



**DEPARTAMENTO DE ZOOLOXÍA, XENÉTICA E ANTROPOLOXÍA
FÍSICA**

FACULTADE DE BIOLOXÍA

Y

ESTACIÓN DE BIOLOXÍA MARIÑA DA GRAÑA

**La familia Splanchnotrophidae
(Crustacea, Copepoda,
Poecilostomatoida) en la Ría de Ferrol y
en la de Ares (NW Península Ibérica):
estudio morfológico y molecular.**

Memoria que presenta para optar al Grado de Doctor en Biología

MARCOS ABAD COSTOYA

Santiago de Compostela, 2016.



D. **VICTORIANO URGORRI CARRASCO**, Catedrático de Universidade no Departamento de Zooloxía, Xenética e Antropoloxía Física da Facultade de Bioloxía e Director da Estación de Bioloxía Mariña da Graña da Universidade de Santiago de Compostela; e D. **GUILLERMO J. DÍAZ AGRAS**, Doutor en Bioloxía e Xefe da Estación de Bioloxía Mariña da Graña,

CERTIFICAN:

Que a presente memoria titulada **“La familia Splanchnotrophidae (Crustacea, Copepoda, Poecilostomatoida) en la Ría de Ferrol y en la de Ares (NW Península Ibérica): estudio morfológico y molecular”**, foi realizada por **Marcos Abad Costoya** baixo a nosa dirección na Estación de Bioloxía Mariña da Graña da Universidade de Santiago de Compostela. E considerando que representa traballo de Tese de Doutoramento, autorizamos a súa presentación ante o Consello do Departamento e a Comisión de Doutoramento da Universidade de Santiago de Compostela.

E para que así conste e surta os efectos oportunos, asinamos o presente certificado.

Santiago de Compostela, 5 de Setembro de 2016.

Vº e Pr. Titor e Director

Vº e Pr. Director

Prof. Dr. Victoriano Urgorri

Dr. Guillermo J. Díaz Agras



Agradecimientos

La primera persona a la que tengo que mencionar es a mi director de tesis y padre científico, Victoriano Urgorri. Confió en mí, me dedicó su tiempo y me ha enseñado todo lo que sabe; nunca podré estar lo suficientemente agradecido. Parecen 7 minutos pero han pasado ya 7 años desde que, mientras navegábamos por delante del castillo de San Felipe a bordo del *Polybius*, me propuso realizar la tesis doctoral en la Estación de Biología Mariña da Graña. Me abrió de par en par las puertas de esta casa y puso a mi disposición un capital humano y material que aún a día de hoy creo que no merezco. Sin su paciencia, cariño y saber hacer este trabajo no podría haberse realizado. Gracias profesor.

A mi otro director, Guillermo Díaz, “Willy”, tengo que agradecerle muchísimas cosas. En primer lugar gracias por haber estado ahí siempre que lo necesité, atendiéndome con una sonrisa y con una paciencia infinita. Gracias también por enseñarme a trabajar con meticulosidad y rigor; si Vituco es mi padre científico, tú eres mi hermano mayor científico. Gracias por haber creído en mí incluso cuando ni yo mismo lo hacía. Y por supuesto gracias por acompañarme en todos los muestreos, sé que no ha sido fácil. Tenerte a mi lado debajo del agua en tantas ocasiones ha sido un privilegio y un ejemplo. Después de todo lo que hemos pasado juntos, bueno y malo, has ganado un amigo.

Gracias al Dr. Javier Quinteiro, a Lois Pérez y al profesor Manuel Rey, del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la USC, la parte del estudio molecular es una realidad. No dudaron en perder el tiempo, sin esperar nada a cambio, para que un completo ignorante en la materia pudiese aprender de ellos. Me han enseñado técnicas de amplificación, a analizar las secuencias, a interpretar los resultados, han hecho correcciones... para ellos es lo más básico, pero para mí vale una tesis.

Michael Schrödl y Roland Anton, del *Zoologische Staatssammlung* de Múnich, son los investigadores que más han contribuido a ampliar el conocimiento sobre la familia Splanchnotrophidae en los últimos tiempos. Soy afortunado por mantener una buena relación con ellos, lo que no resulta complicado teniendo en cuenta su cercanía y calidad humana. Me han ayudado aportando bibliografía antigua, cediéndome amablemente secuencias y haciendo comentarios clarificadores. Quiero mencionar también a Enrico Schwabe, de la misma institución, que a pesar de trabajar con otros grupos animales, siempre ha estado dispuesto a ayudar en todo lo que fue posible.

El Dr. Juan Moreira me dio consejos muy valiosos y me mostró que un buen científico debe ser minucioso, exacto y efectivo en su trabajo. Más importante si cabe son los trucos que me enseñó para jugar al *Panzer General*, que me permitieron aplastar a la *Werhmacht* y tomar Berlín al mando del Ejército Rojo.

Para poder plasmar lo agradecido que le estoy a mis compañeros de la EBMG necesitaría redactar otra tesis. Como considero que con una ya es más que suficiente, intentaré resumirlo lo mejor que pueda:

Más allá de sus conocimientos de la meiofauna, la Subdirectora Celia Besteiro se comporta como una madre con todos nosotros, siempre atenta a becas, congresos, BOEs y DOGAs que nos puedan ser de utilidad. Su capacidad organizativa y de comprensión de enrevesados textos legales nos mantiene a salvo de la temida burocracia.

Gracias a Ramiro, mi ordenador aún no ha explotado en mil pedazos. También me ha enseñado a digitalizar los dibujos y ha participado en infinidad de muestreos. He de decir que a su lado he pasado de todo: hambruna en el B/O Hespérides, recolecciones extremas de mejillón, encontronazos con inspectores de la Xunta (“Costoya es con y griega”), ordenadores de buceo que deciden morir simultáneamente, máscaras AGA rebeldes, inmersiones recreativas, “paradas de descompresión” en Catabois que se alargan... Compañero, eso une.

Junto con su ayuda en los muestreos, María ha sido fundamental para que llegase a comprender los entresijos de la morfología de los copépodos. Siempre que me surgió alguna duda acerca de una espina, seda minúscula, o grosor de trazo de los dibujos sabía que podía recurrir a su opinión y consejo; además, su aporte en la preparación de las muestras para microscopía fue decisivo.

Xela, incansable contadora de poliquetos, empezó su andadura en la EBMG un par de años después de que yo lo hiciese y he sido testigo de su crecimiento científico y profesional. Fue mi compañera de fatigas en el máster que nos vimos obligados a cursar (¡gracias Bolonia!), y por ello ambos podemos decir “yo estuve allí y sobreviví para contarlo”.

Xandro participó muy activamente en los muestreos, buceando o como patrón. Compartimos mucho tiempo juntos en el laboratorio, y también innumerables discusiones científicas, laborales y políticas. Algunas veces incluso conseguimos ponernos de acuerdo. Gracias *compañero*, espero que te vaya bien en el nuevo rumbo que has tomado.

Además de su manera de trabajar y de su carácter amable, Alberto posee la envidiable capacidad de, a partir de unas ideas generales, materializar lo que necesitas; prueba de ello es el diseño de los recipientes para nudibranchios. Gracias a su esfuerzo las embarcaciones y todo el equipamiento se encuentran siempre a punto para ser utilizados, lo cual no es fácil.

Finuca mantiene la Estación perfectamente limpia para que podamos hacer nuestro trabajo, a pesar del empeño que ponemos en ensuciar todo con botas llenas de fango y bichos moribundos.

Por el tipo de trabajo que se desarrolla en esta tesis hubo que realizar, literalmente, docenas y docenas de muestreos para conseguir material. Se dice rápido, pero eso supone salidas al mar e inmersiones en condiciones nada agradables: frío, lluvia, viento, corriente, mala visibilidad, calor en verano, aparejos abandonados... y puedo decir que jamás escuché a ninguno de mis compañeros quejarse o poner mala cara mientras me regalaban el escaso tiempo del que disponían para sus propias tesis. Sólo se me ocurre una palabra que describe a las personas capaces de hacer ese sacrificio: amigos. Esta tesis también es vuestra y es realidad gracias a vosotros, espero haber estado a la altura.

Por supuesto no me olvido de mis compañeros de Santiago y Lugo: Marcos, Tere, Mario, Lucía Barrio y Lucía Pedrouzo. Su capacidad de trabajo y su buena disposición para participar en los muestreos son un ejemplo, y sus visitas mensuales rompían la monotonía del día a día. Mención especial para Marcos por su ayuda con la colección de Opisthobranchios de Galicia de Vituco, y para Lucía Barrio por compartir conmigo una palmera de chocolate que nos haría amigos.

Los componentes de la “sección sénior” de Vituco, los Doctores Óscar García, Julio Parapar, Jesús Troncoso y Luís Míguez son de esa clase de personas que, sin querer, enseñan. No tengo más que buenas palabras hacia ellos: por su impresionante nivel científico -que es un formidable referente y un estímulo para mejorar día a día-, por haberme ayudado y aconsejado, y por tratarme como a uno más con una cercanía fuera de lo común.

Una de las mayores fortunas que he tenido en mi vida ha sido conocer a Ana. Gracias por soportarme cuando la presión fue demasiada, por sacarme una sonrisa, por animarme cuando me hizo falta. Gracias por estar siempre a mi lado.

Finalizo con mi familia. Mi hermana y mis primos (que también son hermanos) me han apoyado pacientemente durante la realización de este trabajo. Gracias a mis padres nunca me ha faltado de nada, y han sabido respetar todas mis decisiones, tanto las buenas como las malas. Me han aconsejado y han aguantado estoicamente mis días malos, y también los peores. Pero por lo que tengo que estarles más agradecido es por ser un ejemplo de cómo superar las dificultades con fuerza de voluntad y tenacidad. Eso vale oro, y por eso esta tesis es para vosotros.



ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción..... 1

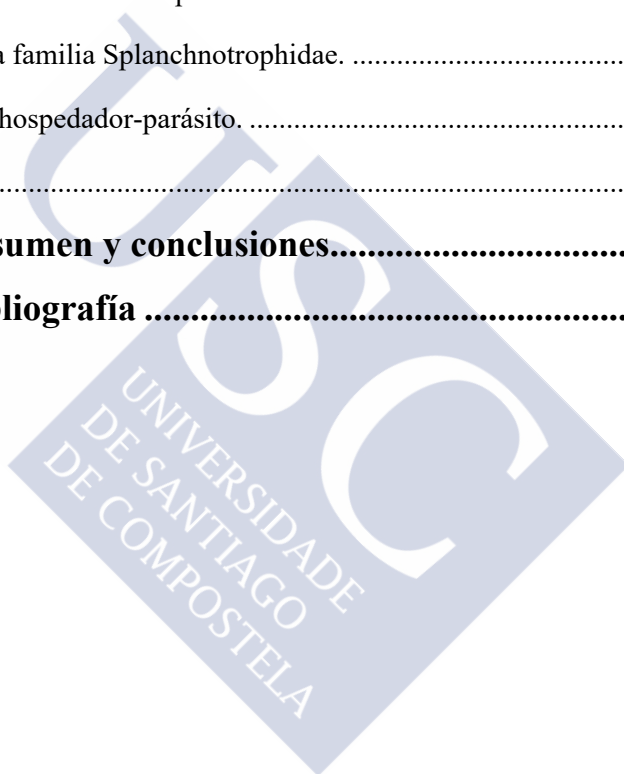
1.1. Características generales de la familia Splanchnotrophidae.	3
1.2. Ordenación sistemática de las especies de la familia Splanchnotrophidae.....	6
1.3. Anatomía externa.	8
1.4. Anatomía interna.....	10
1.5. Antecedentes históricos.	11
1.6. Historia natural.	24
1.6.1. Distribución geográfica.	24
1.6.2. Hábitat.	28
1.6.3. Reproducción.....	31
1.6.4. Ciclo vital.	33
1.6.5. Alimentación.	34
1.6.6. Circulación.	34
1.6.7. Respiración.....	34
1.7. Parasitismo: definición y conceptos generales.	34
1.8. La subclase Copepoda y el parasitismo.	35
1.9. Infraclase Opisthobranchia: hospedadores de la familia Splanchnotrophidae....	39
1.9.1. Sistemática y generalidades de Opisthobranchia.....	39
1.9.2. Preferencias y especificidad de los esplanconotrófidos.	43
1.10. Problemática de la familia Splanchnotrophidae.....	44
1.11. Antecedentes.....	45
1.12. Objetivos.....	51

Capítulo 2. Área de estudio 53

2.1. Localización.....	55
2.1.1. Ría de Ferrol.....	56
2.1.2. Ría de Ares.	57

2.2. Estaciones de muestreo.	58
Capítulo 3. Material y Métodos	73
3.1. Muestreo, fijación y disección de ejemplares.	75
3.1.1. Muestreo.	75
3.1.2. Fijación.	77
3.1.3. Disección.	77
3.2. Estudio molecular.	78
3.2.1. El gen Citocromo c Oxidasa I (COX1).....	78
3.2.2. Aislamiento, amplificación y secuenciación de ADN.	78
3.2.3. Análisis de secuencias.	84
3.3. Microscopía.....	86
3.3.1. <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM).....	86
3.3.2. Microscopía óptica.....	86
3.4. Material estudiado.....	88
3.5. Terminología.....	88
Capítulo 4. Resultados	91
4.1. Introducción.	93
4.2. Estudio anatómico.....	94
4.2.1. Género <i>Lomanotricula</i>	94
4.2.2. Género <i>Splanchnotrophus</i>	133
4.3. Análisis molecular.....	151
4.4. Biología.....	154
4.4.1. Distribución geográfica.	154
4.4.2. Opistobranquios infectados.	157
4.4.3. Tasas de infección.....	158
4.4.4. Carga parasitaria.	162
4.4.5. Tamaño del hospedador.....	163

4.4.6. Posición en el hospedador.	164
4.4.7. Efectos en el hospedador.	164
4.4.8. Presencia estacional.	165
Capítulo 5. Discusión	167
5.1. Morfología.	169
5.1.1. Variabilidad hospedador-dependiente en <i>Lomanotocola</i> sp. nov.	169
5.1.2. Larvas nauplius.	169
5.1.3. <i>Lomanotocola</i> vs. familia Splanchnotrophidae.	171
5.2. Delimitación molecular de especies.	175
5.3. Filogenia de la familia Splanchnotrophidae.	176
5.4. Especificidad hospedador-parásito.	179
5.5. Biología.	181
Capítulo 6. Resumen y conclusiones.....	185
Capítulo 7. Bibliografía	191







Capítulo 1.

Introducción



1.1. Características generales de la familia Splanchnotrophidae.

La familia Splanchnotrophidae Norman & Scott, 1906 es un pequeño grupo poco conocido de crustáceos copépodos endoparásitos asociados a moluscos opisthobranquios y de anatomía muy modificada.

Las características anatómicas que definen a esta familia son: la presencia de antenas fuertes de 3 artejos, maxilas con 2 artejos, tendencia hacia la reducción del número y artejos de apéndices cefálicos, ausencia del 1^{er} par de toracópodos (maxilípedos), 2^o y 3^{er} par de toracópodos birrámeos, y presencia de un par de ramas caudales. Además, en la parte anterior del cefalotórax de las hembras se observan 2-3 pares (según el género) de apéndices laterales (o dorsales, según algunos autores) (HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; ANTON & SCHRÖDL, 2013b; ANTON *et al.*, 2015) (Fig. 1) proyectados hacia el área ventral, lo que supone una característica única de este taxón (HUYS, 2001; SCHRÖDL, 2002; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; SALMEN *et al.*, 2008a, b; UYENO & NAGASAWA, 2012; ANTON & SCHRÖDL, 2013a).

El acentuado dimorfismo sexual que se observa en esta familia, en lo concerniente al tamaño, anatomía y tagmosis (HUYS, 2001), es una característica también compartida por todos los esplanconotrófidios. Las hembras adultas son de un tamaño ostensiblemente mayor que los machos y presentan una anatomía muy modificada (Fig. 1); por su parte la anatomía de los machos es más conservativa y típicamente ciclopiforme (Fig. 2) (HUYS, 2001; SCHRÖDL, 2002; SALMEN *et al.*, 2008a, b).

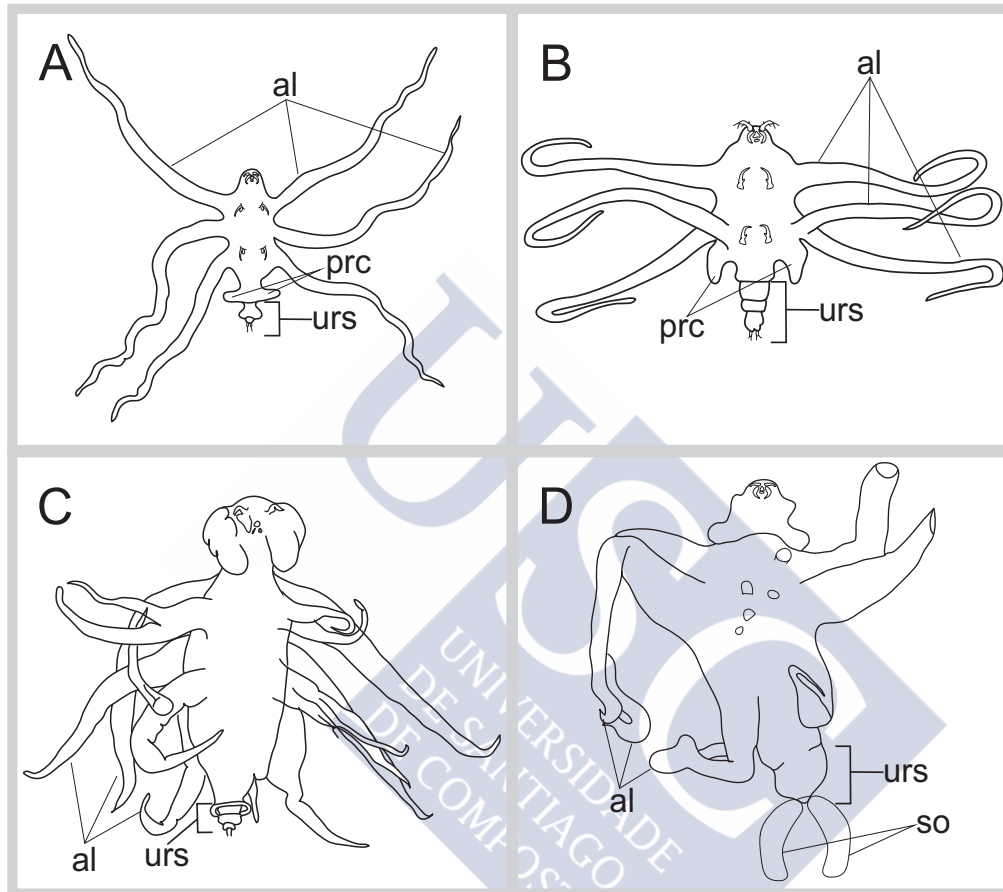


Figura 1. Anatomía externa de las hembras de la familia Splanchnotrophidae. **A.** Hembra de *Splanchnotrophus gracilis* (adaptado de HANCOCK & NORMAN, 1863). **B.** Hembra de *Splanchnotrophus angulatus* (adaptado de HECHT, 1895). **C.** Hembra de *Ismailia aliena* (adaptado de HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003). **D.** Hembra de *Ceratosomicola mammilata* (adaptado de SALMEN *et al.*, 2008a) (al: apéndices laterales; prc: procesos posteriores so: sacos ovígeros; urs: urosoma).

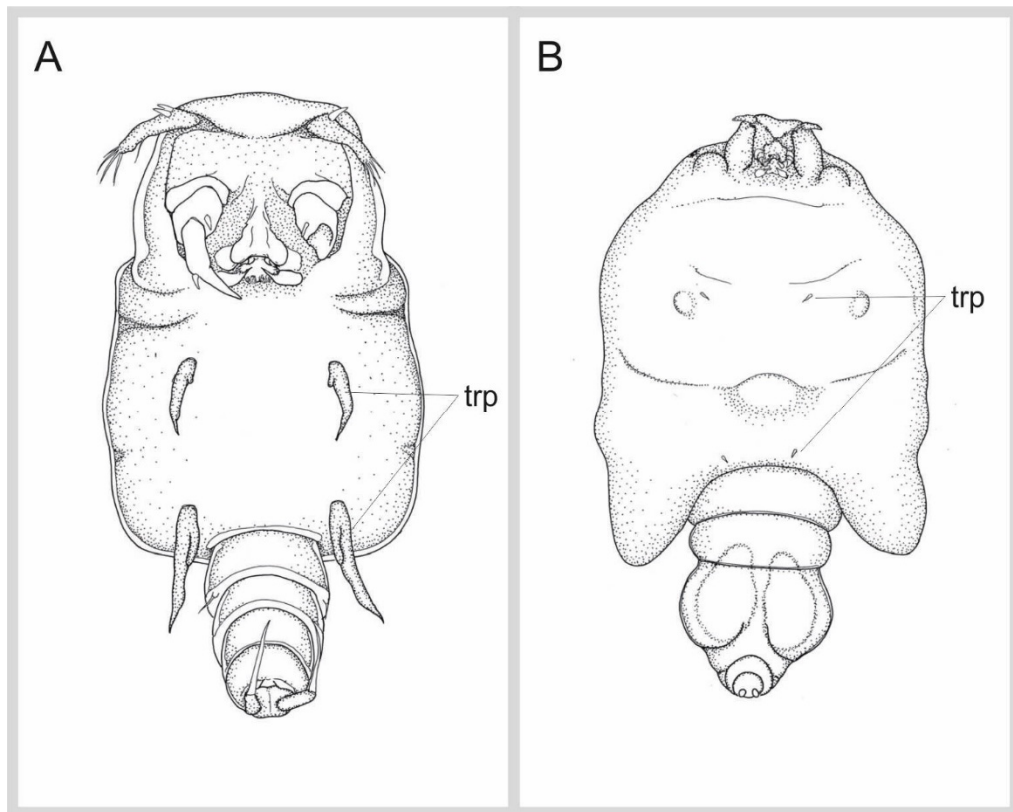


Figura 2. Anatomía externa de los machos de los géneros *Splanchnotrophus* y *Ceratosomicola* (tomado de UYENO & NAGASAWA, 2012). **A.** Macho de *Splanchnotrophus helianthus*. **B.** Macho de *Ceratosomicola japonica*. (trp: toracópodos).

1.2. Ordenación sistemática de las especies de la familia Splanchnotrophidae.

Actualmente se conocen 31 especies de la familia Splanchnotrophidae repartidas en seis géneros: *Splanchnotrophus* Hancock & Norman, 1863; *Lomanotocola* Scott & Scott, 1895; *Ismaila* Bergh, 1867; *Arthurius* Huys, 2001; *Ceratosomicola* Huys, 2001 y *Majimun* Uyeno & Nagasawa, 2012.

Clase Maxillopoda Dahl, 1956

Subclase Copepoda H. M. Edwards, 1840

Infraclass Neocopepoda Huys & Boxshall, 1991

Superorden Podoplea Giesbrecht, 1882

Orden Poecilostomatoida Thorell, 1859

Familia Splanchnotrophidae Norman & Scott, 1906

Género *Splanchnotrophus* Hancock & Norman, 1863

Splanchnotrophus gracilis Hancock & Norman, 1863

Splanchnotrophus willemi Canu, 1891

Splanchnotrophus angulatus Hecht, 1893

Splanchnotrophus dellachiajei Delamare Deboutteville, 1950

Splanchnotrophus helianthus Uyeno & Nagasawa, 2012

Splanchnotrophus imagawai Uyeno & Nagasawa, 2012

Género *Lomanotocola* Scott & Scott, 1895

Lomanotocola brevipes (Hancock & Norman, 1863)

Lomanotocola insolens Scott & Scott, 1895

Género *Ismaila* Bergh, 1867

Ismaila monstrosa Bergh, 1867

Ismaila occulta Ho, 1981

Ismaila belciki Ho, 1987

Ismaila aliena Haumayr & Schrödl, 2003

Ismaila androphila Haumayr & Schrödl, 2003

Ismaila damnosa Haumayr & Schrödl, 2003

Ismaila jenseniana Haumayr & Schrödl, 2003

Ismaila magellanica Haumayr & Schrödl, 2003

Ismaila obtusa Haumayr & Schrödl, 2003

Ismaila robusta Haumayr & Schrödl, 2003

Ismaila socialis Haumayr & Schrödl, 2003

Ismaila chailhuiensis Anton, Schories, Jörger, Kaligis & Schrödl, 2015

Ismaila genalis Anton, Schories, Jörger, Kaligis & Schrödl, 2015

Ismaila volatilis Anton, Schories, Jörger, Kaligis & Schrödl, 2015

Género *Ceratosomicola* Huys, 2001

Ceratosomicola sacculata (O'Donoghue, 1924)

Ceratosomicola coia Salmen, Wilson & Schrödl, 2008

Ceratosomicola delicata Salmen, Wilson & Schrödl, 2008

Ceratosomicola mammilata Salmen, Wilson & Schrödl, 2008

Ceratosomicola japonica Uyeno & Nagasawa, 2012

Género *Arthurius* Huys, 2001

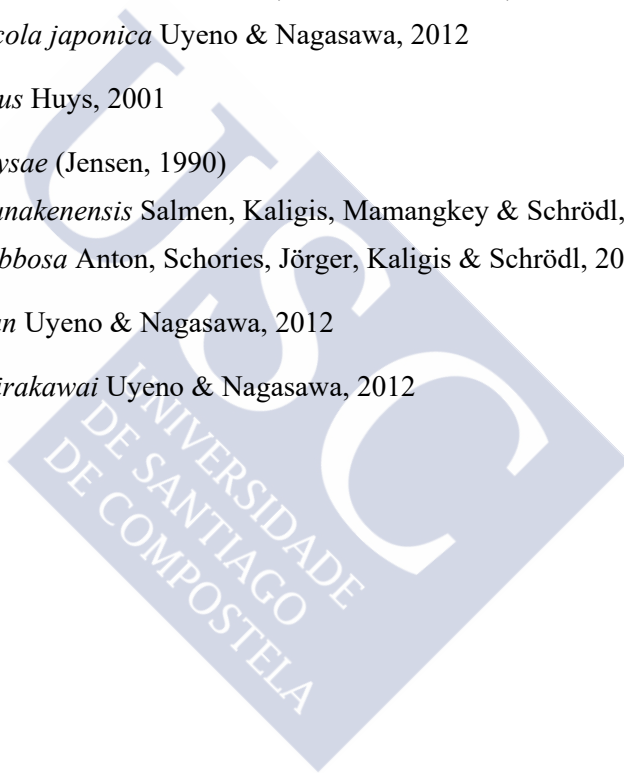
Arthurius elysae (Jensen, 1990)

Arthurius bunakenensis Salmen, Kaligis, Mamangkey & Schrödl, 2008

Arthurius gibbosa Anton, Schories, Jörger, Kaligis & Schrödl, 2015

Género *Majimun* Uyeno & Nagasawa, 2012

Majimun shirakawai Uyeno & Nagasawa, 2012



1.3. Anatomía externa.

Cuerpo de la hembra adulta muy modificado (Fig. 1, Fig. 3). Prosoma de gran tamaño, sin segmentación externa visible, formado por el cefalosoma y los somitos torácicos 2º-5º. Parte anterior del tórax (somitos torácicos 2º y 3º) ancha y con 3-6 pares de apéndices laterales, parte posterior mucho más estrecha, generalmente cilíndrica y formada por la fusión de los somitos torácicos 4º y 5º. Urosoma formado por el 7º somito torácico o somito genital (puede ser simple o doble, al fusionarse con el 1º somito abdominal) y, según el género, por el 6º somito torácico o por entre 0 y 2 somitos postgenitales (abdominales) (Fig. 3). Abertura anal, si existe, entre las dos ramas caudales (HUYS, 2001; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; SALMEN *et al.*, 2008a, b).

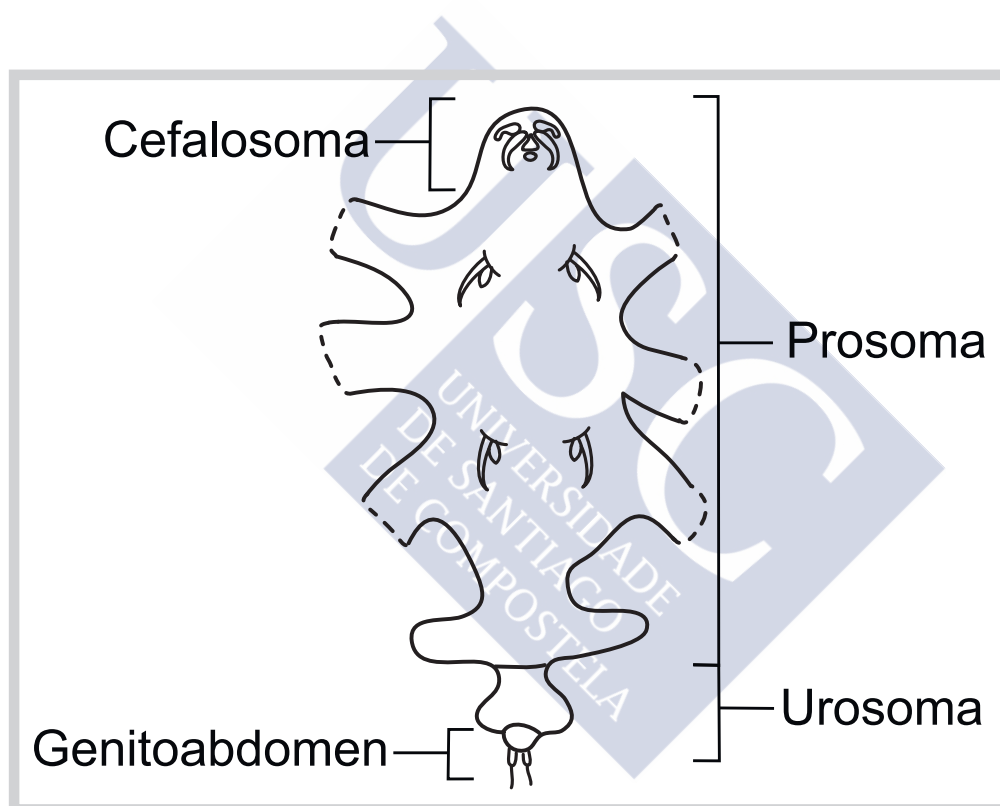


Figura 3. Esquema de la anatomía externa de la hembra de *Splanchnotrophus gracilis*, en el que se señalan las estructuras más importantes y las regiones corporales (adaptado de HANCOCK & NORMAN, 1863).

Macho adulto cicloporiforme, mucho más pequeño que la hembra y sin apéndices laterales (Fig. 2, Fig. 4). Parte anterior delimitada por la articulación presente en el 3^{er} somito torácico, formada por un cefalotórax de 5 somitos cefálicos y 2-3 torácicos. Parte posterior cilíndrica, comprende los somitos torácicos 4^o-6^o, somito genital (7^o torácico) y somito anal (HUYS, 2001; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; SALMEN *et al.*, 2008a, b).

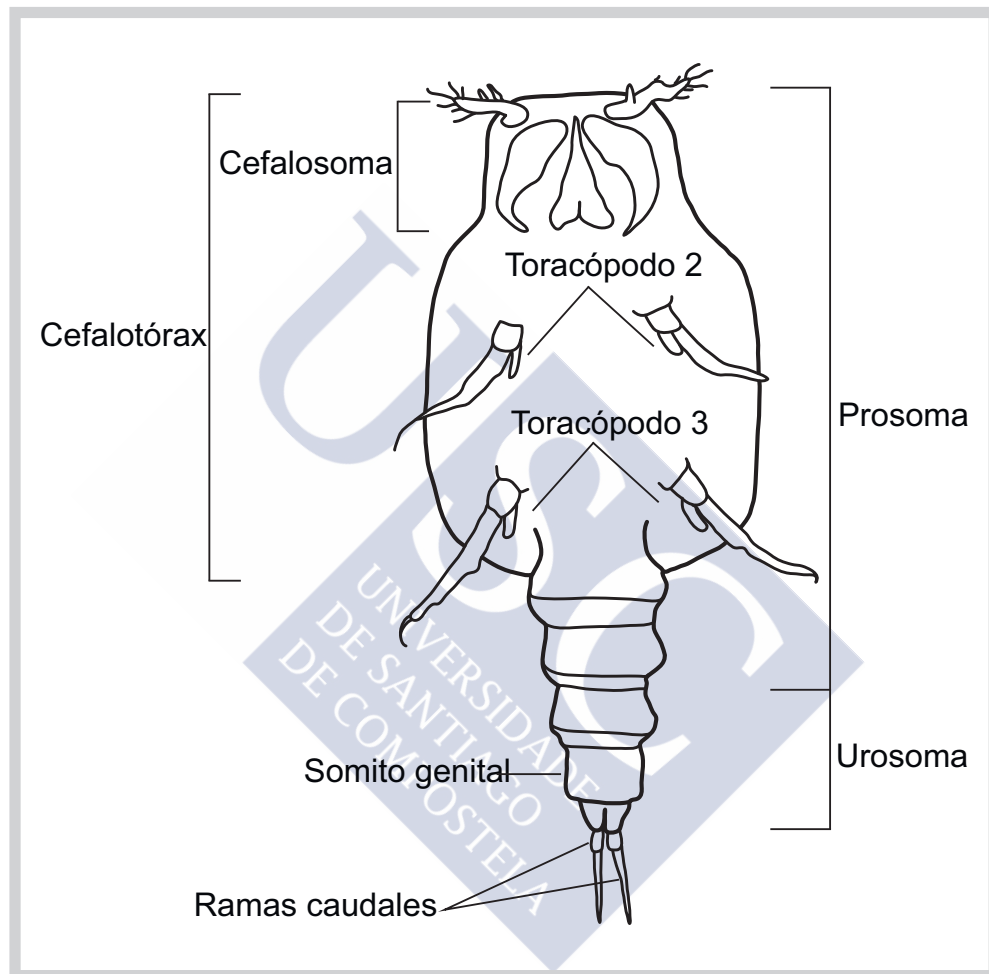


Figura 4. Esquema de la anatomía externa del macho de *Splanchnotrophus gracilis*, en el que se señalan las estructuras más importantes y las regiones corporales (adaptado de HANCOCK & NORMAN, 1863).

Anténulas con 1-4 artejos, de segmentación más o menos marcada según el género. Antenas de 2-3 artejos (coxobase y 1-2 artejos endopodales). Labium y labrum de anatomía muy variable, pudiendo incluso estar ausentes. Mandíbulas, no presentes en *Arthurius*, compuestas por una gnatobase con una hoja de forma diversa entre los diferentes géneros. Maxíbulas reducidas o inexistentes. Maxilas de 2 artejos (syncoxa y alobase). Maxilípedos (1^{er} par de toracópodos) ausentes en la fase adulta (HUYS, 2001; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; SALMEN *et al.*, 2008a, b).

2^o y 3^{er} par de toracópodos birrámeos, endopodito pequeño y exopodito alargado; dimorfismo sexual y ornamentación variables. 4^o par de toracópodos, si está presente, muy reducido y con forma de seda. Sin 5^o par de toracópodos, 6^o par ausente o muy reducido (HUYS, 2001; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; SALMEN *et al.*, 2008a, b).

1.4. Anatomía interna.

La pared corporal está formada por la epidermis, cubierta por una cutícula de quitina pobremente calcificada. Esta capa presenta, en el caso de las hembras, su mayor engrosamiento en la parte del urosoma que se encuentra fuera del hospedador (ANTON & SCHRÖDL, 2013b).

La musculatura de la hembra se compone de tres pares de músculos longitudinales, dos ventrales y uno dorsal, que recorren toda la longitud del animal. Las antenas, mandíbulas y maxilas tienen haces musculares propios; toracópodos y apéndices laterales sin musculatura. En el macho existen dos pares de músculos longitudinales, uno lateral y otro ventral, ambos conectados por un haz muscular transversal. Las antenas y el segundo par de toracópodos poseen una fuerte musculatura (BELCIK, 1981; ANTON & SCHRÖDL, 2013b).

El sistema nervioso de la hembra presenta un ganglio supraesofágico y uno infraesofágico que se alarga formando un nervio ventral, ambos unidos por dos conectivos periesofágicos. El del macho consiste en un anillo nervioso periesofágico y en un ganglio supraesofágico (BELCIK, 1981; ANTON & SCHRÖDL, 2013b).

El sistema excretor está representado por un par de glándulas antenales. Los sistemas respiratorio y circulatorio sin estructuras detectables (BELCIK, 1981; ANTON & SCHRÖDL, 2013b).

El aparato digestivo de ambos sexos es muy similar, comprendido por boca, esófago e intestino medio. Las paredes y lumen de este último presentan células glandulares. La abertura anal sólo fue expresamente mencionada en los géneros *Splanchnotrophus* y

Ceratosomicola, no se observó en el género *Ismaila*, y en los géneros *Lomanotocola*, *Arthurius* y *Majimun* su presencia o ausencia no han sido suficientemente aclaradas (BELCIK, 1981; HUYS, 2001; SALMEN, 2005; SALMEN *et al.*, 2008a; ANTON & SCHRÖDL, 2013b).

El aparato reproductivo femenino está formado por los ovarios, dos oviductos y una glándula cemental. Los ovarios se extienden por todo el cuerpo, incluyendo el interior de los toracópodos y de los apéndices laterales (HUYS, 2001; ANTON & SCHRÖDL, 2013b). El macho posee un par de testis ocupando la mayor parte del cefalosoma y un par de espermátóforos en distinta posición según el género (BELCIK, 1981; HUYS, 2001; ANTON & SCHRÖDL, 2013b).

1.5. Antecedentes históricos.

Los primeros trabajos en los que se menciona a los esplanctotróficos se deben a Delle Chiaje (1841) y a Alder & Hancock (1845-1855) (DELLE CHIAJE, 1841; ALDER & HANCOCK, 1845-1855; HUYS, 2001). DELLE CHIAJE (1841) ilustra un ejemplar del aeolidáceo *Spurilla neapolitana* (Delle Chiaje, 1841) recogido en el Mediterráneo, en el que se observan varias hembras del copépodo sin ninguna descripción ni dibujo detallado (Fig. 5). ALDER & HANCOCK (1845-1855) ilustran y describen brevemente, sin asignar ningún nombre, ambos sexos de un copépodo encontrado parasitando a *Acanthodoris pilosa* (Abildgaard in Müller, 1789) en la localidad inglesa de Devonshire. Comentan además que han observado una especie diferente de la anterior parasitando a *Flabellina verrucosa* (Sars, 1829) y a *Doto coronata* (Gmelin, 1791), pero sin realizar ningún tipo de descripción.

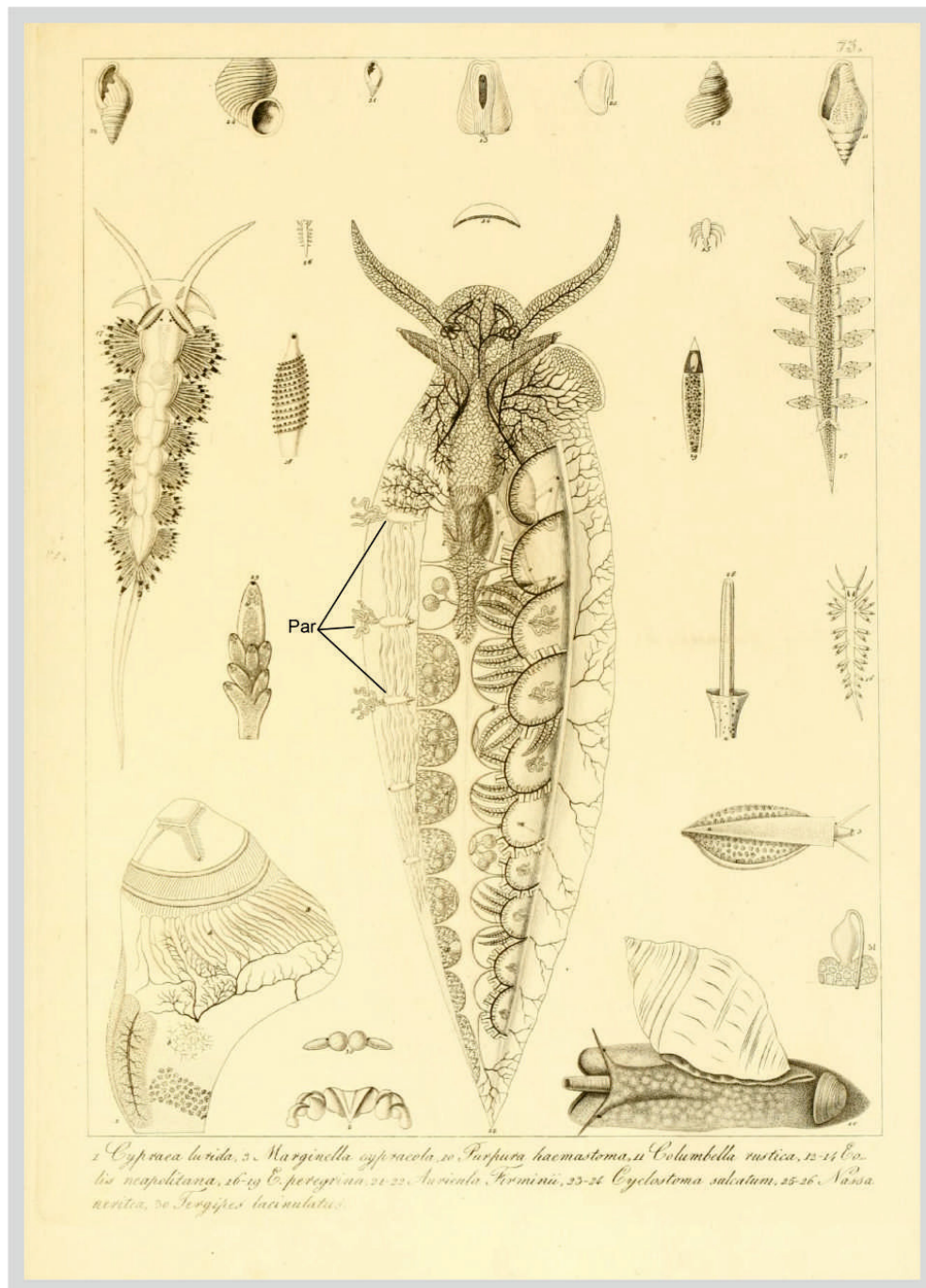


Figura 5. Descripción de *Spurilla neapolitana* en la que se observan varias hembras de *Splanchnotrophus dellachiajei* (tomado de DELLE CHIAJE, 1841; Par: hembra del parásito).

Años más tarde HANCOCK & NORMAN (1863) se centran en las especies de parásitos que aparecen en el trabajo de ALDER & HANCOCK (1845-1855). Encuentran de nuevo a una de ellas infectando a un ejemplar de *Acanthodoris pilosa* en Devonshire, describen ambos sexos y la denominan *Splanchnotrophus gracilis* (Fig. 6A). También detectan al otro parásito mencionado por ALDER & HANCOCK (1845-1855) dentro de *Doto coronata* y describen a la hembra de esta especie, a la que le asignan el nombre de *Splanchnotrophus brevipes* (Fig. 6B). Para albergar a estas dos nuevas especies proponen el género *Splanchnotrophus* (HANCOCK & NORMAN, 1863).

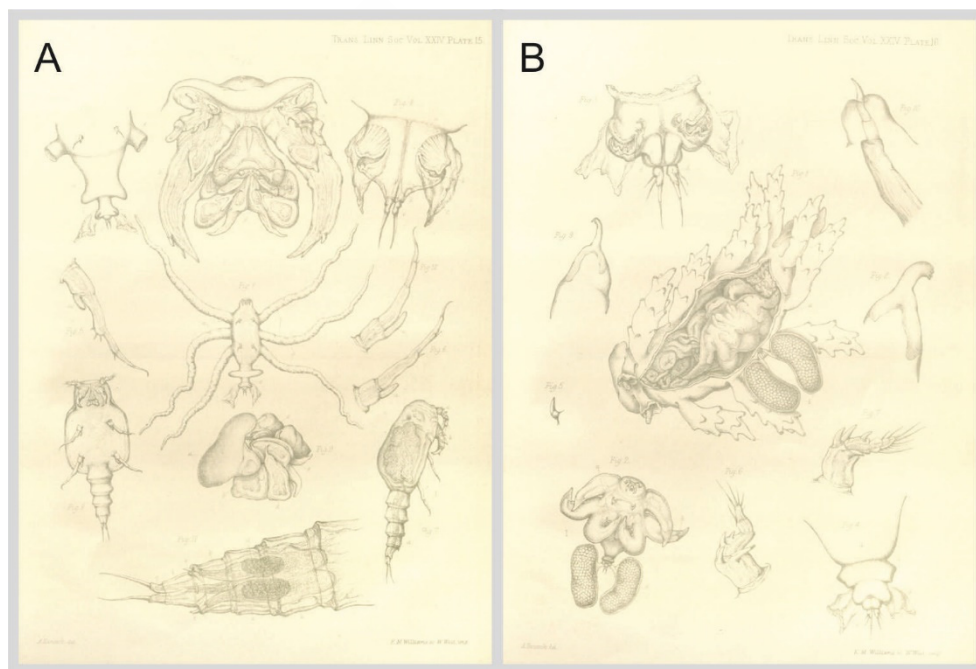


Figura 6. A. Descripción original de *Splanchnotrophus gracilis*. B. Descripción original de *Lomanotricula brevipes* (A y B tomadas de HANCOCK & NORMAN, 1863).

BERGH (1867) crea el género *Ismaila* cuando describe la especie *Ismaila monstrosa* (Fig. 7), encontrada parasitando a *Phidiana lynceus* Bergh, 1867 en las Islas Vírgenes (Mar Caribe). Observa que ese copépodo es similar a *Splanchnotrophus brevipes* pero con diferencias importantes en los apéndices cefálicos, toracópodos y anatomía externa (BERGH, 1867, 1868; HUYS, 2001).

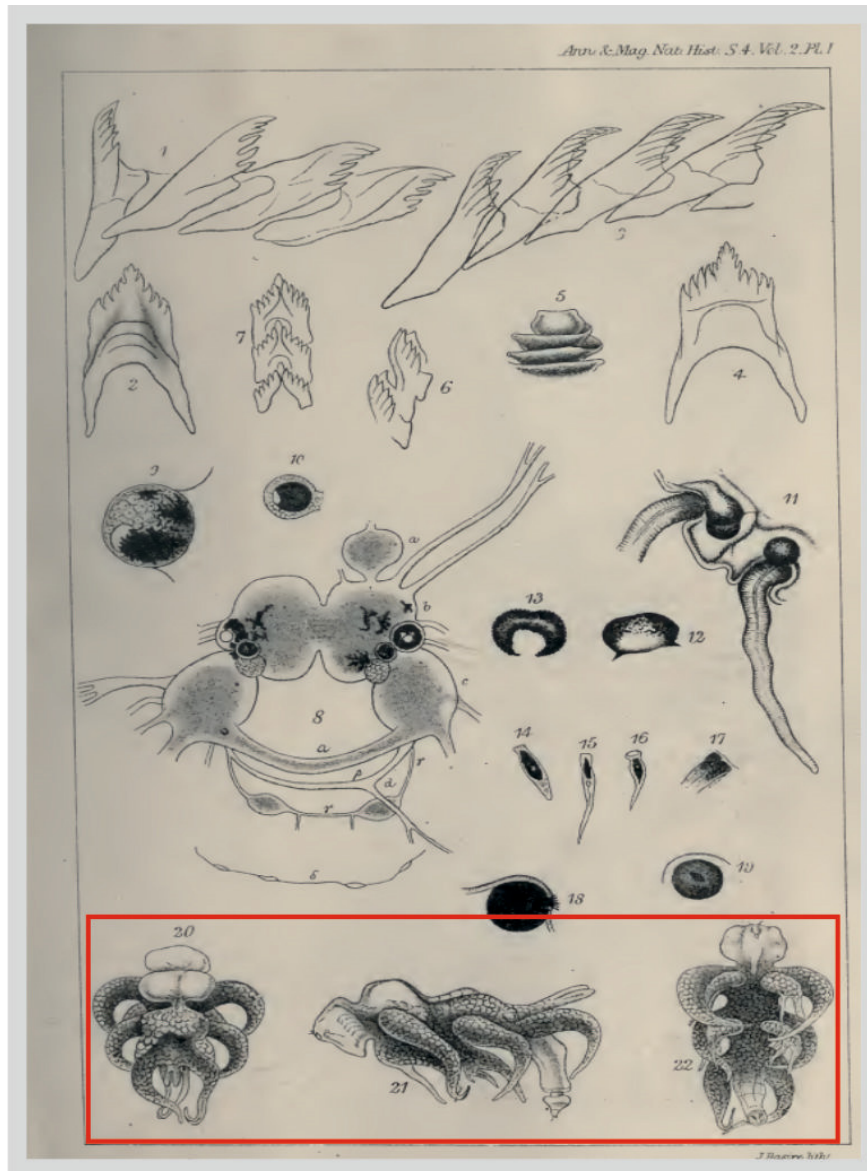


Figura 7. Descripción original de *Ismaila monstrosa* (tomada de BERGH, 1867; copépodo señalado por el rectángulo rojo).

CANU (1891) describe en el género *Splanchnotrophus* a *Splanchnotrophus willemi*, tras encontrar un ejemplar en el noroeste de Francia, realizando una breve descripción de la anatomía externa y sin acompañarla con alguna ilustración.

HECHT (1893) describe *Splanchnotrophus angulatus* parasitando a *Aeolidia papillosa* (Linnaeus, 1761) en Roscoff. Estudia la segmentación de la hembra, la anatomía de los toracópodos y comenta brevemente la disposición de los apéndices cefálicos. Acompaña todo ello con un dibujo esquemático del *habitus* ventral de la hembra (Fig. 8A).

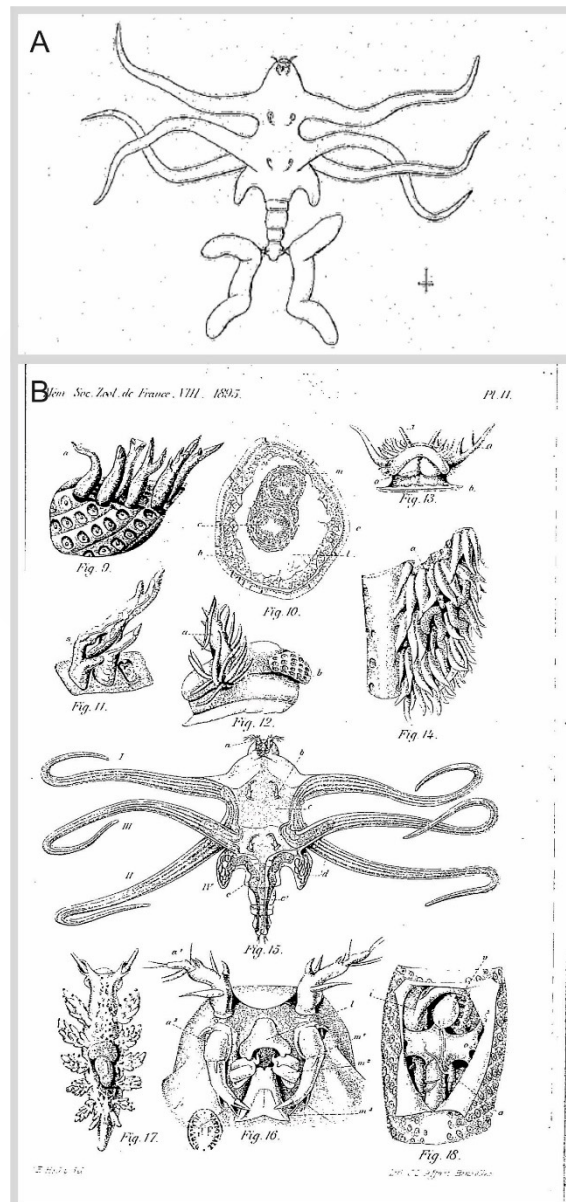


Figura 8. Figuras de diferentes descripciones de *Splanchnotrophus angulatus*. **A.** Descripción original (tomada de HECHT, 1893). **B.** Descripción de HECHT, 1895.

SCOTT & SCOTT (1895) crean el género *Lomanoticola* Scott & Scott, 1895 al describir brevemente la especie *Lomanoticola insolens*, basándose en la reconstrucción de una hembra dañada en la que se observan erróneamente cuatro pares de apéndices laterales (Fig. 9).

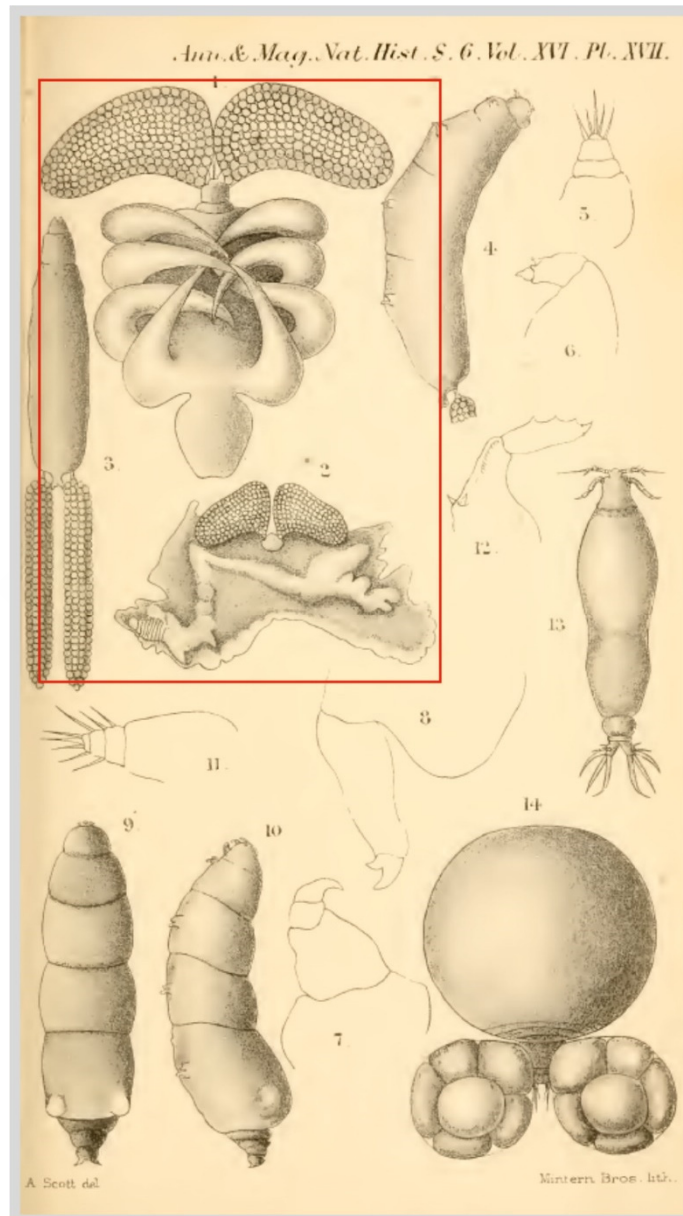


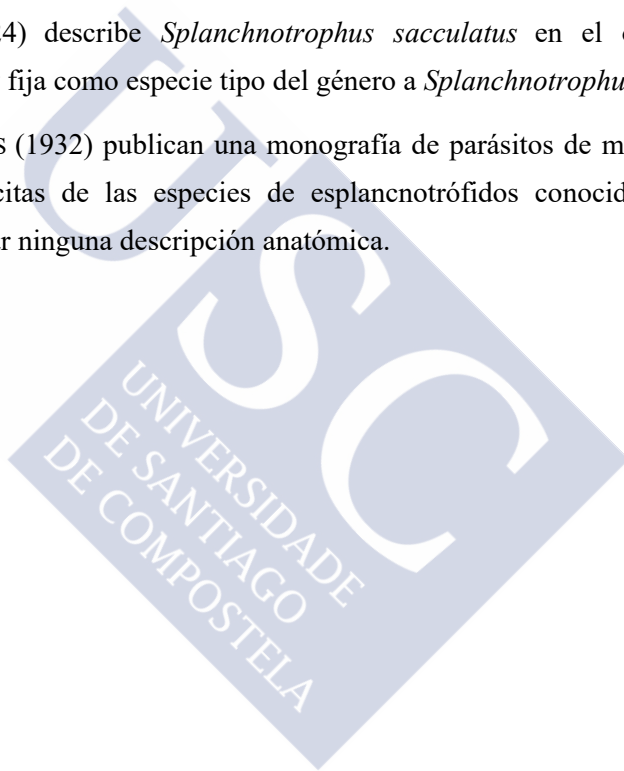
Figura 9. Descripción original de *Lomanoticola insolens* (tomada de SCOTT & SCOTT, 1895; copépodo señalado por el rectángulo rojo).

HECHT (1895) realiza una descripción más pormenorizada y con ilustraciones más detalladas de *Splanchnotrophus angulatus* (Fig. 8B), y compara las 3 especies de *Splanchnotrophus* que encontró en Roscoff (*Splanchnotrophus brevipes*, *Splanchnotrophus willemi* y *Splanchnotrophus angulatus*). Concluye que la presencia de un 4º par de apéndices laterales no es un argumento suficiente para mantener una distinción genérica entre *Lomanotricula* y *Splanchnotrophus*, y relega al primero a la categoría de subgénero de *Splanchnotrophus*. Además, considera a *Lomanotricula insolens* como una especie muy relacionada con *Splanchnotrophus brevipes*.

NORMAN & SCOTT (1906) establecen la familia Splanchnotrophidae para *Splanchnotrophus gracilis*, pero sin una justificación ni diagnóstico que apoyen la creación de este taxón.

O'DONOGHUE (1924) describe *Splanchnotrophus sacculatus* en el occidente de Australia (Fig. 10) y fija como especie tipo del género a *Splanchnotrophus gracilis*.

MONOD & DOLLFUS (1932) publican una monografía de parásitos de moluscos en la que recopilan las citas de las especies de esplanctotrófidos conocidas hasta ese momento, sin aportar ninguna descripción anatómica.



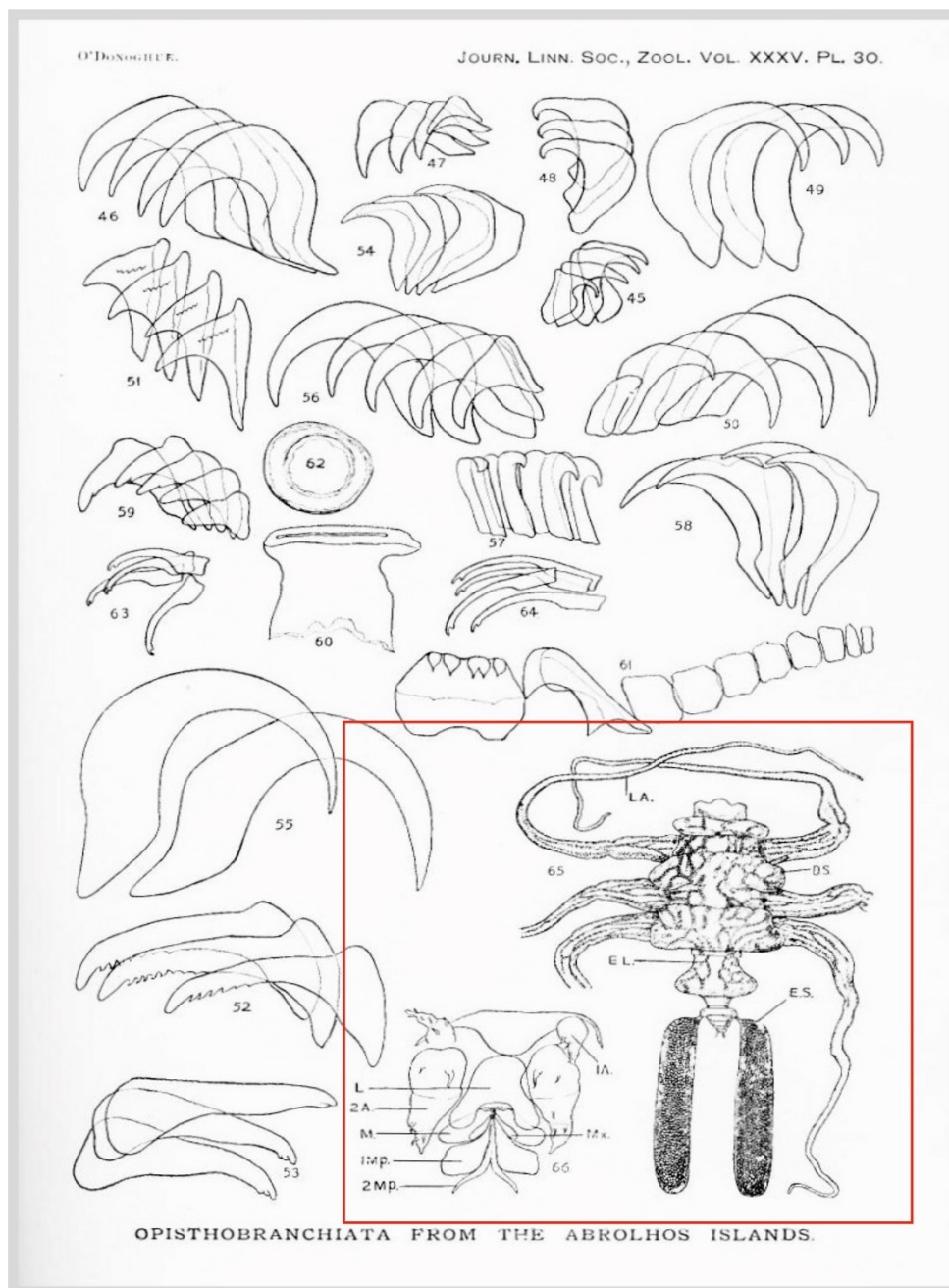


Figura 10. Descripción original de *Ceratosomicola sacculata* (tomada de O'DONOGHUE, 1924; copépodo señalado por el rectángulo rojo).

DELAMARE DEBOUTTEVILLE (1950) estudia las especies de la familia Splanchnotrophidae encontradas en Banyuls (Mediterráneo francés). Describe e ilustra la hembra de la nueva especie *Splanchnotrophus dellachiajei* (Fig. 11A), y la asocia con la que aparece en las ilustraciones de DELLE CHIAJE (1841) basándose en el hecho de que ambas parasitan a *Spurilla neapolitana*. Por otra parte, revisa la anatomía de *Lomanotocola insolens*, aporta ilustraciones (Fig. 11B) y afirma que la presencia de cuatro pares de apéndices laterales en la descripción de la hembra de *Lomanotocola insolens* realizada por SCOTT & SCOTT (1895) es errónea. Poco después este mismo autor publica una descripción del macho de *Splanchnotrophus dellachiajei* (DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1951).

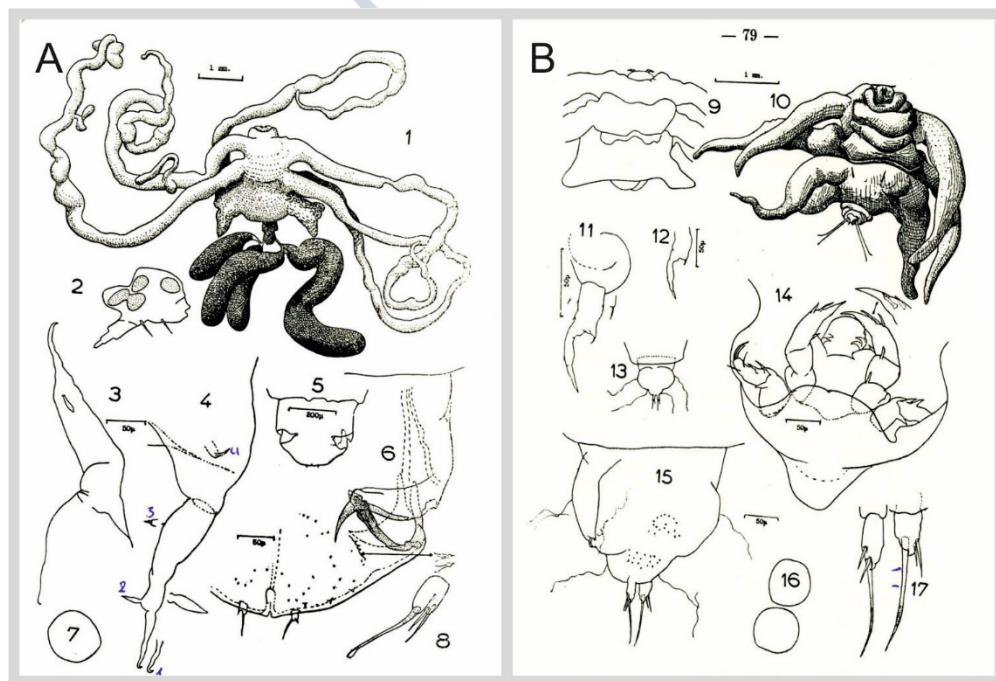


Figura 11. A. Descripción original de *Splanchnotrophus dellachiajei*. B. Redescripción de *Lomanotocola insolens* (A y B tomadas de DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1950).

LAUBIER (1964) estudia en detalle las piezas bucales de *Splanchnotrophus dellachiajei* y *Splanchnotrophus gracilis*. Afirma que la ausencia de maxilípedos y la forma de la mandíbula y la maxila son caracteres diagnósticos inequívocos de la familia Splanchnotrophidae y la distinguen de cualquier otra.

HO (1981) describe la nueva especie *Ismaila occulta*, de aguas del Pacífico nororiental (Fig. 12). Ese mismo año BELCIK (1981) realiza un estudio pormenorizado del macho de *Ismaila monstrosa* en el que aporta datos sobre la tagmosis, apéndices cefálicos, toracópodos y anatomía interna.

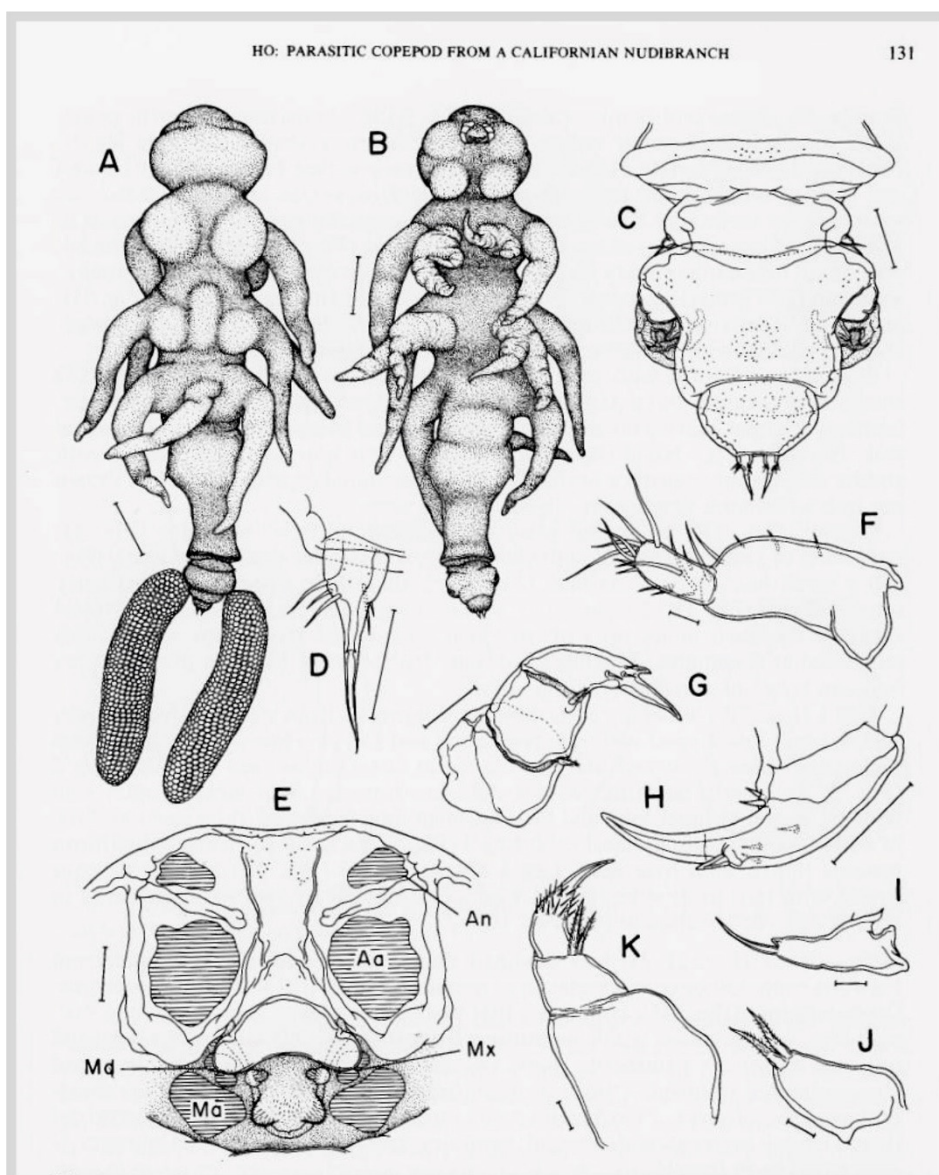


Figura 12. Descripción original de *Ismaila occulta* (tomada de Ho, 1981).

HO (1987) publica los únicos datos conocidos hasta el presente sobre el desarrollo de los miembros de la familia Splanchnotrophidae en su detallado estudio sobre la ontogenia de *Ismaila occulta* (Fig. 23). En él confirma la existencia de una larva nauplius pelágica y propone que el estadio infeccioso sería el de copepodito I, mientras que los copepoditos II, III y IV serían endoparasíticos. También afirma que el mayor progreso en el desarrollo larvario tiene lugar durante el estadio de copepodito IV, ya que es durante esta etapa en la que se observa la aparición del dimorfismo sexual (hecho en consonancia con lo observado en otros poecilostomatoideos). Observa además que la ausencia de maxilípedos en los adultos (una de las apomorfías que definen a los esplanchnotrófidos) se debe a una detención del desarrollo del primodio del maxilípedo que aparece en el copepodito II, más que a la propia inexistencia de su desarrollo.

JENSEN (1987) añade el orden Sacoglossa (von Ihering, 1876) a la lista de hospedadores de la familia Splanchnotrophidae. Encuentra a *Ismaila monstrosa* parasitando a *Ercolania viridis* (Costa, 1866) en la misma localidad en la que Bergh recolectó el primer ejemplar utilizado para describir la especie del copépodo (BERGH, 1867; JENSEN, 1987). En 1990 describe la nueva especie de esplanchnotrófido *Splanchnotrophus elysiae* Jensen, 1990 (Fig. 13) parasitando al también sacogloso *Elysia australis* (Quoy & Gaimard, 1832), y lo incluye en el entonces subgénero *Lomanoticola* en base a la anatomía de los apéndices laterales (JENSEN, 1990).

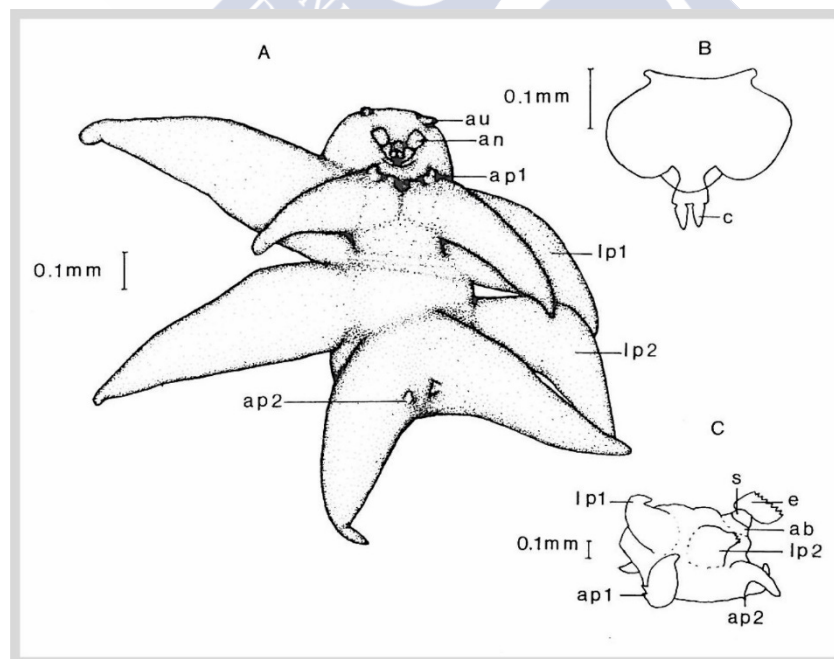


Figura 13. Descripción original de *Arthurius elysae* (tomada de JENSEN, 1990).

SCHRÖDL (1997) estudia los efectos que *Ismaila* sp. produce en la supervivencia y capacidad reproductiva de su hospedador *Flabellina* sp.1. Observa que los nudibrancios infectados dejan de reproducirse y que disminuye su tiempo de supervivencia en laboratorio respecto a los no infectados.

HUYS (2001) marca un punto de inflexión en el conocimiento de la familia Splanchnotrophidae, gracias a las detalladas descripciones anatómicas basadas en los dibujos obtenidos mediante microscopía óptica de las series tipo de la mayoría de las especies y a su estudio exhaustivo y crítico de la bibliografía existente. Agrupa a todos los géneros de endoparásitos de opistobranquios marinos, excepto *Briarella* Bergh, 1876, dentro de la familia Splanchnotrophidae (SALMEN *et al.*, 2010). Resuelve la dudosa posición taxonómica de *Lomanoticola* concediéndole finalmente el estatus de género, e incluye a *Splanchnotrophus brevipes* en este taxón bajo la denominación *Lomanoticola brevipes* (Hancock & Norman, 1863) como nueva combinación. Además, crea dos nuevos géneros para acomodar a *Splanchnotrophus elysiae* y *Splanchnotrophus sacculatus*, que poseen caracteres suficientemente diferenciados del género *Splanchnotrophus* como para ser excluidas de él:

- *Arthurius* Huys, 2001 para *Arthurius elysae*. Las principales características de este género son la presencia de un 4º par de apéndices laterales en las hembras en una posición más ventral que los otros 3, los apéndices cefálicos están muy reducidos (anténulas de un único artejo, antenas de 2, ausencia de mandíbulas y maxílulas) y con dimorfismo sexual, y los toracópodos 2º y 3º son vestigiales en las hembras pero muy desarrollados y completamente funcionales en los machos.
- *Ceratosomicola* Huys, 2001 para *Ceratosomicola sacculata* (HUYS, 2001). Las apomorfías que caracterizan a este género son la anténula con 4 artejos claramente diferenciados, reducción de la maxila, presencia de dos somitos postgenitales en las hembras y reducción de los toracópodos a meros elementos vestigiales, incluidos en gran parte en el interior de la pared corporal.

De esta manera, la familia Splanchnotrophidae queda conformada por los géneros *Splanchnotrophus*, *Lomanoticola*, *Ismaila*, *Arthurius* y *Ceratosomicola*.

SCHRÖDL (2002) analiza las frecuencias y prevalencias de infección del género *Ismaila* en los opistobranquios de Chile y Argentina, así como su variación geográfica. Propone una hipótesis sobre la evolución de la familia Splanchnotrophidae en la que ancestros comunes los géneros *Splanchnotrophus* e *Ismaila*, con baja especificidad hospedador-

parásito, se habrían visto aislados geográficamente. Tras este evento ambos géneros se diferenciarían por radiación paralela y se habrían especializado en determinadas especies de hospedador.

HAUMAYR & SCHRÖDL (2003) revisan el género *Ismaila* y describen 8 nuevas especies del Pacífico suroriental, empleando por primera vez en el estudio de la familia Splanchnotrophidae la microscopía electrónica de barrido (SEM), la cual resulta ser una herramienta eficaz para observar estructuras finas con gran detalle.

MARSHALL & HAYWARD (2006) realizan un análisis histológico de varios individuos del nudibranquio *Ancula gibbosa* (Risso, 1818) infectados por *Splanchnotrophus willemi*, y concluyen que, a pesar de no existir efectos negativos evidentes en la mayoría de ellos, sí producen malformaciones en las gónadas que podrían afectar a la reproducción.

SALMEN *et al.* (2008a, b) usan el SEM para describir nuevas especies pertenecientes a los géneros *Ceratosomicola* y *Arthurius*.

ABAD *et al.* (2011) realizan un estudio anatómico mediante el SEM de *Splanchnotrophus gracilis* en la Ría de Ferrol, y aportan datos sobre la biología del parásito (tasas de infección, efectos en el hospedador, etc.) gracias a la gran cantidad de especímenes encontrados infectando al nudibranquio *Trapania tartanella* (von Ihering, 1886).

UYENO & NAGASAWA (2012) estudian la familia Splanchnotrophidae en aguas japonesas. Fruto de este trabajo es la propuesta del género *Majimun* Uyeno & Nagasawa, 2012 para la nueva especie *Majimun shirakawai* en base a la particular segmentación del urosoma y apéndices cefálicos, y a la ornamentación diferenciada de estas estructuras. También describen una nueva especie del género *Ceratosomicola* y dos del género *Splanchnotrophus*, ampliando notablemente la distribución geográfica conocida de este último.

ANTON & SCHRÖDL (2013a) se basan en caracteres anatómicos para realizar la primera filogenia de los esplanchnotrófidos. En el árbol resultante se demuestra la monofilia de la familia Splanchnotrophidae, así como el hecho de que comparte un antepasado común con el género *Briarella*. Encuentran que existe una dicotomía basal dentro de la familia Splanchnotrophidae, que agrupa en un clado a los géneros *Arthurius* y *Ceratosomicola* y en otro a los géneros *Ismaila* y *Splanchnotrophus s.l.* (incluyendo *Lomanoticola*). Así mismo, proponen la hipótesis de que el área inicial dónde se emplearon los

opistobranquios como hospedadores fue la zona del Indo-Pacífico, donde hoy día se encuentran los géneros más basales *Ceratosomicola* y *Arthurius*. La expansión del ancestro común de los géneros *Ismaila* y *Splanchnotrophus s.l.* tendría lugar desde ahí hacia el oeste antes del cierre del Mar de Tethys, llegando al Mediterráneo y al Atlántico. En el siguiente paso, el ancestro del género *Ismaila* cruzaría en una primera etapa el Atlántico y en una segunda el todavía abierto Istmo de Panamá, colonizando de esta manera las costas occidentales de América del Norte y del Sur.

Ese mismo año ANTON & SCHRÖDL (2013b) realizan una reconstrucción tridimensional de la hembra y del macho de la especie *Ismaila aliena*, con la que describen su anatomía interna y proponen hipótesis sobre su biología en base a los resultados obtenidos.

WOLF & YOUNG (2014) estudian con datos estadísticos obtenidos en laboratorio la reproducción, crecimiento y tasas de supervivencia del armináceo *Janolus fuscus* O'Donoghue, 1924 infectado por *Ismaila belciki*. Determinan que esos parámetros se ven reducidos de manera más o menos significativa respecto a los de otros individuos no infectados. Además, encuentran que el parásito desvía alrededor de un tercio de la energía destinada para la reproducción del nudibranquio hacia su propio esfuerzo reproductivo. Ello implica que al menos *Ismaila belciki* sigue una estrategia similar en ciertos aspectos a los parásitos castradores, aunque difiere de ella en que la infección no implica el cese completo de la reproducción del hospedador.

ANTON *et al.* (2015) emplean de nuevo el SEM para describir tres especies del género *Ismaila* y una del género *Arthurius*.

1.6. Historia natural.

1.6.1. Distribución geográfica.

La mayoría de las especies se encuentran en aguas templadas, ya que de las 31 conocidas en la actualidad, 22 se han encontrado en ellas y únicamente 9 en la zona intertropical (HANCOCK & NORMAN, 1863; BERGH, 1867, 1868; CANU, 1891; HECHT, 1893, 1895; SCOTT & SCOTT, 1895; O'DONOGHUE, 1924; DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1950, 1951; BELCIK, 1981; HO, 1981; JENSEN, 1987, 1990; SCHRÖDL, 1997, 2002; HUYS, 2001; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; SALMEN *et al.*, 2008a, b; ABAD *et al.*, 2011; UYENO & NAGASAWA, 2012; ANTON & SCHRÖDL, 2013a; ANTON *et al.*, 2015).

- El género *Splanchnotrophus* presenta la distribución más amplia de la familia, puesto que se observa en dos zonas bien diferenciadas y separadas geográficamente: una europea boreo-mediterránea y otra formada por las dos especies descritas en Japón.

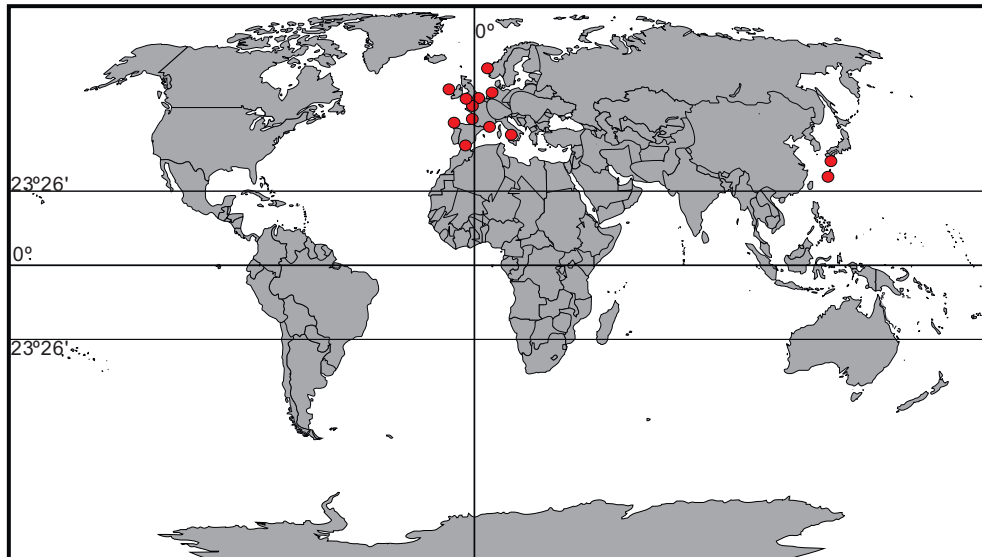


Figura 14. Mapa de la distribución del género *Splanchnotrophus*.

- La distribución del género *Lomanotricula* se solapa con la del género *Splanchnotrophus* en el Mediterráneo y Atlántico nororiental (europea boreo-mediterránea).

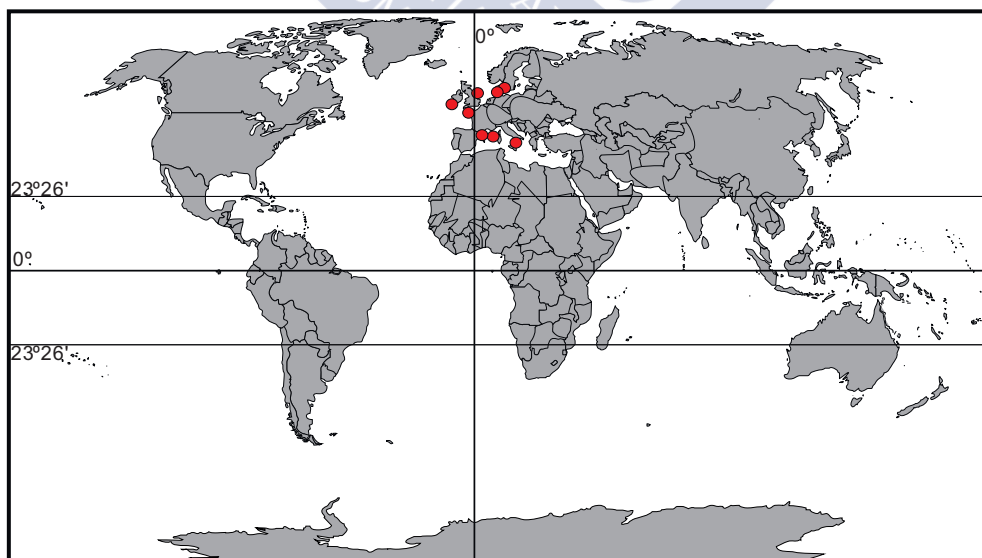


Figura 15. Mapa de la distribución del género *Lomanotricula*.

- El género *Ismaila* se menciona en el Caribe y en aguas templadas del Pacífico nororiental y suroriental.



Figura 16. Mapa de la distribución del género *Ismaila*.

- En el género *Arthurius* la distribución es indo-pacífica, observándose en Australia occidental, Nueva Caledonia y Sulawesi.

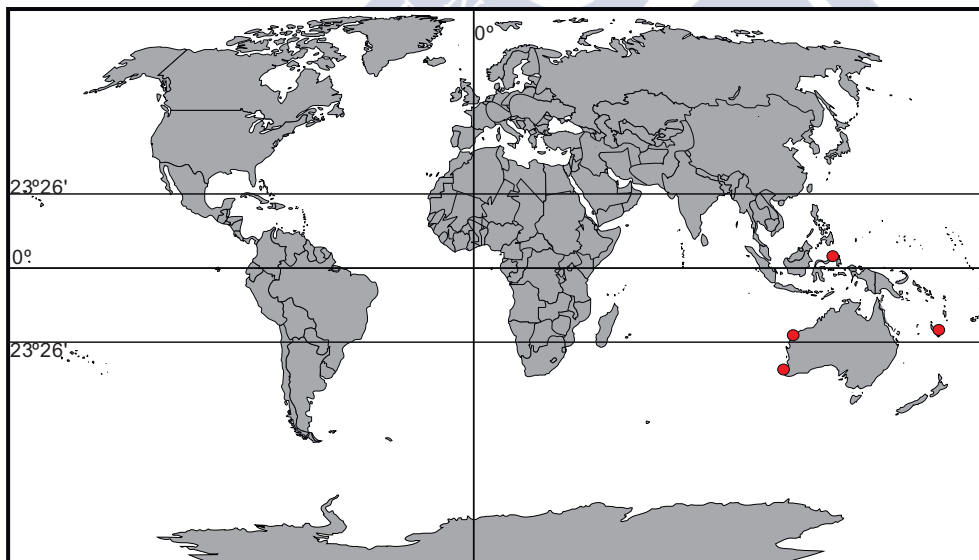


Figura 17. Mapa de la distribución del género *Arthurius*.

- La presencia del género *Ceratosomicola* se ha citado en las islas Houtman, Abrolhos, Sulawesi y Japón (distribución indo-pacífica).

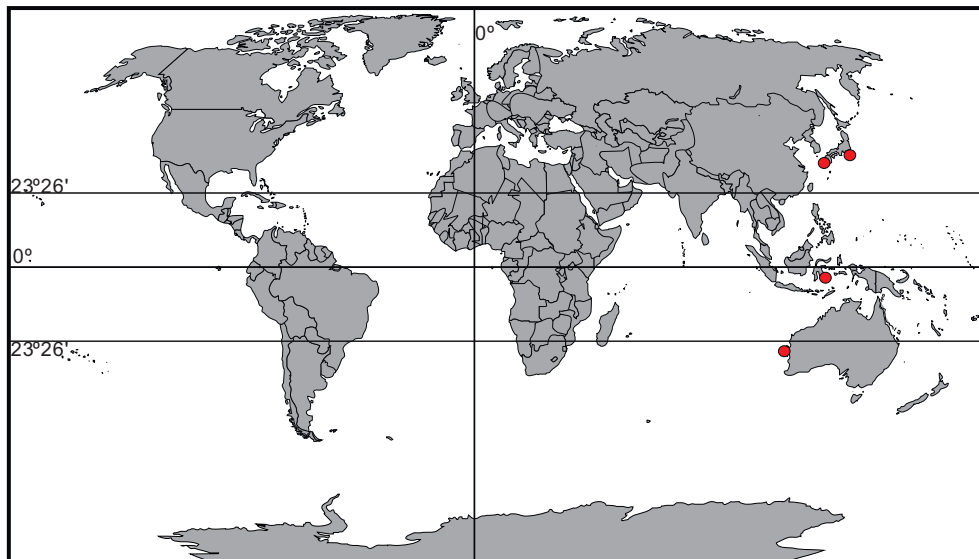


Figura 18. Mapa de la distribución del género *Ceratosomicola*.

- El género *Majimun* presenta la distribución más limitada de la familia, ya que hasta el momento solamente se ha encontrado en Japón.

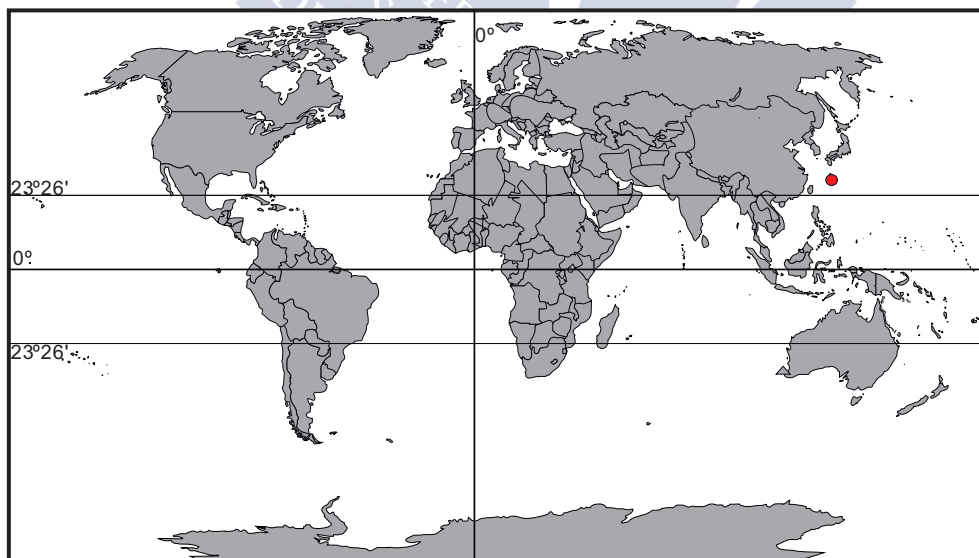


Figura 19. Mapa de la distribución del género *Majimun*.

1.6.2. Hábitat.

La familia Splanchnotrophidae parasita opistobranquios de aguas costeras, desde la zona intermareal hasta los 30 m de profundidad.

Dado que la familia Splanchnotrophidae se encuentra en el interior de opistobranquios, el cuerpo del hospedador se debe entender también como su hábitat (RHODE, 1993). Las hembras ovígeras se sujetan a sus vísceras con los apéndices laterales y penetran el intertegumento con el urosoma (Figs. 20A, B), mientras que los machos se mueven libremente por el interior del hospedador (Fig. 20B).

Al urosoma se anclan un par de sacos ovígeros que se sitúan entre los ceratas o entre las branquias del hospedador (Fig. 21) (BELCIK, 1981; HO, 1981; SCHRÖDL, 1997; HUYS, 2001; SCHRÖDL, 2002; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; SALMEN *et al.*, 2008a, b; ABAD *et al.*, 2011; ANTON & SCHRÖDL, 2013a, b), lo que les confiere un buen camuflaje y el aprovechamiento de las defensas químicas del opistobranquio (JENSEN, 1987; SCHRÖDL, 1997; HUYS, 2001; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; ANTON & SCHRÖDL, 2013a).



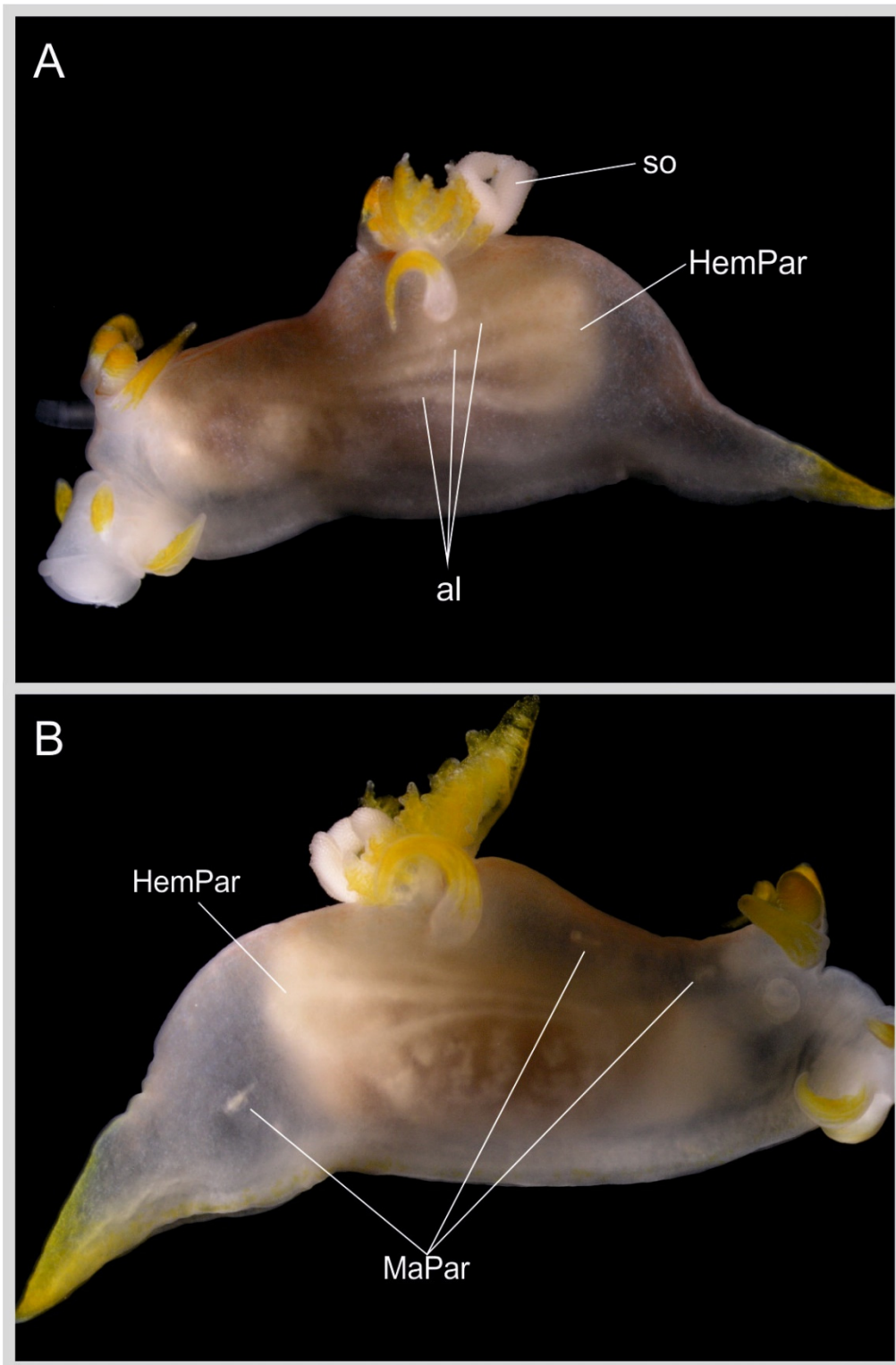


Figura 20. Posicionamiento de *Splanchnotrophus gracilis* en el interior del nudibranquio *Trapania tartanella*. **A.** Posición de la hembra. **B.** Posición de varios machos respecto a una hembra (al: apéndices laterales; HemPar: hembra del parásito; MaPar: macho del parásito; so: sacos ovígeros). Fotografías realizadas con microscopio estereoscópico.

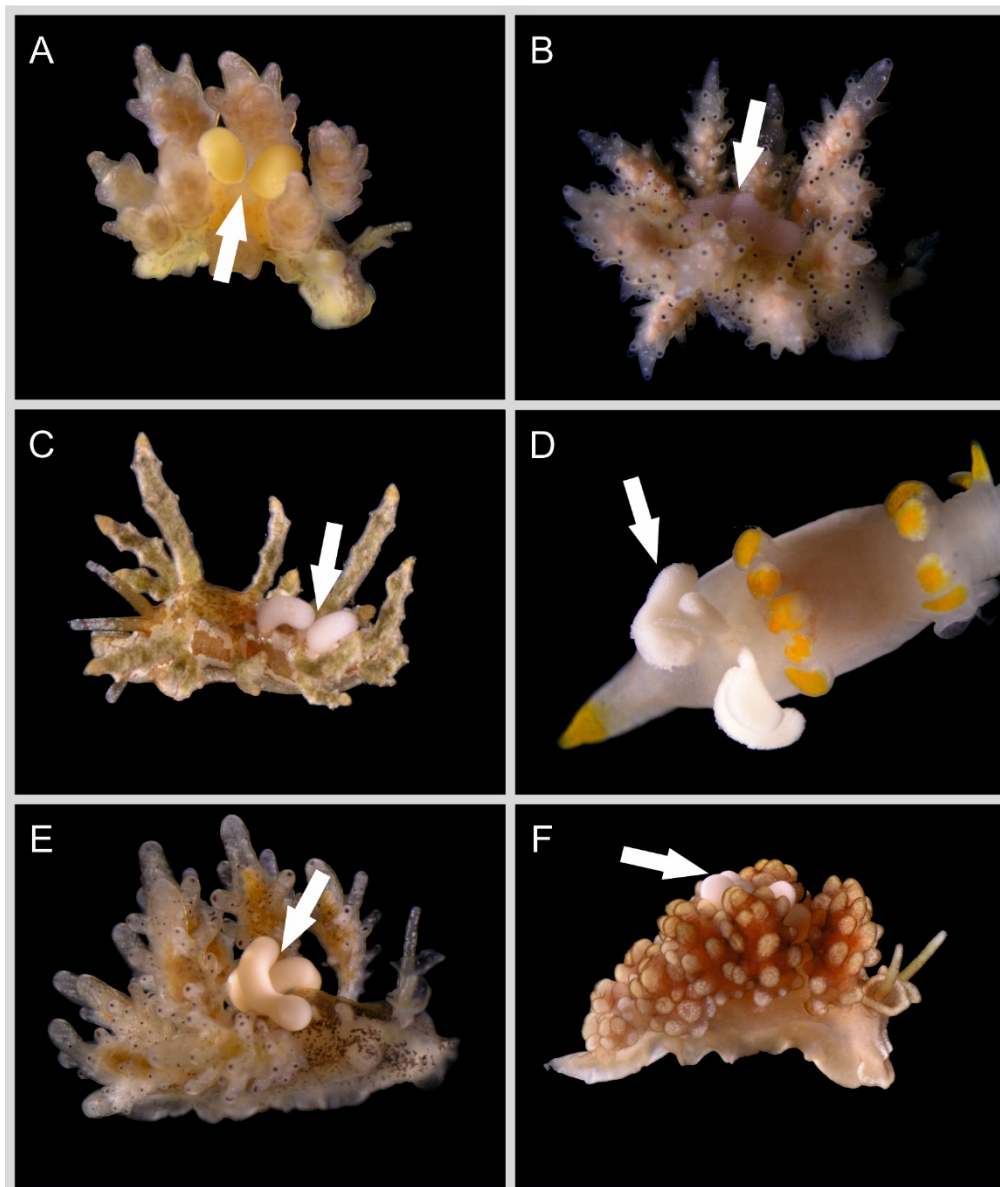


Figura 21. Posición de los sacos ovígeros (flechas blancas) de los géneros *Splanchnotrophus* y *Lomanotricula*. **A.** *Lomanotricula* sp. nov. en *Doto lemchei* Ortea & Urgorri, 1978. **B.** *Lomanotricula* sp. nov. en *Doto pinnatifida* (Montagu, 1804). **C.** *Lomanotricula* sp. nov. en *Eubranchus* sp. **D.** *Splanchnotrophus gracilis* en *Trapania tartanella*. **E.** *Lomanotricula* sp. nov. en *Doto koenneckeri* Lemche, 1976. **F.** *Lomanotricula* sp. nov. en *Doto fragilis* (Forbes, 1838). Fotografías realizadas con microscopio estereoscópico.

1.6.3. Reproducción.

El modo de reproducción de los miembros de la familia Splanchnotrophidae es desconocido, y sólo existen datos sobre la anatomía interna del aparato reproductivo (BELCIK, 1981; HUYS, 2001; ANTON & SCHRÖDL, 2013b). Sin embargo se ha observado que por lo general una única hembra comparte hospedador con uno o más machos, y que estos se encuentran normalmente en las proximidades de la misma (HO, 1981; SCHRÖDL, 1997; HUYS, 2001; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; SALMEN *et al.*, 2008a, b; ABAD *et al.*, 2011). Por ello ANTON & SCHRÖDL (2013b) sugieren que la cópula tiene lugar continuamente entre las hembras y los machos situados en sus proximidades, asegurando así un suministro constante de gametos masculinos.

La forma de los sacos ovígeros es diferente según el género (Fig. 22), y su inserción con el genitoabdomen puede ser terminal o subterminal (HUYS, 2001; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; ANTON & SCHRÖDL, 2013a). Su coloración también es variable, e incluso ha sido utilizada como carácter diagnóstico diferencial entre especies de un mismo género (CANU, 1891; SALMEN, *et al.*, 2008a).



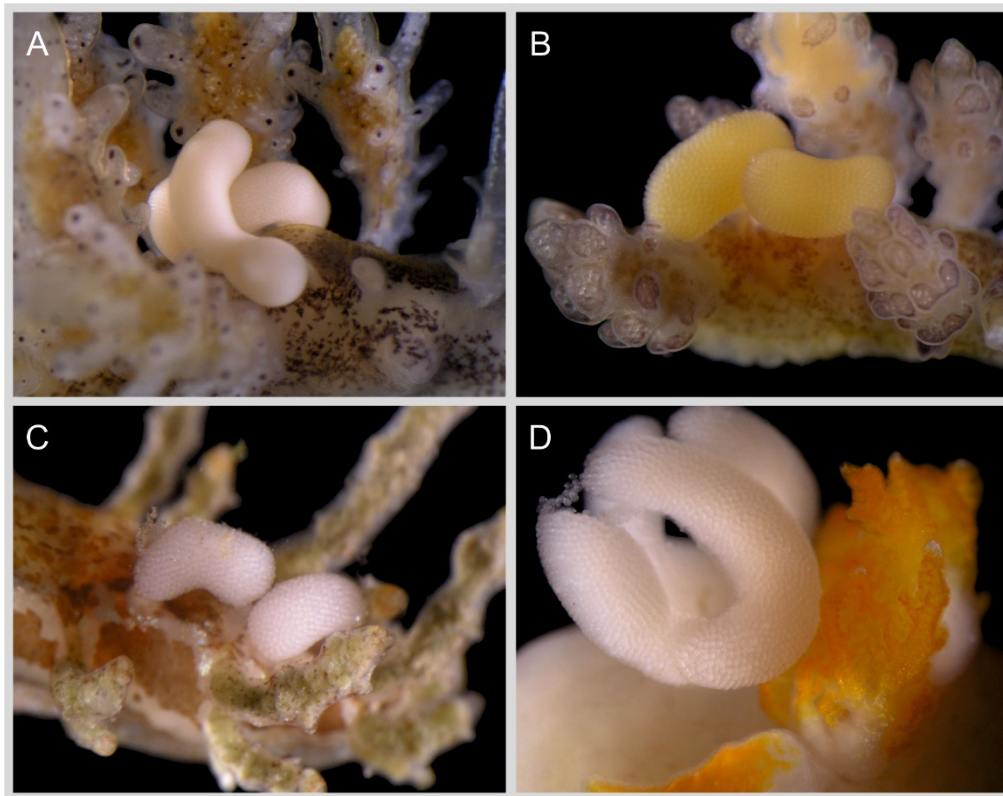


Figura 22. Detalle de los sacos ovígeros de los géneros *Splanchnotrophus* y *Lomanotocola*. **A.** *Lomanotocola* sp. nov. en *Doto koenneckeri*. **B.** *Lomanotocola* sp. nov. en *Doto lemchei*. **C.** *Lomanotocola* sp. nov. en *Eubranchus* sp. **D.** *Splanchnotrophus gracilis* en *Trapania tartanella*. Fotografías realizadas con microscopio estereoscópico.

1.6.4. Ciclo vital.

Tras la eclosión de los huevos el primer estadio larvario que aparece es el nauplius I, de modo de vida pelágico; se desconoce si existen todos los restantes estadios nauplius típicos de copépodos (II-VI) o si hay reducción en su número. A continuación, la larva nauplius se transforma en sucesivas formas de copepodito I, II, III y IV (Fig. 23). La infección del hospedador tiene lugar durante la fase de copepodito I, los copepoditos II, III y IV son endoparasíticos. La aparición del dimorfismo sexual ocurre durante el estadio de copepodito IV mediante el desarrollo peramórfico de las hembras (HO, 1987; HUYS, 2001; ANTON & SCHRÖDL, 2013a).

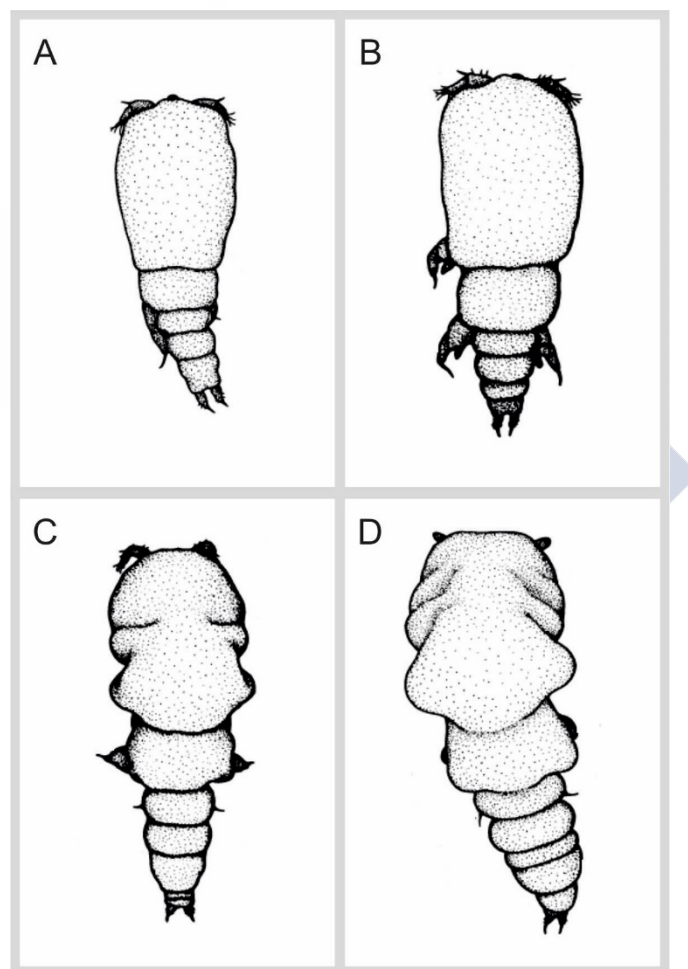


Figura 23. Copepoditos de *Ismaila occulta* (tomado de HO, 1987). **A.** Copepodito II. **B.** Copepodito III. **C.** Copepodito IV, hembra. **D.** Copepodito IV, macho.

1.6.5. Alimentación.

Generalmente se ha asumido que los esplanocnótrifidos se alimentan de las vísceras del hospedador (HUYS, 2001; MARSHALL & HAYWARD, 2006). Recientemente algunos autores (SALMEN *et al.*, 2008a, b; ANTON & SCHRÖDL, 2013a, b) descartan esta teoría puesto que las vísceras de la mayoría de los hospedadores no presentan daños; además, existe una tendencia en la familia hacia la reducción e incluso desaparición de las piezas bucales (géneros *Arthurius* y *Ceratosomicola*) y la musculatura asociada a ellas no está lo suficientemente desarrollada como para permitir este tipo de alimentación. Proponen en su lugar que la principal fuente de alimento es la hemolinfa del hospedador, muy rica en nutrientes y de fácil ingestión y digestión. Complementariamente a este tipo de alimentación también podría realizar absorción de nutrientes a través de la cutícula, gracias a su escaso grosor (ANTON & SCHRÖDL, 2013b).

1.6.6. Circulación.

El flujo de la hemolinfa se produce mediante los propios movimientos del copépodo y del hospedador, ya que no existen corazón u otras estructuras típicas del sistema circulatorio (ANTON & SCHRÖDL, 2013b).

1.6.7. Respiración.

El intercambio gaseoso tiene lugar a través de la fina cutícula por difusión simple en toda la superficie corporal (BELCIK, 1981; SALMEN *et al.*, 2008b; ANTON & SCHRÖDL, 2013b).

1.7. Parasitismo: definición y conceptos generales.

En una aproximación general se podría definir el parasitismo como la utilización de un organismo (el hospedador) como hábitat y fuente de nutrientes por parte de otro (el parásito), que puede producir daños en el primero o ser completamente inocuo para él (KABATA, 1979; RHODE, 1993; SMYTH, 1994; ZELMER, 1998; POULIN, 2007).

Existen una serie de asociaciones interespecíficas que en la literatura han sido ocasionalmente equiparadas al parasitismo en un sentido amplio, ya que en ocasiones es difícil trazar una frontera que separe unas de otras (RHODE, 1993; SMYTH, 1994; POULIN, 2007):

- Foresis: una especie emplea a otra para su desplazamiento pero sin llegar a establecer una asociación íntima.

- Comensalismo: un organismo utiliza la comida suministrada por el hospedador, pero sin causarle ningún perjuicio y sin que esta relación sea obligada o, según SMYTH (1994), sin que uno sea metabólicamente dependiente del otro.
- Mutualismo y simbiosis: son dos términos similares que definen asociaciones muy íntimas entre dos especies en las que ambas obtienen un beneficio, pero si bien en el caso del mutualismo esta relación no es obligada, los organismos simbiotes no pueden vivir de manera independiente uno del otro. Para evitar errores es importante señalar que, en un sentido amplio, es común la aplicación del término simbiosis para referirse a cualquier tipo de relación interespecífica, incluido el parasitismo (RHODE, 1993).

Los parásitos deben poseer una serie de adaptaciones dirigidas hacia una efectiva colonización de su hábitat, entendiendo como tal el cuerpo del hospedador. La más importante de todas ellas es la capacidad de evadir o tolerar la respuesta inmune que su presencia genera en el hospedador, de manera que esta respuesta es un continuo y potente factor selectivo para el parásito. Esto también podría ser aplicado desde el punto de vista del hospedador ya que el parasitismo ejerce en él una fuerte presión selectiva en el sentido de que, desde el momento en el que el parásito le causa algún daño, sólo existen para la especie hospedadora dos salidas frente a este problema: la extinción o la adaptación, mediante el desarrollo de nuevas estrategias que lo lleven a evitar ser parasitado o al menos soportar los efectos de la infección (OLSEN, 1974; ZELMER, 1998).

1.8. La subclase Copepoda y el parasitismo.

Los copépodos integran uno de los grupos de parásitos de animales marinos más amplio, y por ello son extremadamente importantes (RHODE, 1993; ROBERTS & JANOVY, 2000; BOXSHALL & HALSEY, 2004). De hecho, según HUYS & BOXSHALL (1991), casi la mitad de las especies de copépodos viven de alguna manera relacionadas con otros organismos. Es por ello que se puede observar una enorme diversidad evolutiva en la explotación de nichos simbióticos y en su espectro de adaptaciones a la simbiosis *s.l.* (ROBERTS & JANOVY, 2000).

La adaptación de los copépodos al modo de vida parasítico se refleja en una serie de tendencias anatómicas y biológicas (ROBERTS & JANOVY, 2000):

- Reducción de los apéndices locomotores.
- Desarrollo de adaptaciones dirigidas a la adhesión.
- Incremento del tamaño y cambio de las proporciones corporales, causados por el crecimiento de las regiones genitales o reproductivas.

- Fusión de los somitos corporales y pérdida de evidencias externas de segmentación.
- Reducción de los órganos sensoriales.
- Reducción del número de estadios de vida libre.

KABATA (1979) formula dos hipótesis para explicar el proceso por el cual los copépodos adoptaron el parasitismo. La primera afirma que individuos de vida libre que se alimentaban atacando larvas de peces mucho mayores que ellos lo hacían aferrándose a pliegues de su epidermis durante breves períodos de tiempo, limitados a lo estrictamente necesario para la alimentación. De ahí pasaron a encuentros más prolongados que irían evolucionando hacia incipientes sistemas parásito-hospedador.

La segunda hipótesis propone que copépodos de vida libre que buscaban su alimento en los fondos marinos adquirieron aparatos bucales adecuados para este propósito, así como apéndices que les facilitaban la sujeción al sustrato donde se alimentaban. Estos copépodos, debido al gran número de encuentros esporádicos con otras especies que habitaban en el fondo o que se encontraban cerca de él, acabarían por asociarse con ellas de una forma más o menos permanente hasta culminar en el parasitismo.

Ambas propuestas estarían respaldadas por los requisitos que según POULIN (2007) tienen que existir para que se produzca la transición de un modo de vida libre a otro parasítico. Uno de ellos es que surja la oportunidad de explotar un organismo de mayor tamaño por parte de uno más pequeño, derivada de encuentros esporádicos en los que ninguno sufre daños. Otro de los requisitos es que la especie de menor tamaño posea ciertas preadaptaciones encaminadas a su supervivencia, alimentación y reproducción en el hospedador. Sin éstas el parásito no podría sacar partido de su potencial hospedador, y su utilización no se vería favorecida por la selección natural.

La adopción del parasitismo supuso para los copépodos el cambio de una serie de problemas biológicos por otros. Para un animal de vida libre estos problemas se refieren a su supervivencia como individuo, es decir, buscar alimento y al mismo tiempo evitar ser depredado, de manera que desarrolla estrategias para escapar de sus predadores. En el caso de los copépodos parásitos esta faceta se deja en manos del hospedador, por lo que la búsqueda de alimento y la necesidad de huir de los predadores no representan un problema para ellos (KABATA, 1979; POULIN, 2007). A pesar de ello, esta estrategia presenta el inconveniente de que la movilidad se ve muy reducida, lo que puede comprometer el éxito reproductivo. Para resolver este problema los parásitos invierten

la energía ahorrada en la locomoción y búsqueda de alimento en incrementar los esfuerzos destinados a su reproducción (OLSEN, 1974; ROBERTS & JANOVY, 2000).

Desde un punto de vista evolutivo es muy interesante comparar la anatomía de las formas larvarias y adultas de los copépodos de vida libre y de los copépodos parásitos. Por una parte hay evidentes diferencias entre los estadios juveniles de los copépodos parásitos y sus correspondientes adultos, sobre todo en el caso de las hembras (KABATA, 1979). Pero el hecho más destacable es el parecido entre formas larvarias y juveniles parásitas y los adultos de especies de vida libre, semejanza que se hace aún mayor a la hora de comparar los primeros estadios del desarrollo ontogénico de formas de vida libre y parásitas (KABATA, 1979).

Dentro de la subclase Copepoda el orden Poecilostomatoida ilustra la progresión desde pequeños parásitos especializados (familia Ergasilidae) a formas con una anatomía altamente modificada (familias Philichthyidae y Sarcotacidae), teniendo éxito como simbioses *s.s.* y como parásitos (ROBERTS & JANOVY, 2000). HUYS & BOXSHALL (1991) se basan en este hecho al afirmar que el orden Poecilostomatoida es probablemente el más diverso, en términos de anatomía externa, dentro de los copépodos: se observan tanto representantes primitivos con la típica anatomía ciclopiforme que viven en asociaciones “débiles” con otros organismos (como por ejemplo el género *Hemicyclops* Boeck, 1872, que habita en las guaridas de los decápodos), como un elevado número de familias parasíticas altamente derivadas que muestran todo un abanico de anatomías externas poco comunes (como la familia Corallovexiidae, parásita de coelenterados; las familias Chondracanthidae y Philichthyidae, que parasitan peces; la familia Mytilicolidae, que infecta moluscos bivalvos; o la familia Nereicolidae, que se encuentra parasitando poliquetos) (Fig. 24). Según HO (1991) se conocen unas 1570 especies pertenecientes al orden Poecilostomatoida que se encuentran agrupadas en 47 familias y todas ellas, a excepción de 5 planctónicas (Corycaeidae, Oncaeidae, Paralubbockiidae, Sapphirinidae y Urocopiidae), viven manteniendo relaciones interespecíficas más o menos estrechas con invertebrados marinos y peces.

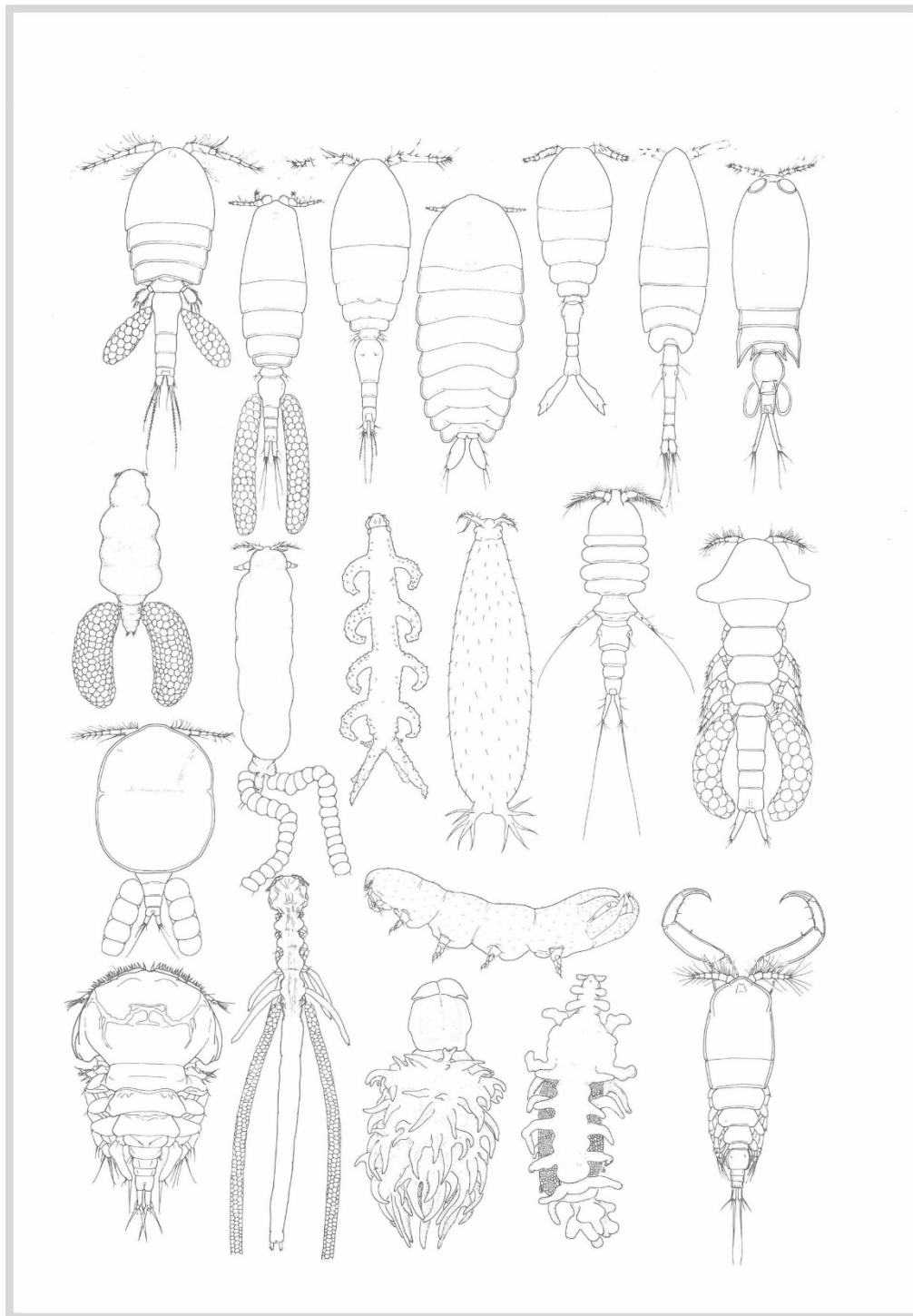


Figura 24. Variabilidad del *habitus* en el orden Poecilostomatoida (tomado de HUYS & BOXSHALL, 1991).

1.9. Infraclase Opisthobranchia: hospedadores de la familia Splanchnotrophidae.

1.9.1. Sistemática y generalidades de Opisthobranchia.

Según BOUCHET *et al.* (2005) la infraclase Opisthobranchia (Mollusca, Gastropoda) se divide en diez ordenes: Acochliidae Odhner, 1937; Anaspidea Fischer, 1883; Cephalaspidea Fischer, 1883; Gymnosomata Blainville, 1824; Nudibranchia Cuvier, 1817; Pleurobranchomorpha Pelseneer, 1906; Runcinacea Burn, 1963; Sacoglossa Von Ihering, 1876; Thecosomata Blainville, 1824 y Umbraculida Odhner, 1939.

La característica común que define a los opistobranquios es el proceso de la detorsión, en el cual se invierte parcial o totalmente la torsión de la masa visceral, cavidad paleal y ctenidio que se da en las primeras etapas del desarrollo embrionario de todos los gasterópodos. Esta inversión secundaria de la torsión ocurre tras el estadio de larva velíger y tiene importantes implicaciones anatómicas, ya que la cavidad paleal y los órganos asociados a ella rotan hacia la derecha e incluso pueden volver a la parte posterior del animal; como consecuencia, los conectivos viscerales se disponen de nuevo paralelamente (eutineuria).

La reducción en diferentes grados o completa desaparición de la concha, ctenidios y cavidad del manto son también caracteres que comparten casi todos los opistobranquios. Además, poseen un par de tentáculos cefálicos, dos rinóforos exclusivos de estos moluscos, son hermafroditas y mayoritariamente marinos y bentónicos (THOMPSON & BROWN, 1984; BRUSCA & BRUSCA, 2005).

El orden Nudibranchia conforma el grupo monofilético más numeroso y diverso dentro de los opistobranquios. Con unas 3000 especies, comprende aproximadamente la mitad de toda la subclase (THOMPSON & BROWN, 1984; WÄGELE & KLUSSMANN-KOLB, 2005). Se encuentra dividido en los subórdenes Dexiarchia Schrödl, Wägele & Willan, 2001 y Euctenidiacea Tardy, 1970. El suborden Dexiarchia engloba al infraorden Cladobranchia Sars, 1878; y el suborden Euctenidiacea engloba al infraorden Doridacea Thiele, 1931. A su vez, dentro del infraorden Cladobranchia se clasifican los parvórdenes Aeolidida Odhner, 1934; Dendronotida Odhner, 1934 y Euarminida Odhner, 1939 (BOUCHET *et al.*, 2005).

Cada uno de estos grupos presenta las siguientes características:

- Infraorden Doridacea. Grupo más abundante dentro de los nudibranchios. Cuerpo protegido por un manto dorsal espiculoso que puede estar fuertemente recubierto de espículas o disponer de glándulas notales de secreción ácida o repugnatoria. Los rinóforos presentan capacidad de retracción o contracción, pero nunca existe vaina rinofórica. El ano se encuentra en posición posterodorsal, rodeado por una corona de branquias secundarias.
- Parvorden Aeolidida. Se caracteriza por presentar ceratas fusiformes en filas dorsolaterales que portan ramas de la glándula digestiva y, en sus ápices, cnidosacos. Rinóforos contráctiles, pero sin vaina.
- Parvorden Dendronotida. Cuerpo con dos líneas dorsolaterales de ceratas, que raramente albergan cnidosacos. La característica más definitoria de este grupo es la presencia alrededor de la base de los rinóforos de una vaina rinofórica, cuya función es la de protegerlos cuando el animal es molestado, retrayendo los rinóforos en su interior.
- Parvorden Euarminida. La característica más destacable de este grupo son los pliegues respiratorios que se encuentran en complejas filas por debajo del borde del manto.

La concha y el opérculo están ausentes en los nudibranchios, salvo en fase larvaria, lo cual representa el grado más desarrollado en la tendencia polifilética de los opisthobranchios a la reducción de la concha.

También desaparecen por completo la cavidad paleal y la branquia de tipo ctenidio, lo que hizo necesaria la aparición de branquias secundarias contráctiles o retractiles en forma de anillo en el notoposterior del animal (infraorden Doridacea) u otras estructuras respiratorias secundarias: pliegues a lo largo del borde inferior del manto (parvorden Euarminida), y ceratas (parvódenes Dendronotida y Aeolidida). Dentro del parvorden Dendronotida existen dos tipos de estructuras respiratorias: ceratas dendríticas de adquisición neomórfica en el género *Tritonia* Cuvier, 1798 y las pseudobranquias del género *Doto* Oken, 1815 en la base interior de los ceratas (THOMPSON & BROWN, 1984).

Debido a la pérdida de la concha, los nudibranchios pudieron alcanzar a lo largo de su historia evolutiva una amplia diversidad anatómica y biológica al desembarazarse del rígido modelo corporal impuesto por esta pesada y limitante defensa pasiva (WÄGELE & KLUSSMANN-KOLB, 2005; WÄGELE *et al.*, 2006). Dicha pérdida fue posible gracias a la aparición de nuevos y variados mecanismos de defensa (THOMPSON & BROWN, 1984):

- Defensas físicas. Muchos doridaeos presentan numerosas espículas en el tegumento (Fig. 25A).
- Cleptonidia. Se observa en los aeolidáeos y consiste en la utilización de los nematocistos sin disparar de los cnidarios que depredan para usarlos en su propia defensa. Son incorporados, vía glándula digestiva, en unas estructuras llamadas cnidosacos, las cuales se encuentran en el ápice de los ceratas (Fig. 25B).
- Defensas químicas. Corresponden a estructuras glandulares repugnatorias, como son las glándulas ácidas y las formaciones dermales del manto (MDFs, de sus siglas en inglés), que incorporan metabolitos secundarios tóxicos procedentes de sus presas o de síntesis propia. Estas estructuras se pueden encontrar dispersas por toda la superficie dorsal del manto (Fig. 25C) o en su borde. La enorme diversidad en cuanto a la anatomía y utilización de estas defensas químicas es otra de las facetas más típicas de los nudibranquios. WÄGELE *et al.* (2006) presuponen que las defensas glandulares tienen alguna implicación en la protección de los nudibranquios frente a las infecciones por parte de los esplanconotrófidos y en la especificidad hospedador-parásito, pero esta afirmación no ha podido ser comprobada.
- Coloraciones crípticas y aposemáticas. En muchos casos, los nudibranquios son capaces de imitar de manera excepcional los colores y forma de los sustratos sobre los que se encuentran con el fin de pasar desapercibidos a los potenciales predadores (Fig. 25D). Por el contrario, los que poseen sistemas de defensa muy efectivos presentan coloraciones aposemáticas, muy llamativas, para advertir a los potenciales depredadores de la existencia de defensas químicas o de otra naturaleza.

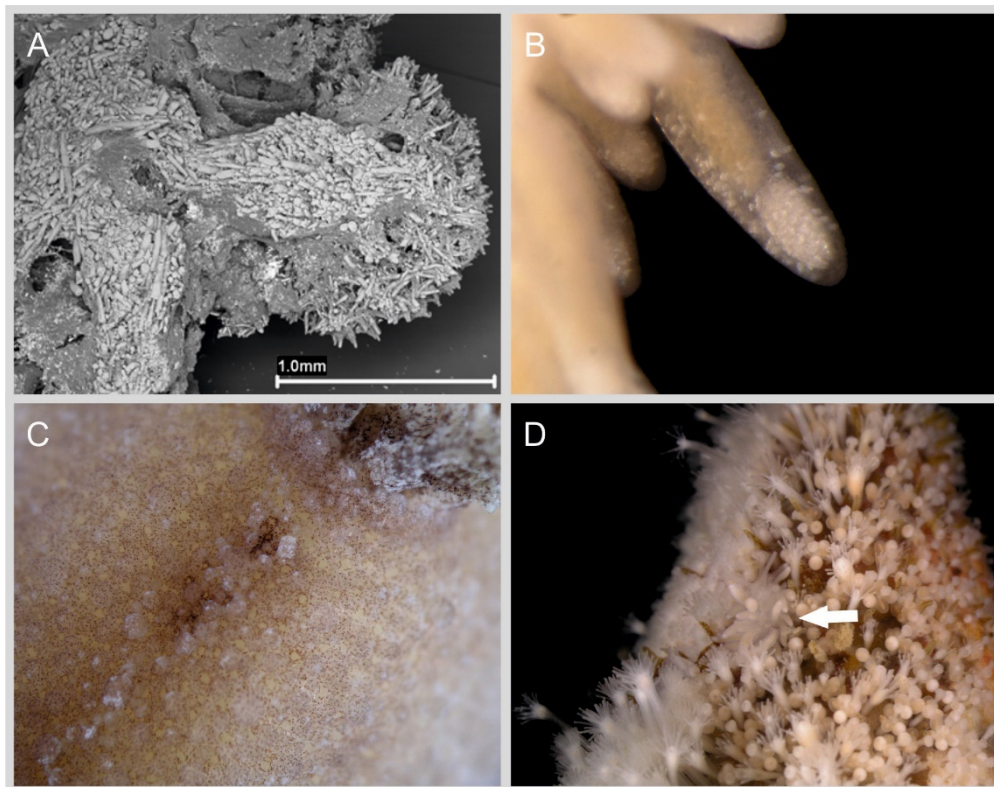


Figura 25. Diferentes estrategias defensivas de los nudibranquios. **A.** Entramado espicular del manto de *Doris* sp. **B.** Cerata con enidosaco de *Cuthona nana* (Alder & Hancock, 1842). **C.** Glándulas repugnatorias (puntos marrones) de *Discodoris stellifera* Vayssiére, 1903. **D.** *Cuthona nana* (flecha blanca) camuflada entre el hidroideo colonial *Hydractinia echinata* (Fleming, 1828) (A: fotografía realizada al SEM; B-D: fotografías realizadas con microscopio estereoscópico).

1.9.2. Preferencias y especificidad de los esplanctotróficos.

Los componentes de la familia Splanchnotrophidae se encuentran parasitando varios ordenes de opistobranquios marinos, con diferentes preferencias según el género al que pertenezcan (HANCOCK & NORMAN, 1863; BERGH, 1868; CANU, 1891; HECHT, 1893, 1895; SCOTT & SCOTT, 1895; O'DONOGHUE, 1924; DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1950, 1951; BELCIK, 1981; HO, 1981; JENSEN, 1987, 1990; SCHRÖDL, 1997, 2002; HUYS, 2001; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; SALMEN *et al.*, 2008a, b; ABAD *et al.*, 2011; UYENO & NAGASAWA, 2012):

- El género *Splanchnotrophus* parasita hospedadores del orden Nudibranchia, específicamente del infraorden Doridacea y del parvorden Aeolidida.
- El género *Lomanotocola* infecta a especies de los parvódenes Aeolidida y Dendronotida.
- El género *Ismaila* presenta patrones de infección más amplios, utilizando como hospedadores, además de a representantes de todos los grupos de nudibranchios, también a algunas especies del orden Sacoglossa.
- El género *Ceratosomicola* sólo se ha encontrado parasitando a miembros de la familia Chromodorididae Bergh, 1871.
- El género *Arthurius* tiene como hospedadores únicamente a miembros del orden Sacoglossa.
- El género *Majimun* parasita a especies de doridáceos del género *Roboastra* Bergh, 1877.

También existen diferencias entre los esplanctotróficos en cuanto a la especificidad hospedador-parásito, entendida como el número de especies de opistobranquios que una única especie de parásito puede infectar (HANCOCK & NORMAN, 1863; BERGH, 1868; CANU, 1891; HECHT, 1893, 1895; SCOTT & SCOTT, 1895; O'DONOGHUE, 1924; DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1950, 1951; BELCIK, 1981; HO, 1981; JENSEN, 1987, 1990; SCHRÖDL, 1997, 2002; HUYS, 2001; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; SALMEN *et al.*, 2008a, b; ABAD *et al.*, 2011; UYENO & NAGASAWA, 2012):

- Géneros *Ismaila*, *Arthurius* y *Ceratosomicola*: la especificidad es muy elevada ya que en todos ellos una especie de parásito utiliza una única especie de hospedador (monoespecificidad), excepto *Ismaila monstrosa* que utiliza 4 especies de opistobranquios como hospedadores.
- Género *Splanchnotrophus*: sus integrantes utilizan como hospedadores un mínimo de 2 especies de nudibranchios y un máximo de 4.

- Género *Lomanoticola*: las 2 especies conocidas de este género presentan distintas especificidades en la elección de sus hospedadores, ya que *Lomanoticola brevipes* parasita a 7 especies pertenecientes a los infraordenes Aeolidida y Dendronotida, pero *Lomanoticola insolens* infecta a una única especie de dendronotáceos.
- La única especie conocida del género *Majimun* tiene 2 hospedadores.

Las diferencias de especificidad a la hora de elegir hospedador plantean dos modelos explicativos acerca de este fenómeno:

- Existen dos estrategias opuestas dentro de la familia Splanchnotrophidae en lo que se refiere a la selección del hospedador: una es la que siguieron las especies monoespecíficas (monófagas) y otra es la que adoptaron las especies que poseen la capacidad de parasitar a múltiples hospedadores (polífagas).
- Las especies polífagas son en realidad un complejo de varias especies crípticas con monoespecificidad.

Se entiende por especies crípticas aquellas que han sido clasificadas bajo un mismo nombre debido a que se diferencian por caracteres anatómicos muy sutiles (BICKFORD *et al.*, 2006), o aquellas en las que se produce estasis morfológica tras la especiación, lo que provoca que la divergencia genética continúe sin diferenciación anatómica (ROCHA-OLIVARES *et al.*, 2001). A causa de la escasa información disponible acerca de varios géneros de la familia Splanchnotrophidae y a que algunas de sus especies fueron descritas únicamente en base a la especificidad hospedador-parásito (HECHT, 1895; DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1950), este taxón es susceptible de albergar especies crípticas. En ese sentido, existen precedentes en otros taxones en los que el estudio de la divergencia genética de una especie supuestamente polífaga revela un complejo de varias especies crípticas monófagas (SMITH *et al.*, 2006; DIPPENAAR *et al.*, 2010).

1.10. Problemática de la familia Splanchnotrophidae.

A pesar de los avances en el conocimiento en los últimos años, la familia Splanchnotrophidae sigue siendo uno de los grupos de copépodos menos conocidos. Sólo existen datos anatómicos de ciertos taxones, lo que hace necesario ampliar esa información. Esto es más evidente en los dos géneros que se encuentran en Europa, *Splanchnotrophus* y *Lomanoticola*: aunque aparecen en las mismas áreas, la relación filogenética entre estos géneros es incierta, ya que la información anatómica disponible

sobre el género *Lomanotocola* es muy limitada. En la península Ibérica la presencia de ambos taxones únicamente ha sido constatada gracias a citas esporádicas - con la excepción de ABAD *et al.* (2011)- a pesar de que se encuentra situada entre las dos áreas de distribución europeas de los géneros *Lomanotocola* y *Splanchnotrophidae* (Noroeste de Europa y Mediterráneo occidental).

Generalmente, los trabajos sobre la morfología de las especies de la familia *Splanchnotrophidae* se limitan a unos pocos ejemplares por la dificultad y aleatoriedad de su recolección. En el caso de la presente memoria, por primera vez se puede afrontar el estudio amplio de algunas especies de los géneros *Lomanotocola* y *Splanchnotrophus* gracias a la recolección de individuos mediante buceo con escafandra autónoma a lo largo de 5 años y a la disponibilidad de un gran número de opistobranquios pertenecientes a la colección “Opistobranquios de Galicia” del profesor Victoriano Urgorri.

1.11. Antecedentes.

Antes comenzar la recolección de ejemplares se realizó un estudio preliminar para determinar cuáles podrían ser las especies de la familia *Splanchnotrophidae* presentes en el área de estudio, y qué especies de opistobranquio podrían ser sus hospedadoras.

Mediante una revisión bibliográfica se identificaron los géneros de la familia *Splanchnotrophidae* con una distribución compatible con el área de estudio y las especies de opistobranquios descritas como hospedadoras con presencia en las rías de Ferrol y Ares (ORTEA & URGORRI, 1978; ORTEA & URGORRI, 1981; URGORRI & BESTEIRO, 1984; HUYS, 2001; ABAD *et al.*, 2011; URGORRI *et al.*, 2011).

Con el fin de ampliar el rango de opistobranquios potencialmente parasitados por los copépodos, se tuvieron en cuenta aquellas especies distribuidas en el área de estudio que muestran proximidad taxonómica, en las categorías de género y familia, con las especies de opistobranquio citadas como hospedadoras de la familia *Splanchnotrophidae*.

Se comprobó que los géneros *Doto* y *Lomanotus* Vérany, 1844 del parvorden Dendronotida y las familias Aeolidiidae Gray, 1827, Eubbranchidae Odhner, 1934, Flabellinidae Bergh, 1889 y Glaucidae Gray, 1827 del parvorden Aeolidida son los taxones con mayor potencial para albergar tanto especies del género *Lomanotocola* como del género *Splanchnotrophus*. En el mismo sentido, se encontró que especies de las familias Goniadorididae H. Adams & A. Adams, 1854 y Onchidorididae Gray, 1827

poseen más probabilidades de ser hospedadoras de especies del género *Splanchnotrophus*.

Dada la dificultad de recolectar nudibranchios directamente en el infralitoral se decidió que en los muestreos se debería realizar la recolección de sustratos alimenticios preferenciales de los nudibranchios, para posteriormente en el laboratorio separar los hospedadores individualmente. Para ello, se revisó la bibliografía con el fin de establecer las especies de cnidarios, poríferos, ascidiáceos, etc. en las que se podría encontrar cada especie de opistobranquio objetivo (Tabla 1) (URGORRI & BESTEIRO, 1984; McDONALD & NYBAKKEN, 1997).

Como complemento, se examinó la colección “Opistobranquios de Galicia” del profesor V. Urgorri en busca de opistobranquios parasitados que fueran recolectados en el área de estudio, gracias a lo cual se encontraron varias especies hospedadoras de la familia Splanchnotrophidae presentes en la Ría de Ferrol y en la Ría de Ares.

Tabla 1. Especies de nudibranchios objeto de estudio y especies a las que depredan; en aquellas citadas como hospedadoras en la bibliografía se indica la especie del parásito. (AE: Aeolidiidae; AN: Anthozoa; AS: Ascidiacea; BR: Bryozoa; CL: Calmidae; DT: Dotidae; EN: Entoprocta; EU: Eubranchiidae; FC: Facelinidae; FL: Flabellinidae; GD: Goniadorididae; HY: Hydrozoa; LB: *Lomanotica brevipes*; LM: Lomanotidae; NU: Nudibranchia; OD: Onchidorididae; PR: Porifera; SA: *Splanchnotrophus angulatus*; SD: *Splanchnotrophus dellachiajei*; SG: *Splanchnotrophus gracilis*; SW: *Splanchnotrophus willemi*).

Familia	Hospedador	Parásito	Especie Alimento
AE	<i>Aeolidia papillosa</i> (Linnaeus, 1761)	SA	(AN) <i>Actinia equina</i> (Linnaeus, 1758)
			(AN) <i>Anemonia viridis</i> (Forsskål, 1775)
			(AN) <i>Metridium dianthus</i> (Ellis, 1768)
AE	<i>Aeolidiella alderi</i> (Cocks, 1852)	SA	(AN) <i>Cereus pedunculatus</i> (Pennant, 1777)
			(AN) <i>Diadumene cincta</i> Stephenson, 1925
			(AN) <i>Sagartia elegans</i> (Dalyell, 1848)
AE	<i>Aeolidiella glauca</i> (Alder & Hancock, 1845)	SA	(AN) <i>Sagartiogeton laceratus</i> (Dalyell, 1848)
AE	<i>Aeolidiella sanguinea</i> (Norman, 1877)	—	(AN) <i>Sagartia elegans</i> (Dalyell, 1848)
AE	<i>Cerberilla bernadettae</i> Tardy, 1965	—	(AN) <i>Cereus pedunculatus</i> (Pennant, 1777)
			(AN) <i>Diadumene cincta</i> Stephenson, 1925
			(AN) <i>Sagartia troglodytes</i> (Price, 1847)
			(AN) <i>Sagartiogeton undatus</i> (Müller, 1778)

Familia	Hospedador	Parásito	Especie Alimento
AE	<i>Spurilla neapolitana</i> (Delle Chiaje, 1841)	SD	(AN) <i>Actinia equina</i> (Linnaeus, 1758)
			(AN) <i>Actinothoe sphyrodeta</i> (Gosse, 1858)
			(AN) <i>Aiptasia mutabilis</i> (Gravenhorst, 1831)
			(AN) <i>Anemonia viridis</i> (Forsskål, 1775)
CL	<i>Calma glaucoides</i> (Alder & Hancock, 1854)	—	Huevos peces: <i>Lipophrys polis</i> (Linnaeus, 1758) Huevos peces: <i>Lepadogaster</i> sp.
CL	<i>Calma gobiophaga</i> Calado & Urgorri, 2002	—	Huevos peces: <i>Gobius niger</i> Linnaeus, 1758
EU	<i>Eubranchus cingulatus</i> (Alder & Hancock, 1847)	—	(HY) <i>Kirchenpaueria pinnata</i> (Linnaeus, 1758)
EU	<i>Eubranchus doriae</i> (Trinchese, 1874)	—	(HY) <i>Kirchenpaueria pinnata</i> (Linnaeus, 1758)
EU	<i>Eubranchus exiguus</i> (Alder & Hancock, 1848)	—	(HY) <i>Laomedea flexuosa</i> Alder, 1857
			(HY) <i>Obelia dichotoma</i> (Linnaeus, 1758)
			(HY) <i>Obelia geniculata</i> (Linnaeus, 1758)
EU	<i>Eubranchus farrani</i> (Alder & Hancock, 1844)	—	(HY) <i>Aglaophenia pluma</i> (Linnaeus, 1758) (HY) <i>Obelia geniculata</i> (Linnaeus, 1758)
EU	<i>Eubranchus linensis</i> García-Gómez <i>et al.</i> , 1990	—	(HY) <i>Halecium liouvillei</i> Billard, 1934
EU	<i>Eubranchus pallidus</i> (Alder & Hancock, 1842)	—	(HY) <i>Obelia dichotoma</i> (Linnaeus, 1758)
EU	<i>Eubranchus</i> sp.	—	(HY) <i>Aglaophenia tubulifera</i> (Hincks, 1861)
EU	<i>Eubranchus</i> sp. 2	—	(HY) <i>Aglaophenia</i> spp.
EU	<i>Eubranchus tricolor</i> Forbes, 1838	LB	(HY) <i>Nemertesia ramosa</i> (Lamarck, 1816)
			(HY) <i>Tubularia indivisa</i> Linnaeus, 1758
EU	<i>Eubranchus vittatus</i> (Alder & Hancock, 1842)	—	(HY) <i>Kirchenpaueria pinnata</i> (Linnaeus, 1758)
FC	<i>Facelina annulicornis</i> (Chamisso & Eysenhardt, 1821)	—	Hydrozoa, Nudibranchia
FC	<i>Facelina auriculata</i> (Müller, 1776)	SW	(HY) <i>Obelia geniculata</i> (Linnaeus, 1758)
FC	<i>Facelina dubia</i> Pruvot-Fol, 1948	—	(HY) <i>Ectopleura larynx</i> (Ellis & Solander, 1786)
FC	<i>Favorinus branchialis</i> (Rathke, 1806)	—	Huevos nudibranchio
FC	<i>Favorinus blianus</i> Lemche & Thompson, 1974	—	Huevos nudibranchio

Familia	Hospedador	Parásito	Especie Alimento
FC	<i>Pruvotfolia pselliotes</i> (Labbé, 1923)	—	(AN) <i>Anemonia sulcata</i> (Pennant, 1777)
			(AS) <i>Ciona intestinalis</i> (Linnaeus, 1767)
			(HY) <i>Clava multicornis</i> (Forsskal, 1775)
			(HY) <i>Coryne muscoides</i> (Linnaeus, 1761)
			(HY) <i>Obelia geniculata</i> (Linnaeus, 1758)
FL	<i>Babakina anadoni</i> (Ortea, 1979)	—	(HY) <i>Candelabrum</i> sp.
FL	<i>Flabellina affinis</i> (Gmelin, 1791)	SD	(NU) <i>Cratena peregrina</i> (Gmelin, 1791)
FL	<i>Flabellina babai</i> Schmekel, 1972	—	(HY) <i>Campanularia</i> sp.
			(HY) <i>Eudendrium</i> spp.
FL	<i>Flabellina ischitana</i> Hirano & Thompson, 1990	—	(HY) <i>Eudendrium glomeratum</i> Picard, 1952
			(HY) <i>Eudendrium racemosum</i> (Cavolini, 1785)
FL	<i>Flabellina lineata</i> (Lovén, 1846)	—	(HY) <i>Corymorpha nutans</i> Sars, 1835
			(HY) <i>Tubularia indivisa</i> Linnaeus, 1758
FL	<i>Flabellina pedata</i> (Montagu, 1816)	—	(HY) <i>Eudendrium</i> spp.
TG	<i>Embletonia pulchra</i> (Alder & Hancock, 1851)	—	(HY) <i>Nemertesia</i> spp.
TG	<i>Cuthona amoena</i> (Alder & Hancock, 1843)	—	(HY) <i>Halecium halecinum</i> (Linnaeus, 1758)
TG	<i>Cuthona caerulea</i> (Montagu, 1804)	—	(HY) <i>Sertularella gayi</i> (Lamouroux, 1821)
			(HY) <i>Sertularella gaudichaudi</i> (Lamouroux, 1824)
			(HY) <i>Sertularella polyzonias</i> (Linnaeus, 1758)
TG	<i>Cuthona concinna</i> (Alder & Hancock, 1843)	—	(HY) <i>Sertularia argentea</i> Linnaeus, 1758
TG	<i>Cuthona foliata</i> (Forbes & Goodsir, 1839)	—	(HY) <i>Bougainvillia muscus</i> (Allman, 1863)
			(HY) <i>Sertularella polyzonias</i> (Linnaeus, 1758)
TG	<i>Cuthona genovae</i> (O'Donoghue, 1929)	LB	Ascidias (HY) <i>Ectopleura larynx</i> (Ellis & Solander, 1786)
TG	<i>Cuthona gymnota</i> (Couthouy, 1838)	—	(HY) <i>Ectopleura crocea</i> (Agassiz, 1862) (HY) <i>Ectopleura larynx</i> (Ellis & Solander, 1786)
TG	<i>Cuthona ilonae</i> (Schmekel, 1968)	—	(HY) <i>Clytia hemisphaerica</i> (Linnaeus, 1767)

Familia	Hospedador	Parásito	Especie Alimento
TG	<i>Cuthona nana</i> (Alder & Hancock, 1842)	—	(HY) <i>Hydractinia echinata</i> (Fleming, 1828)
TG	<i>Cuthona ocellata</i> (Schmekel, 1966)	—	(HY) <i>Eudendrium</i> sp. (HY) <i>Halecium</i> sp.
TG	<i>Cuthona</i> sp.	—	(HY) <i>Sertularella polyzonias</i> (Linnaeus, 1758) (HY) <i>Kirchenpaueria pinnata</i> (Linnaeus, 1758)
TG	<i>Tenellia adspersa</i> (Nordmann, 1845)	—	(HY) <i>Cordylophora caspia</i> (Pallas, 1771) (HY) <i>Laomedea</i> spp. (HY) <i>Obelia geniculata</i> (Linnaeus, 1758) (HY) <i>Protohydra leuckarti</i> Greeff, 1870
TG	<i>Tergipes tergipes</i> (Forsskal, 1775)	—	(HY) <i>Laomedea flexuosa</i> Alder, 1857 (HY) <i>Obelia dichotoma</i> (Linnaeus, 1758) (HY) <i>Obelia geniculata</i> (Linnaeus, 1758)
DT	<i>Doto arteoi</i> Ortea, 1979	—	(HY) <i>Laomedea</i> spp.
DT	<i>Doto coronata</i> (Gmelin, 1791)	LB	(HY) <i>Bougainvillia muscus</i> (Allman, 1863) (HY) <i>Eudendrium</i> sp. (HY) <i>Obelia longissima</i> (Pallas, 1766)
DT	<i>Doto dunnei</i> Lemche, 1976	—	(HY) <i>Kirchenpaueria pinnata</i> (Linnaeus, 1758)
DT	<i>Doto eireana</i> Lemche, 1976	—	(HY) <i>Amphisbetia operculata</i> (Linnaeus, 1758)
DT	<i>Doto floridicola</i> Simroth, 1888	—	(HY) <i>Aglaophenia kirchenpaueri</i> (Heller, 1868) (HY) <i>Aglaophenia pluma</i> (Linnaeus, 1758) (HY) <i>Aglaophenia tubiformis</i> Marktanner-Turneretscher, 1890
DT	<i>Doto fragilis</i> (Forbes, 1838)	—	(HY) <i>Halecium halecinum</i> (Linnaeus, 1758) (HY) <i>Halecium muricatum</i> (Ellis & Solander, 1786) (HY) <i>Nemertesia antennina</i> (Linnaeus, 1758) (HY) <i>Nemertesia ramosa</i> (Lamarck, 1816)
DT	<i>Doto furva</i> García & Ortea, 1984	—	(HY) <i>Campanularia hincksii</i> Alder, 1856 (HY) <i>Filellum serpens</i> (Hassall, 1848) (HY) <i>Halecium tenellum</i> Hincks, 1861 (HY) <i>Sertularella arbuscula</i> (Lamouroux, 1816) (HY) <i>Sertularella cylindritheca</i> (Allman, 1888)

Familia	Hospedador	Parásito	Especie Alimento
DT	<i>Doto koenneckeri</i> Lemche, 1976	—	(HY) <i>Aglaophenia kirchenpaueri</i> (Heller, 1868)
			(HY) <i>Aglaophenia pluma</i> (Linnaeus, 1758)
			(HY) <i>Aglaophenia tubiformis</i> Marktanner-Turneretscher, 1890
			(HY) <i>Aglaophenia tubulifera</i> (Hincks, 1861)
DT	<i>Doto lemchei</i> Ortea & Urgorri, 1978	—	(HY) <i>Aglaophenia tubulifera</i> (Hincks, 1861)
DT	<i>Doto maculata</i> (Montagu, 1804)	—	(HY) <i>Halopteris catharina</i> (Johnston, 1833)
DT	<i>Doto millbayana</i> Lemche, 1976	—	(HY) <i>Aglaophenia</i> sp.
			(HY) <i>Nemertesia ramosa</i> (Lamarck, 1816)
			(HY) <i>Plumularia setacea</i> (Linnaeus, 1758)
DT	<i>Doto oblicua</i> Ortea & Urgorri, 1978	—	(HY) <i>Amphisbetia operculata</i> (Linnaeus, 1758)
DT	<i>Doto pinnatifida</i> (Montagu, 1804)	LB	(HY) <i>Nemertesia antennina</i> (Linnaeus, 1758)
DT	<i>Doto</i> sp.	—	(HY) <i>Aglaophenia acacia</i> Allman, 1883
DT	<i>Doto tuberculata</i> Lemche, 1976	—	(HY) <i>Sertularella gayi</i> (Lamouroux, 1821)
DT	<i>Doto verdicioi</i> Ortea & Urgorri, 1978	—	(HY) <i>Aglaophenia</i> sp.
			(HY) <i>Laomedea flexuosa</i> Alder, 1857
LM	<i>Lomanotus marmoratus</i> (Alder & Hancock, 1845)	—	(HY) <i>Antennularia</i> sp.
			(HY) <i>Nemertesia antennina</i> (Linnaeus, 1758)
			(HY) <i>Nemertesia ramosa</i> (Lamarck, 1816)
GD	<i>Ancula gibbosa</i> (Risso, 1818)	SW	(AS) <i>Diplosoma listerianum</i> (Edwards, 1841)
			(AS) <i>Botrylloides leachii</i> (Savigny, 1816)
			(AS) <i>Botryllus schlosseri</i> (Pallas, 1766)
GD	<i>Goniodoris castanea</i> Alder & Hancock, 1845	—	(AS) <i>Ascidia mentula</i> Müller, 1776
			(AS) <i>Botryllus schlosseri</i> (Pallas, 1766)
			(AS) <i>Brotryllus</i> sp.
GD	<i>Goniodoris nodosa</i> (Montagu, 1808)	—	(BR) <i>Alcyonidium diaphanum</i> (Hudson) Lamouroux
			(AS) <i>Dendrodoa grosularia</i> (Van Beneden, 1846)
			(AS) <i>Diplosoma listerianum</i> (Edwards, 1841)
GD	<i>Okenia aspersa</i> (Alder & Hancock, 1845)	SG	(AS) <i>Molgula occulta</i> Kupffer, 1875

Familia	Hospedador	Parásito	Especie Alimento
GD	<i>Trapania maculata</i> Haefelfinger, 1960	—	(EN) Entoprocta
GD	<i>Trapania pallida</i> (Kress, 1968)	—	(EN) <i>Loxosomella</i> spp.
GD	<i>Trapania tartanella</i> (Von Ihering, 1886)	SG	(PR) <i>Desmacidon fruticosum</i> (Montagu, 1814) (EN) Entoprocta
OD	<i>Diaphorodoris luteocincta</i> (Sars, 1870)	—	(BR) <i>Crisia</i> spp.
OD	<i>Knoutsodonta depressa</i> (Alder & Hancock, 1842)	—	(BR) <i>Schizomavella (Schizomavella) linearis</i> (Hassal, 1841)
OD	<i>Onchidoris cervinoi</i> Ortea & Urgorri, 1979	—	(BR) <i>Turbicellepora magnicostata</i> (Barroso, 1919)
OD	<i>Onchidoris neapolitana</i> (Delle Chiaje, 1841)	—	(BR) <i>Schizomavella</i> spp.
OD	<i>Onchidoris pusilla</i> (Alder & Hancock, 1845)	—	(BR) <i>Escharella immersa</i> (Fleming, 1828) (BR) <i>Escharoides coccinea</i> (Abildgaard, 1806) (BR) <i>Oshurkovia littoralis</i> (Hastings, 1944)

1.12. Objetivos.

Para resolver la problemática asociada a la familia Splanchnotrophidae, los objetivos planteados al inicio de este estudio fueron:

- Incrementar el conocimiento sobre las especies de la familia Splanchnotrophidae en las rías de Ferrol y de Ares.
- Estudio anatómico de las especies que puedan aparecer. De darse el caso, determinar si ya son conocidas o si por el contrario se hace necesario describir nuevas especies para la Ciencia.
- Desarrollo de protocolos para llevar a cabo un estudio molecular de las especies encontradas durante los muestreos.
- Desarrollo de técnicas para la recolección de los estadios larvarios de los copépodos, y estudio anatómico de los mismos.
- Recopilación de datos sobre la biología de los parásitos, tales como tasas de infección, presencia anual de la infección, ratio entre hembras y machos, efectos negativos causados en el hospedador, etc.





Capítulo 2.

Área de estudio



2.1. Localización.

Las rías de Ferrol y de Ares se encuentran situadas en el NW de la Península Ibérica y forman parte, junto con la Ría de Coruña, del Golfo Ártabro (Fig. 26).



Figura 26. Mapa del Golfo Ártabro.

2.1.1. Ría de Ferrol.

La Ría de Ferrol se encuadra entre los paralelos 43°27' y 43°30' de latitud norte y entre los meridianos 008°09' y 008°21' de longitud oeste. Su orientación sigue el eje NEE-WSW, con una longitud de unos 15 km y una superficie de 21 km². Con marea baja el volumen de agua que alberga es de 208 hm³ y con marea alta de 290 hm³ (DE CASTRO *et al.*, 2004).

La Ría de Ferrol se puede dividir en 5 zonas (DE CASTRO *et al.*, 2004).

- La primera de ellas, la más externa, se encuentra entre el Cabo Prioriño y la Punta Coitelada, que forman la boca de la ría. Se orienta hacia el SW y tiene una anchura de 2,2 km. La profundidad máxima fluctúa entre 31 m durante la marea baja y 35 m en la alta. Los fondos son sedimentarios, de arenas finas-medias.
- La segunda corresponde al característico canal de entrada, que se extiende desde la Punta de Rabo da Porca hasta la Punta do Vispón. Posee una longitud de 2 km, una anchura de 0,5 km y una profundidad media de 20 m. Los fondos están dominados por arenas medias-gruesas y cascajos de origen biológico, con afloramientos de bolos de granito. Por su singular morfología, en la zona del canal se producen durante el flujo y reflujos de la marea unas fuertes corrientes de 0,5 m/s de velocidad. Gracias a la presencia de estas corrientes y a la renovación de agua que conllevan, se ve favorecido el asentamiento en los afloramientos rocosos de organismos sésiles, sobre todo de los filos poríferos y cnidarios, de comunidades epibiontes que habitan sobre la roca y de agrupamientos de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (VARELA *et al.*, 2009).
- La tercera zona es la intermedia, que discurre desde la Punta do Vispón hasta el puente de As Pías. La anchura es de 2,3 km, la profundidad media de 15 m y la corriente disminuye a velocidades de 0,1 m/s. Los fondos son sedimentarios, formados en su mayoría por sustratos fangosos ricos en materia orgánica. En esta zona se encuentra la ensenada de A Malata, que se interna aproximadamente 2 km en dirección NNE desde el brazo principal de la ría.
- La cuarta zona, la interna, es la que va desde el puente de As Pías hasta el puente de la Faísca, con fondos sedimentarios fangosos.
- La última de las zonas es la parte estuarina de la ría y se caracteriza por el aporte de agua dulce procedente del Río Xubia y del Río Belelle.

2.1.2. Ría de Ares.

La Ría de Ares está situada entre las rías de Ferrol y Coruña siguiendo un eje SE-NW y enmarcada entre los paralelos 43°19' y 43°24' de latitud norte y entre los meridianos 008°12' y 008°18' de longitud oeste. Presenta una longitud de 13,5 km, desde la desembocadura del Río Mandeo hasta la boca de la ría, ocupa un área de unos 272,6 km² y las profundidades varían entre 2 y 43 m. La velocidad de las corrientes mareales alcanza en algunos puntos los 0,89 m/s (ASENSIO & GRAJAL, 1981; SÁNCHEZ-MATA *et al.*, 1999). Se puede dividir en tres zonas:

- La zona este es la más interna y se corresponde con la desembocadura del Río Mandeo, el cual representa el principal aporte de agua dulce de este área, al que hay que sumar el que realizan, en menor medida, los ríos Mendo y Lambre. Presenta 7 km de longitud, 5 km de ancho y las profundidades varían de los 2 a los 12m. Los sedimentos que predominan son las arenas fangosas de origen continental. Río arriba se encuentra una de las marismas más importantes de Galicia, que se extiende desde la ciudad de Betanzos hasta el puente de O Pedrido (ASENSIO & GRAJAL, 1981; SÁNCHEZ-MATA *et al.*, 1999).

Al NE del brazo principal de la ría está la desembocadura del Río Eume, que realiza también importantes aportes de agua dulce. La longitud es de 5 km, el ancho de 2 km y la profundidad oscila entre los 2 y los 6 m. Los fondos se componen mayoritariamente de arenas fangosas (ASENSIO & GRAJAL, 1981; SÁNCHEZ-MATA *et al.*, 1999).

- La zona de confluencia de ambas desembocaduras se corresponde con la zona central de la Ría de Ares. La profundidad es de 10-12 m y los fondos son suaves y aplanados. Los sedimentos son arenas finas-medias de procedencia continental y oceánica (ASENSIO & GRAJAL, 1981; SÁNCHEZ-MATA *et al.*, 1999).
- La boca de la ría, expuesta a la influencia oceánica, tiene una longitud de unos 5 km, 4,5 km de ancho y profundidades que oscilan entre los 20 y los 35m. Los fondos de las orillas norte y sur son rugosos debido a la existencia de importantes afloramientos rocosos de esquistos y cuarzos, que presentan una pronunciada pendiente en dirección al canal central de la bocana; los sedimentos predominantes son gravas y arenas gruesas y medias de origen oceánico. En el canal central de la bocana los fondos son aplanados y están

compuestos en su mayoría por limos y arcillas (ASENSIO & GRAJAL, 1981; SÁNCHEZ-MATA *et al.*, 1999).

Las aguas oceánicas penetran en la ría por su margen sur para luego dividirse en dos corrientes: una que continúa paralela al margen sur hasta mezclarse con las aguas que aporta el Río Mandeo; y otra que gira al norte a la altura de la ensenada de Ares y que discurre paralela al margen norte de la ría en dirección a su bocana. Cuando se encuentran con los afloramientos rocosos de los márgenes norte y sur, estas corrientes de origen oceánico, al igual que ocurre con las de origen mareal, experimentan importantes aceleraciones en su velocidad (ASENSIO & GRAJAL, 1981; SÁNCHEZ-MATA *et al.*, 1999).

2.2. Estaciones de muestreo.

La recolección de ejemplares se desarrolló entre los años 2009-2014, realizándose un total de 159 inmersiones en 21 estaciones diferentes, 18 en la Ría de Ferrol y 3 en la de Ares (Fig. 27, Tabla 2) durante todos los meses del año. En la Tabla 2 se indican únicamente las fechas de los muestreos realizados en las estaciones en las que aparecieron esplanctotróficos, incluyendo los hechos por el profesor V. Urgorri para la colección “Opistobranquios de Galicia”.

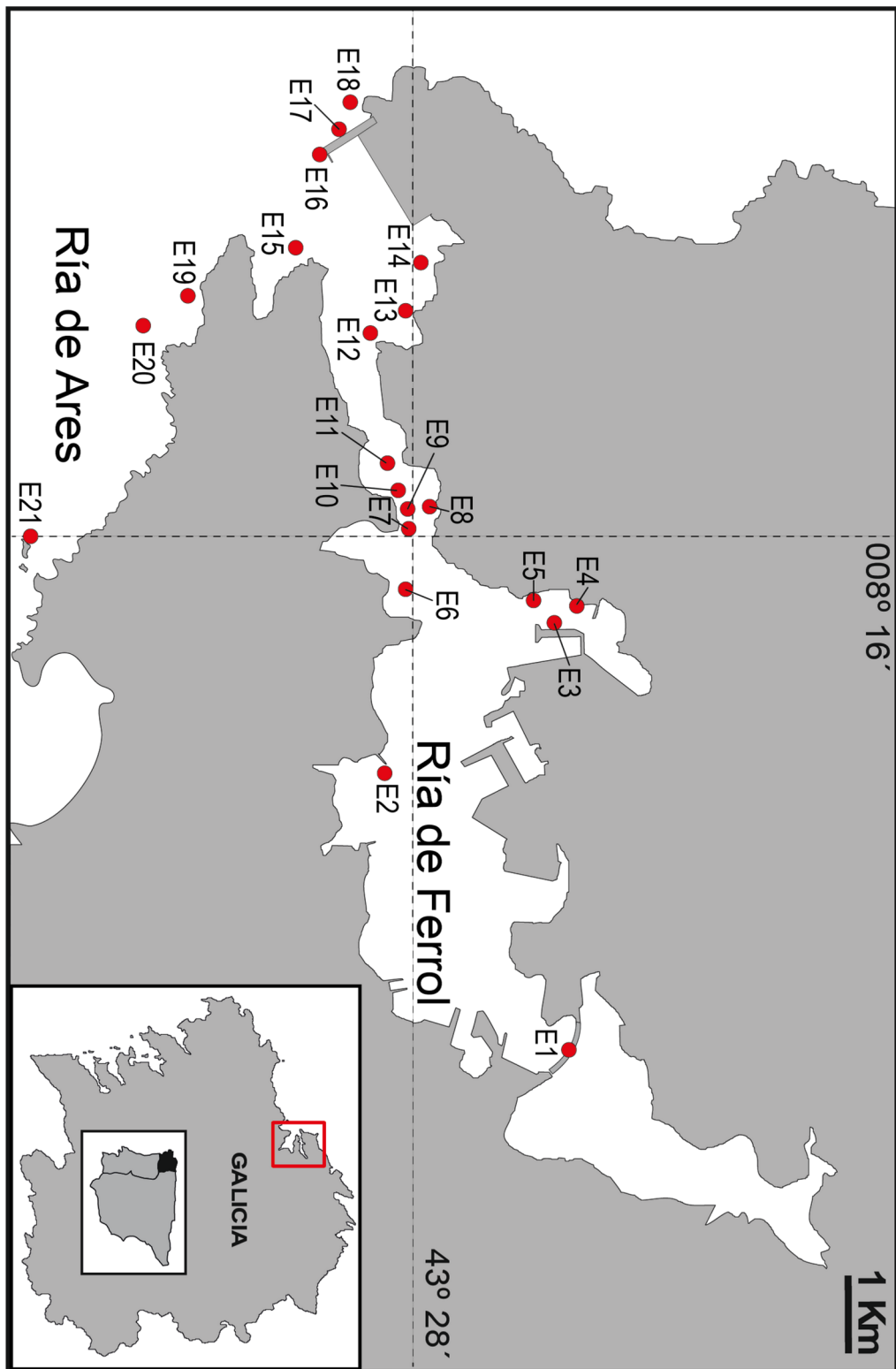


Figura 27. Estaciones de muestreo, señaladas por un círculo rojo.

Tabla 2. Fechas de muestreos en las estaciones en las que se encontraron esplanocnótrifidos.

Estación	Fecha muestreo
E7	20/08/1986
	26/08/1986
	22/07/2013
	23/07/2013
E8	22/08/1996
E10	23/08/1992
	09/08/2012
	26/04/2013
	17/01/2014
	10/03/2014
	09/05/2014
	27/08/2014
	03/09/2014
	02/10/2014
	17/11/2014
E11	22/08/2013
	28/05/2014
	03/09/2014
E12	14/05/2014
	21/05/2014
	26/05/2014
E13	11/06/2014
E14	02/08/1992
	21/08/1992
	23/08/1992
	01/08/1996
	05/08/1996
	05/08/2009
	24/05/2010
	20/09/2010
	30/07/2013
	31/07/2014
E15	11/07/2012
E17	30/07/2012
E18	17/07/2014
E20	12/07/2012
	19/06/2013
	03/07/2013
	10/07/2013
	18/06/2014
	19/06/2014
	15/07/2014
	23/07/2014
08/08/2014	

A continuación se describen solamente aquellas estaciones en las que se recolectaron nudibrancios parasitados por especies de la familia Splanchnotrophidae.

Estación E7

Situación: Punta da Redonda (Ría de Ferrol).

Coordenadas: 43°27,827'N; 008°16,237'W.

Descripción: Profundidad entre 12-15 m. Fondo de arena gruesa con afloramientos de pequeños bolos de granito sobre los que se asientan diversas especies de hidrozooos. También abundan las especies de los géneros *Laminaria* J.V. Lamouroux, 1813 y *Saccorhiza* Eimer & Fickert, 1899. Las corrientes mareales son intensas.



Figura 28. Localización de la estación E7 en la Ría de Ferrol.

Estación E8

Situación: Ensenada de Leuseda (Ría de Ferrol).

Coordenadas: 43°28,083'N; 008°16,347'W.

Descripción: Profundidad entre 8-14 m. Fondo de arena media con afloramientos esporádicos de bolos de granito, sobre los que aparecen colonias de hidrozoos y *Laminaria* spp.

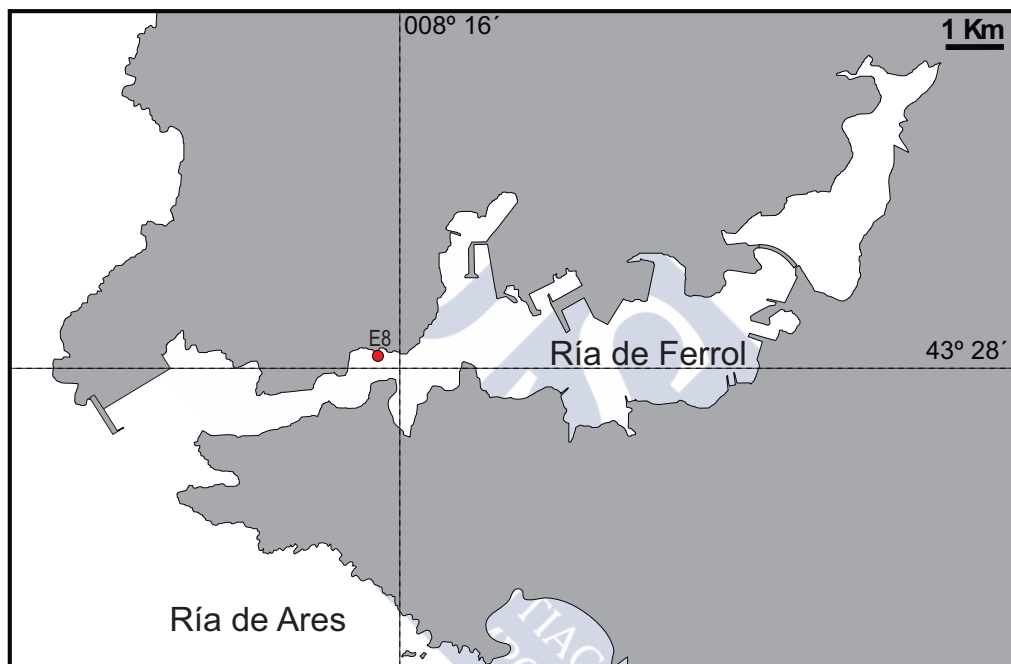


Figura 29. Localización de la estación E8 en la Ría de Ferrol.

Estación E10

Situación: Canal de la Ría de Ferrol, frente al Castillo de A Palma; debido a esta posición se registran fuertes corrientes mareales.

Coordenadas: 43°27,827'N; 008°16,570'W.

Descripción: Profundidad entre 15-17 m. Afloramiento rocoso de granito de tamaño considerable, que se va estrechando a medida que pierde profundidad; está rodeado de bolos de granito de diferentes tamaños. Sobre el afloramiento principal y los bolos que lo rodean hay gran cantidad de cnidarios (mayoritariamente hidrozoos) y otros organismos sésiles.

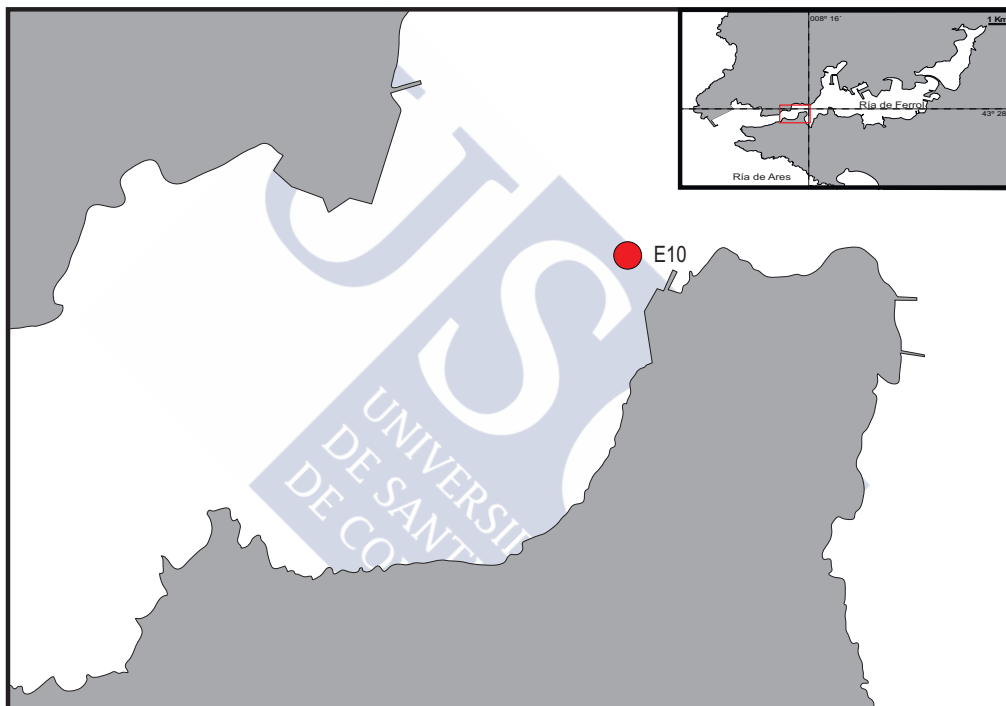


Figura 30. Localización de la estación E10 en el canal de la Ría de Ferrol.

Estación E11

Situación: En el canal de la Ría de Ferrol, frente al castillo de San Felipe.

Coordenadas: 43°27,783'N; 008°16,829'W.

Descripción. Profundidad entre 14-16 m. Muy similar a la estación E10.



Figura 31. Localización de la estación E11 en el canal de la Ría de Ferrol.

Estación E12

Situación: Punta Rabo da Porca (Ría de Ferrol).

Coordenadas: 43°27,705'N; 008°17,987'W.

Descripción: Profundidad entre 10-15 m. Fondos de arena media con abundantes afloramientos de bolos de granito. Sobre ellos abundan *Laminaria* spp. y diversas especies de poríferos y cnidarios. La velocidad de las corrientes mareales va en aumento en dirección a la zona del canal.

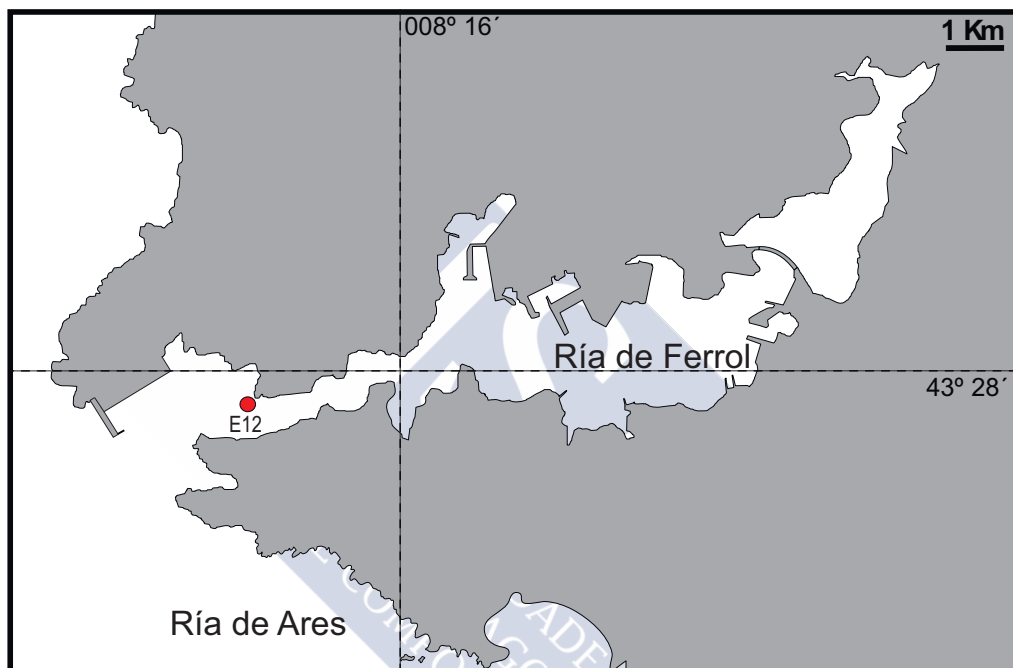


Figura 32. Localización de la estación E12 en la Ría de Ferrol.

Estación E13

Situación: Faro de San Cristobo (Ría de Ferrol).

Coordenadas: 43°27,898'N; 008°18,275'W.

Descripción: Profundidad entre 10-12 m. Fondo de arena fina con numerosos afloramientos graníticos de tamaño medio. Sobre ellos abundan *Laminaria* spp. y diversas especies de cnidarios.

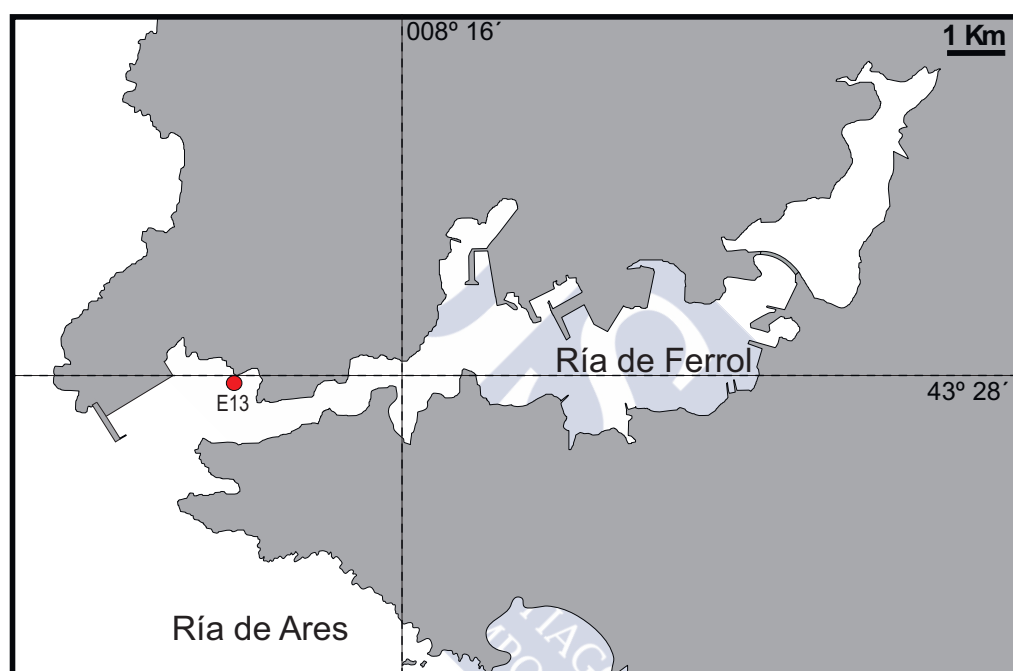


Figura 33. Localización de la estación E13 en la Ría de Ferrol.

Estación E14

Situación: Punta de Fornelos (Ría de Ferrol).

Coordenadas: 43°27,961'N; 008°18,833'W.

Descripción: Profundidad de 20 m. Fondo rocoso sobre el que crecen especies de poríferos y cnidarios, entre los que destaca por su abundancia la especie *Leptogorgia lusitanica* (Stiasny, 1937).

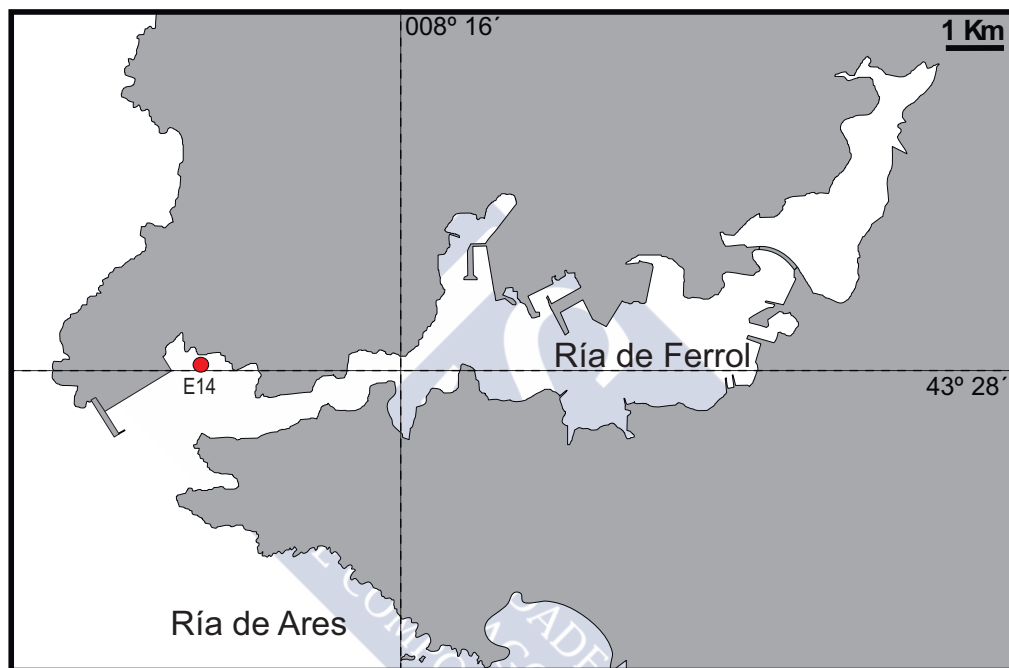


Figura 34. Localización de la estación E14 en la Ría de Ferrol.

Estación E15

Situación: Punta Segaña (Ría de Ferrol).

Coordenadas: 43°27,111'N; 008°18,783'W.

Descripción: Profundidad entre 10-12 m. Fondo rocoso con paredes verticales sobre las que abundan *Laminaria* spp., poríferos y cnidarios.

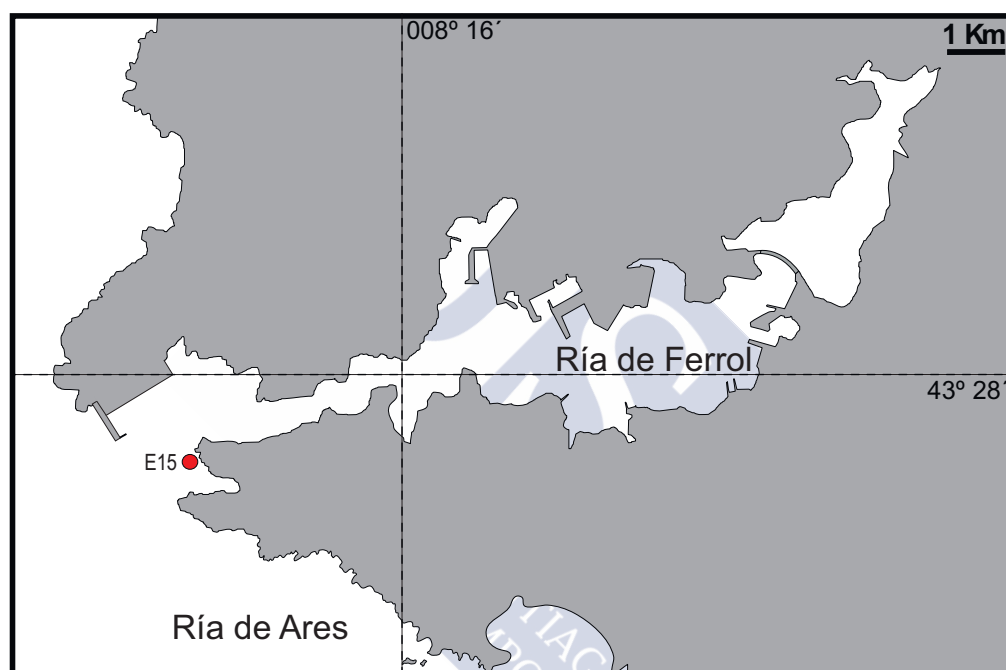


Figura 35. Localización de la estación E15 en la Ría de Ferrol.

Estación E17

Situación: Dique de abrigo del Puerto exterior de Ferrol (Ría de Ferrol).

Coordenadas: 43°27,383'N; 008°20,039'W.

Descripción: Profundidad entre 20-22 m. Bloques de hormigón sobre los que crecen diferentes especies de poríferos y cnidarios.

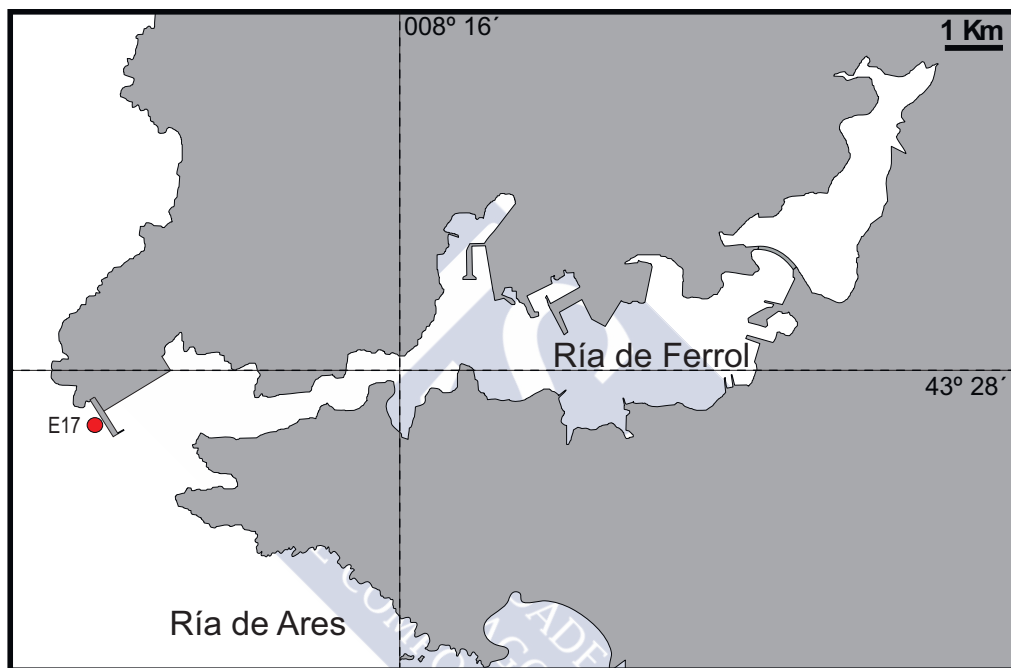


Figura 36. Localización de la estación E17 en la Ría de Ferrol.

Estación E18

Situación: Pieiro Pequeno (Ría de Ferrol).

Coordenadas: 43°27,475'N; 008°20,380'W.

Descripción: Profundidad entre 18-20 m. Abundantes afloramientos de bolos de granito de tamaño medio y grande, estos últimos con paredes verticales sobre las que se asientan *Laminaria* spp. en los primeros metros, poríferos y cnidarios.

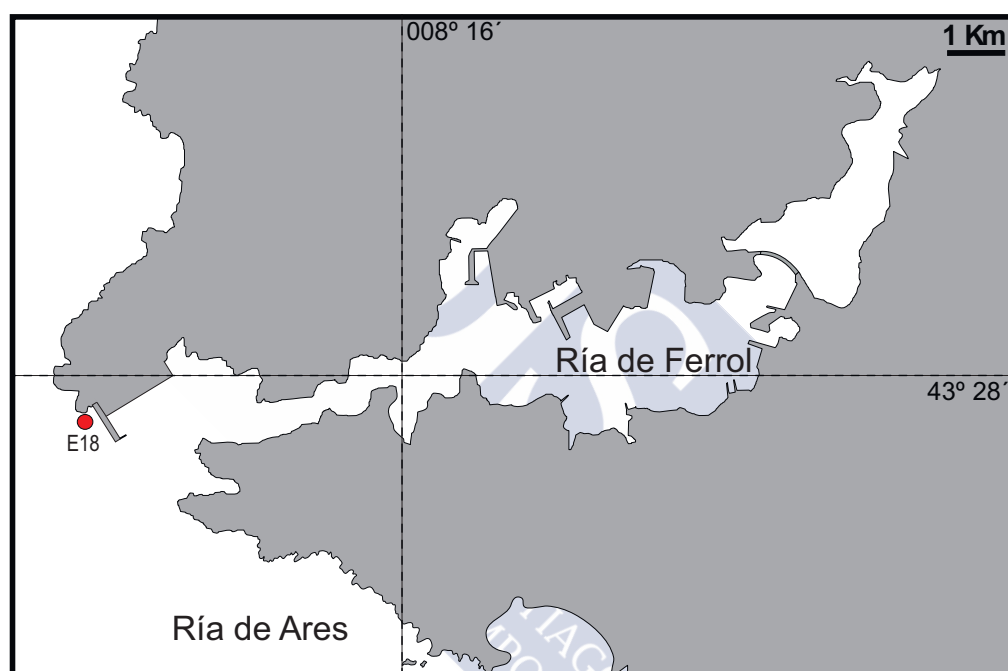


Figura 37. Localización de la estación E18 en la Ría de Ferrol.

Estación E20

Situación: Punta do Areoso (Ría de Ares).

Coordenadas: 43°26,109'N; 008°18,222'W.

Descripción: Profundidad entre 23-25m. Fondo rocoso de esquisto que forma paredes verticales. Sobre ellas aparecen *Laminaria* spp. en los primeros metros, poríferos y cnidarios (especialmente hidrozooos).

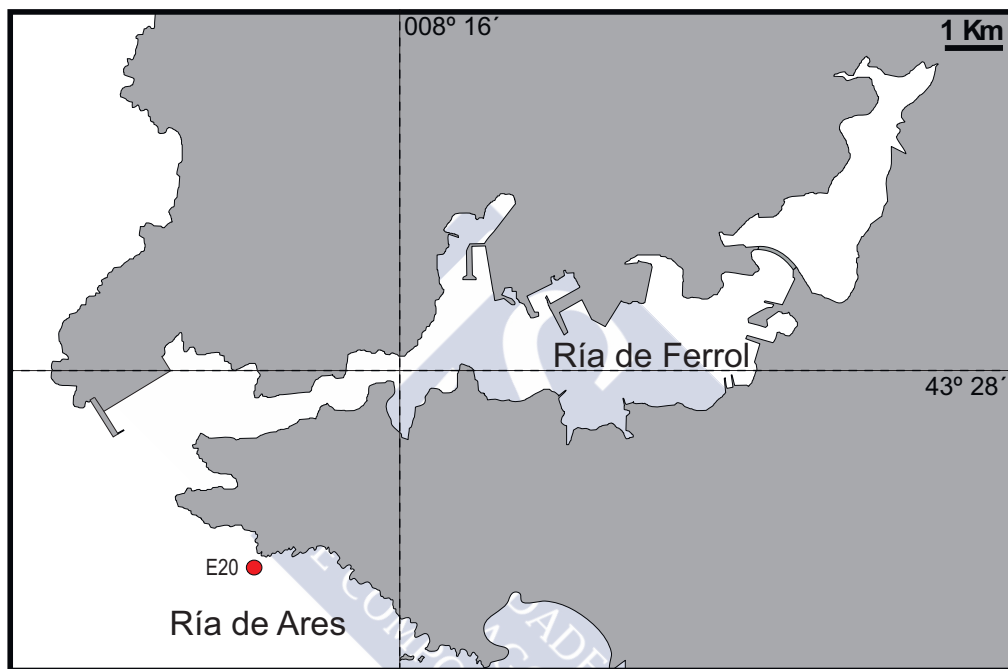
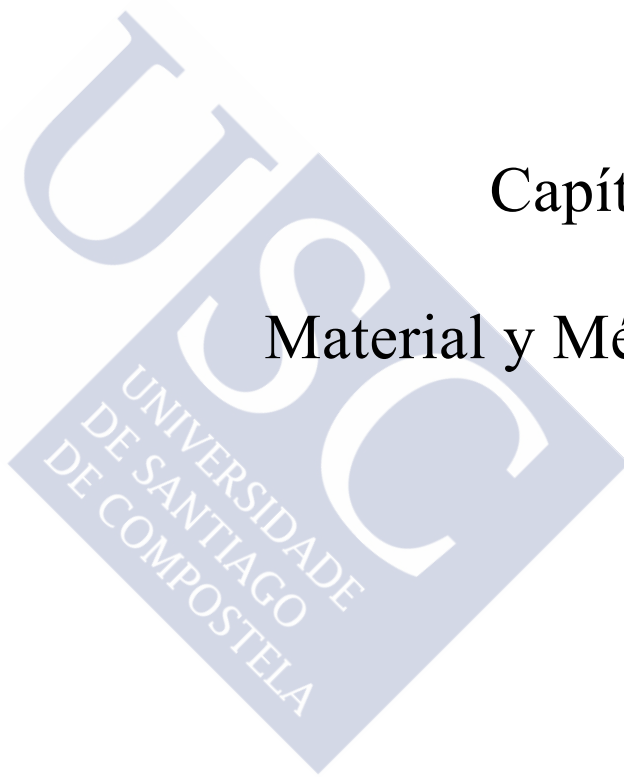


Figura 38. Localización de la estación E20 en la Ría de Ares.



Capítulo 3.

Material y Métodos





3.1. Muestreo, fijación y disección de ejemplares.

3.1.1. Muestreo.

El muestreo de los opistobranquios se realizó mediante buceo con escafandra autónoma (Fig. 39). Aquellos individuos que se encontraron sobre poríferos o ascidias se introdujeron directamente en botes de plástico individuales, mientras que en el caso de las especies que se alimentan de hidrozooos fueron éstos los que se guardaron en los botes.

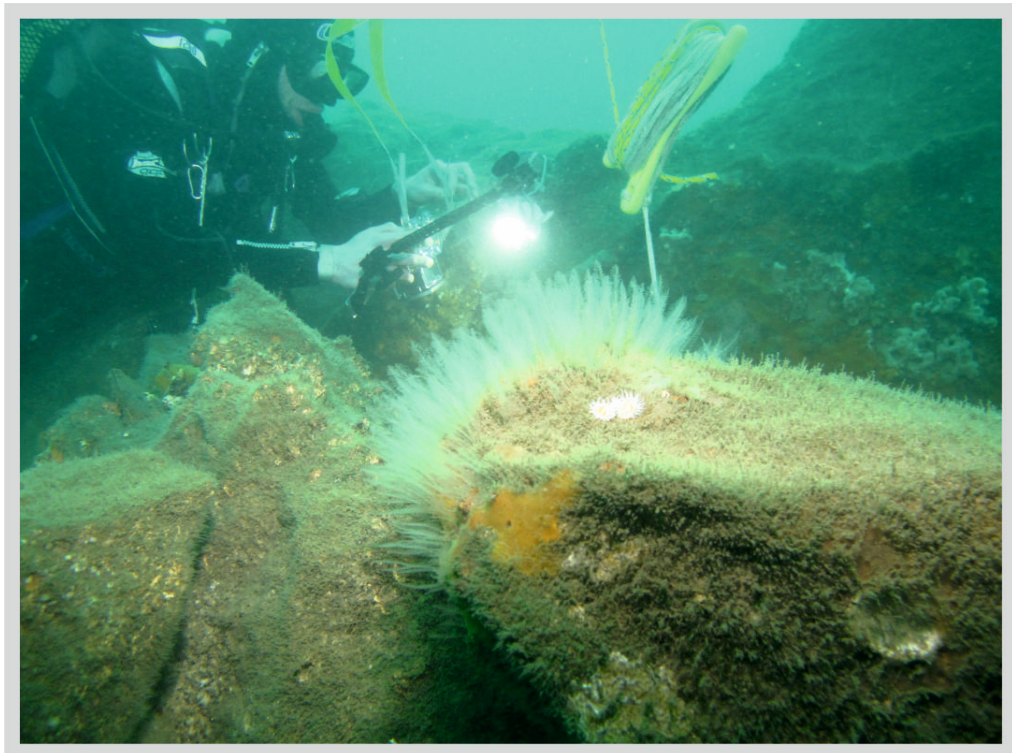


Figura 39. Inmersión subacuática para la toma de fotografías y recolección de ejemplares.

A mayores de las especies señaladas como hospedadoras potenciales mediante el estudio preliminar y la revisión de la colección “Opistobranquios de Galicia”, en cada inmersión se recolectaron todos los opistobranquios que se encontraron en las localidades de muestreo.

Una vez en el laboratorio se separaron del sustrato recolectado los opistobranquios con la ayuda de un microscopio estereoscópico Olympus SZ 40, y se procedió a su

identificación. A continuación se clasificaron en función de la presencia o ausencia de sacos ovígeros del copépodo u otro signo evidente de infección.

Los opistobranquios que no presentaban sacos ovígeros se introdujeron vivos en acuarios con agua de mar circulante, dentro de recipientes de PVC cuyas tapas estaban cerradas con malla de 250 μm de luz (Fig. 40A). Durante una semana los hospedadores se observaron diariamente con la finalidad de detectar nuevas infecciones mediante la presencia de sacos ovígeros.

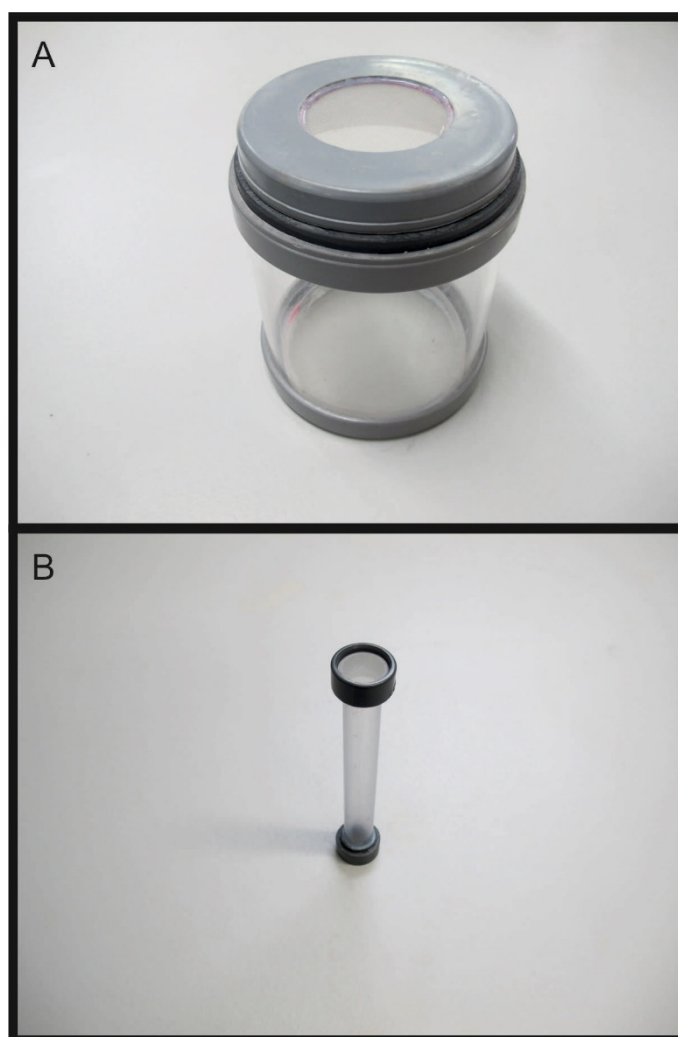


Figura 40. Recipientes para la conservación de nudibranchios en acuarios. **A.** Malla de 250 μm . **B.** Malla de 40 μm para la recolección de larvas nauplius.

Los nudibranquios infectados fueron fotografiados con una cámara Olympus CAMEDIA C-5050 acoplada a un microscopio estereoscópico Olympus SZX12.

Los hospedadores con sacos ovígeros de tamaño considerable fueron seleccionados para obtener las larvas nauplius de los copépodos. Esto se logró manteniendo vivos a los nudibranquios en acuarios con agua de mar circulante, separados individualmente en tubos de PVC transparente con tapas hechas de malla de 40 μm de luz (Fig. 40B). De esta manera los huevos del parásito se desarrollaron con normalidad hasta su eclosión, tras la cual las larvas nauplius quedaron atrapadas en el interior de los tubos. Los recipientes fueron lavados diariamente para recolectar las larvas, con la ayuda de una pipeta Pasteur.

3.1.2. Fijación.

Para la fijación de los nudibranquios parasitados se utilizaron 3 métodos diferentes según el tipo de estudio que se iba a realizar de cada ejemplar de parásito:

- Etanol 96° para estudios moleculares.
- Etanol 70° para estudios anatómicos.
- Líquido de Bouin y formol al 4% para estudios anatómicos e histológicos.

En el caso de los nudibranquios destinados a estudios anatómicos e histológicos se realizó una relajación previa con MgCl_2 al 7% durante al menos 2 horas. La finalidad de este proceso fue evitar contracciones corporales debidas al contacto con el medio de fijación, de manera que tanto los nudibranquios como los copépodos que albergaban se encontrasen en condiciones ideales para la posterior extracción y estudio del parásito.

3.1.3. Disección.

Para obtener los copépodos se realizó la disección de los nudibranquios infectados bajo el microscopio estereoscópico Olympus SZ 40. Se practicó una incisión transversal a lo largo del pie del hospedador y se extrajeron los ejemplares del parásito, que posteriormente fueron fotografiados con una cámara Olympus CAMEDIA C-5050 acoplada a un microscopio estereoscópico Olympus SZX12 y conservados en el mismo medio de fijación que el nudibranquio del que fueron extraídos.

En cada caso se anotó la posición en el hospedador, número, sexo y estadio vital del parásito, así como el estado en que se encontraban las vísceras del nudibranquio en búsqueda de efectos negativos detectables.

3.2. Estudio molecular.

3.2.1. El gen Citocromo c Oxidasa I (COX1).

Para estimar las relaciones filogenéticas y la identidad taxonómica de los distintos especímenes de copépodo encontrados en cada uno de los diferentes hospedadores, se seleccionó el gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (COX1), ya que se ha demostrado que es una herramienta útil con la resolución filogenética suficiente para diferenciar entre especies de un mismo género, constituyendo el marcador filogenético de uso más habitual (HEBERT *et al.*, 2003a, b; HEBERT *et al.*, 2004). Esto se debe a que el gen COX1 posee una gran incidencia de sustituciones, con mayor frecuencia en los nucleótidos de 3ª posición, lo que le confiere una tasa de evolución molecular muy rápida, del orden de 3 veces mayor que otros genes como el 12S o el 16S (HEBERT *et al.*, 2003a). Esta elevada variabilidad hace que dos especies filogenéticamente próximas posean suficiente divergencia genética entre sus secuencias COX1 como para poder ser diferenciadas (HEBERT *et al.*, 2003a).

El protocolo seguido es muy similar al llamado “COX1 *barcoding*” (código de barras), mediante el cual se obtienen secuencias COX1 de individuos problema y posteriormente se comparan con secuencias de referencia de individuos de identidad morfológica conocida (HEBERT *et al.*, 2003a, b; HEBERT *et al.*, 2004; HAJIBABAEI *et al.*, 2007).

A efectos prácticos, y en base a la bibliografía de referencia sobre estudios moleculares con el gen COX1, se considera que dos individuos cuyas secuencias presentan divergencias que rondan o superan el 2% pertenecen, probablemente, a especies diferentes (HEBERT *et al.*, 2003a, b).

3.2.2. Aislamiento, amplificación y secuenciación de ADN.

La extracción del ADN total se realizó con un kit comercial de la marca Qiagen, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Los individuos y especies de los que se obtuvieron secuencias COX1 se indican en la Tabla 3.

Para amplificar el material genético obtenido en el proceso anterior se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (MULLIS *et al.*, 1986), con la ayuda de un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Fig. 41).



Figura 41. Termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient.

Debido a que en el momento de realizar las amplificaciones no existían precedentes de estudios moleculares sobre la familia Splanchnotrophidae se hizo necesario elaborar un protocolo de PCR eficiente para esta taxón. Inicialmente se llevó a cabo la amplificación, en un juego reducido de individuos, de la secuencia COX1 obtenida a partir de los cebadores de uso universal LCO 1490 y HCO 2198 (FOLMER *et al.*, 1994) en condiciones estándar de PCR, los cuales mostraron una baja eficiencia en PCRs a partir del ADN total extraído de los copépodos. Para aumentarla, se diseñaron con el programa PRIMER3 (UNTERGASSER *et al.*, 2012) y se sintetizaron unos nuevos cebadores específicos de especie:

- Loma COX1 F1 (Directo) 5' GTCCCCTCCTCCTCTAGGGT
- Loma COX1 R2 (Reverso) 5' TTGAGCCGGAATAGTGGGGT

La utilización de estos cebadores mejoró sensiblemente la eficiencia de la PCR.

Dicha eficiencia también fue ajustada ensayando diferentes condiciones de reacción (concentración de Mg^{2+} , temperatura, duración y número de ciclos de desnaturalización, fusión y elongación) y seleccionando aquellas que mostraron mejores resultados.

Se determinó que las condiciones óptimas para la realización de la PCR son: desnaturalización a 95°C durante 3'; 35 ciclos de 95°C durante 40", 50°C durante 40" y 72°C durante 60"; una extensión final de 72°C durante 10' y enfriamiento a 4°C durante 5'.

Los productos de PCR fueron visualizados en un transiluminador Vilber Loumart ECX-F15M (Fig. 42A) bajo luz ultravioleta en gel de agarosa al 1% con tinción de 10µl de colorante RedGel, tras una electroforesis durante 25' con un voltaje de 180 V en una cubeta BioRad Wide Mini Sub-Cell GT, que utilizó una fuente de alimentación BioRad PowerPac Basic 300 (Fig. 42B).

Una vez obtenido el producto de PCR éste fue secuenciado en el Servicio de secuenciación de la USC en un secuenciador automático capilar modelo ABI 3730xl (Applied Biosystems). Los electroferogramas fueron revisados y las secuencias alineadas con el programa BioEdit (HALL, 1999) (Fig. 43A).



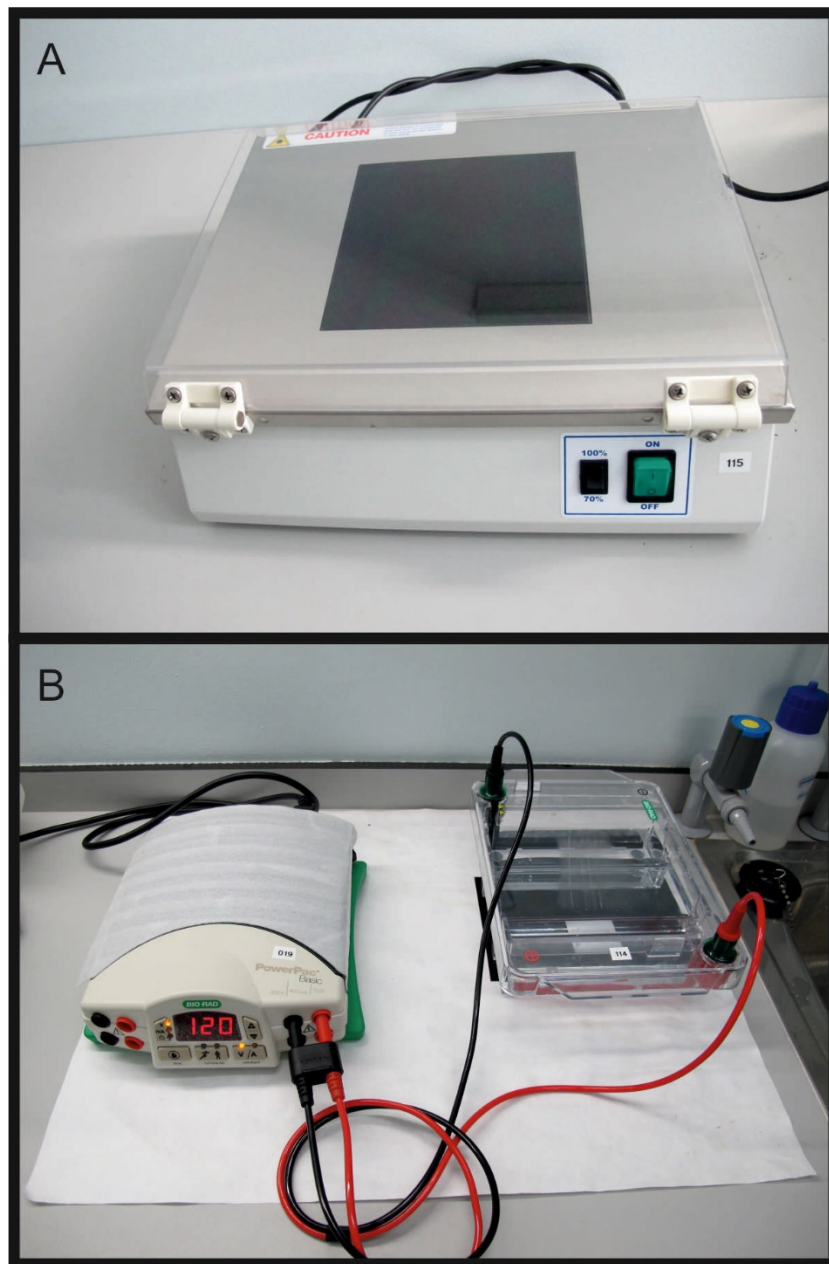


Figura 42. A. Transiluminador. B. Fuente de alimentación y cubeta de electroforesis.

Tabla 3. Resumen de las especies de la familia Splanchnotrophidae y del grupo externo incluidas en el estudio, indicando el hospedador, estación de muestreo y material que se utilizó para la extracción del ADN (Estación de Biología Mariña da Graña; S.O.: Sacos ovígeros).

Especie	Código	Hospedador	Estación	Material
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM1	<i>Doto fragilis</i>	E17	S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM2	<i>Doto fragilis</i>	E17	Hembra
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM3	<i>Doto koenneckeri</i>	E7	S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM4	<i>Doto koenneckeri</i>	E7	Hembra
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM5	<i>Doto koenneckeri</i>	E18	Hembra y S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM6	<i>Doto koenneckeri</i>	E18	Hembra y S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM7	<i>Doto koenneckeri</i>	E18	Hembra y S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM8	<i>Doto koenneckeri</i>	E18	Hembra y S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM9	<i>Doto koenneckeri</i>	E26	Hembra y S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM10	<i>Doto lemchei</i>	E26	S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM11	<i>Doto lemchei</i>	E26	Hembra
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM12	<i>Doto lemchei</i>	E26	Hembra y S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM13	<i>Doto lemchei</i>	E26	Hembra y S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM14	<i>Doto lemchei</i>	E26	Hembra y S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM15	<i>Doto lemchei</i>	E26	Hembra y S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM16	<i>Doto pinnatifida</i>	E11	Hembra
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM17	<i>Doto pinnatifida</i>	E13	Hembra y S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM18	<i>Doto pinnatifida</i>	E7	Hembra y S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM19	<i>Doto pinnatifida</i>	E13	Hembra y S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM20	<i>Doto pinnatifida</i>	E13	Hembra y S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM21	<i>Doto pinnatifida</i>	E13	Hembra y S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM22	<i>Eubranchus</i> sp.	E26	S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM23	<i>Eubranchus</i> sp.	E26	Hembra
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM24	<i>Eubranchus</i> sp.	E26	Hembra y S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM25	<i>Eubranchus</i> sp.	E26	Hembra y S.O.
<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	LOM26	<i>Eubranchus</i> sp.	E20	Hembra y S.O.
Splanchnotrophidae indet.	SPLNCH1	<i>Spurilla neapolitana</i>	EBMG	S.O.

Especie	Código	Hospedador	Estación	Material
<i>Splanchnotrophus gracilis</i>	SGRA1	<i>Trapania tartanella</i>	E20	Hembra y S.O.
<i>Splanchnotrophus gracilis</i>	SGRA2	<i>Trapania tartanella</i>	E20	Hembra y S.O.
<i>Splanchnotrophus gracilis</i>	SGRA3	<i>Trapania tartanella</i>	E20	Hembra y S.O.
<i>Splanchnotrophus gracilis</i>	SGRA4	<i>Trapania tartanella</i>	E20	Hembra y S.O.
<i>Splanchnotrophus angulatus</i>	SANG1	<i>Cratena peregrina</i>	Islote	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Splanchnotrophus angulatus</i>	SANG2	<i>Cratena peregrina</i>	Banyuls (Francia)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Splanchnotrophus angulatus</i>	SANG3	<i>Cratena peregrina</i>	Banyuls (Francia)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Splanchnotrophus angulatus</i>	SANG4	<i>Cratena peregrina</i>	Banyuls (Francia)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Splanchnotrophus angulatus</i>	SANG5	<i>Cratena peregrina</i>	Banyuls (Francia)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Splanchnotrophus angulatus</i>	SANG6	<i>Cratena peregrina</i>	Banyuls (Francia)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Splanchnotrophus angulatus</i>	SANG7	<i>Cratena peregrina</i>	Banyuls (Francia)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Splanchnotrophus angulatus</i>	SANG8	<i>Cratena peregrina</i>	Banyuls (Francia)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Ismaila aliena</i>	IALIE1	<i>Thecacera darwini</i> Pruvot-Fol, 1950	Valdivia (Chile)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Ismaila aliena</i>	IALIE2	<i>Thecacera darwini</i>	Valdivia (Chile)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Ismaila aliena</i>	IALIE3	<i>Thecacera darwini</i>	Valdivia (Chile)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Ismaila aliena</i>	IALIE4	<i>Thecacera darwini</i>	Valdivia (Chile)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Ismaila aliena</i>	IALIE5	<i>Thecacera darwini</i>	Valdivia (Chile)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Ismaila aliena</i>	IALIE6	<i>Thecacera darwini</i>	Valdivia (Chile)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Ismaila aliena</i>	IALIE7	<i>Thecacera darwini</i>	Valdivia (Chile)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Ismaila robusta</i>	IROB1	<i>Phidiana lottini</i> (Lesson, 1831)	Valdivia (Chile)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Ismaila robusta</i>	IROB2	<i>Phidiana lottini</i>	Valdivia (Chile)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Ismaila robusta</i>	IROB3	<i>Phidiana lottini</i>	Valdivia (Chile)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Ismaila robusta</i>	IROB4	<i>Phidiana lottini</i>	Valdivia (Chile)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Ismaila robusta</i>	IROB5	<i>Phidiana lottini</i>	Valdivia (Chile)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Ismaila robusta</i>	IROB6	<i>Phidiana lottini</i>	Valdivia (Chile)	Secuencia cedida por R. Anton

Especie	Código	Hospedador	Estación	Material
<i>Ismaila robusta</i>	IROB7	<i>Phidiana lottini</i>	Valdivia (Chile)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Ismaila robusta</i>	IROB8	<i>Phidiana lottini</i>	Valdivia (Chile)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Lomanoticola</i> sp.	LOM27	<i>Cuthona caerulea</i>	Banyuls (Francia)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Ceratosomicola mammilata</i>	CERMA1	<i>Goniobranchnus geometricus</i> (Ribsec, 1928)	Sulawesi (Indonesia)	Secuencia cedida por R. Anton
<i>Clausocalanus minor</i> Sewell, 1929	AF462313	—	Pacífico Norte	Adulto

3.2.3. Análisis de secuencias.

Las secuencias COX1 disponibles de los copépodos analizados en cada una de las especies de nudibranquios hospedadores se sometieron a diferentes análisis filogenéticos utilizando el programa informático MEGA v6 (TAMURA *et al.*, 2013) (Fig. 43B). Inicialmente se obtuvo una matriz de distancias genéticas entre pares de secuencias, en la que se muestra el porcentaje de diferencias en bases de las secuencias del gen COX1 entre los individuos estudiados. Estas distancias genéticas básicas intraespecíficas e interespecíficas fueron estimadas en MEGA v6 como distancias-*p* (NEI & KUMAR, 2000).

La inferencia de las relaciones filogenéticas entre los individuos analizados se obtuvo mediante la selección del modelo evolutivo más ajustado a los datos y la elaboración de un árbol filogenético basado en Neighbor-Joining (NJ), con una evaluación de los nodos por bootstrapping con 2000 réplicas en MEGA v6 (TAMURA *et al.*, 2013). También se incluyeron secuencias de especies del género *Ismaila* y de la especie *Splanchnotrophus angulatus*, (ANTON *et al.*, en prensa), usándose como grupo externo la especie *Clausocalanus minor* (Calanoida: Clausocalanidae) (código de acceso en GenBank AF462313, BUCKLIN *et al.*, 2003).



Figura 43. Programas informáticos utilizados en el análisis de las secuencias. **A.** Tratamiento de electroferograma con el programa BioEdit. **B.** Análisis de distancias con el programa Mega v6.

3.3. Microscopía.

3.3.1. *Scanning Electron Microscope (SEM).*

En un primer paso se eliminaron los tejidos del hospedador de los especímenes de copépodo con un limpiador ultrasónico Branson 3510, sumergidos durante 3 minutos en agua con un detergente orgánico.

Una vez despojados de cualquier resto orgánico, los ejemplares de copépodo seleccionados para la observación mediante SEM se prepararon con 2 métodos diferentes:

- Debido al excesivo replegamiento de la superficie corporal observado al seguir el método de deshidratación con acetona descrito por los primeros investigadores en usar el SEM (HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; SALMEN *et al.* 2008a, b), se desarrolló una nueva metodología basada en la liofilización: tras una inmersión en N₂ líquido durante al menos 10 minutos, los especímenes fueron liofilizados durante un mínimo de 12 minutos en un liofilizador Telestar Cryodos-50.
- Al observarse que, debido a su pequeño tamaño, con la metodología anterior se producía la pérdida de algunos machos del copépodo se empleó el protocolo descrito por BRAET *et al.* (1997) para la deshidratación con hexametildisilazano: tras una inmersión de los copéodos durante 2 horas en dicho compuesto, se dejó que secasen durante 14 horas. Una vez transcurrido ese tiempo se montaron los ejemplares en un portaobjetos de SEM.

Los especímenes se recubrieron con oro, y a continuación fueron observados en un microscopio SEM Zeiss EVO LS15 y se tomaron fotos de las estructuras con valor taxonómico.

3.3.2. Microscopía óptica.

Las estructuras pequeñas con valor taxonómico de los ejemplares de copépodo que se encontraban en mejor estado se observaron con un microscopio óptico Olympus CX41.

El SEM presenta el inconveniente de que algunas estructuras pueden estar cubriendo a otras, haciéndolas indetectables mediante esta técnica. Para resolverlo se realizaron dibujos con una cámara clara acoplada a un microscopio óptico Olympus BX51 (Fig. 44A). Previamente los ejemplares fueron diseccionados bajo un microscopio estereoscópico Olympus SZX12 con una punta de tungsteno y las diferentes partes se montaron en un portaobjetos utilizando como medio de preparación glicerina.

Los dibujos se escanearon en un escáner Konica Minolta C353 Series PCL y se digitalizaron con el programa Adobe Illustrator versión CS5 con la ayuda de una pen Tablet Wacom Intuos Pro M (Fig. 44B).

En algunos casos se tomaron microfotografías de estructuras con valor taxonómico, mediante una cámara Olympus DP12 acoplada a un microscopio óptico Olympus BX51.

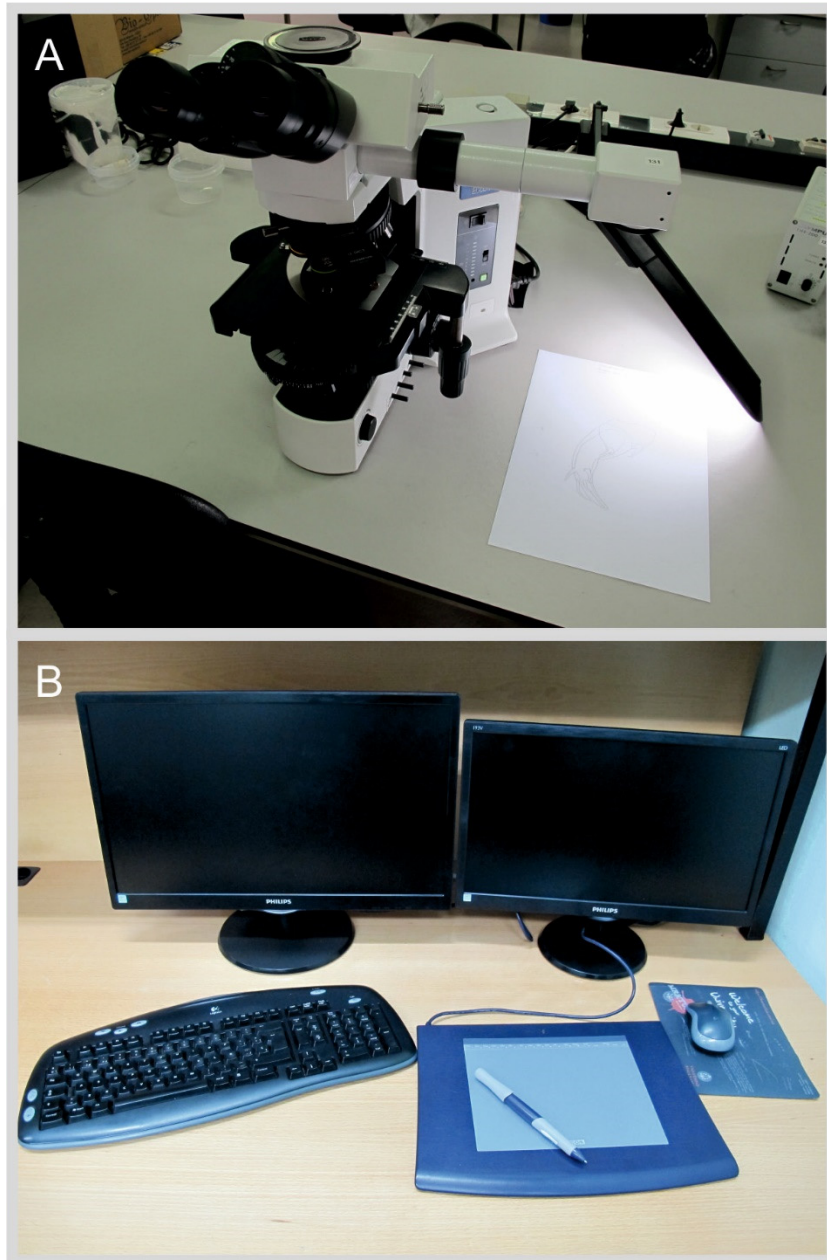


Figura 44. A. Proceso de dibujado de los especímenes con cámara clara. B. Equipo utilizado para la digitalización de los dibujos.

3.4. Material estudiado.

En total se recolectaron un total de 127 hembras y 64 machos de la especie *Lomanoticola* sp. nov., que fueron estudiados mediante técnicas de microscopía de la siguiente manera:

- SEM: 6 hembras (2 encontradas en *Doto lemchei*, 2 en *Doto koenneckeri*, 1 en *Doto pinnatifida* y 1 en *Eubranchus* sp.) y 4 machos (1 en *Doto lemchei*, 1 en *Doto koenneckeri*, 1 en *Doto pinnatifida* y 1 en *Eubranchus* sp.).
- Dibujos en cámara clara: 9 hembras (4 en *Doto lemchei*, 2 en *Doto koenneckeri*, 2 en *Doto pinnatifida*, y 1 en *Eubranchus* sp.) y 4 machos (1 en *Doto lemchei*, 1 en *Doto koenneckeri*, 1 en *Doto pinnatifida* y 1 en *Eubranchus* sp.).

Además, 22 hembras de la especie *Lomanoticola* sp. nov. fueron empleadas para el estudio molecular

En el caso de la especie *Splanchnotrophus gracilis*, se recolectaron un total de 139 hembras y 118 machos, de los cuales 8 hembras y 6 machos fueron examinados al SEM. Por otra parte, 4 hembras de esa especie se destinaron al estudio molecular.

3.5. Terminología.

La terminología seguida fue tomada de HUYS & BOXSHALL (1991), HUYS (2001) y HAUMAYR & SCHRÖDL (2003). Los especialistas en el estudio de los copépodos emplean una serie de términos que describen la segmentación del cuerpo y de los apéndices que, dada la particular anatomía externa de las hembras adultas de la familia Splanchnotrophidae, fueron de gran ayuda a la hora de determinar la segmentación corporal. A continuación se citan los más importantes (HUYS & BOXSHALL, 1991; HUYS, 2001):

- **Alobase:** Segmento compuesto derivado de la fusión del basipodito y del primer segmento endopodal.
- **Apéndices cefálicos:** Cada uno de los apéndices que se encuentran en los somitos cefálicos. Son, del 1º al 5º: anténula, antena, mandíbula, maxílula y maxila.
- **Artejo:** Segmento de un apéndice cefálico.
- **Basipodito:** Segmento distal del protopodito.
- **Cefalosoma:** Segmento compuesto formado por los 5 somitos cefálicos (cada uno con un par de apéndices cefálicos) y el 1º somito torácico.

- **Cefalotórax:** Unión de los 5 somitos cefálicos y de al menos el 1^{er} y 2^o somitos torácicos. Se encuentran cubiertos por el escudo cefálico.
- **Coxopodito:** 2^o segmento del protopodito.
- **Coxobase:** Segmento compuesto formado por la fusión del coxopodito y del basipodito.
- **Endopodito:** Rama interna de un apéndice birrámeo.
- **Epipodito:** Lóbulo del borde externo del coxopodito.
- **Espina:** Elemento de ornamentación rígido, insertado en el tegumento a través de un agujero.
- **Exopodito:** Rama externa de un apéndice birrámeo.
- **Genitoabdomen:** Tagma formado por la fusión del somito genital y de los somitos abdominales.
- **Gnatobase:** Epipodito coxal de la mandíbula, con un borde distal en forma de cuchilla.
- **Maxilípodo:** 1^{er} apéndice torácico (toracópodo), se encuentra en el último segmento del cefalosoma. Por regla general aparece modificado como apéndice alimenticio, pero la familia Splanchnotrophidae carece de él (HO, 1987).
- **Precoxa:** 1^{er} segmento del protopodito.
- **Prosoma:** Región corporal anterior a la articulación mayor.
- **Protopodito:** Parte basal de un apéndice, que generalmente comprende la precoxa, coxopodito y basipodito.
- **Ramas caudales:** Par de apéndices que se encuentran en la superficie posterior de somito anal. Las sedas que aparecen en esta estructura se numeran mediante números romanos.
- **Seda:** Elemento de ornamentación flexible, insertado en el tegumento a través de un agujero.
- **Sincoxa:** Artejo doble formado por la fusión de la precoxa y del coxopodito.
- **Somito:** Un segmento corporal.
- **Somito genital:** 7^o somito torácico, con las aperturas genitales.
- **Somito pedígero:** Somito torácico portador de un par de patas natatorias. Su nomenclatura se abrevia como P1-P5.
- **Toracópodo:** Apéndice torácico. En copéodos comprende del 1^{er} al 5^o apéndices natatorios (abreviados como L1-L5), que son el 2^o, 3^{er}, 4^o, 5^o y 6^o apéndices torácicos.
- **Urosoma:** Región corporal posterior a la articulación mayor.





Capítulo 4.

Resultados



4.1. Introducción.

El capítulo de los resultados se estructura en tres apartados: estudio anatómico, análisis molecular y biología de los parásitos.

En el ESTUDIO ANATÓMICO se presenta la diagnosis de cada género con las referencias bibliográficas correspondientes. De cada una de las especies se describen detalladamente los adultos de ambos sexos. En primer lugar se describe la segmentación corporal y cada uno de los apéndices cefálicos, toracópodos y ramas caudales, acompañados de fotografías al SEM y, en su caso, por dibujos realizados con cámara clara. A continuación se describen los caracteres del dimorfismo sexual y de la variabilidad intraespecífica. Tras la descripción de los adultos, se describen las larvas nauplius con la ayuda de dibujos realizados con cámara clara. Finalmente se realiza una discusión de los resultados obtenidos con la bibliografía científica pertinente.

En el apartado del ANÁLISIS MOLECULAR se estudian las secuencias del gen COX1 de un total de 10 especies pertenecientes a los géneros *Lomanoticola*, *Splanchnotrophus*, *Ismaila* y *Ceratosomicola* de la familia Splanchnotrophidae; y de la especie *Clausocalanus minor*, que fue seleccionada como grupo externo. En primer lugar se analizan las distancias genéticas intraespecíficas e interespecíficas de los diferentes taxones, las cuales se reflejan en sendas tablas. A continuación, se realiza una reconstrucción filogenética basada en distancias mediante el método de Neighbor-Joining, obteniendo un árbol filogenético en el que se agrupan las diferentes secuencias en clados concretos según su afinidad.

Finalmente, en el apartado de la BIOLOGÍA de los parásitos, se exponen los datos obtenidos sobre los siguientes parámetros: distribución geográfica de las especies estudiadas, opistobranquios infectados por las diferentes especies, tasas de infección, carga parasitaria, tamaño de los hospedadores, posición en el interior de los nudibranchios, efectos negativos detectados y presencia estacional de la infección.

Parte de los resultados referidos a la anatomía y biología de *Splanchnotrophus gracilis* ya han sido publicados en ABAD *et al.* (2011).

4.2. Estudio anatómico.

4.2.1. Género *Lomanoticola*.

Clase Copepoda H.M. Edwards, 1840

Orden Poecilostomatoida Thorell, 1859

Familia Splanchnotrophidae Norman & Scott, 1906

Género *Lomanoticola* Scott & Scott, 1895

DIAGNOSIS

HANCOCK & NORMAN, 1863: 55-56, plancha XVI figs. 1-6.

DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1951: 78-80, figs. 9-17.

HUYS, 2001: 123-124.

Cuerpo de la hembra compacto, compuesto por un prosoma de gran tamaño y por un urosoma, más pequeño, de 2 somitos. Parte anterior del prosoma formada por el cefalosoma y los somitos torácicos 2º y 3º, de los que surgen 3 pares de apéndices laterales cortos y robustos; parte posterior del prosoma cilíndrica, formada por la fusión de los somitos torácicos 4º y 5º. Urosoma compuesto por el somito torácico 6º y el genitoabdomen. Ramas caudales con 1 seda apical espatulada y con al menos 2 sedas accesorias bien desarrolladas.

Anténula de 4 artejos, el 1º con 2 espinas robustas. Antena de 3 artejos: coxobase y endopodito de 2 artejos; parte distal del endopodito con forma de gancho. Mandíbula compuesta por una gnátobase corta que finaliza en una hoja dentada. Maxílula no observada. Maxila de 2 artejos, ornamentada por 1 seda y 1 espina en la alobase.

2º y 3º par de toracópodos birrámeos, muy reducidos. Protopodito con 1 seda en su borde externo; endopodito representado por un pequeño lóbulo espinoso; exopodito corto, con varios elementos accesorios. 4º, 5º y 6º par de toracópodos ausentes.

Sacos ovígeros reniformes, unidos al genitoabdomen subterminalmente.

Especie tipo: *Lomanoticola insolens* Scott & Scott, 1895.

El estudio anatómico de la especie *Lomanoticola* sp. nov., que será descrita a continuación, aporta nuevos datos acerca de estructuras con importancia taxonómica que completan la diagnosis del género *Lomanoticola*. En concreto, se observa por primera vez la ornamentación de la anténula, antena, labium y labrum, de los que hasta ahora únicamente se conocía su segmentación y ornamentación general. La anténula,

además de las 2 espinas robustas del 1^{er} artejo, posee 2 espinas y 1 seda larga en el borde externo del 2^o artejo, 2 sedas pequeñas y 1 seda más larga en el 3^{er} artejo y 3 sedas en la porción medial del 4^o artejo, que está finalizado por 8-12 sedas en la posición apical. En el caso de la antena, se observa que posee 1 espina en la coxobase, 1 espina en el artejo proximal del endopodito y 4 elementos de ornamentación en el artejo distal del endopodito (1 espina y 3 sedas). El labrum tiene dos procesos dirigidos lateralmente y el labium es circular y con dos áreas con sédulas. Por otra parte, se confirma la existencia de maxílula, al menos en el macho, que es un proceso sedoso en la base de la mandíbula. También se observan importantes divergencias entre el 2^o y 3^{er} par de toracópodos de *Lomanotocola* sp. nov. y los descritos para *Lomanotocola brevipes* y *Lomanotocola insolens*: en *Lomanotocola* sp. nov. están bien desarrollados, con 1 seda en el protopodito y varios elementos de ornamentación en el exopodito, mientras que en *Lomanotocola brevipes* y *Lomanotocola insolens* son reducidos. Además, *Lomanotocola* sp. nov. posee un 4^o par de toracópodos, del que carecen las otras dos especies del género. En lo que respecta a las ramas caudales de *Lomanotocola* sp. nov., de las que únicamente se conocía el aspecto general y la presencia de una seda V larga en *Lomanotocola brevipes* y *Lomanotocola insolens*, se ha observado que ésta tiene el ápice pinnado y que, de las 6 sedas restantes, 5 se encuentran en posición dorsal. Finalmente, se describe la anatomía del macho, información desconocida hasta este momento.

En vista de lo expuesto anteriormente, la nueva información disponible tras el estudio de *Lomanotocola* sp. nov. hace necesario formular una nueva diagnosis para el género *Lomanotocola*, que es la siguiente:

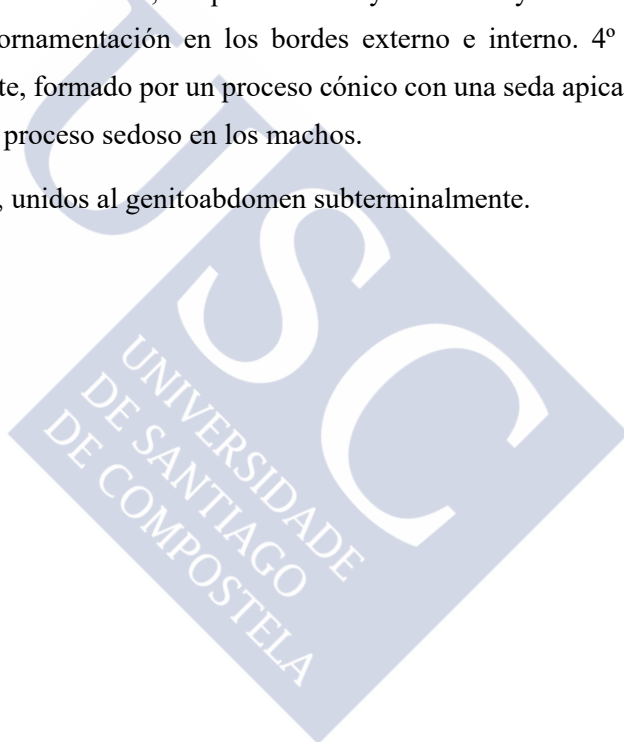
Nueva diagnosis: Cuerpo de la hembra compacto, compuesto por un prosoma de gran tamaño y por un urosoma, más pequeño, de 2 somitos. Parte anterior del prosoma formada por el cefalosoma y los somitos torácicos 2^o y 3^o, de los que surgen 3 pares de apéndices laterales cortos y robustos; parte posterior del prosoma cilíndrica, formada por la fusión de los somitos torácicos 4^o y 5^o. Urosoma compuesto por el somito torácico 6^o y el genitoabdomen. Ramas caudales con una seda apical espatulada y un número variable de sedas más pequeñas, de las cuales 2 son algo mayores que las demás.

Cuerpo del macho ciclopiforme. El prosoma comprende el cefalotórax (cefalosoma y 2^o y 3^{er} somitos torácicos) y el 4^o y 5^o somitos torácicos, que son libres y cilíndricos. Urosoma formado por el 6^o y 7^o somitos torácicos y por el somito anal. Ramas caudales con la seda V en posición apical, larga y espinulada en el ápice y 6 sedas más pequeñas, de las cuales 2 son ligeramente mayores.

Anténula de 4 artejos, 1º y 2º con 2 espinas cada uno y los 2 restantes con un número variable de elementos de ornamentación según la especie. Antena de 3 artejos: coxobase y endopodito de 2 artejos; coxobase y 1º segmento endopodal con 1 espina cada uno, parte distal del endopodito con forma de gancho y ornamentada con 4 elementos accesorios. Labrum con dos procesos dirigidos lateralmente. Labium circular, con dos áreas con numerosas sédulas. Mandíbula compuesta por una gnátobase corta que finaliza en una hoja dentada. Maxílula sólo detectada en los machos, formada por un pequeño esclerito fusionado a la base mandibular, que finaliza con 1 pequeña seda en el ápice. Maxila de 2 artejos, ornamentada por 1 seda y 1 espina en la alobase.

2º y 3º par de toracópodos birrámeos, de anatomía variable según la especie: reducidos o, por el contrario, bien desarrollados. Protopodito con 1 seda en su borde externo; endopodito representado por un lóbulo; exopodito de mayor tamaño y más alargado, con varios elementos de ornamentación en los bordes externo e interno. 4º par de toracópodos, si está presente, formado por un proceso cónico con una seda apical en las hembras y por un pequeño proceso sedoso en los machos.

Sacos ovígeros reniformes, unidos al genitoabdomen subterminalmente.



Lomanoticola* sp. nov.*DIAGNOSIS**

Dimorfismo sexual acentuado en cuanto a anatomía externa y dimensiones corporales: cuerpo de la hembra muy modificado, mientras que el cuerpo del macho es típicamente ciclopiforme y más pequeño. Hembra con 3 procesos laterales cortos y robustos. Anténula de 4 artejos (1º y 2º con 2 espinas cada uno), antena de 3 (1º y 2º artejo con 1 espina cada uno), labrum bilobulado, labium con dos áreas circulares con sédulas y dos paragnatos también con sédulas; mandíbulas con gnatobase falciforme y 4-5 procesos dentiformes, maxílula representada por un pequeño proceso sedoso y maxila con alobase ornamentada por 1 seda y 1 espina. 1º par de toracópodos (maxilípedo) ausente. 2º y 3º par de toracópodos bien desarrollados, birrámeos, endopodito de menor tamaño que el exopodito, 1 seda en el protopodito y numerosos elementos de ornamentación en el exopodito. 4º par de toracópodos unirrámeo, formado por un proceso cónico con una seda apical en las hembras y por un pequeño proceso sedoso en los machos. Un par de ramas caudales con las 7 sedas típicas, de las cuales la V es de mayor porte y con el ápice pinnado.

Hospedadores: *Cuthona caerulea*, *Eubranchus* sp., *Doto eireana*, *Doto fragilis*, *Doto koenneckeri*, *Doto lemchei* y *Doto pinnatifida*.

Material examinado: 48 hembras y 29 machos. Los parásitos encontrados en *Cuthona caerulea* y *Doto fragilis* no se incluyen en el estudio anatómico debido a que únicamente apareció infectado 1 ejemplar de cada especie y el copépodo resultó dañado durante la disección.

Serie tipo: 93 ejemplares. Holotipo: 1 hembra conservada en etanol 96°. Alotipo: 1 macho montado en una preparación de glicerina sobre un portaobjetos. Paratipos 1-8: 5 hembras y 3 machos montados en portaobjetos preparados para el SEM. Paratipos 9-19: 9 hembras y 2 machos montados en preparaciones de glicerina sobre portaobjetos. Paratipos 20-45: 15 hembras y 11 machos conservados en etanol 70°. Paratipos 46-56: 8 hembras y 3 machos conservados en líquido de Bouin. Paratipos 57-72: 8 hembras y 8 machos conservados en etanol 96°. Paratipos 73-75: 2 hembras y 1 macho conservados en formol 4% y teñidos con rosa de Bengala.

Holotipo, alotipo y paratipos 20-45 depositados en el Museo de Historia Natural de la Universidad de Santiago de Compostela (números de depósito en trámite). Los

paratipos 1-8, 9-19, 46-56, 52-72 y 73-75 permanecen en la EBMG en la colección personal del autor.

Localidad tipo: Ría de Ferrol.

DESCRIPCIÓN

HEMBRA

Segmentación (Fig. 46):

Animal de 0,9-1,6 mm de longitud. Cuerpo dividido en prosoma y urosoma. El prosoma es mucho más grande, sin segmentación aparente y se distingue una parte anterior y otra posterior. La anterior está formada por el cefalosoma y por el 2º y el 3º somitos torácicos, que presentan 3 pares de procesos laterales robustos (1 par en el 2º somito torácico y 2 en el 3º) que se van estrechando hacia el ápice, orientados de manera lateral excepto el 3º par, que lo hace de forma dorso-ventral (Fig. 45A, Fig. 47A). En la zona-dorso lateral del 3º somito torácico también presenta 1 o 2 pares de procesos posteriores, forma y tamaño variables en los diferentes especímenes estudiados. Parte posterior del prosoma cilíndrica, más estrecha que la anterior y compuesta por la fusión de los somitos torácicos 4º y 5º. Urosoma (Fig. 45B, Fig. 47B) de 2 somitos, comprende el 6º somito torácico y el genitoabdomen (fusión del somito genital y del 1º somito abdominal). Genitoabdomen ornamentado en su superficie con numerosas sédulas (Fig. 55). Aperturas genitales situadas en el genitoabdomen ventrolateralmente, con un par de sacos ovígeros reniformes anclados de manera subterminal. Ramas caudales bien diferenciadas, espatuladas, con 1 seda apical robusta (V) y 6 pequeñas sedas accesorias. Abertura anal situada entre las dos ramas caudales.

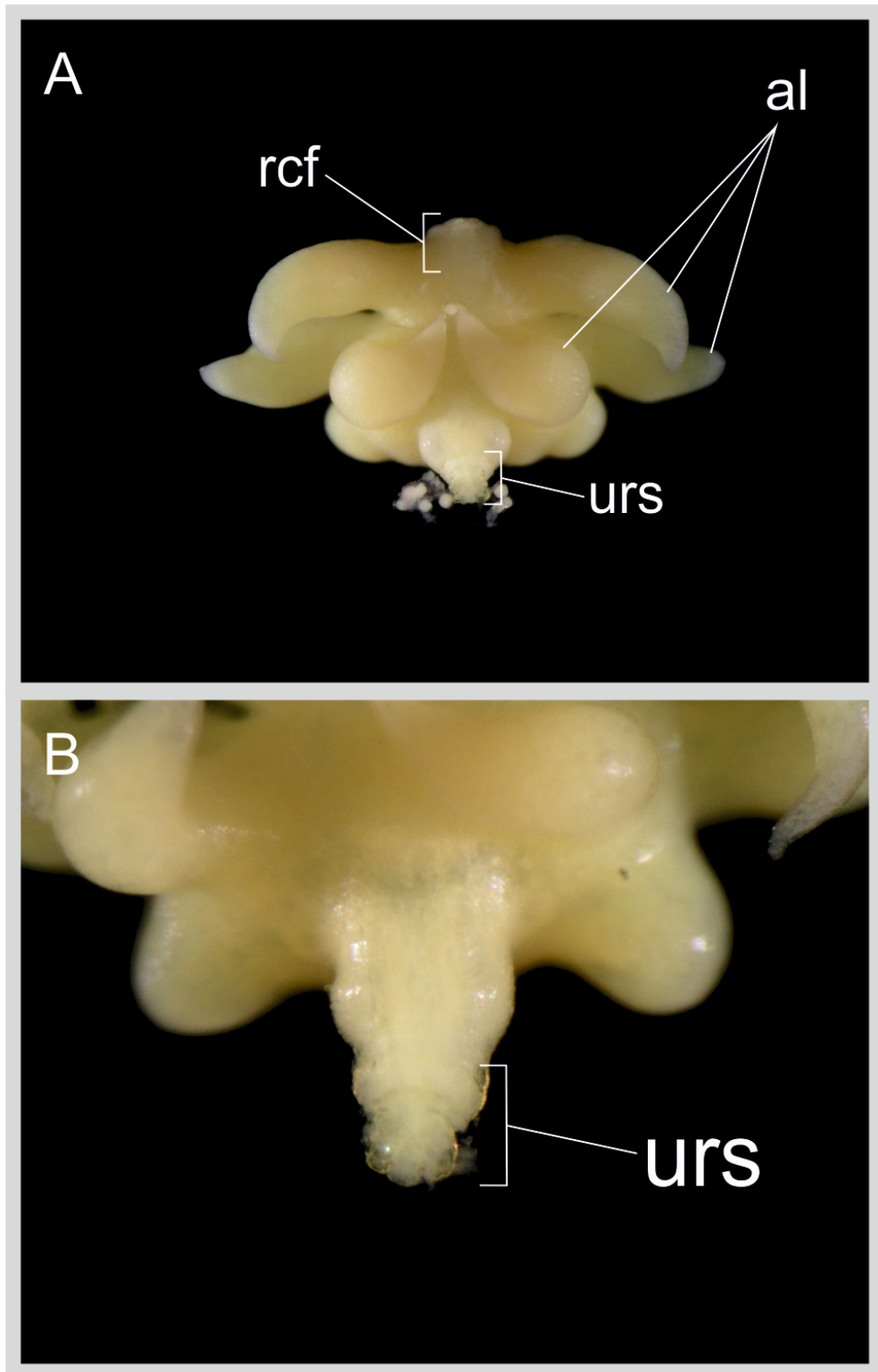


Figura 45. Hembra de *Lomanoticola* sp. nov. **A.** Vista ventral del cuerpo. **B.** Detalle del urosoma (al: apéndices laterales; rcf: región cefálica; urs: urosoma). Fotografías realizadas con el microscopio estereoscópico.

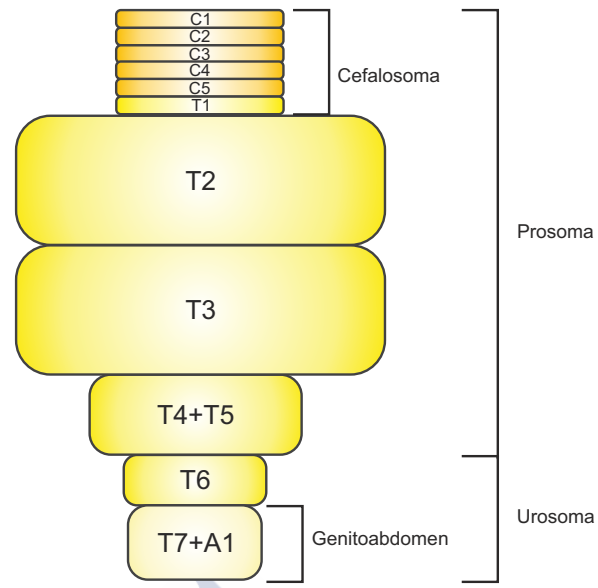


Figura 46. Esquema de la segmentación de la hembra de *Lomanoticola* sp. nov. El tamaño de las proporciones corporales no se corresponde con el real (A-: somito abdominal; C-: somito cefálico; T-: somito torácico).

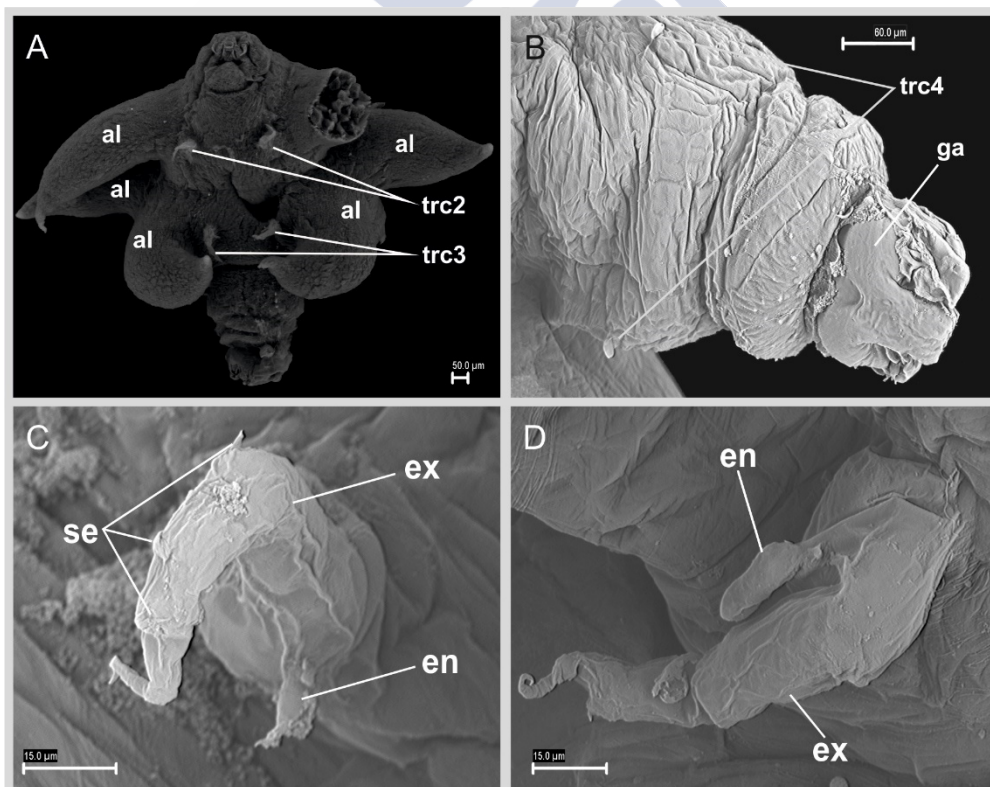


Figura 47. Hembra de *Lomanoticola* sp. nov. **A.** Vista ventral del cuerpo. **B.** Urosoma. **C.** 2º toracópodo. **D.** 3º toracópodo (al: apéndices laterales; en: endopodito; ex: exopodito; ga: genitoabdomen; se: sedas; trc: toracópodos). Fotografías realizadas al SEM.

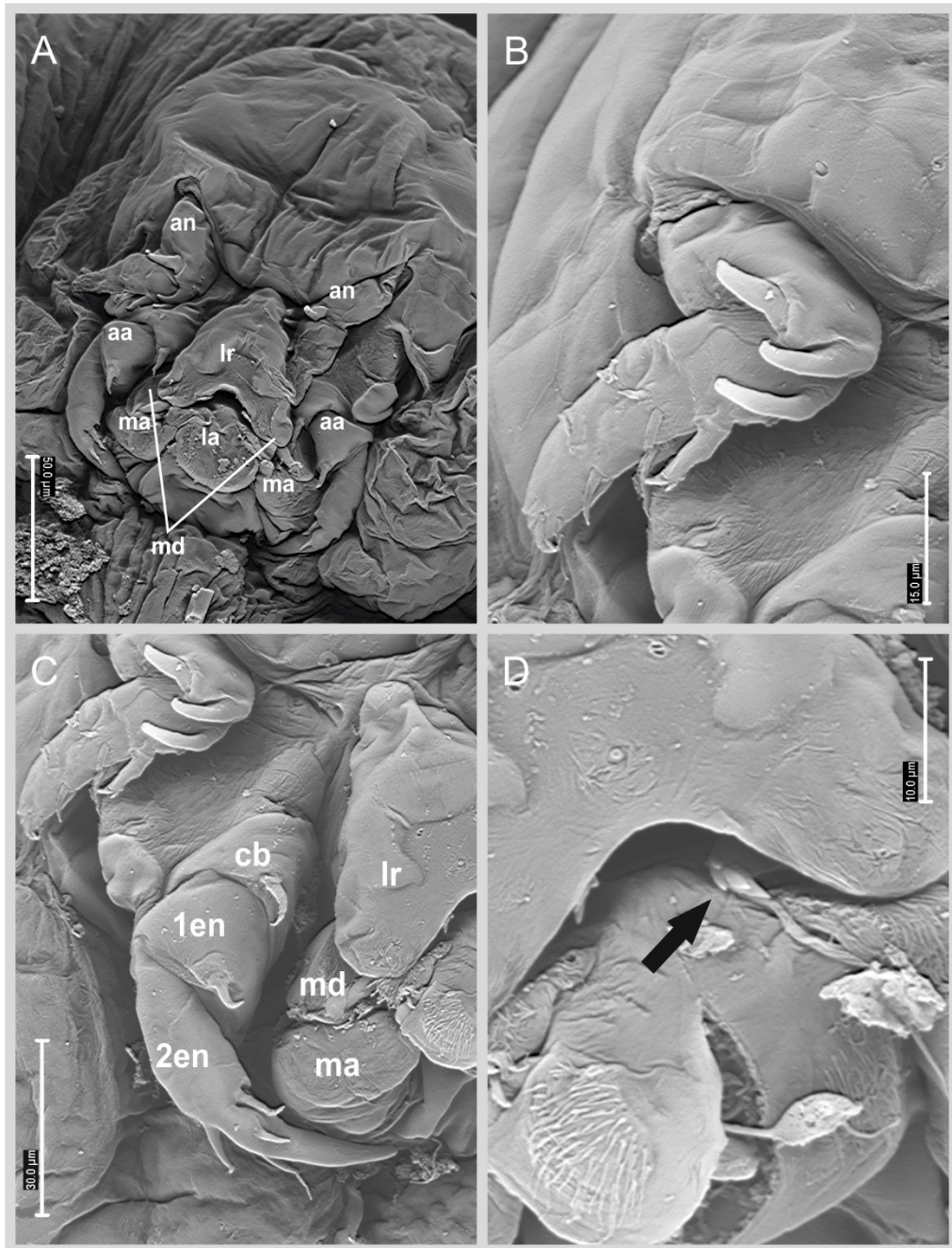


Figura 48. Hembra de *Lomanotica* sp. nov. **A.** Cefalosoma. **B.** Anténula. **C.** Antena. **D.** Detalle del ápice mandibular dentado (flecha negra) (aa: antena; an: anténula; cb: coxobase; 1en: 1^{er} artejo endopodal; 2en: 2^o artejo endopodal; la: labium; lr: labrum; ma: maxila; md: mandíbula). Fotografías realizadas al SEM.

Apéndices cefálicos (Fig. 48A):

Anténula con 4 artejos de segmentación poco marcada entre los artejos 2º, 3º y 4º; únicamente detectable por constricciones que indican la segmentación ancestral. 1º artejo con 2 espinas robustas recurvadas hacia el ápice, 2º artejo con 2 espinas (una robusta en la base y recurvada hacia el ápice, y otra más delgada y alargada en la parte distal) y una 1 larga en el borde externo de artejo. 3º artejo con 2 sedas pequeñas en la parte dorsal y 1 seda más larga en el borde externo. 4º artejo con 2 sedas cortas y 1 notoriamente más larga y ancha en la parte interna de la porción medial, finalizado por 8-12 sedas largas y delgadas situadas en posición apical (Fig. 48B, Fig. 49).

Antena falciforme con 3 artejos, que se corresponden con la coxobase y con el endopodito, de 2 artejos. Coxobase con 1 espina robusta y pinnada; artejo proximal del endopodito también con 1 espina robusta pero de menor porte que la de la coxobase; artejo distal del endopodito (3º artejo de la antena) recurvado, lo que le confiere al apéndice su aspecto falciforme. Este artejo presenta 4 elementos de ornamentación: 1 espina en el borde externo, 2 sedas alargadas en la superficie dorsal (una a la altura de la espina del borde externo y la otra más distal), y 1 seda más fina y larga en el borde externo orientada tangencialmente a la curvatura de la antena. Presenta 2 orificios en el borde interno de la porción distal del 3º artejo (uno de ellos en la base de una de las sedas) (Fig. 48C, Fig. 50).

Labrum con dos abultamientos dirigidos lateralmente, sin ornamentación (Fig. 48A, Fig. 51).

Labium circular, con dos áreas circulares recubiertas de sédulas de pequeño porte. Un par de paragnatos en la parte superior, también con sédulas (Fig. 48A, Fig. 51).

Mandíbula recorrida en la zona media por una línea algo más elevada que la superficie del apéndice; gnatobase pequeña, recurvada apicalmente y con 4 ó 5 procesos dentiformes (Fig. 48D, Fig. 51).

Maxílula no observada.

Maxila con 2 artejos: sincoxa (fusión de la precoxa y del coxopodito) ancha y sin ornamentación; alobase (fusión del basipodito y del primer segmento endopodal) pequeña, con 1 espina y 1 seda que se va estrechando hacia el ápice (Fig. 48A, Fig. 51).

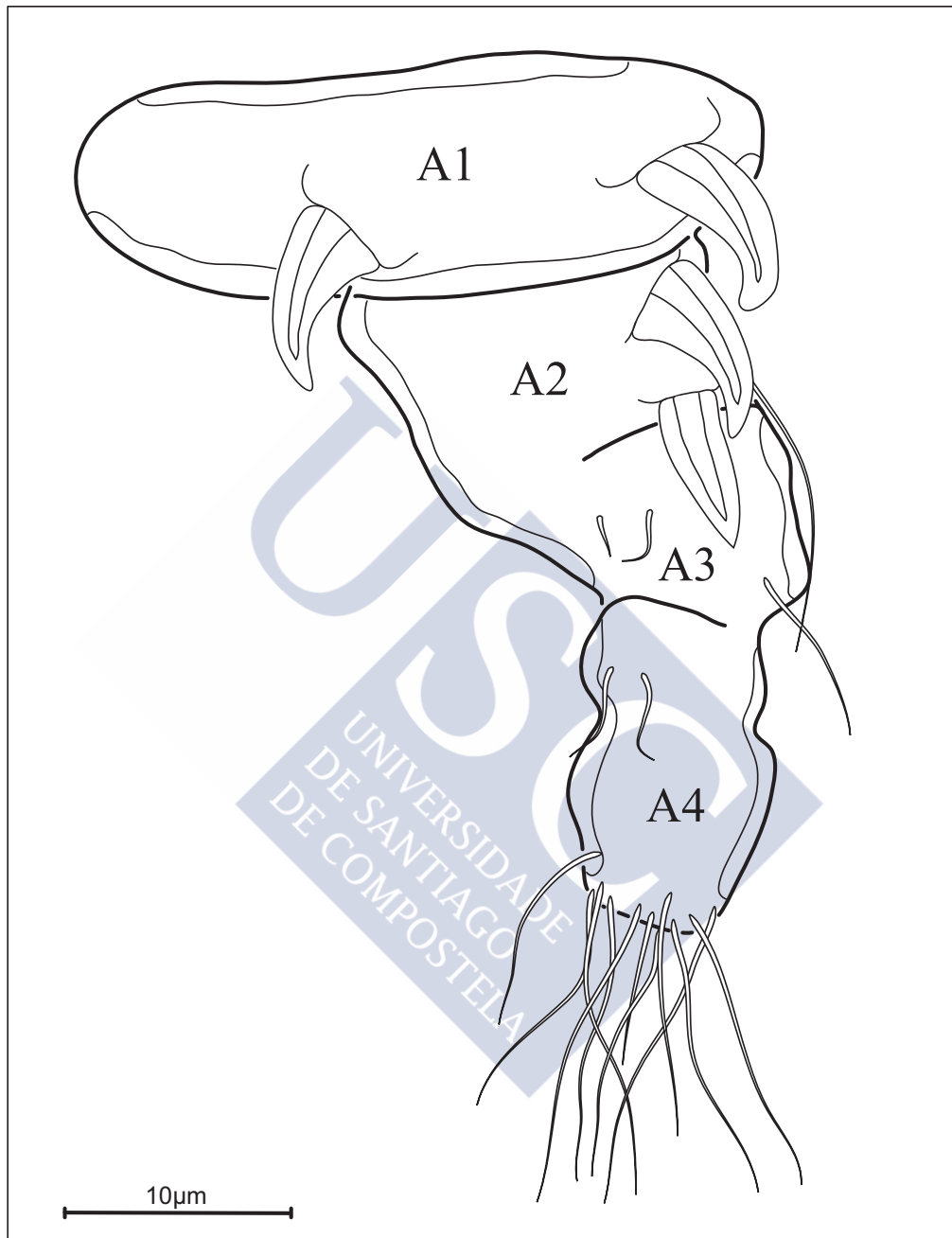


Figura 49. Anténula izquierda de la hembra de *Lomanoticola* sp. nov. (A-: artejo de la anténula).

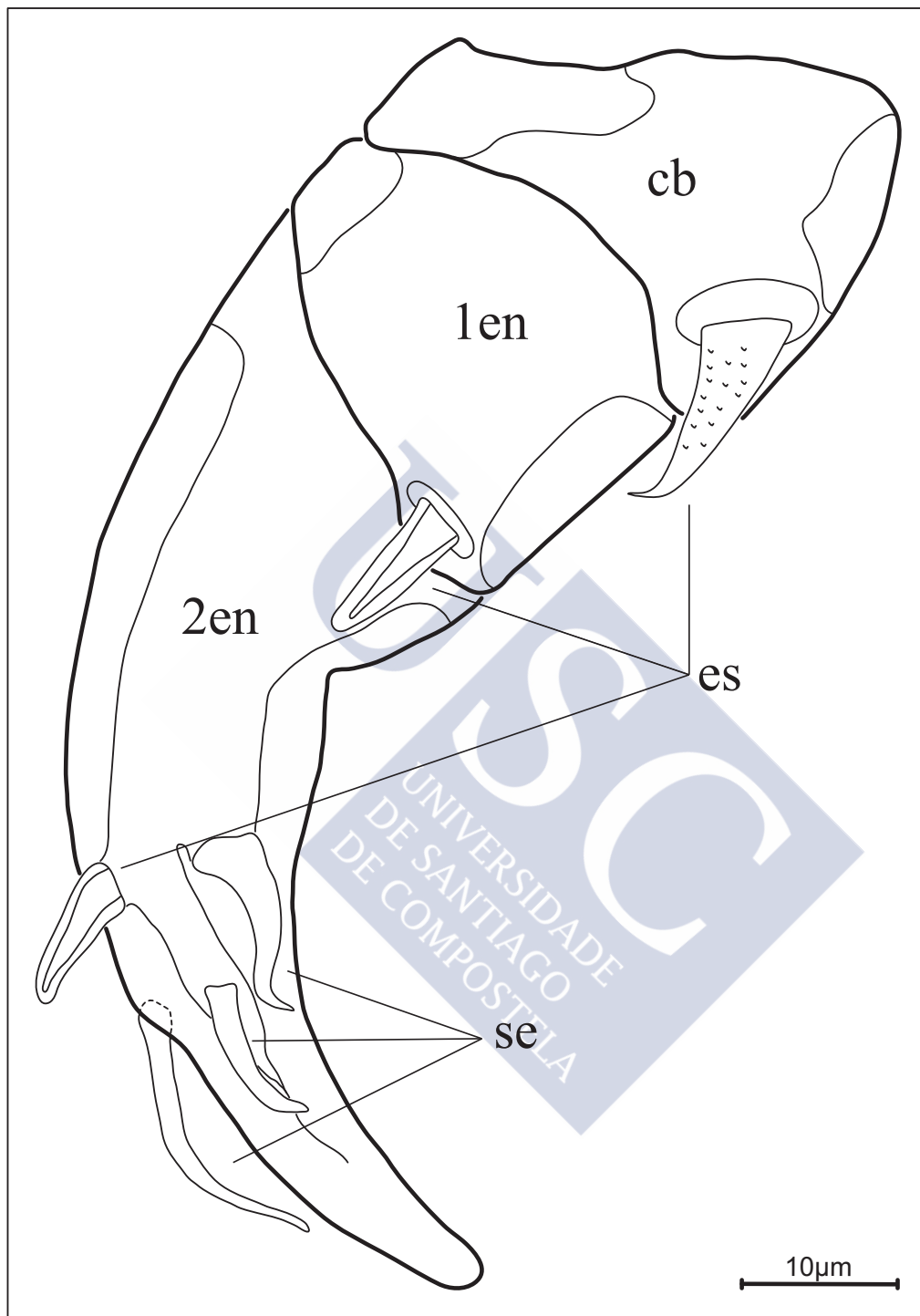


Figura 50. Antena derecha de la hembra de *Lomanoticola* sp. nov. (cb: coxobase; en: artejo endopodal es: espina; se: seda).

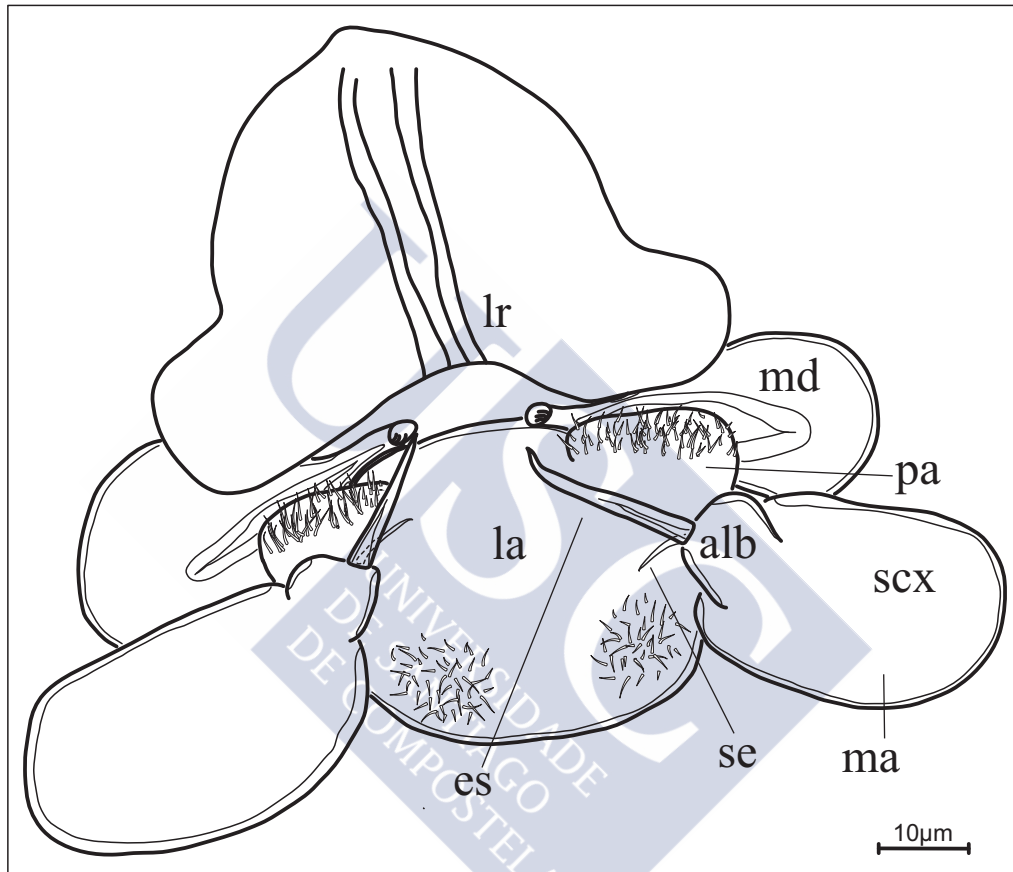


Figura 51. Piezas bucales de la hembra de *Lomanotocola* sp. nov. (alb: alobase; es: espina; la: labium; lr: labrum; ma: maxila; md: mandíbula; pa: paragnato; scx: sincoxa; se: seda).

Toracópodos:

1^{er} par de toracópodos ausente.

2^o par de toracópodos birrámeo. Endopodito mucho menor que el exopodito, con apariencia espinosa y finalizado con 1 pequeña espina apical. Exopodito con dos constricciones: una en la parte medial y otra en la distal; la parte distal se va estrechando y recurvando apicalmente en forma de gancho. La ornamentación consta de 1 seda muy desarrollada en el borde externo del protopodito y 3 sedas pequeñas en el borde externo del exopodito, 1 en la zona medial y 2 en la zona distal (Fig. 47C, Fig. 52).

3^{er} par de toracópodos birrámeo. Endopodito mucho más pequeño que el exopodito, pero de mayor tamaño que el endopodito del 2^o par de toracópodos. Exopodito con ornamentación formada por 1 seda en el protopodito (más pequeña que la del 2^o toracópodo), 3 pequeñas sedas de apariencia espinosa en el borde externo del exopodito y 1 seda más pequeña que las anteriores en el borde interno, a la altura de la 2^a espina del borde externo (Fig. 47D, Fig. 53).

4^o par de toracópodos representado por un proceso cónico con 1 seda apical (Fig. 47B, Fig. 54).

Ramas caudales (Fig. 55):

Ramas caudales pequeñas y robustas, entre las que se encuentra la abertura anal. Seda V mucho más larga que las demás y espatulada, con el ápice pinnado. Seda VII también bien desarrollada, con $\frac{1}{4}$ de la longitud de la V, se dirige hacia el margen interior. El resto de sedas, situadas en la parte dorsal, son pequeñas y en algún caso de apariencia espinosa.

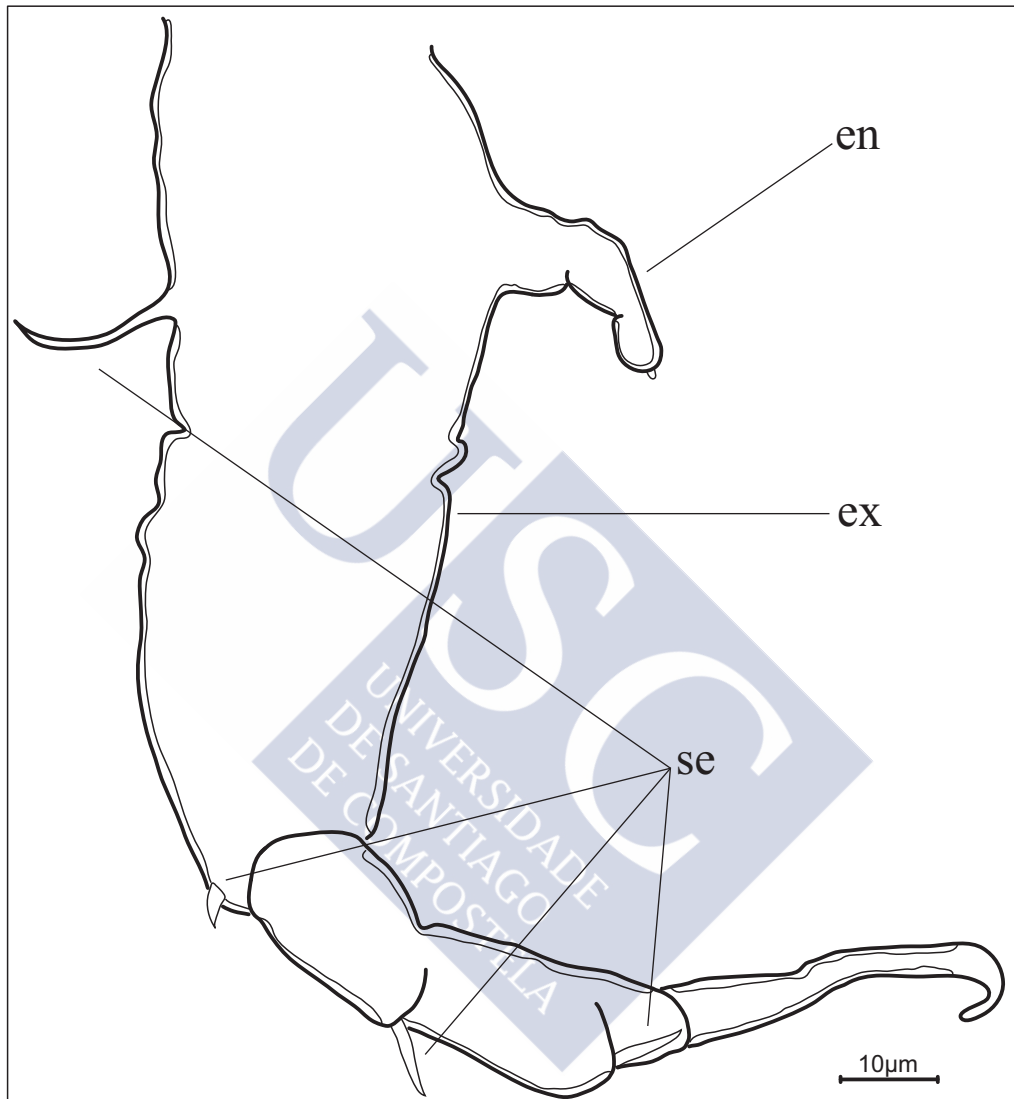


Figura 52. 2º toracópodo derecho de la hembra de *Lomanotocola* sp. nov. (en: endopodito; ex: exopodito; se: seda).

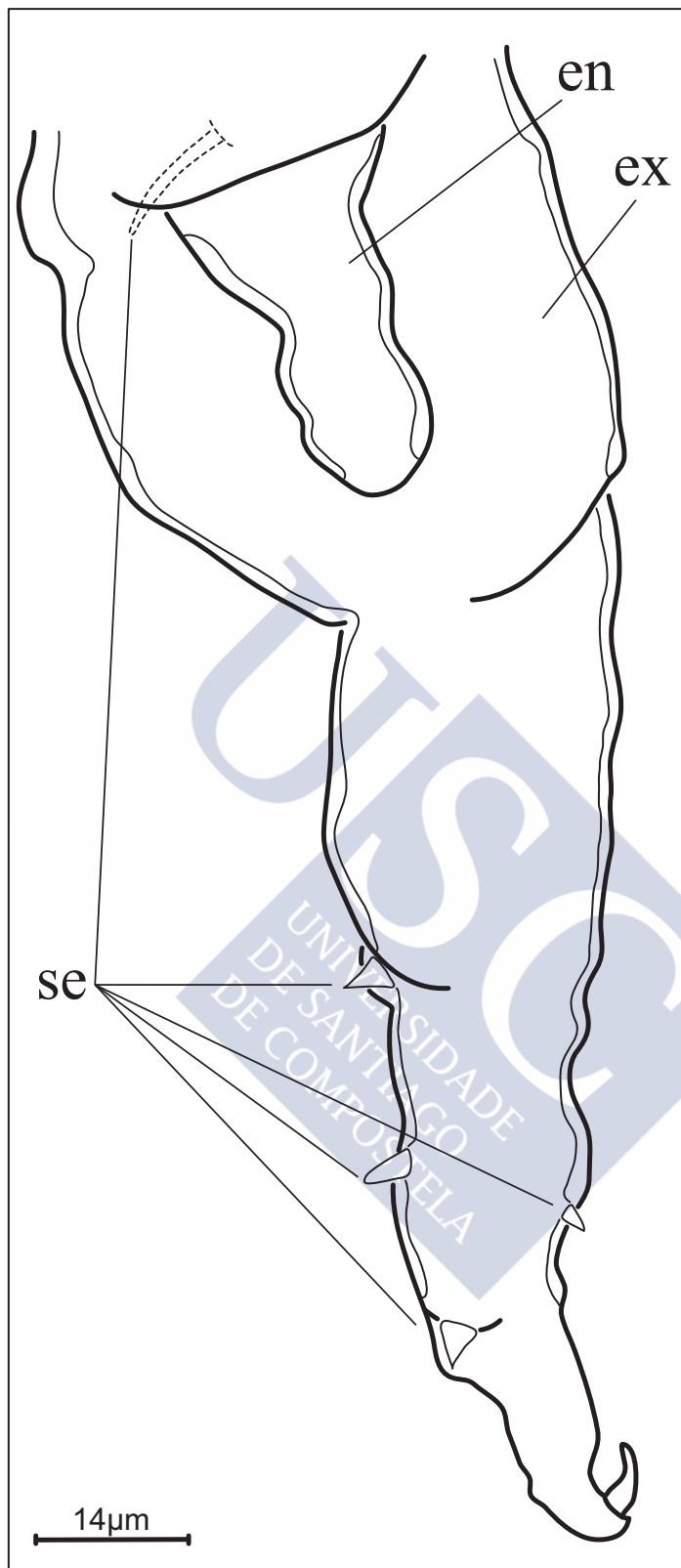


Figura 53. 3^{er} toracópodo derecho de la hembra de *Lomanotocola* sp. nov. (en: endopodito; ex: exopodito; se: seda).

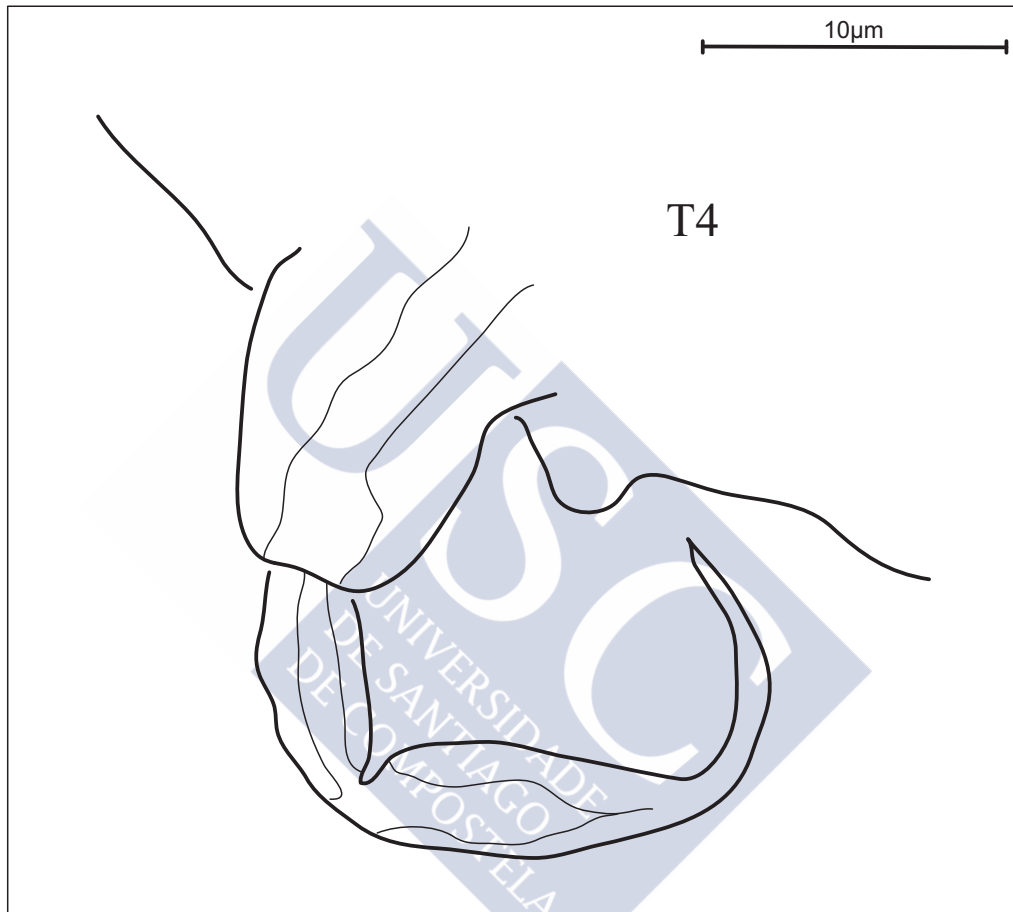


Figura 54. 4º toracópodo derecho de la hembra de *Lomanotocola* sp. nov. (T4: 4º somito torácico).

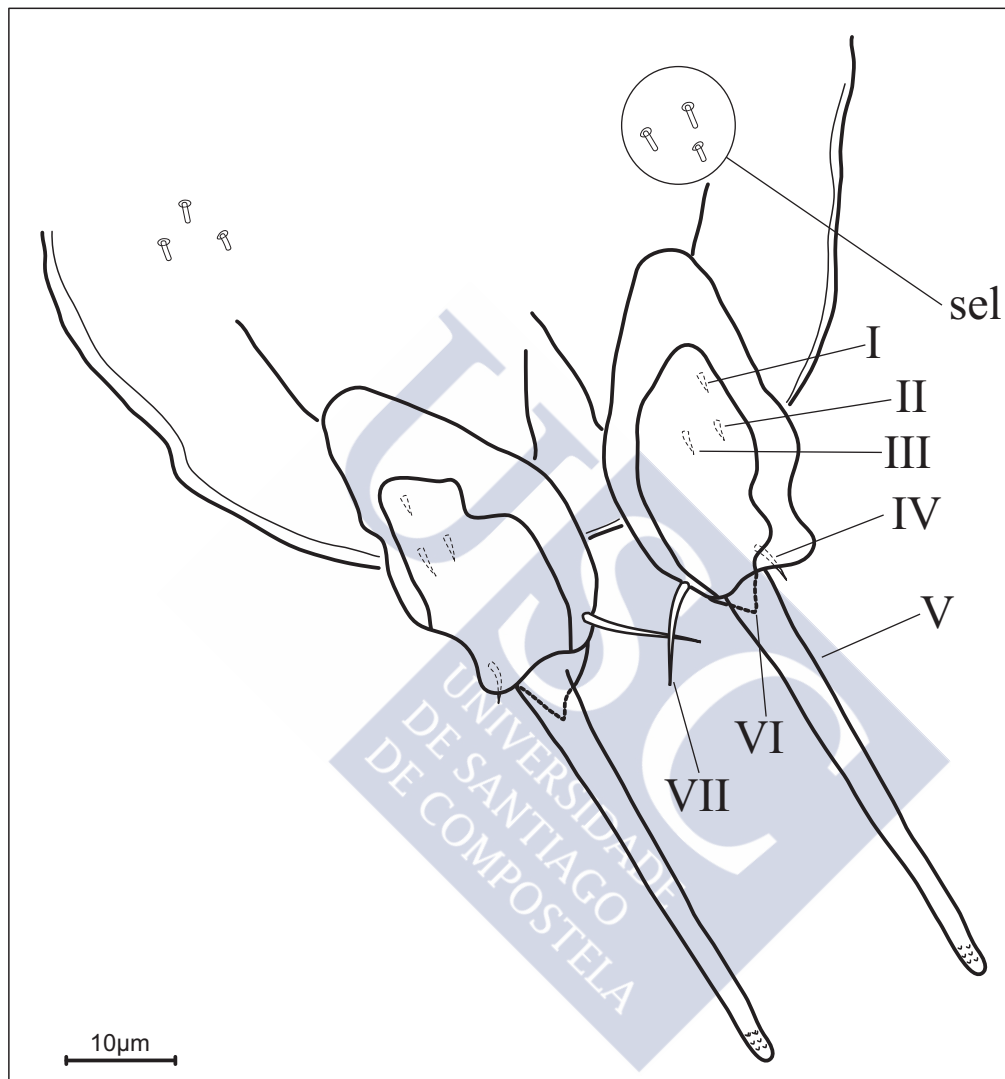


Figura 55. Vista ventral de las ramas caudales de la hembra de *Lomanotocola* sp. nov. (I-VII: sedas de las ramas caudales; sel: sédulas).

MACHO**Segmentación (Fig. 56):**

Animal ciclopiforme, de 0,4-0,6 mm de longitud (Fig. 57A). Cefalotórax formado por el cefalosoma y por el 2º y el 3º somito torácicos. 4º y 5º somitos torácicos libres y cilíndricos. Urosoma de 3 somitos: 6º torácico, somito genital y somito anal. Somito genital (7º somito torácico) cóncavo, con un par de opérculos genitales en cada extremo de la curvatura marcados por 2 sedas pequeñas cada uno (Fig. 57D, Fig. 65). Somito anal (1º somito abdominal) ornamentado por numerosas sédulas en su superficie (Fig. 65). Ramas caudales similares a las de la hembra, pero con la seda V de mayor tamaño.

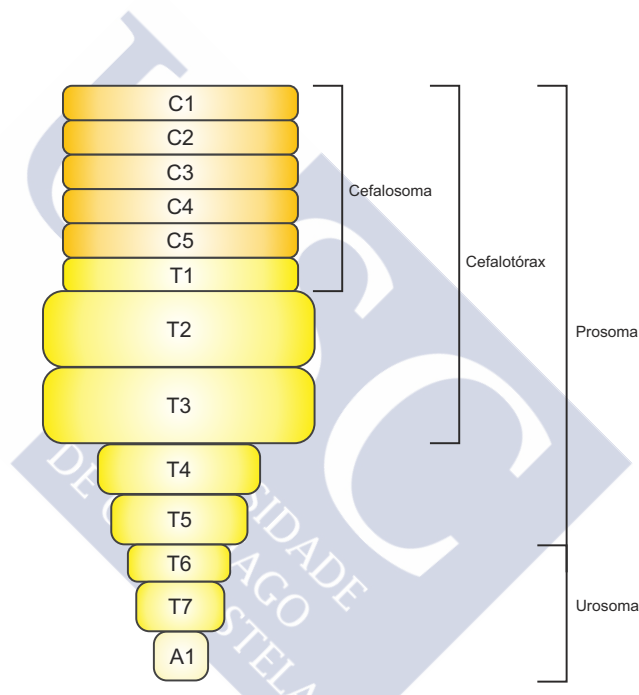


Figura 56. Esquema de la segmentación del macho de *Lomanoticola* sp. nov. El tamaño de las proporciones corporales no se corresponde con el real (A-: somito abdominal; C-: somito cefálico; T-: somito torácico).

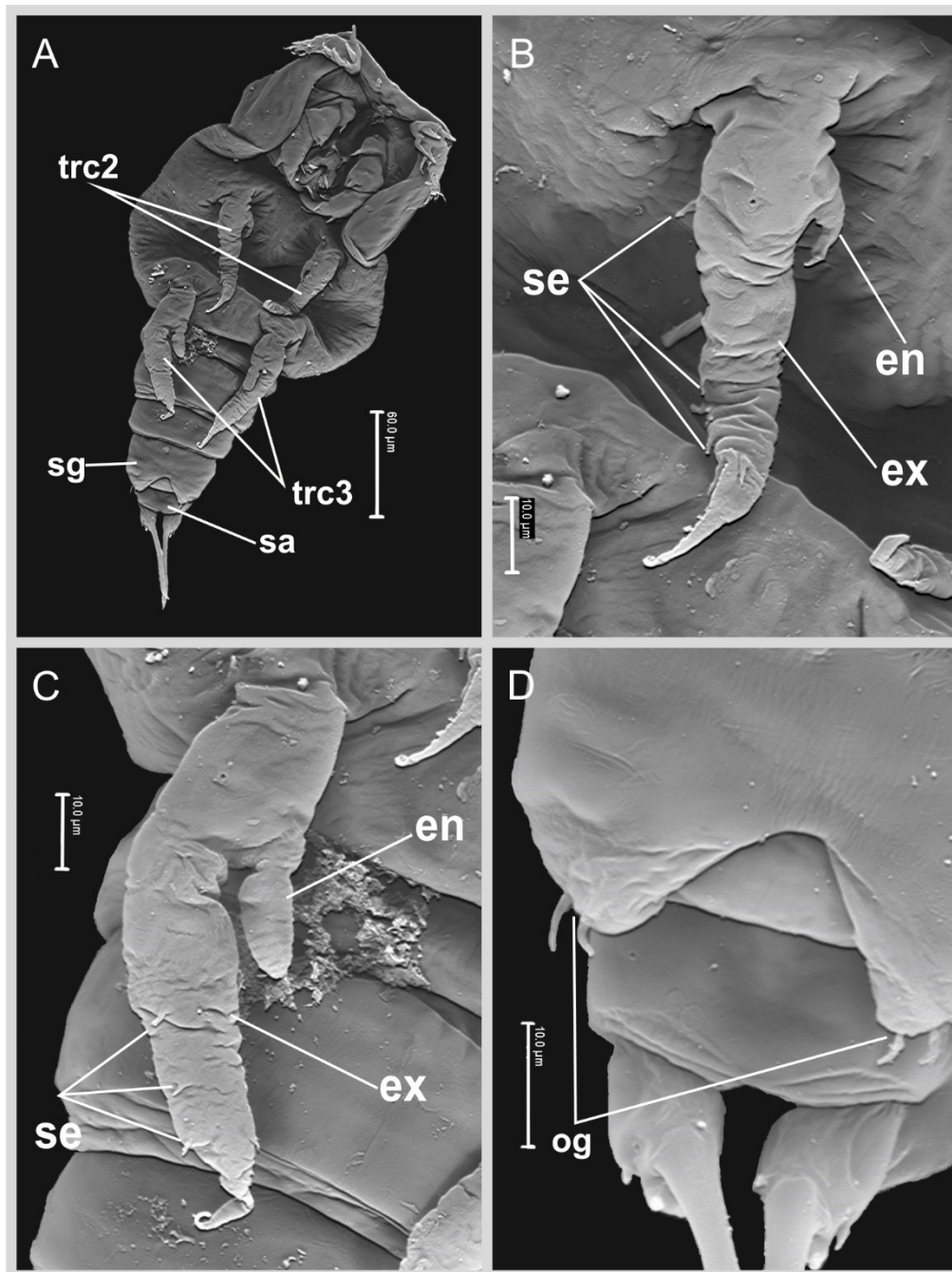


Figura 57. Macho de *Lomanotocola* sp. nov. **A.** Vista ventral del animal. **B.** 2º toracópodo. **C.** 3º toracópodo. **D.** Somito genital (en: endopodito; ex: exopodito; og: opérculo genital; sa: somito anal; se: sedas; sg: somito genital; trc: toracópodos). Fotografías realizadas al SEM.

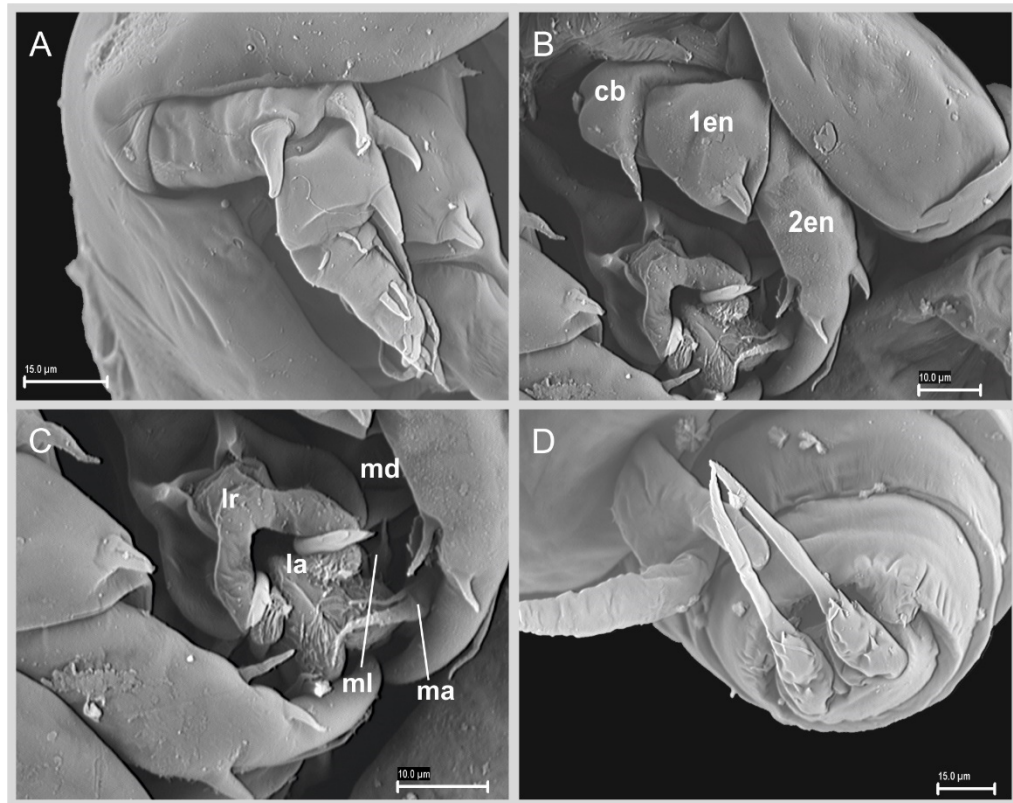


Figura 58. Macho de *Lomanoticola* sp. nov. **A.** Anténula. **B.** Antena. **C.** Piezas bucales. **D.** Ramas caudales, vista dorsal (aa: antena; an: anténula; cb: coxobase; 1en: 1^{er} artejo endopodal; 2en: 2^o artejo endopodal; la: labium; lr: labrum; ma: maxila; md: mandíbula; ml: maxílula). Fotografías realizadas al SEM.

Apéndices cefálicos (Fig. 58A-C):

Anténula muy similar a la de la hembra y formada por 4 artejos de segmentación poco marcada entre los artejos 2º, 3º y 4º; únicamente detectable por constricciones que indican la segmentación ancestral. 1º artejo con 2 espinas robustas recurvadas hacia el ápice, 2º artejo con 2 espinas (una robusta en la base y recurvada hacia el ápice, y otra más delgada y alargada en la parte distal) y 1 seda larga en el borde externo de artejo. 3º artejo con 2 sedas pequeñas en la parte dorsal y 1 seda más larga en el borde externo. 4º artejo con 2 sedas cortas y 1 notoriamente más larga y ancha en la parte interna de la porción medial y en una posición más apical que en el caso de la hembra, finalizado por 8-12 sedas largas y delgadas situadas en posición apical (Fig. 58A, Fig. 59).

Antena igual a la de la hembra: falciforme con 3 artejos, que se corresponden con la coxobase y con el endopodito, de 2 artejos. Coxobase con 1 espina robusta y pinnada; artejo proximal del endopodito también con 1 espina robusta pero de menor porte que la de la coxobase; artejo distal del endopodito (3º artejo de la antena) recurvado, lo que le confiere al apéndice su aspecto falciforme. Este artejo presenta 4 elementos de ornamentación: 1 espina en el borde externo, 2 sedas alargadas en la superficie dorsal (una a la altura de la espina del borde externo y la otra más distal), y 1 seda más fina y larga en el borde externo orientada tangencialmente a la curvatura de la antena. Presenta 2 orificios en el borde interno de la porción distal del 3º artejo (uno de ellos en la base de una de las sedas) (Fig. 58B, Fig. 60).

Labrum con dos abultamientos dirigidos lateralmente, sin ornamentación (Fig. 58C, Fig. 61).

Labium con un surco central y dos áreas circulares recubiertas de sédulas de pequeño porte. Un par de paragnatos en la parte superior, también con sédulas. (Fig. 58C, Fig. 61).

Mandíbula recorrida en la zona media por una línea algo más elevada que la superficie del apéndice; gnatobase pequeña, recurvada apicalmente y con 4 ó 5 procesos dentiformes (Fig. 58C, Fig. 61).

Maxílula representada por un pequeño proceso setiforme fusionado a la gnatobase mandibular (Fig. 58C).

Maxila con dos artejos: sincoxa (fusión de la precoxa y del coxopodito) ancha y sin ornamentación; alobase (fusión del basipodito y del primer segmento endopodal) pequeña, con 1 espina y 1 seda que se va estrechando hacia el ápice (Fig. 58C, Fig. 61).

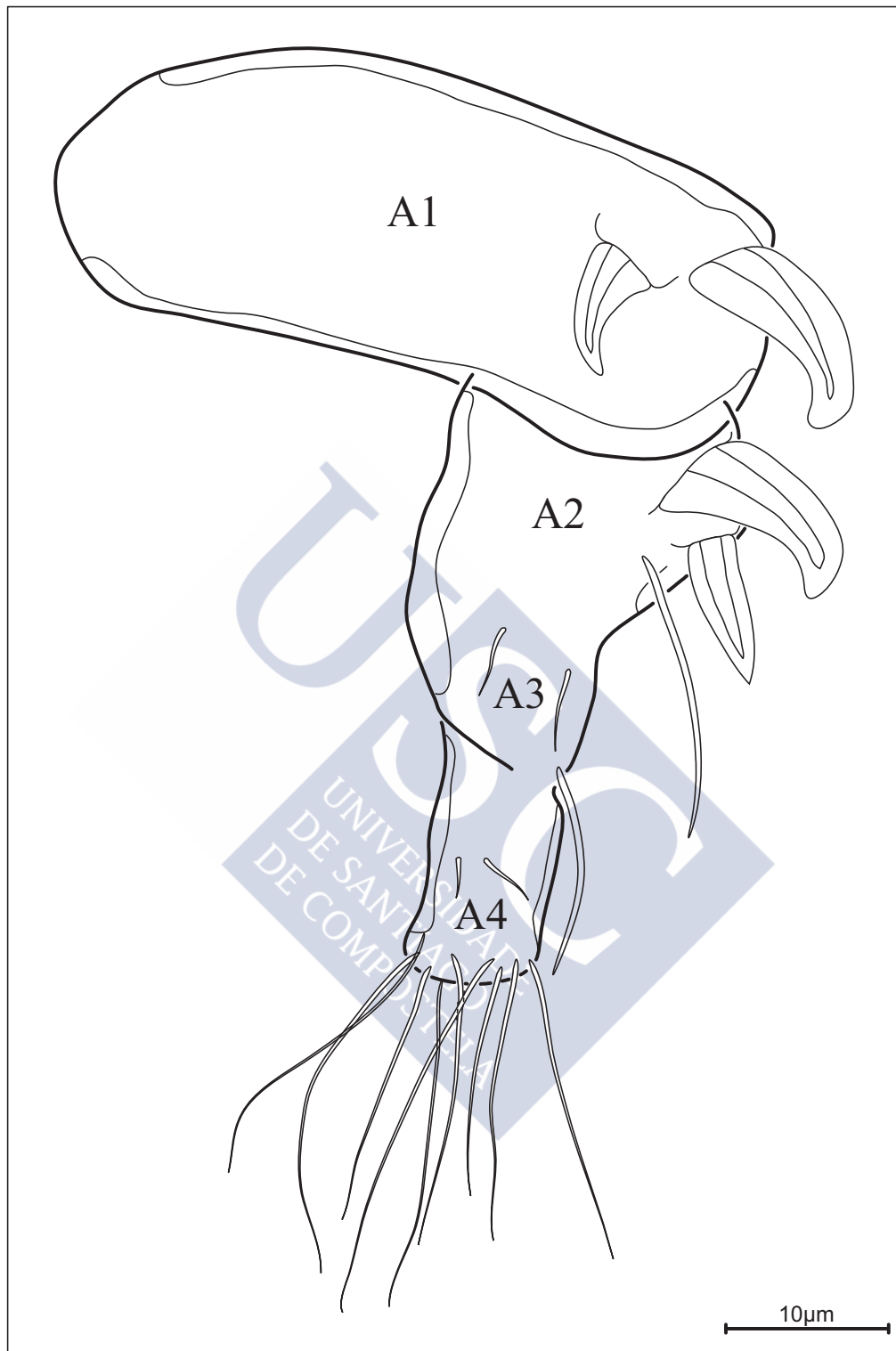


Figura 59. Anténula izquierda del macho de *Lomanoticola* sp. nov. (A-: artejo de la anténula).

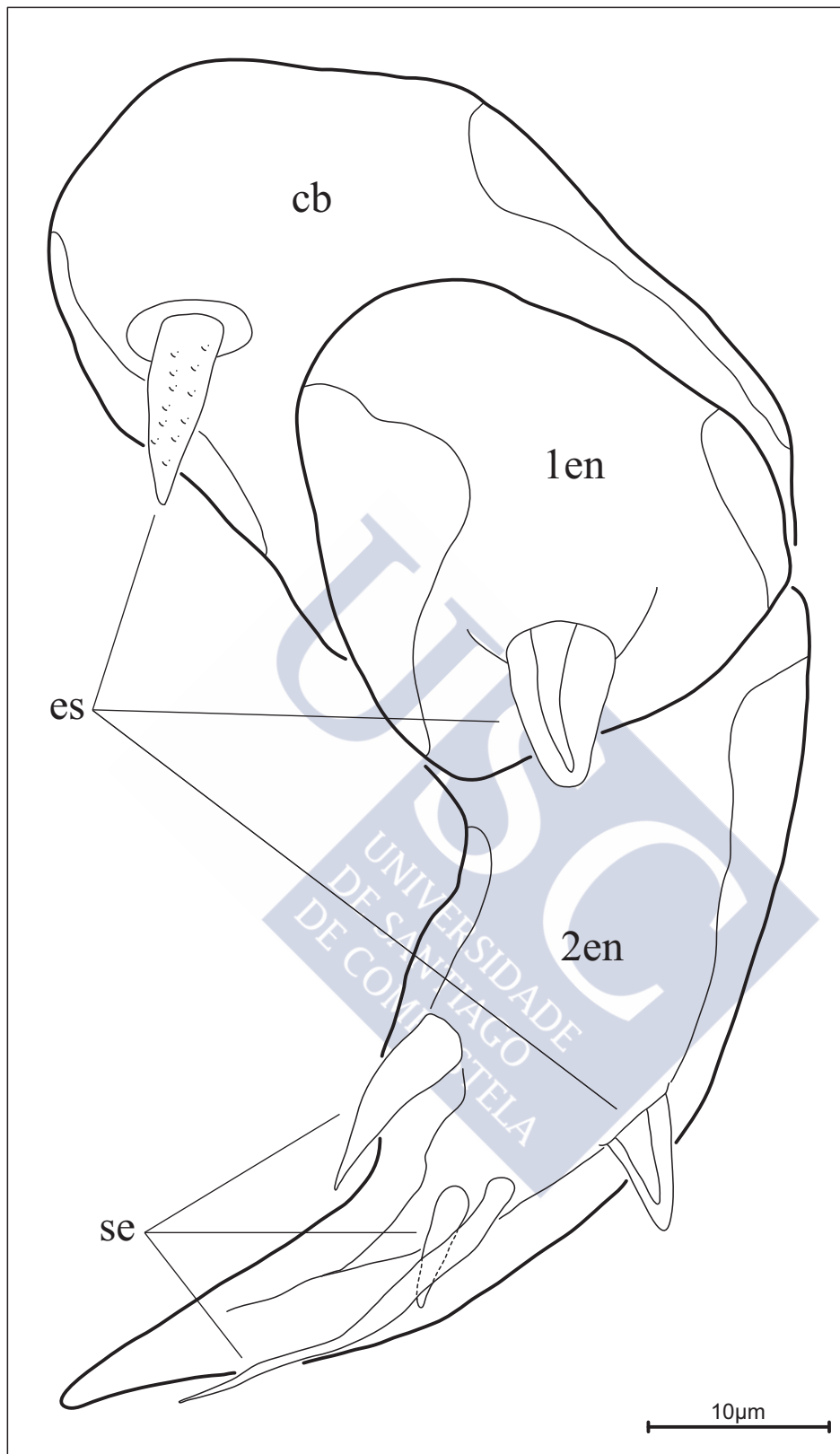


Figura 60. Antena izquierda del macho de *Lomanotocola* sp. nov. (cb: coxobase; en: artejo endopodal; es: espina; se: seda).

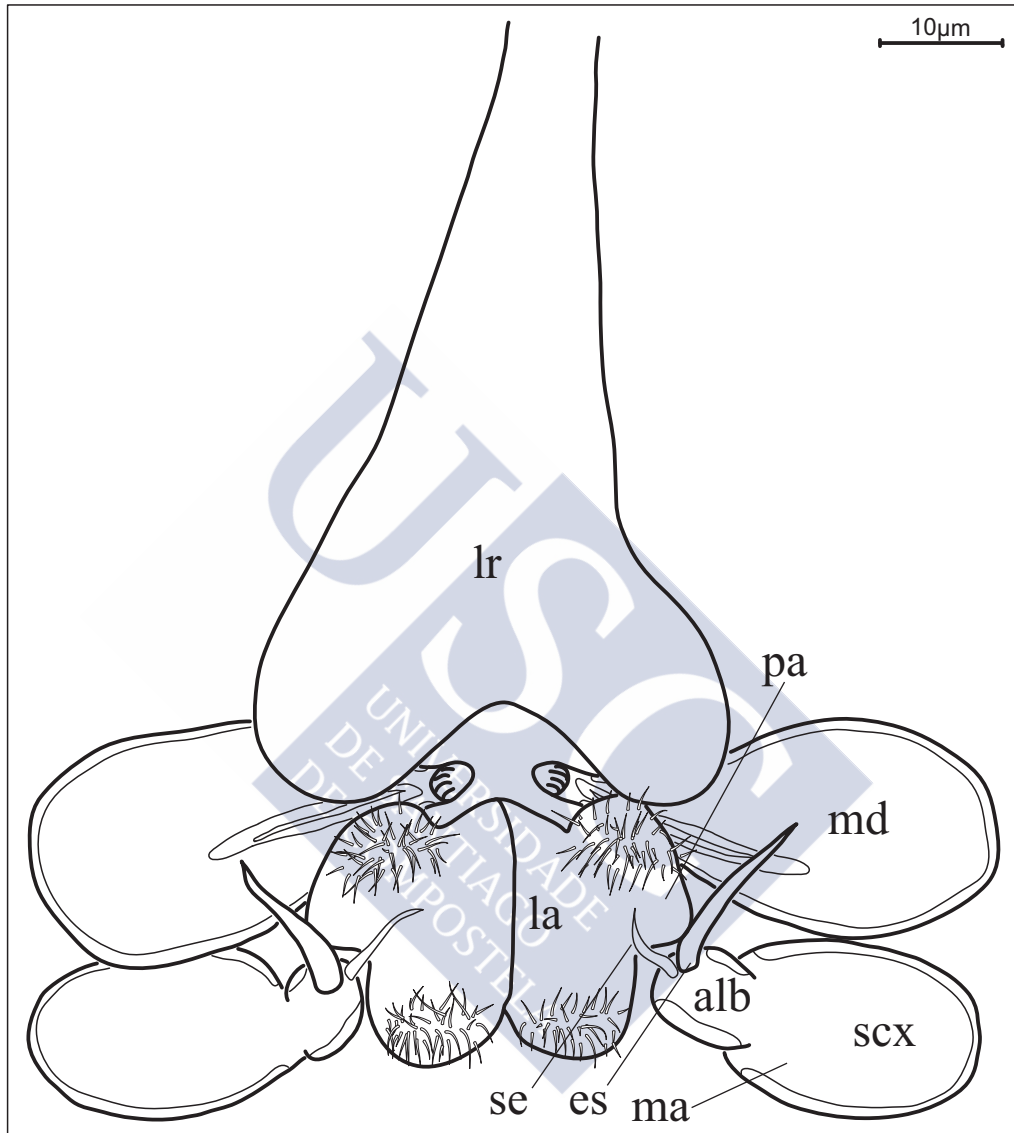


Figura 61. Piezas bucales del macho de *Lomanotocola* sp. nov. (alb: alobase; es: espina; la: labium; lr: labrum; ma: maxila; md: mandíbula; pa: paragnato; scx: sincoxa; se: seda).

Toracópodos:

1^{er} par de toracópodos ausente.

2^o par de toracópodos birrámeo, muy similar al de la hembra. Endopodito mucho menor que el exopodito, con apariencia espinosa y finalizado con 1 pequeña espina apical. Exopodito con 2 constricciones: una en la parte media, menos marcada que la de la hembra, y otra en la distal; la parte distal se va estrechando y recurvando apicalmente en forma de gancho. La ornamentación consta de 1 seda muy desarrollada en el borde externo del protopodito y 3 sedas pequeñas en el borde externo del exopodito, 1 en la zona medial y 2 en la zona distal (Fig. 57B, Fig. 62).

3^{er} par de toracópodos birrámeo. Endopodito mucho más pequeño que el exopodito, pero de mayor tamaño que el endopodito del 2^o par de toracópodos. Exopodito con ornamentación formada por 1 seda en el protopodito (más pequeña que la del 2^o toracópodo), 3 pequeñas sedas de apariencia espinosa en el borde externo del exopodito y 1 seda más pequeña que las anteriores en el borde interno, a la altura de la 2^a espina del borde externo. Como se puede observar, la estructura de este apéndice es igual a la de la hembra, diferenciándose únicamente en el protopodito, más largo en el macho (Fig. 57C, Fig. 63).

4^o par de toracópodos más simple que en caso de la hembra, representado por un pequeño proceso sedoso en el borde externo del 4^o somito torácico (Fig. 64).

Ramas caudales (Fig. 58D, Fig. 65):

Iguals a las de la hembra, con la apertura anal entre ellas. Son pequeñas y robustas, la seda V es mucho más larga que las demás y espatulada, con el ápice pinnado. Seda VII también bien desarrollada, con $\frac{1}{4}$ de la longitud de la V, se dirige hacia el margen interior. El resto de sedas, situadas en la parte dorsal, son pequeñas y en algún caso de apariencia espinosa. La única diferencia entre ambos sexos se encuentra en la seda V, que en el caso del macho está más desarrollada y más profusamente espinulada en el ápice.

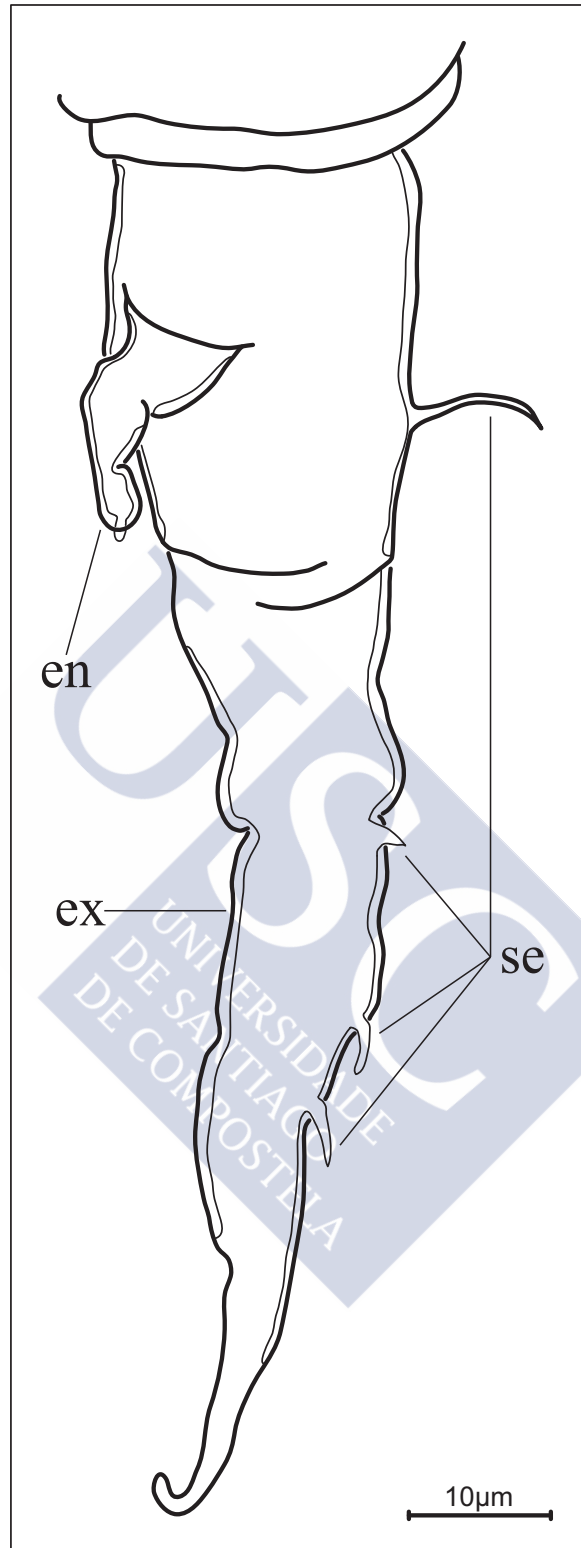


Figura 62. 2º toracópodo izquierdo del macho de *Lomanotocola* sp. nov. (en: endopodito; ex: exopodito; se: seda).

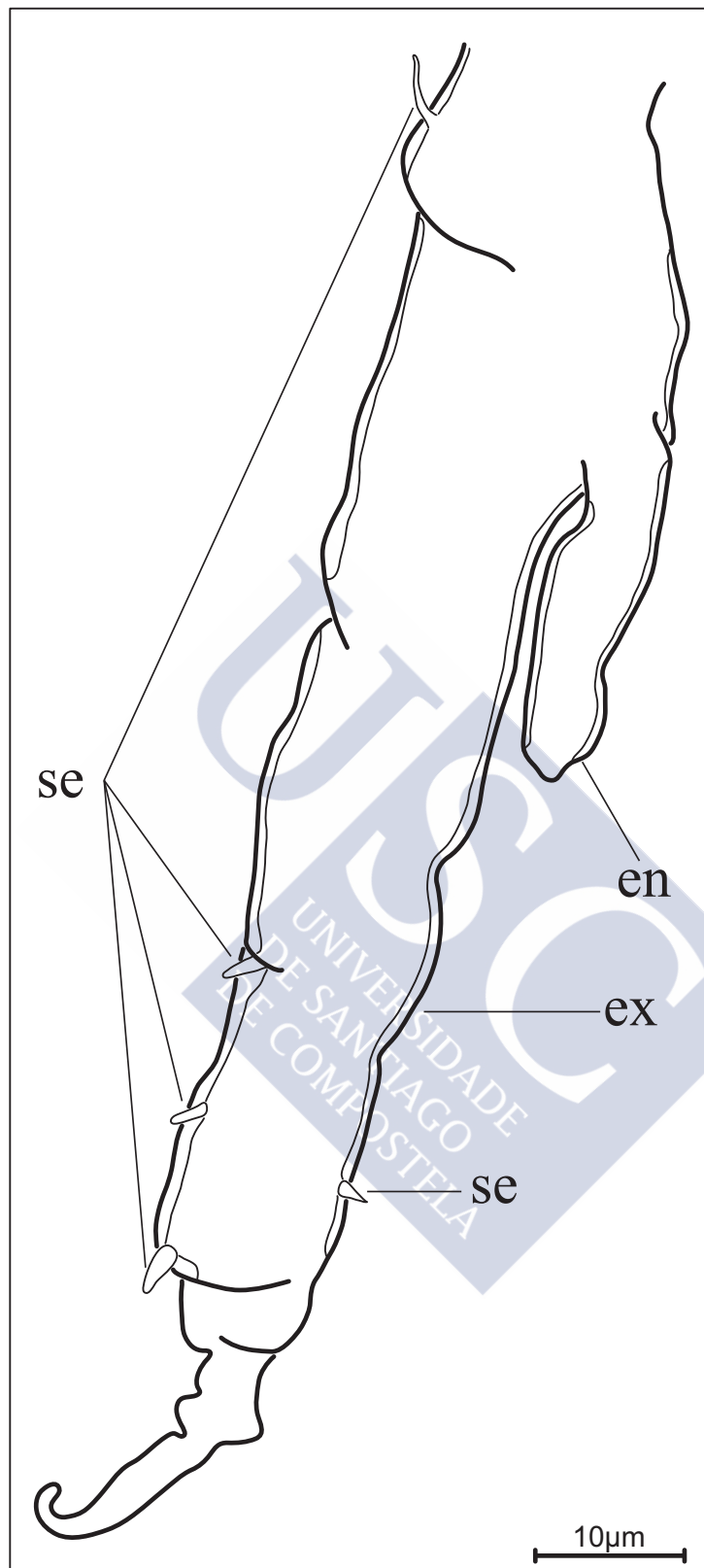


Figura 63. 3^{er} toracópodo derecho del macho de *Lomanotocola* sp. nov. (en: endopodito; ex: exopodito; se: seda).

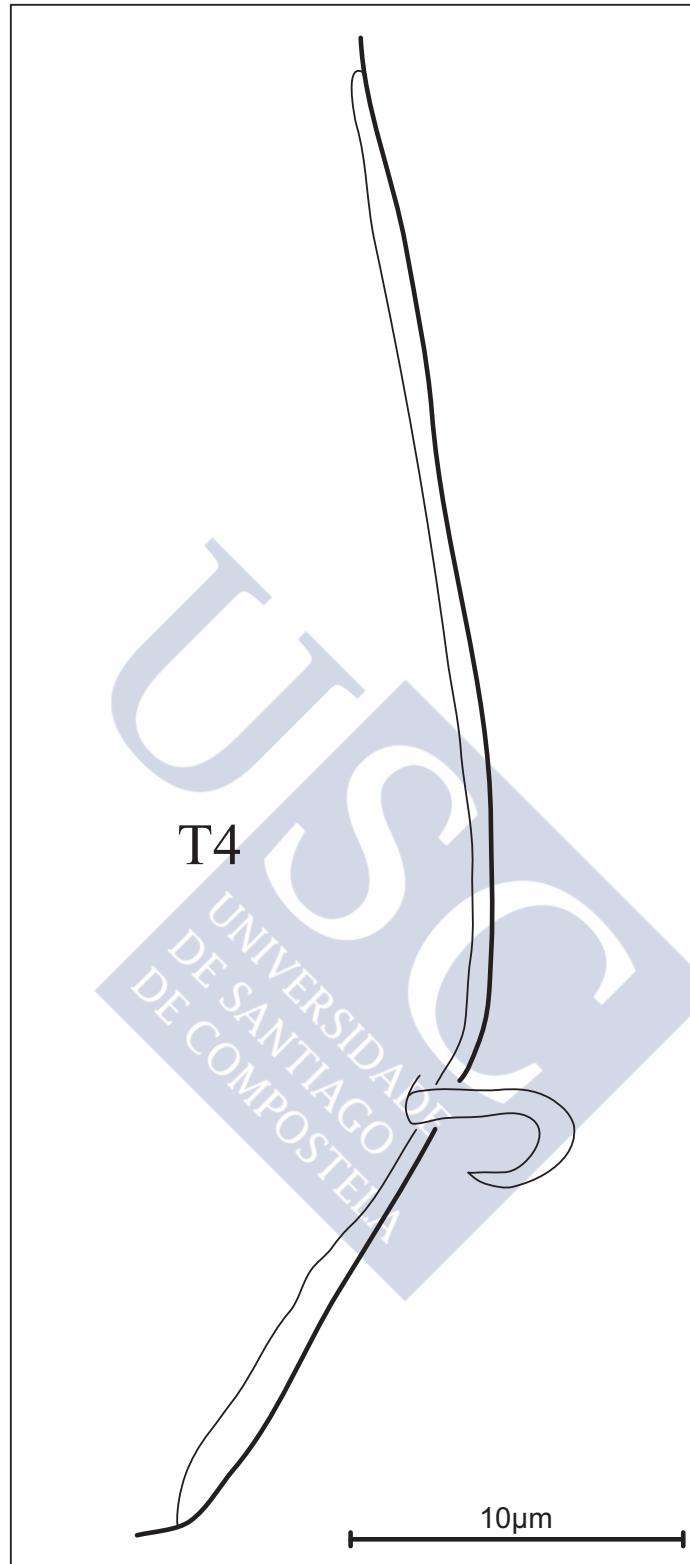


Figura 64. 4º toracópodo izquierdo del macho de *Lomanotocola* sp. nov. (T4: 4º somito torácico).

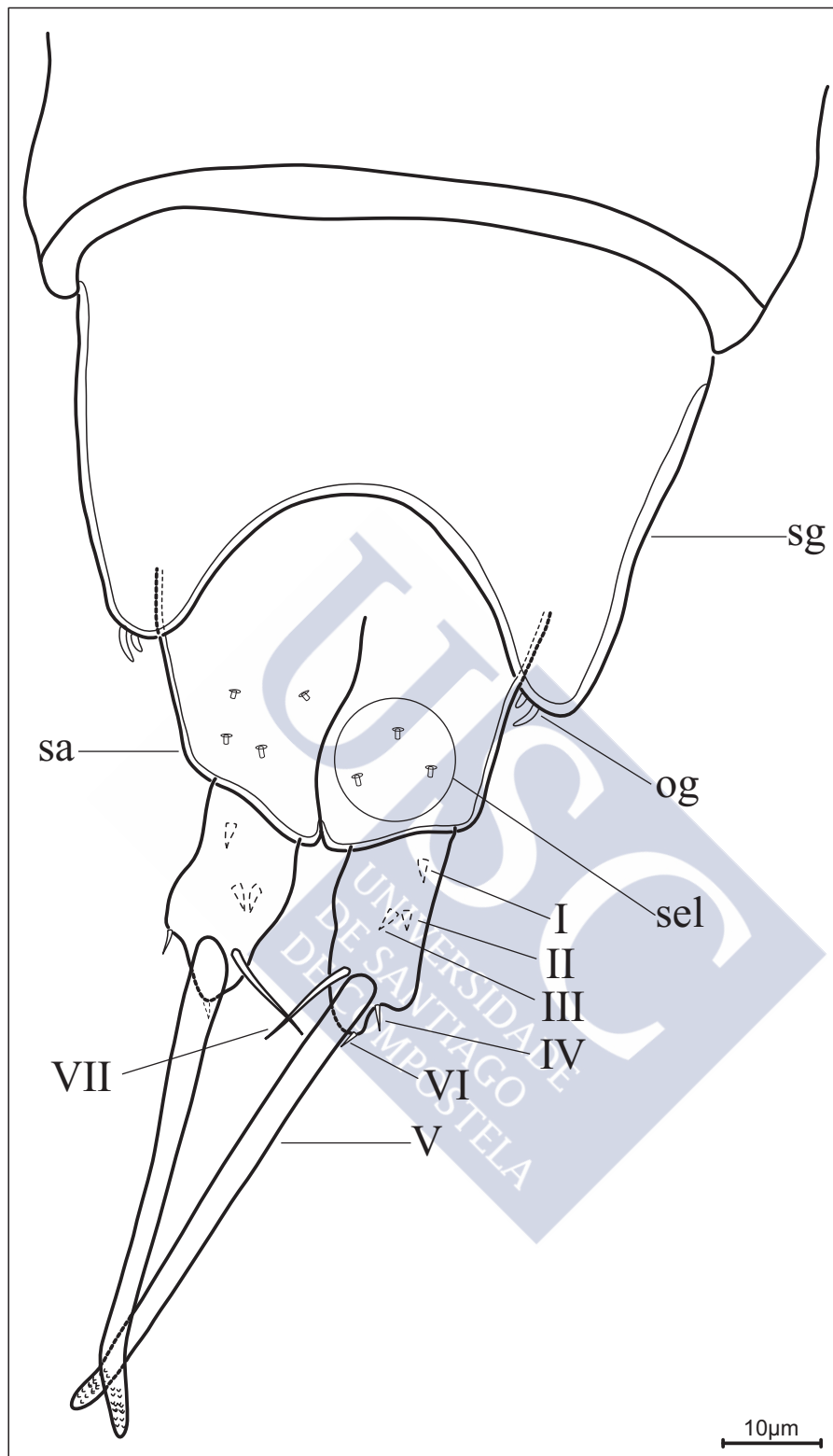


Figura 65. Vista ventral del somito genital, somito anal y ramas caudales del macho de *Lomanotocola* sp. nov. (I-VII: sedas de las ramas caudales; og: opérculo genital; sa: somito anal; sel: sédulas; sg: somito genital).

Dimorfismo sexual:

Muy marcado tanto en la anatomía externa como en la segmentación corporal. 4º toracópodo del macho más reducido que el de la hembra. Seda V de las ramas caudales de la hembra más reducida que la del macho. Apéndices cefálicos iguales, excepto por el surco que existe en el labium del macho.

Respecto a la maxílula, presente en el macho de *Lomanoticola* sp. nov., cabe señalar que su observación se plantea difícil por encontrarse genralmente cubierta por la maxila. De hecho no se ha podido confirmar su existencia en la hembra ni mediante la microscopía óptica ni mediante el SEM, pero dado que en la familia Splanchnotrophidae generalmente no existen diferencias en las piezas bucales, se supone que la hembra también la tiene.

Variabilidad intraespecífica:

Hembras: poseen cierta variabilidad en la forma y proporciones corporales, probablemente debidas al desarrollo peramórfico. Además, los procesos posteriores presentan variabilidad asociada a la especie hospedadora. Por regla general los especímenes que se encontraron parasitando a *Doto koenneckeri*, *Doto Lemche* y *Doto pinnatifida* tienen 2 pares de procesos (Fig. 66A, B, C), siendo el externo el de mayor tamaño; por su parte, los individuos que parasitan a *Eubranchus* sp. solamente poseen 1 par de procesos, mucho más desarrollados que en los copépodos extraídos de las otras especies de nudibranchios (Fig. 66D).

Esta variabilidad hospedador-dependiente plantea la posibilidad de la existencia de dos especies de parásito distintas, pero como se verá en la sección dedicada al estudio del gen COX1, las diferentes anatomías de los procesos posteriores se deben únicamente a la variabilidad intraespecífica.

Machos: no se observó variabilidad.

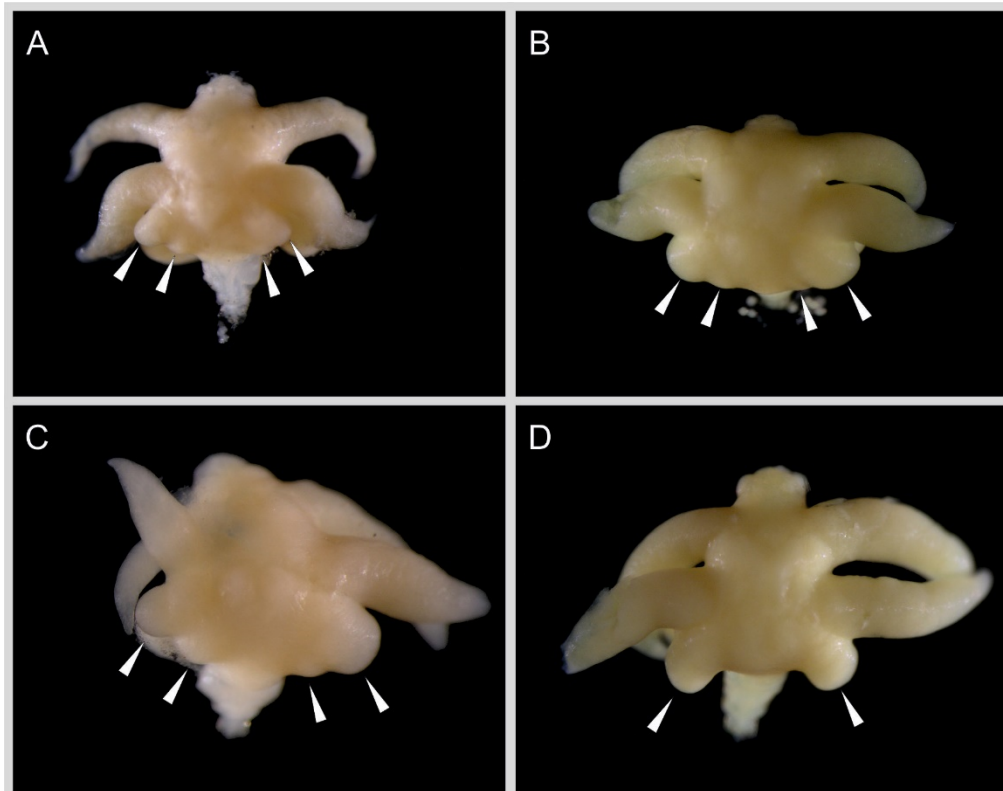


Figura 66. Vista dorsal de hembras de *Lomanoticola* sp. nov. extraídas de diferentes hospedadores, en la que se muestran los procesos posteriores (triángulos blancos). **A.** En *Doto koenneckeri*. **B.** En *Doto lemchei*. **C.** En *Doto pinnatifida*. **D.** En *Eubranchus* sp.

LARVA NAUPLIUS I

Piriforme, con el labrum redondeado y 1 par de ramas caudales en la parte posterior (Fig. 67).

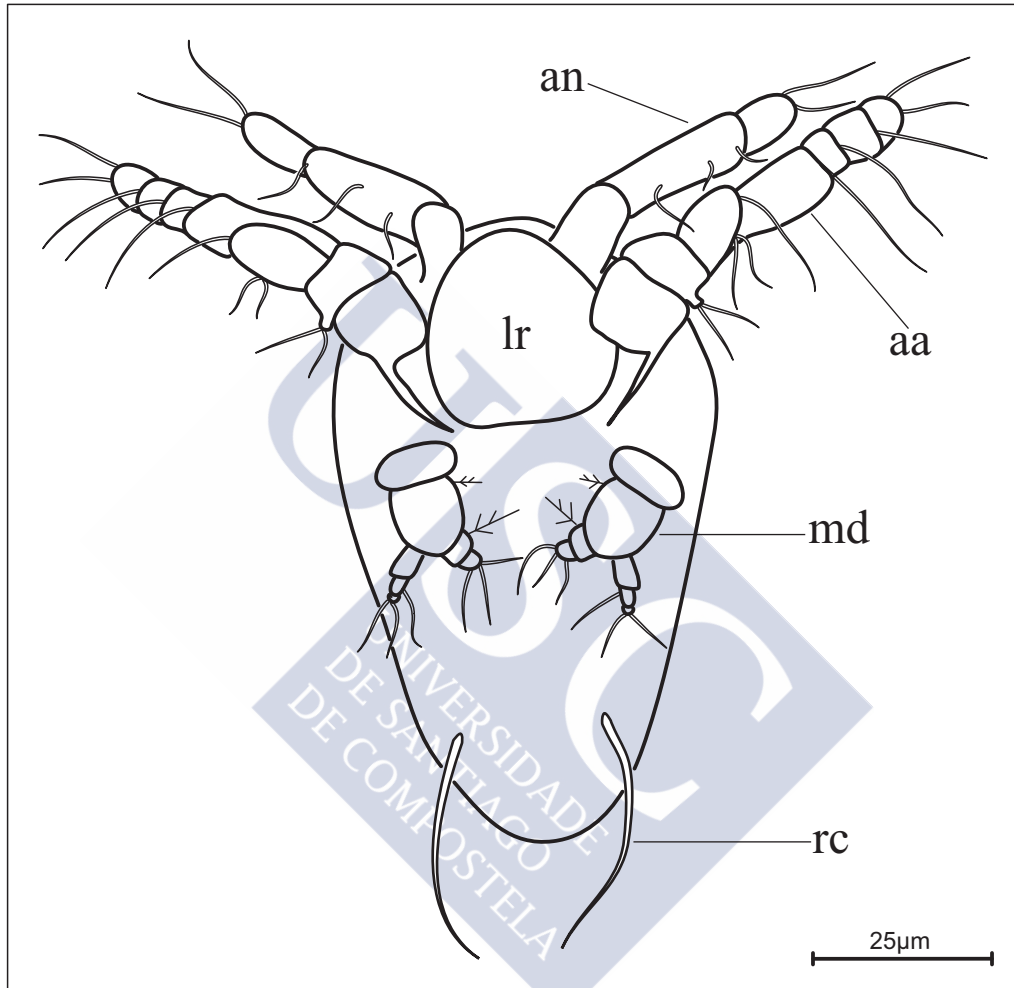
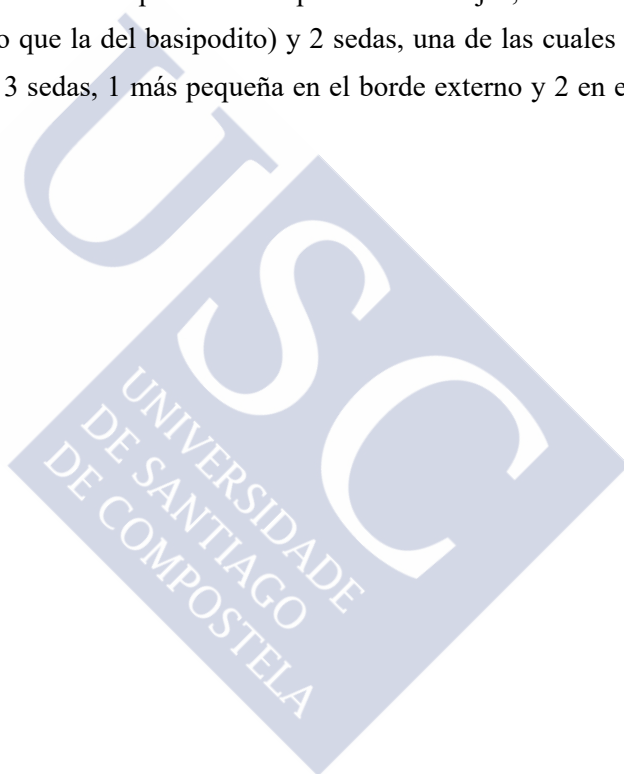


Figura 67. *Habitus* ventral de la larva nauplius I de *Lomanoticola* sp. nov. (aa: antena; an: anténula; lr: labrum; md: mandíbula; rc: ramas caudales).

Anténula unirrámea, constituida por 3 artejos: el 2º es el más alargado, con 3 sedas dispuestas a lo largo del borde interno, y el 3º artejo tiene 3 sedas apicales de longitud similar (Fig. 68).

Antena birrámea. Coxopodito con 1 proceso espiniforme en el borde interno; basipodito con 1 endito del que parten 2 sedas. Exopodito de 5 artejos, siendo el proximal de mayor tamaño; cada uno posee 1 seda excepto el distal, que tiene 2; endopodito de un solo artejo, con 2 sedas en la porción medial y otras 2 en la distal, una de ellas con el doble de longitud que las demás (Fig. 69).

Mandíbula birrámea. Coxopodito sin ornamentación, basipodito de mayor tamaño que el coxopodito y con 1 seda plumosa. Exopodito de 3 artejos, el 1º con 1 seda larga, el 2º sin ornamentación y el 3º con 2 sedas apicales. Endopodito de 2 artejos, 1º con una seda plumosa (de mayor tamaño que la del basipodito) y 2 sedas, una de las cuales es más pequeña; 2º segmento con 3 sedas, 1 más pequeña en el borde externo y 2 en el ápice (Fig. 70).



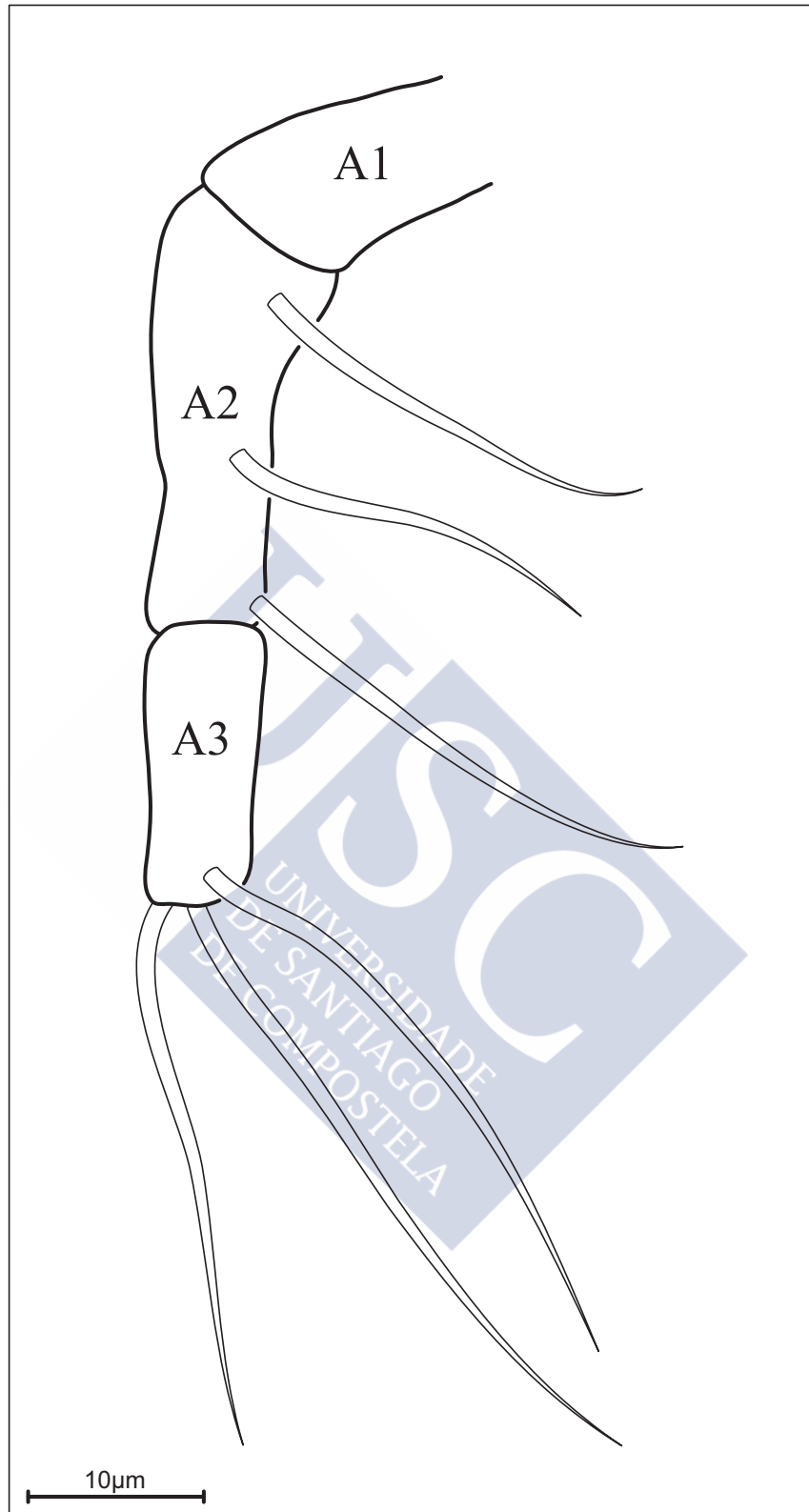


Figura 68. Anténula derecha de la larva nauplius I de *Lomanotica* sp. nov.
(A-: artejo de la anténula).

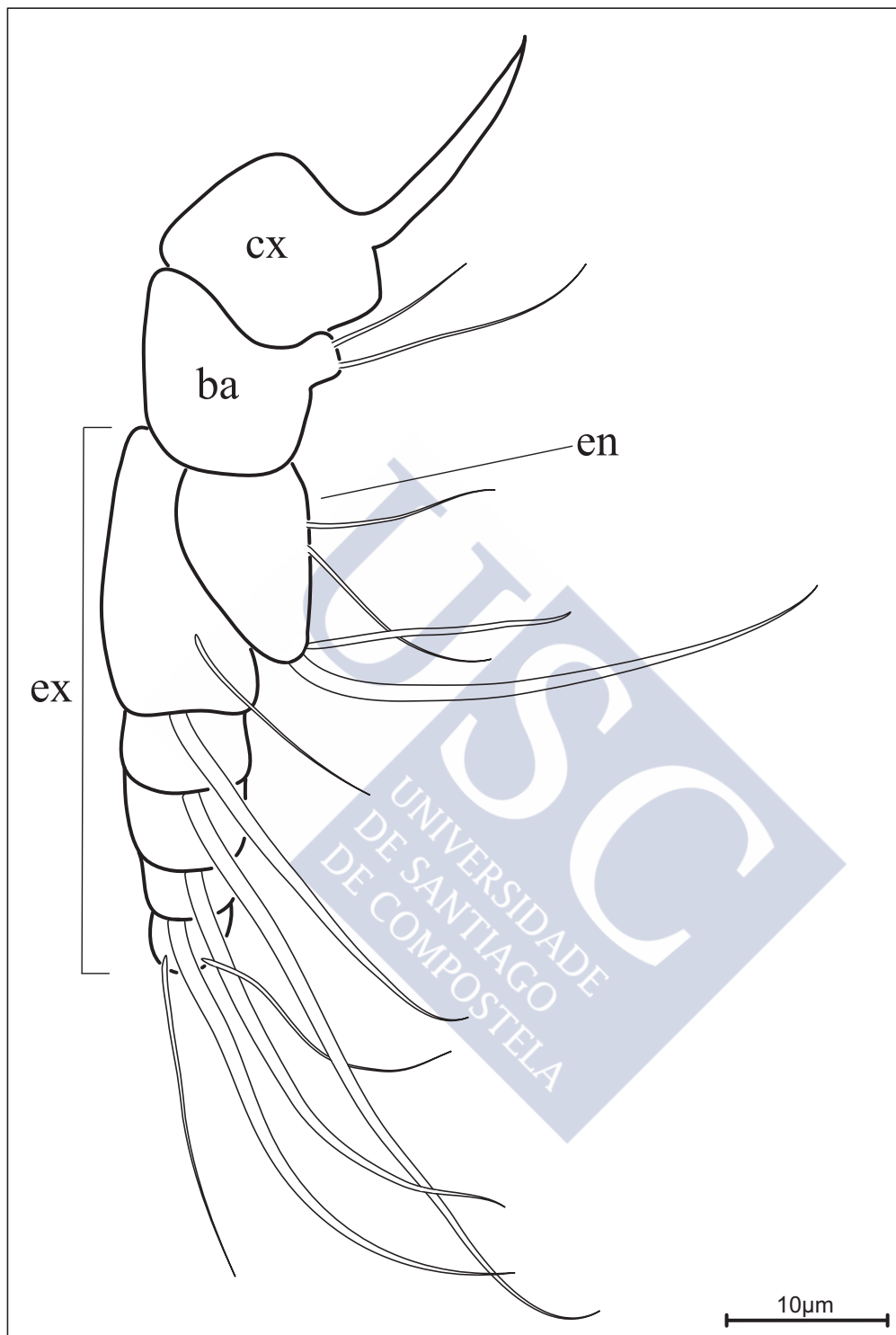


Figura 69. Antena derecha de la larva nauplius I de *Lomanotocola* sp. nov. (ba: basipodito; cx: coxopodito; en: endopodito; ex: exopodito).

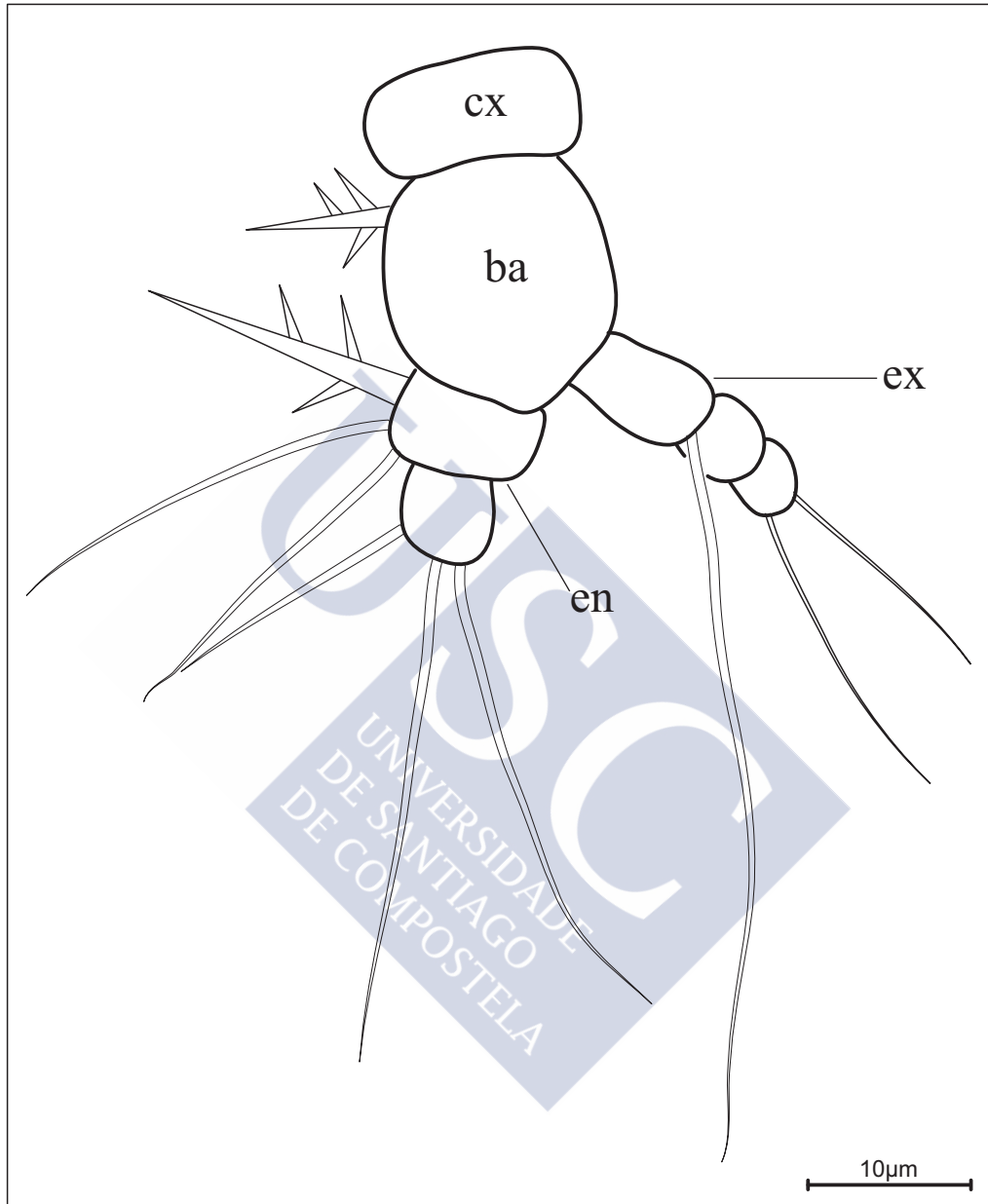


Figura 70. Mandíbula izquierda de la larva nauplius I de *Lomanoticola* sp. nov. (ba: basipodito; cx: coxopodito; en: endopodito; ex: exopodito).

DISCUSIÓN

En esta memoria se realiza por primera vez un estudio pormenorizado de las estructuras con valor taxonómico del género *Lomanoticola*: anténulas, antenas, labium, labrum, mandíbulas, maxílulas, maxilas, toracópodos y ramas caudales. También se describe el macho de este género, hasta ahora desconocido.

Lomanoticola sp. nov. posee caracteres que la clasifican dentro de la familia Splanchnotrophidae: ausencia de maxilípedos, antena de 3 artejos, 2º y 3º toracópodos birrámeos, número y anatomía de los procesos laterales de las hembras y fuerte dimorfismo sexual (HANCOCK & NORMAN, 1863; DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1950; HUYS, 2001).

La hembra de *Lomanoticola* sp. nov. se integra dentro del género *Lomanoticola* por la forma corporal, la existencia de 3 pares de apéndices laterales robustos y cortos, la forma de los sacos ovígeros, la presencia de un genitoabdomen en la hembra y la forma y ornamentación general de los apéndices cefálicos (HANCOCK & NORMAN, 1863; DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1950; HUYS, 2001).

Dado que no existe material tipo de *Lomanoticola* spp. con el que poder comparar los individuos recogidos en las rías de Ferrol y de Ares, se estudiaron la descripción original de *Lomanoticola brevipes* (HANCOCK & NORMAN, 1863) y la revisión de *Lomanoticola insolens* realizada por DELAMARE DEBOUTTEVILLE (1950). En ambos casos se trata de artículos concernientes a las hembras y con descripciones e ilustraciones poco detalladas de las estructuras de valor taxonómico, sobre todo en lo referente a la segmentación y ornamentación de los apéndices cefálicos. Por ello, la información que se puede extraer de esos trabajos se limita al *habitus* corporal general y a la ornamentación general de anténulas, antenas, toracópodos y ramas caudales.

Al no poder comparar con detalle los apéndices cefálicos de la *Lomanoticola* sp. nov. con los de las especies del género *Lomanoticola*, los toracópodos soportan el peso de la identificación, puesto que existen diferencias importantes en la forma y ornamentación. Mientras que los toracópodos de *Lomanoticola* sp. nov. se encuentran bien desarrollados y son observables a simple vista, no sucede así en *Lomanoticola brevipes* y *Lomanoticola insolens*:

- En *Lomanotricula brevipis* los toracópodos son “rudimentarios, reducidos a meros ganchos de pequeño tamaño” (Fig. 71A) (HANCOCK & NORMAN, 1863).
- En *Lomanotricula insolens* los toracópodos son reducidos, con los endopoditos representados por pequeños procesos espinosos (Fig. 71B) (DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1950).

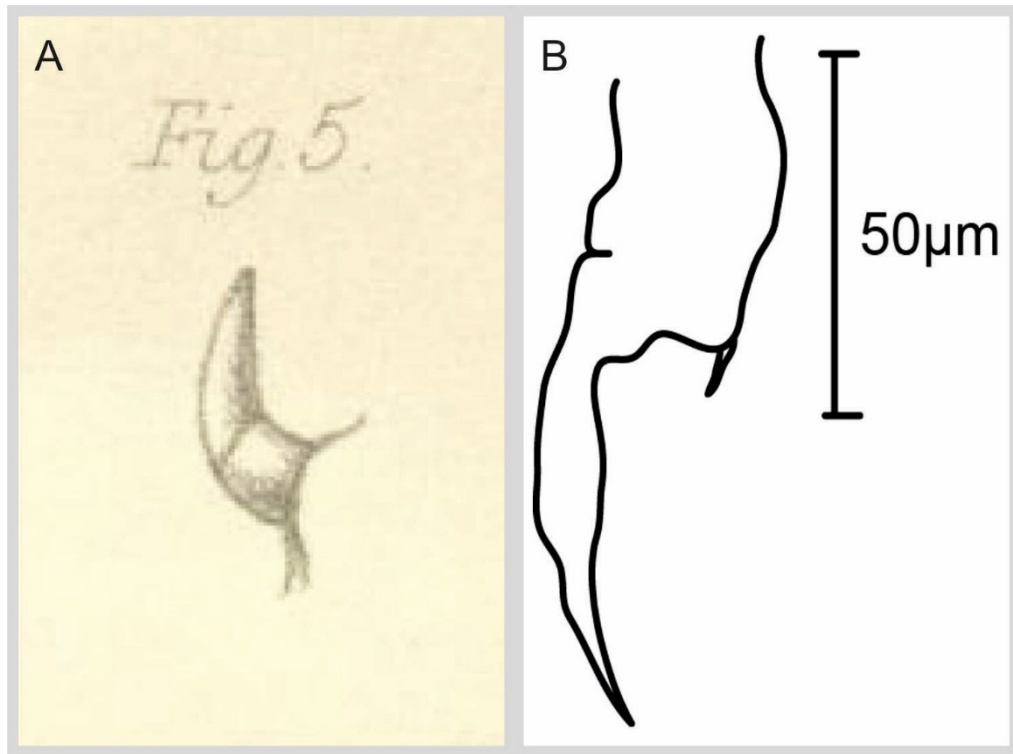


Figura 71. A. Toracópodo de la hembra de *Lomanotricula brevipis* (tomado de HANCOCK & NORMAN, 1863). B. 3^{er} toracópodo derecho de la hembra de *Lomanotricula insolens* (adaptado de DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1950).

La presencia de un 4^o par de toracópodos es determinante: el hecho de que en las descripciones originales y posteriores de *Lomanotricula brevipis* y de *Lomanotricula insolens* no se cite la existencia de una estructura macroscópica fácilmente visible en las hembras, como es el 4^o par de toracópodos, indica que este carácter no existe en esas especies y permite distinguirlas de *Lomanotricula* sp. nov. (HANCOCK & NORMAN, 1863; DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1950; HUYS, 2001).

Además, *Lomanotricula brevipis* y *Lomanotricula insolens* poseen otros rasgos específicos que permiten diferenciarlas de *Lomanotricula* sp. nov.:

- *Lomanotricula brevipes* carece de procesos posteriores. Los artejos 2º y 3º de la anténula no poseen sedas, el 4º artejo no presenta sedas en la porción medial y el número de sedas apicales es menor que el de las anténulas de *Lomanotricula sp. nov.* Las ramas caudales tienen solamente 3 sedas (HANCOCK & NORMAN, 1863).
- *Lomanotricula insolens* posee surcos profundos en el 2º y 3º segmentos torácicos (Fig. 4). La anténula carece de sedas en los artejos 2º y 3º, y el 4º artejo tiene 2 sedas largas en la porción proximal. La antena únicamente presenta 2 sedas en el segmento distal del endopodito. La seda protopodial del 2º toracópodo tiene una longitud de aproximadamente $\frac{1}{4}$ de la que posee *Lomanotricula sp. nov.* y el endopodito tiene forma de espina y se encuentra muy reducido. Las ramas caudales únicamente tienen 3 sedas. (DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1950).

En la filogenia de la familia Splanchnotrophidae realizada por ANTON & SCHRÖDL (2013a) (Fig. 88) se incluye una tercera especie de *Lomanotricula* denominada *Lomanotricula sp.*, la cual fue descrita y erróneamente identificada como *Lomanotricula brevipes* por SALMEN (2005) en su tesis doctoral (datos no publicados). Estos autores la diferencian de *Lomanotricula brevipes* y *Lomanotricula insolens* en base a la estructura y número de toracópodos de la hembra. Las hembras de *Lomanotricula sp.* y *Lomanotricula sp. nov.* poseen grandes similitudes en el *habitus*, segmentación corporal, segmentación y ornamentación de apéndices cefálicos, en el número y estructura de los toracópodos y en la estructura y ornamentación de las ramas caudales. La única diferencia se encuentra en la forma globular del 4º toracópodo de *Lomanotricula sp.*, la cual podría deberse al desprendimiento de la porción sedosa distal del toracópodo durante la manipulación del animal, artefacto también observado durante la presente memoria (Fig. 47B). Por ello, se considera que *Lomanotricula sp.* y *Lomanotricula sp. nov.* son la misma especie.

Esta conclusión podrá ser testada en el estudio molecular gracias a que la secuencia COX1 con código LOM27 (Tabla 3), cedida por Roland Anton, pertenece a los sacos ovígeros de una hembra de *Lomanotricula sp.*

4.2.2. Género *Splanchnotrophus*.

Clase Copepoda H.M. Edwards, 1840

Orden Poecilostomatoida Thorell, 1859

Familia Splanchnotrophidae Norman & Scott, 1906

Género *Splanchnotrophus* Hancock & Norman, 1863

DIAGNOSIS

HANCOCK. & NORMAN, 1863: 50-54, plancha XV figs. 1-11, Plancha XVI figs. 7-10.

HUYS, 2001: 110, figs. 1, 2, 3, 4, 5 y 6D-E.

ABAD *et al.*, 2011: 55-56, figs. 3 y 4.

Cuerpo de la hembra dividido en un prosoma de gran tamaño y un pequeño urosoma de 2 somitos. La parte anterior del prosoma está formada por el cefalosoma y los somitos torácicos 2° y 3°, de los que surgen 3 pares de apéndices laterales largos y delgados; parte posterior más pequeña y cilíndrica, formada por la fusión de los somitos torácicos 4° y 5°. Urosoma compuesto por el 6° somito torácico y el genitoabdomen. Ramas caudales con una seda apical bien desarrolla y 6 sedas accesorias más pequeñas.

Cuerpo del macho cicloporiforme. El prosoma comprende el cefalotórax (cefalosoma y 2° y 3° somitos torácicos) y el 4° y 5° somitos torácicos. Urosoma formado por el 6° y 7° somitos torácicos y por el somito genital. Ramas caudales con 1 seda apical larga y espinulada en el ápice y 6 sedas más pequeñas.

Anténula de 4 artejos, el 1° con 2 espinas robustas. Antena de 3 artejos: coxobase y endopodito de 2 artejos; parte distal del endopodito con 5 elementos accesorios. Mandíbula con gnátobase corta, rematada en una hoja dentada. Maxílula representada por un pequeño esclerito fusionado a la base mandibular, con 1 pequeña seda en el ápice. Maxila de 2 artejos, con 1 espina y 1 seda en la alobase.

2° y 3° par de toracópodos birrámeos. Protopodito con 1 seda en su borde externo; endopodito representado por un pequeño lóbulo; exopodito de mayor tamaño y más alargado, con varios elementos de ornamentación. 4° par de toracópodos reducido, con apariencia de seda.

Sacos ovígeros bilobulados, unidos al genitoabdomen por la parte medial.

Especie tipo: *Splanchnotrophus gracilis* Hancock & Norman, 1863.

Splanchnotrophus gracilis Hancock & Norman, 1863.

DIAGNOSIS

HANCOCK. & NORMAN, 1863: 50-54, plancha XV figs. 1-11, plancha XVI figs. 7-10.

HUYS, 2001: 116-119, figs. 5 y 6 D-E.

BOXSHALL & HALSEY, 2004: 665-667.

DESCRIPCIÓN

HEMBRA

Segmentación (Fig. 72):

Cuerpo de 0,9-2,8 mm de longitud, dividido en prosoma y urosoma, siendo el prosoma más grande y sin segmentación aparente. La parte anterior del prosoma está formada por el cefalosoma y por el 2º y el 3º somitos torácicos. 2º y 3º somitos torácicos con 3 pares de apéndices laterales largos y delicados, orientados lateralmente (1 par en el 2º somito torácico y 2 pares en el 3º) (Fig. 73A). En la zona dorso lateral del tercer somito torácico aparece 1 par de procesos posteriores con forma ovalada y bien desarrollados. Parte posterior del prosoma estrecha y cilíndrica, compuesta por la fusión de los somitos torácicos 4º y 5º. Urosoma de dos somitos: 6º somito torácico y genitoabdomen (Fig. 73B). Aperturas genitales localizadas en la zona ventrolateral del genitoabdomen. Ramas caudales con una seda apical (V) robusta y 6 pequeñas sedas accesorias. Abertura anal situada entre las dos ramas caudales (Fig. 74F).

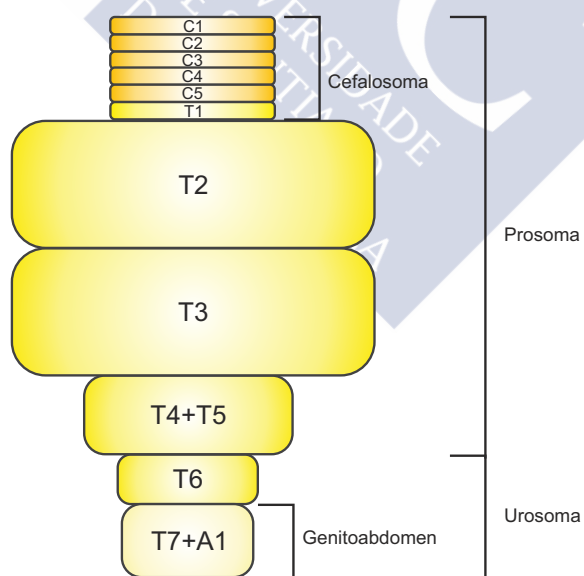


Figura 72. Esquema de la segmentación de la hembra de *Splanchnotrophus gracilis*. El tamaño de las proporciones corporales no se corresponde con el real (A-: somito abdominal; C-: somito cefálico; T-: somito torácico).

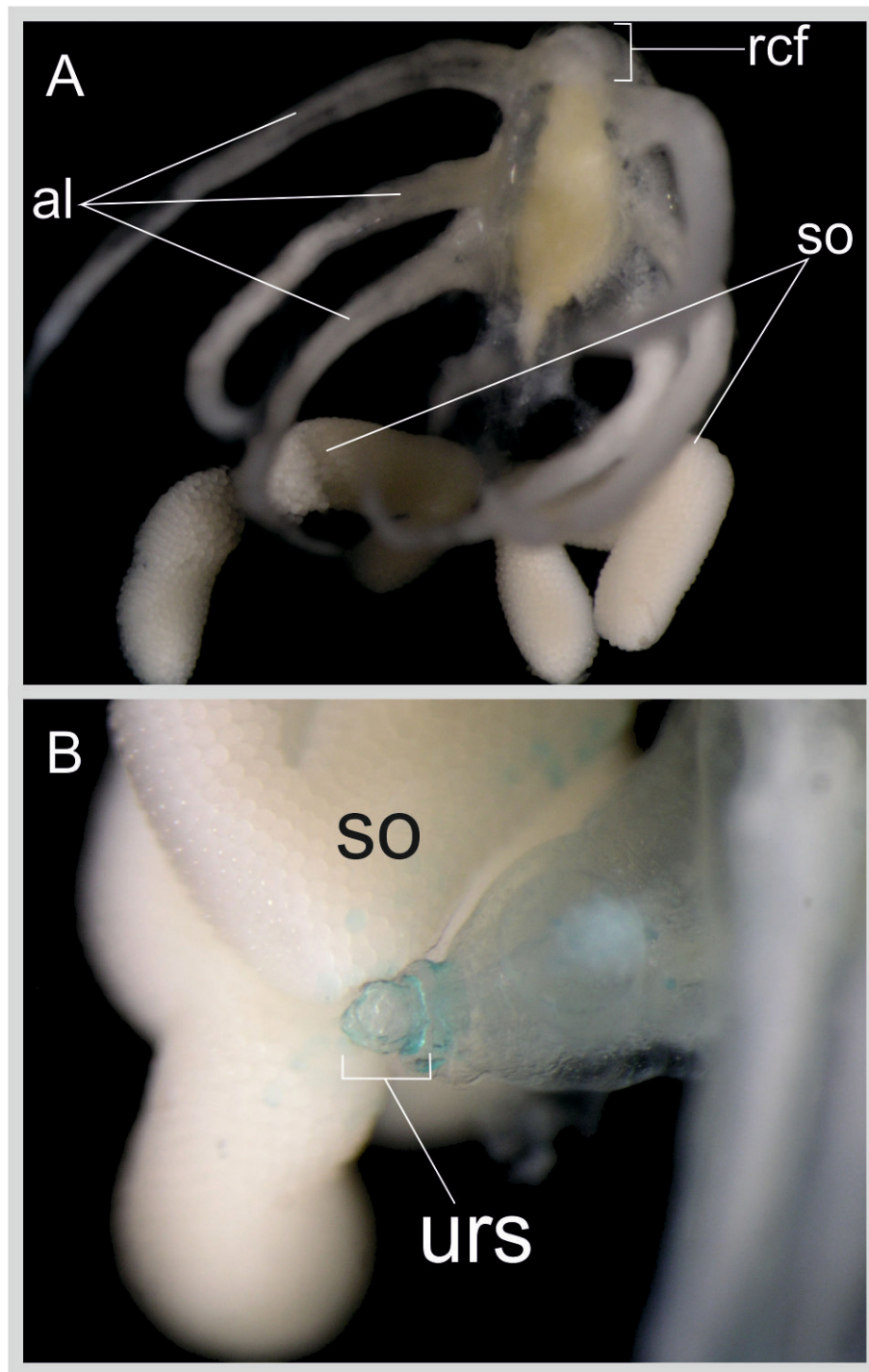


Figura 73. Hembra de *Splanchnotrophus gracilis*. **A.** Vista ventral del cuerpo. **B.** Detalle del urosoma (al: apéndices laterales; rcf: región cefálica; so: sacos ovígeros; urs: urosoma). Fotografías realizadas con el microscopio estereoscópico.

Apéndices cefálicos (Fig. 74A):

Anténula con 4 artejos de segmentación poco marcada. 1^{er} artejo con 2 espinas robustas; 2^o artejo con 2 espinas robustas y 1 seda larga; 3^{er} artejo con 2 sedas pequeñas en la superficie dorsal; 4^o artejo con 2 sedas en la zona subapical y 7-9 sedas en la apical (Fig. 74A, D).

Antena falciforme con 3 artejos: coxobase, 1^{er} artejo endopodal y 2^o artejo endopodal. Coxobase con 1 espina pinnada en la unión con el 1^{er} artejo endopodal; artejo proximal del endopodito con 1 espina robusta y más pequeña que la de la coxobase; artejo distal del endopodito (3^{er} artejo de la antena) recurvado hacia el ápice, con 2 espinas en el borde externo, 1 seda en la superficie dorsal, 1 seda más pequeña en el borde interno, y 1 seda más fina y larga en el borde externo que sigue la curvatura del artejo (Fig. 74A, E).

Labrum con dos abultamientos dirigidos hacia el labium (Fig. 74A, E).

Labium con dos áreas circulares ligeramente cubiertas de sédulas de pequeño porte. Un par de paragnatos en la parte superior, también con sédulas (Fig. 74A, E).

Mandíbula con gnatobase pequeña, recurvada en el ápice y con cuatro o cinco procesos dentiformes (Fig. 74A, E).

Maxílula formada por un pequeño esclerito fusionado a la gnatobase de la mandíbula, rematado por una pequeña seda. Se suele encontrar cubierta por la mandíbula, lo que la hace difícil de observar (Fig. 74E).

Maxila con dos artejos: sincoxa que no presenta ornamentación y alobase pequeña con 1 espina y 1 seda serrada (Fig. 74A, E).

Toracópodos:

1^{er} toracópodo ausente.

2^o par de toracópodos birrámeo, con 1 pequeña seda en el protopodito. Endopodito pequeño y delgado, con 1 pequeña espina en la porción distal. El exopodito es más largo y grueso que el endopodito, presenta 3 sedas en el margen externo y 3 en el interno; ápice finalizado en una ampolla de la que parte un proceso largo y curvado (Fig. 74B).

3^{er} par de toracópodos birrámeo, sin sedas en el protopodito. Endopodito más corto que el exopodito, pero más largo y grueso que el endopodito del 2^o toracópodo y sin espina distal. Exopodito más largo y grueso que el endopodito, muy similar al exopodito

del 2º toracópodo, pero la seda de la porción distal del exopodito está mucho más desarrollada (Fig. 74C).

4º par de toracópodos muy corto y delgado, con apariencia de seda y con una pequeña constricción en la porción medial.

Ramas caudales:

Cilíndricas, con las 7 sedas típicas. Seda V de mayor tamaño y espinulada en el ápice. Las demás sedas en posición lateral y dorsal (Fig. 74F).



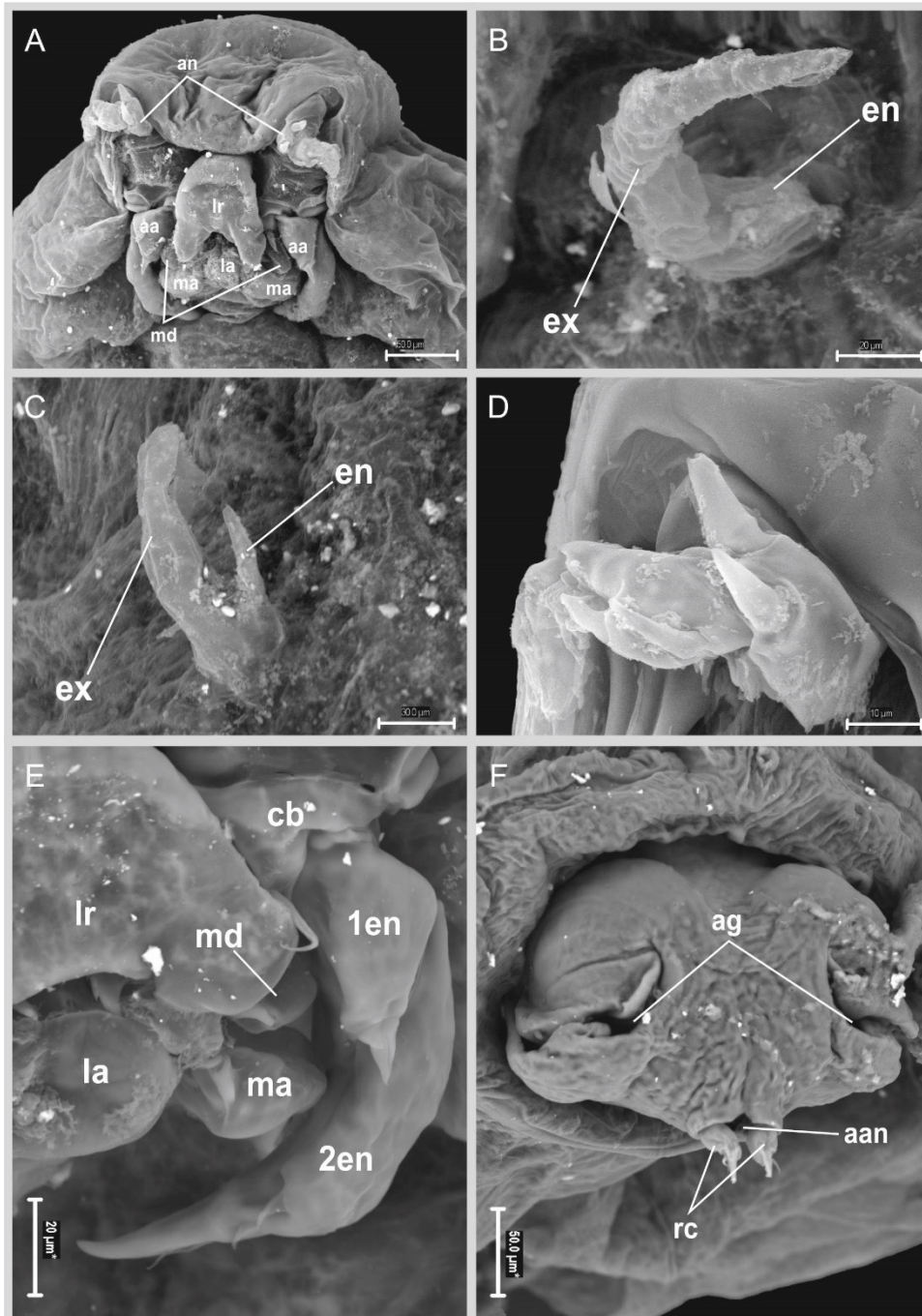


Figura 74. Hembra de *Splanchnotrophus gracilis*. **A.** Apéndices cefálicos, vista general. **B.** 2° toracópodo. **C.** 3^{er} toracópodo. **D.** Anténula derecha. **E.** Anténula y piezas bucales. **F.** Urosoma y genitoabdomen (aa: antena; aan abertura anal; ag: aperturas genitales; an: anténula; cb: coxobase; en: endopodito; 1en: 1^{er} artejo endopodal; 2en: 2° artejo endopodal; ex: exopodito; la: labium; lr: labrum; ma: maxila; md: mandíbula; rc: ramas caudales). Fotografías realizadas en el SEM.

MACHO**Segmentación (Fig. 75):**

Cuerpo ciclopiforme, de 0,5-0,8 mm de longitud (Fig. 76A). Prosoma compuesto por un cefalotórax bien definido (cefalosoma, 2º y 3º somito torácico) y por el 4º y 5º somitos torácicos, estos últimos de forma cilíndrica. El urosoma está constituido por el 6º somito torácico, el somito genital (7º torácico) y el somito anal (1º segmento abdominal). El somito genital, con forma cóncava, porta los opérculos genitales que están ornamentados con 2 sedas y 1 espina.

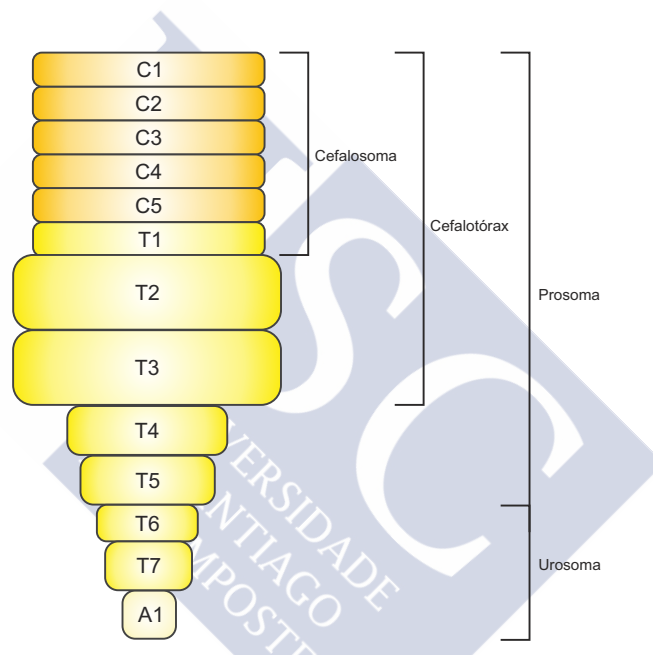


Figura 75. Esquema de la segmentación del macho de *Splanchnotrophus gracilis*. El tamaño de las proporciones corporales no se corresponde con el real (A-: somito abdominal; C-: somito cefálico; T-: somito torácico).

Apéndices cefálicos (Fig. 76B, C):

Anténula igual a la de la hembra: posee 4 artejos de segmentación poco marcada. 1^{er} artejo con 2 espinas robustas; 2^o artejo con 2 espinas robustas y 1 seda larga; 3^{er} artejo con 2 sedas pequeñas en la superficie dorsal; 4^o artejo con 2 sedas en la zona subapical y 7-9 sedas en la apical (Fig. 76B).

Antena igual a la de la hembra: falciforme con 3 artejos: coxobase, 1^{er} artejo endopodal y 2^o artejo endopodal. Coxobase con 1 espina pinnada en la unión con el 1^{er} artejo endopodal; artejo proximal del endopodito con 1 espina robusta y más pequeña que la de la coxobase; artejo distal del endopodito (3^{er} artejo de la antena) recurvado hacia el ápice, con 2 espinas en el borde externo, 1 seda en la superficie dorsal, 1 seda más pequeña en el borde interno, y 1 seda más fina y larga en el borde externo que sigue la curvatura del artejo (Fig. 76B)

Labrum con dos abultamientos dirigidos hacia el labium, al igual que el de la hembra (Fig. 76B, C).

Labium muy similar al de la hembra, con dos áreas circulares ligeramente cubiertas de sédulas de pequeño porte. Un par de paragnatos en la parte superior, también con sédulas. La única diferencia es la existencia en el macho de un surco central vertical (Fig. 76B, C).

Mandíbula igual a la de la hembra: gnatobase pequeña, recurvada en el ápice y con cuatro o cinco procesos dentiformes (Fig. 76B, C).

Maxílula, como en el caso de la hembra, formada por un pequeño esclerito fusionado a la gnatobase de la mandíbula, rematado por una pequeña seda (Fig. 76B, C).

Maxila igual a la de la hembra, formada por dos artejos: sincoxa que no presenta ornamentación y alobase pequeña con 1 espina y 1 seda serrada (Fig. 76B, C).

Toracópodos:

1^{er} toracópodo ausente.

2^o par de toracópodos igual al de la hembra: birrámeo, con 1 pequeña seda en el protopodito. Endopodito pequeño y delgado, con 1 pequeña espina en la porción distal. El exopodito es más largo y grueso que el endopodito, presenta 3 sedas en el margen externo y 3 en el interno; ápice finalizado en una ampolla de la que parte un proceso largo y curvado (Fig. 76D).

3^{er} par de toracópodos, como en el caso de la hembra, birrámeo, sin sedas en el protopodito. Endopodito más corto que el exopodito, pero más largo y grueso que el endopodito del 2^o toracópodo y sin espina distal. Exopodito más largo y grueso que el endopodito, muy similar al exopodito del 2^o toracópodo, pero la seda de la porción distal del exopodito está mucho más desarrollada (Fig. 76E).

4^o par de toracópodos mucho más reducido que el 2^o y 3^{er} par, con forma de seda alargada.

Ramas caudales muy similares a las de la hembra: cilíndricas, con las 7 sedas típicas. Seda V de mayor tamaño y espinulada en el ápice. Las demás sedas en posición lateral y dorsal (Fig. 76F).



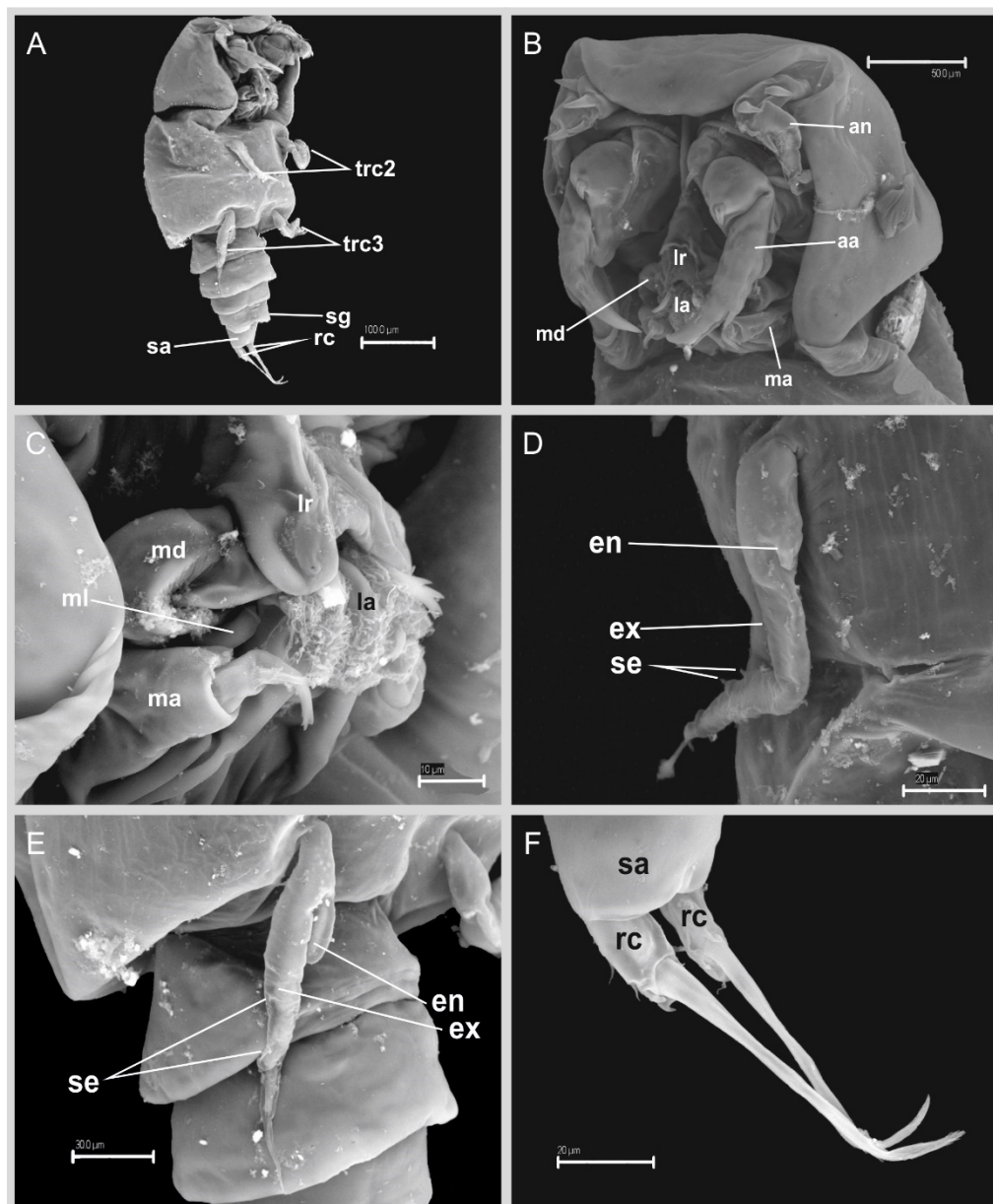


Figura 76. Macho de *Splanchnotrophus gracilis*. **A.** Vista general. **B.** Apéndices cefálicos y piezas bucales. **C.** Piezas bucales. **D.** 2º toracópodo. **E.** 3º toracópodo. **F.** Somito anal y ramas caudales (aa: antena; an: anténula; en: endopodito; ex: exopodito; la: labium; lr: labrum; ma: maxila; md: mandíbula; ml: maxílula; rc: ramas caudales; se: sedas; sa: somito anal; sg: somito genital; trc2: 2º toracópodo; trc3: 3º toracópodo). Fotografías realizadas en el SEM.

Dimorfismo sexual:

Muy marcado en lo concerniente al aspecto externo y a la segmentación corporal. En los apéndices cefálicos, el labium del macho presenta un surco vertical central, del que carecen las hembras. 4º toracópodo menos desarrollado en los machos que en las hembras.

Variabilidad intraespecífica:

Hembras: Las estructuras con valor taxonómico no mostraron ninguna variabilidad entre los especímenes estudiados.

Otras estructuras en las que se detectó cierta variabilidad son:

- Apéndices laterales: En los casos en los que los apéndices laterales se encontraban enrollados en el aparato genital del hospedador, se observó que finalizaban estrechándose y en forma de gancho de consistencia blanda; en otros casos su longitud no era suficiente para alcanzar el aparato genital del hospedador y las puntas de los apéndices eran romas.
- Procesos posteriores de las hembras: Algunas hembras presentaban los procesos hinchados, mientras que en otras la forma era aplanada.

Machos: La única variabilidad intraespecífica encontrada entre los machos fue la longitud de la porción espinulada de la seda larga de las ramas caudales: en la mayoría de los ejemplares estudiados la porción espinulada ocupa el último tercio de la seda, mientras que en algunos ocupa solamente el ápice.

LARVA NAUPLIUS I

Anatomía externa muy similar a la de la larva de *Lomanotocola* sp. nov.: piriforme, con labrum redondeado y 1 par de ramas caudales en la parte posterior (Fig. 77).

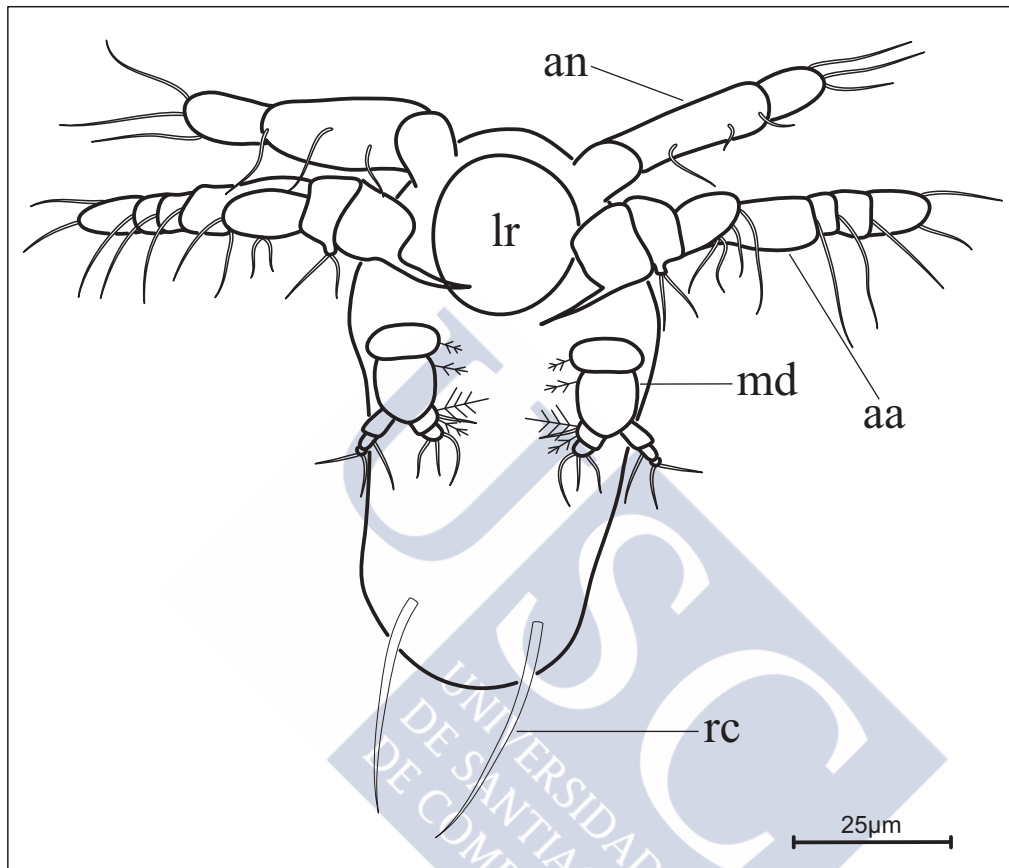
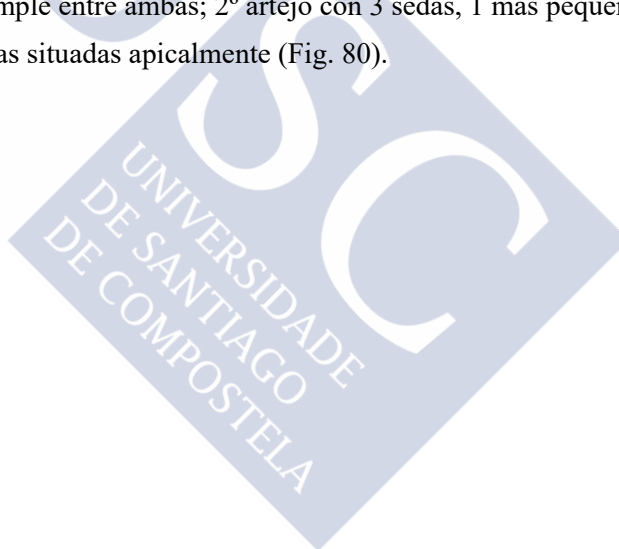


Figura 77. *Habitus* ventral de la larva nauplius I de *Splanchnotrophus gracilis*. (aa: antena; an: anténula; lr: labrum; md: mandíbula; rc: ramas caudales).

Anténula unirrámea, con 3 artejos: el 1^{er} artejo corto y sin ornamentación, el 2^o más alargado y con 3 sedas, y el 3^o más corto que el 2^o y con 3 sedas apicales. Se diferencia de la larva de *Lomanoticola* sp. nov. en el tamaño del 1^{er} artejo, que en este caso es más pequeño (Fig. 78).

Antena birrámea. Coxopodito con 1 proceso espiniforme en el borde interno; basipodito con 1 endito del que parten 2 sedas, una del doble de longitud que la otra. Exopodito con 5 artejos, el proximal es de mayor tamaño; cada uno porta 1 seda excepto el distal, que tiene 2; endopodito de 1 artejo, ornamentado por 2 sedas en la porción medial y otras 2 en la distal. La antena es muy similar a la de *Lomanoticola* sp. nov., diferenciándose únicamente en el tamaño del 5^o artejo del exopodito (mayor en *Splanchnotrophus gracilis*) (Fig. 79).

Mandíbula birrámea. Coxopodito con 1 seda plumosa pequeña. Basipodito también con 1 seda plumosa. Exopodito de 3 artejos: el 1^o sin ornamentación, el 2^o con 1 seda en el borde interno a la altura de la unión con el 3^{er} artejo y el 3^o con 2 sedas apicales. Endopodito de 2 artejos: el 1^o con 2 sedas plumosas (la proximal ligeramente mayor que la distal) y 1 seda simple entre ambas; 2^o artejo con 3 sedas, 1 más pequeña en el borde interno y 2 más largas situadas apicalmente (Fig. 80).



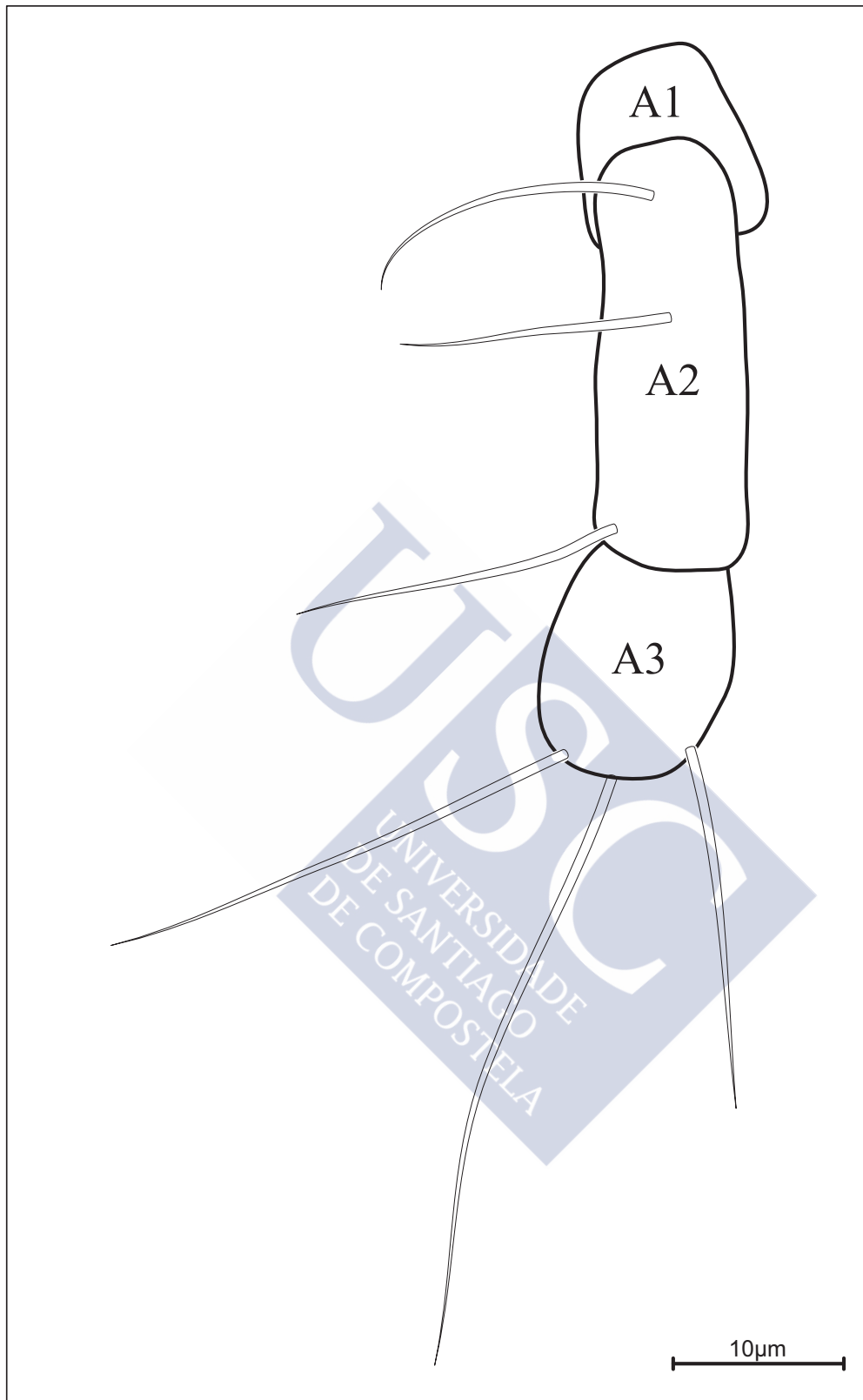


Figura 78. Anténula izquierda de la larva nauplius I de *Splanchnotrophus gracilis* (A-: artejo de la anténula).

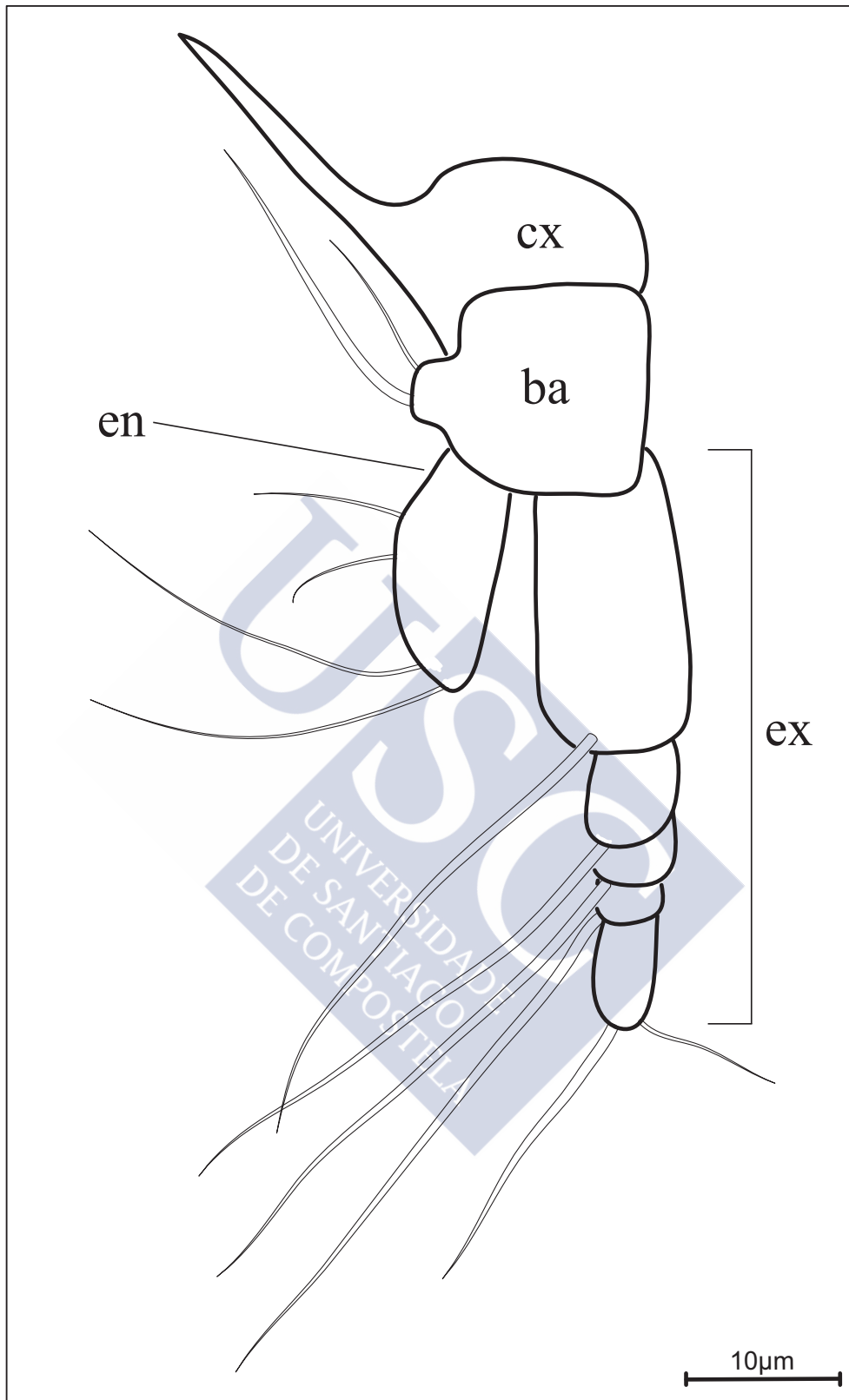


Figura 79. Antena izquierda de la larva nauplius I de *Splanchnotrophus gracilis* (ba: basipodito; cx: coxopodito; en: endopodito; ex: exopodito).

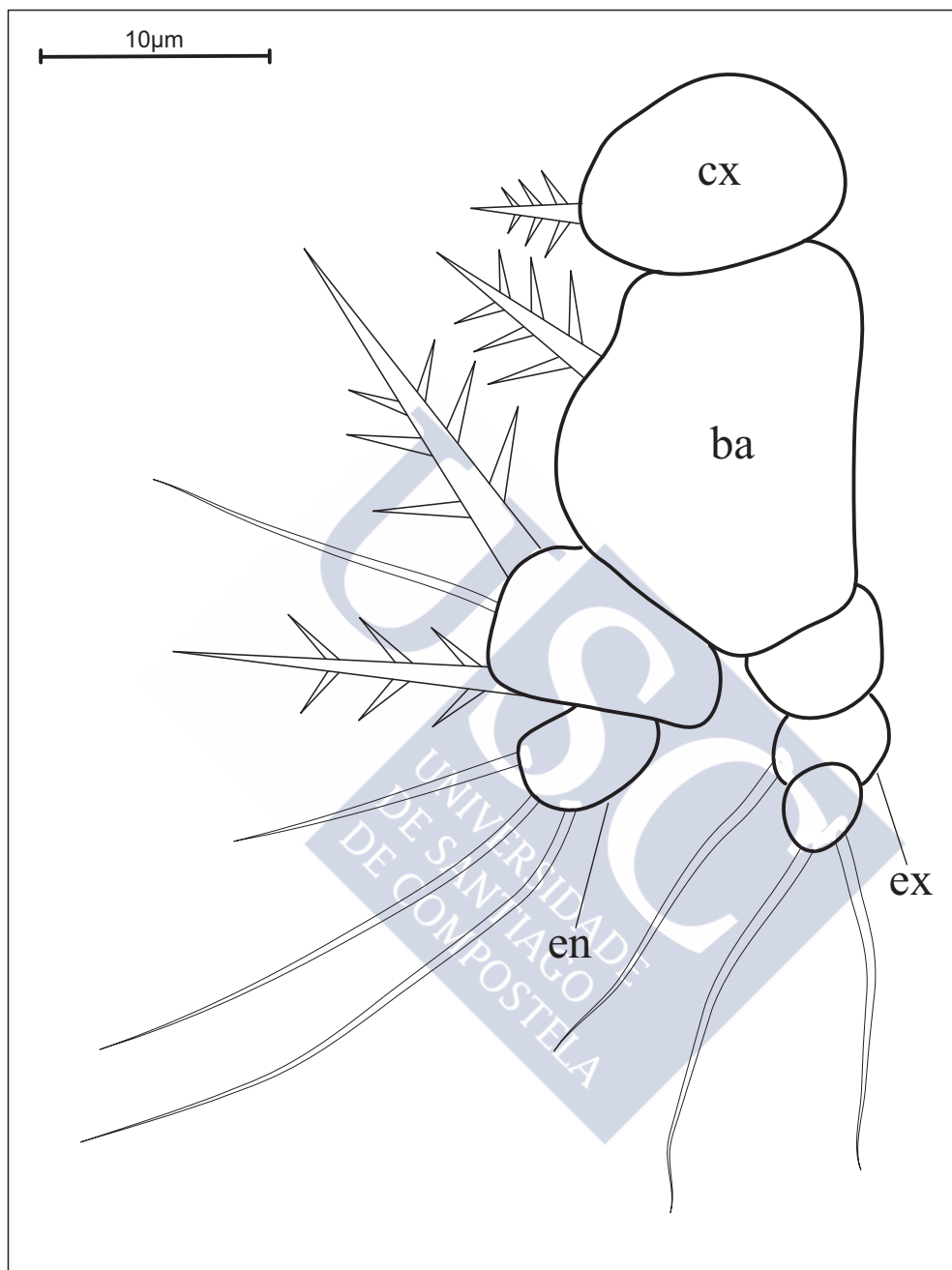


Figura 80. Mandíbula izquierda de la larva nauplius I de *Splanchnotrophus gracilis* (ba: basipodito; cx: coxopodito; en: endopodito; ex: exopodito).

DISCUSIÓN

Splanchnotrophus gracilis se clasifica dentro de la familia Splanchnotrophidae por la ausencia de maxilípedos, por la antena de 3 artejos, por el 2º y 3º toracópodos birrámeos, por el número y forma de los apéndices laterales de las hembras y por el fuerte dimorfismo sexual.

Se clasifica dentro del género *Splanchnotrophus* por la concordancia con los siguientes caracteres diagnósticos: apéndices laterales de la hembra largos y delicados, 1 par de procesos posteriores en la hembra, presencia de maxílula, seda en el protopodito de los toracópodos 2º y 3º, y ramas caudales con las siete sedas típicas (HANCOCK & NORMAN, 1863; HUYS, 2001).

Se identifica como *Splanchnotrophus gracilis* por los siguientes caracteres ya descritos por HANCOCK & NORMAN (1863) en la descripción original de la especie: aspecto general de hembras y machos, forma y número de los procesos laterales de la hembra, segmentación y ornamentación de los apéndices cefálicos y piezas bucales, forma y ornamentación general del 2º y 3º par de toracópodos y forma del genitoabdomen y ramas caudales.

Además, coincide con la redescipción parcial del macho realizada por HUYS (2001) en lo concerniente a la forma del cuerpo, segmentación, apéndices cefálicos y número y ornamentación de los toracópodos.

Por otra parte SALMEN (2005) hizo una detallada descripción de *Splanchnotrophus gracilis* utilizando el SEM en su tesis doctoral (datos no publicados), la cual coincide completamente con lo observado en esta memoria. La forma y tamaño corporales, segmentación, estructura fina de apéndices cefálicos y toracópodos, posición dentro del hospedador y número de parásitos por hospedador son casi idénticos a los aquí descritos. Las pequeñas diferencias encontradas (ramas caudales del macho) podrían ser debidas al mayor número de especímenes recogidos y estudiados en este trabajo.

El nudibranquio hospedador, *Trapania tartanella*, es la misma especie en la que SALMEN (2005) encontró los especímenes de parásito que describió como *Splanchnotrophus gracilis*. Además, el área de muestreo pertenece a la región zoogeográfica que SCHRÖDL (2002) describió para el género *Splanchnotrophus* (Atlántico nororiental).

Splanchnotrophus angulatus habita también en aguas del Atlántico nororiental y se diferencia de *Splanchnotrophus gracilis* por las siguientes características (HANCOCK & NORMAN, 1863; HECHT, 1895; HUYS, 2001; ABAD *et al.*, 2011):

- La posición de la espina de la coxobase de la antena no es tan distal como en *Splanchnotrophus gracilis*.
- La ornamentación del artejo distal del endopodito de la antena consiste en 1 elemento largo y 4 cortos, con una distribución diferente a la que se observa en *Splanchnotrophus gracilis*.
- Forma del endopodito del 2º toracópodo, que en *Splanchnotrophus gracilis* está más desarrollado. La seda distal del exopodito es más larga en *Splanchnotrophus gracilis* que en *Splanchnotrophus angulatus*.
- El exopodito del 3º toracópodo de *Splanchnotrophus angulatus* tiene 1 espina más que *Splanchnotrophus gracilis* en su borde externo y 2 menos en el interno.
- Las sedas de las ramas caudales de *Splanchnotrophus angulatus* están menos desarrolladas en *Splanchnotrophus gracilis*, y la II y III se encuentran fusionadas en la base.
- El macho de *Splanchnotrophus gracilis* presenta 3 sedas en el opérculo genital, mientras que *Splanchnotrophus angulatus* tiene 2.

Splanchnotrophus dellachiajei, a pesar de tener una distribución exclusivamente mediterránea, se distingue de *Splanchnotrophus gracilis* en los siguientes caracteres (DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1950; DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1951; HUYS, 2001; ABAD *et al.*, 2011):

- El 4º artejo de la anténula tiene un número menor de sedas.
- La seda del borde externo del 2º artejo endopodal de la antena es más corta que la de *Splanchnotrophus gracilis*, mientras que en borde interno cuenta con 1 mucho más larga.
- El 3º par de toracópodos tiene una espina más en el borde externo del exopodito que *Splanchnotrophus gracilis*.
- Las sedas de las ramas caudales son de menor tamaño que en *Splanchnotrophus gracilis*.

4.3. Análisis molecular.

El alineamiento resultante incluye las secuencias del gen COX1 mitocondrial obtenidas de *Lomanotocola* sp. nov., *Splanchnotrophus gracilis*, 3 parásitos muy dañados cuya especie no se pudo determinar en el presente trabajo, parte de las obtenidas por ANTON *et al.* (en prensa) y la de *Clausocalanus minor* (BUCKLIN *et al.*, 2003) como grupo externo. En total se estudiaron 57 secuencias en un alineamiento de una longitud de 533 pares de bases, 54 de ellas pertenecientes a 7 especies determinadas morfológicamente y 3 secuencias (SPLNCH1, LOM1 y LOM2) a especies no estudiadas morfológicamente.

Las distancias medias intraespecíficas para las especies *Splanchnotrophus angulatus*, *Ismaila aliena* e *Ismaila robusta* se sitúan en 0,003-0,004 (E.E.=0,001), 0,009 para *Splanchnotrophus gracilis* (E.E.=0,003) y 0,013 *Lomanotocola* sp. nov. (E.E.=0,002) (Tabla 4). En contraste, los valores de distancias entre las especies consideradas son más elevados, con un valor medio de 0,170 (Tabla 5). El valor medio de distancia de *Lomanotocola* sp. nov. respecto al resto de especies consideradas es de 0,188. Entre las especies congénicas del género *Ismaila* (*Ismaila aliena* e *Ismaila robusta*) se obtiene el valor interespecífico más bajo, de 0,042. Entre las especies del género *Splanchnotrophus* (*Splanchnotrophus angulatus* y *Splanchnotrophus gracilis*) se obtiene el segundo valor más bajo, de 0,163 (Tabla 5).

Tabla 4. Valores de distancias genéticas (distancias-p) intraespecíficas dentro de las especies consideradas. Se indica el número medio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias (D.I.: Distancia intraespecífica; E.E.: Error estándar).

D.I.	E.E.	Especie
0,004	0,001	<i>Splanchnotrophus angulatus</i>
0,003	0,001	<i>Ismaila aliena</i>
0,003	0,001	<i>Ismaila robusta</i>
n/c	n/c	<i>Ceratosomicola mammilata</i>
0,013	0,002	<i>Lomanotocola</i> sp. nov.
0,009	0,003	<i>Splanchnotrophus gracilis</i>

Tabla 5. Valores de distancias genéticas (distancias-*p*) interespecíficas entre las especies consideradas. Se indica el número medio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias. Los valores del error estándar se muestran sobre la diagonal. (CM: *Ceratosomicola mammilata*; LOM: *Lomanotricula* sp. nov.); IA: *Ismaila aliena*; IR: *Ismaila robusta*; SA: *Splanchnotrophus angulatus*; SG: *Splanchnotrophus gracilis*).

	SA	IA	IR	CM	LOM	SG
SA		0,016	0,017	0,017	0,016	0,015
IA	0,187		0,008	0,018	0,017	0,016
IR	0,202	0,042		0,018	0,017	0,017
CM	0,197	0,209	0,211		0,017	0,016
LOM	0,184	0,193	0,186	0,222		0,016
SG	0,163	0,181	0,187	0,181	0,173	

El modelo evolutivo seleccionado en MEGA para el juego de datos de secuencias COX1 fue el de Tamura-Nei (TAMURA & NEI, 1993) incluyendo el parámetro $\alpha = 0,6$ de la distribución gamma de la tasa de variación entre sitios.

Las reconstrucciones filogenéticas basadas en distancias y el método de Neighbor-Joining (NJ) muestran los clados específicos bien soportados (valores de bootstrapping $\geq 90\%$) para cada una de las especies consideradas. También las especies congénicas se agrupan monofiléticamente como especies muy próximas. Sin embargo, no se observa, o es escasamente soportada (<50% de bootstrapping), la monofilia para el género *Splanchnotrophus*. Las relaciones entre los clados de *Lomanotricula* sp. nov., *Ismaila*, *Splanchnotrophus gracilis* y *Splanchnotrophus angulatus* no están bien soportadas (<60%), situación esperable debido a la elevada y similar divergencia entre ellos, resultado de eventos de especiación rápida y simultánea y a la ausencia de taxones intermedios (Fig. 81). La utilización de criterios alternativos de reconstrucción filogenética (parsimonia y máxima verosimilitud) no implica cambios significativos en la topología aquí considerada.

El clado que incluye a *Lomanotricula* sp. nov. se encuentra bien soportado, con un valor de bootstrapping del 100% y divergente del resto de especies consideradas. Las secuencias no muestran agrupación alguna en función del hospedador parasitado.

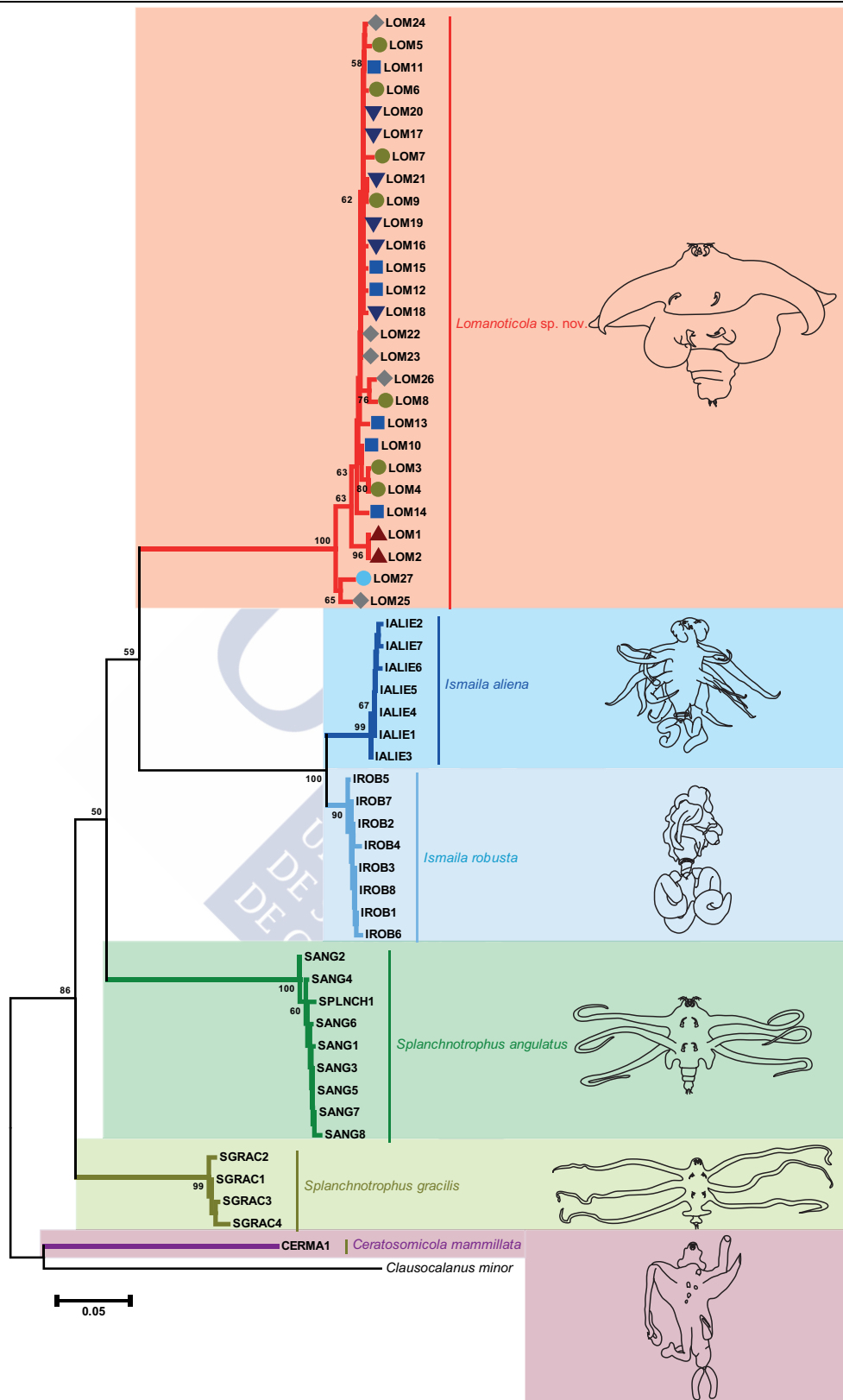


Figura 81. Árbol filogenético obtenido mediante el algoritmo de Neighbor-Joining y basado en distancias de Tamura-Nei. Los iconos idénticos junto a los códigos de las muestras de *Lomanotocola* sp. nov. indican el mismo hospedador (Tabla 3).

4.4. Biología.

4.4.1. Distribución geográfica.

Lomanoticola sp. nov.

Con los datos obtenidos en la presente memoria y con la secuencia LOM27, cedida por Roland Anton, se determina que la distribución de *Lomanoticola* sp. nov. comprende las rías de Ferrol y Ares (NW Península Ibérica) y el área de Banyuls (costa francesa del Mediterráneo) (Fig. 82).

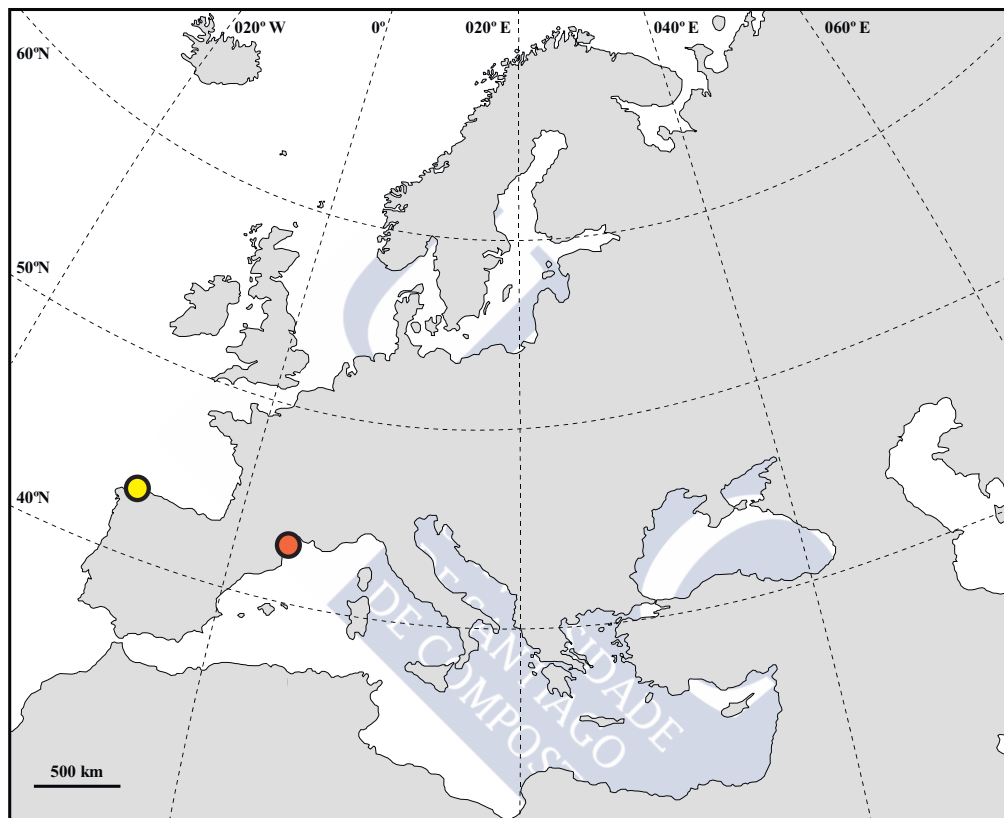


Figura 82. Mapa de la distribución de *Lomanoticola* sp. nov. (círculo amarillo: localidad tipo).

***Splanchnotrophus gracilis*.**

Tras el estudio realizado en la presente memoria, el área de distribución conocida de *Splanchnotrophus gracilis* comprende el Sur de las Islas Británicas y la costa atlántica de la Península Ibérica (Fig. 83).

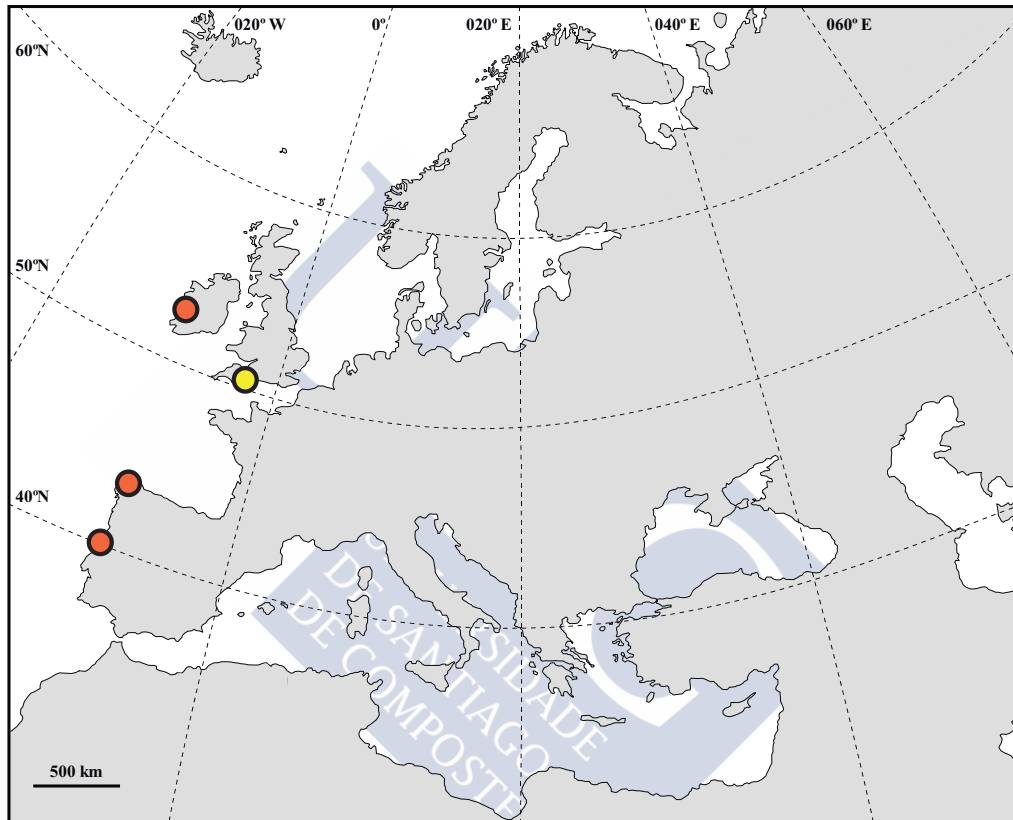


Figura 83. Mapa de la distribución de *Splanchnotrophus gracilis* (círculo amarillo: localidad tipo).

Splanchnotrophus angulatus.

A pesar de no haber sido estudiada morfológicamente por el mal estado del copépodo tras la disección del hospedador, los datos aportados por el análisis molecular de gen COX1 (especimen obtenido en la Ría de Ferrol y secuencias aportadas por Roland Anton) el área de distribución de *Splanchnotrophus angulatus* aumenta sustancialmente, al NW de la Península Ibérica y al Mediterráneo occidental (Fig. 84).

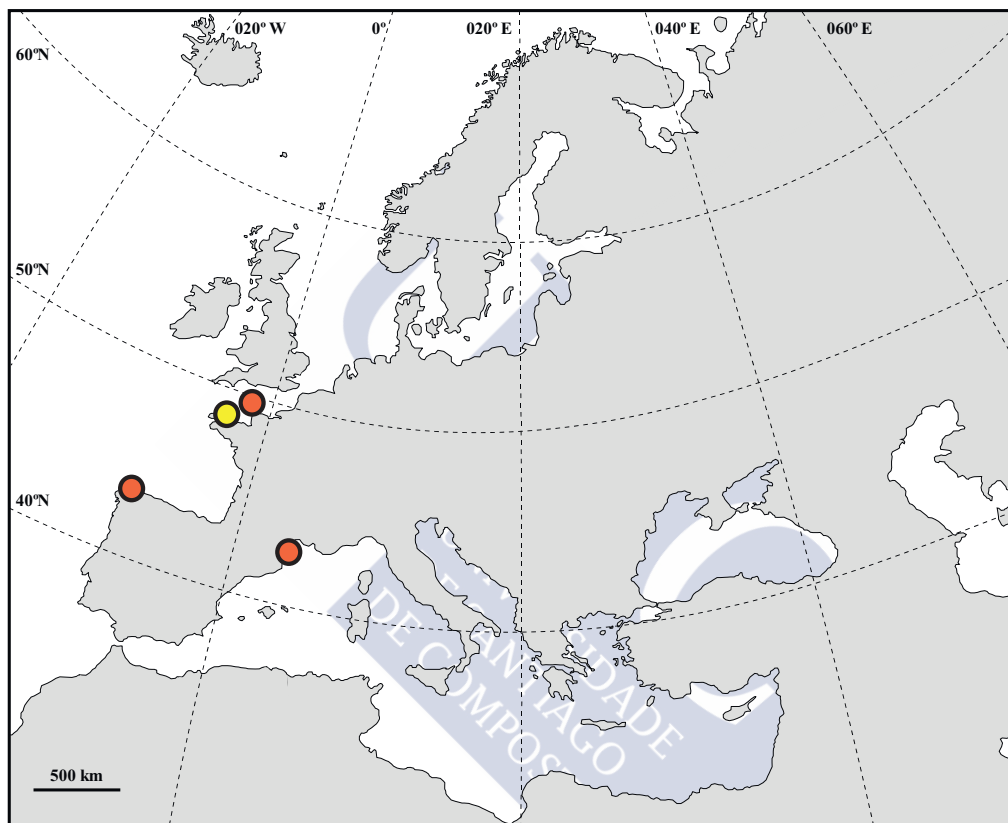


Figura 84. Mapa de la distribución de *Splanchnotrophus angulatus* (círculo amarillo: localidad tipo).

4.4.2. Opistobranquios infectados.

Se estudiaron 129 especies de opistobranquios pertenecientes a los órdenes Anaspidea, Nudibranchia y Sacoglossa en busca de parásitos, 59 recogidas durante el estudio y 128 pertenecientes a la colección “Opistobranquios de Galicia”. 10 de ellas se encontraban parasitadas por los géneros *Lomanotocola* (8) y *Splanchnotrophus* (2), todas pertenecientes al orden Nudibranchia. Esto representa una prevalencia de infección (número especies infectadas respecto al número total de especies estudiadas) del 7,75% en las especies de opistobranquios estudiadas en las rías de Ferrol y Ares.

Tabla 6. Relación de hospedadores de especies de la familia Splanchnotrophidae en las rías de Ferrol y Ares (OG: Colección Opistobranquios de Galicia; R: Recolecciones 2009-2014).

Hospedador	Parásito	R	OG
<i>Cuthona caerulea</i>	<i>Lomanotocola</i> sp.	+	
<i>Cuthona genovae</i>	<i>Lomanotocola</i> sp.	+	
<i>Doto eireana</i>	<i>Lomanotocola</i> sp. nov.		+
<i>Doto fragilis</i>	<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	+	
<i>Doto koenneckeri</i>	<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	+	+
<i>Doto lemchei</i>	<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	+	+
<i>Doto pinnatifida</i>	<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	+	+
<i>Eubranchus</i> sp.	<i>Lomanotocola</i> sp. nov.	+	
<i>Spurilla neapolitana</i>	<i>Splanchnotrophus angulatus</i>	+	
<i>Trapania tartanella</i>	<i>Splanchnotrophus gracilis</i>	+	+

4.4.3. Tasas de infección.

Durante el estudio de la presente memoria se encontraron serias dificultades para la realización de muestreos de seguimiento *in situ* de los parásitos, destinados a la obtención de una serie temporal de datos con los que disponer de una base estadística sólida, a partir de la cual realizar estudios sobre su biología. Dichas dificultades se deben al endoparasitismo de los miembros de la familia Splanchnotrophidae, lo que hizo imposible identificar con certeza la especie de copépodo en su propio hábitat.

Además, la metodología utilizada en la obtención de especímenes de parásito para los trabajos morfológicos y moleculares presenta el inconveniente de que los muestreos de recolección intensivos influyen en la abundancia de los hospedadores y, por extensión, en la de los propios copépodos.

Por estas razones los resultados sobre la biología del parásito que se exponen a continuación se han de interpretar como meramente informativos, y como un posible punto de partida de cara a futuros estudios sobre la familia Splanchnotrophidae.

Los datos de las tasas de infección (número de hospedadores parasitados sobre el total de individuos recolectados) hacen referencia únicamente a aquellos muestreos en los que se encontraron individuos parasitados.

En lo que respecta a *Lomanotocola* sp. nov., de un total de 901 individuos de *Doto lemchei*, *Eubranchus* sp., *Doto pinnatifida* y *Doto koenneckeri* estudiados, se encontraron parasitados sólo 127, lo que representa el 14,095 % del total.

En las Tablas 7, 8, 9 y 10 se muestran las diferentes tasas de infección que se encontraron en cada una de las especies hospedadoras de *Lomanotocola* sp. nov., indicando la estación de muestreo, la fecha, número de ejemplares recogidos y número de ejemplares parasitados, incluyendo los realizados por el profesor V. Urgorri para la colección “Opisthobranchios de Galicia”.

Tabla 7. Tasa de infección total de la especie *Lomanotocola* sp. nov. en el nudibranquio *Doto lemchei*.

<i>Doto lemchei</i>			
Estación	Fecha	Recolectados	Parasitados
E14	05/08/1996	27	9
E15	11/07/2012	1	1
E20	12/07/2012	10	1
E17	30/07/2012	3	1
E20	19/06/2013	27	2
E20	03/07/2013	32	7
E20	10/07/2013	50	4
E20	18/06/2014	37	16
E20	15/07/2014	52	8
E20	23/07/2014	38	3
E20	08/08/2014	25	2
TOTAL		302	54
TASA INFECCIÓN		17,88%	

Tabla 8. Tasa de infección total de la especie *Lomanotocola* sp. nov. en el nudibranquio *Eubbranchus* sp.

<i>Eubbranchus</i> sp.			
Estación	Fecha	Recolectados	Parasitados
E20	03/07/2013	25	6
E20	10/07/2013	18	6
E14	30/07/2013	21	2
TOTAL		64	14
TASA INFECCIÓN		21,87%	

Tabla 9. Tasa de infección total de la especie *Lomanotocola* sp. nov. en el nudibranquio *Doto pinnatifida*.

<i>Doto pinnatifida</i>			
Estación	Fecha	Recolectados	Parasitados
E7	26/08/1986	12	3
E10	23/08/1992	22	3
E8	22/08/1996	39	5
E10	09/08/2012	5	1
E7	23/07/2013	14	1
E11	22/08/2013	6	6
E10	17/01/2014	16	3
E10	10/03/2014	5	1
E10	09/05/2014	17	1
E11	28/05/2014	17	3
E10	27/08/2014	35	1
E10	03/09/2014	23	6
E11	03/09/2014	17	1
E10	02/10/2014	19	2
E10	17/11/2014	13	1
TOTAL		260	38
TASA INFECCIÓN		14,61%	

Tabla 10. Tasa de infección total de la especie *Lomanotocola* sp. nov. en el nudibranquio *Doto koenneckeri*.

<i>Doto koenneckeri</i>			
Estación	Fecha	Recolectados	Parasitados
E7	20/08/1986	51	4
E7	26/08/1986	10	1
E10	26/04/2013	2	1
E7	23/07/2013	5	4
E10	09/05/2014	3	1
E12	14/05/2014	39	2
E12	21/05/2014	37	2
E12	26/05/2014	101	3
E20	18/06/2014	24	2
E20	19/06/2014	3	1
TOTAL		275	21
TASA INFECCIÓN		7,63%	



Splanchnotrophus gracilis se encontró parasitando 139 *Trapania tartanella* de 153 recolectadas, lo que supone una tasa de infección del 90,85%. Los datos se desglosan en la Tabla 11.

Tabla 11. Tasa de infección total de la especie *Splanchnotrophus gracilis* en el nudibranquio *Trapania tartanella*.

<i>Trapania tartanella</i>			
Estación	Fecha	Recolectados	Parasitados
E14	02/08/1992	22	19
E14	21/08/1992	3	2
E14	23/08/1992	3	2
E14	01/08/1996	4	2
E14	05/08/1996	3	3
E14	05/08/2009	85	81
E14	24/05/2010	18	18
E14	20/09/2010	6	6
E14	31/07/2014	9	6
TOTAL		153	139
TASA INFECCIÓN		90,85%	

4.4.4. Carga parasitaria.

La carga parasitaria se define como el número de individuos del parásito por cada hospedador.

En el caso de *Lomanotricula* sp. nov., se estudiaron 88 individuos de nudibranquios parasitados. En todos ellos apareció una única hembra, mientras que el número de machos fue variable: en 34 nudibranquios no apareció ninguno, en 48 había un único macho, en 5 casos se encontraron 2 machos y únicamente en uno de los nudibranquios cohabitaban más de 5.

En todos los ejemplares de *Trapania tartanella* infectados por *Splanchnotrophus gracilis* se encontró como mínimo una hembra y en uno de los hospedadores 4 hembras, de las cuales solamente una se encontraba en estado adulto. Los machos no siempre

aparecieron en los nudibranchios infectados por hembras (en 45 casos del total) y por lo general su número varió entre 1 y 4 individuos. La carga parasitaria máxima se encontró en un único ejemplar de *Trapania tartanella* que portaba 43 parásitos en su interior, probablemente algunos de ellos copepoditos.

4.4.5. Tamaño del hospedador.

Se anotó la longitud corporal de 32 hospedadores de *Lomanotocola* sp. nov. para estudiar una posible correlación entre el tamaño del hospedador y la incidencia de la infección. Los resultados se muestran, desglosados por especie hospedadora, en la Figura 85. En ella se observa que la mayor abundancia está en los nudibranchios de tamaño intermedio (19 ejemplares).

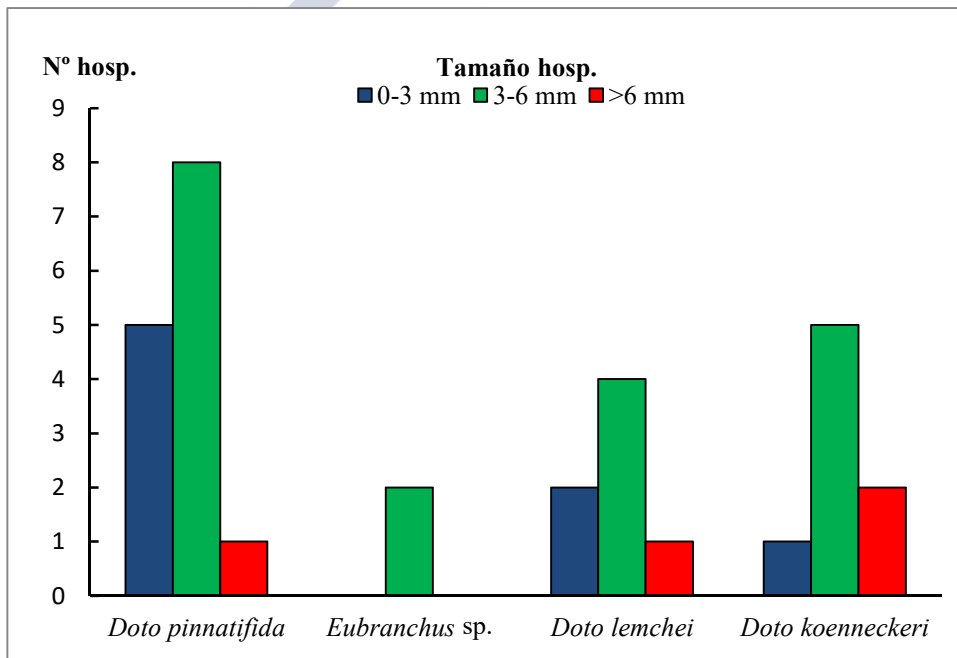


Figura 85. Gráfico en el que se indica el número de individuos de los diferentes hospedadores de *Lomanotocola* sp. nov. en relación a su longitud (hosp.: hospedador).

4.4.6. Posición en el hospedador.

La posición más frecuente en la que se encontró la hembra de *Lomanotricula* sp. nov. dentro de sus diferentes hospedadores fue siguiendo el eje antero-posterior del lado derecho, con el cefalosoma orientado hacia el pie y el urosoma penetrando el tegumento de la zona dorsal, de manera que los sacos ovíferos quedaban flanqueados por los ceratas (Fig. 21A-C, E, F; Fig. 22A-C). Los machos aparecieron en posiciones variables, como por ejemplo en la cavidad corporal posterior del nudibranchio, en las proximidades del pericardio, en la zona ventral, en contacto con la hembra, en el aparato reproductivo, etc.

Las hembras de *Splanchnotrophus gracilis* mostraron un posicionamiento preferencial, ocupando con su cuerpo la cavidad corporal posterior del hospedador y abrazando con sus apéndices laterales la gónada (Fig. 20), llegando hasta la parte anterior del nudibranchio en donde las puntas de los apéndices se encontraban enredadas con las porciones tubulares del aparato reproductivo del hospedador. Perforan la pared corporal del nudibranchio con el urosoma a nivel de la papila anal, entre las branquias, de donde sale un par de sacos ovíferos (Fig. 21D, Fig. 22D). El cefalosoma de la hembra se encontraba orientado hacia la parte ventral del hospedador, con las piezas bucales próximas a la gónada pero sin llegar a entrar en contacto con ella. Los machos mostraron variabilidad en cuanto a su posicionamiento dentro del hospedador, pero se encontraron con más frecuencia libres en la cavidad corporal posterior, cerca de la hembra (Fig. 20B). Otras posiciones que ocupaban con frecuencia fueron el aparato reproductivo, la porción ventral de la gónada, el interior de los procesos peribranchiales y el pericardium. Se observó que en dos hospedadores machos maduros se encontraban situados entre el primer y el segundo apéndices laterales de la hembra, en contacto con ella, y su parte ventral dirigida hacia la gónada del hospedador y fijados a la misma.

4.4.7. Efectos en el hospedador.

De los 93 hospedadores de *Lomanotricula* sp. nov. de los que se tomaron datos, en 77 (82,79%) la condición de la gónada era normal, en 7 (7,52%) estaba reducida y en 9 (9,67%) completamente ausente. Excepto en uno de los casos, todos los nudibranchios con gónadas reducidas o ausentes eran *Doto pinnatifida*.

En todos los ejemplares de *Trapania tartanella* que estaban parasitadas por *Splanchnotrophus gracilis* la gónada no presentaba ninguna diferencia con respecto a los nudibranchios no infectados.

Durante el tiempo que se mantuvieron con vida en el laboratorio, todos los hospedadores parasitados por las diferentes especies de esplanctotróficos realizaban cópulas y puestas aparentemente normales.

En dos casos, se observó como una hembra de *Lomanotocola* sp. nov. y una hembra de *Splanchnotrophus gracilis* rompían el tegumento de sus hospedadores (*Doto koenneckeri* y *Trapania tartanella*, respectivamente) para salir al exterior, muriendo al cabo de poco tiempo tanto los nudibrancios como los copépodos (Fig. 86).

4.4.8. Presencia estacional.

Tanto *Lomanotocola* sp. nov. como *Splanchnotrophus gracilis* aparecen infectando a sus hospedadores en los meses de la primavera-verano (marzo-agosto), con la excepción de los especímenes de *Doto pinnatifida* parasitados por *Lomanotocola* sp. nov. en enero y noviembre de 2014.



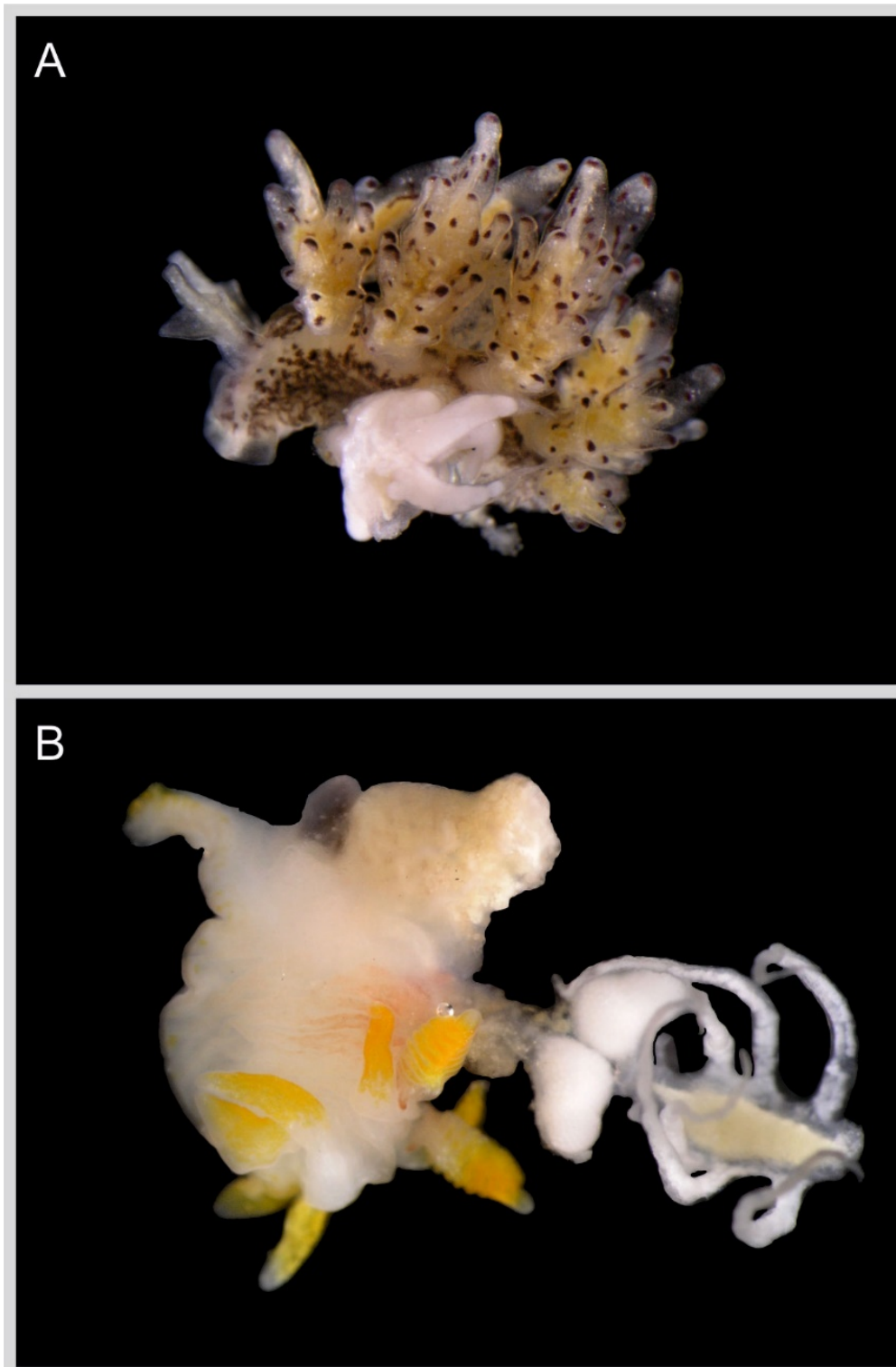


Figura 86. Hembras de copépodo saliendo de sus hospedadores. **A.** Hembra de *Lomanotocola* sp. nov. saliendo de *Doto koenckeri*. **B.** Hembra de *Splanchnotrophus gracilis* saliendo de *Trapania tartanella*.



Capítulo 5.

Discusión



5.1. Morfología.

5.1.1. Variabilidad hospedador-dependiente en *Lomanotocola* sp. nov.

En el apartado del estudio anatómico se puso en evidencia la variabilidad hospedador-dependiente de los procesos posteriores de las hembras de *Lomanotocola* sp. nov., lo que supone un caso llamativo. La variabilidad en la forma de estas estructuras ya fue citada por HUYS (2001) en el copépodo *Splanchnotrophus angulatus* y por ABAD *et al.* (2011) en *Splanchnotrophus gracilis*, aunque en estos parásitos las diferencias se daban entre ejemplares de una misma especie hospedadora.

El origen de este fenómeno, así como la variabilidad corporal de las hembras, podría hallarse en el desarrollo peramórfico. Durante su desarrollo las hembras adaptan el crecimiento al entorno físico en el que tiene lugar, en este caso la cavidad corporal del hospedador (HUYS, 2001). Esto coincidiría con la variabilidad observada en *Lomanotocola* sp. nov.: los parásitos con la forma de los procesos posteriores más divergente respecto a lo observado en la mayoría de ejemplares son los que se extrajeron de *Eubranchus* sp., cuya anatomía interna es diferente a la del género *Doto* (BABA, 1960; LEMCHE, 1976; ORTEA & URGORRI, 1978; ORTEA, 1979; LLERA & ORTEA, 1981).

5.1.2. Larvas nauplius.

En base al número, segmentación y patrón de ornamentación de los apéndices (anténula, antena y mandíbula) se determina que el estadio observado en las larvas de *Lomanotocola* sp. nov. y *Splanchnotrophus gracilis* es el de nauplius I (IZAWA, 1987).

Hasta el presente, únicamente BELCIK (1981) había descrito la larva nauplius de un representante de la familia Splanchnotrophidae, en concreto de *Ismaila monstrosa* (Fig. 87A). Las larvas encontradas por BELCIK (1981) presentan una anatomía externa muy similar a las de *Lomanotocola* sp. nov. y *Splanchnotrophus gracilis*. La anténula unirrámea y la antena birrámea también coinciden con lo observado en *Lomanotocola* sp. nov. y *Splanchnotrophus gracilis*. Las mayores diferencias aparecen en la ornamentación de estos apéndices y la mandíbula unirrámea que posee la larva nauplius de *Ismaila monstrosa*.

La estructura de los apéndices de las larvas nauplius I de las dos especies estudiadas son muy similares al patrón general que describe IZAWA (1987) para el orden Poecilostomatoida. La segmentación, número y posición de las sedas de la anténula son idénticas en la larva N-1 (Fig. 87B). La segmentación de la antena se corresponde

completamente con la descrita en el trabajo antes citado, así como la ornamentación general, siendo la diferencia más importante la existencia del proceso coxal (Fig. 87C). La segmentación de la mandíbula también es similar, aunque en las N-1 observadas en la presente memoria el exopodito solamente tiene 3 segmentos frente a los 4 señalados por IZAWA (1987) (Fig. 87D).

En términos generales, las larvas nauplius I de *Lomanoticola* sp. nov. y de *Splanchnotrophus gracilis* son muy parecidas entre sí. La forma corporal, la estructura y segmentación de anténulas, antenas y mandíbulas, así como la forma de las ramas caudales son casi idénticas en ambas especies. Únicamente se diferencian por la proporción de los artejos de anténulas, antenas y mandíbulas, y por el mayor número de sedas plumosas que posee la larva nauplius I de *Splanchnotrophus gracilis* en las mandíbulas.

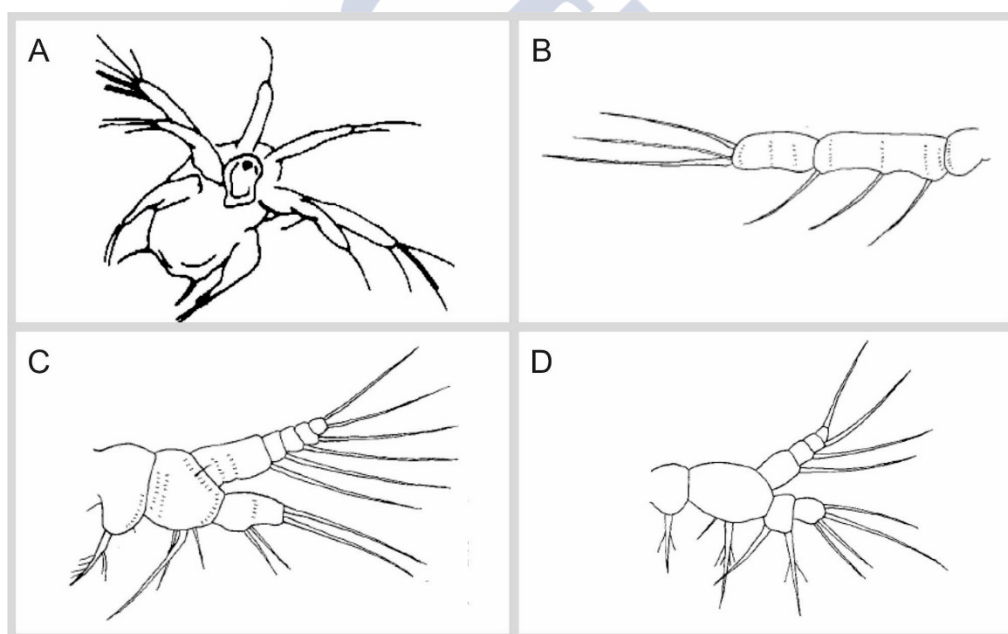


Figura 87. Anatomía de la larva nauplius. **A.** Larva nauplius I de *Ismaila monstrosa* (tomado de BELCIK, 1981). **B.** Anténula generalizada de la larva nauplius I de Poecilostomatoida (tomado de IZAWA, 1987). **C.** Antena generalizada de la larva nauplius I de Poecilostomatoida (tomado de IZAWA, 1987). **D.** Mandíbula generalizada de la larva nauplius I de Poecilostomatoida (tomado de IZAWA, 1987).

5.1.3. *Lomanotricula* vs. familia Splanchnotrophidae.

Tradicionalmente, el género *Splanchnotrophus* siempre ha sido el más relacionado con el género *Lomanotricula*, en base a la similitud entre los apéndices cefálicos y áreas de distribución de ambos taxones. Esto llevó a que *Lomanotricula* fuese considerado como sinónimo o subgénero de *Splanchnotrophus* (HANCOCK & NORMAN, 1863; HECHT, 1895; MONOD & DOLLFUS, 1932; BELCIK, 1981; JENSEN, 1990) hasta que HUYS (2001) lo considera con categoría de género. Comparando los datos morfológicos de ambos taxones se confirma que su relación es estrecha, dado que los apéndices cefálicos, toracópodos y ramas caudales presentan una estructura, segmentación y ornamentación muy parecidas en los dos casos, y a su vez son diferentes de los demás géneros de la familia Splanchnotrophidae (Tabla 12). A pesar de ello, se observan importantes divergencias entre ambos géneros que respaldan la clasificación como género propio de *Lomanotricula* propuesta por HUYS (2001):

- Forma y longitud de los apéndices laterales, más cortos y robustos en el género *Lomanotricula*.
- Procesos posteriores de las hembras, que en el género *Splanchnotrophus* son más aplanados y están más desarrollados que los del género *Lomanotricula*.
- Posición y número de las sedas de la anténula, más abundantes en el 3^{er} artejo del género *Lomanotricula*.
- Posición y estructura de las espinas del 1^{er} y 2^o artejo de la antena, más robustas en el género *Lomanotricula*, así como en el número y posición de los elementos de ornamentación del artejo distal (4 en el género *Lomanotricula* y 5 en el género *Splanchnotrophus*).
- Maxílula más reducida en el género *Lomanotricula*.
- Espina de la maxila más robusta en el género *Splanchnotrophus*.
- Patrón de distribución y forma de las sedas de las ramas caudales, que, por lo general, están más reducidas en el género *Lomanotricula*.
- Los opérculos genitales de los machos del género *Splanchnotrophus* poseen un mayor número de elementos de ornamentación.

Comparado con el resto de géneros de la familia Splanchnotrophidae, el género *Lomanotricula* posee diferencias importantes. Con respecto al género *Ismaila* las más evidentes son la ornamentación de la maxílula (mucho más desarrollada y con más elementos de ornamentación en el género *Ismaila*), la forma del 2^o y 3^{er} par de

toracópodos (de tamaño mucho mayor en el género *Ismaila*) y la anatomía externa de los machos (piriforme en varias especies del género *Ismaila*).

Las diferencias más evidentes que posee el género *Ceratosomicola* con el género *Lomanotocola* se refieren a la ornamentación de la mandíbula, a la estructura de los toracópodos 2º y 3º (que en el género *Ceratosomicola* se encuentran parcialmente incluidos en la pared corporal) y a la anatomía externa de los machos, piriformes y con lóbulos en el género *Ceratosomicola*.

El género *Arthurius* es considerado como el más divergente dentro de la familia Splanchnotrophidae, dada la reducción de anténulas, antenas y ausencia de piezas bucales que se observa. En una comparación con el género *Lomanotocola* esta divergencia se mantiene (Tabla 12).

Finalmente, el género *Majimun* se puede diferenciar del género *Lomanotocola* en base a varios caracteres, siendo los más evidentes la forma de los apéndices laterales (más largos y delicados en el género *Majimun*), la forma de los toracópodos 2º y 3º (parcialmente incluidos en la pared corporal en el género *Majimun*) y la anatomía externa del macho, que en el caso del género *Majimun* es piriforme.

Los principales caracteres diferenciadores del género *Lomanotocola*, así como de los restantes 5 géneros de la familia, se exponen en la Tabla 12 a modo de comparación.



Tabla 12. Principales caracteres diferenciadores del género *Lomanotocola* comparados con los géneros de la familia Splanchnotrophidae.

	<i>Lomanotocola</i>	<i>Splanchnotrophus</i>	<i>Ismaila</i>	<i>Ceratosomicola</i>	<i>Arthurius</i>	<i>Majimun</i>
Apéndices laterales	3 pares latero-ventrales, cortos y robustos	3 pares latero-ventrales, largos y delicados	3 pares latero-dorsales, robustos	3 latero-ventrales, largos y delicados	3 pares laterales y 1-3 pares (según la especie) antero-ventrales, largos y con un bulbo apical	3 pares latero-ventrales, alargados
Anatomía externa ♂	Ciclopiforme	Ciclopiforme	Ciclopiforme o piriforme, según la especie	Piriforme, con dos lóbulos ventrales y otros 2 latero-dorsales	Ciclopiforme	Piriforme
Sacos ovígeros	Reniformes	Reniformes	Cilíndricos	Cilíndricos	Cilíndricos	Cilíndricos y espirales
Anténula	4 artejos	4 artejos	2 artejos	3-4 artejos, según la especie	1 artejo	3 artejos
Antena	3 artejos, 3 ^{er} artejo con 4 elementos de ornamentación	3 artejos, 3 ^{er} artejo con 5 elementos de ornamentación	3 artejos	3 artejos, 3 ^{er} artejo con 6 elementos de ornamentación	2 artejos, 3 ^{er} artejo con 6 elementos de ornamentación en ♀	3 artejos
Labrum	Bilobulado	Bilobulado	Forma de media luna, con pliegues mediales	Bilobulado	Ausente en ♀, muy reducido en ♂	Bilobulado, con un par extra de lóbulos en posición dorsal
Labium	Circular, con sédulas	Circular, con sédulas	Circular, con sédulas	Circular, con 2 procesos ventro-laterales	Ausente	Circular, con sédulas y una protusión espiniforme
Mandíbula	Gnatobase con 4-5 procesos dentiformes	Gnatobase con 4-5 procesos dentiformes	Gnatobase con una seda pinnada	Gnatobase ornamentada con múltiples espinas	Ausente	Gnatobase con 3 procesos dentiformes

	<i>Lomanotocola</i>	<i>Splanchnotrophus</i>	<i>Ismaila</i>	<i>Ceratosomicola</i>	<i>Arthurius</i>	<i>Majimun</i>
Maxílula	Proceso con apariencia de seda, fusionado a la mandíbula	Proceso con apariencia de seda, fusionado a la mandíbula	Ornamentada con 2-10 sedas pinnadas, según la especie	Ausente	Ausente	Ausente
Maxila	2 artejos, alobase con 1 seda y 1 espina	2 artejos, alobase con 1 seda y 1 espina	2-3 artejos según la especie	1-2 artejos, según la especie	2 artejos, 1 seda en la alobase.	2 artejos, alobase con 1 seda y 1 proceso espiniforme
2º par de toracópodos	Birrámico, exopodito más largo. Seda protopodial	Birrámico, exopodito más largo. Seda protopodial	Unirrámico o birrámico, según la especie. Muy desarrollado	Birrámico, protopodito incorporado a la pared corporal	Birrámico, vestigial en ♀	Birrámico, protopodito incorporado a la pared corporal
3º par de toracópodos	Birrámico exopodito más largo. Seda protopodial	Birrámico exopodito más largo. Seda protopodial	Birrámico, muy desarrollado	Birrámico, protopodito incorporado a la pared corporal	Birrámico, vestigial en ♀	Birrámico, protopodito incorporado a la pared corporal
4º par de toracópodos	Si está presente, unirrámico	Unirrámico	Si está presente, unirrámico, rudimentario	Si está presente, birrámico o unirrámico, según la especie	Ausente	Unirrámico
5º par de toracópodos	Ausente	Ausente	Si está presente, birrámico y rudimentario	Si está presente, reducido y con apariencia de seda	Ausente	Ausente
Ramas caudales	7 sedas	7 sedas	3-6 sedas, según la especie	3 elementos terminales espiniformes	Sin ornamentación en ♀, con 2 espinas en ♂	7 sedas

5.2. Delimitación molecular de especies.

El gen mitocondrial COX1 muestra suficiente variación en su secuencia de nucleótidos e información filogenética entre especies congénicas como para permitir fácilmente resolver diferencias entre especies de la familia Splanchnotrophidae. Esto coincide con estudios previos que emplean el gen COX1 para estudiar la diversidad en copépodos pertenecientes a otras familias del orden Poecilostomatoida (BÖTTGER-SCHNACK & MACHIDA, 2011), así como al orden Harpacticoida Sars M., 1903 (BURTON & LEE, 1994; ROCHA-OLIVARES *et al.*, 2001; KARANOVIC *et al.*, 2015), al orden Calanoida Sars G.O., 1903 (HILL *et al.*, 2001; BUCKLIN *et al.*, 2003; GOETZE, 2003; DA COSTA *et al.*, 2011; CORNILS *et al.*, 2014; GUTIÉRREZ-AGUIRRE *et al.*, 2014) y al orden Siphonostomatoida Thorell, 1859 (BURGOS, 2003; GOLLNER *et al.*, 2011).

En *Lomanotricula* sp. nov. el estudio del gen COX1 revela que los individuos de copépodo extraídos de los diferentes hospedadores pertenecen a una única especie, ya que los valores de distancias intraespecíficas e interespecíficas estimadas y su agrupamiento monofilético en el árbol NJ son congruentes con la definición de un taxón específico. Dichas distancias muestran en la monofilética *Lomanotricula* sp. nov. unos valores similares a los observados entre y dentro de otras especies de la familia Splanchnotrophidae.

El gen COX1 ha ayudado también a la hora de aclarar si la variabilidad hospedador-dependiente de los procesos posteriores encontrada entre los individuos de *Lomanotricula* sp. nov. examinados en el estudio anatómico eran debidas a variabilidad intraespecífica o interespecífica, ya que todos los individuos se agrupan en un mismo clado distribuidos heterogéneamente respecto del hospedador en el que fueron encontrados.

La agrupación del individuo con código LOM27 dentro del clado de *Lomanotricula* sp. nov. confirma la suposición, basada en el estudio anatómico, de que *Lomanotricula* sp. y *Lomanotricula* sp. nov. son la misma especie. Gracias a ello se añade al conjunto de hospedadores de *Lomanotricula* sp. nov. al nudibranquio *Cuthona caerulea*, y permite suponer que un espécimen de copépodo encontrado en la Ría de Ares parasitando a *Cuthona caerulea* pertenece también a la especie *Lomanotricula* sp. nov. Además, el área de distribución geográfica de *Lomanotricula* sp. nov. se extiende de Galicia a Banyuls, ya que el ejemplar LOM27 fue recolectado en esta localidad francesa (Tabla 3).

Las especies *Splanchnotrophus gracilis* y *Splanchnotrophus angulatus* aparecen claramente diferenciadas entre sí por las distancias genéticas interespecíficas y ambas

forman dos clados monofiléticos bien soportados, lo que es congruente con los estudios morfológicos previos (HUYS, 2001; ABAD *et al.*, 2011).

También *Ismaila robusta* e *Ismaila aliena* se presentan como dos especies diferenciadas, tal y como indicaban los datos morfológicos (HUYS, 2001; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; ANTON & SCHRÖDL, 2013a).

En todos los casos los especímenes de la familia Splanchnotrophidae analizados se agrupan en clados monofiléticos bien definidos que se corresponden con especies identificadas morfológicamente. Esto descarta que puedan existir complejos de especies crípticas en los taxones estudiados, ya que en el caso contrario los individuos pertenecientes a especies caracterizadas morfológicamente aparecerían distribuidos en varios clados separados (HEBERT *et al.*, 2004; WITT *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2006).

Por otra parte mediante la utilización de metodologías de reconstrucción filogenética (NJ) ha sido posible asignar aquellos especímenes de anatomía desconocida a especies conocidas: SPLNCH1 se identifica como *Splanchnotrophus angulatus* y LOM1 y LOM2 como *Lomanotocola* sp. nov. Gracias a ello se añade la especie *Spurilla neapolitana* a la lista de hospedadores de *Splanchnotrophus angulatus* y *Doto fragilis* a la de *Lomanotocola* sp. nov.

5.3. Filogenia de la familia Splanchnotrophidae.

Los altos valores de soporte que poseen los diferentes clados específicos y la agrupación monofilética de éstos en el árbol NJ basado en las distancias genéticas, indican que el gen COX1 tiene la resolución ideal para diferenciar y agrupar especies dentro de la familia Splanchnotrophidae.

Por el contrario, los valores bajos de bootstrapping obtenidos en este estudio para los clados que agrupan los diferentes géneros, muestran que la resolución del gen COX1 para estudiar las relaciones entre estos taxones no es la adecuada. Por ello, las interpretaciones sobre las afinidades de Splanchnotrophidae a niveles superiores al de especie extraídas del árbol filogenético NJ se han de tomar como un estudio preliminar, que deberá ser completado con un mayor número de especies y marcadores moleculares que permitan una mayor resolución a nivel basal de la topología (16S, 18S, etc.).

Esto coincide con HAJIBABAEI *et al.* (2007) cuando afirman que los *barcodes* no tienen señal filogenética suficiente para resolver relaciones evolutivas, especialmente en las categorías taxonómicas superiores; por ello, y aunque las secuencias COX1 se analizan

mediante métodos de reconstrucción filogenética (como NJ, máxima similitud, etc.), los árboles resultantes no deben ser interpretados como estrictos árboles filogenéticos.

En consonancia con lo expuesto anteriormente, el árbol NJ basado en distancias muestra dos topologías que difieren de los agrupamientos esperados teniendo en cuenta los datos morfológicos:

- *Lomanotocola* sp. nov. se presenta como grupo hermano del género *Ismaila*, con un soporte bajo.
- Las dos especies del género *Splanchnotrophus* no se agrupan en un taxón monofilético, si no que la especie *Splanchnotrophus gracilis* aparece como clado hermano al conformado por *Splanchnotrophus angulatus*, *Lomanotocola* sp. nov. y el género *Ismaila*, con valores de soporte bajos.

Respecto al primer caso, el hecho de que las especies de los géneros *Lomanotocola* e *Ismaila* aparezcan en el mismo clado en las reconstrucciones filogenéticas obtenidas a partir de las distancias COX1 (presente estudio; ANTON *et al.*, en prensa) contrasta con las hipótesis precedentes basadas en el análisis de caracteres anatómicos (HUYS, 2001; ANTON & SCHRÖDL, 2013a). Según éstas, la mayor afinidad del género *Lomanotocola* se da con el género *Splanchnotrophus*, bien como géneros hermanos (HUYS, 2001), bien con *Splanchnotrophus* como taxón derivado de *Lomanotocola* (Fig. 88) (ANTON & SCHRÖDL, 2013a). La validez de estas hipótesis se ve respaldada frente a la agrupación del género *Lomanotocola* como grupo hermano del género *Ismaila* por varios motivos:

- En primer lugar, el clado *Ismaila-Lomanotocola* muestra un soporte bajo (presente estudio; ANTON *et al.*, en prensa), del 59% de bootstrapping.
- Tal y como se ha discutido anteriormente, las estructuras con valor taxonómico del género *Lomanotocola* poseen un gran parecido con las observadas en el género *Splanchnotrophus*, frente a las grandes diferencias que presentan con las del género *Ismaila* (HANCOCK & NORMAN, 1863; HECHT, 1893, 1895; HO, 1981; HUYS, 2001; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; ABAD *et al.*, 2011; UYENO & NAGASAWA, 2012; ANTON *et al.*, 2015; presente estudio).
- Los machos y las larvas nauplius I del género *Lomanotocola* tienen numerosas similitudes con los del género *Splanchnotrophus*, mientras que muestran diferencias evidentes con los del género *Ismaila* (BELCIK, 1981; HUYS, 2001; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; ANTON *et al.*, 2015).
- Por último, los géneros *Splanchnotrophus* y *Lomanotocola* son los únicos de la familia Splanchnotrophidae con capacidad de infectar más de dos especies de

hospedadores, mientras que las especies del género *Ismaila* aparecen como estrictamente monoespecíficas (excepto *Ismaila monstrosa*) (HANCOCK & NORMAN, 1863; HECHT, 1893, 1895; HUYS, 2001; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; ABAD *et al.*, 2011; ANTON *et al.*, 2015; ANTON *et al.*, en prensa).

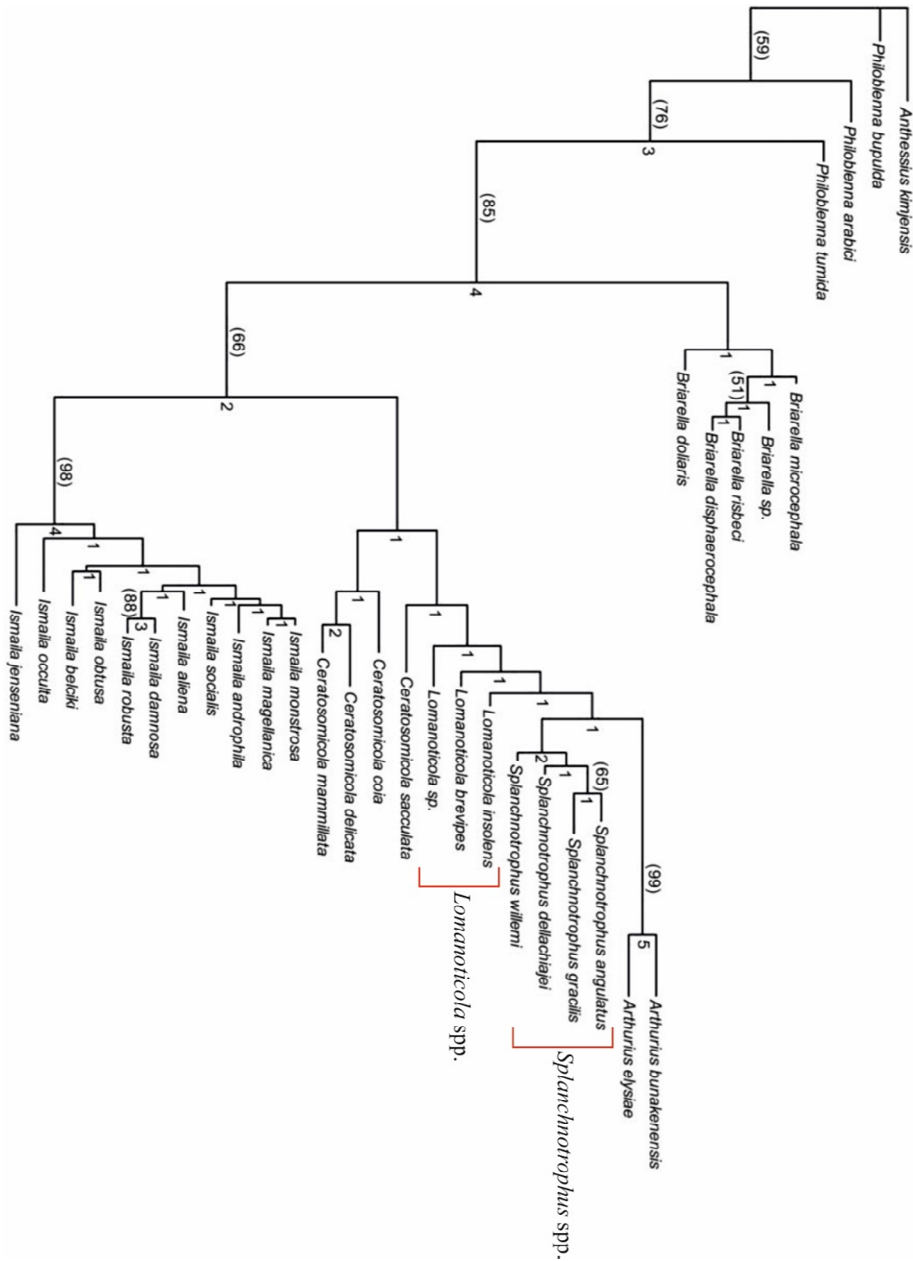


Figura 88. Filogenia de la familia Splanchnotrophidae basada en caracteres morfológicos (tomado de Anton & Schrödl, 2013a). Los clados de *Lomanotocola* spp. y *Splanchnotrophus* spp. se resaltan en rojo.

Por su parte la parafilia del género *Splanchnotrophus* (presente estudio, ANTON *et al.*, en prensa) contradice el agrupamiento monofilético que se obtiene en los estudios basados en la morfología de las diferentes especies del taxón (HUYS, 2001; ANTON & SCHRÖDL, 2013a). De hecho, en la filogenia morfológica de ANTON & SCHRÖDL (2013a), las especies *Splanchnotrophus gracilis* y *Splanchnotrophus angulatus* aparecen en el mismo clado (Fig. 88). Debido al bajo soporte (50% de bootstrapping) que posee la topología parafilética de las especies del género *Splanchnotrophus* en la reconstrucción NJ, surgen dudas acerca de la validez de este agrupamiento.

A pesar de las inconsistencias mencionadas, la familia Splanchnotrophidae aparece como un taxón monofilético en el árbol NJ, lo que coincide con los estudios sobre las relaciones filogenéticas realizados hasta la fecha, tanto aquellos basados en datos morfológicos (HUYS, 2001; ANTON & SCHRÖDL, 2013a) como en moleculares (ANTON *et al.*, en prensa). El género *Ceratosomicola* supone una excepción a la monofilia de la familia Splanchnotrophidae, ya que se agrupa en un clado junto con el grupo externo. Esto podría explicarse por el fenómeno de la atracción por rama larga (*Long-Branch Attraction* o LBA), un artefacto propio de las reconstrucciones filogenéticas que puede aparecer cuando se utiliza un grupo externo distante que atrae hacia sí a la especie más divergente del grupo de estudio, formando ambos taxones un único clado de ramas largas (PHILIPPE & LAURENT, 1998; BERGSTEN, 2005; LARTILLOT *et al.*, 2007).

5.4. Especificidad hospedador-parásito.

Gracias al estudio anatómico y a la delimitación basada en la divergencia genética del gen COX1, se determina que *Lomanotricula* sp. nov. es una única especie que parasita a 7 especies diferentes de nudibrancios: *Doto pinnatifida*, *Doto koenneckeri*, *Doto lemchei*, *Doto eireana*, *Doto fragilis*, *Eubranhus* sp. y *Cuthona caerulea*, pertenecientes a tres géneros de los parvódenes Dendronotida y Aeolidida.

La variabilidad de hospedador en *Lomanotricula* sp. nov. es congruente con la ausencia de linajes mitocondriales específicos para los individuos obtenidos de un hospedador común. Esta estrategia sería compartida por otras especies tales como *Splanchnotrophus angulatus* o *Splanchnotrophus gracilis*, frente a la especificidad de hospedador observada en las especies de los géneros *Ismaila* (HUYS, 2001; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; ANTON *et al.*, 2015; ANTON *et al.*, en prensa.), *Ceratosomicola* y *Arthurius* (HUYS, 2001; SALMEN *et al.*, 2008a, b; ANTON *et al.*, 2015). Ambas estrategias evidencian sendas tendencias evolutivas. En los géneros basales *Ismaila*, *Arthurius* y *Ceratosomicola* la diversificación mediante cambio de hospedador (*host switching*)

redujo la habilidad de infectar al hospedador original, creando con el tiempo una barrera reproductiva entre los parásitos de dicho hospedador y los del nuevo. En cambio, el ancestro común de los géneros *Lomanotocola*, *Splanchnotrophus* y, probablemente, *Majimun* habría desenvuelto la capacidad de parasitar nuevas especies de hospedador sin perder el flujo genético con los individuos de los hospedadores iniciales (ANTON *et al.*, en prensa). Esta estrategia tiene la ventaja, sobre la seguida por las especies monoespecíficas, de asegurar una mayor tasa de supervivencia del parásito ante eventos de gran mortalidad de la especie hospedadora.

Los géneros polípagos *Lomanotocola* y *Splanchnotrophus* también albergan especies monoespecíficas. En el caso del género *Splanchnotrophus*, la capacidad de parasitar una o varias especies de hospedadores parece tener una correlación geográfica, ya que las especies japonesas *Splanchnotrophus helianthus* y *Splanchnotrophus imagawai* son monoespecíficas, mientras que sus congéneres europeos pueden infectar a varias especies de nudibranquio (UYENO & NAGASAWA, 2012). Dado que las especies que presentan monoespecificidad son las menos estudiadas de estos dos géneros (*Lomanotocola insolens*, *Splanchnotrophus helianthus* y *Splanchnotrophus imagawai*), surge la cuestión de si esta monoespecificidad es real o simplemente no se han encontrado más hospedadores de esa especie.



5.5. Biología.

La distribución geográfica de *Lomanotricula* sp. nov. es similar a la de *Lomanotricula insolens*, ya que ambas aparecen tanto en el Atlántico nororiental como en el Mediterráneo (Figs. 82, 89A) (SCOTT & SCOTT, 1895; DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1950; HUYS, 2001). En cambio, *Lomanotricula brevipes* únicamente se encuentra en las Islas Británicas, norte de Francia y Mar Báltico (Fig. 89B) (ALDER & HANCOCK, 1845; HANCOCK & NORMAN, 1863; HECHT, 1895; HUYS, 2001).

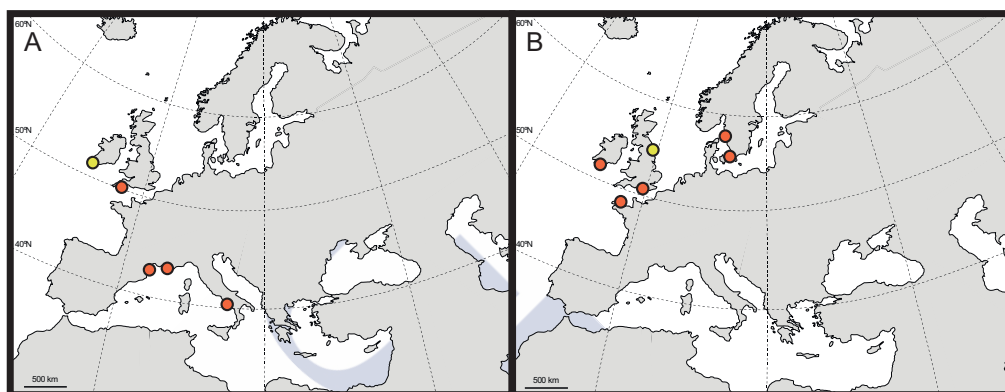


Figura 89. Mapas de la distribución de *Lomanotricula* spp. **A.** *Lomanotricula insolens*. **B.** *Lomanotricula brevipes* (círculo amarillo: localidad tipo).

En el caso de *Splanchnotrophus angulatus*, se amplía notablemente su distribución geográfica conocida, ya que hasta el momento sólo se había citado en el Canal de la Mancha. Su presencia en el Atlántico y en el Mediterráneo supone una excepción a lo observado en las especies europeas de este género, ya que están restringidas a de una de esas dos áreas: *Splanchnotrophus gracilis* y *Splanchnotrophus willemi* en el Atlántico (ALDER & HANCOCK, 1845; HANCOCK & NORMAN, 1863; SALMEN, 2005; ABAD *et al.*, 2011) y *Splanchnotrophus dellachiajei* en el Mediterráneo (DELLE CHIAJE, 1841; MONOD & DOLLFUS, 1932; DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1950; LAUBIER, 1964; HUYS, 2001).

En el caso de la *Lomanotricula* sp. nov., *Lomanotricula insolens* y *Splanchnotrophus angulatus*, se observa que su área de distribución es relativamente amplia, lo que podría explicarse gracias a la elevada capacidad de dispersión que confieren las larvas nauplius pelágicas (SCHRÖDL, 2002).

La frecuencia de infección de opistobranquios encontrada en las rías de Ferrol y Ares (7,75%) es inferior que la observada por SCHRÖDL (2002) en las costas de Chile (13%).

Las tasas de infección de *Lomanoticola* sp. nov. y *Splanchnotrophus gracilis* son muy diferentes entre sí, ya que en el caso de *Lomanoticola* sp. nov. es de 14,09%, mientras que en el caso *Splanchnotrophus gracilis* es de 90,85%. Este valor se aproxima al más alto registrado hasta el momento, que se corresponde con el 96% de los individuos del nudibranquio *Thecacera darwini* infectados por *Ismaila* spp. en Chile (SCHRÖDL, 2002).

La forma en la que las hembras de *Lomanoticola* sp. nov. se posicionan dentro de sus diferentes hospedadores coincide con lo encontrado para *Lomanoticola brevipes* y *Lomanoticola insolens* (HANCOCK & NORMAN, 1863; SCOTT & SCOTT, 1895; DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1950). Dada la anatomía interna de los nudibranquios que parasita el género *Lomanoticola*, esta posición parece la más idónea para aprovechar al máximo el espacio disponible sin dañar al hospedador.

Algo parecido ocurre con la especie *Splanchnotrophus gracilis*, cuya posición en sus hospedadores es idéntica a la anteriormente descrita para esta especie (HANCOCK & NORMAN, 1863; HUYS, 2001), así como para otras especies del género que parasitan doridáceos (HUYS, 2001; MARSHALL & HAYWARD, 2006).

Salvo excepciones, la carga parasitaria observada en *Lomanoticola* sp. nov. y en *Splanchnotrophus gracilis* es similar a la encontrada en otros géneros de la familia, donde una única hembra comparte hospedador con un número variable y relativamente bajo de machos (HANCOCK & NORMAN, 1863; SCOTT & SCOTT, 1895; DELAMARE DEBOUTTEVILLE, 1950; BELCIK, 1981; JENSEN, 1987, 1990; SCHRÖDL, 1997, 2002; HUYS, 2001; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; SALMEN *et al.*, 2008a, b; ABAD *et al.*, 2011; ANTON *et al.*, 2015), con la notable excepción de los 425 individuos de *Ismaila occulta* encontrados dentro del nudibranquio gigante *Dendronotus iris* Cooper, 1863 (HO, 1981).

Los datos obtenidos sobre el tamaño del hospedador de *Lomanoticola* sp. nov. muestran que los copépodos se encuentran en nudibranquios de todos los rangos de longitudes. Ello plantea dos explicaciones: la infección tiene lugar durante el estadio juvenil y el hospedador continúa su crecimiento alojando al copépodo, o, por el contrario, el parásito selecciona a sus objetivos indistintamente de su tamaño.

Los efectos que producen las especies de la familia Splanchnotrophidae en sus hospedadores son variables y oscilan desde daños o atrofia en la gónada (BERGH, 1868; JENSEN, 1987; SCHRÖDL, 1997; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; MARSHALL & HAYWARD, 2006) e inhibición de la cópula (JENSEN, 1990) hasta la ausencia de daño

alguno en la anatomía interna (JENSEN, 1990; HAUMAYR & SCHRÖDL, 2003; SALMEN *et al.*, 2008a, b; ABAD *et al.*, 2011; ANTON *et al.*, 2015). Pero la infección no solamente produce efectos visibles en las vísceras del hospedador o en su comportamiento reproductivo, ya que se ha demostrado mediante experimentos en laboratorio que los especímenes infectados por especies de la familia Splanchnotrophidae tienen mayores tasas de mortalidad que los no infectados (SCHRÖDL, 1997; WOLFF, 2014) y que una parte de su esfuerzo reproductivo es redirigido hacia el del propio parásito (WOLFF, 2014).

En el caso de *Lomanoticola* sp. nov., los nudibrancios parasitados copulaban y realizaban puestas con normalidad y en su mayoría no presentaban daños en su gónada. Curiosamente, los únicos casos en los que se observó algún efecto negativo en las vísceras del hospedador se corresponden con el nudibranciuo *Doto pinnatifida*. Esto podría deberse a una infección más temprana que en las otras especies de hospedador, ya que de esta manera la hembra del copépodo compite por el espacio con la gónada del nudibranciuo cuando todavía no está desarrollada.

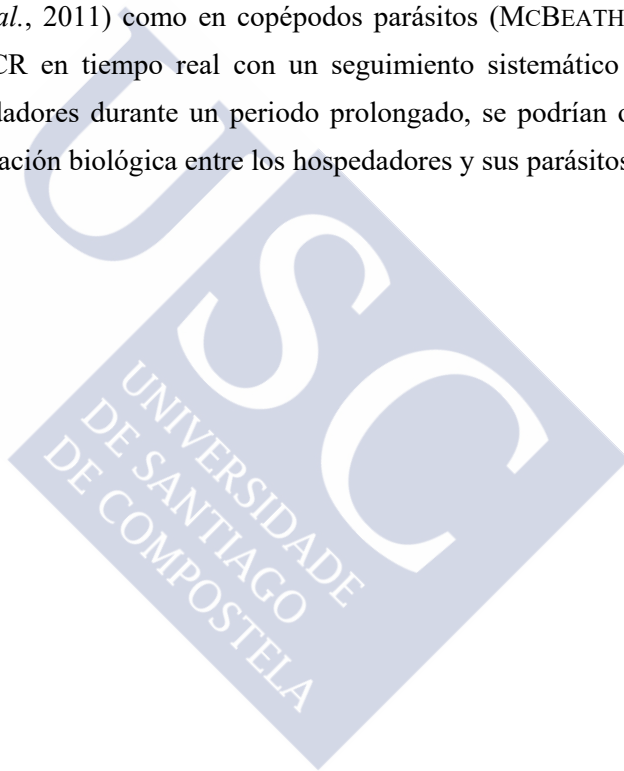
Por su parte, las gónadas de la especie *Trapania tartanella* de especímenes infectados por *Splanchnotrophus gracilis* no presentaban ninguna diferencia apreciable con respecto a individuos no parasitados.

El comportamiento mediante el cual la hembra del parásito rompe la pared corporal de su hospedador ya ha sido observado en otras ocasiones en los géneros *Ismaila* y *Splanchnotrophus* (SCHRÖDL, 1997; ABAD *et al.*, 2011) y esta es la primera vez que se registra en el género *Lomanoticola*. El escape del hospedador parece desencadenarse en momentos en los que éste se encuentra en condiciones de deterioro (MARSHALL & HAYWARD, 2006; ANTON & SCHRÖDL, 2013b). Las razones de este comportamiento no están claras, ya que tanto la hembra del copépodo como el nudibranciuo mueren al poco tiempo. ANTON & SCHRÖDL (2013b) proponen que podría ser un mecanismo para ayudar a liberar al macho y que, gracias a su mayor movilidad, pueda tener una pequeña oportunidad de infectar a un nuevo hospedador.

SCHRÖDL (2002) observa que la mayor incidencia de la infección en nudibrancios de la costa de Chile, parasitados por *Ismaila* spp. se produce durante los meses de primavera-verano austral (septiembre-abril). Esto coincide con lo encontrado en el presente estudio, ya que las mayores tasas de infección en los hospedadores de *Lomanoticola* sp. nov. y *Splanchnotrophus gracilis* aparecen en el periodo mayo-agosto a lo largo de varios años.

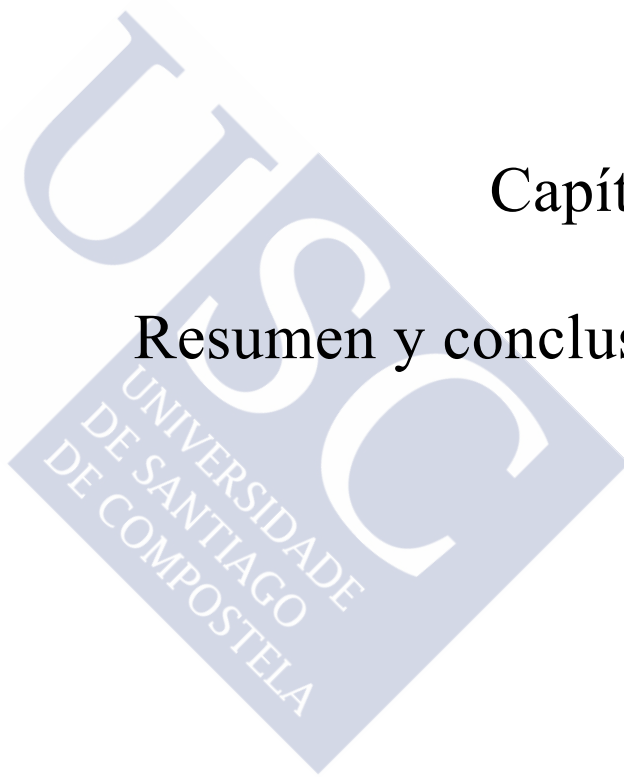
Esta estacionalidad podría explicarse por el incremento poblacional de las especies hospedadoras durante esos meses (VARELA, 2008; observación personal), lo que facilitaría a su vez el aumento de la infección. Un dato que apunta en esa dirección es el hecho de que los parásitos encontrados durante el invierno (meses de enero y noviembre de 2014) estaban infectando a *Doto pinnatifida*, la única junto a *Doto fragilis* que apareció a lo largo de todo el año.

La manera en la que los ciclos vitales de los parásitos y de sus hospedadores se relacionan entre sí continúa siendo desconocida, debido a la dificultad de estudiar el ciclo vital completo de la familia Splanchnotrophidae. La técnica de la PCR en tiempo real podría ser de gran utilidad, ya que permite la detección y cuantificación de larvas de especies objetivo en muestras de plancton, y ha demostrado su eficacia tanto en moluscos (QUINTEIRO *et al.*, 2011) como en copépodos parásitos (MCBEATH *et al.*, 2006). Combinando la PCR en tiempo real con un seguimiento sistemático de las poblaciones de los hospedadores durante un periodo prolongado, se podrían obtener datos que clarifiquen la relación biológica entre los hospedadores y sus parásitos.



Capítulo 6.

Resumen y conclusiones





En la presente memoria doctoral se estudian las especies de la familia Splanchnotrophidae presentes en la Ría de Ferrol y en la Ría de Ares mediante su estudio anatómico, molecular y biológico.

En el primer capítulo, INTRODUCCIÓN, se realiza una descripción general de las características de la familia Splanchnotrophidae: ordenación sistemática (incluyendo un listado de las especies conocidas), anatomía externa e interna e historia natural (distribución geográfica, hábitat, reproducción, ciclo vital, alimentación, circulación, reproducción y respiración). También se realiza una pequeña aproximación al concepto e implicaciones del parasitismo, relacionándolo con el peso que esta forma de vida tiene en la subclase Copepoda y más concretamente en el orden Poecilostomatoida.

Además, se realiza una revisión bibliográfica de todos los estudios que existen sobre este grupo, desde los primeros autores del siglo XIX hasta el repunte de trabajos que se observa en los primeros años del siglo XXI.

Por otra parte, se describen las características generales del superorden Opisthobranchia, en su calidad de hospedadores de especies de la familia Splanchnotrophidae. Se hace especial hincapié en la ordenación taxonómica y en las estrategias defensivas que despliegan. También se enumeran las diferentes especificidades hospedador-parásito que se observan entre los géneros del taxón.

Finalmente, se expone la problemática asociada al estudio de la familia Splanchnotrophidae, derivada de la falta de conocimiento sobre las especies europeas. A continuación parte se plantean dos modelos explicativos sobre las diferencias en cuanto a la especificidad hospedador-parásito: uno propone la posibilidad la existencia de complejos de especies crípticas monófagas y el otro presupone que hay especies polífagas. A modo de antecedente, también se menciona que se realizó un estudio previo de las especies hospedadoras conocidas y potencialmente hospedadoras de la familia Splanchnotrophidae, así como de sus hábitos alimenticios, con el fin de hacer una mejor planificación de los muestreos. Finalmente, para abordar la problemática asociada a la familia Splanchnotrophidae y contrastar los diferentes modelos explicativos se fijan una serie de objetivos: desarrollo de metodologías para la recolección de los copépodos, estudio anatómico de las especies encontradas, desarrollo de un protocolo para realizar análisis moleculares de las especies, obtención y descripción de estadios larvarios y recopilación de datos sobre la biología del parásito.

El segundo capítulo corresponde al ÁREA DE ESTUDIO y en él se presenta una breve descripción de las características generales de la Ría de Ferrol y de la Ría de Ares y de sus condiciones hidrográficas. Además, se precisan las localizaciones de las estaciones de muestreo y se describe cada estación en la que se encontraron nudibranchios parasitados.

En el capítulo dedicado a MATERIAL Y MÉTODOS se explica de qué manera se llevaron a cabo los muestreos y se describe el protocolo seguido tras la recolección de los ejemplares para su fijación y preparación para los diferentes estudios. De este capítulo se concluye que:

1. La planificación de los muestreos relacionando una especie de hospedador con su presa, resultó efectiva para recoger numerosos ejemplares de parásitos.

En la sección concerniente al estudio molecular, se justifican los motivos de la elección del gen COX1 y se describen el protocolo y las condiciones de PCR utilizadas. Así mismo se enumeran los análisis a los que se sometieron las secuencias obtenidas y los programas informáticos empleados. También se adjunta una tabla en la que se desglosa el material utilizado para el estudio molecular. Con los datos resultantes del trabajo en el laboratorio, se concluye que:

2. Las extracciones realizadas a partir de sacos ovígeros también fueron exitosas para la obtención de las secuencias del gen COX1. Esto permitirá en futuros trabajos la conservación del copépodo para estudios morfológicos y la utilización de los sacos ovígeros del mismo individuo para análisis moleculares.

El capítulo de RESULTADOS se estructura en tres apartados: el primero dedicado al estudio anatómico, el segundo al análisis molecular y el tercero a la biología del parásito.

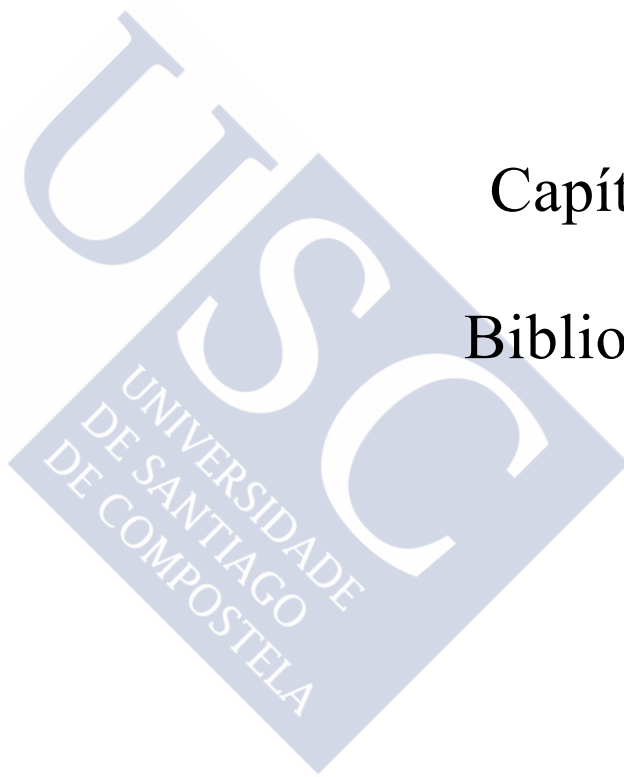
En consonancia con los resultados obtenidos, se concluye que:

3. Una de las especies recolectadas, *Lomanoticola* sp. nov., es nueva para la Ciencia. Se diferencia de sus congéneres por la ornamentación de los apéndices cefálicos, por la estructura y ornamentación del 2º y 3º par de toracópodos, por la presencia de un 4º par de toracópodos y por la ornamentación de las ramas caudales.
4. Debido a que a la nueva información sobre estructuras con interés taxonómico que aporta el estudio anatómico de la especie *Lomanoticola* sp. nov. completa y deja obsoleta la diagnosis del género *Lomanoticola* existente, se realiza una nueva diagnosis.

5. La otra especie recolectada, *Splanchnotrophus gracilis*, se encuentra parasitando al nudibranquio *Trapania tartanella*, caracterizándose por los delicados apéndices laterales de la hembra, por la segmentación y ornamentación de los apéndices cefálicos y toracópodos, y por la ornamentación de las ramas caudales. Estos caracteres permiten diferenciarla de las especies *Splanchnotrophus angulatus*, *Splanchnotrophus dellachiajei* y *Splanchnotrophus willemi*.
6. Los géneros *Lomanotricula* y *Splanchnotrophus* son filogenéticamente muy próximos, tal y como indican todas las similitudes encontradas entre ambos taxones y que no son compartidas con otros géneros de la familia Splanchnotrophidae.
7. La descripción del macho de *Lomanotricula* sp. nov. y de las larvas nauplius I de *Lomanotricula* sp. nov. y de *Splanchnotrophus gracilis* supone una novedad que aporta datos anatómicos importantes para futuros estudios filogenéticos sobre la familia Splanchnotrophidae.
8. Se descarta la existencia de un complejo de especies crípticas monoespecíficas en *Lomanotricula* sp. nov. Así lo indican la uniformidad de los caracteres con valor taxonómico de los individuos pertenecientes a los diferentes hospedadores, los valores de las distancias-*p* de las diferentes secuencias del gen COX1 y el agrupamiento monofilético de éstas en el árbol obtenido mediante el método Neighbor-Joining. De la misma manera, se confirma que en *Splanchnotrophus gracilis*, *Splanchnotrophus angulatus*, *Ismaila aliena* e *Ismaila robusta* tampoco existen especies crípticas.
9. *Lomanotricula* sp. nov. parasita al menos a 7 especies de nudibranquio de los parvódenes Dendronotida y Aeolidida: *Doto pinnatifida*, *Doto eireana*, *Doto fragilis*, *Doto koenneckeri*, *Doto lemchei*, *Eubranchus* sp. y *Cuthona caerulea*.
10. Existen dos estrategias opuestas respecto a la especificidad hospedador-parásito dentro de la familia Splanchnotrophidae: una es la que siguen los géneros monófagos *Ismaila*, *Ceratosomicola* y *Arthurius* y otra es la observada en los géneros polífagos *Lomanotricula*, *Splanchnotrophus* y *Majimun*.
11. Las distribuciones geográficas conocidas de *Lomanotricula* sp. nov. y *Lomanotricula insolens* son muy similares, ya que ambas se extienden por el Atlántico nororiental y por el Mediterráneo. Además, se amplía al noroeste de la Península Ibérica y Mediterráneo el área de distribución de *Splanchnotrophus angulatus*, restringida hasta la actualidad en el Canal de la Mancha.

12. Las tasas de infección que se observan en los ejemplares de *Trapania tartanella* infectados por *Splanchnotrophus gracilis* son sensiblemente mayores que las de los hospedadores de *Lomanotocola* sp. nov.
13. La época de mayor intensidad de la infección se produce en los meses de primavera-verano (marzo-agosto).
14. En términos generales, *Lomanotocola* sp. nov. y *Splanchnotrophus gracilis* no causan efectos negativos aparentes en la anatomía interna de sus hospedadores.

En el capítulo de la DISCUSIÓN se comparan críticamente los resultados obtenidos con la bibliografía existente sobre la familia Splanchnotrophidae. En primer lugar, se explica la presencia de variabilidad hospedador-dependiente en diferentes especies de la familia Splanchnotrophidae y se plantea una explicación al origen de este fenómeno. A continuación, se cotejan los datos obtenidos del estudio de las larvas nauplius con trabajos previos sobre el orden Poecilostomatoida y la familia Splanchnotrophidae. Después se compara, a nivel anatómico y con la ayuda de una tabla de caracteres, el género *Lomanotocola* con el resto de los géneros de la familia Splanchnotrophidae, señalando que la mayor similitud se da con el género *Splanchnotrophus*. En la sección dedicada a la delimitación molecular de especies se desglosan los diferentes resultados obtenidos y se estudia su coincidencia con los datos morfológicos existentes. En la parte referida a la filogenia de la familia Splanchnotrophidae se explican las inconsistencias encontradas en la topología del árbol NJ con respecto a lo esperado en base a los datos morfológicos. En lo atinente a la especificidad hospedador-parásito, se describen las diferentes estrategias observadas en la familia Splanchnotrophidae y las implicaciones que derivan de ellas. Finalmente, se comparan los diferentes parámetros biológicos estudiados (distribución geográfica, frecuencias y tasas de infección, posición y efectos en los hospedadores, carga parasitaria, tamaño del hospedador y presencia estacional) con la bibliografía científica publicada.



Capítulo 7.

Bibliografía



- ABAD, M., DÍAZ-AGRAS, G. & URGORRI, V. (2011). Anatomical description and biology of the splanchnotrophid *Splanchnotrophus gracilis* Hancock & Norman, 1863 found parasitizing the doridacean nudibranch *Trapania tartanella* Ihering, 1886 at the Ría de Ferrol (Galicia, NW Iberian Peninsula). *Thalassas*, 27 (2): 49-60.
- ALDER, J., HANCOCK, A. & CHARLES, E. (1845-1855). *A monograph of the British nudibranchiate Mollusca: with figures of all the species (2)*. The Ray Society, Londres. 557 pp.
- ANTON, R. & SCHRÖDL, M. (2013a). The gastropod–crustacean connection: towards the phylogeny and evolution of the parasitic copepod family Splanchnotrophidae. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 167 (4): 501-530.
- ANTON, R. & SCHRÖDL, M. (2013b). The “inner values” of an endoparasitic copepod–computer-based 3D-reconstruction of *Ismaila aliena*. *Spixiana* 36, (2): 183-199.
- ANTON, R., SCHORIES, D., JÖRGER, K., KALIGIS, F. & SCHÖDL, M. (2015). Description of four new endoparasitic species of the family Splanchnotrophidae (Copepoda, Poecilostomatoida) from nudibranch and sacoglossan gastropod hosts. *Marine Biodiversity*: 1-13.
- ANTON, R., SCHORIES, D., WILSON, N., WOLF, M., ABAD, M. & SCHRÖDL, M. (en prensa). Host specificity versus plasticity: testing the morphology based taxonomy of the endoparasitic copepod family Splanchnotrophidae with COI barcoding. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*.
- ASENSIO, I. & GRAJAL, M. (1981). Rasgos morfológicos y sedimentológicos de la Ría de Betanzos (A Coruña, Galicia, España). *Cuadernos laboratorio xeolóxico de Laxe*, 8: 197-208.
- BABA, K. (1960). Two new species of the genus *Eubranchus* from Japan (Nudibranchia-Eolidacea). *Publications of Seto Marine Biological Laboratory*, VIII (2): 77-81.
- BELCIK, F.P. (1981). The male of *Ismaila monstrosa* Bergh, 1867. (Copepoda, Splanchnotrophidae). *Crustaceana*, 40: 16-25.

- BERGH, L.S.R. (1867). *Phidiana lynceus* og *Ismaila monstrosa*. *Videnskabelige Meddelelser fra den naturhistoriska Forening i Kjöbenhavn 1866*: 97–130.
- BERGH, L.S.R. (1868). On *Phidiana lynceus* and *Ismaila monstrosa*. *Annals and Magazine of Natural History*, 4 (2): 133-138.
- BERGSTEN, J. (2005). A review of long-branch attraction. *Cladistics*, 21 (2): 163-193.
- BICKFORD, D., LOHMAN, D.J., SODHI, N.S., NG, P.K.L., MEIER, R., WINKER, K., INGRAM, K.K. & DAS, I. (2006). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology and evolution*, 22 (3): 148-155.
- BÖTTGER-SCHNACK, R. & MACHIDA, R.J. (2011). Comparison of morphological and molecular traits for species identification and taxonomic grouping of oncaeid copepods. *Hydrobiologia*, 666 (1): 111-125.
- BOUCHET, P., ROCROI, J.P., FRÝDA, J., HAUSDORF, B., PONDER, W., VALDÉS, Á. & WARÉN, A. (2005). Classification and nomenclator of gastropod families. *Malacologia*, 47 (1-2): 1-397.
- BOXSHALL, G.A. & HALSEY, S.H. (2004). *An introduction to copepod diversity*. The Ray Society 166, British Museum of Natural History. Londres. 966 pp.
- BRAET, F., DE ZANGER, R. & WISSE, E. (1997). Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells. *Journal of Microscopy*, 186 (1): 84-87.
- BRUSCA, R.C. & BRUSCA, G.J. (2005). *Invertebrados, 2ª edición*. McGraw-Hill/Interamericana de España. Madrid. 1005 pp.
- BUCKLIN, A., FROST, B., BRADFORD-GRIEVE, J., ALLEN, L. & COPLEY, N. (2003). Molecular systematic and phylogenetic assessment of 34 calanoid copepod species of the Calanidae and Clausocalanidae. *Marine Biology*, 142 (2): 333-343.

- BURGOS VEGA, R. (2003). *Identificación de especies basada en la secuencia del COI mt (ADNmt) del género Clavella Oken, 1815 (Copepoda: Siphonostomatoida: Lernaepodidae) parásito de peces de la costa norte de Chile*. Diploma de Estudios Avanzados. Universidade de Santiago de Compostela.
- BURTON, R.S. & LEE, B.N. (1994). Nuclear and mitochondrial gene genealogies and allozyme polymorphism across a major phylogeographic break in the copepod *Tigriopus californicus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91 (11): 5197-5201.
- CANU, E. (1891). Sur quelques Copépodes parasites, observés dans le Boulonnais. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Paris*, 113: 435-437.
- CORNILS, A. & HELD, C. (2014). Evidence of cryptic and pseudocryptic speciation in the *Paracalanus parvus* species complex (Crustacea, Copepoda, Calanoida). *Frontiers in zoology*, 11 (1): 1-17.
- DA COSTA, K.G., VALLINOTO, M. & DA COSTA, R.M. (2011). Molecular identification of a new cryptic species of *Acartia tonsa* (Copepoda, Acartiidae) from the Northern coast of Brazil, based on mitochondrial COI gene sequences. *Journal of Coastal Research*, 64: 359-363.
- DE CASTRO, M., GÓMEZ-GESTEIRA, M., PREGO, R. & ÁLVAREZ, I. (2004). Ria-ocean exchange driven by tides in the Ria of Ferrol (NW Spain). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 61 (1): 15-24.
- DELAMARE DEBOUTTEVILLE, C. (1950). Contribution à la connaissance des copepods du genre *Splanchnotrophus* Hancock et Norman parasites des Mollusques. *Vie et Milieu*, 1 (1): 74-80.
- DELAMARE DEBOUTTEVILLE, C. (1951). Description du mâle du genre *Splanchnotrophus* Hancock et Norman (Crust. Copepoda). *Vie et Milieu*, 2 (3): 367-370.

DELLE CHIAJE, S. (1841). *Descrizione et Notomia degli Animali invertebrati della Sicilia citeriore osservati vivi negli anni 1822-1830*. Stabilimento Tipografico di C. Batelli e Co. Nápoles. Vol. 1-4.

DIPPENAAR, S.M., MATHIBELA, R.B. & BLOOMER, P. (2010). Cytochrome oxidase I sequences reveal possible cryptic diversity in the cosmopolitan symbiotic copepod *Nesippus orientalis* Heller, 1868 (Pandaridae: Siphonostomatoida) on elasmobranch hosts from the KwaZulu-Natal coast of South Africa. *Experimental parasitology*, 125 (1): 42-50.

FORBES, E. (1838). *Malacologia Monensis: a catalogue of the Mollusca inhabiting the Isle of Man and the neighbouring sea Edinburgh*. J. Carfrae and son.

FOLMER, O., BLACK, M., LUTZ, R. & VRIJENHOEK, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3 (5): 294-299.

GOETZE, E. (2003). Cryptic speciation on the high seas; global phylogenetics of the copepod family Eucalanidae. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270 (1531): 2321-2331.

GOLLNER, S., FONTANETO, D. & ARBIZU, P.M. (2011). Molecular taxonomy confirms morphological classification of deep-sea hydrothermal vent copepods (Dirivultidae) and suggests broad physiological tolerance of species and frequent dispersal along ridges. *Marine biology*, 158 (1): 221-231.

GUTIÉRREZ-AGUIRRE, M.A., CERVANTES-MARTÍNEZ, A. & ELÍAS-GUTIÉRREZ, M. (2014). An example of how barcodes can clarify cryptic species: the case of the calanoid copepod *Mastigodiptomus albuquerquensis* (Herrick). *Plos One*, 9 (1): 1-11.

HAJIBABAEI, M., SINGER, G.A.C., HEBERT, P.D.N. & HICKEY, D.A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in genetics*, 23 (4): 167-172.

- HALL, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41: 95-98.
- HANCOCK, A. & NORMAN, A.M. (1863). On *Splanchnotrophus*, an undescribed genus of Crustacea, parasitic on nudibranchiate Mollusca. *Transactions of the Linnean Society of London, Zoology*, 24: 49-60.
- HAUMAYR, U. & SCHRÖDL, M. (2003). Revision of the endoparasitic genus *Ismaila* Bergh, 1867, with description of eight new species (Copepoda, Poecilostomatoida, Splanchnotrophidae). *Spixiana*, 26 (1): 1-33.
- HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., BALL, S.L. & DE WAARD, J.R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270 (1512): 313-321.
- HEBERT, P.D.N., RATNASINGHAM, S. & DE WAARD, J.R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270 (Suppl 1): S96-S99.
- HEBERT, P.D.N., PENTON, E.H., BURNS, J.M., JANZEN, D.H. & HALLWACHS, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (41): 14812-14817.
- HECHT, E. (1893). Note sur un nouveau Copéode parasite des Nudibranchs. *Archives de zoologie expérimentale et générale, notes et revue*, 3 (1): XIII-XVI.
- HECHT, E. (1895). Contribution à l'étude des Nudibranchs. *Mémoires de la Société zoologique de France*, 8: 539-711.
- HILL, R., ALLEN, L. & BUCKLIN, A. (2001). Multiplexed species-specific PCR protocol to discriminate four N. Atlantic *Calanus* species, with an mtCOI gene tree for ten *Calanus* species. *Marine Biology*, 139 (2): 279-287.

HO, J. (1981). *Ismaila occulta*, a new species of poecilostomatoid copepod parasitic in a dendronotoid nudibranch from California. *Journal of Crustacean Biology*, 1: 130-136.

HO, J. (1987). Larval stages of *Ismaila occulta* Ho, 1981 and the affinity of Splanchnotrophidae (Copepoda: Poecilostomatoida). *Researches on Crustacea*, 16: 67-83.

HO, J. (1991). Phylogeny of Poecilostomatoida: a major order of symbiotic copepods. Proceedings of the Fourth International Conference on Copepoda; *Bulletin of Plankton Society of Japan, Special Volume*, 25: 25-48.

HUYS, R. & BOXHALL, G.A. (1991). *Copepod Evolution*. The Ray Society 159, British Museum of Natural History. Londres. 468 pp.

HUYS, R. (2001). Splanchnotrophid systematics: a case of polyphyly and taxonomic myopia. *Journal of Crustacean Biology*, 21 (1): 106-156.

IHERING, H. VON. (1886). Beiträge zur Kenntnis der Nudibranchien des Mittelmeeres. *Part 2 Malakozoologische Blätter*, 8: 12-48.

IZAWA, K. (1987). Studies on the phylogenetic implications of ontogenetic features in the poecilostome nauplii (Copepoda: Cyclopoida). *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory*, 32 (4/6): 151-217.

JENSEN, K. (1987). *Ismaila monstrosa* Bergh (Copepoda: Splanchnotrophidae) found parasitizing in *Ercolaria funerea* (Costa) (Gastropoda: Ascoglossa). *Ophelia*, 28 (1): 75-84.

JENSEN, K. (1990). *Splanchnotrophus elysiae* n. sp. (Copepoda: Splanchnotrophidae) found parasitizing in the sacoglossan opisthobranch *Elysia australis* (Quoy and Gaimard, 1832). Proceedings of the Third International Marine Biological Workshop: The Marine Flora and Fauna of Albany, Western Australia. Western Australian Museum, Perth: 291-296.

- KABATA, Z. (1979). *Parasitic Copepoda of the British Fishes*. The Ray Society 152, British Museum of Natural History. Londres. 468 pp.
- KARANOVIC, T., EBERHARD, S., COOPER, S.J.B. & GUZIK, M.T. (2015). Morphological and molecular study of the genus *Nitokra* (Crustacea, Copepoda, Harpacticoida) in a small palaeochannel in Western Australia. *Organisms Diversity & Evolution*, 15 (1): 65-99.
- LARTILLOT, N., BRINKMANN, H. & PHILIPPE, H. (2007). Suppression of long-branch attraction artefacts in the animal phylogeny using a site-heterogeneous model. *BMC evolutionary biology*, 7 (Suppl1): S4.
- LAUBIER, L. (1964). La morphologie des pieces bucales chez les Splanchnotrophidae (Copépodes parasites des Mollusques). *Crustaceana*, 7: 167-174.
- LEMICHE, H. (1976). New British species of *Doto* Oken, 1815. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 56: 691-706.
- LLERA, E.M. & ORTEA, J.A. (1981). Una nueva especie de *Eubranchus* (Mollusca: Nudibranchiata) del norte de España. *Boletín Malacológico*, 17 (11-12): 265-270.
- MARSHALL, H. P. & HAYWARD, P. J. (2006). The effects of *Splanchnotrophus willemi* infecting *Ancula gibbosa* (Gastropoda: Opisthobranchia: Nudibranchia). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 86: 1437-1441.
- MCBEATH, A.J.A., PENSTON, M.J., SNOW, M., COOK, P.F., BRICKNELL, I.R. & CUNNINGHAM, C.O. (2006). Development and application of real-time PCR for specific detection of *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus elongatus* larvae in Scottish plankton samples. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73 (2): 141-150.
- MCDONALD, G.R. & NYBAKKEN, J.W. (1997). List of the Worldwide Food Habits of Nudibranchs. *Veliger*, 40 (2).
- MONOD, TH. & DOLLFUS, R. (1932). Les Copépodes parasites de mollusques. *Annales de Parasitologie humaine et comparée*, 10: 129-204.

MONTAGU, G. (1804). Description of several marine animals found on the South coast of Devonshire. *Transactions of the Linnean Society of London*, 7: 61-85.

MULLIS, K., FAALONA, F., SCHARF, S., SAIKI, S., HORN, G. & ERLICH, H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51: 263-273.

NEI, M. & KUMAR, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press. Nueva York. 352 pp.

NORMAN, A.M. & SCOTT, T. (1906). *The Crustacea of Devon and Cornwall*. W. Wesley and Son. Londres. 232 pp.

O'DONOGHUE, C. H. (1924). Report on Opisthobranchiata from the Abrolhos Islands, Western Australia, with description of a new parasitic copepod. *Journal of the Linnean Society, Zoology*, 35: 521-579.

OLSEN, O.W. (1974). *Animal Parasites, their Life Cycles and Ecology*, 3^a ed. University Park Press. Baltimore. 562 pp.

ORTEA, J.A. & URGORRI, V. (1978). El género *Doto* Oken, 1815 en el Norte y Noroeste de España. *Boletín de la Estación Central de Ecología*, 7 (14): 73-92.

ORTEA, J.A. (1979). Una nueva especie de *Eubranchus* (Mollusca: Opisthobranchia) de Tenerife, Islas Canarias. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Oviedo (Serie Biología)*, 20-21: 169-176.

ORTEA, J.A. & URGORRI, V. (1981). Opisthobranchios nuevos para el litoral ibérico colectados en Galicia. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, 6: 49-60.

PHILIPPE, H. & LAURENT, J. (1998). How good are deep phylogenetic trees? *Current opinion in genetics & development*, 8 (6): 616-623.

POULIN, R. (2007). *Evolutionary ecology of parasites*, 2^a ed. Princeton University Press. Nueva Jersey. 312 pp.

QUINTEIRO, J., PÉREZ-DIÉGUEZ, L., SÁNCHEZ, A., PÉREZ-MARTÍN, R.A., SOTELO C.G. & REY-MÉNDEZ, M. (2011). Quantification of Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) larvae based on SYBR Green real-time polymerase chain reaction. *Journal of Shellfish Research*, 30 (3): 791-796.

RHODE, K. (1993). *Ecology of Marine Parasites. An Introduction to Marine Parasitology*, 2ª edición. Cab International, Oxon. 298 pp.

ROBERTS, L. S. & JANOVY, J. JR. (2000). *Foundations of Parasitology*, 6ª ed. McGraw-Hill, EE.UU. 670 pp.

ROCHA-OLIVARES, A., FLEEGER, J.W. & FOLTZ, D.W. (2001). Decoupling of molecular and morphological evolution in deep lineages of a meiobenthic harpacticoid copepod. *Molecular Biology and Evolution*, 18 (6): 1088-1102.

SALMEN, A. (2005). *Morphology, taxonomy and biology of endoparasitic copepods in shell-less opisthobranch gastropods (Crustacea, Copepoda, Poecilostomatoida)*. Tesis Doctoral, Technische Universität München, Munich.

SALMEN, A., WILSON, N.G. & SCHRÖDL, M. (2008a). Scanning electron microscopical description and biology of three new endoparasitic *Ceratosomicola* species from tropical Indo-Pacific nudibranch hosts (Crustacea, Copepoda, Poecilostomatoida, Splanchnotrophidae). *Spixiana*, 31 (1): 47-69.

SALMEN, A., KALIGIS, F., MAMANGKEY, G.F. & SCHRÖDL, M. (2008b). *Arthurius bunakenensis*, a new tropical Indo-Pacific species of endoparasitic copepods from a sacoglossan opisthobranch host (Crustacea, Copepoda, Poecilostomatoida, Splanchnotrophidae). *Spixiana*, 31 (2): 199-205.

SALMEN, A., ANTON, R., WILSON, N.G. & SCHRÖDL, M. (2010). *Briarella doliaris* spec. nov., a new philobleniid copepod parasite from Australia: a potential link to the Splanchnotrophidae (Copepoda, Poecilostomatoida). *Spixiana*, 33 (2): 19-26.

SÁNCHEZ-MATA, A., GLÉMAREC, M. & MORA, J. (1999). Physico-chemical structure of the benthic environment of a Galician ría (Ría de Ares-Betanzos, north-west Spain). *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 79 (1): 1-21.

SCHRÖDL, M. (1997). Aspects of Chilean Nudibranch Biology: effects of Splanchnotrophid copepod parasitism on *Flabellina sp. 1*. *Opisthobranch Newsletter*, 23: 45-47.

SCHRÖDL, M. (2002). Heavy infestation by endoparasitic copepod crustaceans (Poecilostomatoida: Splanchnotrophidae) in Chilean opisthobranch gastropods, with aspects of splanchnotrophid evolution. *Organisms, Diversity and Evolution*, 2: 19-26.

SCOTT, T. & SCOTT, A. (1895). On some new and rare British Copepoda. *Journal of Natural History*, 6 (16): 353-362.

SMITH, M.A., WOODLEY, N.E., JANZEN, D.H., HALLWACHS, W. & HEBERT, P.D.N. (2006). DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (10): 3657-3662.

SMYTH, J.D. (1994). *Introduction to Animal Parasitology*, 3^a edición. Cambridge University Press. Nueva York. 569 pp.

TAMURA, K. & NEI, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, 10: 512-526.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A. & KUMAR, S. (2013). MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.

THOMPSON, T.H. & BROWN, G.H. (1984). *Biology of Opisthobranch Molluscs*. The Ray Society, British Museum of Natural History. Londres. 436 pp.

- UNTERGASSER, A., CUTCUTACHE, I., KORESSAAR, T., YE, J., FAIRCLOTH, B., REMM, M. & ROZEN, S. (2012). Primer 3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40 (15): e115.
- URGORRI, V. & BESTEIRO, C. (1984). La alimentación de los moluscos nudibranchios de Galicia. *Iberus*, 4: 51-58.
- URGORRI, V., DÍAZ-AGRAS, G., BESTEIRO, C. & MONTOTO, G. (2011). Additions to the Inventory of *Mollusca opisthobranchia* of Galicia (NW Iberian Peninsula). *Thalassas*, 27 (2): 77-100.
- UYENO, D. & NAGASAWA K. (2012). Four new species of splanchnotrophid copepods (Poecilostomatoida) parasitic on doridacean nudibranchs (Gastropoda, Opisthobranchia) from Japan, with proposition of one new genus. *Zoo Keys*, 247: 1-29.
- VARELA, C. (2008). *Diversidad y variación espacio-temporal de la fauna epibionte de cinco colonias hidroides de la Punta da Redonda (Ría de Ferrol; NW Península Ibérica)*. Memoria de Licenciatura, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago.
- VARELA, C., MOREIRA, J. & URGORRI, V. (2009). Inventario de la fauna epibionte asociada a hidrozoos en la Ría de Ferrol (NO península Ibérica). *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 18: 95-109.
- WÄGELE, H. & KLUSMANN-KOLB, A. (2005). Opisthobranchia (Mollusca, Gastropoda) more than just slimy slugs. Shell reduction and its implications on defence and foraging. *Frontiers in Zoology*, 2 (3): 1-18.
- WÄGELE, H., BALLESTEROS, M. & AVILA, C. (2006). Defensive glandular structures in Opisthobranch Molluscs: from Histology to Ecology. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 44: 197-276.
- WITT, J.D.S., THRELOFF, D.L. & HEBERT, P.D.N. (2006). DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Molecular ecology*, 15 (10): 3073-3082.

WOLF, M. & YOUNG, C. M. (2014). Impacts of an endoparasitic copepod, *Ismaila belciki*, on the reproduction, growth and survivorship of its nudibranch host, *Janolus fuscus*. *International journal for parasitology*, 44 (6): 391-401.

ZELMER, D.A. (1998). An evolutionary definition of parasitism. *International Journal for Parasitology*, 28: 531-533.





