

Supplementary Tables and Figures

Table S1: Primers used in this study

Common Name	F (<i>H. verbana</i>)	R (<i>H. verbana</i>)	F (<i>H. robusta</i>)	R (<i>H. robusta</i>)
Inositol Triphosphate Receptor	gaggagaaatccgtgcaaata	gaagcactctaccaacaaatc	ctaggcagtaacctatgcatcac	atagcaccatccctcctta
Collagen-alpha	ccgtcagttccctggttc	caagggtgactctggagaaatag	gtattgaaggctctgtgggaat	agtgagctgggaggatcaa
Annelid hypothetical	cggcgtgaacatctcatagaa	ctctcccacaacatggaaa	n/a	n/a
Protocadherin	ccagtcacagggtcgaaatag	cccgtaaagtgatcgtgaa	tggtggaatctcaaacttact	cggcgctgatgttaattatc
HCN Channel	tttcctgtaatgctcttga	cggagtcagaggaggataa	cccatgctacaagactccc	tcgtacgttgcataggataaaca
Voltage-Gated Potassium Channel	tactctcgctcaaaagtgc	taatacgactcactataggaagtcttaat gcttgcgc (with t7)	n/a	n/a
Aromatic Amino Acid Decarboxylase	gaaggcctttgtctcaggtaa	tgtctgaactcgggacaataaa	atgatgaagtgctcggttaag	gttgacgtcaccttcgftagt
Tryptophan Hydroxylase	tgaccatctgggttcaaaga	tcgataaagggttctgtctactgc	gatggtcacccgtggttcc	tcgacaagttgaacagtttatcctgg

Fig. S1. Detection of Outliers in the RNASeq Dataset. RobustPCA of the original 14 samples (L). Samples shown with high score and orthogonal distances are outliers by this analysis. Right, MDS plot of the original 14 samples with the samples identified as outliers labeled.

Fig. S2. Expression patterns of each isolated cluster. Centroids of each cluster are shown in color, while the expression of each Trinity gene belonging to the cluster is shown in light grey.

Fig. S3. Expression of neuron-specific transcripts found in *Hirudo* in late-stage *Helobdella* embryos. ISH of stage 11 *Helobdella austinensis* embryos using probes specific to the *Helobdella* orthologs of six of the transcripts verified in figure 3. Probe localization is shown in blue/purple. For each probe, a light micrograph of a chain of 4 mid-body ganglia (left), and a single ganglion at higher magnification (right) are shown. Anterior-posterior (A-P) axis orientation is shown at left.

Fig. S4. Full Phylogenetic tree shown in Figure 5, with all members of each clade shown. Scale bar = the average number of substitutions per site along each branch.

Figure S1

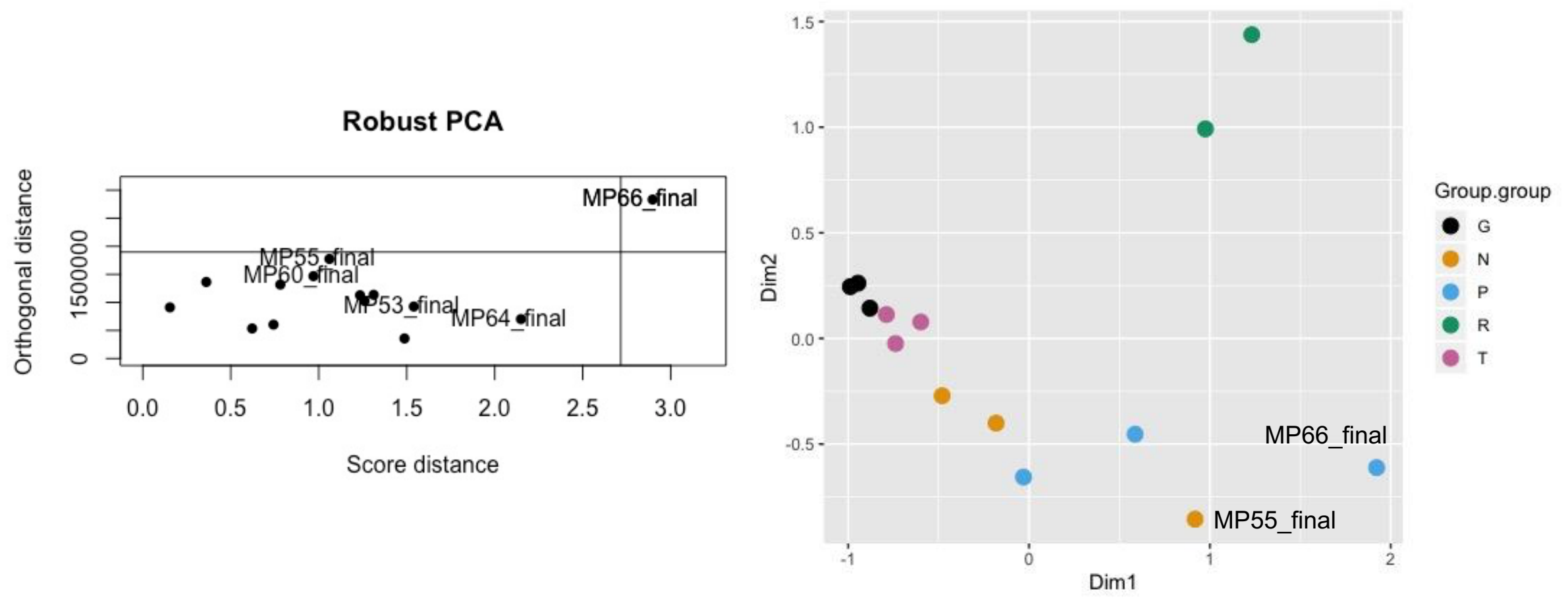
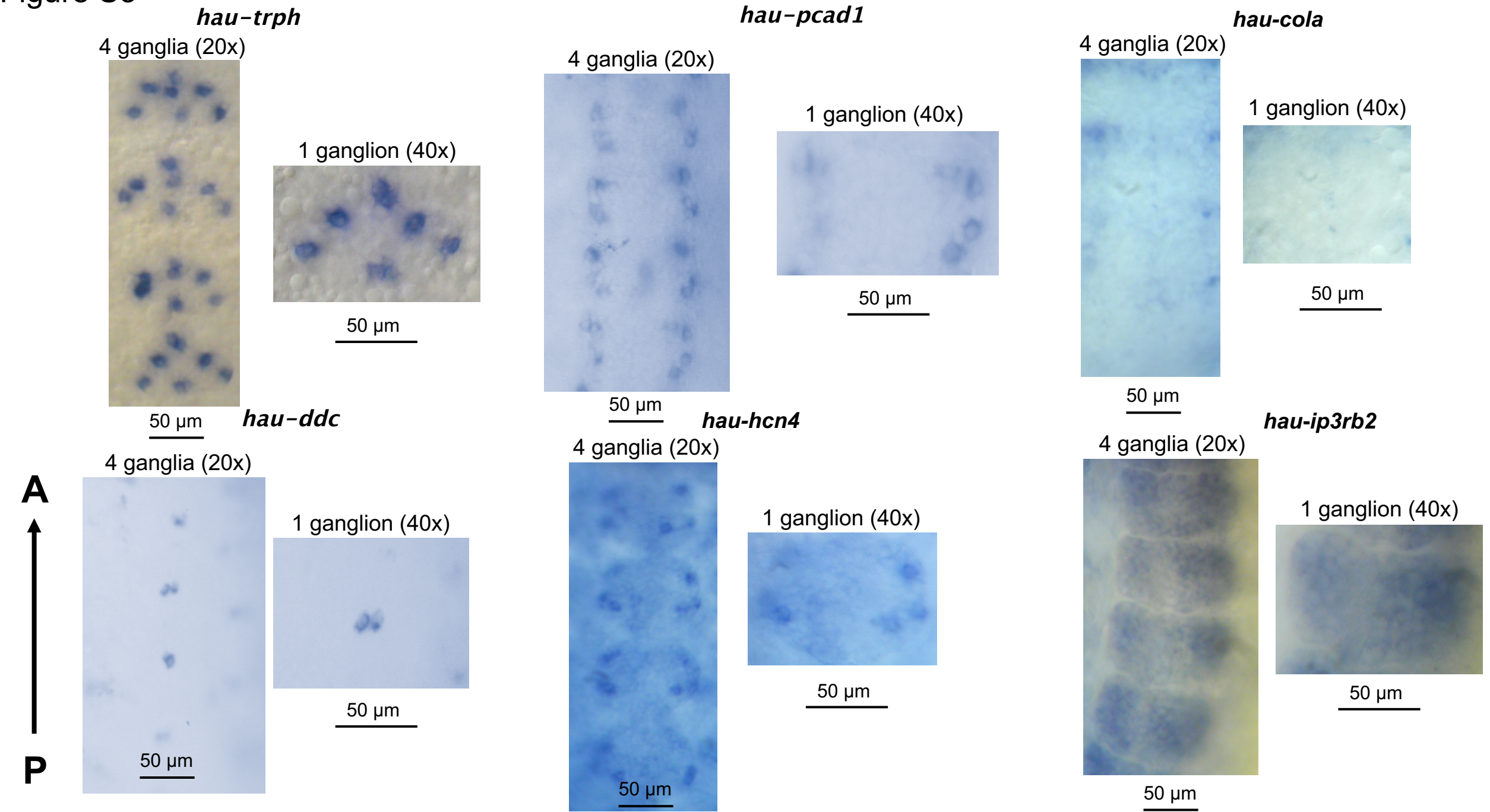


Figure S2



Figure S3



Phylogenetic tree showing the relationships between various HCN channel subunits. The tree is rooted at the bottom left. Bootstrap values are indicated at the nodes. The scale bar represents 0.3 substitutions per site. The species names are listed on the right side of the tree.

Species listed (from top to bottom):

- HCN1_opposum
- HCN1_fugu
- HCN1_green_puffer
- HCN1_trout
- HCN1_frog
- HCN1_chimpanzee
- HCN1_rabbit
- HCN1_human
- HCN1_rat
- HCN1_mouse
- HCN2b_fugu
- HCN2b_green_puffer
- HCN2_zebrafish
- HCN2a_fugu
- HCN2a_green_puffer
- HCN2_frog
- HCN2_chicken
- HCN2_human
- HCN2_rat
- HCN2_mouse
- HCN4_rabbit
- HCN4_human
- HCN4_dog
- HCN4_rat
- HCN4_mouse
- HCN4_opposum
- HCN4_chimpanzee
- HCN4_chicken
- HCN4_frog
- HCN4_zebrafish
- HCN4b_fugu
- HCN4b_green_puffer
- HCN4a_fugu
- HCN4a_green_puffer
- HCN3_human
- HCN3_dog
- HCN3_cow
- HCN3_rat
- HCN3_mouse
- HCN3_opposum
- HCN3b_fugu
- HCN3_zebrafish
- HCN3a_fugu
- HCN3_green_puffer
- HCN3b_csavignyi
- HCN3c_csavignyi
- HCN3d_csavignyi
- HCN3e_csavignyi
- HCN3f_csavignyi
- HCN3g_csavignyi
- HCN3h_csavignyi
- HCN3i_csavignyi
- HCN3j_csavignyi
- HCN3k_csavignyi
- HCN3l_csavignyi
- HCN3m_csavignyi
- HCN3n_csavignyi
- HCN3o_csavignyi
- HCN3p_csavignyi
- HCN3q_csavignyi
- HCN3r_csavignyi
- HCN3s_csavignyi
- HCN3t_csavignyi
- HCN3u_csavignyi
- HCN3v_csavignyi
- HCN3w_csavignyi
- HCN3x_csavignyi
- HCN3y_csavignyi
- HCN3z_csavignyi
- HCN3aa_csavignyi
- HCN3ab_csavignyi
- HCN3ac_csavignyi
- HCN3ad_csavignyi
- HCN3ae_csavignyi
- HCN3af_csavignyi
- HCN3ag_csavignyi
- HCN3ah_csavignyi
- HCN3ai_csavignyi
- HCN3aj_csavignyi
- HCN3ak_csavignyi
- HCN3al_csavignyi
- HCN3am_csavignyi
- HCN3an_csavignyi
- HCN3ao_csavignyi
- HCN3ap_csavignyi
- HCN3aq_csavignyi
- HCN3ar_csavignyi
- HCN3as_csavignyi
- HCN3at_csavignyi
- HCN3au_csavignyi
- HCN3av_csavignyi
- HCN3aw_csavignyi
- HCN3ax_csavignyi
- HCN3ay_csavignyi
- HCN3az_csavignyi
- HCN3ba_csavignyi
- HCN3bb_csavignyi
- HCN3bc_csavignyi
- HCN3bd_csavignyi
- HCN3be_csavignyi
- HCN3bf_csavignyi
- HCN3bg_csavignyi
- HCN3bh_csavignyi
- HCN3bi_csavignyi
- HCN3bj_csavignyi
- HCN3bk_csavignyi
- HCN3bl_csavignyi
- HCN3bm_csavignyi
- HCN3bn_csavignyi
- HCN3bo_csavignyi
- HCN3bp_csavignyi
- HCN3bq_csavignyi
- HCN3br_csavignyi
- HCN3bs_csavignyi
- HCN3bt_csavignyi
- HCN3bu_csavignyi
- HCN3bv_csavignyi
- HCN3bw_csavignyi
- HCN3bx_csavignyi
- HCN3by_csavignyi
- HCN3bz_csavignyi
- HCN3ca_csavignyi
- HCN3cb_csavignyi
- HCN3cc_csavignyi
- HCN3cd_csavignyi
- HCN3ce_csavignyi
- HCN3cf_csavignyi
- HCN3cg_csavignyi
- HCN3ch_csavignyi
- HCN3ci_csavignyi
- HCN3cj_csavignyi
- HCN3ck_csavignyi
- HCN3cl_csavignyi
- HCN3cm_csavignyi
- HCN3cn_csavignyi
- HCN3co_csavignyi
- HCN3cp_csavignyi
- HCN3cq_csavignyi
- HCN3cr_csavignyi
- HCN3cs_csavignyi
- HCN3ct_csavignyi
- HCN3cu_csavignyi
- HCN3cv_csavignyi
- HCN3cw_csavignyi
- HCN3cx_csavignyi
- HCN3cy_csavignyi
- HCN3cz_csavignyi
- HCN3da_csavignyi
- HCN3db_csavignyi
- HCN3dc_csavignyi
- HCN3dd_csavignyi
- HCN3de_csavignyi
- HCN3df_csavignyi
- HCN3dg_csavignyi
- HCN3dh_csavignyi
- HCN3di_csavignyi
- HCN3dj_csavignyi
- HCN3dk_csavignyi
- HCN3dl_csavignyi
- HCN3dm_csavignyi
- HCN3dn_csavignyi
- HCN3do_csavignyi
- HCN3dp_csavignyi
- HCN3dq_csavignyi
- HCN3dr_csavignyi
- HCN3ds_csavignyi
- HCN3dt_csavignyi
- HCN3du_csavignyi
- HCN3dv_csavignyi
- HCN3dw_csavignyi
- HCN3dx_csavignyi
- HCN3dy_csavignyi
- HCN3dz_csavignyi
- HCN3ea_csavignyi
- HCN3eb_csavignyi
- HCN3ec_csavignyi
- HCN3ed_csavignyi
- HCN3ee_csavignyi
- HCN3ef_csavignyi
- HCN3eg_csavignyi
- HCN3eh_csavignyi
- HCN3ei_csavignyi
- HCN3ej_csavignyi
- HCN3ek_csavignyi
- HCN3el_csavignyi
- HCN3em_csavignyi
- HCN3en_csavignyi
- HCN3eo_csavignyi
- HCN3ep_csavignyi
- HCN3eq_csavignyi
- HCN3er_csavignyi
- HCN3es_csavignyi
- HCN3et_csavignyi
- HCN3eu_csavignyi
- HCN3ev_csavignyi
- HCN3ew_csavignyi
- HCN3ex_csavignyi
- HCN3ey_csavignyi
- HCN3ez_csavignyi
- HCN3fa_csavignyi
- HCN3fb_csavignyi
- HCN3fc_csavignyi
- HCN3fd_csavignyi
- HCN3fe_csavignyi
- HCN3ff_csavignyi
- HCN3fg_csavignyi
- HCN3fh_csavignyi
- HCN3fi_csavignyi
- HCN3fj_csavignyi
- HCN3fk_csavignyi
- HCN3fl_csavignyi
- HCN3fm_csavignyi
- HCN3fn_csavignyi
- HCN3fo_csavignyi
- HCN3fp_csavignyi
- HCN3fq_csavignyi
- HCN3fr_csavignyi
- HCN3fs_csavignyi
- HCN3ft_csavignyi
- HCN3fu_csavignyi
- HCN3fv_csavignyi
- HCN3fw_csavignyi
- HCN3fx_csavignyi
- HCN3fy_csavignyi
- HCN3fz_csavignyi
- HCN3ga_csavignyi
- HCN3gb_csavignyi
- HCN3gc_csavignyi
- HCN3gd_csavignyi
- HCN3ge_csavignyi
- HCN3gf_csavignyi
- HCN3gg_csavignyi
- HCN3gh_csavignyi
- HCN3gi_csavignyi
- HCN3gj_csavignyi
- HCN3gk_csavignyi
- HCN3gl_csavignyi
- HCN3gm_csavignyi
- HCN3gn_csavignyi
- HCN3go_csavignyi
- HCN3gp_csavignyi
- HCN3gq_csavignyi
- HCN3gr_csavignyi
- HCN3gs_csavignyi
- HCN3gt_csavignyi
- HCN3gu_csavignyi
- HCN3gv_csavignyi
- HCN3gw_csavignyi
- HCN3gx_csavignyi
- HCN3gy_csavignyi
- HCN3gz_csavignyi
- HCN3ha_csavignyi
- HCN3hb_csavignyi
- HCN3hc_csavignyi
- HCN3hd_csavignyi
- HCN3he_csavignyi
- HCN3hf_csavignyi
- HCN3hg_csavignyi
- HCN3hh_csavignyi
- HCN3hi_csavignyi
- HCN3hj_csavignyi
- HCN3hk_csavignyi
- HCN3hl_csavignyi
- HCN3hm_csavignyi
- HCN3hn_csavignyi
- HCN3ho_csavignyi
- HCN3hp_csavignyi
- HCN3hq_csavignyi
- HCN3hr_csavignyi
- HCN3hs_csavignyi
- HCN3ht_csavignyi
- HCN3hu_csavignyi
- HCN3hv_csavignyi
- HCN3hw_csavignyi
- HCN3hx_csavignyi
- HCN3hy_csavignyi
- HCN3hz_csavignyi
- HCN3ia_csavignyi
- HCN3ib_csavignyi
- HCN3ic_csavignyi
- HCN3id_csavignyi
- HCN3ie_csavignyi
- HCN3if_csavignyi
- HCN3ig_csavignyi
- HCN3ih_csavignyi
- HCN3ii_csavignyi
- HCN3ij_csavignyi
- HCN3ik_csavignyi
- HCN3il_csavignyi
- HCN3im_csavign