



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grao en Bioloxía

Memoria de Traballo de Fin de Grao

Estudio comparativo de la micro-anatomía externa de tres especies del género *Terebellides* (Annelida; Trichobanchidae) utilizando microscopía electrónica de barrido

Estudo comparativo da micro-anatomía externa de tres especies do xénero *Terebellides* (Annelida; Trichobanchidae) empregando a microscopía electrónica de varrido

Comparative study of the external micro-anatomy of three species of the genus *Terebellides* (Annelida; Trichobanchidae) using scanning electron microscopy



*Sindy Carolina Ortiz Florez
Setembro 2017*

Tutor Académico: Julio Parapar Vegas



TRABAJO DE FIN DE GRADO

Don Julio Parapar Vegas, como Director del trabajo de Fin de Grado de Dña Sindy Carolina Ortiz Florez, titulado “Estudio comparativo de la microanatomía externa de tres especies del género *Terebellides* (Annelida; Trichobranchidae) utilizando microscopía electrónica de barrido”, por la presente,

AUTORIZO

A la autora a su presentación y defensa ante el tribunal calificador elegido a tal efecto,

En A Coruña, a 11 de Septiembre de 2017

Julio Parapar Vegas

Resumen

El Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) es uno de los instrumentos más versátiles para el examen y análisis de características micro estructurales cuya utilidad radica en su alta resolución y su profundidad de campo, permitiendo la obtención de imágenes estereoscópicas de muy alta definición. Este TFG explora el uso del MEB como herramienta en el estudio taxonómico de los animales, y en particular de los Anélidos Poliquetos. Para ello se emplearán las imágenes obtenidas a partir del estudio de varios ejemplares del género *Terebellides* (Annelida; Trichobanchidae) pertenecientes a tres especies procedentes de tres enclaves geográficos diferentes en la costa oriental del Océano Atlántico: *T. shetlandica* Parapar, Moreira & O'Reilly, 2016 de las Islas Shetland (N Escocia), y dos ejemplares de dos especies todavía no descritas y procedentes de Galicia (NW España) y Congo respectivamente. El estudio se ha centrado en la forma de las sedas y branquias, con el objeto de valorar la posibilidad de que sean o no la misma especie.

Palabras clave: Morfología, MEB, *Terebellides*, Poliquetos, taxonomía

Resumo

O Microscopio Electrónico de Varrido (MEV) é un dos instrumentos máis versátiles para o examen e análise de características micro estruturais cuxa utilidade radica na súa alta resolución e profundidade de campo, permitindo a obtención de imaxes estereoscópicas de moi alta definición. Este TFG explora o uso do MEB como ferramenta no estudio taxonómico dos animais, e en particular dos Anélidos Poliquetos. Para elo se empregarán as imaxes obtidas a partires do estudo de varios exemplares do xénero *Terebellides* (Annelida; Trichobanchidae) pertencentes a tres especies procedentes de tres enclaves xeográficos diferentes da costa oriental do Océano Atlántico: *T. shetlandica* Parapar, Moreira & O'Reilly, 2016 das Illas Shetland (N Escocia), e dous exemplares de dous especies todavía non descritas e procedentes de Galicia (NW España) e Congo respectivamente. O estudio centrouse na forma das sedas e branquias, co oxecto de valorar a posibilidade de que sexan ou non a mesma especie.

Palabras chave: Morfoloxía, MEV, *Terebellides*, Poliquetos, taxonomía

Abstract

The Scanning Electron Microscope (SEM) is one of the most versatile instruments for the examination and analysis of micro structural characteristics, and whose utility lies in its high resolution and depth of field, allowing obtaining stereoscopic very high definition images. This TFG explores the use of MEB as a tool in the animal taxonomic study, and in particular of the Polychaetes. Shape of chaetae and branchiae has been studied in three Tricobranchid polychaete specimens of genus *Terebellides*, one belonging to an already described species, *T. shetlandica* Parapar, Moreira & O'Reilly, 2016 from the Shetland Islands (N Scotland), and two specimens from two still undescribed species, one from the Galician coasts (NW Spain) and one from the Congo coast respectively, in order to explore the possibility of being or not the same species.

Key words: Morphology, SEM, *Terebellides*, Polychaeta, taxonomy

Índice

Introducción	1
Objetivos	8
Material y métodos	6
Resultados	9
Discusión	17
Conclusiones	20
Conclusións	20
Conclusions	21
Bibliografía	22

Introducción

El Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), o también llamado SEM, por sus siglas en inglés (Scanning Electron Microscopy) es uno de los instrumentos más versátiles para el examen y análisis de características micro estructurales de sólidos, proporcionando información morfológica y topográfica de la superficie de los mismos. La utilidad del MEB radica en su alta resolución con valores en el orden 1 a 5 nm (de 10 a 50 Å). Otra característica importante es la apariencia tridimensional de la imagen de la muestra, resultado directo de su gran profundidad de campo (aproximadamente entre 100 y 1000 veces mayor que la de un microscopio óptico a la misma magnificación), la cual permite la obtención de imágenes estereoscópicas de muy alta definición. Todo ello hace que las imágenes obtenidas de esta manera se empleen habitualmente en una amplia variedad de medios de comunicación desde revistas científicas tanto especializadas en ciencia como en divulgación de muy diferentes temáticas (Goldstein *et al.*, 2003).

Los componentes básicos del Microscopio Electrónico de Barrido son (Goldstein *et al.* 2003):

1) Un **cañón de electrones** cuyo propósito es proveer de una corriente intensa y estable de un pequeño haz de electrones, es decir, actúa como emisor/fuente de electrones. Existen diferentes tipos de cañones de electrones que varían según la cantidad de corriente que pueden producir, el tamaño de la fuente, la estabilidad de la corriente emitida y la duración de la fuente.

2) Un sistema de **lentes**, normalmente formado por dos o tres, que se encarga de focalizar el haz de electrones en un punto de tamaño regulable según el nivel de detalle que se requiera.

3) Una serie de **rejillas** situadas generalmente antes y/o después de cada lente, y que se encargan de eliminar las aberraciones producidas en el haz de electrones. La última de las lentes cuenta con un sistema de barrido que se encarga de desplazar el haz de electrones por toda la muestra siguiendo un patrón de líneas paralelas. Cuando los electrones acelerados inciden sobre la superficie de la muestra se originan una serie de emanaciones como por ejemplo rayos X, luz visible, calor y distintos tipos de electrones. De éstos últimos, los utilizados por el microscopio para crear la imagen son los llamados "electrones secundarios" los cuales son partículas de baja energía. Dichos electrones abandonan el espécimen en múltiples direcciones y debido a que son ligeramente negativos se utiliza una fuerte carga positiva para atraerlos hacia el detector de electrones secundarios. La detección de éstos es transformada en una señal eléctrica proporcional al número de electrones secundarios recogidos y transformada en una imagen digital donde la iluminación de cada píxel es proporcional a la señal emitida.

4) Por último, presenta un **sistema de vacío** que es necesario para eliminar las moléculas de aire que podrían impedir el paso de los electrones de alta energía por la columna, formada por las lentes electromagnéticas y por un conjunto de piezas que se ensamblan que limitan el espacio físico recorrido por el haz de electrones, así como para permitir que los electrones secundarios de energía baja viajen al detector.

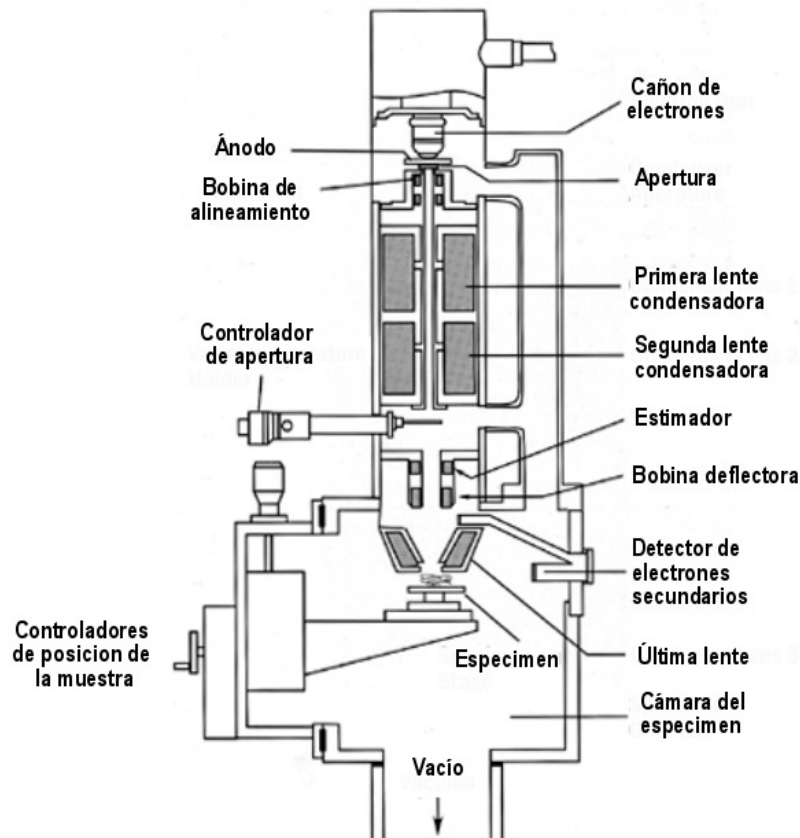


Figura 1. Esquema de las partes de un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) (sacado de Goldstein *et al.* 2003).

El MEB se ha convertido en una herramienta muy útil en las diferentes disciplinas científicas. En Biología, ha proporcionado imágenes muy novedosas de la morfología de los seres vivos, dando información veraz de las estructuras que integran los organismos animales. Actualmente, existe un gran número de investigaciones en las que se han empleado imágenes obtenidas por el MEB para la descripción e identificación de muchas especies en el campo de la Zoología, ya que el uso de un microscopio óptico no llega a aportar el suficiente detalle morfológico.

Es el caso del género *Terebellides*, Anélido perteneciente a la familia Trichobanchidae Malmøgren, 1886. Estos poliquetos, de hábitos sedentarios, se caracterizan principalmente por presentar en la parte dorsal del tórax un conjunto braquial muy peculiar y compuesto por la fusión a lo largo de su evolución de tres pares de branquias primitivas (Garraffoni & Lana, 2006) (Figs. 2 y 3). Morfológicamente hablando, la branquia de este género está provista de un solo tallo presente a la altura de los segmentos corporales 2-4 (S2-S4), y está dotada habitualmente de cuatro lóbulos lamelados, 2 grandes dorsales y 2 más pequeños de posición ventral (Fig. 2, 3A-B). Todos ellos pueden o no estar parcialmente fusionados. En ocasiones ciertos autores reconocen un quinto lóbulo el cual es simplemente la proyección anterior del par de lóbulos dorsales (Fig. 3B). Las anteriormente citadas lamelas que componen cada uno de los lóbulos branquiales pueden presentar en toda o parte de su superficie unas líneas de cilios, así como unas papilas pequeñas, redondeadas y asimismo ciliadas, más evidentes en el borde externo (Solis-Weiss *et al.*, 2009; Hutchings & Peart, 2000). El prostomio es corto y

compacto, sin elementos sensoriales, como es habitual en poliquetos sedentarios, si bien presentan una gran membrana tentacular alrededor de la boca y que está provista de numerosos tentáculos bucales, y que emplean en la alimentación (Parapar & Hutchings, 2014) (Fig. 2, 3A). El peristomio consta de un labio superior que está casi completamente oculto, y un labio inferior expandido formando una estructura rectangular alargada (Hutchings & Peart, 2000). El cuerpo es robusto con una segmentación visible especialmente en la región del tórax. Los parápodos son birrámeos provistos de ramas notopodiales (Notópodos) dorsales y ramas neuropodiales (neurópodos) ventrales. El tórax porta 18 pares de parápodos, con notópodos de forma rectangular, compacta y móvil, y posición dorsolateral, y que portan notosedas de tipo capilar. Los neuropódos se extienden desde el segmento 8 (S8) hasta el pigidio en el extremo final del cuerpo. Se presentan como unas estructuras de tipo glandular carnosas denominadas “torus”, que pueden variar ligeramente en su forma a lo largo del cuerpo, siendo sésiles en la zona torácica o en forma de pínulas ventrolaterales en la zona abdominal. En estos torus neuropodiales se localizan un tipo de sedas muy peculiares morfológicamente denominadas “uncinos”. Los uncinos torácicos tienen un eje largo con un remate en forma de gancho con varias filas superiores de pequeños dientes (Fig. 3C), mientras que los uncinos abdominales carecen de este eje basal, en cambio presentan una base cuadrada o redondeada con una cresta de dientes pequeños (Solis-Weiss *et al.*, 2009; Hutchings, 2000) (Fig. 3D). En el primer segmento torácico con uncinos, éstos poseen una forma diferente a los demás y se conocen como uncinos aciculares.

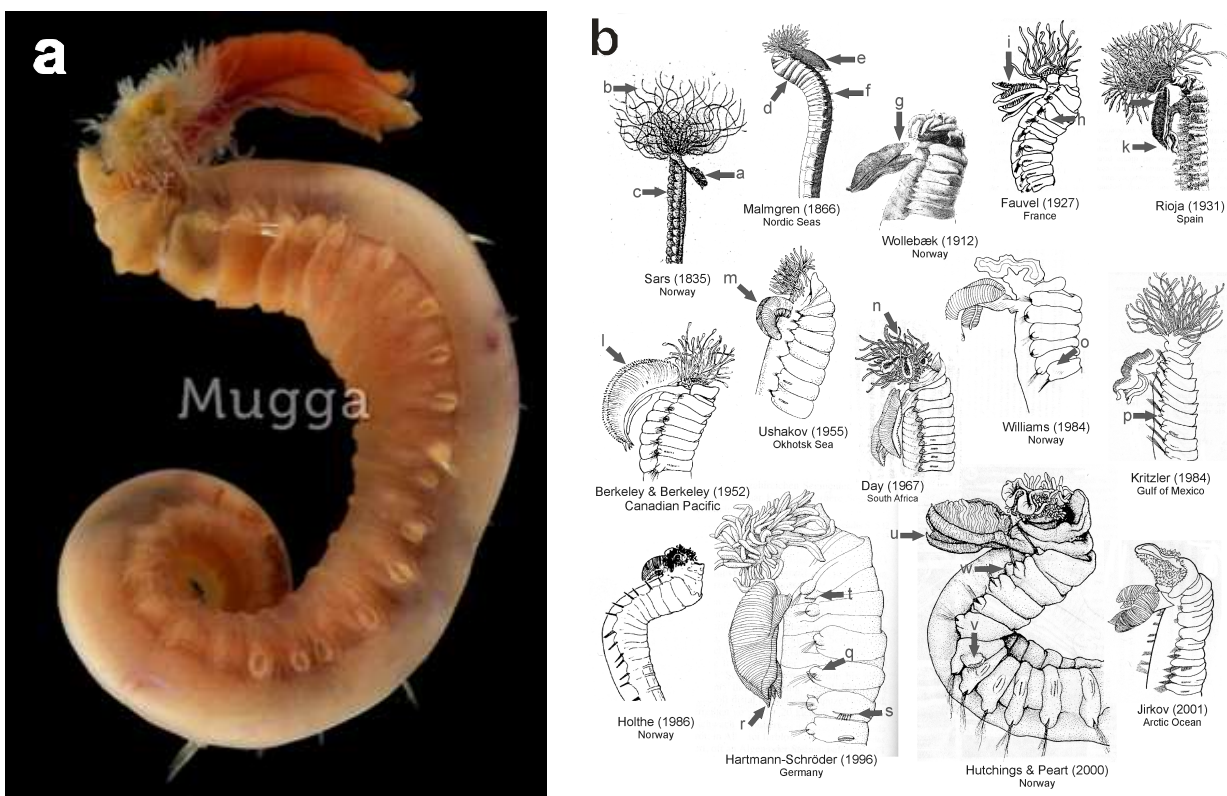


Figura 2. Morfología de Terebellidae. (a) Aspecto general bajo la lupa de un ejemplar vivo; en su cuerpo destaca la presencia de unas complejas branquias asociadas al extremo antero dorsal del cuerpo (tomado de http://www.mugga.se/photo/2816/terebellides_stroemi). (b) Variabilidad morfológica branquial en distintos ejemplares identificados como *Terebellides stroemii* (tomado de Parapar y Hutchings, 2014).

Si bien el tórax suele presentar un número fijo de segmentos, en la región del abdomen este número sin embargo puede variar en las distintas especies, presentando los parápodos de tipo

unirrámico, con solamente rama ventral con uncinos estando ausente el notópodo (Hutchings, 2000).

A partir de ejemplares recogidos en la costa de Noruega, Sars (1835) estableció el género *Terebellides*, describiendo *Terebellides stroemii* que resultará así ser la especie tipo de dicho género. Tradicionalmente, *Terebellides* se consideró como un género muy poco diverso, recogiendo la presencia de esta especie en localidades muy diferentes a lo largo de todos los mares mundiales; lo cual era debido fundamentalmente a la peculiar morfología de la branquia y al poco detalle de su descripción tanto en el trabajo de M. Sars. Casi siglo y medio más tarde, Williams (1984) elaboró un estudio comparativo sobre las semejanzas y diferencias morfológicas, entre el distinto material identificado como *T. stroemii* de diferentes áreas geográficas, llegando a la conclusión de que en muchos casos se trataba de especies diferentes con lo cual se refutó definitivamente el estatus cosmopolita del taxón *T. stroemii*. Como consecuencia de ello, Williams (1984) describió cuatro nuevas especies y definió nuevos caracteres para una descripción e identificación más adecuada y precisa de las especies como por ejemplo la presencia de expansiones laterales en los primeros segmentos torácicos y el tamaño relativo del primer par de notópodos torácico respecto al resto, entre otros (Williams, 1984).

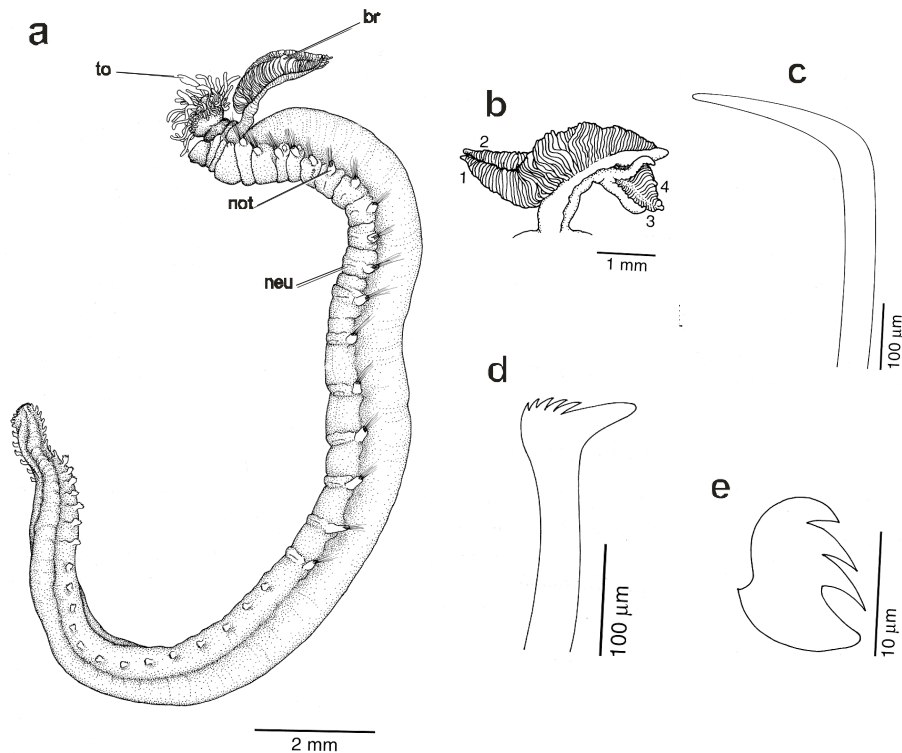


Figura 3. Características generales del cuerpo de un ejemplar de *Terebellides* estudiadas en este TFG. (a) Aspecto general del cuerpo. (b) Forma de la branquia con los cuatro lóbulos numerados: 1 y 2 lóbulos dorsales, 3 y 4 lóbulos ventrales (la fusión de los lóbulos 1 y 2 a nivel anterior formaría el lóbulo 5). (c) Uncino torácico. (d) Uncino abdominal.

Apoyándose en estas aportaciones, en años siguientes se realizaron estudios más cuidadosos de los especímenes, empleando además otros caracteres taxonómicos asimismo relevantes como el número de lóbulos branquiales y su grado de fusión, la morfología de los tentáculos bucales, la posición de las papilas nefridiales, y la forma de los notópodos y neuropodos torácicos (Hutchings & Peart 2000; Schüller & Hutchings 2010; Parapar & Moreira 2008a;

2008b; Parapar et al. 2011; Solís-Weiss et al. 1991). Además, la utilización de nuevas técnicas de tinción y el uso de instrumental más moderno como el MEB y la microtomografía computarizada (microCT) han confirmado la gran diversidad dentro de este género.

A pesar de lo dicho anteriormente, y siguiendo a Parapar & Hutchings (2014), el empleo exclusivo de caracteres procedentes del estudio de la morfología externa para identificar y diferenciar los distintos taxones se está revelando claramente insuficiente para diferenciar las llamadas especies crípticas. De ahí que cada vez más, se está revelando necesario el uso de otros caracteres procedentes del empleo de otras herramientas de estudio como las preferencias ecológicas (por ejemplo, la distribución batimétrica) o el estudio molecular de los ejemplares (Schüller & Hutchings, 2012)

Material y métodos

El presente estudio fue realizado empleando un total de 7 ejemplares de poliquetos del género *Terebellides* recogidos de distintas campañas de muestreo en tres áreas distintas del Océano Atlántico oriental (Figuras 2 y 3), que de norte a sur son: 1) Islas Shetland (Escocia) (dos ejemplares), 2) Plataforma continental de Galicia (dos ejemplares), y 3) Costa del Congo y Gabón (tres ejemplares).

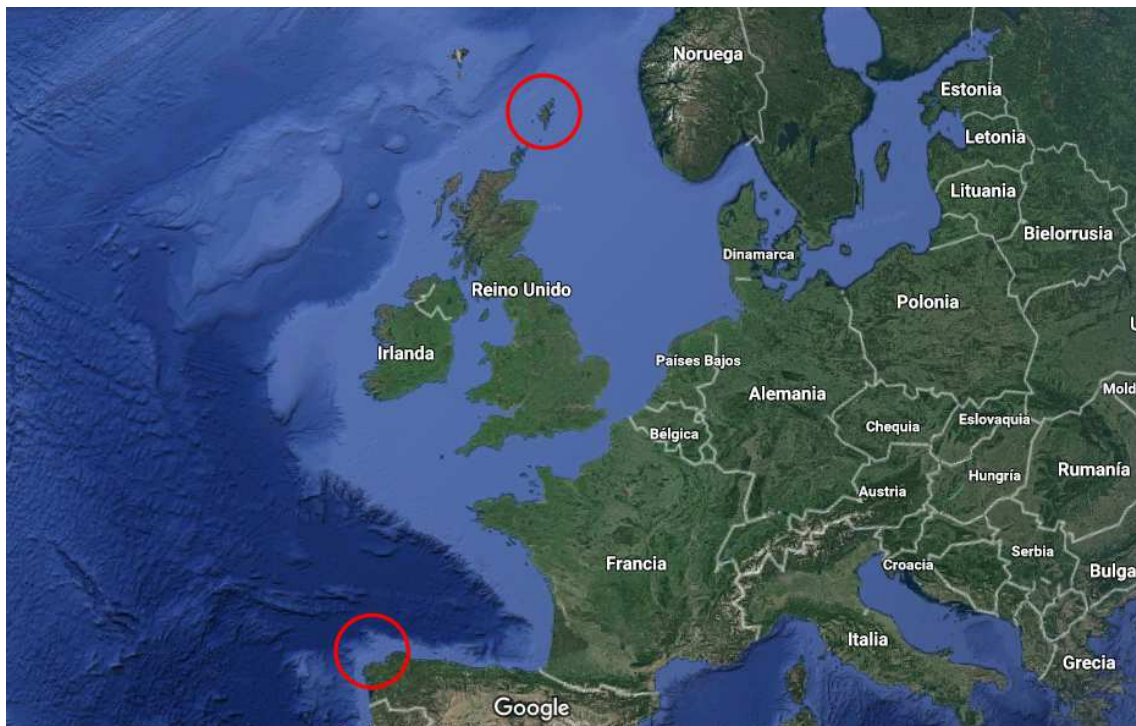


Figura 4. Localización geográfica de las muestras recogidas en Escocia y Galicia (círculos rojos).

Los ejemplares procedentes de Escocia fueron recogidos durante un estudio de monitorización rutinario de la macrofauna bentónica en yacimientos petrolíferos del Mar del Norte (Escocia), en los años 1991, 2008 y durante el período 2010-2012. En total fueron recogidos 14 poliquetos pertenecientes al género *Terebellides*, identificados como una nueva especie y denominados *Terebellides shetlandica* por Parapar, Moreira y O'Reilly (2016). Los valores ambientales de recogida de los ejemplares provenientes del Congo están pendientes de ser facilitados por la empresa que realizó el muestreo. Con relación a estos datos como a los de los ejemplares de la costa de Galicia, dado que se trata todavía de material en proceso de estudio, y por lo tanto no publicado todavía, creemos pertinente no incluirlos en este TFG.



Figura 5. Localización geográfica de las muestras recogidas en la costa del Congo y Gabón (círculo rojo).

Independientemente de su origen, todos los especímenes fueron introducidos en formol 4% para la fijación de los tejidos, y posteriormente en etanol 70% para su conservación. Los ejemplares fueron examinados previamente con lupa en el laboratorio de poliquetos (Área de Zoología) de la Universidad de Coruña para la selección de aquellos que serían utilizados para ser examinados con el MEB. Aquellos seleccionados, los 7 ejemplares arriba referidos, fueron preparados mediante una deshidratación progresiva utilizando alcoholes desde el 70% al 100%. Posteriormente fueron trasladados al Servicios de Apoyo a Investigación de la UDC, donde fueron sometidos a un proceso de secado en punto crítico utilizando CO₂ a través de un evaporador BAL-TEC SCD 004 y a continuación recubiertos de una fina capa de oro para poder ser examinados empleando un MEB de la marca JEOL JSM-6400.

Abreviaturas empleadas en el texto y pies de fotos: **br** – branquia; **cab** - ciliatura abfrontal branquial; **ceb** - ciliatura del eje branquial; **cl** - cilios lamelares; **cp** - cocópodo; **dt** – dentículos; **l_{dd}** - lóbulo dorsal derecho; **l_{di}** - lóbulo dorsal izquierdo; **l_{vd}** - lóbulo ventral derecho; **l_{vi}** - lóbulo ventral izquierdo; **MC** - Mechón ciliar; **neu** – neurópodo; **no** – notópodo; **p_{da}** - papila dorsal abdominal; **r** – rostrum; **SG** – segmento; **ST** – setígero; **to** – tentáculos orales.

Objetivo

El objetivo del presente trabajo es aprender las principales características del Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), los rudimentos de su manejo, así como su aplicabilidad en los estudios científicos a través, en este caso, de su empleo en el estudio taxonómico de los Anélidos Poliquetos. Para ello se emplearán las imágenes MEB obtenidas a partir del estudio de varios ejemplares del género *Terebellides* con esta herramienta procedentes de tres enclaves geográficos diferentes en la costa oriental del Océano Atlántico (ver arriba), y realizando así una comparación de las características micro-morfológicas externas, preferentemente de dos elementos corporales claves en el estudio taxonómico y cuya observación es especialmente favorable con el MEB. Estos elementos son las branquias y las sedas y uncinos. Como resultado de ello se pretende concluir si, al menos a este nivel, los tres grupos de ejemplares podrían o no pertenecer a la misma especie.

Resultados

A continuación, se presenta una descripción de los distintos ejemplares estudiados a partir de las imágenes tomadas al MEB, centrándose en las distintas estructuras citas anteriormente: branquias y sedas, las cuales su observación detallada es de mucha mayor calidad bajo esta técnica de estudio microestructura.

Descripción de los ejemplares escoceses (Figuras 6 a 8)

Las branquias surgen como una estructura única del ST1 (Fig. 6a), consta de un grueso tallo basal de posición medio-dorsal y están compuestas por dos pares de lóbulos no fusionados (Fig. 6a), un par inferior (=ventral) más pequeño y más corto que el par de lóbulos superiores (=dorsal) (Fig. 6b). El quinto lóbulo (anterior) no está presente. Los lóbulos ventrales presentan una proyección larga y puntiaguda en su región posterior de aproximadamente la mitad de su longitud (= filamento terminal) (Figs. 6b, c); los lóbulos dorsales carecen de ella. Ambos lados de las lamelas braquiales están provistos de filas paralelas de cilios (Fig. 6d, cl). El borde de cada lamela de los lóbulos dorsales posee un mechón de cilios en la zona interbranquial (Fig. 6c, ceb). Las ramas desde las que se proyectan las lamelas en todos los lóbulos branquiales cuentan con una banda ciliada ancha en la parte inferior (Fig. 6c, cab). No se observa mechones de cilios o papilas marginales en el borde exterior de las láminas.

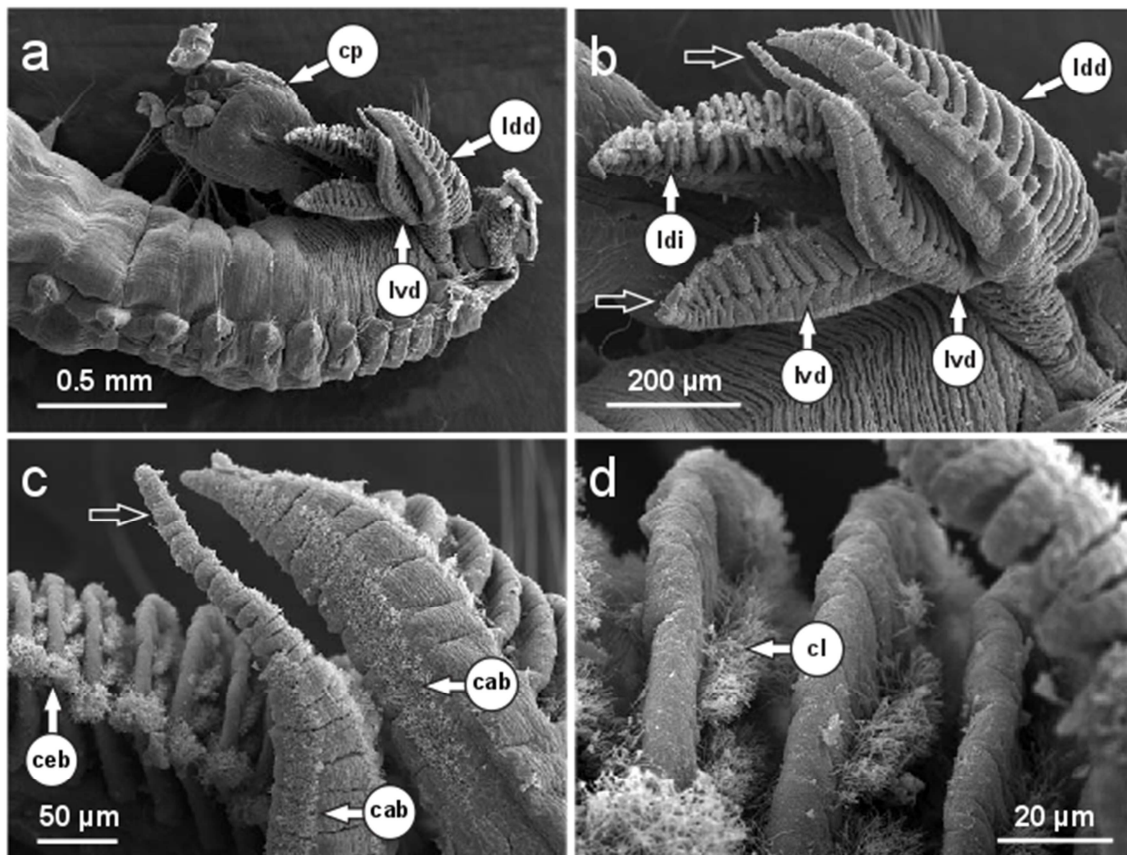


Figura 6. Ejemplar de la costa escocesa de *Terebellides shetlandica*. (a) Región anterior del tórax, con las branquias y un copépodo parásito. (b) Lóbulos branquiales dorsales y ventrales. (c) Detalle de la parte inferior de las ramas branquiales y del filamento terminal (flecha blanca). (d) Detalle del espacio interlamelar.

Entre estos ejemplares escoceses es habitual, aunque no constante, encontrar copépodos parásitos adherido a la superficie dorsal del cuerpo en posición anterior, cerca de las branquias (Fig. 6a, cp).

La región torácica está formada por 18 setígeros provistos de notópodos y también con neurópodos desde ST6. Todos los notópodos son de tamaño similar, estando los del ST1 y ST2 ligeramente desplazados dorsalmente. Notosedas torácicas dispuestas en dos filas y con la superficie rugosa; la fila anterior presenta sedas curvadas ligeramente aplanadas, mientras que la posterior son sedas claramente lanceoladas (Fig. 7a).

Los neurópodos torácicos están presentes desde ST6 hasta ST18 y dotados de uncinos dispuestos en hileras individuales hasta el final. El primer neurópodo torácico (ST6) presenta ganchos aciculares geniculados (Fig. 7b, c). Estas sedas están provistas de unos dientes diminutos formado un *capitium* (Fig. 7d). Los siguientes neurópodos torácicos cuentan con aproximadamente de 8-10 uncinos por torus (Fig. 8a, b). Estos uncinos aciculares tienen forma de gancho denticulado formado por un *rostrum* curvado y alargado (Fig. 8b) cubierto por cuatro dientes y una cresta superior de pequeños denticúlos de diferentes tamaños (Fig. 8b, dt).

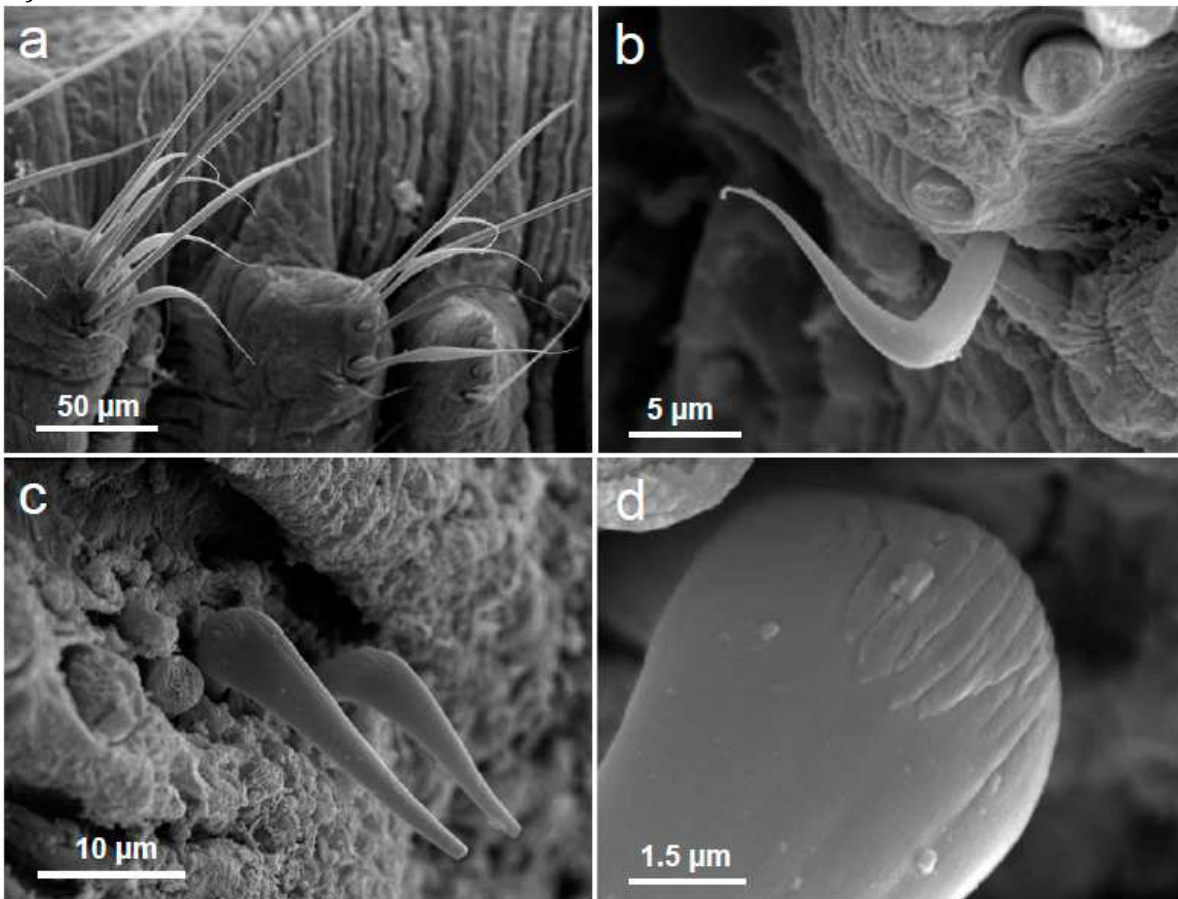


Figura 7. Ejemplar de la costa escocesa de *Terebellides shetlandica*. (a) Notópodos torácicos con dos filas paralelas de sedas de distintas formas. (b-c) Uncinos aciculares en ST6. (d) Detalle de denticillos del *capitium* de los anteriores.

Neurópodos abdominales como pínulas elevadas provistas de 6-12 uncinos por torus (Fig. 8c). Estos uncinos son de tipo avicular provistos de 3-4 dientes sobre el rostro (Fig. 8d, r), y todos ellos superpuestos por un número variable de dientes más cortos formando una cresta

superior. En los setígeros abdominales no existe noropodio con notosedas, encontrándose en su lugar una papila ciliada sensorial dorsal (Fig. 8c, pda).

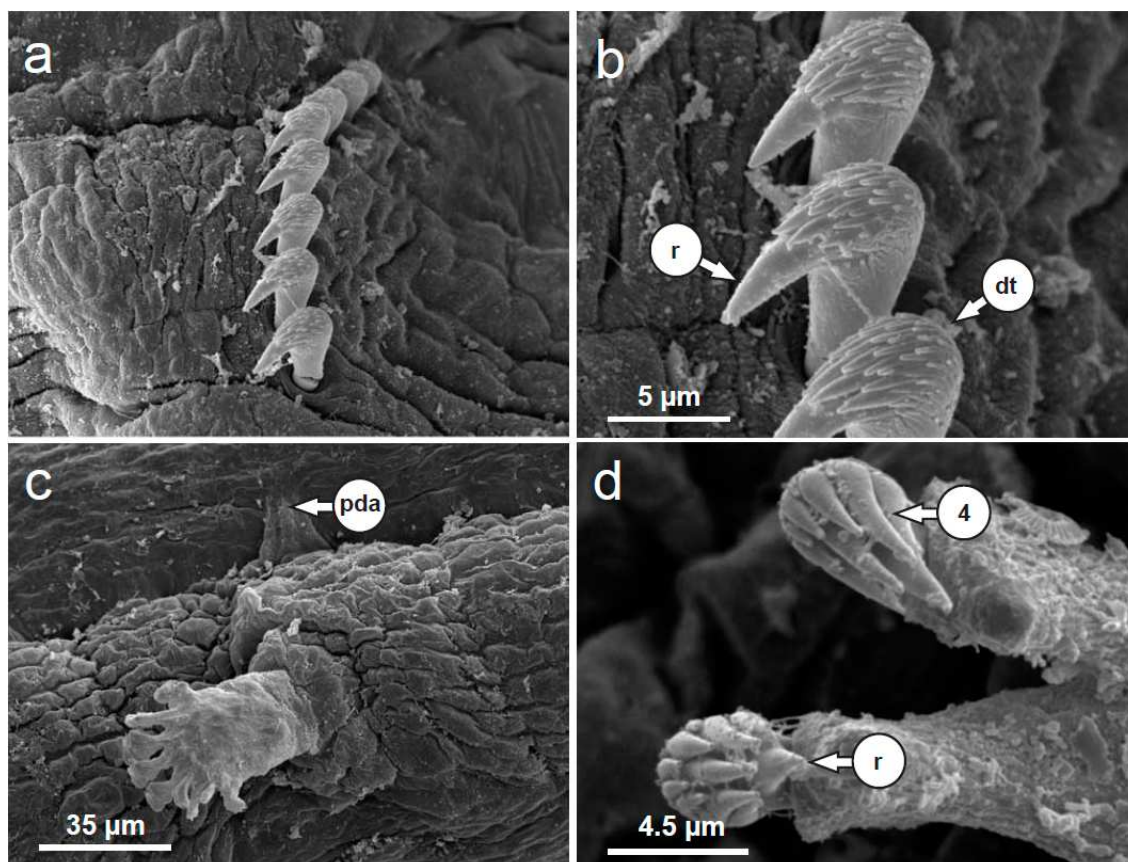


Figura 8. Ejemplar de la costa escocesa de *Terebellides shetlandica*. (a) Neurópodo torácico. (b) Detalle de los uncinos geniculados de los neurópodos torácicos. (c) Neurópodo abdominal. (d) Detalle de los uncinos aviculares de los neurópodos abdominales.

Descripción de los ejemplares gallegos (Figuras 9 a 11)

Las branquias surgen del ST1, están formadas por un tallo único provisto de dos pares de lóbulos no fusionados de tamaño similar (Fig. 9a) aunque en ocasiones los lóbulos dorsales pueden faltar (Fig. 9c). Quinto lóbulo (anterior) asimismo no presente. Proyecciones alargadas y agudas presentes en el extremo posterior de los lóbulos ventrales (Fig. 9a-c). Lamelas branquiales gruesas que presentan hileras de cilios en ambas caras, además de mechones de cilios en su borde medial (Fig. 9d). Ciliatura abfrontal branquial no presente. Como ocurre en el material escocés, tampoco se observan mechones ciliados o papilas marginales en el borde exterior de las lamelas.

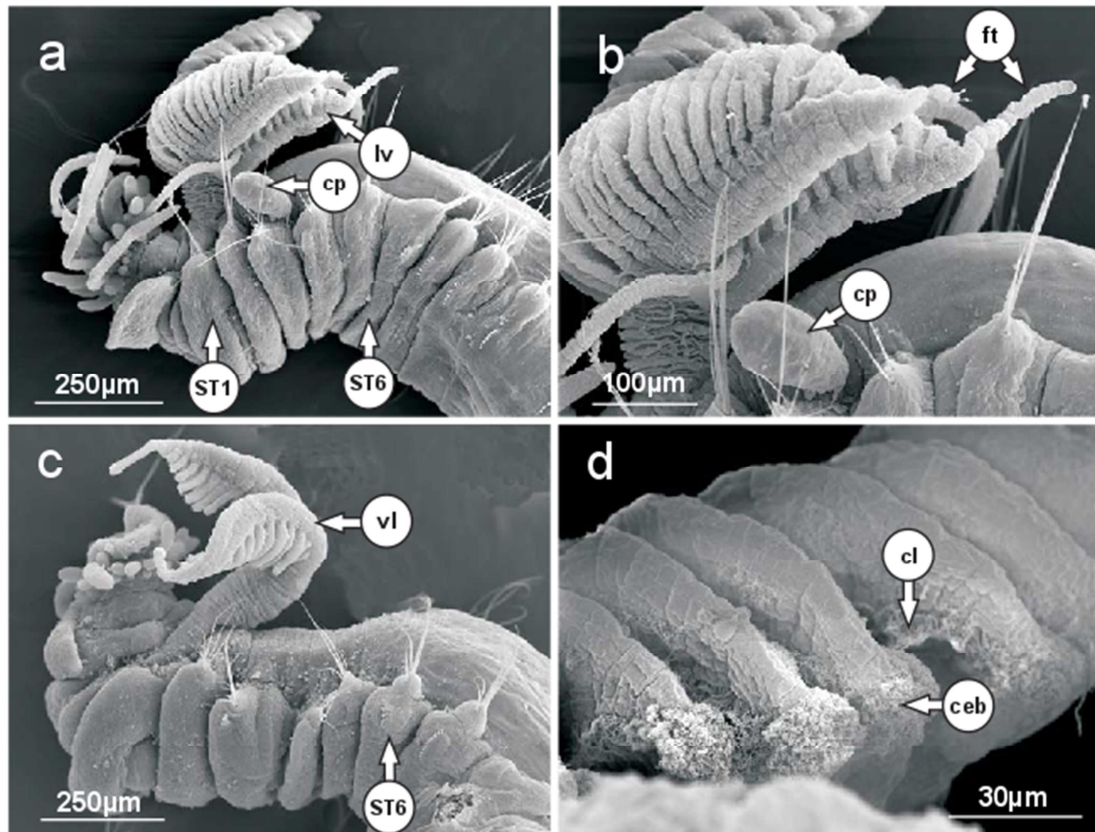


Figura 9. Ejemplar de la costa gallega de *Terebellides* sp. (a) Vista de la parte anterior del tórax en la que se puede apreciar las láminas laterales de los setígeros torácicos anteriores, branquias y copépodo parásito. (b) Detalle de los lóbulos branquiales y copépodo. (c) Ejemplar sin lóbulos branquiales dorsales. (d) Detalle de las hileras y mechones ciliares del lóbulo dorsal derecho.

En los ejemplares gallegos, al igual que en los escoceses, es habitual encontrar copéodos parásitos adheridos a la superficie dorsal del cuerpo en posición anterior (Fig. 9a-b, cp).

Los notópodos incrementan de tamaño progresivamente a medida que se aproximan a la zona abdominal (Fig. 9c). El notópodo del ST2 presenta un ligero desplazamiento dorsal. Notosedas muy largas con superficie rugosa, dispuestas en dos filas paralelas. En uno de los ejemplares, las sedas de la fila anterior tienen forma geniculada mientras que las de la fila posterior son más rectas y alargadas; por el contrario, en el otro esto solo ocurre a partir de ST6 (Fig. 10a).

Primer neurópodo torácico en ST6, con uncinos geniculados dispuestos en fila cuyo tamaño se reduce progresivamente, siendo las ventrales más pequeñas (Fig. 10c). En la parte exterior de la curvatura de las sedas presentan unos minúsculos dientes formando un *capitium* (Fig. 10d). El resto de neurópodos torácicos presentan uncinos en forma de gancho formados por un colmillo interior recubierto por 3 dientes de menor tamaño y otros de tamaño variable formando una capa superior (Fig. 11a, b).

Neurópodos abdominales en forma de pínulas dotadas de 7 a 13 uncinos aviculares compuestos por un rostro recubierto casi en su totalidad de cuatro dientes largos y numerosos dentículos de tamaño progresivamente menor (Fig. 11c, d).

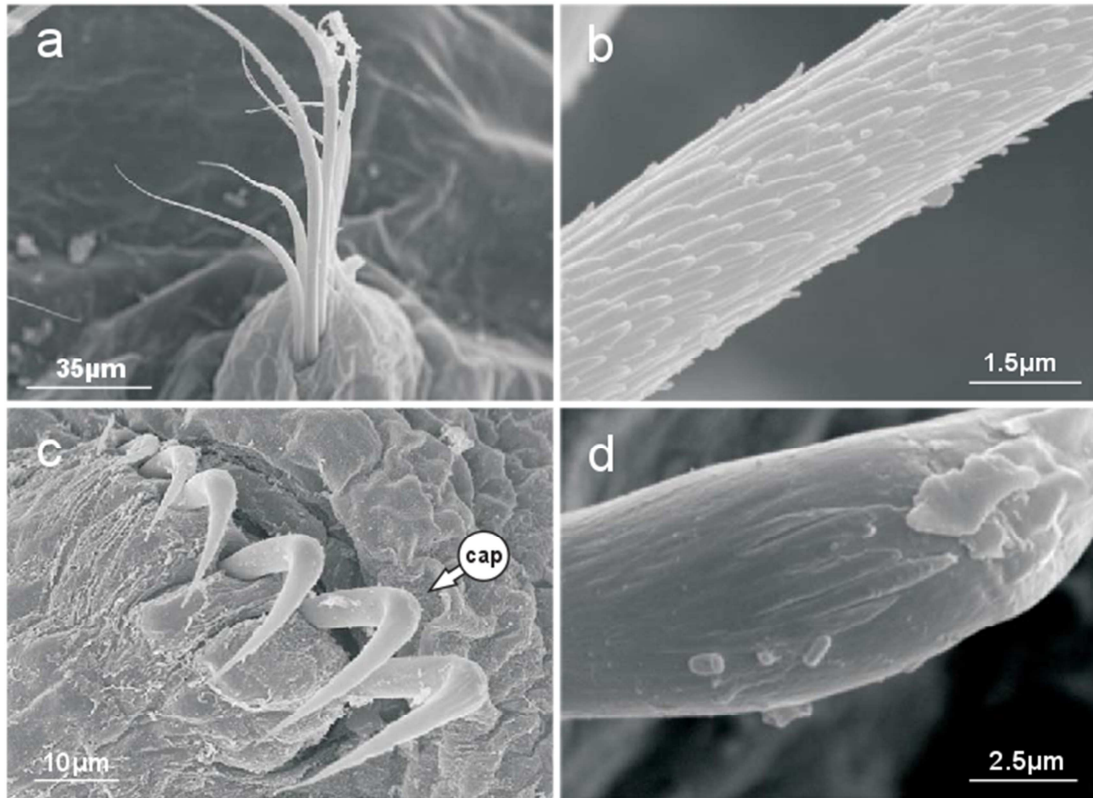


Figura 10. Ejemplar de la costa gallega de *Terebellides* sp. (a) Detalle de las dos filas de notosedas de cada notópodo. (b) Superficie rugosa de una notoseda. (c) Sedas geniculadas del primer neurópodo torácico en ST6. (d) Detalle del *capitium* de una de las neurosedas anteriores.

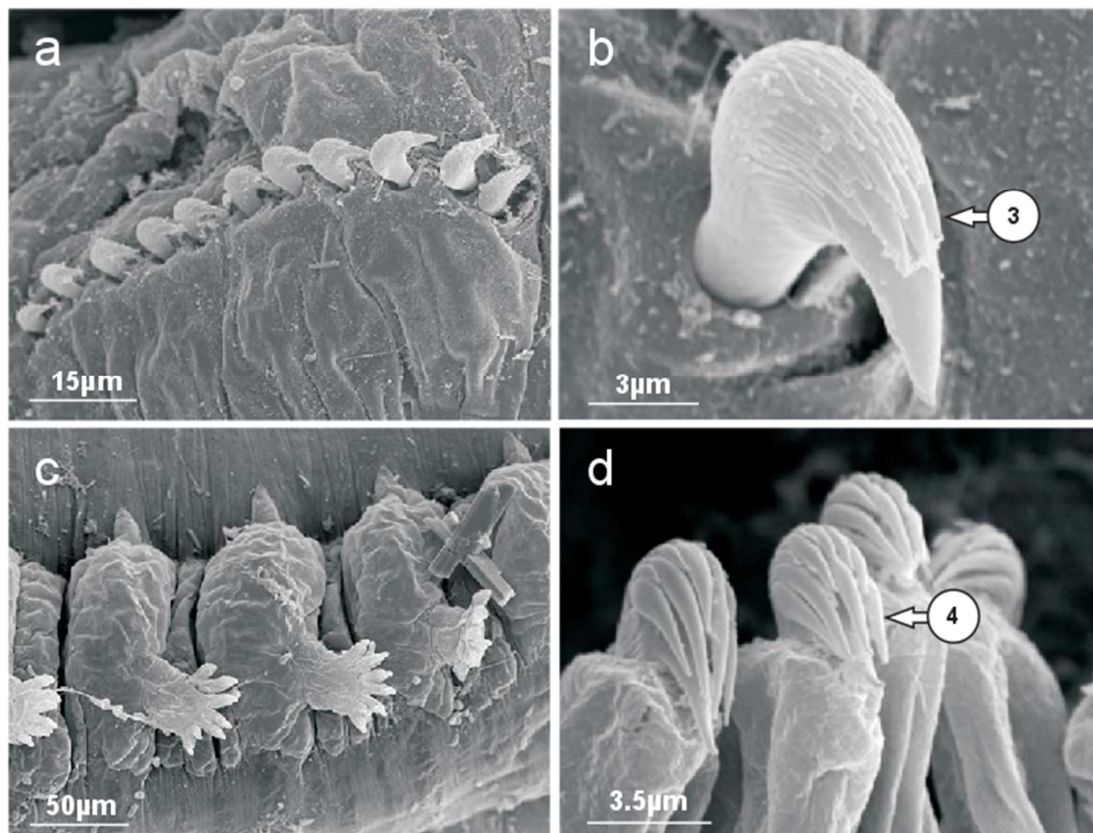


Figura 11. Ejemplar de la costa gallega de *Terebellides* sp. (a) Neurópodo torácico. (b) Detalle de un uncino torácico. (c) Neurópodos abdominales. (d) Detalle de uncinos aviculares de los neurópodos abdominales.

Descripción de los ejemplares africanos (Figuras 12 y 13)

Las branquias parten de la zona mediodorsal de ST1 través de un tallo único que se divide en un par de lóbulos inferiores (ventrales) sensiblemente menores en tamaño que el par de lóbulos superiores (dorsales), ninguno de los dos pares se encuentra fusionado a lo largo de su longitud (Figs. 12a, b). Se la misma manera que ocurre en los dos casos anteriores, no se observa presencia del quinto lóbulo branquial (anterior) (Fig. 12a). En el extremo posterior de los lóbulos inferiores se observan de nuevo unas largas proyecciones puntiagudas que están ausentes en los superiores (Fig. 12b, ft). Ambos lados de las láminas branquiales presentan filas de cilios. En la cara interna, tanto anterior como posterior de las lamelas que componen los lóbulos branquiales, tanto dorsales como ventrales, se observan de nuevo las líneas de cilios (Fig. 12c, cl).

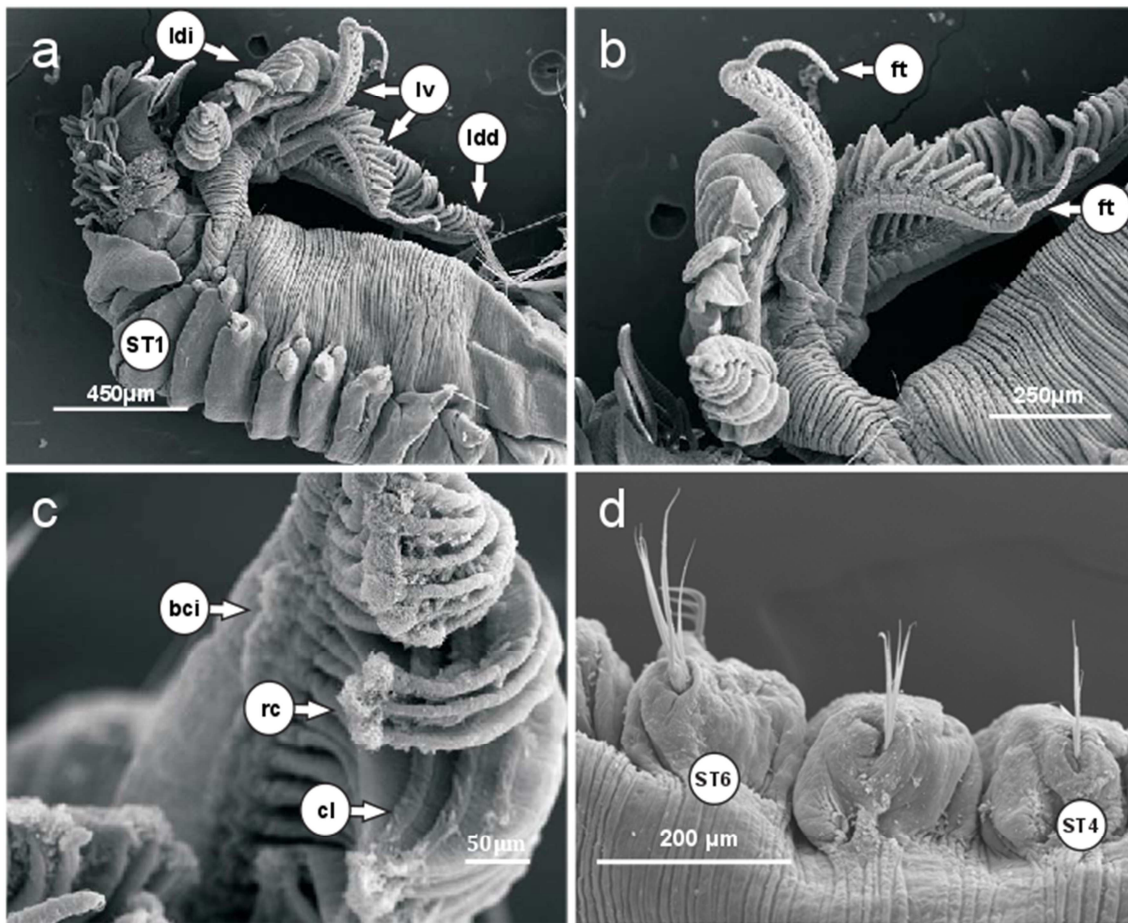


Figura 12. Ejemplar de la costa africana de *Terebellides* sp. (a) Parte anterior del tórax donde se pueden ver las expansiones laterales de los segmentos torácicos anteriores, prostomio y branquia. (b) Detalle de la branquia, provista de un par de lóbulos dorsal y un par ventral. (c) Detalle del espacio interlamelar de un lóbulo dorsal donde se aprecian las líneas de cilios. (d) Notópodos y sedas dispuestas en una única fila.

Los notópodos torácicos ST1 Y ST2 están ligeramente desplazados dorsalmente, siendo el primero de ellos considerablemente más pequeño que los demás (Fig. 12a). Notosedas lanceoladas con una superficie escamosa y dispuestas en una fila simple (Fig. 12d, 13a).

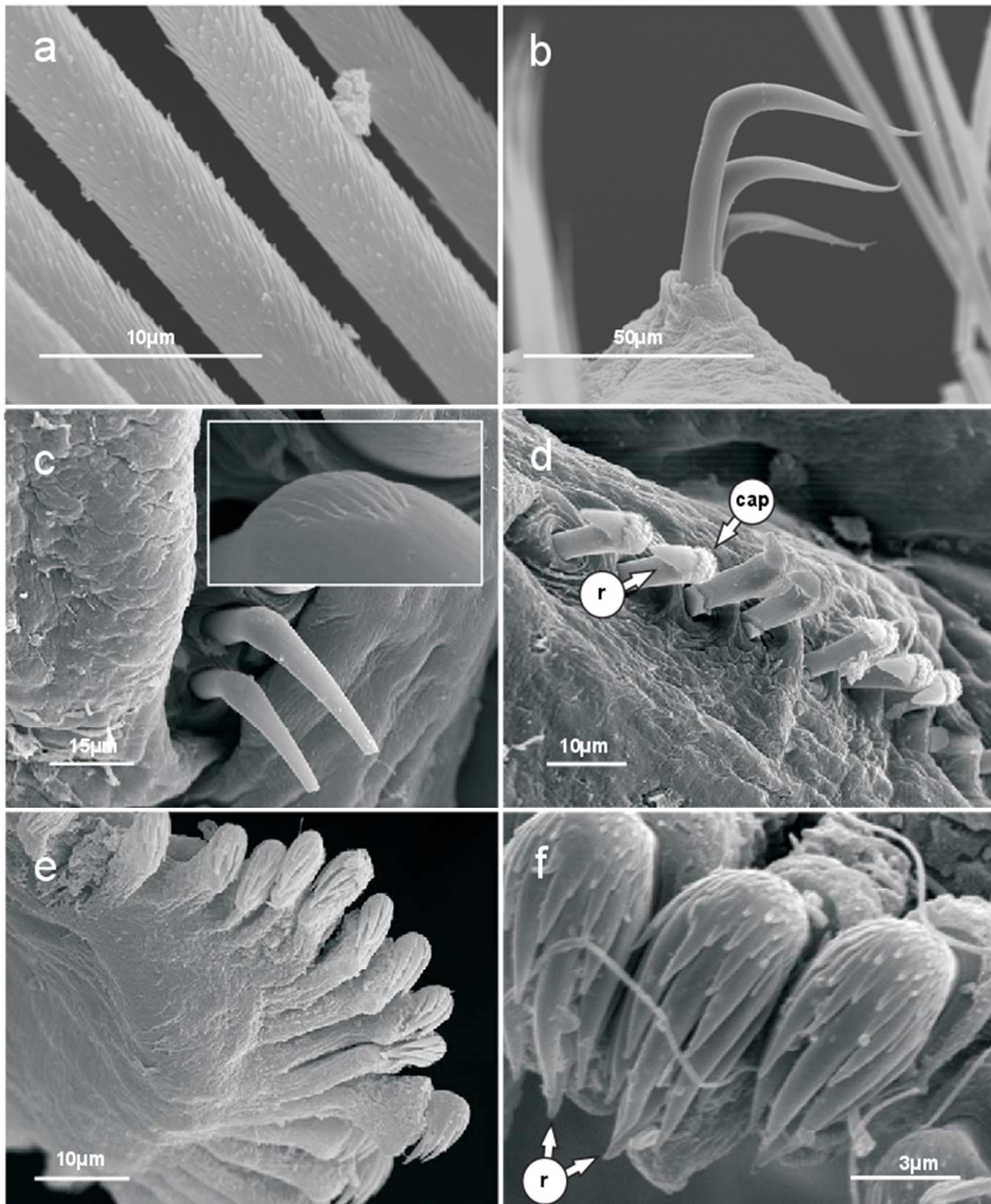


Figura 13. Ejemplar de la costa africana de *Terebellides* sp. (a) Detalle de la superficie no lisa de una notoseda (b) Uncinos geniculados del primer neurópedo torácico (c) Neurópedo torácico en ST6 y detalle del capitium (d) Neuropódo torácico (e) Neurópedo abdominal (f) Detalle de uncino avicular de un neurópedo abdominal.

Los neurópedos torácicos presentes desde ST6 con uncinos dispuestos en una fila simple, siendo éstos en el primer neurópedo en forma de ganchos aciculares geniculados (Fig. 13b, c). Estas sedas geniculadas están provistas por un *capitium* denticulado en la parte superior (Fig. 13c, detalle). De ST7 en adelante, uncinos aciculares torácicos tienen apariencia de gancho y formado por 4-5 pequeños dientes que recubren un diente alargado y curvado o *rostrum* (Fig. 13d, r), rematado en una cresta con dientes de distintos tamaños o *capitium* (Fig. 13d, cap).

Unciníferos abdominales en forma de pínulas elevadas sobre la superficie corporal (Fig. 13e) que disminuyen en tamaño a medida que se estrecha el cuerpo hacia el pigidio. Estos neurópodos cuentan con 7-17 uncinos aviculares dispuestos en una hilera, formados por un rostro prácticamente cubierto por 4 de dientes más cortos y por una segunda capa de dentículos de diferentes longitudes (Fig. 13e, f).

Discusión

A continuación, se presentarán algunos comentarios generales comparativos relativos a los tres ejemplares estudiados y en relación con los dos caracteres corporales tenidos en cuenta: branquias y sedas y uncinos.

Es importante aclarar que, como se puede apreciar por el material empleado, el número de ejemplares estudiados, así como el de caracteres taxonómicos tenidos en cuenta, no es posible extraer conclusiones definitivas en cuanto a la coespecificidad o no de los ejemplares. En el primer caso pues no se contempla la posible variabilidad morfológica de cada grupo geográfico, y en el segundo por no tenerse en cuenta otros caracteres morfológicos asimismo relevantes en la taxonomía del género como son la localización y número de nefridios, tamaño general corporal, tamaño y disposición relativa de notópodos y neurópodos, etc.

Respecto a las branquias:

El quinto lóbulo no se presenta en ninguno de los tres ejemplares independientemente de que fueran procedentes de muy distintas localizaciones geográficas. Asimismo se observa un bajo grado de fusión en los lóbulos de todos los ejemplares. Los lóbulos dorsales tienen distinta forma y mayor tamaño que los ventrales en los especímenes escoceses y africanos, si bien es cierto que esta diferencia no es muy evidente en el ejemplar gallego. Uno de los ejemplares carece de lóbulos dorsales por lo que no se puede hacer una clara correspondencia comparación entre ellos. Sin embargo, los lóbulos ventrales presentes parecen muy pequeños como para que los dorsales, en el caso de estar presentes, sean del mismo tamaño. Por último, en los especímenes de las 3 localizaciones presentan un filamento terminal de los lóbulos ventrales, lo cual es muy relevante pues se trata de un carácter de peso en la taxonomía del género (ver por ejemplo Parapar & Hutchings, 2014; Parapar, Moreira & Helgason, 2011; Parapar, Moreira & O'Reilly, 2016).

Por su parte, las lamelas de los ejemplares africanos y escoceses se observan menos densamente empaquetadas que las gallegas, siendo esto tal vez debido al estado del ejemplar. En cuanto a los cilios lamelares no existen diferencias entre ellas puesto que todos los especímenes cuentan con filas de cilios en ambas caras lamelares así como de mechones ciliados en los bordes intrabranquiales de ambos lóbulos dorsales. De la misma forma tampoco se encuentran en ninguno de los ejemplares verrugas en el borde lamelar. Por el contrario en los ejemplares gallegos, a diferencia de los otros dos, no muestran ciliatura en el eje branquial, aunque esto falta pueda ser asimismo debida al bajo número de ejemplares estudiados y deberá ser comprobada en otros. Todas estas características claramente acercan a los ejemplares gallegos y africanos a la especie *T. shertlandica* y los alejan de otros próximos geográficamente como *T. stroemii* Sars, 1835, redescrito recientemente de la costa noruega por Parapar & Hutchings (2014) y *T. adriatica* descrito por Parapar, Mikac & Fiege (2013) en aguas del Mar Adriático, pues ambas especies, además de ser de mayor tamaño, poseen grado diferente de fusión de los lóbulos branquiales y presencia de verrugas en los bordes de las lamelas branquiales.

Como se ha dicho anteriormente las branquias es uno de los caracteres más representativo del género *Terebellides*, y muy utilizado para su descripción taxonómica. Como muestra la Figura 2, estas estructuras presentan una gran variabilidad en la morfología que no es evidente a simple vista. Con el objetivo de ayudar a facilitar el proceso de identificación de las branquias y

establecer futuras relaciones filogenéticas de parentesco entre especies, Parapar, *et al* (2016) ha propuesto 4 modelos de estructuras branquiales. Los 3 grupos de especímenes presentes en este trabajo tienen una morfología branquial que parece corresponder claramente con el tipo 3 de dicha clasificación, esta similitud branquial podría ser un buen indicador de coespecificidad en una muestra más amplia.

Respecto a las sedas y uncinos:

Las sedas de los notópodos torácicos de todos los especímenes de este estudio presentan una superficie escamosa y están dispuestas en dos filas en los notópodos de los ejemplares gallegos y escoceses. Mientras que los africanos sólo cuentan con una fila de sedas por notópodos. Otras características como la longitud, la curvatura y el grado de las mismas necesitan de muestras más amplias para poder llegar a ser utilizadas como característica distintiva, ya que probablemente sea consecuencia de la variabilidad intraespecífica.

Como es frecuente en el género *Terebellides*, todos los especímenes de las distintas áreas geográficas muestran su primer neurópodo en ST6. Estos están dotados de ganchos aciculares geniculados, muy similares entre los ejemplares, y todos ellos con *capitium*. Este hecho lleva también a pensar que los ejemplares de este estudio podrían tratarse de la misma especie ya que muchas especies descritas hasta el momento aparentemente no presentan tal carácter, si bien cabe la posibilidad de que su presencia, no habiendo en muchos casos utilizado el MEB, haya podido pasar desapercibida. Algunas de las características presentadas en el apartado de Resultados no pueden ser utilizadas para realizar comparaciones en una muestra tan pequeña como la nuestra, como por ejemplo la comentada diferencia en la forma del *capitium*, la variabilidad del número de uncinos (se considera normal un número entre 4 y 6 uncinos) así como las variaciones en el tamaño de éstos.

En cuanto a los uncinos torácicos existe una variación en el número de dientes que recubren rostro, si bien estas características pueden ser causadas por la variabilidad, este hecho sirve para poner de manifiesto la interespecificidad del número de dientes que lo recubren (Parapar, *et al.* 2011) los ejemplares africanos cuentan con lo que parece ser un rostro más largo en relación a la dentición que lo recubre (ver Fig. 8b, 11b y 13d), característica potencialmente útil que podría indicar que los especímenes africanos son de una especie distinta.

Por su parte, los uncinos abdominales, de forma avicular, son mucho más similares entre sí en todos los ejemplares, con un rostro rodeado de 4 dientes en la mayoría de ellos. Las muestras gallegas y escocesas cuentan con 6-12 uncinos aproximadamente, mientras que la muestra africana con 7-17. Aunque este número puede ser debido a la variabilidad intraespecífica, por lo que hasta ahora este carácter no ha sido históricamente de gran utilidad para la discriminación de especies dentro del género *Terebellides*.

A partir de los datos extraídos y siguiendo la clave propuesta por Parapar *et al.* (2016) para la clasificación de las especies de *Terebellides* del noreste atlántico, se desprende que los especímenes recogidos del enclave geográfico africano podrían pertenecer a la especie *Terebellides shetlandica spec. nov.* Estos ejemplares presentan características que coinciden con esta especie en cuanto a las branquias como la presencia de filamentos terminales en los lóbulos ventrales y las diferencias en tamaño y forma de los lóbulos dorsales respecto a los ventrales. Sin embargo, como vimos, existen ciertas diferencias en las sedas notopodiales y sobre todo en los uncinos torácicos, las cuales no nos permiten afirmar con mayor rotundidad

esta coespecificidad. Por otro lado, hay que insistir en que es necesario tener presente que el número de ejemplares utilizados en este estudio es claramente insuficiente como para afirmar nada categóricamente.

En relación a los especímenes gallegos, la forma y el tamaño similar entre los lóbulos ventrales y dorsales podría llevarnos a pensar que se trata de una *Terebellides atlantis* Williams, 1984 según la clave mencionada. No obstante, estos ejemplares están dotados de un filamento terminal en los lóbulos ventrales mucho más largo y han sido descritos (de forma bastante incompleta) de la costa occidental del Océano Atlántico. La dentición del *capitium* de los uncinos torácicos descrita en *T. atlantis* (dientes muy finos) no se asemeja a la de nuestros especímenes. Además, esta especie suele tener un elevado número de uncinos abdominales por torus (según Parapar *et al.*, 2011 y Parapar *et al.*, 2016). Si bien es cierto que algunos autores han establecido que el número de uncinos aviculares abdominales no es de gran utilidad para la diferenciación entre especies (ver Schüller & Hutchings, 2010). Debido a la presencia común del filamento terminal en los lóbulos ventrales, la diferencia de los uncinos torácicos respecto a los de la *T. atlantis* y al bajo número de uncinos abdominales por torus, concluimos que probablemente los ejemplares gallegos es más probable pertenezcan al taxón *Terebellides shetlandica spec. nov.* tanto por semejanzas morfológicas como también por la indudable proximidad geográfica.

Conclusiones

1. El uso del Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) es una herramienta de apoyo muy útil para la identificación de especies y su diferenciación con otras ya previamente descritas. En especial en caracteres finos como la presencia de cilios en la lamelas, de verrugas ciliares, etc.
2. La revisión de las fotografías proporcionadas por el MEB establece que los ejemplares correspondientes a los enclaves de Congo y Galicia pueden pertenecer a la misma especie y a su vez ambas muy probablemente se correspondan con la especie *T. shetlandica*.
3. La existencia de una cierta variabilidad morfológica en una misma estructura corporal en Poliquetos, como es habitual en invertebrados, hace necesario el empleo de más ejemplares así como abordar el examen de otros caracteres de relevancia taxonómica.

Conclusión

1. O uso do Microscopio Electrónico de Varrido (MEV) é unha ferramenta de apoio moi útil pra identificación de especies e súa diferenciación con outras xa previamente descritas. En especial en caracteres finos como a presenza de cilios nas lamelas, de verrugas ciliares, etc.
2. A revisión das fotografías proporcionadas polo MEV establece que os exemplares correspondentes aos enclaves do Congo e Galicia poden pertencer á mesma especie e á súa vez ambas moi probablemente correspóndanse coa especie *T. shetlandica*.
3. A existencia dunha certa variabilidade morfolóxica nunha mesma estrutura corporal nos Poliquetos, como é habitual en invertebrados, fai necesario o emprego de máis exemplares así como abordar o examen doutros caracteres de relevancia taxonómica

Conclusions

1. The use of the Scanning Electron Microscope (SEM) is a very useful tool for the taxonomic identification of species and its differentiation with others previously described. Especially in fine characters such as the presence of cilia in the lamellae, ciliary buttons, etc.
2. The study of the pictures provided by the SEM establishes that the specimens collected both in Congo and Galicia may belong to the same species and in turn both probably correspond to the species *T. shetlandica*.
3. The existence of a certain morphological variability in the same body structure in Polychaetes, as is usual in invertebrates, makes necessary the use of more specimens as well as the examination of other characters of taxonomic relevance.

Bibliografía

- Garraffoni, A.R.S. & Lana, P.C. (2006). Phylogenetic relationships within the Terebellidae (Polychaeta: Terebellida) based on morphological characters. *Invertebrate Systematics* 22(6):605–626.
- Goldstein, J.I., Newbury, D.E., Echlin P., Alegría, D.C., Lyman, C.E., Lifshin, E., Sawyner, L., Michael, J.R., (2003), *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis: Third Edition*. New York: Springer Science + Business media New York.
- Hutchings P. & Peart R. (2000). A revision of the Australian Trichobranchidae (Polychaeta). *Invertebrate Taxonomy*, 14:225–272.
- Hutchings P. (2000) Polychaetes & Allies, The Southern Synthesis: Family Trichobranchidae. *Fauna of Australia*, 4:232-235.
- Parapar J. & Hutchings P. (2014). Redescription of *Terebellides stroemii* (Polychaeta, Trichobranchidae) and designation of a neotype. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, pp. 1-15.
- Parapar J., Mikac B. & Fiege D. (2013). Diversity of the genus *Terebellides* (Polychaeta: Trichobranchidae) in the Adriatic Sea with the description of a new species. *Zootaxa* 3691:333-350.
- Parapar J., Moreira J. & Helgason G. V. (2011). Taxonomy and distribution of *Terebellides* (Polychaeta, Trichobranchidae) in Icelandic waters, with the description of a new species. *Zootaxa* 2983:1-20.
- Parapar J., Moreira J. & O'Reilly M.. (2016) A new species of *Terebellides* (Polychaeta: Trichobranchidae) from Scottish waters with an insight into branchial morphology. *Marine Biodiversity*, 46:211-225
- Parapar, J. & Moreira, J. (2008a). Redescription of *Terebellides kerguelensis* stat. nov. (Polychaeta: Trichobranchidae) from Antarctic and subantarctic waters. *Helgoland Marine Research*, 62: 143-152.
- Parapar, J. & Moreira, J. (2008b). Revision of three species of *Terebellides* (Polychaeta, Trichobranchidae) described by C. Hesse in 1917 from Southern Ocean. *Journal of Natural History*. 42: 1261-1275.
- Sars, M. (1835). Beskrivelser og lagttagelser over nogle mærkelige eller nye I Havet ved den Bergenske Kyst levende Dyr af Polypernes, Acalephernes, Radiaternes, Annelidernes og Molluskernes classer, med en kort Oversigt over de hidtil af Forfatteren sammesteds fundne Arter og deres Forelkommen. Thorstein Hallegers Forlag, Bergen, 81 pp.

- Schüller M. & Hutchings P. (2010). New insights in the taxonomy of Trichobranchidae (Polychaeta) with description of a new *Terebellides* species from Australia. *Zootaxa* 2395: 1-16.
- Schüller M. & Hutchings P. (2012) New species of Terebellides (Polychaeta: Trichobranchidae) indicate long-distance dispersal between western South Atlantic deep-sea basins. *Zootaxa* 3254:1-31
- Solís-Weiss V., Lodoño-Messa M. H. & Hernández-Alcántara P. (2009). Trichobranchidae Malmgren, 1866. *Poliquetos (Annelida: Polychaeta) de México y América tropical*, 3: 665-670.
- Solís-Weiss, V., Fauchald, K., Blankensteyn, A. (1991). Trichobranchidae (Polychaeta) from shallow warm water areas in the western Atlantic Ocean. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 104(1): 147-158.
- Williams S. J. (1984). The status of *Terebellides stroemi* (Polychaeta; Trichobranchidae) as a cosmopolitan species, based on a worldwide morphological survey, including description of new species. *The Linnean Society of New South Wales*, 118-142.