

# Discussió

“One lifetime isn` t enough. Just when you start to learn, it's time to go”  
(Luis Marden)

La transició d'animals amb un eix, simetria radial i dues capes embrionàries a animals amb dos eixos, simetria bilateral i tres capes embrionàries fou un dels esdeveniments més importants de la història evolutiva animal. Com eren els primers organismes bilaterals, els ancestres dels 34 filums actuals de bilaterals, és un dels misteris més grans de la Zoologia i la Història Natural. Les dades morfològiques i paleontològiques han produït no poques teories de com es va donar aquest procés (veure Introducció). En qualsevol cas, aquestes es poden simplificar en una pregunta: eren els primers bilaterals organismes estructuralment complexes (amb celoma, segmentació i amb estructures internes i nervioses desenvolupades) o bé morfològicament senzills? Les implicacions són evidents: si l'ancestre era complex, això implica que els bilaterals actuals d'organització corporal senzilla (els filums acelomats i pseudocelomats) són derivats per simplificació. Si, d'altra banda, l'ancestre era estructuralment senzill, la complexitat corporal s'hauria adquirit gradualment. Entendre aquest pas ajudarà, entre d'altres coses, a: 1) polaritzar els canvis genètics i morfològics, 2) comprendre les raons de l'augment o disminució de complexitat, i 3) iniciar estudis genètics en taxons clau per entendre la genètica subjacent de passar de un sol eix corporal (oral-aboral) a dos eixos corporals (antero-posterior i dorso-ventral).

La condició *sine qua non* per respondre aquesta pregunta és disposar d'una filogènia robusta dels filums animals. Així, adreçant-nos cap aquest objectiu, aquesta tesi ha intentat solventar la posició filogenètica de dos taxons: els acels i els nemertodermàtides. Avui en dia, la manera més eficaç d'afrontar això és obtenint dades independents de la morfologia; és a dir, obtenir dades moleculars i inferir-ne la seva posició filogenètica a partir d'aquestes. D'aquesta manera es pot testar i evaluar les teories proposades i, per què no?, generar hipòtesis noves. A l'inici de la tesi només disposavem de les seqüències del 18S de tres espècies d'acels i d'un nemertodermàtid, obtingudes per resoldre la situació del filum Platyhelminthes (considerat basal fins aleshores) dins dels Bilateria (Carranza i col. 1997, Carranza 1997). Els acels seqüenciats eren, però, *fast-clock* (veure Introducció). Davant d'aquest problema, l'aproximació molecular havia de seguir, doncs, unes pautes concretes, emprant diferents aproximacions i metodologies (Aguinaldo i col. 1997 i Maley i Marshall 1998 i Introducció):

1. seqüenciar més 18S d'acels i nemertodermàtides, per tal de trobar algun amb una taxa de substitució semblant a la resta de bilaterals. És l'aproximació utilitzada també per Aguinaldo i col. (1997) per determinar la posició filogenètica dels nemàtodes (veure Introducció).

2. seqüenciar molècules diferents dels gens ribosomals, com, per exemple, gens nuclears codificants. En principi, les seqüències proteíniques haurien d'ésser més inimmunes als problemes de *long-branch*, o si més no, aportarien una visió independent. El problema és que, si es volia aconseguir una filogènia robusta, s'havia de testar diferents molècules i veure el seu valor filogenètic. Finalment, calia no només obtenir seqüències d'acels i nemertodermàtides, sinó, a més a més, seqüenciar una mostra prou diversa i il·lustrativa dels filums bilaterals.
3. obtenir dades sobre possibles sinapomorfies moleculars, com ara el nombre i tipus de gens Hox, el reordenament dels gens mitocondrials, o la presència/absència de gens o zones indels útils per inferir filogènia. El problema d'aquestes dades és que tot i ser molt contundents per situar a un taxon dins d'un grup determinat (com el cas del gens Hox característics d'ecdysozous, lofotrocozous i deuteròstoms, o l'ordre mitocondrial característic de cordats i urocordats), l'absència de dades clares sobre els grups externs (*outgroups*) impossibilita polaritzar els caràcters i per tant inferir filogènies a partir d'aquests (Telford 2000). En qualsevol cas, el que si poden fer les dades qualitatives moleculars és enfortir o refutar algunes topologies.
4. Una vegada obtingudes les seqüències nucleotídiques o aminoacídiques, aquestes han de ser analitzades utilitzant metodologies poc sensibles als problemes de *long-branch* (veure Introducció).

Aquesta Tesi enfila el problema emprant moltes de les possibles aproximacions moleculars: a) generant més seqüències de 18S d'acels i nemertodermàtides (capítol I i II); b) aconseguint les primeres seqüències de proteïnes mitocondrials d'acels i nemertodermàtides (capítol II); c) cercant una nova molècula –gen codificant nuclear– amb informació filogenètica al nivell que volem i seqüenciant una serie suficient de filums bilaterals per testar els resultats del 18S (capítol III); i d) generant les primeres dades dels genomes mitocondrials d'acels, nemertodermàtides i platihelminths no-paràsits, per tal de buscar sinapomorfies moleculars (capítol IV).

## **1. Acels i nemertodermàtides no són Platyhelminthes, sino els grups més basals dins els Bilateria.**

Totes les dades aquí presentades corroboren que els Platyhelminthes són polifilètics, ja que ni acels ni nemertodermàtides s'agrupen amb el gruix dels Platyhelminthes (els Rhabditophora). De fet, acels i nemertodermàtides són els bilaterals més basals de tots els actuals.

Aquesta afirmació es recolça en les diferents dades aportades, que són:

- a) dades del gen ribosomal 18S (capítol I i II) d'acels i nemertodermàtides, analitzant només les espècies d'acels i nemertodermàtides que presenten taxes de substitució similars a la resta de bilaterals (En el capítol I, la seqüència de nemertodermàtid utilitzada s'agrupava amb la resta de platihelminths, però seqüències d'altres espècies de nemertodermàtides (capítol II) confirmaren el que ja Carranza (1997) apuntava: que aquella seqüència podria provenir d'una mala classificació o bé d'un problema de contaminació). Aquestes dades varen ser analitzades mitjançant màxima versemblança, i tenint en compte la variació en les taxes de substitució entre posicions. El suport estadístic per aquesta posició basal es molt elevat (veure figura 2 del capítol I i figura 2 i 4 del capítol II). A més a més, tant la comparació de topologies alternatives (capítol I), com l'eliminació de les posicions més variables (capítol I), els anàlisis sense outgroup (figura 3, capítol II), o l'utilització de màxima parsimònia mitjançant el mètode de triplets (figura 1, capítol II) corroboren aquests resultats.
- b) dades del gen que codifica per la cadena pesant de la miosina tipus II (capítol III). Les seqüències de la miosina II, que és un gen nuclear codificant, totalment independent dels gens ribosomals, confirma els resultats del 18S. Tant analitzant les seqüències de miosina II soles (figura 1, capítol III), com juntament amb les de 18S (figura 3, capítol III), acels i nemertodermàtides queden com a grup germà de la resta de bilaterals. El fet de ser una molècula independent, que a més a més, no presenta problemes de *fast-clock* ni per acels ni per nemertodermàtides, resulta ser una corroboració molt important. Les anàlisis sense les posicions més variables, o eliminant els acels o els nemertodermàtides (capítol II), juntament amb el test de topologies alternatives (taula 2, capítol III) reblen la robustesa de les dades.

El conjunt de dades aportades provenen de tres fonts independents i mostren clarament la polifia dels Platihelminths i la posició basal d'acels i nemertodermàtides. A més a més, la posició dels acels (malauradament no hi ha dades de nemertodermàtides) s'ha vist recentment recolçada amb dades obtingudes per altres autors, com ara les obtingudes a partir de seqüències del gen 28S ribosomal (Telford, comunicació personal) o a partir de seqüències aminoacídiques del gen Hox posterior (Cooke, comunicació personal).

La posició basal d'acels i nemertodermàtides, tot i sorprenent, és morfològicament congruent. Com s'ha comentat a la Introducció, no existeixen

sinapomorfies clares que uneixin els Platihelmins i, d'altra banda, són varies les diferències entre acels i nemertodermàtides respecte a la resta de Platihelmins. Primer, tant acels com nemertodermàtides no tenen protonefridis. Això s'havia interpretat (Ehlers, 1985) com una autopomorfia dels Acoelomorpha (Acoela + Nemertodermatida), però de fet, donada la posició d'acels i nemertodermàtides, podria ser l'estat plesiomòrfic dels Bilateria. Segon, els acels i possiblement també els nemertodermàtides (Jondelius, comunicació personal) presenten un tipus de clivellament especial en duet (*duet-spiral cleavage*) i, en el cas dels acels, un mesoderm d'origen únicament endomesodèrmic (Henry i col. 2000), a diferència del típic clivellament en quartets (*quartet-spiral cleavage*) i un origen ecto i endomesodèrmic del mesoderm a la resta de Platihelmins i Spiralia. L'origen endomesodèrmic del mesoderm es considera ancestral. A més, el clivellament en duet és, de fet, més bilateral que espiral, el que suggereix que el clivellament en duet i el clivellament en quartet no estan relacionats. Tercer, tant acels com nemertodermàtides, tenen una estructura ciliar característica, molt diferent de la de la resta de platihelmins (veure Introducció). Per últim, ni acels ni nemertodermàtides no tenen un veritable cervell amb neuropil com la resta de Platihelmins (Raikova i col. 1998, Reuter i col. 1998), sinó un sistema nerviós molt més simple.

Tot i l'elevat suport estadístic dels resultats del 18S del capítol I, molts autors pensaren que la posició basal era un artefacte degut al *long-brach-attraction* (Adoutte i col. 2000; Peterson i Eernisse 2001; Halanych i Passamanek 2001; Erwin i Davidson 2002), o bé consideraven que calia més informació per corroborar-ho (Collins i Valentine 2001; Von Nickisch-Roseneck i col. 2001; Giribet 2002). Fins i tot Berney i col. (2000) i Giribet i col. (2000) publicaren resultats que contradieien la posició basal dels acels. Berney i col. utilitzant el gen EF1-alfa i Giribet utilitzant el 18S proposaven que els acels eren el grup germà dels triclàdides, un ordre derivat de rhabditòfors (Bagnà i col. 2001). En ambdós casos aquesta proposta estava molt poc fonamentada o era sencillament artefactual. L'anàlisi de Berney i col. es basava en un aliniament dubtós i, tal i com Littlewood i col. (2001) varen demostrar al presentar seqüències de EF1-alfa de més acels (Berney només n'havia seqüenciat una). El EF1-alfa és, de fet, una molècula que no conté cap informació filogenètica per esdeveniments tant llunyans. Les anàlisis de Giribet i col., utilitzant *màxima parsimònia* (sabut ser el mètode més sensible a aquest problema, Huelsenbeck 1997), col·locaven en una mateixa clade, que anomenaven Platyzoa, tots els taxons amb branques llargues (Acanthocephala, Gnathostomulida, Cyclophora, Rotifera, Rhabditophora, Nemertodermatida i Acoela) més els Gastrotricha, en el que, sens

dubte, és un clar exemple del *long-branch attraction*. A més a més, les diferències en el codi genètic mitocondrial entre acels i nemertodermàtides i la resta de Plathelminths (Telford i col. 2000) i l'absència en els acels (o en els nemertodermàtides) de qualsevol de les sinapomorfies dels triclads o dels rhabditòfors (Tyler 2001) tornen inversemblant aquesta agrupació. De fet, el mateix autor, dos anys més tard, escindeix tant acels com nemertodermàtides del suposat clade Platyzoa (Giribet, 2002).

En qualsevol cas, les crítiques vessades sobre els resultats trobats al capítol I, bàsicament les branques llargues o la manca de dades moleculars addicionals, s'ha vist que eren completament infundades. A més, han estat totalment refutades per els resultats de les seqüències del gen que codifica per la miosina II i per les seqüències mitocondrials. Les dades de miosina presentades al capítol II són especialment il·lustradores, al tenir una bona mostra representativa dels fílums bilaterals i no presentar problemes de taxons amb taxes de substitució més elevades. Cal assenyalar, a més, que anàlisis filogenètiques fetes per altres autors amb 18S d'acels, ja sigui utilitzant *outgroups* a l'atzar (Peterson i Eernisse, 2001) o utilitzant noves metodologies que eliminen gradualment les posicions més variables (Riutort i Philippe, comunicació personal) continuen col·locant els acels a la base dels bilaterals. Per últim, les dades de seqüències Hox (Cooke i col., comunicació personal) i de 28S (Telford i col. comunicació personal) d'acels corroboren, una vegada més, les dades aquí aportades.

## **2. El clade Acoelomorpha: monofilètic o parafilètic?**

Malgrat els diferents resultats d'aquesta tesi confirmen la posició basal d'acels i nemertodermàtides dins els bilaterals, són contradictòries, però, en la monofília/parafília del clade que morfològicament uneix els dos: els Acoelomorpha *sensu* Ehlers, 1985 (veure capítol III). El 18S els presenta parafilètics (figures 1, 2 i 4 del capítol II i figura 2 del capítol III) mentre que la miosina II (figura 1, capítol III) i el mitocondrial (capítol IV) proven l'existència del clade Acoelomorpha. Cal ressaltar, que ni el 18S rebutja estadísticament la seva monofília, ni la miosina la seva parafília (taula 3, capítol III). L'estructura dels genomes mitocondrials semblen assenyalar també cap a la monofília dels dos grups dins el clade Acoelomorpha. Tots dos comparteixen, a part del codi genètic, la posició dels dos ribosomals (el *rrnS* a 5' del gen *cox3* i el *rrnL* a 5' del gen *atp6*, veure figura 1 del capítol IV), i l'estructura dels tRNAs *S1* and *K* (figures 2 i 3, capítol IV).

Les dades morfològiques són també diverses i incertes. D'una banda, l'estructura ciliar demostraria la seva unió (veure Introducció), ja que es tracta d'una estructura única només compartida per acels i nemertodermàtides (Ax, 1996). No és pot descartar, per això, que puguin haver-se creat independentment en els dos llinatges. L'estructura neuronal és molt senzilla en tots dos llinatges, però els patrons de neurotransmissors d'acels i nemertodermàtides són força diferents (Raikova i col. 2000) i podrien no estar relacionats. L'estructura dels espermatozous també és desigual. Els nemertodermàtides tenen espermatozous uniflagelats amb l'axonema típic de 9+2 (Lundin i Hendelberg 1998), mentre que els espermatozous dels acels tenen dos flagels d'orientació invertida i, en alguns casos, amb l'estructura de l'axonema molt derivada (Raikova i col. 2001). Una característica clau és el tipus de clivellament, que, com ja hem dit, és duet en els acels. Si en els nemertodermàtides es confirmés que fós també duet, com dades preliminars semblen apuntar (Jondelius, comunicació personal), hi haurien moltes possibilitats de que fós una sinapomorfia del grup Acoelomorpha. Finalment, acels i nemertodermàtides difereixen en l'estructura dels estatocists i en que als acels el sistema digestiu no té cèl·lules glandulars i la matriu extracelular és inexistent (veure Ax 1996 per a una revisió general).

El fet de que acels i nemertodermàtides presentin una posició basal dins els Bilateria, anterior a la radiació dels tres superclades de eubilaterals, dificulta determinar la seva monofília en base a la morfologia, ja que molts dels caràcters divergents entre ells (estructura neuronal i estructura dels espermatozous, estatocists i sistema digestiu) podrien ser deguts a una llarga història evolutiva desde l'ancestre comú a tots dos grups. El tipus de clivellament i l'estructura ciliar, que són les característiques compartides, semblen ser caràcters derivats i no pas ancestrals. Això implica que si es confirma que el tipus de clivellament dels nemertodermàtids és en duet (Jondelius, comunicació personal), la monofília es veuria fortament suportada. Les dades moleculars semblen més clares. Tot i que el 18S els mostra parafilètics, la miosina corrobora el clade Acoelomorpha. Però, com només disposem de dades de miosina i de mitocondrial d'un nemertodermàtid, hom podria pensar que la monofília es un efecte del reduït mostreig. El que sembla més clar, per la baixa probabilitat de que es tracti d'una convergència o d'un caràcter plesiomòrfic, és l'estructura mitocondrial, és a dir la posició dels dos ribosomals en el genoma mitocondrial (figura 1, capítol IV). Sens dubte, aconseguir dades moleculars addicionals, tant de proteïnes i estructures mitocondrials com de la miosina II, de nemertodermàtides, juntament amb l'esclariment del seu tipus de clivellament ajudaran a resoldre definitivament aquest punt.

### 3. Miosina II com a nou marcador filogenètic.

Trobar un gen adient, a més del 18S, per inferir filogènies d'esdeveniments tant llunyans i que complementi i testii les dades i els resultats generats a partir de les seqüències ribosomals, es una tasca força difícil, ja que el gen en qüestió ha de complir una serie de requeriments (veure Introducció i Giribet 2002). En el capítol III presentem un nou marcador filogenètic: les seqüències del gen que codifica per el cap de la cadena pesanta de la miosina tipus II.

Els resultats de la miosina II (figura 1, capítol III) són molt esperançadors. Primer corroboren moltes de les hipòtesis generades a partir de les seqüències ribosomals, i utilitzant només un número de nucleòtids relativament baix. A més, resulta tenir (utilitzant el 1er i 2on codó) taxes de substitució molt més homogènees que el 18S entre els diferents llinatges animals, evitant problemes de *long-brach attraction*. Finalment, resulta ser perfectament complementària al 18S, augmentant els valors de bootstrap de gairebé tots els nodes quan s'utilitzant aquestes dues molècules conjuntament (figura 3 i taula 2 del capítol III). A l'utilitzar aquestes dues molècules conjuntament –doncs l'anàlisi multigènic sembla ser l'estratègia a seguir (Soltis i col. 1999; Qiu i col. 1999; Parkinson i col. 1999; Giribet i col. 2001; Giribet 2002)- l'arbre dels metazous guanya en robusteça i els diferents embrancaments queden suportats amb valors molt alts i amb qualsevol dels mètodes emprats, el que augmenta la nostra confiança en les diferents relacions inferides.

Així, les seqüències de miosina II es mostren com un marcador filogenetic molt útil i que, a ben segur, començarà a ser seqüenciat per testar altres hipòtesis filogenètiques. A més, les seqüències aquí presentades només representen una tercera part del cap de la cadena pesanta de la miosina II. Seqüenciar el que resta del cap de la miosina i augmentar el nombre de taxons seqüenciats són, sens dubte, els primers passos a fer per augmentar la informació filogenètica de l'arbre dels metazous.

### 4. Genomes mitocondrials: valor filogenètic dels reordenaments mitocondrials.

La informació de genomes mitocondrials es limitava, fins fa poc, a uns pocs fílums animals (Boore 1999). No hi havia cap dada sobre l'estructura del genoma mitocondrial ni d'acels ni de nemertodermàtides; i dins els platihelmits només sobre els ordres paràsits (Le i col. 2002). De les possibles sinapomorfies moleculars a



buscar, els gens Hox (de Rosa 1999, Saló i col. 2001) i l'ordre dels gens mitocondrials (Boore i Brown 1998), vàrem decidir seqüenciar el genoma mitocondrial, ja que a més a més de l'ordre dels gens aconseguíem: 1) les seqüències nucleotídiques de les proteïnes, que també són útils per inferir filogènia (Boore i Staton 2002, Hwang i col. 2001), 2) informació sobre el codi genètic (veure Telford i col. 2000), i 3) informació addicional sobre l'estructura del genoma: tRNAs, codons d'inici, etc.

La informació filogenètica dels ordres dels gens mitocondrials al nivell que ens interessa (suprafilètic) es difícil de jutjar per la manca d'un ordenament diblàstic "canònic". Hi ha informació sobre l'ordenament de varies espècies de cnidaris (Beagley i col. 1998; Beaton i col. 1998; Pont-Kingdon i col. 2000), però aquests semblen haver divergit molt- han perdut, per exemple, 20 dels 22 tRNAs- el que dificulta fer comparacions. A més hi ha publicades 3 kb del mitocondrial d'un porífer (*Tetilla sp.*, Watkins i Beckenbach 1999), però resulta insuficient. A més, els ordres dels gens en acels i nemertodermàtides són inèdits (figura 1, capítol IV) i ens impedeixen, a manca de més informació sobre ordenaments diblàstics, inferir la seva posició dins l'arbre dels metazous. D'altra banda també hi ha força diferències entre ells dos i només comparteixen la posició dels dos ribosomals. Així, sen's presenta el dubte de si les espècies seqüenciades han patit reordenaments independents de la resta del grup (és a dir, si son *fast-clock* per l'ordre dels gens mitocondrials) o si el seu ordenament és el canònic d'acels i nemertodermàtides. Dades preliminars del mitocondrial d'una altra espècie d'acel, *Childia sp.*, sembla indicar que al menys hi ha hagut un canvi en l'ordre respecte a *Paratomella rubra* (K. Helfenbein, comunicació personal). Necessariem, però, ampliar la informació sobre l'estructura dels ordres mitocondrials en més espècies d'acels i nemertodermàtides per acabar de dilucidar el seu valor filogenètic. En qualsevol cas, les nostres dades semblen indicar que la informació evolutiva dels ordres dels gens mitocondrials es limita a algunes parts de l'arbre dels metazous, però no per inferir una filogènia de tots ells.

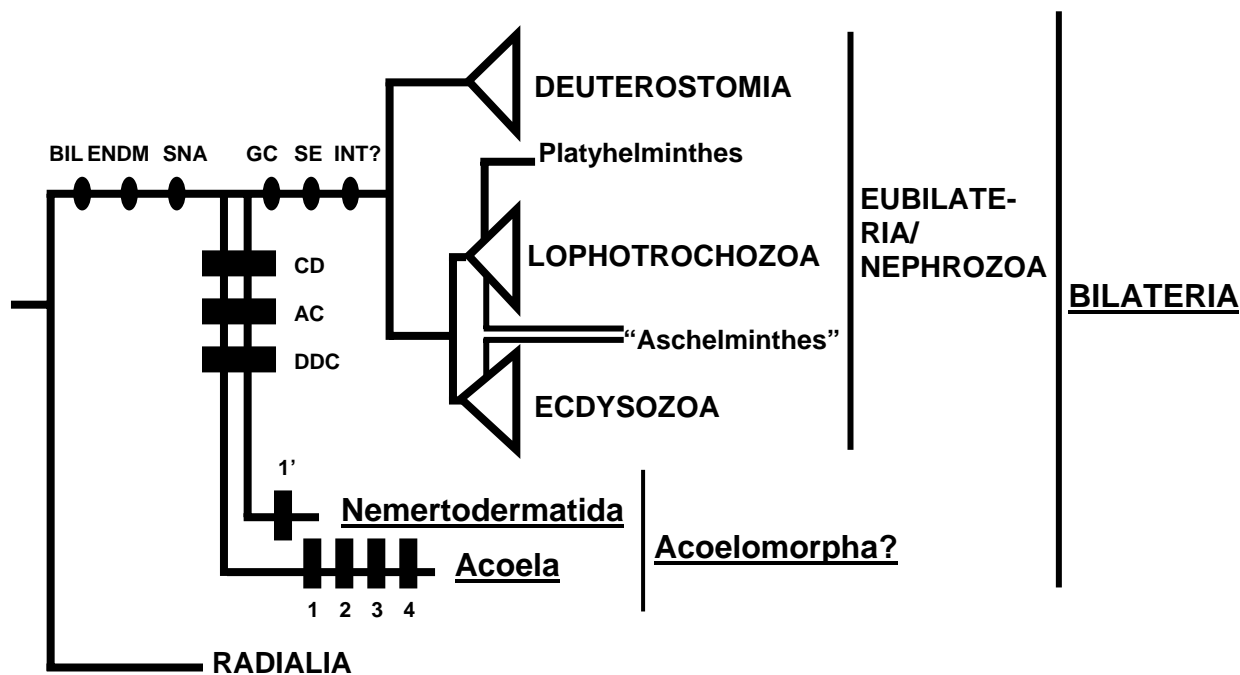
Les dades aportades per les seqüències mitocondrials, però, no es restringeixen a l'ordre dels gens, sinó que a més obtenim dades sobre el codi genètic, l'estructura dels tRNAs, i les seqüències nucleotídiques i aminoacídiques. Les dades sobre el codi genètic ja han evidenciat el seu valor mostrant, per exemple, les diferències en el codi genètic mitocondrial entre acels i nemertodermàtides (que comparteixen el de la resta de invertebrats) i els rhabditòfors (Telford i col. 2000). El coneixement, a més a més, de l'estructura del genoma mitocondrial ens aporta un model evolutiu molt adequat per esbrinar com funcionen els diferents fenòmens evolutius que poden ocórrer en els genomes animals, ja que en el genoma mitocondrial dispoem de gairebé tots els

ingredients d'un genoma: tRNAs, gens que codifiquen per proteïnes, gens que codifiquen per ribosomals, zones no-codificants, zones control, codi genètic propi, etc... Per altra banda la comparació de les seqüències nucleotídiques o aminoacídiques del conjunt podrà, probablement, aportar també informació filogenètica (Boore i Staton 2002).

## **5. Una nova hipòtesis taxonòmica i filogenètica: acels i nemertodermàtides *versus* Eubilateria.**

El conjunt de dades presentades suggereixen un nou esquema taxonòmic i filogenètic dels Metazous (figura 1): els Bilateria formen un grup monofilètic dividit en: 1) acels i nemertodermàtides i 2) el gruix dels bilaterals, que anomenem Eubilateria o Nephrozoa, dividits en els tres superclades (Ecdysozoa, Lophotrochozoa i Deuterostomia). Així, acels i nemertodermàtides haurien divergit abans que la resta dels bilaterals actuals. Aquest nou escenari evolutiu ha de ser necessàriament congruent amb la morfologia. D'ací que una de les qüestions a plantejar sigui determinar quines sinapomorfies morfològiques defineixen a tots els Bilateria i quines a els Eubilateria (excloent acels i nemertodermàtides). La figura 1 ens mostra tres d'aquestes sinapomorfies dels Bilateria: 1) la simetria bilateral amb la generació de dos nous eixos corporals (l'antero-posterior i el dorso-ventral), 2) el tercer full embrionari, és a dir el mesoderm, i 3) un Sistema Nerviós concentrat a la regió anterior. Com a sinapomorfies dels Eubilateria, que acels i nemertodermàtides no comparteixen hi hauria: 1) la presència de ganglis cerebrals; és a dir, d'un veritable cervell, 2) un sistema excretor basat en nefridis, i 3) un intestí de sentit únic (anus+boca), tot i que aquest es podria haver originat independentment en els tres superclades, i els Plathelminths mantindrien la condició ancestral.

Aquest nou esquema taxonòmic i filogenètic està recolzat per dades del 18S (capítol I i II), per el gen de la miosina II (capítol III), per les seqüències de proteïnes mitocondrials (capítol IV), i, en el cas dels acels, per anàlisis recents fetes per altres autors (veure apartat 1 de la discussió). Que acels i nemertodermàtides siguin o no grups germans (formant el clade Acoelomorpha) no canviaria gaire aquest escenari. Com ja hem comentat a l'apartat 2 de la present discussió, si acels i nemertodermàtides són parafilètics, els seus caràcters compartits (és a dir, l'estructura ciliar i probablement la segmentació en duet) serien probablement plesiomòrfics per els bilaterals. Això implicaria que 1) l'estructura ciliar s'hauria perdut a l'ancestre dels Eubilateria; i 2) el clivellament en quartet hauria d'haver evolucionat a partir del clivellament en duet, la qual cosa no és fàcilment explicable (Henry i col.



|                     |      |  |
|---------------------|------|--|
| <b>Bilateria</b>    | BIL  | Simetria bilateral-2 eixos corporals (AP + DV)             |
|                     | ENDM | Endomesoderm   |
|                     | NA   | Sistema nerviós concentrat a la part anterior              |
| <b>Eubilateria</b>  | GC   | Ganglis cerebrals  |
|                     | SE   | Sistema Excretor   |
|                     | INT? | Intestí de via única (boca + anus)                         |
| <b>Acoelomorpha</b> | CD   | Clivellament en duet                                       |
|                     | AC   | Arrels ciliars complexes                                   |
|                     | DDC  | Discontinuitat distal ciliar                               |
| <b>Acoela</b>       | 1    | Estatocists amb 1 estatocist i 2 cèl·l·les parietals       |
|                     | 2    | Absència de Matriu extracel·lular                          |
|                     | 3    | Absència de cèl·lules glandulars digestives                |
|                     | 4    | Esperma biciliar   |
| <b>Nemertod.</b>    | 1'   | Estatocists amb 2 estatocists i varies cèl·l·les parietals |

Figura 1. Nova proposta de filogènia general dels Metazous basada en els resultats d'aquesta Tesi. Dos grups formarien els bilaterals: els acelomorfs acels i nemertodermàtides per una banda i la resta de bilaterals, o Eubilateria per l'altra. Els Eubilateria presenten una serie de sinapomorfies morfològiques que exclouen els acelomorfs. Al seu torn, els Acoelomorpha, així com els acels i els nemertodermàtides quedarien definits per un conjunt de sinapomorfies específiques.

2000). Si són grups germans, formant els Acoelomorpha, possiblement l'estructura ciliar i el clivellament en duet serien autopomorfies del grup. En qualsevol cas, acels i nemertodermàtides van divergir abans que la resta de bilaterals actuals (que tenen les seves pròpies sinapomorfies), el que canvia per complert la hipòtesi filogenètica majoritàriament acceptada anterior a aquesta tesi (figura 2B, Introducció). En aquella, tots els taxons triblàstics acelomats i pseudocelomats quedaven embrancats dins

d'algun del tres superclades, Deuterostomia, Lophotrochozoa i Ecdysozoa. Aquesta topologia s'argumentava com a prova de que l'ancestre dels bilaterals devia ser celomat i segmentat (Adoutte i col. 1999, 2000). Les dades aquí presentades, i concretament la hipòtesi aquí discutida, rebutja aquests arguments.

## **6. Implicacions evolutives sobre l'origen i radiació dels bilaterals i l'explosió Càmbrica.**

Els resultats presentats mostren que de tots els bilaterals actuals, acels i nemertodermàtides serien els més propers a l'ancestre. Hi ha taxons la posició dels quals encara resta incerta, però en qualsevol cas tots (potser exceptuant l'enigmàtic *Xenoturbella*) serien eubilaterals. Aquest es el cas dels Mesozoa, Acantocephala, Gnathostomulida, Chaetognatha i el mateix *Xenoturbella*. A les anàlisis del primer capítol (taula 2, capítol I) demostrarem que els quatre primers són eubilaterals, tot i que de posició incerta. A més, els gens Hox de mesozous són de tipus lofotrocozou (Kobayashi i col. 1999) i les anàlisis fetes amb proteïnes mitocondrials mostren als chaetognats com a grup germà dels protòstoms, es a dir eubilaterals (K. Helfenbein, comunicació personal). La posició de *Xenoburbella* sembla ser, a manca de noves dades independents, la d'un grup derivat de mol·luscs, ja que seqüències del 18S ribosomal així ho corroboren (Norén i Jondelius 1997).

La posició d'acels i nemertodermàtides com els bilaterals actuals més propers a l'ancestre, divergint anteriorment a la diversificació dels tres superclades, permet fer algunes inferències evolutives. Entenent en tot moment que els llinatges dels acels i dels nemertodermàtides també han patit la seva pròpia evolució, podem considerar que l'ancestre dels bilaterals i els acelomorfs compartien alguns caràcters plesiomòrfics, com l'absència de protonefridis, l'absència de celoma, i un sistema nerviós poc desenvolupat (figura 1, discussió). Els nostres resultats, doncs, recolcen la hipòtesi d'un ancestre senzill i acelomat, possiblement amb desenvolupament directe. Això contrastaria amb la visió dominant actual d'un ancestre, l'arquicelomat, ja celomat, segmentat i complexe (Adoutte i col. 1999 i 2000, de Rosa i col. 1999). De fet, els nostres resultats mostren que els filums acelomats i pseudocelomats inclosos dins els lofotrocozous i ecdysozous s'agrupen (tot i que no sempre ben suportat) en una posició basal dins els superclades (figura 1, capítol I i figura 1 i 3 capítol III, per exemple). Això implicaria que els primers ecdysozous i lofotrocozous serien pseudocelomats o acelomats, i que, per tant, el celoma va aparèixer independentment diverses vegades (veure Introducció).

L'existència de l'anomenada explosió Càmbrica, ara fa uns 540 ma, ha estat recentment discutida, degut, en part, a la publicació d'estudis basats en estimacions del rellotge molecular que situen l'origen dels patrons corporals animals abans dels 570, o inclús 600 m.a. (veure apartat 1.2 de l'Introducció, Ayala i col. 1998; Wray i col. 1996). L'aparent discrepància entre registre fòssil i dades moleculars podria veure's reduïda si hipotetitzem que va haver-hi una primera etapa d'animals triblàstics, entre ells l'ancestre dels acelomorfs, i, posteriorment una explosió dels eubilaterals, probablement provocada per un canvi en les condicions ambientals i ecològiques. La primera etapa de bilaterals podria no haver deixat mostra fòssil per l'absència de parts esquelètiques en els animals, per condicions de fossilització adverses o per mida petita, difícils de trobar fins al moment. La segona etapa, ja d'eubilaterals, hauria generat una autèntica explosió de formes fòssils, tant per les condicions ambientals favorables (augment dels nivells d'oxígen), com per l'augment en la quantitat i diversitat d'estructures esquelètiques dels diferents filums bilaterals, que il·lustren, a més a més, la més que probable guerra armamentística que va tenir lloc a l'origen dels eubilaterals, i que alguns han argumentat com una causa més de l'explosió Càmbrica (Conway-Morris 2000). La hipotetitzada congelació del globus terraquí (anomenat "*snow ball Earth*", Hoffman i col. 1998), és un argument més en favor d'aquesta etapa proterozoica de bilaterals. A més, el descobriment recent d'acels en enormes quantitats vivint dins les capes de gel de l'Antàrtida (Friedrich i Hendelberg 2001) confirmaria que els acels haurien pogut sobreviure l'etapa de *snow ball Earth*. La descongelació posterior hauria obert un ventall de níxols ecològics per els eubilaterals. Així, les datacions fetes a partir de dades moleculars de l'origen dels animals bilaterals no serien tan elevades si, a més, tenim en compte la seva tendència a sobreestimar (Rodríguez-Trelles i col. 2002). Per últim, les datacions a partir de dades moleculars potser només indiquen que els gens que van generar l'explosió de formes animals en el Càmbric ja existien abans. L'existència de gens Hox en els radials corroboraria aquesta suposició (Finnerty 2001). Així, la maquinària genètica dels bilaterals ja existia abans, un canvi en la seva regulació i una millor flexibilitat dels processos morfogenètics haurien permès l'enorme radiació de patrons corporals observada al registre fòssil a inicis del Càmbric (Erwin i Davidson 2002).

La posició filogenètica d'acels i nemertodermàtides propera a l'ancestre, fa de l'estudi dels seus gens Hox i d'altres gens importants per el desenvolupament com gens del mesoderm, una tasca clau per arribar a entendre millor com es va dur a terme la transició radials/diblàstics a bilaterals/triblàstics.

## 7. Implicacions sobre els mecanismes cel·lulars i moleculars a la base de la transició diploblasts-triploblasts.

Tal com esmentem a la Introducció, identificar el grup actual de bilaterals més propers als diblastics radials és la condició *sine qua non* per tractar d'abordar els mecanismes clau en la transició entre radials i bilaterals. Dels resultats d'aquesta Tesi, és prou clar, a manca però d'una corroboració al cent per cent, que aquest grup el representen Acels+Nemertodermàtides. L'altra condició imprescindible és identificar el grup de radials actuals més proper als bilaterals. El consens actual és que són els Cnidaris Antozous, i més en concret els Octocoralaris (Kim i col 1999). Aquest grup presenta la fase invariant de larva plànula i la fase adulta de pòlip no tenint fase medusoide; aquesta darrera es considera avui en dia com un estadi afegit independentment, a diferents Hidrozous, Cubozous i Escifozous.

La comparació entre un acel actual i un polip de qualsevol antozou fa difícil entreveure com del pòlip es pot derivar quelcom semblant a un acel. El pòlip, malgrat la seva senzillesa, és sèsil, i presenta un seguit d'adaptacions a aquest tipus de vida que fan inversemblant la seva transformació a un acel. Per contra, i tal com han assenyalat nombrosos autors en el passat (Veure Willmer 1990, per a una revisió general), la larva plànula dels antozous té una gran semblança amb els acels. Algunes són pelàgiques i altres bènctiques i el seu modus de desplaçament és direccional amb la part aboral fent de regió anterior (o 'cap', on s'hi concentren cèl·lules sensorials) i la oral (on hi ha sovint el 'orifici digestiu' que coincideix amb el blastopor) de posterior (o 'cua'). Malgrat tot, tenen encare simetria radial i no presenten diferenciació visible (ni externa ni interna) entre un hipotètic dors i un ventre.

Tant la versió antiga (Metchnikoff 1883) com la moderna (Hyman 1940, 1951; Salvini-Plawen 1978) de la teoria planuloid-aceloid consideren un organisme amb el grau d'organització d'una plànula però sexualment madur com ancestre alhora dels cnidaris i de tots els bilaterals. Malgrat aquesta hipòtesi no es pot descartar, sembla més versemblant pensar en un origen dels bilaterals per progènesi a partir de larves plànules d'Antozous. El mecanisme de progènesi (avançament de la maduresa reproductiva en estadis embrionaris o juvenils) es considera un mecanisme clau per generar de cop, a qualsevol nivell taxonòmic, nous organismes ben adaptats a l'ambient. Un mecanisme semblant a l'origen dels bilaterals eliminaria la dificultat d'un origen més o menys simultani de radials i bilaterals a partir de plànules. Les darreres dades fòssils del jaciment de Doushanto (Xina), d'una antiguetat de 570-580 milions d'anys (25-45 milions abans del Càmbric i la seva famosa explosió), mostren la

presència de gran nombre de fòssils de plànules i pòlips de microcnidaris (Chen i col 2002). Tot i no haver-se trobat encara fòssils de bilaterals, sembla prou segur que algun tipus de bilaterals, petits també, coexistirien ja amb els microcnidaris. Una pregunta interessant és el perquè tant cnidaris, com esponges, com els hipotètics bilaterals, eren inicialment tant petits. Una explicació, segons Chen i col (2002), és que l'ambient de Doushanto, poc després de la glaciació Marinoica (610-590 milions d'anys) quan el globus terraquí es va pràcticament gelar (Hoffman i col 1998), era pobre en oxigen i nutrients. Això demanava als organismes una relació superfície/volum molt gran per sobreviure, suggerint que havien de ser petits, amb 2 fulls embrionaris(diblàstics) o amb un tercer full incipient (triblàstics), tal com eren els microcnidaris i, possiblement, devien ser els bilaterals ancestrals semblants als acels i nemertodermàtides actuals. Tot aquest conjunt de dades reforça la idea que el bilateral ancestral fou un organisme simple de mida petita i no el complex Urbilateria contemplat fins ara (referències a Adoutte i col 1999, 2000).

Acceptant un origen progenètic dels bilaterals, com testar aquesta predicció?. Hi ha diverses estratègies: a) aïllar els gens axials (Hox, ParaHox i DV), els gens endomesodèrmics, i els del sistema nerviós de cnidaris antozous i d'acels+nemertodermàtides i fer-ne una anàlisi comparada dels patrons d'expressió entre l'embrió d'aquests darrers i les larves plànules dels primers; b) un cop detectats els gens esmentats anteriorment, realitzar estudis funcionals d'inhibició de l'expressió mitjançant RNAi (RNA interference) o l'ús de Morpholinos per esbrinar els efectes fenotípics de la manca de funció de gens concrets; i c) obtenir cnidaris antozous transgènics per tal d'iniciar el que Brenner (1993) anomena Genètica de composició o Genètica de síntesi; és a dir, activar gens concrets de manera heterotòpica o heterocrònica a plànules transgèniques per generar les asimetries clau que 'reproduueixin' els canvis necessaris per transformar la plànula en un organisme com un acel actual amb dos eixos axials, simetria bilateral i mesoderm.

L'identificació i anàlisi del nombre i tipus de gens Hox i ParaHox als acels i nemertodermàtides, així com de la seva existència, o no, en 'cluster', permetrà saber, com esperem (Saló i col 2001; Eva Jimènez, comunicació personal), que el nombre de gens del cluster Hox als acels+nemertodermàtides sigui intermedi entre els 3 Hox i els 2 ParaHox dels Cnidaris (Ferrier i Holland 2001) i els 8-10 Hox i 3 ParaHox de la resta de bilaterals. Els seus patrons d'expressió, a més, permetran saber si tenen l'esperada funció canònica d'especificar el patró AP. D'altra banda, les anàlisis funcionals emprant RNAi i/o Morpholinos serien claus per esbrinar la 'funció real' que els ortòlegs d'aquests i altres gens fan als acels i nemertodermàtides. Això és especialment

---

important per evitar els errors potencials d'alguns d'aquests gens amb funcions diferents entre ancestres i descendents. Cal recordar que en l'evolució de forces grups animals, gens o xarxes de gens han estat sovint co-optats per executar funcions clarament diferents.

Finalment, el dia que la Genètica de Síntesi sigui factible en plànules d'Antozou i suposant funcioni, es pot intentar: 1) induir la maduresa sexual activant els gens de la línia germinal (*vasa*, *nanos*,...) per veure'n els efectes; 2) activar asimètricament algun dels gens DV de bilaterals en un sector del eix Oral-Aboral de la plànula o, similarment, tractar d'inhibir en el mateix sector algun dels gens DV que se sap s'expressen ja a cnidaris; i 3) activar la segregació i migració, generalitzada o localitzada, de cèl.lules del endoderm, emprant els gens *snail*, *twist* i d'altres, per generar una capa intermèdia 'mesodèrmica'.



# Conclusions

"El saber *científico* no es un saber: es sólo un *saber conjetural*"  
(Karl Popper)

1. Les dades de les seqüències del gen 18S ribosomal i de la miosina II indiquen que acels i nemertodermàtides no són Plathelminths, sinó el grup més basal de bilaterals de tots els actuals. Els Plathelminths són, per tant, un grup polifilètic.
2. Les seqüències de la miosina i l'ordre dels gens mitocondrials suggereixen que acels i nemertodermàtides són grups germans, formant el clade Acoelomorpha.
3. Les seqüències del cap de la cadena pesanta de la miosina tipus II (miosina II) contenen una quantitat important d'informació filogenètica a nivell de fílums. Això fa de la miosina II una molècula adient per testar i complementar, així, els resultats del 18S, formant la base d'una aproximació multigènica.
4. La posició d'acels i nemertodermàtides és congruent amb les dades morfològiques i embriològiques, el que permet generar una nova hipòtesi taxonòmica i filogenètica, on els Bilateria queden dividits en dos grans grups: d'una banda acels i nemertodermàtides, i d'altra els eubilaterals.
5. La posició basal d'acels i nemertodermàtides permet hipotetitzar la naturalesa de l'ancestre dels bilaterals, que seria, probablement, morfològicament senzill, acelomat, no segmentat i de desenvolupament directe, contradient així la hipòtesi, força generalitzada, de l'ancestre celomat, segmentat, complexe i amb desenvolupament indirecte.
6. Acels i nemertodermàtides presenten una ordenació dels gens mitocondrials única entre els metazous, el que implica que han patit una llarga història evolutiva desde que es van separar.
7. L'ordre dels gens mitocondrials sembla una eina filogenèticament útil a diferents nivells, tot i que l'abast que pot tenir per inferir relacions interfilètiques és encara incerta.

# **Bibliografia**

"I don't mind you thinking slowly; I mind you publishing faster than you think"  
(Wolfgang Pauli)

**A**

**Aguinaldo, A. A., Turbeville, J. M., Linford, L. S., Rivera, M. C., Garey, J. R., Raff, R. A. & Lake, J. A.** 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387: 489-493.

**Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N & de Rosa, R.** 1999. Animal evolution: The end of the intermediate taxa? *TIG* 15:104-108.

**Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N., Lespinet, O., Prud'homme, B. & de Rosa, R.** 2000. The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4453-4456.

**Arendt, D., Technau, U. & Wittbrodt, J.** 2001. Evolution of the bilaterian larval foregut. *Nature* 409:81-84.

**Ayala, F. J., Rzhetsky, A. & Ayala, F. J.** 1998. Origin of the metazoan phyla: molecular clocks confirm paleontological estimates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 606-611.

**Ax, P.** 1996. *Multicellular animals. A new approach to the phylogenetic order in nature. Vol. I.* Springer-Verlag, Berlin, Germany.

**B**

**Baguñà, J., Carranza, S., Paps, J., Ruiz-Trillo & Riutort, M.** 2001. Molecular taxonomy and phylogeny of Tricladida. In *Interrelationships of the Platyhelminthes*. D. T. J. Littlewood & R. A. Bray Ed.. London. Taylor & Francis.

**Balavoine, G.** 1997. The early emergence of platyhelminths is contradicted by the agreement between 18S rRNA and Hox genes data. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III Sciences de la Vie* 320: 83-94.

**Balavoine, G.** 1998. Are Platyhelminthes coelomates without coelom?. An argument based on the evolution of Hox genes. *Amer. Zool.* 38: 843-858.

**Balavoine, G. & Adoutte, A.** 1998. One or three cambrian radiations? *Science* 280: 397-398.

**Beagley, T. C., Okimoto, R. & Wolstenholme, D. R.** 1998. The mitochondrial genome of the sea anemone *Metridium senile* (Cnidaria): Introns, a paucity of tRNA genes, and a near-standard genetic code. *Genetics* 148: 1091-1108.

**Beaton, M. J., Roger, A. J. & Cavalier-Smith, T.** 1998. Sequence analysis of the mitochondrial genome of *Sarcophyton glaucum*: conserved gene order among octocorals. *J. Mol. Evol.* 47: 697-708.

**Berney, C., Pawloski, J. & Zaninetti, L.** 2000. Elongation factor 1-alpha sequences do not support an early divergence of the Acoela. *Mol. Biol. Evol.* 17: 1032-1039.

**Blanchette, M., Kunisawa, T. & Sankoff, D.** 1999. Gene order breakpoint evidence in animal mitochondrial phylogeny. *J. Mol. Evol.* 49: 193-203.

**Boore, J. L.** 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27: 1767-1780.

**Boore, J. L., Collins, T. M., Stanton, D., Daehler, L. L. & Brown, W. M.** 1995. Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. *Nature*, 376: 163- 165.

**Boore, J. L., Lavrov, D. V. & Brown, W. M.** 1998. Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature* 392: 667-668.

**Boore, J. L. & Brown, W. M.** 1998. Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. *Current Opinion in Genetics & Development* 8: 668-674.

**Boore, J. L. & Staton, J. L.** 2002. The mitochondrial genome of the sipunculid *Phascolopsis gouldii* supports its association with annelida rather than mollusca. *Mol. Biol. Evol.* 19: 127-137.

**Brenner, S.** 1993. Thoughts on genetics at the fin de siècle. *TIG* 9: 104.

**Brusca, R. C. & Brusca, G. J.** 1990. Invertebrates. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.

## C

**Carpenter, J. M.** 1992. Random cladistics. *Cladistics* 8: 174-153.

**Carranza, S., Bagaña, J. & Riutort, M.** 1997. Are the Platyhelminthes a monophyletic primitive group? An assessment using 18S rDNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 14, 485-497.

**Carranza, S.** 1997. *Taxonomia molecular mitjançant la seqüenciació del DNA ribosòmic 18S. Aplicació a l'origen i filogènia del Plathelminths*. Tesi Doctoral. Barcelona.

**Cebrià, F.** 2000. *Determinació, diferenciació i restitució del patró muscular durant la regeneració i renovació cel.lular a planàries d'aigua dolça*. Tesi Doctoral. Barcelona.

**Chen, J-Y., Oliveri, P., Gao, F., Dornbos, S. Q., Li, C-W., Botjer, D. J. & Davidson, E. H.** 2002. Precambrian Animal Life: Probable Developmental and Adult Cnidarian Forms from Southwest China. *Developmental Biology* 248: 182-196.

**Collins, A. G. & Valentine, J. W.** 2001. Defining phyla: evolutionary pathways to metazoan body plans. *Evolution and Development* 3: 6, 432-442.

**Conway-Morris, S.** 1993. The fossil record and the early evolution of the Metazoa. *Nature* 361: 219-225.

**Conway-Morris, S.** 1997. Molecular clocks: defusing the Cambrian "explosion"?. *Current Biology*, 7: R71-R74.

**Conway-Morris, S.** 1998. Metazoan phylogenies: falling into place or falling to pieces? A palaeontological perspective. *Current opinion in genetics & development*, 8: 662-667.

**Conway-Morris, S. C.** 2000. Evolution: bringing molecules into the fold. *Cell*, 100: 1-11.

**D**

**Davis, G. K. & Patel, N. H.** 1999. The origin and evolution of segmentation. *TCB* 9: M68- M72.

**Davidson, E. H., Peterson, K. & Cameron, R.A.** 1995. Origin of the adult bilaterian body plans: Evolution of developmental regulatory mechanisms. *Science* 270, 1319-1325.

**De Robertis, E.M. and Sasai, Y.** 1996. A common plan for dorso-ventral patterning in Bilateria. *Nature* 380, 37-40.

**De Robertis, E. M.** 1997. The ancestry of segmentation. *Nature* 387: 25-26.

**De Rosa, R., Grenier, J. K., Andreeva, T., Cook, C. E., Adoutte, A., Akam, M., Carrol, S. B. & Balavoine, G.** 1999. Hox genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution. *Nature* 399: 772-776.

**Dewel, R. A.** 2000. Colonial origin for Eumetazoa: major morphological transitions and the origin of bilaterian complexity. *J. Morph.* 243: 35-74.

**E**

**Ehlers, U.** 1985. Phylogenetic relationships within the Platyhelminthes. In *The origin and relationships of lower invertebrates groups*. Morris, S. C., George, J. D., Gibson, R. & Platt, H. M. Pp. 143-158. Oxford University Press, Oxford.

**Erwin, D. H. & Davidson, E. H.** 2002. The last common bilaterian ancestor. *Development* 129: 3021-3032.

**F**

**Farris, J. S.** 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. Pp. 277-302 in Platnick, N. I. & Funk, V. A., eds. *Advances in Cladistics*. Columbia University Press, New York.

**Farris, J. S., Albert, V. A., Källersjö, M., Lipscomb, D. & Kluge, A. G.** 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* 12: 99-124.

**Felsenstein, J.** 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Sys. Zool.* 27: 401-410.

**Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

**Ferrier, D. E. K. & Holland, P. W. H.** 2001. Ancient origin of the Hox gene cluster. *Nature reviews* 2: 33.

**Field, K. G., Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Ghiselin, M. T., Raff, E. C., Pace, N. R. & Raff, R. A.** 1988. Molecular phylogeny of the animal kingdom. *Science* 239: 748-753.

**Finnerty, J. R.** 2001. Cnidarians reveal intermediate stages in the evolution of *hox* clusters and axial complexity. *Am. Zool.* 41: 608-620.

**Friedrich, C. & Hendelberg, J.** 2001. On the ecology of Acoela living in the Arctic Sea ice. *Belg. J. Zool.* 131 (Supp. 1): 213-216.

## G

**Giribet, G., Distel, D. L., Polz, M., Sterrer, W. & Wheeler, W. C.** 2000. Triploblastic relationships with emphasis on the acoelomates and the position of Gnathostomulida, Cyciophora, Plathelminthes, and Chaetognatha: a combined approach of 18S rDNA sequences and morphology. *Syst. Biol.* 49: 539-562.

**Giribet, G., Edgecombe, G. D. & Wheeler, W. C.** 2001. Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. *Nature* 413: 157-161.

**Giribet, G.** 2002. Current advances in the phylogenetic reconstruction of metazoan evolution. A new paradigm for the Cambrian explosion?. *Mol. Phylog. Evol.* (en premsa)

**Goldman, N.** 1998. Effects of sequence alignment procedures on estimates of phylogeny. *BioEssays* 20.4: 287-290.

**Goodson, V. H. & Spudich, J. A.** 1993. Molecular evolution of the myosin family: relationships derived from comparisons of amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 659-663.

**Graff, L. Von** 1882. *Monographie der Turbellarien*. 1. Rhabdocoelida. 422 pp. Leipzig: Engelmann.

## H

**Hadzi, J.** 1953. An attempt to reconstruct the system of animal classification. *Syst. Zool.* 2: 145-154.

**Hadzi, J.** 1963. *The evolution of the Metazoa*. Pergamon Press. Oxford.

**Haeckel, E.** 1874. The gastraea-theory, the phylogenetic classification of the animal kingdom and the homology of the germ-lamellae. *Quart. J. Microsc. Sci.* 14: 142-265.

**Haeckel, E.** 1875. Die Gastrula und die Entfurchung der Thiere. *Jena Z. Naturwiss* 9: 402-508.

**Halanych, K. M., Bacheller, J. D., Aguinaldo, A. M., Liva, S. M., Hillis, D. M. & Lake, J. K.** 1995. Evidence from 18S ribosomal DNA that the lophophorates are protostome animals. *Science* 267: 1641-1643.

**Halanych, K. M. & Passamaneck, Y.** 2001. A brief review of metazoan phylogeny and future prospects in hox-research. *Amer. Zool.* 41: 629-639.

**Hanson, E. D.** 1963. Homologies and the ciliate origin of the Eumetazoa. *In The Lower Metazoa*. Dougherty, E. C., ed. Pp. 7-22. University of California Press, Berkeley.

**Hanson, E. D.** 1977. *The origin and early evolution of animals*. Pitman, London.

**Haszprunar, G.** 1996. Platyhelminthes and Platyhelminthomorpha-paraphyletic taxa. *J. Zool. Syst. Evol. Research* 34: 41-48.

**Henry, J.Q., Martindale, M.Q., and Boyer, B.C.** 2000. The unique developmental program of the acoel flatworm, *Neochildia fusca*. *Dev. Biol.* 220: 285-295.

**Hoffman, P. F., Kaufman, A. J., Halverson, G. P. & Schrag, D. P.** 1998. A neoproterozoic snowball earth. *Science* 281: 1342-1346.

**Holland, L. Z.** 2000. Body-plan evolution in the Bilateria: early antero-posterior patterning and the deuterostome-protostome dichotomy. *Current opinion in genetics & development*, 10: 434-442.

**Holland, P. W. H., Kene, M., Williams, N. A. & Holland N. D.** 1997. Sequence and embryonic expression of the amphioxus engrailed gene (AmphiEn): The metameric pattern of transcription resembles that of its segment polarity homolog in *Drosophila*. *Development* 124: 1723-1732.

**Holland, P. W. H.** 1998. Major transitions in animal evolution: a developmental genetic perspective. *Amer. Zool.* 38: 829-842.

**Huelsenbeck, J. P.** 1997. Is the Felsenstein zone a fly trap? *Syst. Biol.* 46: 69-74.

**Huelsenbeck, J. P., Ronquist, R., Nielsen, R. & Bollback, J. P.** 2001. Bayesian Inference of Phylogeny and Its Impact on Evolutionary Biology. *Science* 294: 2310-2314.

**Huelsenbeck, J. P. & Bollback, J. P.** 2001. In "*Handbook of Statistical genetics*" M. Bishop Editor. (Wiley, London).

**Hwang, U. W., Friedrich, M., Tautz, D., Park, C. J. & Kim, W.** 2001. Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates. *Nature* 423: 154-157.

**Hyman, L. H.** 1940. *The Invertebrates; vol. 1. Protozoa through Ctenophora*. pp. 1-726. McGraw-Hill, New York.

**Hyman, L. H.** 1951. *The Invertebrates. Vol. 2. Platyhelminthes and Rhynchocoela: the Acoelomate Bilateria*. McGraw Hill, New York.

## J

**Jägersten, G.** 1955. On the early phylogeny of the Metazoa. The Bilaterogastrea theory. *Zool. Bidr. Uppsala*. 30: 321-254.

**Jägersten, G.** 1959. Further remarks on the early phylogeny of the Metazoa. *Zool. Bidr. Uppsala*. 33: 79-108.

**Jägersten, G.** 1972. *Evolution of the Metazoan life cycle*. Academic Press, London.

## K

**Karling, T. G.** 1974. On the anatomy and affinities of the turbellarian orders. In *Biology of the Turbellaria*. Riser, N. W. & Morse, M. P., eds. Pp. 1-16. McGraw-Hill, New York.

**Katayama, T., Yakamoto, M., Wada, H. & Satoh, N.** 1993. Phylogenetic position of acoel turbellarians inferred from partial 18S rDNA sequences. *Zoological Science* 10: 529-536.



**Kim, J., Kim, W. & Cunningham, C. W.** 1999. New perspective on lower metazoan relationships from 18S rDNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 16(3): 423-427.

**Kishino, H. & Hasegawa, M.** 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequences data, and the branching order in Hominoidea. *J. Mol. Evol.* 29: 170-179.

**Kobayashi, M., Furuya, H. & Holland, P. W. H.** 1999. Dicyemids are higher animals. *Nature* 401: 762.

**Korn, E. D.** 2000. Coevolution of head, neck, and tail domains of myosin heavy chains *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 12559-12564.

## L

**Le, T. H., Blair, D. & McManus, D. P.** 2002. Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. *TRENDS in Parasitology*, 18: 206-213.

**Li, W. H. & Tanimura, M.** 1987. The molecular clock runs more slowly in man than in apes and monkeys. *Nature* 326: 93.

**Littlewood, D. T. J., Olson, P. D., Telford, M. J., Herniou, E. A. & Riutort, M.** 2001. Elongation factor 1-alpha sequences alone do not assist in resolving the position of the Acoela within the Metazoa. *Mol. Biol. Evol.* 18, 437-442.

**Lundin, K. & Hendelberg, J.** 1998. Is the sperm type of the Nemertodermatida close to that of the ancestral Platyhelminthes? *Hydrobiologia* 383: 197-205.

## M

**Maley, L. E. & Marshall, C. R.** 1998. The coming of age of molecular systematics. *Science* 279: 505-506.

**Mallatt, J & Winchell, C.J.** 2002. Testing the New Animal Phylogeny: First Use of Combined Large-Subunit and Small-Subunit rRNA Gene Sequences to Classify the Protostomes. *Mol. Biol. Evol.*, 19(3): 289-301

**Manuel, M., Kruse, M., Werner, E. G. & LeParco, Y.** 2000. The comparison of fl-thymosin homologues among Metazoa supports an arthropod-nematode clade. *J. Mol. Evol.* 51: 378-381.

**Medina, M., Collins, A. G., Silberman, J. D. & Sogin, M. L.** 2001. Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9707-9712.

**Metchnikoff.** 1883. Untersuchungen über die intracelluläre Verdauung bei wirbellosen Thieren. *Arb. Zool. Inst. Wien* 5: 141-168. (Transl. (1884) as: Researches on the intracellular digestion of invertebrates. *Quart. J. micr. Sci.* 24: 89-111).

**Morrison, D. A. & Ellis, J. T.** 1997. Effects of nucleotide sequence alignment on phylogeny estimation: a case study of 18S rDNA of Apicomplexa. *Mol. Biol. Evol.* 14: 428-441.

**N**

**Nickisch-Roseneck, M. Von, Brown, W. M. & Boore, J. L.** 2001. Complete sequence of the mitochondrial genome of the tapeworm *Hymenolepis diminuta*: gene arrangements indicate that platyhelminthes are eutrochozoans. *Mol. Biol. Evol.* 18: 721-730.

**Nielsen, C.** 1985. Animal phylogeny in the light of the trochaea theory. *Biol. J. Linn. Soc.* 25: 243-299.

**Nielsen, C. & Norrevang, A.** 1985. The trochaea theory: an example of life cycle phylogeny. In *The origin and relationships of lower invertebrates groups*. Morris, S. C., George, J. D., Gibson, R. & Platt, H. M., eds. Pp. 28-41. Oxford University Press, Oxford.

**Nixon, K. C. & Carpenter, J. M.** 1994. On outgroups. *Cladistics* 9: 413-426.

**Norén, M. & Jondelius, U.** 1997. Xenoturbella's molluscan relatives... *Nature* 390: 31-32.

**P**

**Parkinson, C. L., Adams, K. L. & Palmer, J. D.** 1999. Multigene analyses identify the three earliest lineages of extant flowering plants. *Current Biology* 9: 1485-1488.

**Peterson, K. J., Cameron, R. A. & Davidson, E. H.** 1997. Set-aside cells in maximal indirect development: evolutionary and developmental significance. *BioEssays* 19: 623-631.

**Peterson, K. J. & Eernisse, D. J.** 2001. Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: inferences from morphology and 18S rDNA gene sequences. *Evol. Dev.* 3: 170-205.

**Pont-Kingdom, G., Vassort, C. G., Warrior, R., Okimoto, R., Beagley, C. T. & Wolstenholme, D. R.** 2000. Mitochondrial DNA of *Hydra attenuata* (Cnidaria): a sequence that includes an end of one linear molecule and the genes for I-rRNA, tRNA<sup>f-Met</sup>, tRNA<sup>Trp</sup>, COII, and ATPase8. *J. Mol. Evol.* 51: 404-415.

**Q**

**Qiu, Y., Lee, J., Bernasconi-Quadroni, F., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Zanis, M., Zimmer, E. A., Chen, Z., Savolainen, V. & Chase, M. W.** 1999. The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature* 402: 404-407.

**R**

**Raikova, O. I., Reuter, M., Kotikova, E. A. & Gustafsson, M. K. S.** 1998. A commisural brain! The pattern of 5-HT immunoreactivity in Acoela (Platyhelminthes). *Zoomorphology* 118: 69-77.

**Raikova, O. I., Reuter, M., Jondelius, U. & Gustafsson, M. K. S.** 2000. The brain of the Nemertodermatida (Platyhelminthes) as revealed by anti-5HT and anti-FMRamide immunostainings. *Tissue and cell* 32: 358-365.

**Raikova, O. I., Reuter, M. & Justine, J. L.** 2001. Contributions to the the phylogeny and systematics of the Acoelomorpha. In *Interrelationships of the Platyhelminthes*, pp. 13-23. D. T. J. Littlewood & R. A. Bray eds. London. Taylor & Francis.

**Rasmussen, B., Bengtson, S., Fletcher, I. R. & McNaughton, N. J.** 2002. Discoidal impressions and trace-like fossils more than 1200 million years old. *Science*, 296: 1112-1115.

**Regier, J. C. & Shultz, J. W.** 2001. Elongation Factor-2: A Useful Gene for Arthropod Phylogenetics. *Mol. Phylogenet. Evol.* 20: 136-148.

**Remane, A., Storch, V. & Welsh, U.** 1980. *Systematische Zoologie*. G. Fisher, Stuttgart, Germany.

**Reuter, M., Raikova, O. I. & Gustafsson, M. K.** 1998. An endocrine brain? The pattern of FMRF-amide immunoreactivity in Acoela (Plathelminthes). *Tissue Cell* 30: 57-63.

**Rieger, R.** 1980. A new group of interstitial worms. Lobatocerebridae nov. fam. (Annelida) and its significance for metazoan phylogeny. *Zoomorphologie* 95: 41-84.

**Rieger, R.** 1985. The phylogenetic status of the acelomate organisation within the Bilateria: a histological perspective. In *The origin and relationships of lower invertebrates groups*. Morris, S. C., George, J. D., Gibson, R. & Platt, H. M., eds. Pp. 101-122. Oxford University Press, Oxford.

**Rieger, R., Smith, J. P. S. & Rieger, G. E.** 1991. Platyhelminthes: Turbellaria. In *Microscopic anatomy of invertebrates 3, Platyhelminthes and Nemertinea*. Harrison, F. W. & Bogitsch, B. J., eds. Pp. 7-140. John Wiley & Sons, New York.

**Rieger, R. & Ladurner, P.** 2001. Searching for the stem species of the Bilateria. *Belg. J. Zool.* 131(Suppl): 27-34.

**Rodhe, K.** 1990. Phylogeny of Platyhelminthes, with special reference to parasitic groups. *Int. J. Parasitol.* 20: 979-1007.

**Rodríguez-Trelles, F., Tarrío, R. & Ayala, F. J.** 2002. A methodological bias toward overestimation of molecular evolutionary time scales. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 99: 8112-8115.

## S

**Saitou, N. & Nei, M.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.

**Saló, E., Tauler, J., Jiménez, E., Bayascas, J. R., González-Linares, J., García-Fernández, J. & Baguña, J.** 2001. Hox and parahox genes in flatworms: characterization and expression. *Amer. Zool.* 41: 652-663.

**Salvini-Plawen, L. Von.** 1978. On the origin, and evolution of the lower Metazoan. *Z. Zool. Syst. Evol.* 16: 40-88.

**Sedgwick.** 1884. On the origin of metameric segmentation, and some others morphological questions. *Quart. J. Micr. Sci.* 24: 43-82.

**Sensenbaugh, T. and Franzén, Å.** 1998. Ultrastructural study of metamorphosis in the freshwater bryozoan *Plumatella fungosa* (Bryozoa Phylactolaemata). *Invertebrate Reproduction and Development*, 34: 301-308.

**Shimodaira, H. & Hasegawa, M.** 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1114-1116.

**Smith, M. J., Arndt, A., Gorski, S. & Fajber, E.** 1993. The phylogeny of echinoderm classes based on mitochondrial gene arrangements. *J. Mol. Evol.* 36: 545-554.

**Smith, J. P. S., Tyler, S. & Rieger, R. R.** 1986. Is the Turbellaria polyphyletic?. *Hydrobiologia* 132: 13-21.

**Soltis, P. S., Soltis, D. E. & Chase, M.** 1999. Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. *Nature* 402: 402-404.

**Steinböck, O.** 1963. Origin and affinities of the lower Metazoa. In: *The lower Metazoa*. Dougherty, E. C., ed. Pp. 45-54. University of California Press, Berkeley.

**Steel, M. & Penny, D.** 2000. Parsimony, Likelihood, and the role of models in molecular phylogenetics. *Mol. Biol. Evol.* 17: 839-850.

**Strimmer, K. & von Haeseler, A.** 1996. Quartet puzzling: a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* 13: 964-969.

**Strimmer, K. & von Haeseler, A.** 1997. Likelihood-mapping: a simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94: 6815-6819.

**Swofford, D. L., Olsen, G. J., Waddell, P. J. & Hillis, D. M.** 1996. Phylogenetic Inference. Pp. 407-514 in Hillis, D. M., Moritz, C. & Mable, B. K., eds. *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Sunderland.

## T

**Telford, M. J.** 2000. Turning hox "signatures" into synapomorphies. *Evol. Dev.* 2: 360-364.

**Telford, M. J., Herniou, E. A., Russell, R. B. & Littlewood, D. T. J.** 2000. Changes in mitochondrial genetic code as phylogenetic characters: two examples from the flatworms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11359-11364.

**Turbeville, J. M. & Ruppert, E. E.** 1985. Comparative ultrastructure and the evolution of nemertines. *Am. Zool.* 25: 53-71.

**Tyler, S.** 2001. The early worm-origins and relationships of the lower flatworms. In *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Littlewood, D. T. J. & Bray, R. A., eds. Pp. 3-12. Taylor & Francis. London.

## W

**Watkins, R. F. & Beckenbach, A. T.** 1999. Partial sequence of a sponge mitochondrial genome reveals sequence similarity to Cnidaria in cytochrome oxidase subunit II and the large ribosomal RNA subunit. *J. Mol. Evol.* 48: 542-554.

**Wheeler, W. C.** 1990. Nucleic acid sequence phylogeny and random outgroups. *Cladistics* 6: 363-368.

**Whelan, S., Liò, P. & Goldman, N.** 2001. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. *TRENDS in Genetics* 17: 262-272

**Wilson, A. C., Carlson, S. S. & White, T. J.** 1977. Biochemical evolution. *Annu. Rev. Biochem* 46: 573-639.

**Willmer, P.** 1990. *Invertebrate Relationships, Patterns in Animal Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.

**Winnepenninckx, B., Ackeljau, T., Mackey, L. Y., Brooks, J. M., De Wachter, R., Kumar, S. & Garey, J. R.** 1995. 18S rRNA data indicate that aschelminthes are polyphyletic in origin and consist of at least three distinct clades. *Mol. Biol. Evol.* 12: 1132-1137.

**Wray, G. A., Levinton, J. S. & Shapiro, I. H.** 1996. Molecular evidence for deep precambrian divergences among metazoan phyla. *Science* 274: 568-573.

#### **X**

**Xiao, S., Zhang, Y. & Knoll, A. H.** 1998. Three-dimensional preservation of algae and animal embryos in a Neoproterozoic phosphorite. *Nature* 391: 553-558.

#### **Y**

**Yang, Z.** 1996. Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. *TREE* 11: 367-372.