, 106°40' W; [DNA-CODE-14] María Madre, 21°38' N, 106°31' W; [DNA-CODE-10-11] María Magdalena, 21°29' N, 106°23' W; [DNA-CODE-13] María Cleofas, 21°20' N, 106°16' W; [DNA-CODE-202-203] Cabo San Lucas, 22°56' N, 109°50' W.

Diagnosis

Morfología- como se describió para el género, excepto las notosetas en el borde externo, ya que son distalmente ensanchadas (Fig. V.4A-D). Genética- secuencia diagnóstica

proveniente de La Partida en la región sur del golfo de California (DNA-CODE-201). Variación intraespecífica 1.1% dentro de todo el golfo de California, variación interespecífica de 14 a 23%.

Comentarios

Berkeley y Berkeley (1939) consideraron la presencia de la notoseta distalmente ensanchada como una variación individual, ya que este atributo lo observaron en sólo un espécimen. Años más tarde, con ejemplares de bahía San Carlos, confirmaron la presencia de esta seta y la determinaron como una variedad de *E. complanata* (Berkeley y Berkeley, 1960). Kudenov (1974) relacionó esta seta con procesos de regeneración y que podría asociarse al crecimiento; sin embargo, sugirió retener la variedad hasta obtener más información sobre la biología de esta especie en el golfo de California (Kudenov, 1975). En la caracterización del proceso de regeneración de *Eurythoe* sp. A no se observó ningún cambio en las setas (Yáñez-Rivera y Méndez, 2014; Cap. VI), por lo que se descarta el supuesto de Kudenov (1974). Además, la divergencia genética respecto a *E. complanata* (14%) confirma que se trata de una especie diferente, no sólo de una variedad.

El único atributo morfológico que permite diferenciar esta especie es la presencia de la seta distalmente ensanchada; no obstante, tendrá que revisarse, ya que, la especie descrita en el Pacífico de Panamá *E. armata* presenta una seta robusta con terminación redondeada (Hartman, 1948: 43): “Notosetae form full fascicles; they include long, slender, notched setae, harpoon-like setae and smooth, coarser setae that appear bulbous distally ...”. Esta especie fue revisada y determinada como un sinónimo menor de *E. complanata* por Hartman (1948). A pesar de la similitud de la seta robusta con terminación redondeada de *E. armata* y la seta distalmente ensanchada de *E. mexicana* no se consideran sinónimos debido a que la divergencia genética entre las especies del género es considerable y es factible que con un muestreo detallado en el Pacífico de Panamá se encuentren otras especies. Barroso *et al.* (2010) consideraron que el taxón proveniente del Pacífico de Panamá correspondería a *E. armata*; no obstante, aquí se trató como *Eurythoe* sp. B (ver comentarios en esta especie), porque no tiene la peculiaridad observada en los ejemplares tipo revisados por Hartman (1948). *Eurythoe*

sp. B y *E. mexicana* muestran una divergencia genética del 23%, por lo que corresponden a especies diferentes.

No se cuenta con la secuencia de ejemplares de la localidad tipo, sin embargo, las localidades involucradas en el golfo de California son cercanas. La Partida es una isla que se encuentra unida a Espíritu Santo, la localidad tipo, por lo que esta isla representa la secuencia de referencia para la especie. La estructura poblacional dentro del golfo de California tendrá que ser analizada con detalle, ya que, al parecer, puede presentar cierta regionalización, principalmente en el norte (Fig. V.1).

Distribución

Golfo de California. México: Baja California, Baja California Sur y Sonora.

Eurythoe sp. A

Fig. V.3F

Material

[ECOSUR-OH-P0224, 225] **Nayarit**, La Cruz de Huanacastle, Vallarta Garden, 20°45'4.3" N, 105°22'25.7" W, Febrero 23, 2008, rocas coralinas; [ECOSUR-OH-P0226-228, 214-216] playa La Manzanilla, 20°44'35" N, 105°23'14.8" W, Abril 01, 2008, rocas coralinas. [ECOSUR-OH-P0229-236, EMU-XXXX] **Sinaloa**, Mazatlán, 23°12'21.5" N, 106°25'44.7" W, Marzo 22, 2008, costa rocosa.

Diagnosis

Morfología- como se describió para el género. Genética- secuencias diagnósticas (ECOSUR-OH-P0224-225, 229-236). Variación intraespecífica 0.1%, variación interespecífica de 17 a 23%. Biología- Ciclo reproductivo secuencial sexual/asexual de julio a octubre, gran capacidad de regeneración por amputación (un organismo puede generar tres).

Comentarios

No presenta ninguna diferenciación morfológica respecto a *E. complanata* y a las especies ilustradas por Gustafson (1930) de Japón, Haití e islas Marshall, ya que las espinas son ligeramente curvadas (Fig. V.3F). No obstante, la divergencia genética (17%) soporta que se trata de diferentes especies.

Es factible que algunos registros de *E. complanata* en el Pacífico correspondan a este taxón, desafortunadamente no es posible discernir si se trata de esta especie (Dean *et al.*, 2012) y asignarlos correctamente.

Distribución

Pacífico mexicano (Nayarit y Sinaloa).

***Eurythoe* sp. B**

Fig. V.3G

Eurythoe armata.– Barroso *et al.*, 2010: 358 (*partim* no Kinberg, 1867).

Material

[OH-P0217-220] **Guerrero**, Acapulco, playa Hornos, 16°51'6.4" N, 99°54'1" W, Abril 20, 2008, en esponja. [ECOSUR-OH-P0191] **Quintana Roo**, isla Contoy, 21°28'28.9" N, 86°47'22.5" W, Febrero 22, 2008, en esponja; [ECOSUR-OH-P0192] Punta Sur, 21°27'34.8" N, 86°47'7.9" W, Febrero 22, 2008. [DNA-CODE-193] **Baja California Sur**, isla San Marcos, 27°15' N, 112°05' W; [DNA-CODE-200] isla Santa Cruz, 25°15' N, 110°43' W.

Diagnosis

Morfología- como se describió para el género. Genética- secuencia diagnóstica tomada de Barroso *et al.* (2010), COI (FJ429274). Variación intraespecífica 1.1% considerando ejemplares del Caribe y Pacífico mexicano, variación interespecífica de 20 a 23%.

Comentarios

En el notópodo esta especie presenta espinas rectas (Fig. V.3G). Se puede diferenciar de *E. complanata* y de las especies ilustradas por Gustafson (1930) de Japón, Haití e islas Marshall, porque en estas especies las espinas del notópodo son ligeramente curvas (Fig. V.3F). También se puede diferenciar de *E. mexicana* porque en esta especie no son espinas, sino que estas notosetas son distalmente ensanchadas (Fig. V.3E). Además, la divergencia genética entre los taxones soporta que representen diferentes especies (Figs. V.1, V.2).

Los especímenes de esta especie se encontraron tanto en localidades del Atlántico oeste como del Pacífico, por lo que algunos registros de *E. complanata* sensu lato pueden corresponder a esta especie. Barroso *et al.* (2010) asignaron ejemplares de este taxón como *E. armata*, descrita por Kinberg como *Blenda armata* (1967: 90) para el Pacífico de Panamá. La descripción original refiere las notosetas como “*arcuatae, obtusae*” (inclinadas y romas), que podrían asemejarse a las caracterizadas para *E. mexicana*. Adicionalmente, Hartman (1948: 43) revisó el material tipo e indicó que presenta una variedad en la forma de las notosetas, una seta ancha distalmente bulbosa que no ha perdido su cubierta “*coarser setae that appear bulbous distally where they have not lost the investing sheath.*” Por ello, se determinó que estos ejemplares no puede ser referido como *E. armata* ni como *E. mexicana*.

Ejemplares de Guerrero y Quintana Roo se encontraron asociados a esponjas, a diferencia de las otras especies que se encuentran en rocas coralinas. Esta diferenciación ecológica debe considerarse.

Distribución

Anfiamericana. México: Guerrero, Baja California Sur y Quintana Roo. Panamá: isla Taboga.

Discusión

Se ha demostrado la existencia de especies crípticas en la mayoría de los phyla en el medio marino (Knowlton, 1993) y los anélidos no son la excepción (Nygren, 2014). Particularmente en los anfinómidos, se han encontrado especies crípticas en *Archinome*, cuyos ejemplares se encuentran en ventilas hidrotermales y los caracteres morfológicos son variables, por lo que no es posible distinguir a las diferentes especies (Borda *et al.*, 2013). En *Eurythoe*, Barroso *et al.* (2010) registraron tres especies; entre la especie del Pacífico y *E. complanata* no encontraron diferenciación morfológica, pero para *E. laevisetis* identificaron una variación en las setas (la ausencia de las setas tipo arpón), que había sido señalada en la descripción original (Fauvel, 1914). Al integrar el material estudiado aquí, se encontró que el taxón del Pacífico de Barroso *et al.* (2010), llamado *Eurythoe* sp. B presenta una diferenciación en las setas (espinas rectas), por lo que los tres taxones identificados anteriormente en realidad serían considerados pseudocrípticos. Estos se logran identificar con algún carácter clave para su reconocimiento, después de una comparación morfológica detallada y usualmente después de la aplicación de técnicas moleculares (Knowlton, 1993; Sáez y Lozano, 2005).

No hay un límite preciso entre las especies crípticas, que son indistinguibles entre sí, y las pseudo-crípticas (Nygren, 2014). Aunque se identificaron estas sutiles diferencias en las setas, también se evidenció que *E. complanata* y *Eurythoe* sp. A son morfológicamente indistinguibles entre sí, por lo que se podrían caracterizar dependiendo del área de distribución, ya que la primera se distribuye en el Atlántico oeste y la segunda en el Pacífico este. Sin embargo, es necesario cuidar las generalizaciones, ya que es factible que otras especies del género tengan la misma morfología de las setas curvadas como las ilustradas por Gustafson (1930) y Arias *et al.* (2013). Además, el área de distribución para *Eurythoe* sp. B no es excluyente, ya que se distribuye tanto en el Atlántico oeste como en el Pacífico este y la variación genética intraespecífica es similar a las especies con poblaciones continuas (*E. mexicana* 1.1%). Asimismo, el antecedente de la seta distalmente globosa para *E. armata* (Kinberg, 1867; Hartman, 1948) sugiere que la seta que caracteriza a *E. mexicana* podría no mantenerse

como característica diagnóstica al extender el muestreo hacia el Pacífico sur. Cabe destacar que en los anfinómidos, por la naturaleza calcárea de sus setas, las variaciones sutiles no tienen relevancia diagnóstica (Poots, 1909; Fauvel, 1923; Day, 1967; Yáñez-Rivera y Salazar-Vallejo, 2011). Las diferencias identificadas en este estudio son constantes y sólo incorporan las notosetas externas debido a que su morfología no es variable ni en el setífero, ni a lo largo del cuerpo. Los demás tipos de setas presentan una gran variación de tamaño incluso dentro del mismo setífero (Ebbs, 1966). Aún así, la utilización de las setas para distinguir las especies parece que tiene un alcance limitado, ya que también se encontraron especies morfológicamente indistinguibles.

Reconocer las especies crípticas es importante porque, a pesar de la similitud morfológica pueden diferir en las características biológicas (Nygren, 2014). Por ejemplo, *Eurythoe* sp. B puede estar asociado a esponjas, mientras que las otras especies habitan en sistemas rocosos o se encuentran en rocas de coral. La identificación adecuada es necesaria, ya que a partir de la determinación de las especies se derivan una serie de inferencias que se relacionan directamente con la gestión humana de la biodiversidad, como la detección de especies amenazadas, indicadoras y exóticas, incluso monitoreos y evaluaciones tróficas para comunidades y ecosistemas (Salazar-Vallejo *et al.*, 2008). En este sentido se ha registrado a *E. complanata* y a *E. laevisetis* como introducidas en el Mediterráneo (Arias *et al.*, 2013). Dada la complejidad para distinguir las especies dentro del género y que la incorporación de mayor información cambió los patrones encontrados por Barroso *et al.* (2010), dicho registro en el Mediterráneo debe tomarse con reserva, ya que es posible que estos taxones correspondan a diferentes especies porque sólo se consideraron las variaciones en las setas. Sin embargo, cabe la posibilidad que la distribución de algún taxon se relacione con introducciones humanas, ya que el registro de *Eurythoe* sp. B en el acuario de Alemania sugiere que su traslado es posible pero se desconoce si está establecida en el Mediterráneo o no.

El entendimiento de los patrones biogeográficos puede ser muy limitado si no se consideran las especies crípticas, ya que se parte de una generalización de distribución cosmopolita cuando en realidad se trata de un complejo de especies con distribución

restringida (Nygren, 2014). Hasta el trabajo de Barroso *et al.* (2010), prácticamente se consideraba que *E. complanata* tenía una distribución cosmopolita, específicamente pantropical. En esta primera contribución con datos moleculares, se determinaron dos especies simpátricas en el Atlántico y una en el Pacífico este (Barroso *et al.*, 2010). En este trabajo se pudo comprobar que este taxón del Pacífico también se distribuye en el Atlántico oeste y se identificaron dos taxones más con distribución limitada en el Pacífico este, lo cual difiere bastante del patrón de distribución cosmopolita, a pesar de la desventaja que en la práctica taxonómica tradicional (morfológica) no se puedan distinguir las especies (Dean *et al.*, 2012). En casos particulares, como la especiación críptica, se ha propuesto que bastaría con la caracterización de la secuencia molecular para describir especies. Además, como el Código de Nomenclatura Zoológica no tiene objeciones específicas al respecto, es posible describir especies utilizando únicamente datos moleculares (Cook *et al.*, 2010; Borda *et al.*, 2013). Sin embargo, de ser posible, lo ideal es integrar diferentes tipos de caracteres para delimitar, describir e identificar las especies (Dayrat, 2005; Will *et al.* 2005). Para *Eurythoe* sp. A se caracterizó el proceso de regeneración (Yáñez-Rivera y Méndez, 2014, Cap. VI) y un ciclo anual (Cap. VII), con la finalidad de establecer otros parámetros biológicos, pero se necesita mayor información de los otros taxones para aplicar un enfoque comparativo.

En otros géneros de anfinómidos se ha demostrado que las especies de amplia distribución se relacionan con una limitada comprensión de los atributos diagnósticos y el uso de atributos genéricos en la descripción de las especies (Cap. II; Yáñez-Rivera y Carrera-Parra, 2012, Cap. III; Borda *et al.*, 2015, Cap. IV). Sin embargo, en *Eurythoe* la problemática se relaciona, además, con especiación críptica.

Conclusiones

Se determinó la validez a nivel de especie de *E. mexicana* y se identificaron tres especies más en el país: *E. complanata* sensu stricto, y dos especies indescritas: *Eurythoe* sp. A y *Eurythoe* sp. B.

En la costa atlántica se registraron *E. complanata* sensu stricto y *Eurythoe* sp. B, mientras que, para la costa del Pacífico, *E. mexicana*, *Eurythoe* sp. A y *Eurythoe* sp. B; solo esta última presenta una distribución anfiamericana.

Se confirmó que *E. complanata* sensu lato corresponde a un complejo de especies, dentro del cual algunas se pueden diferenciar por variaciones en la estructura de las notosetas exteriores (*E. mexicana* y *Eurythoe* sp. B) y otras son indistinguibles entre sí (*E. complanata* y *Eurythoe* sp. B), pero la divergencia genética del gen COI sustenta la validez de los diferentes taxones (del 10 al 23%).

Capítulo VI

Regeneration in the stinging fireworm *Eurythoe* (Annelida): Lipid and triglyceride evaluation

BEATRIZ YÁÑEZ-RIVERA and NURIA MÉNDEZ

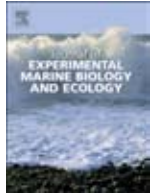
2014

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 459: 137-143.

Corresponding Author:

Beatriz Yáñez-Rivera

Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología



Regeneration in the stinging fireworm *Eurythoe* (Annelida): Lipid and triglyceride evaluation



Beatriz Yáñez-Rivera^{a,*}, Nuria Méndez^b

^a Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Académica Mazatlán, Joel Montes Camarena s/n, Ap. Postal 811, 82000, Mazatlán, Sinaloa, Mexico

^b Laboratorio de Invertebrados Bentónicos, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, Unidad Académica Mazatlán, Joel Montes Camarena s/n, Ap. Postal 811, 82000, Mazatlán, Sinaloa, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 February 2014

Received in revised form 20 May 2014

Accepted 24 May 2014

Available online xxxx

Keywords:

Amphinomidae

Energy reserves

Malformations

Regeneration

ABSTRACT

Regeneration is the ability to restore lost body parts in response to external amputation, and involves a high energy demand, but the role of lipids in this process is unknown. The marine fireworm *Eurythoe complanata* is able to regenerate anterior and posterior ends under natural conditions. Here, this process was recorded in the laboratory for 90 days by monitoring individuals of *E. cf. complanata*. Total lipid and triglyceride concentrations were determined by colorimetric methods at successive regeneration stages. Anterior regeneration consists of prostomium formation, addition of segments and increase in size. Posterior regeneration varies across individuals, in the number of regenerated segments and the regeneration phases are not evident. All fragments were able to regenerate completely without feeding for 50 days, which indicates that they had enough stores of lipids and triglycerides to confront a long starvation period. These energy reserves showed a marked depletion from the beginning of regeneration, reflecting the high demand imposed by the production of new tissue. The concentrations of these compounds increased after feeding. This is the first study describing lipid and triglyceride concentrations during annelid regeneration. The extraordinary regeneration ability of *E. cf. complanata* suggests that it is a good model species for the study of factors involved in this process. It also has ecological implications since one specimen can generate two or more functional individuals in about 50 days.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The regeneration process has been recorded in several phyla of marine invertebrates. This ability to restore a lost body part in some metazoans such as cnidarians and flatworms has been interpreted as asexual reproduction since it represents the potential to produce a new individual from small body fragments (Bely and Nyberg, 2009). However, the two processes have a different origin: asexual reproduction is endogenously induced, whereas regeneration is the response to external amputation (Bely, 2006). Furthermore, regeneration has a distinct developmental basis and evolutionary origin (Bely and Nyberg, 2009).

In Annelida, regeneration occurs at various hierarchical levels; including cell repair, structures or the complete body derived from small fragments. The most widely distributed type among families is posterior regeneration, with anterior regeneration being less common (Bely, 2006). Fireworms show both anterior regeneration and posterior regeneration and this ability has been recognized since earlier studies with observations of asymmetrical segments or abnormalities in the segmentation pattern (Buchanan, 1893). Only few studies about regeneration following experimental amputation in fireworms have been

performed (Ahrens et al., 2014; Müller et al., 2003). In *Eurythoe*, the anterior regeneration has been studied by Müller et al. (2003), particularly regarding the reconfiguration of the nervous system, which occurs in two phases: first, the development of primary neuronal structures derived from the old cord and second, the formation of new neurons and their link up with fibers of the old nerve cord during the first 16 days after amputation.

To date it is unknown if the process of regeneration contributes significantly to increase the number of individuals of *Eurythoe*. Experiments performed by Müller et al. (2003) indicated that amputated worms showed high mortality (70% of small fragments) and relatively low survival (56% of large fragments). In contrast, in a field evaluation Kudenov (1974) found a high proportion (80%) of worms with evidence of regeneration, without distinguishing if endogenous or exogenous processes were involved. Thus, the role of regeneration on survival rate after amputation is unclear.

The importance of lipids in the physiology of most animals is known, but information related to marine annelids is still limited and concerns relatively few species (Koechlin et al., 1981). Structural lipids in the body wall are sterols and phospholipids, which are also present in the coelomic fluid; monoglycerides are common in gut and triglycerides are abundant in mature females (Marsden, 1976). Detailed studies on the complete depletion of triglycerides and glyceryl-ether-dieters in

* Corresponding author. Tel.: +52 669 9852845; fax: +52 669 9826133.
E-mail address: beyariv7@gmail.com (B. Yáñez-Rivera).

neriid species demonstrated their function as lipid reserve during starvation and maturation processes (Pocock et al., 1971). In addition, a discoidal lipoprotein has been identified in the coelomic fluid that is involved in lipid mobilization instead of an external supply during spermatogenesis (Schenk et al., 2006). To date, there has been no evidence that lipids can play an important role in the regeneration process.

Since details of the regeneration process in *Eurythoe* are still little known, we present data on: 1) description of the regeneration process of *Eurythoe cf. complanata* considering behavior and survival through individual monitoring; and 2) evaluation of total lipid and triglyceride concentrations at different regeneration stages.

2. Materials and methods

2.1. Taxonomic identification

The *E. complanata* complex has been characterized by Barroso et al. (2010), including at least three species. Our samples show chaetal features shared with *E. complanata* (Pallas) (Atlantic Ocean) and *Eurythoe laevisetis* Fauvel (Pacific Ocean) sensu Barroso et al. (2010). Biogeographical considerations could indicate that our specimens correspond to *E. laevisetis*. However, molecular evidence shows that more than one species occur in the Pacific (Borda and Yáñez-Rivera, unpublished results); thus, to avoid confusion we refer here to *E. cf. complanata*.

2.2. Regeneration experiment

Specimens of *E. cf. complanata* were collected from the intertidal zone of the Cerritos rocky shore in Mazatlan, Mexico (23° 18' N, 106° 29' W) during low tide on March and April 2013. Worms were transferred to the laboratory in trays with seawater from the collection site. An open-system aquarium was designed with a sand layer and rocks from the same locality to simulate the natural conditions.

Twenty-five worms whose number of segments ranged from 77 to 135 were analyzed. Scissors were used to cut 20 of them into two pieces and five worms into three pieces. After amputation, worms were observed every 24 h during the first 24 days. From day 24 to day 30, they were checked every 48 h and afterward, twice a week until the end of the experiment at day 90. After amputation, each worm was maintained individually in a 250 ml perforated vessel (anterior and posterior ends together) with a sand layer and a small rock. Each vessel was covered with a 0.5 mm mesh net to allow water circulation and to prevent the worm from escaping. All vessels were kept together in an aerated aquarium with running sea water (a salinity of 34). The water temperature corresponded to environmental conditions and ranged from 25 to 30 °C.

Movement, response to light, feeding and structural changes during the regeneration process were recorded. Worms were allowed to feed on shredded marine fish (2.5 g per vessel) from day 50, when both ends were completely developed and thus able to eat (previously tested with additional worms). Observation of feeding is easy because worms evert the pharynx to trap food, as described by Marsden (1963) for the amphinomid *Hermodice carunculata* (Pallas). On the basis of this information and our observations, every four days we maintained a two-hour feeding period and afterwards food was removed.

Structural changes were photographed with a Canon EOS REBEL XSI camera adapted to a Leica stereoscopic microscope (MM-SLR ADAPTER) for live specimens, without anesthetic solutions to avoid possible changes in the regeneration process due to the addition of strange solutions. Percent proportions of malformations were assessed in only 28 regenerated worms, because 12 fragments were frozen for lipid and triglyceride analyses before development was completed.

2.3. Determinations of total lipid and triglyceride concentrations

Worms in different regeneration stages were frozen at -4 °C for lipid and triglyceride analyses. Seven stages were evaluated, at days

15, 22, 26, 36, 43, 52, and 78 (hereafter termed 15-d, 22-d, 26-d, 36-d, 43-d, 52-d, 78-d, respectively), the last one corresponding to the conclusion of morphological changes in the regeneration process. In each stage, three sections from four regenerated fragments were sampled. Sections were obtained from regenerated tissue (RT), the first segment (FS) adjacent to the amputation, and the seventh segment (SS) from amputation (Fig. 1).

Spinreact kits for determination of total lipid and triglyceride concentrations were used according to the manufacturer's instructions (Spinreact, Girona, Spain). The use of such colorimetric methods in marine invertebrates has been recommended because they are simple and provide reliable results (Barnes and Blackstock, 1973). They had never been applied to polychaetes, so we analyzed both tests to determine possible variations between them. Moran and McAlister (2009) described some limitations inherent in these methods, because it is not possible to separate lipid classes. However their advantages are that they are highly sensitive, relatively simple and inexpensive, and they are useful for studies related to eggs and marine larvae because only a small amount of tissue is required. In our study, tissues for FS and SS sections were only one segment of similar size, and an equivalent size of regenerated tissue was excised for RT sections after day 52. To prepare the samples for total lipid and triglyceride determinations we did a preliminary test using phosphate buffer and distilled water as a solution for ultrasonication and homogenization methods. Three replicates were

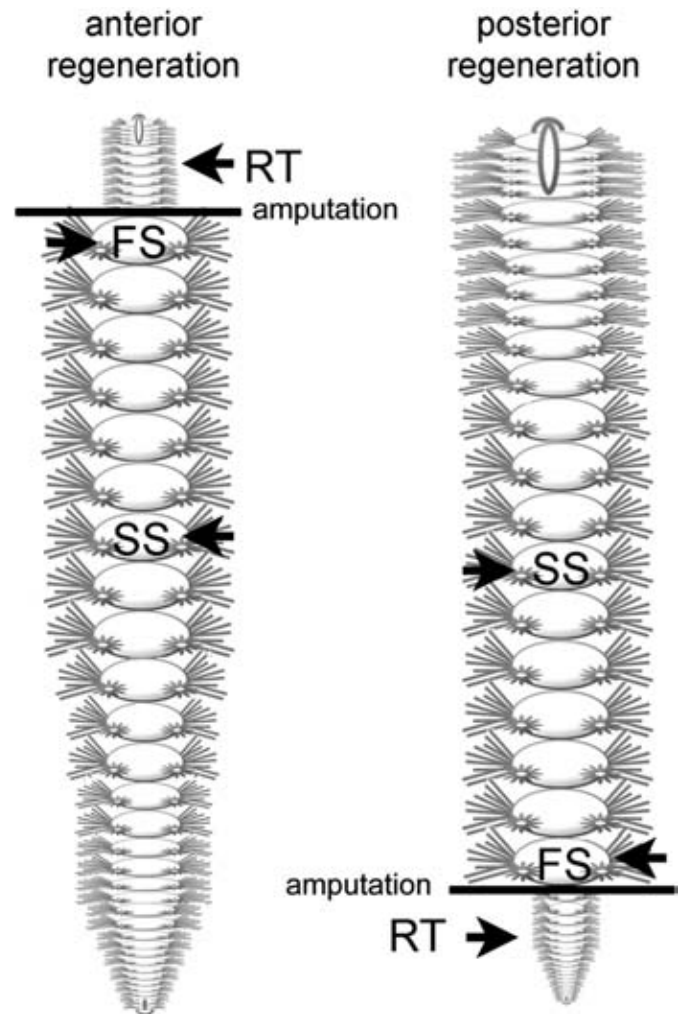


Fig. 1. Sections sampled from regenerated worm for analyses of total lipid and triglyceride concentrations (RT = regenerated tissue; FS = first segment adjacent to the amputation; SS = seventh segment from amputation).

analyzed and the most uniform data resulted from homogenization in distilled water. Thus, samples were homogenated in 500 μl of distilled water and centrifuged for 20 min at 15,000 rpm and 4 °C. The supernatant corresponded to the sample for determination of total lipids and triglycerides, and the pellet produced was discarded. According to Spinreact protocols, a volume of 50 μl was used for lipids and 10 μl for triglycerides. Two essays for total lipids were performed and the final concentration corresponded to the average. For triglycerides, only one determination was performed. As reference values, we included samples from four non-regenerating worms: two from field conditions and two starving worms that had been maintained in the aquarium for 50 days. Three measurements (anterior, medium and posterior segments) were performed from each worm. Worms belonging to field references were collected at day 70 and were frozen until lipid and triglyceride determinations.

Absorbance was measured with a spectrophotometer T70 UV/VIS, PG Instruments, at 520 nm wavelengths for total lipids and 505 nm for triglycerides. Absorbance value was converted to concentration taking into account the standard kit concentration (750 mg dL^{-1} for total lipids and 200 mg dL^{-1} for triglycerides) as recommended by the manufacturer.

2.4. Data analysis

All data were analyzed with the software GraphPad Prism version 6.0c for Mac OS X, GraphPad (www.graphpad.com). Owing to variation in the number of segments (77 to 135) among worms from the same population, calculations of final total lipid and triglyceride concentrations were balanced taking into account the number of segments from each worm analyzed. Thus, the concentrations were multiplied by 1.x, where “x” represents the respective number of segments. Anterior regeneration and posterior regeneration were analyzed independently.

Gaussian distribution was checked through the D'Agostino–Pearson normality test. Since data for total lipids fitted a normal distribution, parametric tests were performed. As triglyceride concentrations showed non-Gaussian distribution, a square root transformation was done (Zar, 1996), and since the transformed data fitted a normal distribution, these too were analyzed by parametric tests.

Comparison of total lipid and triglyceride concentrations from the starved (before day 50) and fed worms (after 50 d) during regeneration was done with t-tests. Comparisons of the seven different stages (mean values) with the reference values (starved and field) also used t-tests. Differences among sections (RT, FS, SS) of the seven stages on the different days were tested with two-way ANOVA and Tukey's post-hoc test. Since earlier stages had not developed regenerated tissue, day 15 (anterior regeneration) and days 15 and 22 (posterior regeneration) were excluded from these last analyses.

3. Results

3.1. Regeneration process

Anterior regeneration (posterior end fragments without prostomium) exhibited a musculature contraction immediately after amputation, avoiding the loss of coelom content and intestine expansion. At 24 h, most of the fragments produced an epithelium layer covering the wound. Parapodia of the segment adjacent to amputation underwent a direction change from lateral (perpendicular to body axes) to anterior. Between these parapodia in the middle of the wound a first cell proliferation after amputation promoted blastema formation, which occurred during the first 48 h as a whitish bud (Fig. 2A). In the next seven days, the blastema acquired a red coloration due to the presence of several blood vessels. On the anterior edge of this zone, a small reddish bud appeared at day 10. This bud was able to contract and enlarge, and corresponded to the future prostomium, whose formation began to be evident at day 14 (Fig. 2B). Antennae and palps appeared

as small projections at day 19 (Fig. 2C). The eyes and caruncle were perceptible at day 20, the eyes as pigmented points and the caruncle with a rich supply of blood (Fig. 2D). Chaetae were present from day 24, being more evident at day 26 in three segments, when antennae, palps, caruncle and eyes were more defined (Fig. 2E). After this point, the number of segments increased at a rate of one segment daily; thus at day 28 five segments were evident (Fig. 2F). Seven segments were visible at day 30, with branchial filaments in most of them (Fig. 2G). Eleven segments were observed at day 34 (Fig. 2H). Once 12 anterior segments had developed in all worms (except for three specimens that developed 13, 15 and 16 regenerated segments), a gradual growth occurred. At day 90, the regenerated anterior end of each worm was similar in appearance to adjacent tissues in its non-regenerated portion (Fig. 2I).

At day 36 the new anterior end was pale orange, but by about day 50 the pigmentation had gradually changed to a deep orange similar to that of the original part. Branchial development was gradual, from only a few filaments at day 30 until they resembled normal ramified branchiae (more than 15 filaments) near day 80.

In posterior regeneration (anterior end fragments without pygidium) after the closure of the wound (Fig. 3A), no blastema formation was evident as a non-pigmented mass. From day 20 to day 32 there was simply a red bud, but by day 36 it had rapidly developed with seven or ten segments and with the anal lobe well formed. However, the anal aperture was not evident until day 43 (Fig. 3B). The segments continued to increase in number without any regular pattern; at day 78, from 15 to 24 segments were observed. Disproportion between regenerated and non-regenerated regions was almost imperceptible, since the regenerated posterior segments widened more rapidly than they lengthened. Segments gradually increased in size, and by day 90 their size was normal and the only evidence that regeneration occurred was the lighter orange pigmentation (Fig. 3C).

Behavior of both anterior and posterior fragments was similar to that of the complete worms avoiding light stimulus. Despite the lack of a prostomium, the posterior fragment movement after amputation was normal (with a forwards-directed walk). Phototactic activity began at 72 h before antennae, eyes and caruncle were evident with the fragments moving away from the light.

Related to feeding activity, the anterior fragments (with prostomium) were able to eat from day 15. Posterior fragments (prostomium regenerated) began ingestion at day 50, when all the prostomial appendages, the caruncle and chaetigers were well developed and when the pigmentation pattern was uniform.

All amputated worms survived. The final result after regeneration of each individual amputated in two pieces was two functional worms. The behavior and anterior–posterior regeneration patterns of the fragments generated from the five worms amputated in three pieces resembled those of worms amputated in two pieces. Thus, these worms generated three individuals in the same time as the others had generated two individuals.

Of the regenerated worms, 25% showed some kind of morphological malformation. In anterior regeneration we observed a caruncle deformity with exiguous growth (3%, Fig. 3D), with overgrowth (6%, Fig. 3E), and abnormal segmentation (6%, Fig. 3F), which involves at least one extra parapodium only on one side from the same segment. In posterior regeneration only abnormal segmentation was documented (10%). Most of the fragments with abnormal segmentation (80%) presented this irregularity in two different segments, having thus a double malformation in the same side and opposite sides, but not in adjacent segments.

3.2. Total lipids and triglyceride concentrations

In order to evaluate changes on lipid and triglyceride concentrations, comparisons were made between references and regenerating worms, as well as between fed and unfed worms during regeneration. Lipid

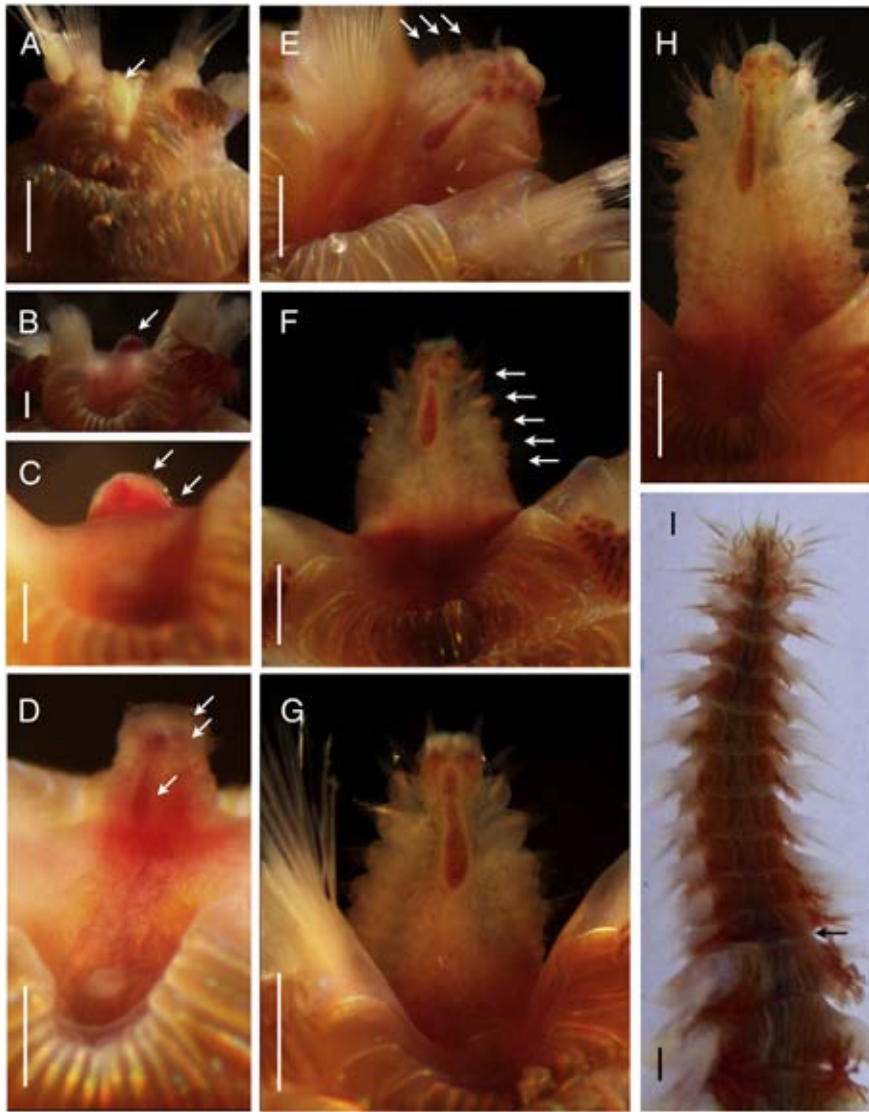


Fig. 2. Anterior regeneration in a single specimen of *Eurythoe cf. complanata*: A) blastema 48 h after amputation, B) prostomium formation at day 14, C) prostomium formation at day 19 when appendages appeared, D) eyes and caruncle noticeable at day 20, E) chaetae in three segments at day 26, F) chaetae in five segments at day 28, G) chaetae in seven segments at day 30, H) chaetae in eleven segments at day 34, I) development at day 90. Arrows A–F indicated structures, I indicates amputation site. Scale bars A–D: 0.5 mm; E–I: 1 mm. (For interpretation of the references to color in this figure, the reader is referred to the web version of this article.)

concentrations of the reference worms were higher in the field-condition worms ($41.91 \pm 4.5 \text{ mg dL}^{-1}$, $n = 6$) than in the starved worms ($32.6 \pm 4.1 \text{ mg dL}^{-1}$, $n = 6$). The group of unfed worms with anterior regeneration showed lower concentrations than fed worms during stages 52-d and 78-d (unpaired t -test, $t_{46} = 5.315$, $P < 0.0001$). There were significant differences between the field reference worms and most of the stages before food ingestion on day 50, differences after stage 52-d were no longer significant. Lipids on field reference showed higher concentrations than unfed worms in both anterior regeneration and posterior regeneration. Comparisons with starved reference worms indicated non-significant differences at all stages except for 15-d and 78-d (Fig. 4A). Lipids of the starved reference showed higher concentrations than unfed worms in the first three regeneration stages. Afterwards, a slight increase occurred, and finally with food supply, the regenerated worms showed higher values than the starved reference. During posterior regeneration, significant differences were observed between starved and fed worms (unpaired t test, $t_{46} = 4.824$, $P < 0.0001$). Lipid concentrations showed non-significant

differences between regenerated worms and each of the reference values (Fig. 4B).

Triglyceride concentrations in reference worms were higher in the field condition ($38.47 \pm 2.88 \text{ mg dL}^{-1}$, $n = 6$) than in starved condition ($30.45 \pm 2.12 \text{ mg dL}^{-1}$, $n = 6$). Both anterior and posterior regeneration processes showed significant differences between starving and fed conditions (unpaired t test, $t_{44} = 4.968$, $P < 0.0001$ and $t_{38} = 3.757$, $P = 0.0006$, respectively). Triglycerides during anterior regeneration before feeding differed significantly from both reference values, except for stage 26-d in the starved reference (Fig. 4C). In contrast, differences were not significant following the restoration of food supplies (except for stage 78-d with the field reference, Fig. 4C). During posterior regeneration, differences with the starved reference were not significant at most stages (Fig. 4D), and differences from the field reference were significant only at stages 26-d and 43-d (Fig. 4D).

Finally, two-way ANOVA and Tukey post-hoc analyses demonstrated non-significant differences among sections RT, FS and SS during anterior and posterior regeneration and only the time factor was

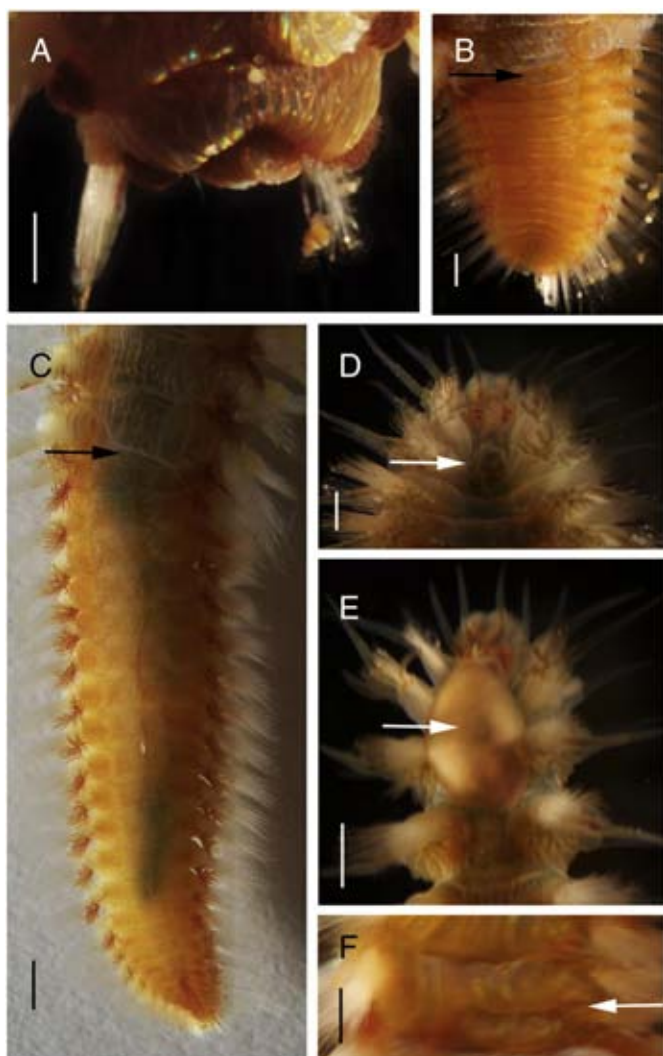


Fig. 3. Posterior regeneration and abnormalities in *Eurythoe cf. complanata* A) closure of the wound 48 h after amputation, B) regeneration at day 43, C) complete regeneration at day 90, D) caruncle deformity with exiguous growth, day 90, E) caruncle deformity with overgrowth, day 90, F) abnormal segmentation, day 90. Arrows B–C indicate amputation, D–F indicate malformations. Scale bars: 1 mm. (For interpretation of the references to color in this figure, the reader is referred to the web version of this article.)

significant for both lipid and triglyceride concentrations. However, the general trend of unfed regenerated worms showed a higher concentration in FS and SS and lower concentration in RT.

4. Discussion

4.1. Regeneration process

The anterior regeneration showed a pattern in the formation of the new anterior end with three phases: prostomium formation, addition of segments and increase in size. Our results agree with general observations by Müller et al. (2003) regarding *E. complanata* regeneration, with immediate closure of the wound and blastema formation, as well as development of antennae as small projections in the new prostomium. However, regeneration time and number of segments differed: worms tested here showed a complete external regeneration (12 segments) at day 35, and subsequently only an increase in size. In contrast, worms tested by Müller et al. (2003) completed their anterior regeneration at day 16 with only six segments on average (when apparently the prostomium should be completely formed). At day 16,

our worms only had a small bud that represented the future prostomium. Their study lasted only 18 days because it focused on the re-configuration of the nervous system, which was not analyzed here. However, the experimental conditions were similar since Müller et al. (2003) maintained the worms at 25 °C with a salinity of 35, and our experimental temperature ranged from 25° to 30 °C and salinity was 34; hence, differences cannot be attributed to experimental conditions. Therefore, the differences between the two studies in regeneration time and number of segments may be attributable to a divergence in the regulatory process that could be related to the cryptic species in the genus, as indicated by Barroso et al. (2010).

In his field study of *E. complanata* (without induced amputation) Kudenov (1974) registered an upper limit of 16 anterior regenerated segments, i.e. in the same order of magnitude as our results (from 12 to 16 new segments). Another similarity with his work is the lack of pigmentation of the recently regenerated tissue. Nevertheless, he observed an “anomalous setal type” which he related to the regeneration process. Our detailed observation of 55 fragments in regeneration and 55 complete worms confirmed that regenerated and non-regenerated worms bear identical normal chaetal types. This observation and the movement of the fragments similar to that of complete worms suggest that regeneration of the *E. cf. complanata* population in the present study does not involve the presence of special types of chaetae.

Regeneration of the posterior end also showed an immediate closure of the wound but, in contrast, no regeneration phases were recognizable during the pygidium regeneration. It is probable that this process depends more on individual features, or is influenced by the physiological state of each worm, than that it follows a common pattern, because worms showed a sudden pygidium formation associated with a varying number of regenerated segments. Alternatively it may be related to stress produced by the lack of food, since the posterior amputation under natural conditions does not involve such a long starvation period. Nevertheless, all the tested anterior fragments were deprived of food supply until day 50 so that they would have conditions similar to those of their respective posterior part, without the mouth. Although specimens would have been able to eat from day 15, such a long period of starvation might affect differently the pygidium formation of each worm. Ahrens et al. (2014) found that amputation of the last 20 posterior segments of *H. carunculata* has a minimal impact on the digestive system. They also described that the anal lobe is the first formation in posterior regeneration prior to segment formation, with individual variation in the number of segments. Our observations also confirm such variation and the complete development of the anal lobe at day 36 in all the fragments.

The food ingestion observed in an advanced stage of anterior regeneration could be related to activation of enzymatic processes. Feeding in amphinomidids involves at least three categories of enzymes acting from the buccal region to the intestine (Marsden, 1963). Thus, it appears that from day 50 after amputation the regenerated tissues of the anterior end are fully structured and worms are therefore able to resume physiological processes in a way similar to that of complete organisms.

Several malformations such as duplication of appendages (antennae, cirrus and palps) have been recorded in Amphinomidae (Liñero-Arana, 1993; Yáñez-Rivera and Salazar-Vallejo, 2011). Buchanan (1893) related the presence of extra parapodia on one side of a segment with regeneration. According to Ahrens et al. (2014), the abnormal segmentation in the regeneration process is related with damage to the ventral nerve cord, which explains our results about abnormal segmentation. The observed caruncle malformations have not been previously reported in amphinomidids and we have not noticed their presence in field specimens; this could indicate that they are related to regeneration. Analysis of the incidence and causes of such abnormal growth could contribute to the study of the annelid nervous system, since the caruncle bears the nuchal organs with sensory function (Plejel, 2001).

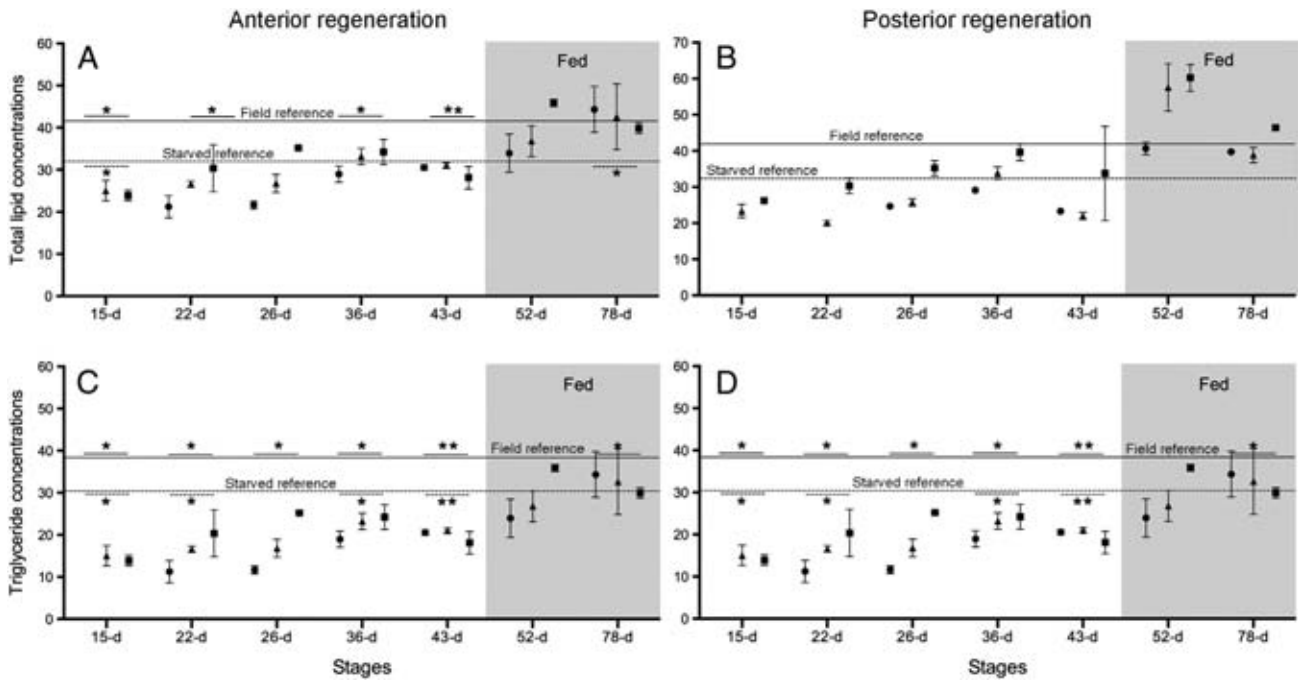


Fig. 4. Total lipid and triglyceride concentrations (mg dL^{-1}) during successive regeneration stages (circles = regenerated tissue; triangles = first segment adjacent to the amputation; squares = seventh segment from amputation; * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.0001$). Significant levels refer to comparisons between values in each time point and mean field (continuous line) and starving (dotted line) references.

The regeneration exhibited by *E. cf. complanata* has important ecological implications because the behavior, survivorship and starvation resistance of all the fragments tested in this study showed a high viability which can be compared with that of worms living under natural conditions. Thus, this process can represent an excellent strategy to increase the number of individuals of the population without involving sexual or asexual reproduction, processes that are mainly endogenously induced (Bely, 2006; Bely and Nyberg, 2009; Durou and Mouneyrac, 2007). Moreover, regeneration is advantageous in intertidal environments because worms are continuously exposed to unpredictable injuries, caused by predators or surrounding rocks that can produce accidental amputations.

4.2. Lipid and triglyceride concentrations

This contribution represents the first attempt to describe the relationship between lipid and triglyceride concentrations as energy reserves, and the regeneration process in marine annelids. Lipids are necessary to maintain physiological processes and are acquired through natural food (Marsden, 1963): there is no lipid depletion when food supplies are continuously available (Koechlin et al., 1981). Our results fit this pattern, since the concentrations of both energy reserves increased significantly after food was supplied to all regenerating fragments at day 50 (Fig. 4). The variation observed afterwards may have depended on the amount of fish consumed by each worm until day 90.

Duration and frequency of starvation in animals under natural conditions can vary widely and in marine environments could be related to tidal cycles, acute weather conditions or seasonal cycles (McCue, 2010). The lack of functional structures from the mouth in anteriorly regenerating fragments of *E. cf. complanata* could be another factor influencing the duration and frequency of starvation. All the fragments were able to regenerate completely without feeding, which indicates that they had enough stores of lipids and triglycerides to survive a starvation period of at least 50 days.

Marsden (1963) and Pocock et al. (1971) observed a considerable reduction of lipid and triglyceride concentrations in polychaetes during starvation periods. Such depletion was evident in starved references and unfed regenerated fragments compared with our field references, especially in the case of triglyceride concentration during anterior regeneration. Low values of total lipid and triglyceride concentrations during regeneration seem to be indicative of a high demand for energy reserves required for the synthesis of new tissue to restore a lost part. Our observations agree with those of Douglas (1970) and Bely and Sikes (2010) that, blastema development occurs in the first days of regeneration, consisting of a non-pigmented mass of undifferentiated cells. The formation of these cells could cause a major demand for energy reserves, and this could explain the significant depletion observed during the early stages of anterior regeneration. Although posterior regeneration does not involve the development of blastema, the energy reduction on stage 15 may be indicative of a similar process.

During the starvation period, energy reserves varied significantly over time without significant differences among sections. Schenk and Hoeger (2010) demonstrated that lipids are mobilized during spermatogenesis in nereidid worms. Such a mobilization could explain our results which suggest that energy reserves were redistributed from the original tissues (FS and SS), which had higher concentrations, to the regenerated tissue (RT), which had lower concentrations of lipids and triglycerides.

Although it is unknown which are the main factors involved in restoration of missing body parts, our results agree with statements about the function that lipids and triglycerides fulfill as energy reserves. Their depletion validated their role as energy suppliers confronting the high metabolic demand during regeneration. This study indicated that colorimetric tests to determine lipid and triglyceride concentrations are sufficiently sensitive to detect small variations during the regeneration process in *E. cf. complanata*. Results generated by the two methods used in this study showed a similar trend since triglycerides constitute a considerable proportion of total lipids. Thus, for further studies to evaluate energy reserves in polychaetes the use of triglycerides method may suffice.

The fireworm *E. cf. complanata* is abundant on rocky shores, is easily collected and maintained in aquaria, and is of an appropriate size to be handled in the laboratory. With its high ability to restore missing body parts, this species could represent an excellent model in the study of issues involved in regeneration, such as gene activation, neurotransmission, protein synthesis and ganglion reconfiguration.

Acknowledgments

This contribution is part of the PhD thesis of BYR (PCMyL–UNAM), supported by CONACyT (175321). We are grateful to Milagros Méndez and Karla Hernández-Fonseca (Laboratorio de Neurobiología Molecular, INPRFM) for their laboratory assistance and suggestions during lipid and triglyceride determinations. Thanks are given to Sergio Rendón and José Salgado (Unidad Académica Mazatlán, ICMyL, UNAM) for their help during sampling and to Alma Nieto for her help in the laboratory. Ann Grant revised the English style of the manuscript. We thank Jerry Kudenov (University of Alaska Anchorage) and one anonymous reviewer for comments on the manuscript. [SS]

References

- Ahrens, J.B., Kudenov, J.D., Marshall, C.D., Schulze, A., 2014. Regeneration of posterior segments and terminal structures in the bearded fireworm, *Hermodice carunculata* (Annelida: Amphinomidae). *J. Morphol.* <http://dx.doi.org/10.1002/jmor.20287> (00, 00–00).
- Barnes, H., Blackstock, J., 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for total lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12, 103–118.
- Barroso, R., Klautau, M., Solé-Cava, A.M., Paiva, P.C., 2010. *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae), the 'cosmopolitan' fireworm, consists of at least three cryptic species. *Mar. Biol.* 157, 69–80.
- Bely, A.E., 2006. Distribution of segment regeneration ability in the Annelida. *Integr. Comp. Biol.* 46, 508–518.
- Bely, A.E., Nyberg, K.G., 2009. Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends Ecol. Evol.* 25, 161–170.
- Bely, A.E., Sikes, J.M., 2010. Latent regeneration abilities persist following recent evolutionary loss in asexual annelids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 1464–1469.
- Buchanan, F., 1893. Peculiarities in the segmentation of certain polychaetes. *Q. J. Microsc. Sci.* 34 (s2), 529–544.
- Douglas, H.S., 1970. Origin of the regeneration blastema in polychaete annelids. *Am. Zool.* 10, 101–112.
- Durou, C., Mouneyrac, C., 2007. Linking steroid hormone levels to sexual maturity index and energy reserves in *Nereis diversicolor* from clean and polluted estuaries. *Gen. Comp. Endocrinol.* 150, 106–113.
- Koehlin, N., Polonsky, J., Varenne, J., 1981. Accumulation of cholesterol and cholesterol esters in the nephridia of a polychaete annelida (*Sabella pavonina* Savigny). *Comp. Biochem. Physiol.* 68A, 391–397.
- Kudenov, J.D., 1974. The Reproductive Biology of *Eurythoe complanata* (Pallas, 1766), (Polychaeta: Amphinomidae). (Ph. D. Thesis) University of Arizona, (128 pp.).
- Liñero-Arana, I., 1993. Anélidos poliquetos de la costa nororiental de Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venez.* 32, 17–26.
- Marsden, J.R., 1963. A preliminary report on digestive enzymes of *Hermodice carunculata*. *Can. J. Zool.* 41, 159–164.
- Marsden, J.R., 1976. Classes of lipid in two polychaetes, an echiuroid and a sipunculid from the coast of Kenya, East Africa. *Comp. Biochem. Physiol.* 53B, 225–229.
- McCue, M.D., 2010. Starvation physiology: reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comp. Biochem. Physiol.* 156A, 1–18.
- Moran, A.L., McAlister, J.S., 2009. Egg size as a life history character of marine invertebrates: is it all it's cracked up to be? *Biol. Bull.* 216, 226–242.
- Müller, M.C.M., Berenzen, A., Westheide, W., 2003. Experiments on anterior regeneration in *Eurythoe complanata* ("Polychaeta", Amphinomidae): reconfiguration of the nervous system and its function for regeneration. *Zoomorphology* 122, 95–103.
- Pleijel, F., 2001. Amphinomida Lamarck, 1818. In: Rouse, G.W., Pleijel, F. (Eds.), *Polychaetes*. Oxford University Press, New York, pp. 145–147.
- Pocock, D.M.E., Marsden, J.R., Hamilton, J.G., 1971. Lipids in an intertidal polychaete and their relation to maturation of the worm. *Comp. Biochem. Physiol.* 39, 683–697.
- Schenk, S., Hoeger, U., 2010. Lipid accumulation and metabolism in polychaete spermatogenesis: role of the large discoidal lipoprotein. *Mol. Reprod. Dev.* 77, 710–719.
- Schenk, S., Harris, R.J., Hoeger, U., 2006. A discoidal lipoprotein from the coelomic fluid of the polychaete *Nereis virens*. *Comp. Biochem. Physiol.* 143B, 236–243.
- Yáñez-Rivera, B., Salazar-Vallejo, S.I., 2011. Revision of *Hermodice* Kinberg, 1857 (Polychaeta: Amphinomidae). *Sci. Mar.* 75, 251–262.
- Zar, J.H., 1996. *Biostatistical Analysis*, third ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

Capítulo VII

Aspectos reproductivos del gusano de fuego *Eurythoe* sp. A

Introducción

Los anélidos marinos presentan una gran variedad de estrategias reproductivas aunque el patrón generalizado es la reproducción sexual con organismos gonocóricos, el hermafroditismo se presenta usualmente en familias con hábitos tubícolas o especies intersticiales (Giangrande, 1997). También es frecuente la reproducción asexual, principalmente en las especies tubícolas gregarias, como Sabellidae y Serpulidae (Kupriyanova *et al.*, 2001; Rouse y Pleijel, 2006). En la reproducción asexual o esquizotomía se identifican dos modelos básicos: paratomía y arquitomía. En el primer caso, el nuevo organismo se desarrolla por completo antes de separarse del parental, mientras que en la arquitomía, la fragmentación ocurre antes de la formación de las regiones faltantes del nuevo individuo, principalmente de la cefalización (Rouse y Pleijel, 2001). La variedad de estrategias se incrementa al considerar la temporalidad, ya que algunas especies se reproducen una vez al año por varios años, otras una sola vez en la vida y otras, pueden reproducirse continuamente (e.g. *Branchiomma bairdi*, Tovar-Hernández *et al.*, 2011). El conocimiento sobre la biología reproductiva de anélidos marinos se limita a pocas especies, ya que el ciclo de vida se ha estudiado en aproximadamente el 3% de las especies descritas; además, sólo el 0.1% de los estudios describen detalladamente la producción de óvulos (Eckelbarger, 2005). Es habitual que las estrategias reproductivas sean similares entre especies cercanas, aunque cada especie puede presentar particularidades (Fischer y Dorresteijn, 2004).

Los estudios sobre la reproducción en los anfinómidos son escasos, ya que sólo se ha estudiado el ciclo reproductivo anual de *Eurythoe complanata* sensu lato e *Hipponoe gaudichaudi* (Kudenov, 1974, 1977) pero no se ha logrado la caracterización larval completa y metamorfosis de ninguna especie (Reish y Pernet, 2009). Los anfinómidos se

consideran gonogóricos y se ha descrito una diferencia de coloración entre machos y hembras maduros debido a la presencia de gametos en la cavidad celómica (Allen, 1957; Kudenov, 1974). La fecundación se presenta en la columna de agua, por lo que la transferencia de gametos no involucra contacto entre los organismos parentales. La hembra libera los gametos una sola vez al año mientras que el macho lo hace varias veces (Kudenov, 1974). En los anfinómidos se desconocen los detalles que controlan la sincronización de la liberación de gametos; sin embargo, en otras especies se ha demostrado que son procesos complejos regulados por factores endócrinos, ambientales y de comunicación química (Andries, 2001; Murray *et al.*, 2011).

Se considera que los anfinómidos presentan una larva rostraria de larga duración (Pleijel, 2001). Sin embargo, no se han realizado estudios genéticos ni de desarrollo que demuestren con certeza que los anfinómidos poseen una larva rostraria, ya que la asociación de la larva con el grupo se determinó a partir de la estructura de las setas (Ahrens *et al.*, 2013). La generalización de la larva rostraria para toda la familia podría ser una simplificación de las estrategias reproductivas en los anfinómidos, ya que las larvas observadas sólo se han asignado a algunos géneros como: *Chloeia*, *Chloenopsis* (como *Chloenea*) e *Hipponoe* (Bhaud, 1972). En el desarrollo larvario de *Eurythoe complanata* sensu lato de Puerto Peñasco (Sonora), descrito por Kudenov (1974), no se observó la larva rostraria. Dicho autor indicó que después de la fecundación se desarrolla una larva ciliada, posteriormente una larva trocófora que en la siguiente fase presenta unas setas largas que facilitan la flotación, y a las 72 h es una larva metatrocófora, que comienza a alimentarse, incrementa su tamaño e inicia la formación de segmentos. Otra particularidad que apuntó Kudenov (1974) fue la combinación de estrategia sexual y asexual. Con estos antecedentes se explicó la aparente distribución circumtropical de esta especie, ya que la reproducción asexual favorecería un incremento rápido de la población local, mientras que las características de la larva permitirían su dispersión. Actualmente se ha demostrado que la especie nominal *Eurythoe complanata* en realidad corresponde a un complejo con por lo menos tres especies (Barroso *et al.*, 2010). También se sabe que la falta de alguna región del cuerpo o la presencia de organismos en regeneración no se relacionan directamente con reproducción

asexual (Yáñez-Rivera y Méndez, 2014, Cap. VI), debido a que la reproducción asexual es un proceso endógeno y la regeneración es la respuesta ante un estímulo externo (Bely, 2006).

En la revisión del género (Cap. V) se llegó a la conclusión que la especie de *Eurythoe* en Mazatlán no corresponde a ninguno de los taxones identificados por Barroso *et al.* (2010) dentro del complejo *E. complanata*, por lo que aquí se ha denominado *Eurythoe* sp. A. Con la finalidad de incrementar el conocimiento sobre los aspectos reproductivos de los anfinómidos, se estudió esta especie a partir de la caracterización de un ciclo reproductivo anual con muestreos mensuales. Los objetivos en este capítulo son: *i*) identificar las variaciones en el tamaño de los organismos a lo largo del año, *ii*) determinar si *Eurythoe* sp. A, presenta la combinación de la estrategia sexual (producción de gametos) y asexual (alta frecuencia de organismos en regeneración limitada temporalmente), *iii*) describir el desarrollo larvario mediante fecundación inducida, y *iv*) evaluar la incidencia de malformaciones. Este último objetivo emanó de los resultados del estudio de regeneración (Cap. VI), ya que se observaron una serie de malformaciones tanto en el patrón de segmentación como en la carúncula, por lo que se decidió evaluar su incidencia en los organismos de campo, sin amputación experimental.

Método

Monitoreo mensual

Se realizaron muestreos mensuales desde abril de 2013 hasta marzo de 2014 en la playa rocosa de Cerritos, Mazatlán, Sinaloa (23° 18' N, 106° 29' W). Esta playa se caracteriza por presentar una gran densidad de *Eurythoe* sp. A. El muestreo intermareal se efectuó en bajamar los días de luna llena. Se recolectaron los gusanos encontrados por una persona en el transcurso de 1 h (n>30, en todos los meses). Los organismos se trasladaron al laboratorio donde se ubicaron en una pecera con flujo continuo de agua de mar, con

aereación, arena y rocas de la localidad simulando las condiciones naturales (salinidad 34 y temperatura 25–30°C).

Se contó el número de segmentos de cada gusano al revisar los organismos en un microscopio de disección LEICA S6E y se determinó el peso húmedo con una balanza digital (0.01 g de precisión, Yamato LW3200). La presencia de gametos se estableció mediante la revisión del celoma, cuya muestra se obtuvo a partir de una incisión o con la extracción de un parápodo de los segmentos medios; posteriormente, se revisó con ayuda de un microscopio compuesto LEICA DME (10X y 40X). También se registraron las anomalías presentes en el cuerpo del gusano y la evidencia de regeneración. Para considerar los organismos en regeneración, solamente se contaron los gusanos cuya fragmentación no se pudo atribuir a la manipulación. Estos organismos presentaron estados posteriores a la formación del blastema, cuando ya se observa tejido irrigado, aproximadamente 10 días posteriores a la amputación y cuando aún hay una diferencia notable de tamaño entre la región regenerada y la preexistente (≈ 70 días; Yáñez-Rivera y Méndez, 2014, Cap. VI). El incremento en la frecuencia de organismos en regeneración limitada temporalmente, se consideró como reproducción asexual, ya que sería el resultado de una regulación endógena y no solamente la respuesta a una amputación incidental por algún factor externo (Bely, 2006). El manejo de los organismos se facilitó al revisarlos en agua de mar fría ($<4^{\circ}$ C) lo que reduce sus movimientos (Méndez y Páez-Osuna, 1998).

Después de la revisión, la mayoría de los gusanos se regresaron al campo, a una zona restringida de la misma localidad, donde posteriormente no se recolectó para evitar la captura de los mismos individuos. Aproximadamente 20 gusanos se procesaron para el análisis histológico y 15 se depositaron en la Colección de Referencia de la Unidad Académica Mazatlán (EMU). El peso húmedo y el número de segmentos se utilizaron como medida del tamaño de los organismos.

Los factores ambientales considerados fueron la temperatura (reproducción sexual y asexual) y la incidencia de ciclones tropicales (en organismos con evidencia de regeneración, ya que estos eventos podrían producir la ruptura de los organismos). Los datos de temperatura superficial del agua se obtuvieron del portal de la NOAA (<http://disc.sci.gsfc.nasa.gov/giovanni>), para la zona de estudio. Se consideraron tanto las temperaturas de día como de noche (1,500 datos). La incidencia de ciclones tropicales se tomó del registro del Servicio Meteorológico Nacional para el Pacífico mexicano en las tres categorías: depresión tropical, tormenta tropical y huracán (<http://smn.cna.gob.mx>).

Histología

La caracterización de los gametos se complementó con cortes histológicos. Las muestras se prepararon con dos lavados previos en HNO₃ al 10%, durante 30 minutos, para evitar que las setas calcáreas dañaran el tejido en los cortes. Esta técnica es una modificación de la que se aplica en esponjas incrustantes de corales, para retirar los restos calcáreos (Bautista-Guerrero *et al.*, 2010, 2014). Posteriormente, fueron lavadas varias veces con agua destilada y se deshidrataron con alcohol al 80, 90, 96% y absoluto. Las muestras se embebieron en parafina a 60° C usando un embebedor Leica EG1150C y se realizaron cortes histológicos (7 µ) con un microtomo Leica RM2125RT. Finalmente, fueron teñidos con la técnica de Hematoxilina de Mayer/Floxina-Eosina y con la tricrómica de Mallory y Masson (Sheehan y Hrapchak, 1980).

Fecundación “in Vitro”

Cuando se observaron gametos en el celoma, se extrajeron mediante el rompimiento de la pared corporal y se succionaron con pipetas Pasteur con ayuda de un microscopio de disección LEICA S6E. Se mezclaron óvulos y espermatozoides en agua de mar filtrada e irradiada con UV a 32° C. La mezcla de los gametos se colocó a temperatura ambiente en un contenedor con 500 ml de agua de mar y bomba de aire en la parte inferior para facilitar la flotación de las larvas. El seguimiento del desarrollo larvario se documentó con

microfotografías, utilizando una cámara digital Canon EOS REBEL XSI montada en el microscopio compuesto LEICA DME con el adaptador para microscopio MM-SLR ADAPTER. Como alimento se agregó espinaca deshidratada y tamizada ($<40 \mu$). En estas condiciones se obtuvieron los estadios larvarios durante 72 h de desarrollo.

Cabe destacar que en agosto de 2012 se realizó un ensayo preliminar y la mezcla de gametos se colocó en cajas multipozos, de seis y nueve pozos y se incubaron en una habitación con temperatura controlada (26-28° C). En esa ocasión, ocurrió la fecundación pero los cigotos no fueron viables, la mayoría murió antes de alcanzar el primer estadio larval, durante la segmentación en el estadio de blástula.

Análisis de datos

Para determinar diferencia entre el número de segmentos, el peso húmedo y la incidencia de malformaciones entre los meses del año, se verificó la normalidad de los datos con la prueba de D'Angostino y Pearson. Dado que los datos no fueron normales, se aplicó una comparación de Kruskal Wallis y un análisis *post hoc* de Dunn (Legendre y Legendre, 1983). Se determinó la relación entre el número de segmentos y el peso húmedo utilizando los datos transformados (\log_{10}) y un modelo de regresión lineal (Harvey y Pagel, 1991). Se compararon las pendientes de las relaciones morfométricas de organismos normales, con gametos y con evidencia de regeneración mediante un análisis de covarianza. Se aplicó el índice de correlación de Spearman para determinar la relación entre la temperatura superficial del agua con la frecuencia de organismos con evidencia de regeneración y la presencia de gametos, así como la incidencia de ciclones tropicales con la frecuencia de organismos con evidencia de regeneración (Legendre y Legendre, 2003). Los análisis se realizaron con el programa Prism 5.0c para Mac OS X, GraphPad Software.

Resultados

i) Tamaño

Durante el ciclo anual estudiado no se detectó un patrón regular en el tamaño de los organismos, ya que en todos los meses se observaron gusanos de diferentes tallas (Fig. VII.1). El individuo de mayor tamaño se encontró en enero, con 253 segmentos y 9.53 g (≈ 25 cm). En este mes, también se capturó el más ligero (0.23 g), con 45 segmentos, mientras que el individuo con menor número de segmentos (39) se encontró en julio, con 0.3 g de peso. En general no hubo diferencias significativas entre los meses (prueba *post hoc* de Dunn: $p > 0.05$), a excepción de febrero, cuando se registró un intervalo menor tanto en el número de segmentos como en el peso de los organismos (segmentos: 43 a 121; peso: 0.16 a 3.06 g), por lo que este mes presentó diferencias significativas respecto al mes de abril (segmentos: 73 a 138; peso: 0.83 a 5.75 g), agosto (segmentos: 59 a 149; peso: 0.47 a 5.32 g), y junio (sólo en el peso húmedo, 0.54 a 5.83 g).

La relación entre el número de segmentos, como medida de longitud (x), y el peso de los organismos (y) fue alométrica positiva y no mostró diferencias a lo largo del año (análisis de covarianza, $F=1.75962$, $p=0.0587$, $DFd=448$). No obstante, esta relación presentó diferencias entre organismos con evidencia reciente de regeneración ($y=2.447x-4.612$, $R^2=0.71$, $DFd=69$) y sin regeneración ($y=1.933x-3.567$, $R^2=0.61$; $F=7.06486$, $p=0.0081$, $DFd=395$). También se detectó diferencia entre los organismos con gametos y sin gametos; sin embargo, en este caso el coeficiente de determinación fue bajo ($R^2=0.20$), por lo que el modelo no se consideró representativo.

ii) Reproducción sexual: gametos y fecundación “*in Vitro*”

Los organismos con gametos y la mayor proporción de organismos en regeneración mostraron temporalidad. Sólo se observaron machos con más de 70 segmentos en julio y agosto, y hembras con más de 79 segmentos desde julio a septiembre. La morfología de los espermatozoides consiste en un núcleo esférico de 2.5 μ y un flagelo. Los espermatozoides fueron abundantes y se encontraron distribuidos principalmente en la mitad dorsal de cada

segmento, no en la ventral (Fig. VII.2A, B). Por el contrario, los gametos femeninos, de color naranja, se encontraron dorsal y ventralmente (Fig. VII.2C). Los óvulos se diferenciaron de los ovocitos (entre 50 y 80 μ), por su mayor tamaño ($\approx 100 \mu$), así como por el desarrollo de la membrana vitelina que es delgada en los ovocitos (Fig. VII.2D).

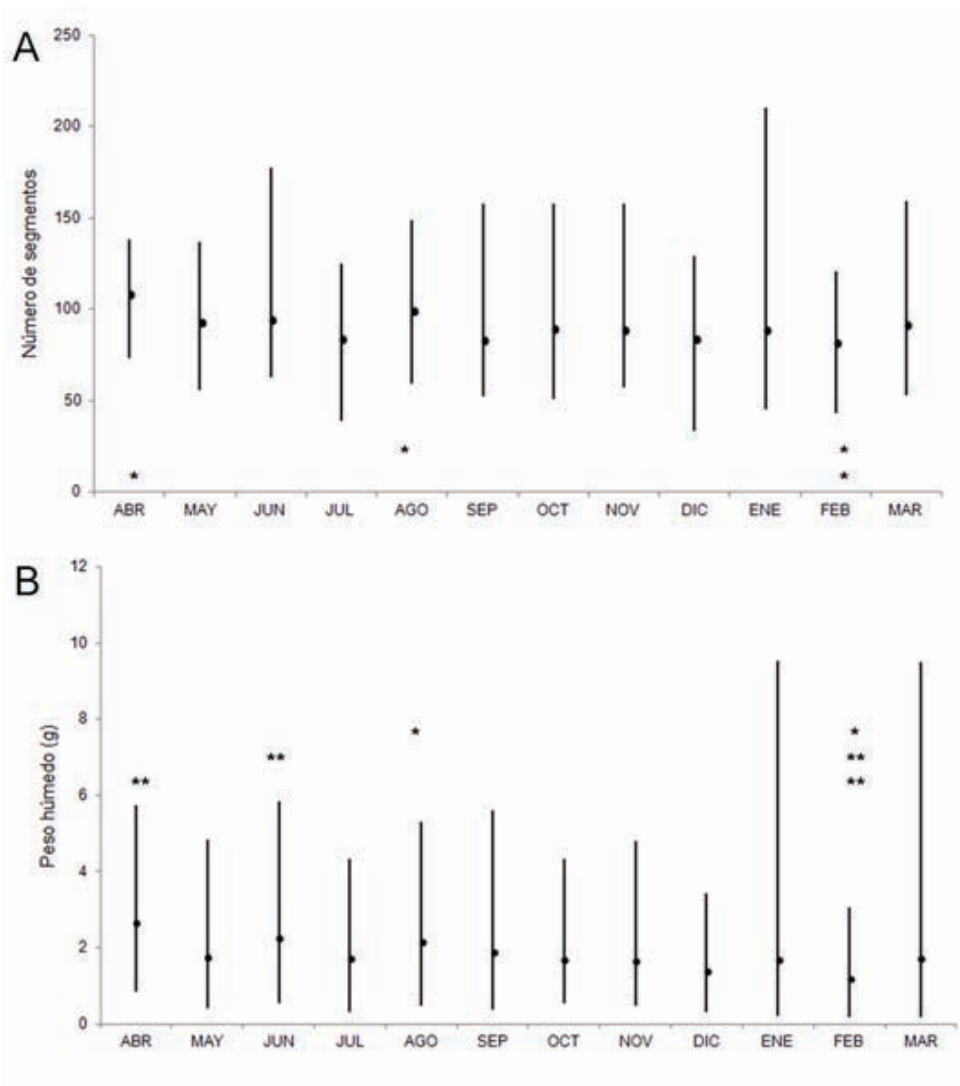


Figura VII.1. Tamaño de los organismos de *Eurythoe* sp. A recolectados. A) número de segmentos; B) peso húmedo; el punto indica el valor medio para el mes y las barras los valores máximos y mínimos. Diferencia significativa *: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$ (prueba *post hoc* de Dunn).

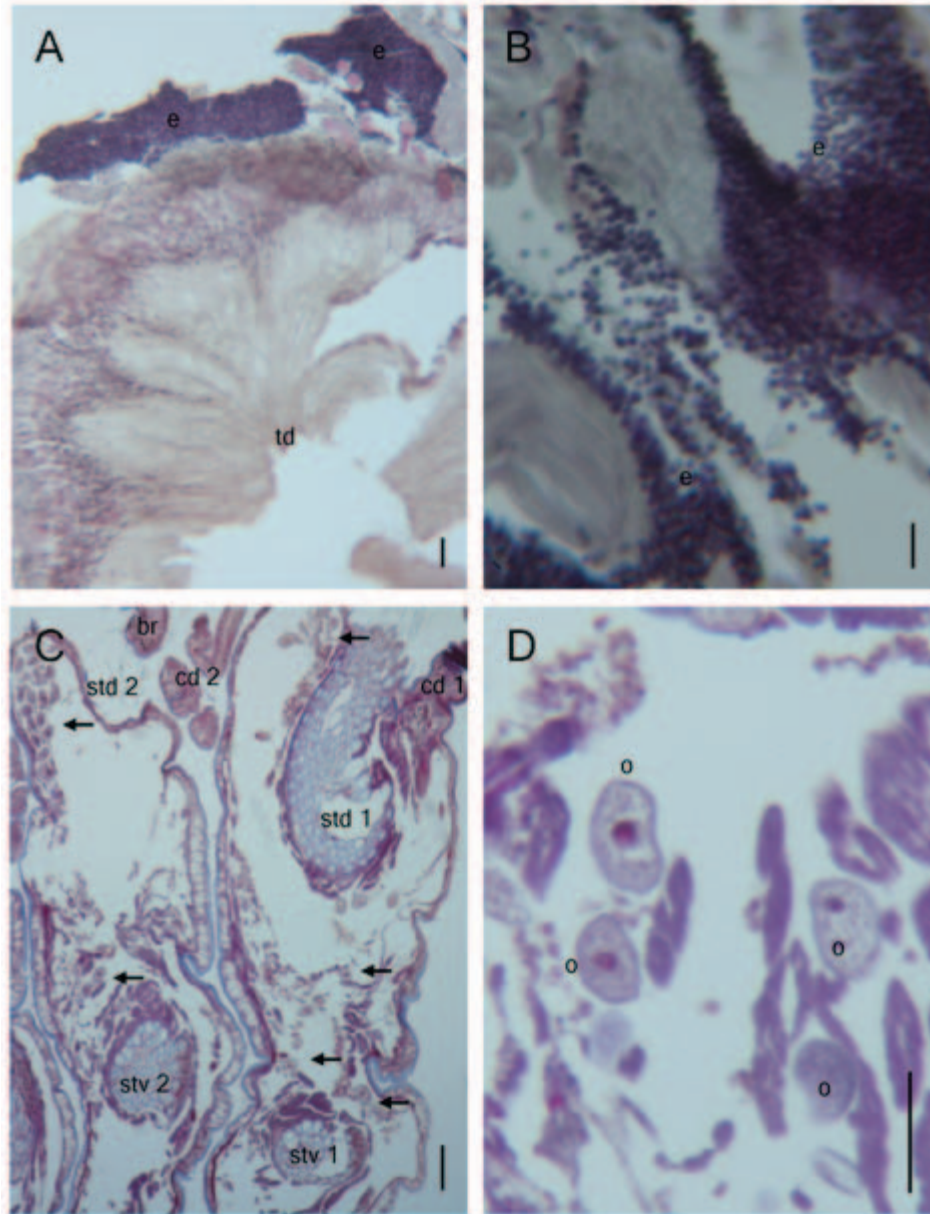


Figura VII.2. Cortes histológicos de organismos con gametos. A) Espermatozoides en la región superior del celoma, arriba del tubo digestivo, corte transversal; B) espermatozoides entre el tejido dorsal, corte transversal; C) corte sagital en los parapodos señalando con flechas los ovocitos; D) ovocitos en la región ventral (br: branquia, e: espermatozoides, cd: cirro dorsal 1 y 2, o: ovocito, std: setígero dorsal 1 y 2, stv: setígero ventral 1 y 2, td: tubo digestivo). Escalas: A) 25 μ , B) 10 μ , C) 100 μ , D) 75 μ .

En agosto, cuando se registraron las temperaturas más elevadas, se presentó una mayor proporción de organismos con gametos (Fig. VII.3). Se encontró una correlación de

Spearman positiva entre la temperatura y la presencia de gametos ($r=0.6841$, $p<0.0001$, $n_{xy}=12$).

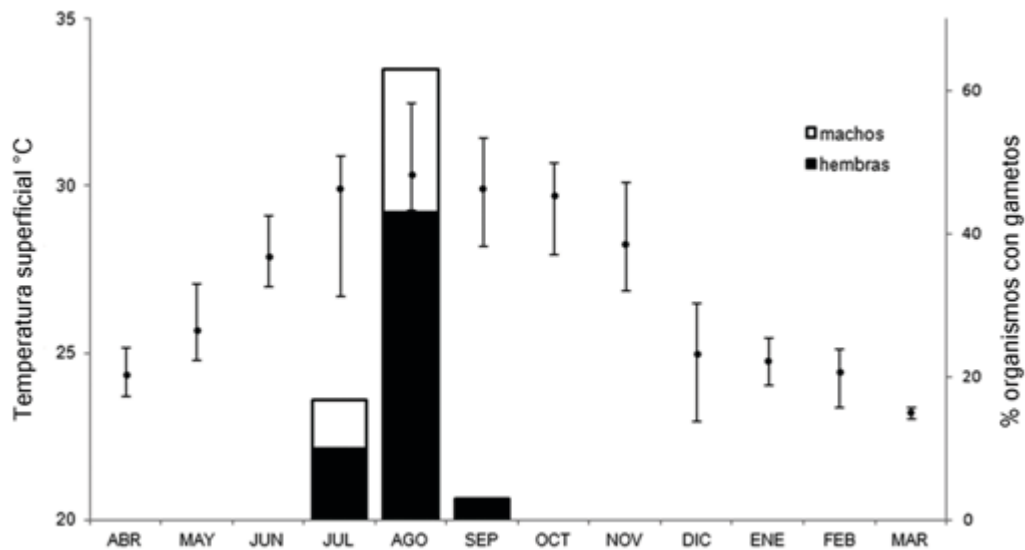


Figura VII.3. Frecuencia de organismos de *Eurythoe* sp. A con gametos (barras) y temperatura superficial del agua registradas a lo largo del estudio, el punto indica el valor medio para el mes y las barras los valores máximos y mínimos.

La fecundación únicamente se logró con los gametos obtenidos en agosto. La membrana de fecundación se formó en los primeros minutos (Fig. VII.4A); sin embargo, los espermatozoides continuaron rodeando al óvulo. A partir de la primera hora se observó la segmentación (Fig. VII.4B). Después de la gastrulación se desarrolló una larva ciliada (Fig. VII.4C). Esta larva ciliada dio lugar a la larva trocófora (Fig. VII.4D), la cual se observó a partir de 24 horas después de la fecundación. Se observaron las dos bandas de cilios características: la prototroca y la metatroca.

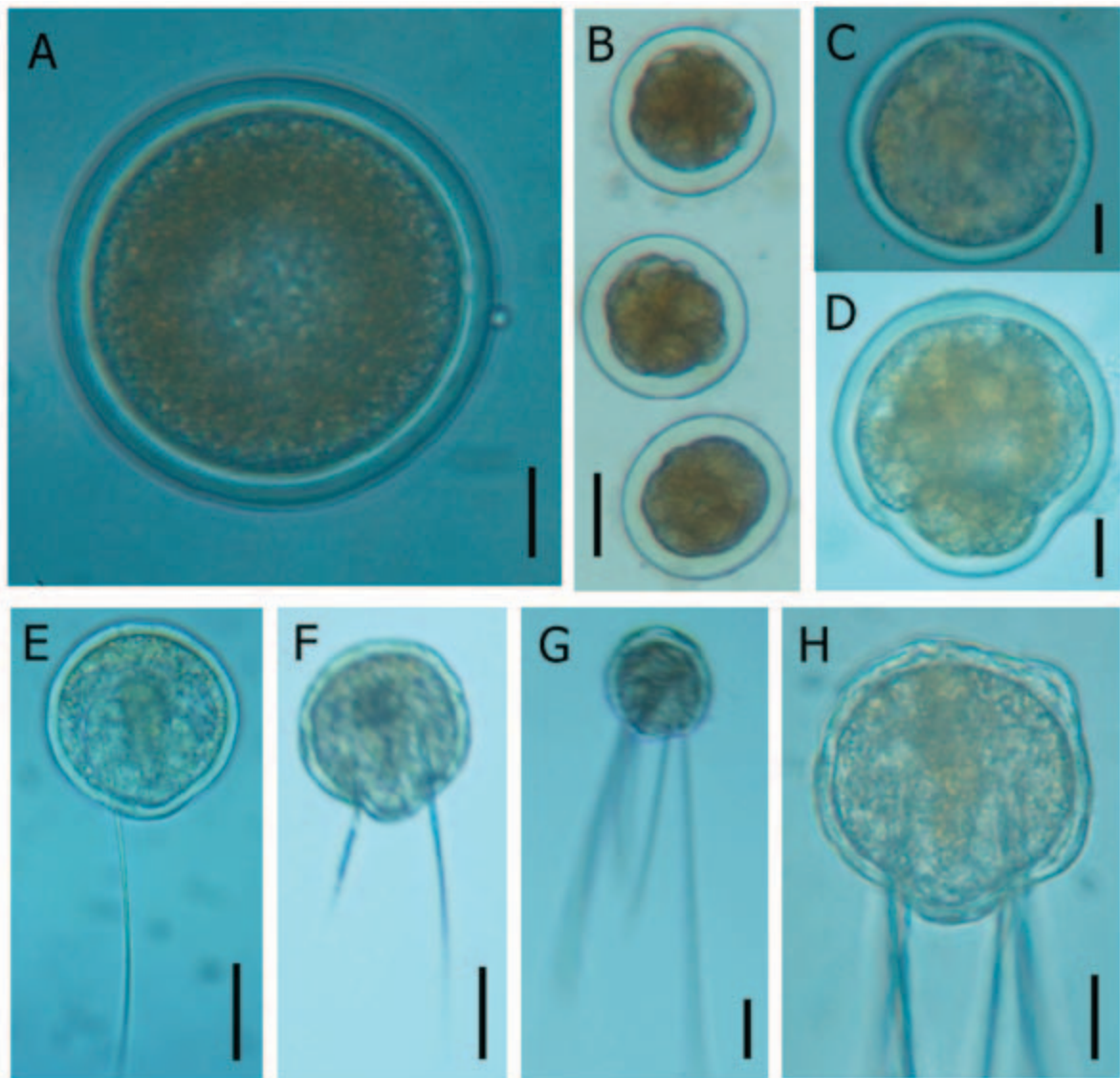


Figura VII.4. Desarrollo de *Eurythoe* sp. A. A) Óvulo con membrana de fecundación y espermatozoide; B) mórula; C-H) larvas obtenidas después de 18 h (C), 24 h (D), 44 h (E), 50 h (F), 60 h (G y H). Escalas: A, C, H) 20 μ , B) 50 μ , E, F, G) 35 μ .

Los estadios siguientes se diferenciaron por la emergencia de las setas: primero se proyectó una seta larga (Fig. VII.6E), lo que le confirió a la larva cierta asimetría. En este momento de desarrollo de la larva trocófora también fueron notables los ojos y el tubo digestivo. Después de la aparición de la primera seta, se desarrolló una segunda (50 horas),

restableciendo el eje de simetría (Fig. VII.6F). Posteriormente, emergieron varias setas largas conformando un grupo de tres a cuatro en cada lado (Fig. VII.6G, H). A partir de la emergencia de las setas la larva se desplazó controladamente en la columna de agua, ya que la contracción de éstas al centro le permitía subir en la columna de agua y al expandirlas se desplazaba hacia abajo. Los diferentes estadios con setas se observaron desde 44 horas después de la fecundación hasta 72 horas. En las últimas horas de observación comenzó una transformación en la morfología de la larva, ya que se desarrollaron unas protuberancias que probablemente darían origen al prostomio en la región anterior y a los segmentos en región posterior. No obstante, no se observaron signos de segmentación aparente debido a que todas las larvas murieron antes de alcanzar el estadio de metatrocófora.

iii) Regeneración y reproducción asexual

Los organismos con evidencia de regeneración se observaron a lo largo del año con una frecuencia variable. La mayor proporción se encontró en septiembre (>60%) y octubre (40%), mientras que en los demás meses, no excedió el 25% (Fig. VII.5). La correlación con las variables ambientales sólo fue significativa para la temperatura ($r=0.5802$, $p<0.0001$, $n_{xy}=12$, Fig. VII.5A). El número de ciclones tropicales, al parecer, no se relaciona directamente con la frecuencia de los organismos en regeneración, ya que la correlación de Spearman no fue significativa. En agosto y octubre ocurrió el mismo número de ciclones y la proporción de organismos en regeneración fue diferente, mientras que en septiembre, cuando se incrementó la frecuencia de organismos en regeneración, las tormentas registradas fueron las mismas que en mayo y junio, cuando la frecuencia de organismos en regeneración fue <10% (Fig. VII.5B).

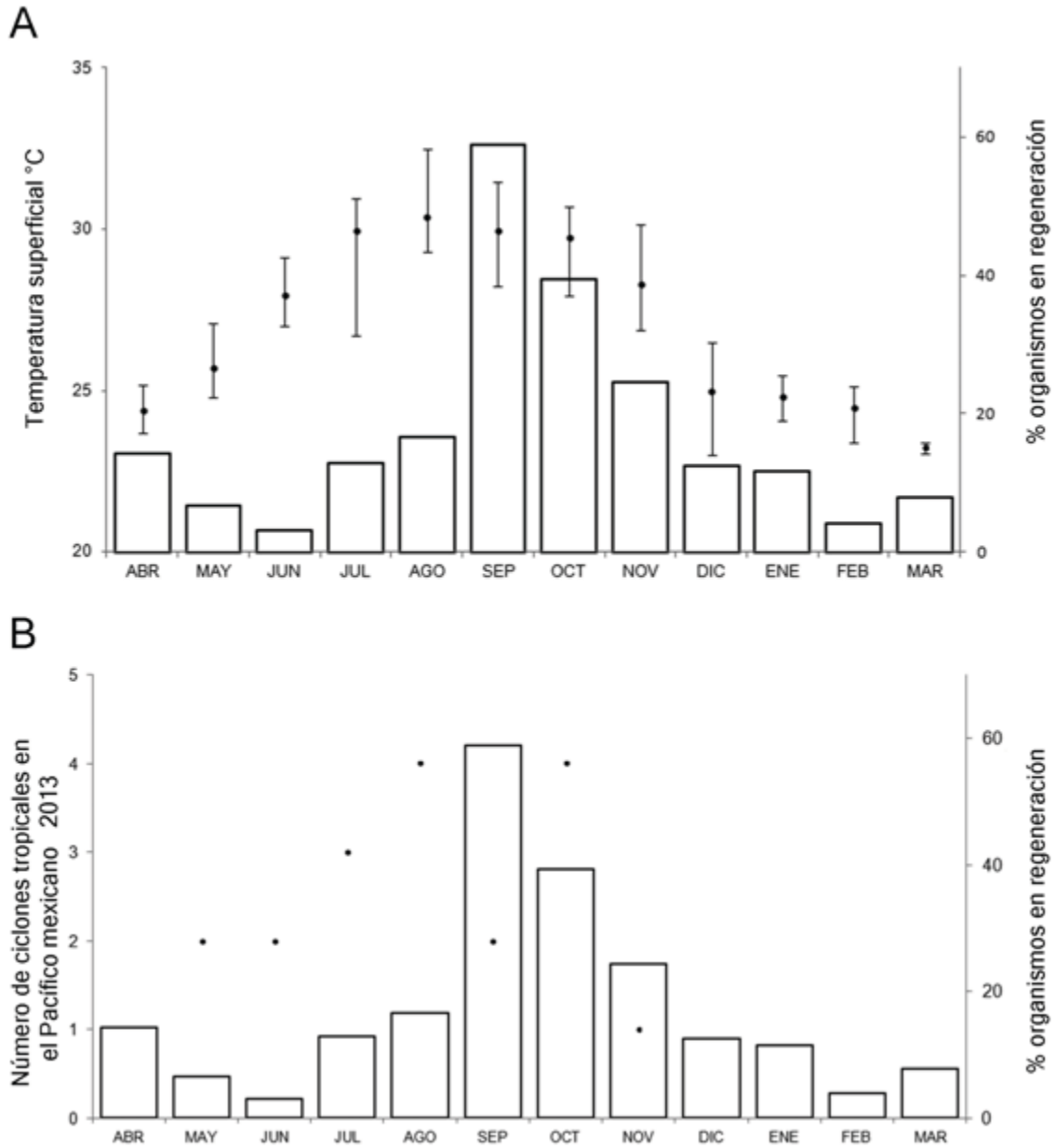


Figura VII.5. Frecuencia de organismos de *Eurythoe* sp. A en regeneración (barras) y factores ambientales registrados a lo largo del estudio. A) Temperatura superficial del agua, el punto indica el valor medio para el mes y las barras los valores máximos y mínimos; B) número de ciclones.

iv) *Malformaciones*

Las alteraciones en el patrón normal de segmentación fueron consideradas como anomalías (Fig. VII.6A) y corresponden a dos tipos, que se denominaron “segmento

simulado” y “malformación”. El segmento simulado (Fig. VII.6B) se caracterizó como un pliegue intersegmental ancho, prácticamente la mitad de un segmento normal que carece de branquias o parápodos. La malformación se caracterizó como una asimetría en el patrón de segmentación, ya fuese como un sólo parápodo extra en un solo lado (asimetría 2:1; Fig. VII.6C), dos parápodos (asimetría 3:1; Fig. VII.6D) o, parápodos extra en segmentos contiguos (Fig. VII.6E, F).

Durante el ciclo reproductivo estudiado se observó una proporción variable de las anormalidades sin diferencias significativas a lo largo del año. Un mismo organismo puede presentar ambos tipos de anormalidades, aunque esta combinación de malformaciones, no fue tan frecuente (<23%, Fig. VII.7A). La anormalidad más común fue la malformación asimétrica que, en la mayoría de los meses, representó más del 30%. El segmento simulado se observó en un 20% de los organismos y mostró una distribución particular en el cuerpo del gusano. Prácticamente, sólo se encontró en el primer tercio anterior, entre los segmentos 12 al 20, y en pocos organismos se observó antes del segmento 12 y después del 20. Un solo organismo presentó el segmento simulado a la mitad del cuerpo. En la mayoría se encontró entre el segmento 15 y el 17, fue frecuente del segmento 12 al 14 y menos común del 18 al 20 (Fig. VII.7B). La anormalidad más común fue la asimetría de un solo parápodo extra (2:1), la cual se observó en un solo segmento en todo el cuerpo o en varios segmentos, ya sea contiguos o no. Esta anormalidad presentó la mayor frecuencia, ya que en varios meses fue >40%. La asimetría por dos parápodos extras (3:1) fue rara, se observó con una frecuencia baja (<5%) y sólo en cuatro meses (Fig. VII.7C).

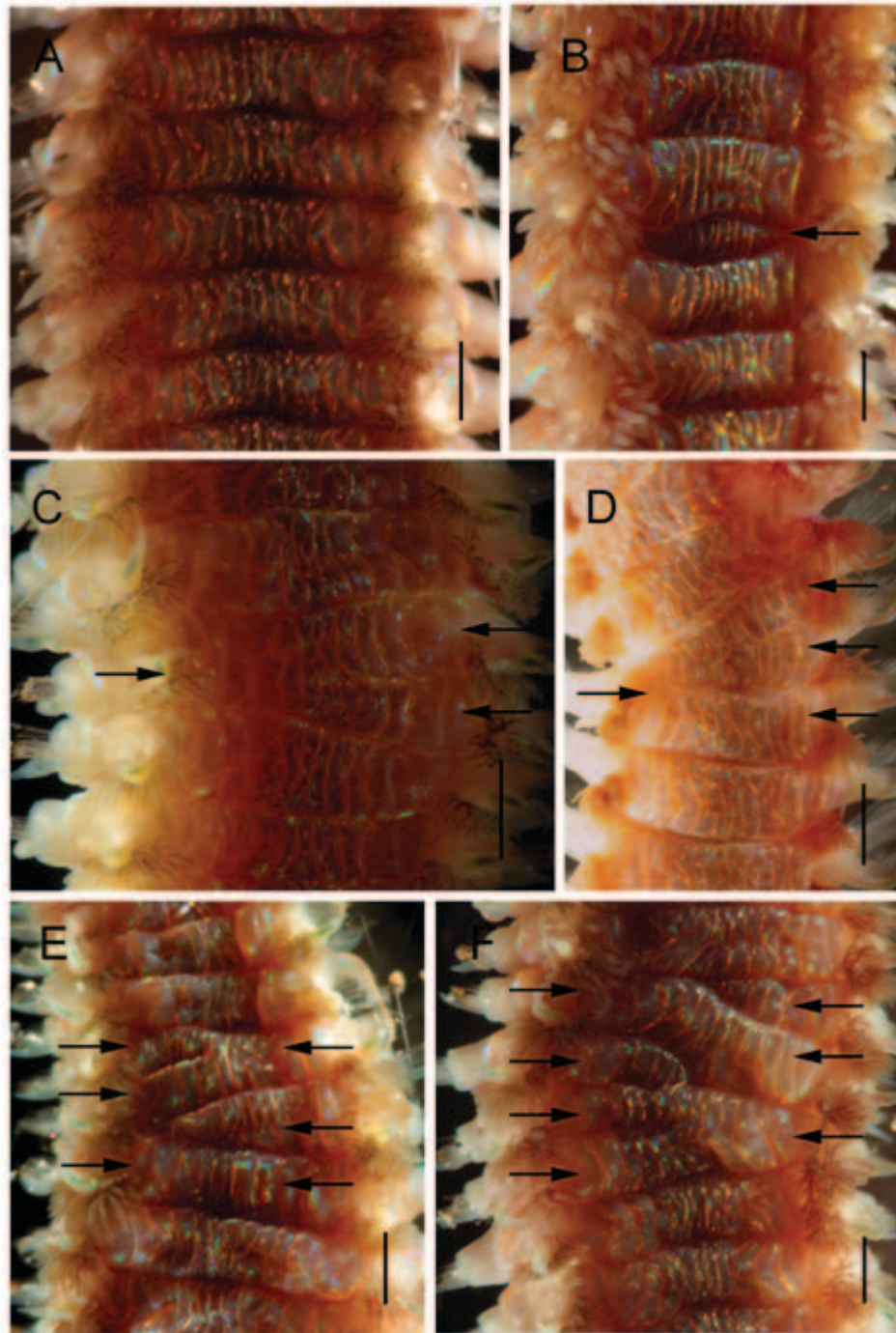


Figura VII.6. Segmentos en *Eurythoe* sp. A. A) normal; B) segmento simulado; C) un parápodo extra, asimetría 2:1; D) dos parápodos extras, asimetría 3:1; E) asimetría 2:1 en segmentos contiguos; F) asimetría 2:1 y 3:1 en segmentos contiguos. Escalas A-F: 1 mm.

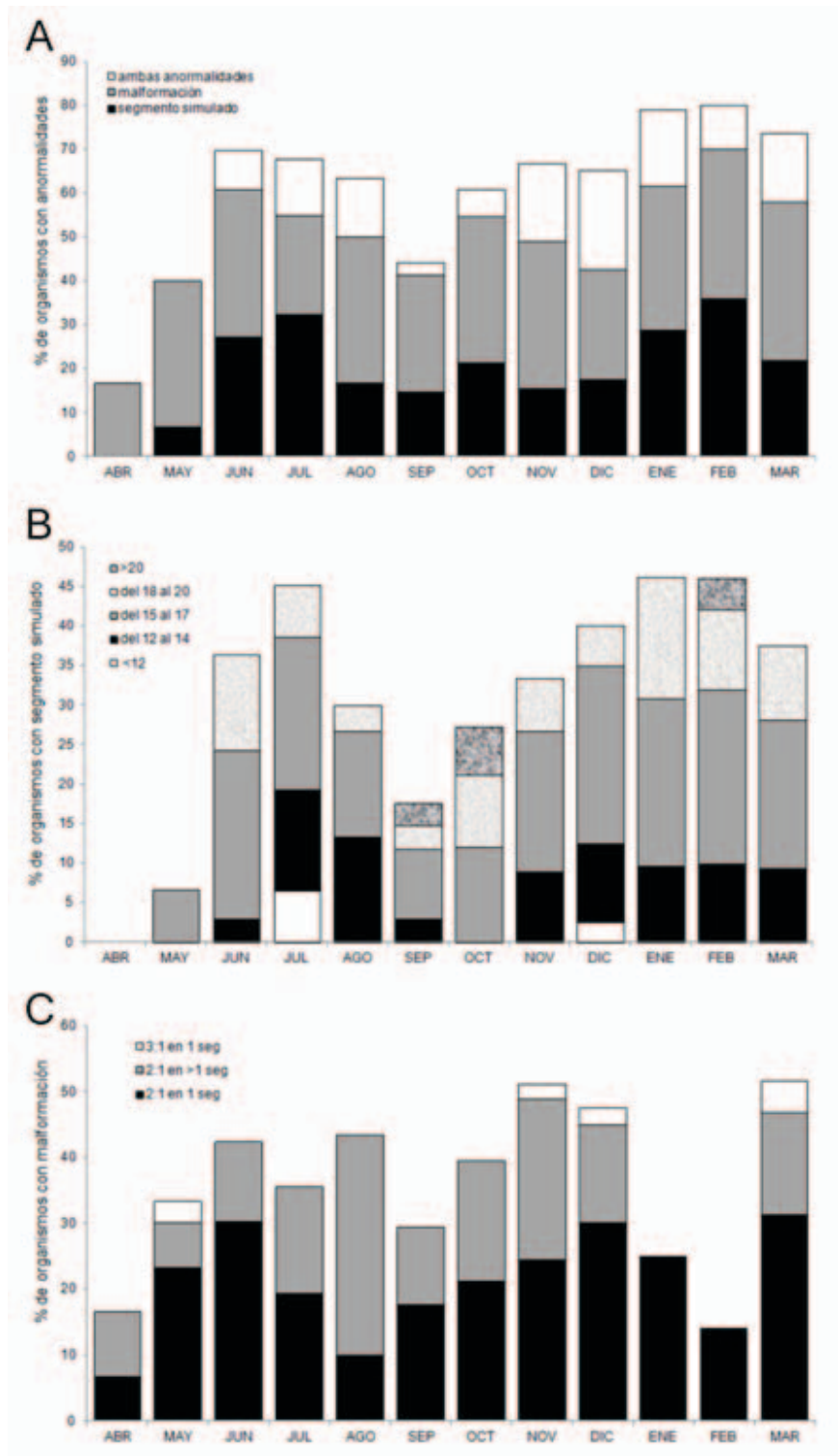


Figura VII.7. Frecuencia de las anomalías en *Eurythoe* sp. A) porcentaje de organismos con anomalías indicando el tipo; B) porcentaje de organismos con segmento simulado indicando el intervalo de segmentos en los que se encuentra; C) porcentaje de organismos con malformación indicando el tipo de asimetría.

Discusión

i) Tamaño

En este estudio no se observaron patrones regulares en la talla de los organismos, comparativamente, el único estudio de referencia para el género *Eurythoe* registró una reducción en el número de segmentos en mayo y un incremento gradual a partir de ese mes (Kudenov, 1974). El intervalo de los valores medios es comparable entre ambos estudios (76–106 en Puerto Peñasco vs. 81–107 en este estudio). Respecto al peso húmedo, los valores medios obtenidos son menores (3.4–6.5 g en Puerto Peñasco vs. 1.1–2.6 en este estudio); no obstante, el valor máximo es similar (≈ 10 g). Por ello, no se podría inferir que los organismos de *Eurythoe* sp. A son menos robustos que aquellos de la especie estudiada en Puerto Peñasco. Otra diferencia en el peso húmedo es la temporalidad, ya que Kudenov (1974) registró los valores más altos en julio y agosto, asociados con los meses cálidos, mientras que para Mazatlán el valor medio más alto se registró en abril y los valores máximos en enero y marzo (Fig. VII.1B).

Las diferencias entre la relación alométrica de organismos con evidencia de regeneración y sin ella demuestran que la regeneración implica asimetrías en el tamaño del organismo (Sánchez-Alvarado, 2006). Esta desproporción, causada por la regeneración que se presenta durante todo el año (Fig. VII.5), altera las relaciones morfométricas y no permitió observar la tendencia de crecimiento a lo largo del año como la caracterizada en Puerto Peñasco por Kudenov (1974). Para *E. complanata* sensu lato, se registró un incremento en el peso húmedo durante la temporada reproductiva tanto para los organismos sin gametos como en hembras y machos maduros y en agosto, el peso húmedo de los gusanos con gametos mostró una reducción (Kudenov, 1974). En *Eurythoe* sp. A aunque se registró una diferencia entre la relación alométrica de los organismos con gametos y sin gametos no se puede concluir que los organismos en estado reproductivo son más pesados, ya que los valores se superponen y el porcentaje de datos explicado por la relación alométrica es muy bajo.

ii) Reproducción sexual: gametos y fecundación in vitro

La producción de gametos en *Eurythoe* sp. A está limitada temporalmente, ya que los organismos con gametos se registraron a partir de julio, cuando inician los meses más cálidos del año, y termina en septiembre. Esto indica que *Eurythoe* sp. A tiene un periodo reproductivo de menor duración al registrado para *E. complanata* sensu lato del golfo de California, donde dicho periodo inicia en mayo y termina en agosto (Kudenov, 1974).

Se sabe que uno de los factores de mayor relevancia en la regulación de la reproducción sexual es la temperatura. Por ejemplo, en neréididos, sin fase epitoca, se ha documentado la maduración y la liberación de gametos en los meses más cálidos, de junio a finales de agosto, en regiones templadas (Daas *et al.*, 2011).

Los espermatozoides de los anfinómidos pertenecen al tipo ectacuasperma. Esta clasificación se refiere principalmente a la función, en la que los espermatozoides son liberados en la columna de agua para fertilizar los óvulos también desovados en el agua (Rouse, 2005). Las observaciones realizadas concuerdan con lo registrado por Kudenov (1974), respecto a la morfología y el tamaño de los espermatozoides. En sus observaciones, él registró que la actividad del flagelo estaba limitada a finales de julio, previo a la liberación de gametos, pero no proporcionó más detalles. En este trabajo se observó que el movimiento del flagelo se inicia al entrar en contacto con el agua de mar aparentemente de manera independiente de la temporada o cercanía del desove, ya que no se observaron espermatozoides fuera del periodo reproductivo.

El tamaño medio de los óvulos en *Eurythoe* sp. A es acorde con la información registrada para el género (90 μ ; Reish y Pernet, 2009) y para otros anfinómidos como *H. carunculata* (\approx 100 μ ; Allen, 1957; Yáñez-Rivera y Salazar-Vallejo, 2011). Cabe destacar que los gametos de los anfinómidos, son relativamente pequeños; por ejemplo, los óvulos de *Nereis falsa* miden prácticamente el doble (200 μ) y los estadios tempranos de esta especie se identifican por tener un diámetro menor (\approx 40 μ ; Daas *et al.*, 2011). Probablemente, debido

al tamaño, Kudenov (1974) sugirió que los gametos femeninos en *Eurythoe* se liberan aún en estadio temprano, pero esto es poco probable, ya que la fecundación no sería factible. Además, la membrana vitelina que ilustró es gruesa ($\approx 5 \mu$), lo que sugiere que los óvulos caracterizados eran maduros, ya que Eckelbarger (2005) registró una membrana vitelina de 4μ para los gametos maduros del anfinómido *Benthoscolex* sp.

En términos generales, el desarrollo larvario observado coincide con la descripción realizada por Kudenov (1974); sin embargo, hay algunas diferencias con respecto a las bandas ciliadas y a la emergencia de las setas. En la larva ciliada Kudenov ilustró dos setas largas que no se observaron en los ejemplares de Mazatlán y en la larva trocófora no se distinguió el penacho apical ni la telotroca, las cuales *E. complanata* sensu lato desarrolla una vez que las setas emergieron. A pesar de que cada especie puede presentar variaciones, es necesario estudiar con más detalle la variación de las bandas ciliadas entre las especies de *Eurythoe*, ya que pueden representar un atributo esencial para la distinción de las especies crípticas del complejo. Por ejemplo, en *Capitella* spp. otro complejo de especies crípticas, hay trocóforas con bandas ciliadas y larvas sin bandas ciliadas y estas diferencias dependen del tipo de desarrollo y de las condiciones ambientales. Así, las especies que incuban las larvas que se desarrollan directamente no presenta bandas ciliadas (Méndez, 1995), mientras que las especies con larvas nadadoras presentan bandas ciliadas que les permiten el desplazamiento, capturar comida y, por tanto, una mayor dispersión (Méndez, 2002).

En la caracterización del desarrollo larvario de *E. complanata* sensu lato se observó la metatrocófora con tres segmentos (88 h) y se indicó que la larva comienza a incrementar su tamaño (Kudenov, 1974). Para *Eurythoe* sp. A, la segmentación que caracteriza la metatrocófora no se observó porque las larvas murieron. En ninguno de los dos trabajos se logró el desarrollo de los embriones hasta alcanzar el estadio de larva rostraria, debido, probablemente, a que el alimento o las condiciones experimentales no fueron adecuados para el desarrollo de la larva. Cabe destacar, que no se han realizado estudios de desarrollo o molecular que demuestren que la larva rostraria pertenece al grupo de los anfinómidos (Ahrens *et al.*, 2013), por lo que se requiere continuar con estudios de desarrollo para

obtener una caracterización completa.

iii) Regeneración y reproducción asexual

El incremento drástico de los organismos con evidencia de regeneración en septiembre, sugiere que se trata de un proceso regulado por factores endógenos, debido a que ocurre en la mayoría de los organismos (>60%), está limitado temporalmente y es inmediato-posterior a la producción de gametos. Estos hechos fortalecen la propuesta de Kudenov (1974) de que el ciclo reproductivo en este género incluye una combinación de reproducciones sexual y asexual. En este caso se trataría de reproducción asexual por arquitomía, la cual implica una fragmentación y la formación de las regiones faltantes (Rouse y Pleijel, 2001). Sin embargo, es importante destacar que no toda la evidencia de regeneración es indicativa de reproducción asexual, ya que estos organismos regeneran como respuesta a un estímulo externo o amputación (Yáñez-Rivera y Méndez, 2014, Cap. VI). El registro de organismos en regeneración en los meses restantes, sin un patrón en particular y con una baja frecuencia (<25%), evidencian la regeneración independiente de la reproducción asexual, como respuesta individual ante los estímulos externos. Kudenov (1974) también registró que durante todo el año se presentan organismos en regeneración ($\approx 30\%$), pero el incremento de los organismos en regeneración para la especie de Puerto Peñasco fue de junio a octubre; sin embargo, coincide septiembre como el mes con la mayor proporción de organismos en regeneración (Kudenov, 1974), lo cual confirmaría la regulación en la reproducción asexual.

El papel de los factores ambientales en el ciclo sexual de los poliquetos es determinante en la sincronización de la liberación de gametos (Andries, 2001; Murray *et al.*, 2011). En el ciclo asexual estos factores, principalmente la temperatura, también pueden tener relevancia; por ejemplo, se ha demostrado que la formación de las regiones faltantes del espionido *Polydora colonia* ocurre más rápido en temperaturas altas (David y Williams, 2012). En las especies de *Eurythoe* se desconoce el efecto de la temperatura en la tasa de formación de regiones faltantes. Sin embargo, la reproducción asexual por arquitomía en septiembre y octubre registrada aquí, cuando la temperatura superficial media es alta

($\approx 30^{\circ}\text{C}$) y no durante todo el año, sugiere que la temperatura dispara una respuesta endógena.

En *Eurythoe* sp. A la combinación del modo de reproducción sexual-asexual es secuencial, a diferencia de la especie en Puerto Peñasco en la que, al parecer, ambos procesos ocurren de manera simultánea, ya que la mayor autotomía ocurre en mayo cuando inicia la producción de gametos (Kudenov, 1974). Estas diferencias podrían relacionarse con las variaciones entre especies; Kudenov (1974) mencionó la presencia de una seta que corresponde a otra especie de *Eurythoe* (*E. mexicana*, Cap. V) únicamente durante el proceso de regeneración, por lo que sería probable que en algunas etapas de su estudio se hayan incluido dos especies.

iv) Malformaciones

Las alteraciones en el patrón de segmentación de los anfinómidos se han considerado como malformaciones en el proceso de regeneración (Buchanan, 1893). Recientemente, en *Hermodice carunculata* se demostró que las asimetrías en la regeneración ocurren cuando se daña el cordón nervioso ventral durante la amputación (Ahrens *et al.*, 2014). Este tipo de malformación fue el más común en este estudio ($>30\%$; Figs. VII.6C-F, VII.7A). Cabe destacar que su incidencia en un experimento de regeneración fue menor que la observada en el campo ($<6\%$ en la regeneración anterior y 10% en la regeneración posterior; Yáñez-Rivera y Méndez, 2014, Cap. VI). La diferencia observada en el campo podría estar asociada a la presencia de depredadores. Aunque *Eurythoe* presenta una toxina que induce inflamación (Nakamura *et al.*, 2008) y no es apetecible para peces (*Fundulus heteroclitus* y *Leiostomus xanthurus*) y un cangrejo (*Callinectes similis*; Kicklighter y Hay, 2006), se sabe que es consumido por gasterópodos del género *Conus* (Taylor, 1984). Se ha documentado que *Conus regius* evierte la proboscis para capturar al gusano de fuego y cuando lo tiene cerca, con la rádula le introduce toxinas que lo paralizan y de esta manera puede engullir los organismos (Vianna *et al.*, 2005). Se desconoce si los gasterópodos consumen sólo una

parte del gusano o si hay otros depredadores que fragmentan al organismo. Además, no se descarta la posibilidad que algunos cangrejos corten al gusano pero no lo consuman, ya que entre los poliquetos consumidos por braquiuros no se han incluido anfinómidos (Petti *et al.*, 1996).

Otro factor que podría intervenir en la formación de anomalías morfológicas es la presencia de sustancias tóxicas en el medio marino. Se sabe que la exposición al cadmio y al DDT reduce la formación de segmentos durante la regeneración (Reish *et al.*, 1989) y que el mercurio ocasiona daños severos en la epidermis de *Eurythoe* (Méndez *et al.*, 2009). No obstante, estos trabajos no mencionan las asimetrías o las malformaciones observadas.

El segmento simulado (20% de los organismos; Figs. VII.6B, VII.7A) es una extensión que involucra todo el segmento y por su estructura, podría relacionarse con el “megasepto” descrito por Kudenov (1974). Sin embargo, el megasepto es una modificación en el segmento antes de la fragmentación por reproducción asexual, tan sólo dura dos semanas y es transparente por la lisis del tejido y la constricción del tubo digestivo. Observaciones adicionales donde se revisaron siete individuos con segmento simulado por 15 días en el acuario, sugieren que no tienen relación, ya que no ocurrió ningún cambio en el segmento simulado; es decir, no perdió la pigmentación, ni ocurrió la fragmentación.

No hay información disponible sobre la distribución del megasepto en el cuerpo, por lo que no se puede comparar. Sin embargo, la distribución particular del segmento simulado, entre los segmentos 12 al 20, podría relacionarse con el número de segmentos regenerados, como algún símil de “cicatriz”, ya que durante el experimento de regeneración se observó la formación de 12 a 16 segmentos anteriores (Yáñez-Rivera y Méndez, 2014, Cap. VI). Kudenov (1974) registró un máximo de 16 segmentos regenerados y mencionó que queda una unión distinta entre la sección regenerada y la ya existente, sin proporcionar detalles. No obstante, cabe destacar que esta unión no se observó en el experimento de regeneración (Yáñez-Rivera y Méndez, 2014, Cap. VI). No todos los organismos con regeneración

presentan el segmento simulado y se desconocen los mecanismos que promueven esta malformación.

Conclusiones

Debido a la gran variación en tamaño, la fragmentación y posterior regeneración de los organismos, no fue posible observar una tendencia de crecimiento o algún patrón en el tamaño y peso húmedo en *Eurythoe* sp. A.

Las relaciones alométricas entre organismos en regeneración y sin evidencia de ésta son diferentes, evidenciando la desproporción en tamaño ocasionada durante este proceso.

Esta especie presenta un ciclo secuencial de reproducción sexual/asexual anual, de julio a octubre. Los gametos sólo se presentan en julio, agosto y septiembre, los meses con mayor temperatura, mientras que en septiembre y octubre los organismos se reproducen asexualmente. Sin embargo, durante todo el año se observan organismos en regeneración por probable depredación o fragmentación.

Se requieren más estudios para lograr la caracterización del ciclo de vida de la especie y determinar la duración de las larvas trocófora, metatrocófora, juvenil y adulto, así como la confirmación de la larva rostraria en *Eurythoe*.

La malformación más común fue la asimetría en el patrón de segmentación y es probable que se relacione con la regeneración por depredación.

Capítulo VIII

Discusión y conclusiones generales

En los trabajos faunísticos regionales los anfinómidos resaltan porque para la mayoría de las especies registradas se indica una amplia distribución; es decir, se presentan en dos o más áreas de endemismo. Por ejemplo, la especie *Eurythoe complanata* se considera cosmopolita o pantropical (Kudenov, 1975; Salazar-Vallejo, 1997; Dean, 2004; Nuñez *et al.*, 2010; Dean *et al.*, 2012) y otras como *Chloeia viridis*, *Notopygos crinita* y *N. ornata* son catalogadas como anfiamericanas (Fauchald, 1977; Dean *et al.*, 2012). Sin embargo, entre los poliquetos bénticos es raro que una especie alcance o mantenga una amplia distribución por sus propios mecanismos de dispersión; esto sólo puede explicarse por dispersión facilitada por acciones humanas, error en la identificación o porque no se han advertido diferencias sutiles luego de un proceso de especiación, (Wiley *et al.*, 1991). Durante el siglo XX, fue predominante la concepción de la continuidad marina como ecosistema, por lo que era raro cuestionar la amplia distribución de invertebrados marinos, sobre todo si los organismos presentaban una larva planctónica (Levin, 2006). La concepción predominante se relacionaba con la biogeografía dispersalista que explicaba la distribución actual a partir de las rutas que recorrieron y atravesaron los individuos de cierto taxón a partir de su centro de origen (Contreras *et al.*, 2001).

El estado actual del conocimiento en diferentes disciplinas como ecología, biogeografía, evolución y filogenia ha demostrado que la amplia distribución en los invertebrados bentónicos marinos no es una generalidad y son pocos los casos que corroboran este fenómeno (e.g. Westheide *et al.*, 2003; Ahrens *et al.*, 2013). Prácticamente, se sugiere que el cosmopolitismo debe ser cuestionado y que dicha idea se relaciona con procesos de especiación críptica con alto grado de endemismo (Klautau *et al.*, 1999). En estos casos, la perspectiva genética ha permitido identificar varias especies y usualmente cambia de una entidad taxonómica de asumida amplia distribución a más de una con distribuciones más restringidas (Vogler *et al.*, 2008; Nygren y Pleijel, 2012). No obstante, los registros de especies de amplia distribución deben ser evaluados ya que también hay casos de polimorfismo y puede ocurrir que los análisis revelen que

entidades que se reconocían como diferentes, en realidad corresponden a la misma especie (Bickford *et al.*, 2007). Al incorporar la especiación críptica, Bleidorn *et al.* (2006), en una perspectiva más extensiva sobre las hipótesis para explicar la amplia distribución de un taxón, detallan lo que representaría el error en la identificación de la propuesta de Wiley *et al.* (1991), en dos sentidos: cuando se trata de morfoespecies ampliamente distribuidas, que en realidad corresponden a especies genéticamente distintas con especiación críptica y cuando el conocimiento taxonómico es insuficiente, lo que se conoce como el “síndrome cosmopolita”. De esta manera, la amplia distribución se explicaría bajo cuatro hipótesis posibles: a) verdadero cosmopolitismo; b) especiación críptica; c) conocimiento taxonómico insuficiente; o bien d) una amplia distribución actual relacionada con las introducciones por la actividad humana (Bleidorn *et al.*, 2006). Los resultados con la integración de datos morfológicos y moleculares en los tres géneros evaluados en este trabajo concuerdan con las tres últimas hipótesis, ya que: en anfinómidos: a) hay casos de especiación críptica (Cap. V); b) la comprensión taxonómica no es suficiente y con la incorporación de nuevos atributos morfológicos a las descripciones previas es posible distinguir diferentes especies (Cap. II; Yáñez-Rivera y Carrera-Parra, 2012, Cap. III; Borda *et al.*, 2015, Cap. IV); y c) es factible que para una especie de *Eurythoe* la actividad humana intervenga en su distribución, ya que la especie del Caribe se encontró en un acuario de Alemania (Cap. V), y justo esta especie se asocia con las esponjas, phylum en el que se han demostrado casos de introducciones relacionadas con las rutas del transporte marítimo en el Pacífico mexicano (Ávila y Carballo, 2008; Carballo *et al.*, 2013).

La revisión de los especímenes de los géneros *Chloeia* y *Notopygos* demostró la ausencia de especies anfiamericanas. Se demostró que los registros de *C. viridis* en el Pacífico son erróneos (Cap. II), así como los registros en el Caribe de *N. ornata* (Yáñez-Rivera y Carrera-Parra, 2012, Cap. III), la cual sólo se distribuye en el Pacífico y que hay otra especie del género en el golfo de California (Borda *et al.*, 2015, Cap. IV). En ambos géneros la problemática se relaciona con el conocimiento taxonómico insuficiente, donde el uso de pocos atributos morfológicos en las primeras descripciones facilitó la inclusión de diferentes especies bajo la misma especie nominal (Klautau *et al.*, 1999; Bleidorn *et al.*, 2006), es decir, prácticamente se utilizaron atributos genéricos para distinguir las especies, por ello las limitaciones para identificarlas como diferentes.

Un ejemplo claro es el caso de *C. viridis*, la cual se ha caracterizado tradicionalmente por el inicio de las branquias en el cuarto setígero y los cirros dorsales violetas, cuando estas características se presentan en por lo menos cinco especies (Cap. II). Debido a la identificación errónea de estas diferentes especies bajo un mismo nombre se hicieron inferencias equivocadas sobre la distribución y las características biológicas de los organismos, lo que se conoce como el “síndrome cosmopolita” (Bleidorn *et al.*, 2006). La situación para las especies de *Notopygos* es similar ya que la falta de precisión en la descripción de los atributos diagnósticos generó confusión y registros equivocados. En este estudio se incorporaron atributos que facilitan la delimitación de especies relacionadas y la documentación fotográfica de organismos en vivo que también ayuda en el reconocimiento de las diferentes especies para lograr su correcta identificación, ya que, en ambos géneros, el patrón de pigmentación y el inicio de las branquias son determinantes. Además, para ambos géneros la divergencia genética de la subunidad 1 del gen COI sustentó con una base genética las diferencias morfológicas observadas (Cap. II; Yáñez-Rivera y Carrera-Parra, Cap. III; Borda *et al.*, 2015, Cap. IV). Particularmente para *Chloeia*, los atributos importantes se relacionaron con la carúncula, el cirro dorsal accesorio y la extensión del segundo cirro ventral. (Cap. II), mientras que para *Notopygos*, es crucial la posición del ano (Yáñez-Rivera y Carrera-Parra, Cap. III; Borda *et al.*, 2015, Cap. IV). Cabe destacar que un solo carácter es insuficiente para distinguir una especie de otra y lo que caracteriza las especies de estos géneros es la necesidad de combinar diversos atributos diagnósticos.

No se puede generalizar que la falta del conocimiento taxonómico es la única problemática, como en los géneros *Chloeia* y *Notopygos*, ya que en *Eurythoe* se corroboró la existencia de especies crípticas y pseudo-crípticas (Cap. V). Estas especies, a pesar de la divergencia genética, morfológicamente son prácticamente iguales o muy similares entre sí, por lo que la caracterización morfológica no es suficiente para distinguirlos y se requiere la incorporación de datos moleculares (Knowlton, 1993; Sáez y Lozano, 2005). Dentro de los poliquetos se ha demostrado que es posible subestimar el número de especies utilizando únicamente análisis morfológicos, y que para entender los patrones biogeográficos es necesario un enfoque combinado que permita identificar las especies crípticas y pseudo-crípticas (Nygren, 2014). En este sentido, la incorporación de la información molecular en *Eurythoe* resultó crucial, ya que sin ésta no se pueden

distinguir las especies crípticas y pseudo-crípticas. Por lo contrario, en *Chloeia* y *Notopygos* los resultados genéticos son coincidentes y complementarios con el enfoque morfológico. Cabe destacar que los géneros *Chloeia* y *Notopygos* se encuentran más relacionados y pertenecen a la subfamilia Archinominae (Borda *et al.*, 2015, Cap. IV), pero no es indicativo de que el error en la identificación se asocie a la falta de comprensión taxonómica, ya que en esta subfamilia también se ha documentado la especiación críptica en *Archinome* (Borda *et al.*, 2013).

Las consideraciones sobre la amplia distribución de especies de anfinómidos se sustentó considerando la larva rostraria de larga duración, que caracteriza al grupo (Pleijel, 2001). No obstante, faltan estudios de desarrollo que demuestren que este tipo de larva corresponde a los anfinómidos, ya que la relación de la larva con los anfinómidos se determinó a partir de la estructura de las setas (Ahrens *et al.*, 2013). En el seguimiento del desarrollo larvario de *Eurythoe* sp. A no se observó la larva rostraria (Cap. VII) y tampoco en la caracterización de *Eurythoe complanata* sensu lato en Puerto Peñasco, Sonora (Kudenov, 1974). Una posibilidad se relaciona con el tiempo de observación, que fue limitado en ambos casos, ya que no se caracterizó el desarrollo completo. Considerar la existencia de la larva rostraria para toda la familia podría representar una simplificación de las estrategias reproductivas en los anfinómidos, ya que las larvas observadas sólo se han asignado a algunos géneros como *Chloeia*, *Chloenopsis* e *Hipponoe* (Bhaud, 1972). Por este motivo, será necesario realizar una caracterización completa para determinar la generalidad de la larva rostraria en el grupo. Las casi 80 horas de observación de etapas tempranas corroboraron que *Eurythoe* presenta una larva trocófora y posteriormente una metatrocófora, la cual, con el movimiento de las setas, puede controlar su desplazamiento en la columna de agua.

Otra de las características biológicas en *Eurythoe* que justificaron la idea de una especie cosmopolita es el modo de reproducción asexual y sexual. Se consideró que la reproducción asexual favorecería un incremento rápido de la población, mientras que las características de la larva permitirían su dispersión (Kudenov, 1974). La combinación de estrategias reproductivas se confirmó en el estudio del ciclo reproductivo anual (Cap. VII). Además, se encontraron algunas diferencias respecto a la

temporalidad con el estudio previo de Kudenov (1974) que pueden relacionarse con las especies crípticas en el Pacífico mexicano (Cap. V). El hecho de que en el género se presente esta estrategia de reproducción combinada no es suficiente para justificar la amplia distribución. Se ha demostrado que la dispersión larval opera a escalas geográficas menores y dada la complejidad de los procesos biofísicos que intervienen en el transporte de las larvas y la conectividad no se podría generalizar a una población completamente abierta o con elevado flujo genético entre las diferentes localidades y regiones (Levin, 2006; Cowen y Sponaugle, 2009). Por otro lado, el establecimiento de la especie dependería de las condiciones locales, que seguramente serán particulares para cada una de las alrededor de cinco especies en el género (Cap. V).

Para *Eurythoe* sp. A se encontró que la reproducción asexual se encuentra limitada temporalmente y que responde a un proceso endógeno, aunque durante todo el año se registraron organismos en regeneración como respuesta a una amputación; es decir, un estímulo externo (Bely, 2006). Si bien la capacidad de regeneración ya se ha documentado en *Eurythoe* (Müller *et al.*, 2003), ahora se demostró que un gusano amputado tiene la capacidad de conformar dos o tres organismos funcionales en tan sólo 50 días (Cap. VI). Además, su capacidad fisiológica de resistir las condiciones de ayuno impuestas por la falta de la región anterior (reflejada en la disminución de los lípidos y los triglicéridos) podría sugerir que esta especie es tolerante a condiciones de estrés fisiológico (Cap. VI), aunque, se desconoce su resistencia ante los cambios en los factores ambientales. *Eurythoe* sp. B (Cap. V) podría representar un ejemplo, ya que se encontró tanto en sistemas en arrecifales en condiciones casi prístinas (isla Contoy en el Atlántico) y en sistemas costeros impactados por condiciones humanas (Acapulco en el Pacífico). Sin embargo, se requiere un estudio filogeográfico al respecto para determinar si la distribución anfiamericana de esta especie es resultado de una introducción relacionada con la actividad humana o responde a la distribución natural de la especie. Lo que si se debe considerar es que, debido a la especiación críptica y pseudo-críptica en el género, no es posible hacer inferencias sobre introducciones o especies invasoras (e.g. Arias *et al.*, 2013) sin un referente filogeográfico.

Al integrar más marcadores moleculares (18S, 28S y 16S), también fue posible realizar inferencias filogenéticas sobre la familia (Borda *et al.*, 2015, Cap. IV). Lo relevante de este estudio, además de la descripción de la especie para el golfo de California, es que permitió resolver la problemática relacionada con las familias dentro del grupo Amphinomida. Tradicionalmente, se reconocen dos familias dentro del grupo: Amphinomidae y Euphrosinidae. En 1991, con base en una especie de ventilas hidrotermales (*Archinome rosacea* (Blake, 1985)) y sin un análisis filogenético, se estableció una tercera familia: Archinomidae (Kudenov, 1991). Cuando se descubrió la especie *A. rosacea* se ubicó dentro de Euphrosinidae por las características del prostomio y la carúncula (Blake, 1985). La validez de la tercera familia se consideró incierta (Pleijel, 2001), ya que presentaba atributos morfológicos combinados (Fauchald y Rouse, 1997). Con este escenario, Wiklund *et al.* (2008) estudiaron las relaciones filogenéticas entre las tres familias únicamente con datos moleculares. Este estudio incluyó las secuencias de dos marcadores nucleares (genes 18S y 28S), y mostró que Archinomidae está más cercana a *Chloeia* y que juntos se separan del resto de los anfinómidos, por lo que consideraron a Archinomidae como sinónimo menor de Amphinomidae (Wiklund *et al.*, 2008). Posteriormente, Borda *et al.* (2012) caracterizaron dos clados dentro de Amphinomidae (el fusiforme y el rectilíneo), según la forma del cuerpo de los organismos. La inclusión de especies de *Notopygos* permitió un análisis más robusto que sustentó las dos subfamilias dentro de Amphinomidae: Archinominae status novo y Amphinominae (Borda *et al.*, 2015, Cap. IV). Los miembros de estas subfamilias se pueden distinguir morfológicamente por la presencia (Archinominae) o ausencia (Amphinominae) del cirro dorsal accesorio.

Estudios previos registran que la divergencia genética entre las especies de poliquetos varía de 8 a >20% (Jones *et al.*, 2008; Vrijenhoek *et al.*, 2009; Carrera-Parra y Salazar-Vallejo, 2011). Las evaluaciones anteriores en anfinómidos registraron una divergencia del 14 al 22% (Barroso *et al.*, 2010; Borda *et al.*, 2013). Entre los géneros evaluados, la divergencia encontrada entre las respectivas especies es de amplitud similar (del 10 al 31%). La divergencia intraespecífica en los tres géneros es <2%, lo cual es similar a la divergencia registrada en *Hermodice carunculata* a lo largo del Atlántico, la cual tiene un máximo de 2.9% (Ahrens *et al.*, 2013). La utilización de los datos moleculares responde a la necesidad de incorporar diferentes tipos de caracteres para delimitar,

descubrir e identificar las especies naturales dentro de una taxonomía integrativa (Dayrat, 2015; Will *et al.*, 2005). El estudio sobre la biología reproductiva y regeneración de *Eurythoe* sp. A (Cap. VI y VII) representa una contribución inicial para fomentar la integración de las características biológicas al enfoque molecular en la identificación de las especies crípticas.

Conclusiones

De manera global este estudio abordó el análisis de los anfinómidos a diferentes escalas. La parte central se relaciona con los problemas taxonómicos de las especies registradas en el país, que se resolvió utilizando tanto el enfoque morfológico como el molecular. También se reconocieron dos subfamilias dentro de Amphinomidae al incluir a *Notopygos* en el análisis filogenético de la familia. Finalmente, se generó información particular sobre una especie, caracterizando el proceso de regeneración con el análisis de las reservas energéticas y biología reproductiva, estudio que incluyó tanto el desarrollo larvario como el seguimiento de un ciclo reproductivo anual.

Particularmente, sobre la problemática taxonómica, cabe destacar que se restablecieron las especies *C. euglochis* y *N. megalops*, se delimitaron *C. entypa*, *C. pinnata* y *C. viridis*, se determinó la validez a nivel de especie de *E. mexicana* y se describieron *Chloeia* sp. A y B, *Notopygos caribea*, *N. kekooa* y *Eurythoe* sp. A y B. Con esta información se comprobó que varios registros eran erróneos y se determinó que las especies de anfinómidos pertenecientes a los géneros *Chloeia*, *Notopygos* y *Eurythoe* no presentan la amplia distribución como tradicionalmente se pensaba. Sólo el taxón *Eurythoe* sp. B tiene una distribución anfiamericana, las especies *C. viridis*, *N. crinita*, y *E. carunculata* no son anfiamericanas (sólo se presentan en la costa Atlántica), mientras que *N. ornata* sólo en el Pacífico (sus registros en el Atlántico son erróneos). Tanto en *Chloeia* como en *Notopygos*, el error en la identificación se relaciona con el uso de atributos genéricos para describir las especies por lo que diferentes taxones se podían

identificar como la misma especie. En *Eurythoe* se identificaron especies crípticas y pseudo-crípticas, por lo que en este caso la información molecular fue invaluable.

Respecto al conflicto a nivel de familia dentro del grupo Amphinomida, la inclusión de *Notopygos* en el análisis filogenético permitió establecer las dos subfamilias dentro de Amphinomidae: Archinominae y Amphinominae. Esta propuesta de arreglo sistemático refleja los grupos naturales y se elimina la propuesta de la familia Archinomidae, que implica un grupo parafilético.

La información sobre el proceso de regeneración en *Eurythoe* sp. A demostró que un gusano amputado puede generar dos o tres organismos funcionales en 50 días. La formación del blastema en el inicio de la regeneración causa la mayor demanda de lípidos y triglicéridos en la regeneración anterior. También se observó que se pueden producir malformaciones en la carúncula y en el patrón de segmentación.

El aporte sobre la biología reproductiva confirma la combinación de estrategias reproductivas en los anfinómidos. *Eurythoe* sp. A presenta un ciclo secuencial de reproducción sexual/asexual anual, de julio a octubre. La producción de gametos ocurre en julio, agosto y septiembre, los meses con mayor temperatura, mientras que en septiembre y octubre los organismos se reproducen asexualmente. Durante el seguimiento del desarrollo larvario no se observó la larva rostraria, se requieren más estudios para lograr la caracterización del ciclo de vida completo de la especie.

Literatura citada

Las referencias de los capítulos III, IV, y VI se encuentran en la sección correspondiente, ya que estos constituyen artículos publicados.

- Ahrens, J.B., E. Borda, R. Barroso, P.C. Paiva, A.M. Campbell, A. Wolf, M.M. Nugues, G.W. Rouse & A. Schulze. 2013. The curious case of *Hermodice carunculata* (Annelida: Amphinomidae): evidence for genetic homogeneity throughout the Atlantic Ocean and adjacent basins. *Mol Ecol* 22: 2280–2291.
- Ahrens, J.B., J.D. Kudenov, C.D. Marshall & A. Schulze. 2014. Regeneration of posterior segments and terminal structures in the bearded fireworm, *Hermodice carunculata* (Annelida: Amphinomidae). *J Morphol* 275: 1103–1112.
- Allen, M.J. 1957. The breeding of polychaetous annelids near Parguera, Puerto Rico. *Biol Bull* 113: 49–57.
- Andries, J.C. 2001. Endocrine and environmental control of reproduction in Polychaeta. *Can J Zool* 79: 254–270.
- Appeltans, W., S.T. Ahyong, G. Anderson, M.V. Angel, T. Artois, N. Bailly & R.R. Hopcroft 2012. The magnitude of global marine species diversity. *Curr Biol* 22: 2189–2202.
- Arias, A., R. Barroso, N. Anadón & P.C. Paiva. 2013. On the occurrence of the fireworm *Eurythoe complanata* complex (Annelida, Amphinomidae) in the Mediterranean Sea with an updated revision of the alien Mediterranean amphinomids. *ZooKeys* 337: 19–33.
- Ávila, E. & J.L. Carballo. 2009. A preliminary assessment of the invasiveness of the Indo-Pacific sponge *Chalinula nematifera* on coral communities from the tropical Eastern Pacific. *Biol Inv* 11: 257–264.
- Barroso, R., M. Klautau, A.M. Solé-Cava & P.C. Paiva. 2010. *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae), the ‘cosmopolitan’ fireworm, consists of at least three cryptic species. *Mar Biol* 157: 69–80.
- Barroso, R. & P.C. Paiva. 2011. A new deep-sea species of *Chloeia* (Polychaeta: Amphinomidae) from southern Brazil. *J Mar Biol Ass UK* 91: 419–423.
- Bautista-Guerrero, E., J.L. Carballo & M. Maldonado. 2010. Reproductive cycle of the coral-excavating sponge *Thoosa mismalolli* (Clionidae) from Mexican Pacific coral reefs. *Invertebr Biol* 129: 285–296.
- Bautista-Guerrero, E., J.L. Carballo & M. Maldonado. 2014. Abundance and reproductive patterns of the excavating sponge *Cliona vermifera*: a threat to Pacific coral reefs? *Coral Reefs* 33: 259–266.
- Bely, A.E. 2006. Distribution of segment regeneration ability in the Annelida. *Integr Comp Biol* 46: 508–518.
- Berkeley, E. & C. Berkeley. 1939. On a collection of Polychaeta, chiefly from the West Coast of Mexico. *Ann Mag Nat Hist* 3: 321–46.

- Berkeley, E. & C. Berkeley. 1960. Notes on some Polychaeta from the West Coast of Mexico, Panama, and California. *Can J Zool* 38: 357–362.
- Bhaud, M. 1972. Identification des larves d'Amphinomidae. (Annélides Polychètes) recueillies près de Nosy-Bé (Madagascar) et problèmes biologiques connexes. *Cah ORSTOM ser Oceanogr* 10: 203–216.
- Bickford, D., D.J. Lohman, N.S. Sodhi, P.K.L. Ng, R. Meier, K. Winker, K.K. Ingram & I. Das. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol* 22: 148–155.
- Bindra, S.S. 1927. A study of the genus *Eurythoe* (Family Amphinomidae). *Fauna Karachi, Mem Dept Zool Panjab Univ* 1: 1–18.
- Blainville de, H. 1828. Vers (Entomoz.). *Dict Sci Nat* 57: 365–625.
- Blake, J.A. 1985. Polychaeta from the vicinity of deep-sea geothermal vents in the eastern Pacific. I: Euphrosinidae, Phyllodocidae, Hesionidae, Nereididae, Glyceridae, Dorvilleidae, Orbiniidae and Maldanidae. *Bull Biol Soc Wash* 6: 67–101.
- Bleidorn, C., I. Kruse, S. Albrecht & T. Bartolomaeus. 2006. Mitochondrial sequence data expose the putative cosmopolitan polychaete *Scoloplos armiger* (Annelida, Orbiniidae) as a species complex. *BMC Evol Biol* 6: 47.
- Borda, E., J.D. Kudenov, C. Beinholt & G.W. Rouse. 2012. Towards a revised Amphinomidae (Annelida: Amphinomida): description and affinities of a new genus and species from the Nile Deep-sea Fan, Mediterranean Sea. *Zool Scr* 41: 307–325.
- Borda, E., J.D. Kudenov, P. Chevaldonné, J.A. Blake, D. Desbruyères, M.C. Fabri, S. Hourdez, F. Pleijel, T.M. Shank, N.G. Wilson, A. Schulze & G.W. Rouse. 2013. Cryptic species of *Archinome* (Annelida: Amphinomida) from vents and seeps. *P Roy Soc B: Biol Sci* 280: 20131876.
- Borda, E., B. Yáñez-Rivera, G. Ochoa, J.D. Kudenov, C. Sánchez-Ortiz, A. Schulze & G.W. Rouse. 2015. Revamping Amphinomidae (Annelida: Amphinomida), with the inclusion of *Notopygos*. *Zool Scr* 44: 324–333.
- Bruguière, J.G. 1789. Histoire Naturelle des Vers. Tome I. Encyclopédie Méthodique. Panckoucke, Paris. 758 pp.
- Buchanan, F. 1893. Peculiarities in the segmentation of certain polychaetes. *Q J Microsc Sci, Lond* 34: 528–544.
- Carballo, J.L., J.M. Aguilar-Camacho, I.S. Knapp & J.J. Bell. 2013. Wide distributional range of marine sponges along the Pacific Ocean. *Mar Biol Res* 9: 768–775.
- Carrera-Parra, L.F. & S.I. Salazar-Vallejo. 2011. Redescriptions of *Eunice filamentosa* and *E. denticulata* and description of *E. tovarae* n. sp. (Polychaeta: Eunicidae), highlighted with morphological and molecular data. *Zootaxa* 2880: 51–64.
- Chamberlin, R.V. 1919. The Annelida Polychaeta of the *Albatross* Tropical Pacific Expedition, 1891–1905. *Mem Mus Comp Zool, Harvard* 48: 1–514.
- Chatzigeorgiou, G., E. Sarropoulou, K. Vasileiadou, C. Brown, S. Faulwetter, G. Kotoulas & C.D. Arvanitidis. 2014. Community structure and population genetics of Eastern Mediterranean polychaetes. *Front Mar Sci* 1: 47.

- Contreras, M.R., V.I. Luna & J.J. Morrone. 2001. Conceptos biogeográficos. *Elementos* 8: 33–37.
- Cook, L.G., R.D. Edwards, M.D. Crisp & N.B. Hardy. 2010. Need morphology always be required for new species descriptions? *Invertebr Syst* 24: 322–326.
- Cowen, R.K. & S. Sponaugle. 2009. Larval dispersal and marine population connectivity. *Annu Rev Mar Sci* 1: 443–466.
- Daas, T., M. Younsi, O. Daas-Maamcha, P. Gillet & P. Scaps. 2011. Reproduction, population dynamics and production of *Nereis falsa* (Nereididae: Polychaeta) on the rocky coast of El Kala National Park, Algeria. *Helgol Mar Res* 65: 165–173.
- David, A.A. & J.D. Williams. 2012. Asexual reproduction and anterior regeneration under high and low temperatures in the sponge associate *Polydora colonia* (Polychaeta: Spionidae). *Invertebr Reprod Dev* 56: 315–324.
- Day, J.H. 1934. On a collection of South African Polychaeta, with a catalogue of the species recorded from South Africa, Angola, Mozambique and Madagascar. *J Linn Soc Lond* 39: 15–82.
- Day, J.H. 1967. A Monograph on the Polychaeta of Southern Africa. *Brit Mus Nat Hist Publ* 656: 1–878.
- Dayrat B. 2005. Toward integrative taxonomy. *Biol J Linn Soc* 85: 407–415.
- Dean, H.K. 2004. Marine biodiversity of Costa Rica: Class Polychaeta (Annelida). *Rev Biol Trop* 52: 131–181.
- Dean, H.K., J.A. Sibaja-Cordero & J. Cortés. 2012. Polychaetes (Annelida: Polychaeta) of Cocos Island National Park, Pacific Costa Rica 1. *Pac Sci* 66: 347–386.
- Dunn, C.P. 2003. Keeping taxonomy based in morphology. *Trends Ecol Evol* 18: 270–271.
- Ebbs, Jr.N.K. 1966. The coral-inhabiting polychaetes of the northern Florida reef tract. Part I. Aphroditidae, Polynoidae, Amphinomidae, Eunicidae, and Lysaretidae. *Bull Mar Sci* 16: 485–555.
- Eckelbarger, K.J. 2005. Oogenesis and oocytes. *Hydrobiologia* 535/536: 179–198.
- Eckert, G.J. 1985. Absence of toxin-producing parapodial glands in amphinomid polychaetes (fireworms). *Toxicon* 23: 350–353.
- Ehlers E. 1887. Reports on the results of dredging, under the direction of L.F. Pourtalès, during the years 1868–1870, and of Alexander Agassiz, in the Gulf of Mexico (1877–78), and in the Caribbean Sea (1878–79), in the U.S. Coast Survey Steamer “Blake,” Lieut. Com. C.D. Sigsbee, U.S.N., and Commander J.R. Bartlett, U.S.N., Commanding. XXXI. Report on the Annelids. *Mem Mus Comp Zool, Harvard* 15: 1–335.
- Fauchald, K. 1977. The polychaete worms: Definitions and keys to the orders, families and genera. *Nat Hist Mus LA County, Sci Ser* 28: 1–190.
- Fauchald, K. & G.W. Rouse. 1997. Polychaete systematics: past and present. *Zool Scr* 26: 71–138.
- Fauvel, P. 1914. Annélides polychètes de San-Thomé (Golfe de Guinée) recueillies par M. Ch. Gravier. *Arch Zool Exp Gen* 54: 105–155.

- Fauvel, P. 1917. Annélides Polychètes de l'Australie méridionale. *Arch Zool Exp Gen* 56: 159–277.
- Fauvel, P. 1923. Polychètes Errantes. Faune de France, Paris. 488 pp.
- Fauvel, P. 1943. Annélides polychètes de Californie recueillies par L. Diguët. *Mém Mus Natl Hist Nat Paris* 18: 1–32.
- Fauvel, P. 1953. The Fauna of India including Pakistan, Ceylon, Burma and Malaya. Annelida Polychaeta. Indian Press, Allahabad. 507 pp.
- Fischer, A. & A. Dorresteijn. 2004. The polychaete *Platynereis dumerilii* (Annelida): a laboratory animal with spiralian cleavage, lifelong segment proliferation and a mixed benthic/pelagic life cycle. *Bioessays* 26: 314–325.
- Gathof, J.M. 1984. Family Amphinomidae Savigny, 1818 (pp: V37-1–V37-12) In: Uebelacker, J.M. & P.G. Johnson (eds.) *Taxonomic guide to the polychaetes of the northern Gulf of Mexico*. Final report to the Mineral Management Service, contract 14-152-29091. Barry A. Vitor & Ass. Inc. Mobile, Alabama.
- Giangrande, A. 1997. Polychaete reproductive patterns, life cycles and life histories: an overview. *Oceanogr Mar Biol* 35: 323–386.
- Gleibs, S., D. Mebs & B. Werding. 1995. Studies on the origin and distribution of palytoxin in a Caribbean coral reef. *Toxicon* 33: 1531–1537.
- Gustafson, G. 1930. Anatomische Studien über die Polychaeten-Familien Amphinomidae und Euphrosynidae. *Zool Bidrag Uppsala* 12: 301–471.
- Hajibabaei, M., J.R. deWaard, N.V. Ivanova, S. Ratnasingham, R. Dooh, S.L. Kirk, P.M. Mackie & P.D.N. Hebert. 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philos Trans R Soc B* 360: 1959–1967.
- Hartman, O. 1938. Annotated list of the types of polychaetous annelids in the Museum of Comparative Zoology. *Bull Mus Comp Zool* 85: 1–31.
- Hartman, O. 1940. Polychaetous annelids, 2. Chrysopetalidae to Goniadidae. *Allan Hancock Pac Exped* 7: 173–287.
- Hartman, O. 1948. The marine annelids erected by Kinberg with notes on some others types in the Swedish State Museum. *Arkiv Zool* 42A: 1–137.
- Hartman, O. 1959. Catalogue of the Polychaetous Annelids of the World, Pt. 1. *Allan Hancock Occ Pap* 23: 1–353.
- Harvey, P.H. & M.D. Pagel. 1991. The comparative method in evolutionary biology. Oxford Univ. Press, Oxford. 239 pp.
- Horst, R. 1910. On the genus *Chloeia* with some new species from the Malay Archipelago, partly collected by the Siboga-Expedition. *Notes Leyden Mus* 32: 169–175.
- Horst, R. 1912. Polychaeta errantia of the Siboga Expedition. Part 1, Amphinomidae. *Siboga-Expeditie Leyden* 24a: 1–43.
- Hutchings, P.A. 2000. Family Amphinomidae (pp: 107–110) In: Beesly, P.L., G.B. Ross & C.J. Glasby (eds.) *Polychaetes & Allies: The Southern Synthesis. Fauna of Australia. Vol 4A Polychaeta, Myzostomida, Pogonophora, Echiura, Sipunculida*. CSIRO Publishing, Melbourne, Australia.

- International Commission on Zoological Nomenclature. (1999). *International Code of Zoological Nomenclature*. International Trust for Zoological Nomenclature, London. 306 pp.
- Jones, W.J., S.B. Johnson, G.W. Rouse & R.C. Vrijenhoek. 2008. Marine worms (genus *Osedax*) colonize cow bones. . *P Roy Soc B: Biol Sci* 275: 387–391.
- Kicklighter, C. E., & M.E. Hay. 2006. Integrating prey defensive traits: contrasts of marine worms from temperate and tropical habitats. *Ecol Monogr* 76: 195–215.
- Kimura, M. 1980. A simple method of estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies. *J Mol Evol* 16: 111–120.
- Kinberg, J.G.H. 1867. On Amphinomernas systematic. *Öfvers K Vetensk-Akad Förh* 24: 83–91.
- Klautau, M., C.A. Russo, C. Lazoski, N. Boury-Esnault, J.P. Thorpe & A.M. Solé-Cava. 1999. Does cosmopolitanism result from overconservative systematics? A case study using the marine sponge *Chondrilla nucula*. *Evolution* 53: 1414-1422.
- Knowlton, N. 1993. Sibling species in the sea. *Annu Rev Ecol Syst* 24: 189–216.
- Knowlton, N. 2000. Molecular genetic analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia* 420: 73–99.
- Kudenov, J.D. 1974. The reproductive biology of *Eurythoe complanata* (Pallas, 1766), (Polychaeta: Amphinomidae). Ph. D. Dissertation, Univ Arizona, Tucson. 128 pp.
- Kudenov, J.D. 1975. Errant polychaetes from the Gulf of California, Mexico. *J Nat Hist* 9: 65–91.
- Kudenov, J.D. 1977. Brooding behavior and protandry in *Hipponoe gaudichaudi* (Polychaeta: Amphinomidae). *Bull So Cal Acad Sci* 76: 85–90.
- Kudenov, J.D. 1980. Annelida: Polychaeta (Bristleworms) (pp: 77–123) In: R.C. Brusca (ed.) *Common Intertidal Invertebrates of the Gulf of California*, 2nd ed., Univ. Arizona Press, Tucson.
- Kudenov, J.D. 1991. A new family and genus of the order Amphinomida (Polychaeta) from Galapagos hydrothermal vents (pp: 111–120) In: M.E. Petersen & J.B. Kirkegaard (eds.) *Proceedings of the 2nd International Polychaeta Conference, Copenhagen, 1986. Systematics, Biology and Morphology of World Polychaeta*. Ophelia 5, Supplement.
- Kudenov, J.D. 1995. Family Amphinomidae Lamarck, 1818 (pp: 207–215) In: Blake, J.A., B. Hilbig & P.H. Scott (eds.) *Taxonomic Atlas of the Benthic Fauna of the Santa Maria Basin and Western Santa Barbara Channel. Vol. 5. The Annelida Part 2*. Santa Barbara Museum of Natural History, Santa Barbara.
- Kupriyanova, E.K., E. Nishi, H.A. ten Hove & A.V. Rzhavsky. 2001. Life-history patterns in serpulimorph polychaetes: ecological and evolutionary perspectives. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev* 39: 1–101.
- Legendre, P. & L. Legendre. 1983. *Numerical Ecology*. Elsevier, Amsterdam. 419 pp.
- Levin, L.A. 2006. Recent progress in understanding larval dispersal: new directions and digressions. *Integr Comp Biol* 46: 282–297.
- MacLeod, N. & P.L. Forey. 2002. Introduction: morphology, shape, and phylogenetics (pp: 1–7) In: MacLeod, N. & P.L. Forey (eds.) *Morphology, Shape and Phylogeny*. Taylor & Francis, London.

- Mayr, E. & P.D. Ashlock. 1991. *Principles of Systematic Zoology*. McGraw-Hill, Nueva York. 2nd ed. 475 pp.
- McIntosh, W.C. 1885. Report on the Annelida Polychaeta collected by H.M.S. Challenger during the years 1873-76. *Challenger Report* 12: 1–554.
- Mebs, D. 1998. Occurrence and sequestration of toxins in food chains. *Toxicon* 36: 1519–1522.
- Méndez, N. 1995. Non-pelagic development of *Capitella capitata* (Polychaeta) in the littoral zone of Barcelona, Spain. *Sci Mar* 59: 95–101.
- Méndez, N. 2002. Experimental evidence of polymorphism of sexual development in *Capitella* sp. B (Polychaeta: Capitellidae) from Barcelona, Spain. *Sci Mar* 66: 103–110.
- Méndez, N. & F. Páez-Osuna. 1998. Trace metals in two populations of the fireworm *Eurythoe complanata* from Mazatlán Bay: effect of body size on concentrations. *Environ Poll* 102: 279–285.
- Méndez, N., C. Green-Ruíz & R. Vázquez-Núñez. 2009. Mortality and abnormalities observed after experimental Hg exposure in the polychaete *Eurythoe complanata* (Pallas) from Mazatlan, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol* 83: 488–492.
- Monro, C.C.A. 1933. The polychaeta errantia collected by Dr. C. Crossland at Colón, in the Panama region, and the Galapagos Islands during the expedition of the S.Y. St. George. *Proc Zool Soc Lond* 1933: 1–96.
- Moore, J.P. 1911. The polychaetous annelids dredged by the U.S.S. 'Albatross' off the coast of southern California in 1904. III. Euphrosynidae to Goniadidae. *P Acad Nat Sci Phila* 63: 234–318.
- Müller, M., A. Berenzen & W. Westheide. 2003. Experiments on anterior regeneration in *Eurythoe complanata* ("Polychaeta", Amphinomidae): reconfiguration of the nervous system and its function for regeneration. *Zoomorphology* 122: 95–103.
- Murray, J.M., G.J. Watson, A. Giangrande, M.G. Bentley & P. Farrell. 2011. Reproductive biology and population ecology of the marine fan worm *Sabella pavonina* (Savigny)(Polychaeta: Sabellidae). *Invertebr Reprod Dev* 55: 183–196.
- Nakamura, K., Y. Tachikawa, M. Kitamura, O. Ohno, M. Suganuma & D. Uemura. 2008. Complanine, an inflammation-inducing substance isolated from the marine fireworm *Eurythoe complanata*. *Org Biomol Chem* 6: 2058–2060.
- Nakamura, K., Y. Tachikawa, O. Ohno, M. Kitamura, M. Suganuma & D. Uemura. 2010. Neocomplanines A and B, a complanine family isolated from the marine fireworm. *J Nat Prod* 73: 303–305.
- Nusetti, O., E. Zapata-Vívenes, M.M. Esclapés & A. Rojas. 2005. Antioxidant enzymes and tissue regeneration in *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae) exposed to used vehicle crankcase oil. *Arch Environ Contam Toxicol* 48: 509–514.
- Nygren, A. 2014. Cryptic polychaete diversity: a review. *Zool Scr* 43: 172–183.
- Nygren, A. & F. Pleijel. 2011. From one to ten in a single stroke—resolving the European *Eumida sanguinea* (Phyllodocidae, Annelida) species complex. *Mol Phylogenet Evol* 58: 132–141.
- OBIS. 2014. *Global biodiversity indices from the Ocean Biogeographic Information System*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Web. <http://www.iobis.org>

- Pallas P.S. 1766. *Miscellanea Zoologica*. Hagrae Comitum. 244 pp.
- Petti, M.A.V., E.F. Nonato & P.C. de Paiva. 1996. Trophic relationships between polychaetes and brachyuran crabs on the southeastern Brazilian coast. *Rev Bras Oceanogr* 44: i1–67.
- Pleijel, F. 2001. Amphinomida Lamarck, 1818 (pp: 145–147) *In*: Rouse, G.W. & F. Pleijel (eds.) *Polychaetes*. Oxford University Press, New York, U.S.A.
- Potts, F.A. 1909. Polychaeta of the Indian Ocean, 1. The Amphinomidae. *Trans Linn Soc Lond Ser* 12: 355–371.
- Quatrefages de, A. 1866. *Histoire Naturelle des Annelés Marins et d'Eau Douce*. Annelides et Géphyriens. Librairie Encyclopédique de Roret, Paris. 3 vols. and Atlas with Pls. 1–20.
- Ratnasingham, S. & P.D.N. Hebert. 2007. BOLD: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org). *Mol Ecol Notes* 7: 355–364.
- Reish, D.J., S.L. Asato & J.A. LeMay. 1989. The effect of cadmium and DDT on the survival and regeneration in the amphinomid polychaete *Eurythoe complanata*. *VII Simposio Int Biol Mar 1-5 junio 1989*:107–111.
- Reish, D.J. & B. Pernet. 2009. Life cycle cultures of annelids: a review (pp: 47–62) *In*: Shain, D.H. (ed.) *Annelids as Model Systems in the Biological Sciences*. Wiley-Blackwell, New Jersey.
- Rouse, G.W. 2005. Annelid sperm and fertilization biology (pp: 167–178) *In*: Bartolomaeus, T. & G. Purschke (eds.) *Morphology, Molecules, Evolution and Phylogeny in Polychaeta and Related Taxa*. Springer, Netherlands.
- Rouse, G.W. & F. Pleijel. 2001. Polychaete anatomy (pp: 18–35) *In*: Rouse, G.W. & F. Pleijel (eds.) *Polychaetes*. Oxford University Press, New York, U.S.A.
- Rouse, G.W. & F. Pleijel. 2006. *Reproductive Biology and Phylogeny of Annelida*. Science Publishers, Enfield, NH. 688 pp.
- Sáez, A.G. & E. Lozano. 2005. Body doubles. *Nature* 433: 111.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987 The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.
- Salazar-Vallejo, S.I. 1997. Anfinómidos y eufrosínidos (Polychaeta) del Caribe mexicano con claves para las especies reconocidas del Gran Caribe. *Rev Biol Trop* 44/45: 379–390.
- Salazar-Vallejo, S.I., N.E. González & E. Schwindt. 2008. Taxonomía de invertebrados marinos: necesidades en Latinoamérica. *Interciencia* 33: 510–517.
- Sánchez-Alvarado, A. 2006. Planarian regeneration: its end is its beginning. *Cell* 124: 241–245.
- Schmarda, L.K. 1861. Neue wirbellose Thiere beobachtet und gesammelt auf einer Reise um die Erde 1853 bis 1857. Wilhelm Engelman, Leipzig. 164 pp.
- Sheehan, D.C. & B.B. Hrapchak. 1980. Theory and practice of histotechnology. St. Louis, Missouri, USA: The C. V. Mosby Company. 481 pp.
- 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. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739.
- Taylor, J.D. 1984. A partial food web involving predatory gastropods on a Pacific fringing reef. *J Exp Mar Biol Ecol* 74: 273–290.

- Tovar-Hernández, M.A., B. Yáñez-Rivera & J.L. Bortolini-Rosales. 2011. Reproduction of the invasive fan worm *Branchiomma bairdi* (Polychaeta: Sabellidae). *Mar Biol Res* 7: 710–718.
- Treadwell, A.L. 1923. Polychaetous annelids from lower California with descriptions of new species. *Am Mus Novitates* 74: 1–11.
- Vázquez-Núñez, R., N. Méndez & C. Green-Ruíz. 2007. Bioaccumulation and elimination of Hg in the fireworm *Eurythoe complanata* (Annelida: Polychaeta) from Mazatlan, Mexico. *Arch Environ Contam Toxicol* 52: 541–548.
- Vianna, B.M.C., K. Konno, F.C.V. Portaro, J.C. de Freitas, T. Yamane, B.M. Olivera & D.C. Pimenta. 2005. Mass spectrometric and high performance liquid chromatography profiling of the venom of the Brazilian vermivorous mollusk *Conus regius*: feeding behavior and identification of one novel conotoxin. *Toxicon* 45: 113–122.
- Vogler, C., J. Benzie, H. Lessios, P. Barber & G. Wörheide. 2008. A threat to coral reefs multiplied? Four species of crown-of-thorns starfish. *Biol Lett* 4: 696–699.
- Vrijenhoek, R.C., Johnson, S.B. & Rouse, G.W. (2009) A remarkable diversity of bone-eating worms (*Osedax*; Siboglinidae; Annelida). *Bio Med Cent Biol* 7: 1–13.
- Westheide, W., E. Haß-Cordes, M. Krabusch & M. Müller. 2003. *Ctenodrilus serratus* (Polychaeta: Ctenodrilidae) is a truly amphi-Atlantic meiofauna species-evidence from molecular data. *Mar Biol* 142: 637–642.
- Wiklund, H., A. Nygren, F. Pleijel & P. Sundberg. 2008. The phylogenetic relationships between Amphinomidae, Archinomidae and Euphrosinidae (Amphinomida: Aciculata: Polychaeta), inferred from molecular data. *J Mar Biol Association UK* 88: 509–513.
- Wiley E.O., D. Siegel-Caused, D.R. Brooks & V.A. Funk. 1991. *The Compleat Cladist*. A Primer of Phylogenetic Procedures. The University of Kansas Museum of Natural History Special Publication 19. 158 pp.
- Will, W.K., B.D. Mishler & Q.D. Wheeler. 2005. The Perils of DNA Barcoding and the Need for Integrative Taxonomy. *Syst Biol* 54: 844–851.
- Yáñez-Rivera, B. 2009. Familia Amphinomidae Savigny in Lamarck, 1818 (pp: 77–87) In: de León-González, J.A., J.R. Bastida-Zavala, L.F. Carrera-Parra, M.E. García-Garza, A. Peña-Rivera, S.I. Salazar-Vallejo & V. Solís-Weiss (eds.) *Poliquetos (Annelida: Polychaeta) de México y América tropical*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.
- Yáñez-Rivera, B. & S.I. Salazar-Vallejo. 2011. Revision of *Hermodice* Kinberg, 1857 (Polychaeta: Amphinomidae). *Sci Mar* 75: 251–262.
- Yáñez-Rivera, B. & L.F. Carrera-Parra. 2012. Reestablishment of *Notopygos megalops* McIntosh, description of *N. caribea* n. sp. from the Greater Caribbean and barcoding of “amphiamerican” *Notopygos* species (Annelida, Amphinomidae). *Zookeys* 223: 69–84.
- Yáñez-Rivera, B. & N. Méndez. 2014. Regeneration in the stinging fireworm *Eurythoe* (Annelida): Lipid and triglyceride evaluation. *J Exp Mar Biol Ecol* 459: 137–143.