

Departament de Genètica
Facultat de Biologia
UNIVERSITAT DE BARCELONA

TESI DOCTORAL

TESI DOCTORAL

**Acels i nemertodermàtides:
bilaterals basals o Plathelminths?
Aproximació multigènica a l'origen
dels metazous bilaterals.**

Íñaki Ruiz-Trillo



Barcelona, 2002

Íñaki Ruiz-Trillo
Setembre de 2002



<u>Introducció</u>	1
1. Els Bilateria	1
1.1 Característiques generals	
1.2 Origen dels Bilateria	1
1.3 Organització corporal dels bilaterals: trets estructurals	3
2. L'origen dels Bilateria: dades morfològiques i embriològiques	7
2.1. A partir d'ancestres acelomats	7
2.2. A partir d'ancestres celomats	8
2.3. El pas d'un sol eix (O-AB) a dos eixos corporals (AP i DV)	9
3. L'origen dels Bilateria: dades moleculars	11
3.1. La nova filogènia molecular dels Metazous	12
4. La problemàtica dels Platyhelminthes i dels Acoelomorpha	14
4.1. Les dades morfològiques	16
4.2. Dades moleculars i comportament <i>fast-clock</i> dels acels	18
5. Inferència filogenètica a partir de dades moleculars	19
5.1. La filogènia molecular. Avantatges i inconvenients	19
5.2. Inferència filogenètica	21
6. Aproximacions moleculars al problema dels Acoelomorpha i a la seva posició dins dels Bilateria	24
6.1. El gen ribosomal 18S	24
6.2. La cerca de nous gens	25
6.3. La cerca de sinapomorfies moleculars	26
6.4. El genoma mitocondrial	26
<u>Objectius</u>	31
<u>Resultats</u>	33
Capítol I: Acoel flatworms: earliest extant bilaterian metazoans, not members of the Platyhelminthes. <i>Science</i> 283, 1919-1923 (1999).	35
Capítol II: The Nemertodermatida are basal bilaterians and not members of the Platyhelminthes. <i>Zoologica Scripta</i> 31, 201-215 (2002).	45
Capítol III: A phylogenetic analysis of Myosin Heavy Chain type II sequences corroborates that Acoela and Nemertodermatida are basal bilaterians. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 99, 11246-11251 (2002).	65
Capítol IV: First mitochondrial genome of an acoel, and a nemertodermatid. Gene content and phylogenetic inference. <i>In preparation</i>.	75
<u>Discussió</u>	101
1. Acels i nemertodermàtides no són Platyhelminthes, sino els grups més basals dins els Bilateria.	104
2. El clade Acoelomorpha: monofilètic o parafilètic?	107
3. Miosina II com a nou marcador filogenètic	109

4. Genomes mitocondrials: valor filogenètic dels reordenaments mitocondrials	109
5. Una nova hipòtesi taxonòmica i filogenètica: acels i nemertodermàtides <i>versus</i> Eubilateria	111
6. Implicacions evolutives sobre l'origen i radicació dels bilaterals i l'explosió Càmbrica	113
7. Implicacions sobre els mecanismes cel·lulars i moleculars a la base de la transició diploblasts-triploblasts.	115
<u>Conclusions</u>	119
<u>Bibliografia</u>	123

Agraiments

“Mi papel ha sido tan pequeño que, aunque hubiera permanecido detrás de los bastidores, todos habrían dicho igualmente que la comedia era perfecta” (*La isla del día de antes*, Umberto Eco).

Introducció

"In terms of events in the Cambrian (if not the preceding Ediacaran) I believe that the search for the basic trigger may be sought in the area of molecular evolution"
(Simon Conway Morris)

1. Els Bilateria

1.1. Característiques generals

En base a la seva simetria i al nombre d'eixos corporals i de capes embrionàries, el Regne Animal es divideix en dos grups. D'una banda, els Radialia o diblàstics, amb un sol eix axial (oral-aboral), simetria radial i dues capes embrionàries. D'altra banda, els Bilateria o triblàstics, amb dos eixos axials (anteroposterior i dorsoventral), simetria bilateral i tres capes embrionàries.

La majoria dels Radialia o diblàstics tenen molts plans de simetria, que donen lloc a dues parts simètricament idèntiques. Ara bé, algunes meduses tenen, però, simetria tetra-radial, mentre que alguns coralls la tenen biradial o fins i tot bilateral, al menys a nivell dels mesenteris. Les capes embrionàries, a partir de les quals es desenvolupa l'organisme adult, són dues: una d'externa, l'ectoderm, que dona lloc a l'epidermis i al sistema nerviós; i una d'interna, l'endoderm, que forma la cavitat digestiva. Un únic eix corporal, l'eix oral-aboral, polaritza l'estructura corporal dels radials. A l'extrem anomenat oral hi ha la boca i els tentacles; a l'altre, anomenat aboral, el peu o disc basal per on adherir-se al substrat. Les formes de vida no-sèsil, com les meduses, i els ctenòfors, conserven aquest eix, tot i que invertit. Quatre fílums representen aquest grup de metazous: els Porifera (esponges), que de fet es consideren diblàstics asimètrics, els Cnidaria (meduses, coralls i anèmones de mar), els Ctenophora i els Placozoa.

Els Bilateria o bilaterals comprén els organismes animals amb un únic pla de simetria que divideix el cos en dos costats iguals (esquerra i dreta), que són l'imatge especular l'un de l'altre. A resultes d'això, els Bilateria consten de dos eixos axials: l'anteroposterior, que va de cap a cua, i el dorsoventral, que va d'esquena a ventre. A més a més, els Bilateria posseeixen tres, i no dos, fulls embrionaris. Aquestes capes o fulls són: l'endoderm i l'ectoderm com els diblàstics, i una tercera capa intermitja que es forma entre les altres dues, que rep el nom de mesoderm i que dona lloc a la musculatura i a diferents òrgans interns. Els Bilateria representen el gruix dels metazous. Hi ha aproximadament trenta-quatre fílums bilaterals, amb diferents graus de complexitat i diferents formes de desenvolupament embrionari.

1.2. Origen dels Bilateria

L'aparició dels animals bilaterals va ser un fet clau en la evolució de la vida animal, tan sols comparable a l'adquisició de la multicel·lularitat. La raó rau en que les

dues característiques que defineixen el grup, la simetria bilateral i el mesoderm, van representar dues importants innovacions evolutives al permetre un increment de complexitat corporal que comportà una gran radiació de formes animals. Això explica la gran diferència que hi ha en el nombre actual de fílums o *bauplans* radials i bilaterals: 34 fílums d'animals bilaterals, per quatre de radials.

Els Radialia són, tal i com prova el registre fòssil, ancestrals als Bilateria. Es troben fòssils d'organismes radials, com les faunes de Doushanto, Xina, (Xiao i col. 1998; Chen i col. 2002) i d'Ediacara, Austràlia (Conway-Morris 1993) en jaciments fòssils del PreCàmbric, d'ara fa uns 570-600 milions d'anys. No obstant, no es troba cap fòssil atribuïble a un organisme d'estructura bilateral fins a les roques del Càmbric (ara fa uns 540 milions d'anys). I el que encara és més important, en només 30-40 milions d'anys van aparèixer –sempre segons el registre fòssil– tots els *bauplans* bilaterals coneguts (explosió Càmbrica, ara fa aproximadament 515-510 milions d'anys), el que ens indica que va haver-hi una enorme radiació a l'inici de la bilateralitat. Recentment aquesta explosió s'ha posat en dubte, emprant dues argumentacions: 1) paleontològiques; presència de rastres fòssils PreCàmbrics atribuïts a l'activitat d'animal bilaterals (Rasmussen i col. 2002); i 2) moleculars; estudis fets amb proteïnes han datat l'origen dels bilaterals en fins i tot 1000 milions d'anys. (Wray i col. 1996; veure Conway-Morris 1997, 1998 i 2000 per una revisió crítica). Ambdues dades, però, han generat molta polèmica, i cal corroborar-les. Així, atribuir rastres fòssils a un bilateral és extremadament difícil, i, fins i tot, un origen no-biològic és prou factible. A més a més, les datacions moleculars impliquen suposicions sobre el "rellotge molecular" (com unes taxes constants de canvi) que estan molt lluny de ser empíriques i creïbles (Ayala i col. 1998, Rodríguez-Trelles i col. 2002).

En qualsevol cas, la gran radiació dels bilaterals s'explica per l'èxit de les seves innovacions. D'una banda, l'adquisició de la simetria bilateral duu a una polarització del cos en anterior i posterior, i ventral i dorsal, que permet: 1) una encefalització de la part anterior on es localitza el sistema sensitiu, donant lloc al cervell, i 2) una diferenciació de la part dorsal, enfrontada a l'ambient i per tant de funció protectora, versus la part ventral, associada al substracte i especialitzada en la locomoció i nutrició. Tot això implica passar d'una locomoció no-direccional, típica dels radials, a una locomoció uni-direccional, molt més efectiva, dirigida per aquesta part anterior sensitiva. D'altra banda, la tercera capa embrionària o mesoderm permet, a més d'adquirir òrgans interns, augmentar en grandària i complexitat corporal.

1.3. Organització corporal dels bilaterals: trets estructurals.

La diversitat estructural dels Bilateria, el grup objecte del nostre estudi, és impressionant. Algunes de les característiques morfològiques i embrionàries han estat la base per tractar de catalogar o agrupar als bilaterals.

a) Els eixos corporals

La característica més definitòria dels bilaterals respecte als radials és la polarització del cos al llarg de dos eixos ortogonals entre sí: l'eix anteroposterior (AP) i l'eix dorsoventral (DV), en contraposició a l'únic eix, l'Oral-Aboral (O/AB) dels radials. Aquesta diferenciació axial va dur d'una banda a la locomoció unidireccional *versus* la multidireccional dels radials, i lògicament va estimular la concentració del Sistema Nerviós a la part anterior (funció sensorial o exploratòria). Alhora, l'eix DV va diferenciar la part dorsal encarada a l'ambient extern (amb estructures de defensa) *versus* la part ventral encarada al substrat i especialitzada en locomoció i alimentació.

La incògnita respecte als eixos axials dels bilaterals és el seu origen a partir d'un únic eix, l'O/AB dels radials. Això ha generat multitud d'hipòtesis que seràn tractades a l'Apartat 2 d'aquesta Introducció.

b) El tercer full embrionari o mesoderm

Tot i que alguns diploblasts o radials de mida gran presenten cèl·lules dins de la matriu extracel·lular o mesoglea, fet que ha dut a alguns autors a considerar-les com una mena de mesoderm, el fet és que llevat de les cèl·lules musculars dels ctenòfors (separades ja de les epitelials), no hi ha cap cèl·lula, teixit o llinatge als radials que puguem qualificar de mesodèrmic. El mesoderm, doncs, entès com una tercera capa entre ectoderm i endoderm, és un 'invent' (i molt important) dels bilaterals.

La qüestió que ha preocupat a forces investigadors és d'on es va originar el mesoderm (de l'ectoderm o de l'endoderm) i el mecanisme precís de formació (invaginació, delaminació, migració,...). A la majoria de protostomats, el mesoderm té un origen dual; a partir del blastòmer 2d (ectoderm) es formen derivats mesodèrmics cefàlics (ectomesoderm), mentre que del blastòmer 4d (endoderm) es formen la majoria d'estructures mesodèrmiques del tronc. Als deuterostomats, el mesoderm és bàsicament d'origen endodèrmic; és a dir, és un endomesoderm. Semblaria, per tant, que l'origen ancestral del mesoderm seria de tipus endomesodèrmic. Respecte al

mecanisme o modalitat de formació, tant la invaginació com la migració (unipolar bàsicament)+extensió semblen igualment factibles, no poden deduir-se dels diblàstics cap modalitat preferent.

c) El Sistema Nerviós Anterior o cefàlic

Una altra característica que diferencia als radials dels bilaterals és la concentració als darrers de grups de cèl·lules nervioses al pol anterior formant uns incipients ganglis cefàlics que, ulteriorment en evolució, donaran el Sistema Nerviós Anterior. La raó principal d'aquesta concentració, conseqüència de l'aparició de l'eix AP, és el d'establir un centre on rebre les entrades de neurones sensorials (lògicament concentrades a la part anterior), des d'on computar l'informació per trametre les ordres motores a la musculatura corporal.

De nou, la incògnita principal és esbrinar com aquest Sistema Nerviós concentrat cefàlicament s'origina a partir d'un sistema difós en xarxa. De les nombroses hipòtesis formulades (Veure Willmer 1990), la més factible proposa l'agrupament neuronal en petits feixos paralels al eix AP que culminen en una agrupació cel·lular a ambdós pols del eix generant en un d'ells el futur Sistema Nerviós Anterior. D'ací, la concentració dels feixos en cordons nerviosos ventrals (protostomats) i dorsals (deuterostomats) generaria l'estructura bàsica del Sistema Nerviós Central dels diferents bilaterals.

d) blastopor, sistema digestiu, boca i anus

La relació entre el blastopor i l'origen embriològic de la boca i l'anús dóna lloc a la divisió en bilaterals protostomats i deuterostomats.

Els **protostomats** formen la boca en el lloc on es forma el blastopor (o a prop d'aquest), i formen el mesoderm a partir dels mesentoblasts -que normalment s'originen a partir de la cèl·lula 4d-. A més, la formació del celoma es de tipus esquizocèlic. Els Priapula, Nematomorpha, Artropoda i grups afins, Nematoda, Platyhelminthes, Mollusca i Annelida, entre d'altres, es consideren protostomats.

Els **deuterostomats** formen l'anús a partir del blastopor, essent la boca de nova formació. A més, formen el mesoderm a partir de les cèl·lules endodèrmiques de la paret del tub digestiu, i la formació del celoma es de tipus enterocèlic. Chordata, Urochordata, Hemichordata i Echinodermata són deuterostomats.

En qualsevol cas, i com passa amb el celoma, l'assignació concreta a un o altre grup no és fàcil, i, en molts casos, organismes considerats protòstoms o deuteròstoms no compleixen totes les característiques definidores.

El moment d'aparició d'un sistema digestiu de via única amb boca i anus separat planteja una de les grans incògnites en Evolució Animal. Segons la teoria de l'arquicelomat (Veure Introducció, Apartat 2.2) el primer bilateral seria ja celomat, segmentat i amb boca i anus separats. En conseqüència, els Plathelminths, que són els únics bilaterals amb intestí cec (boca i anus al mateix lloc) com als radials, haurien d'haver perdut l'intestí de via única passant a un intestí cec. Tot i que s'han proposat mecanismes progenètics (Rieger 1985; Balavoine 1998) per explicar-ho, és difícil entendre com un grup pot perdre una millora adaptativa com aquesta sense estar associat ni a miniaturització ni a parasitisme. Si per altra banda, i segons la teoria planuloid-anceloid (Veure Introducció, Apartat 2.1), el primer bilateral era semblant a un acel amb intestí cec, l'aparició del intestí de via única es va donar posteriorment a l'aparició dels bilaterals, no essent doncs una sinapomorfia global d'aquests.

e) el celoma

El celoma és una cavitat corporal plena de líquid, envoltada per un epitelí o peritoneu, d'origen endodèrmic o mesodèrmic, i situada entre la capa externa del cós, que deriva de l'ectoderm, i el tub digestiu, derivat de l'endoderm. De funció originalment hidrostàtica, el celoma permet moltes altres coses com 1) ser un element distribuïdor de nutrients, gasos i productes catabòlics (nefrocel) entre els teixits; 2) ser una cavitat on desenvolupar noves estructures, i conseqüentment permetre un augment de grandària; 3) ser una cavitat d'emmagatzament de diversos productes corporals, com ara les gàmetes (gonocel), i 4) desenvolupar un sistema circulatori (hemocel). Així, el celoma, com a cavitat corporal més important a nivell estructural, té efectes sobre la mida, la locomoció, el comportament alimentari, i la vida en general dels organismes. Tot i les avantatges, no tots els bilaterals tenen celoma. Hi ha, de fet, tres situacions distintes: a) organismes sense celoma, anomenats **acelomats**, com els platihelminths, caracteritzats per la presència d'un parènquima compacte entre el tub digestiu i l'epidermis; b) organismes **pseudocelomats**, com ara nemàtodes, priapulíds i rotífers, amb una cavitat corporal que és la resta de la cavitat blastocèlica o que s'origina per cavitació del mesoderm, estant limitada no per un epitelí sinó tant sols per matriu extracel·lular; i c) organismes **celomats**, com anèl·lids, mol·luscs, i equinoderms, entre d'altres, amb un celoma ben definit.

La definició d'una cavitat com a pseudoceloma o celoma, clara en teoria, és difícil a la pràctica. L'exemple més palès són els Nemertins, durant molt temps considerats acelomats, però ara sabuts ser celomats ja que tant el rincocel com l'anomenat sistema circulatori són veritables celomes (Turbeville i Ruppert 1985).

f) la segmentació

La segmentació és la repetició d'estructures al llarg de l'eix anteroposterior. La majoria d'estructures repetides afecten ectoderm i mesoderm, deixant l'endoderm sense segmentar. La segmentació o metamerització (formació de segments o metàmers), cal distingir-la de l'anomenada pseudometamerització com és l'estrobilació dels pòlips als cnidaris o la dels segments reproductius (proglòtides) als platihelminths cestodes. La diferència entre una i l'altra és que la darrera s'associa clarament a fenòmens de reproducció i els nous metàmers es formen intercalarmen, mentre que a la segmentació veritable, els segments es formen subterminalment durant el desenvolupament no estant associats a reproducció.

El problema fonamental que planteja la segmentació en Evolució és el seu origen: monofilètic o polifilètic. Si es compara la morfologia i el desenvolupament embrionari dels principals filums d'organismes segmentats: Anèlids, Artròpodes i Cordats, la conclusió arribada és la d'un origen difilètic. Així, Anèlids i Artròpodes, units en el clade Articulata, tindrien una segmentació semblant de tipus teloblàstic. Per contra, els Cordats presentarien un tipus de segmentació clarament diferent. Dades recents, tot i que incompletes, d'expressió gènica dels gens de segmentació a diferents filums animals van fer concloure que la segmentació seria homòloga a tots els bilaterals (De Robertis i Sasai 1996; De Robertis 1997; Holland i col. 1997; Adoutte i col. 1999 i 2000). Una conseqüència d'això seria que tots els filums bilaterals no segmentats haurien derivat d'ancestres segmentats. Aquesta darrera conclusió ha demostrat ser errònea, ja que Anèlids i Artròpodes pertanyen a superclades diferents (Aguinaldo i col. 1997) essent la seva segmentació no homòloga, i al fet que les darreres dades d'expressió gènica demostren amb claredat que els mecanismes de segmentació són diferents (Davis i Patel 1999)

g) cicles vitals i formes larvàries

Alguns autors (Jägersten 1972, Nielsen 1985) consideren que el cicle vital indirecte (larva pelàgica i adult bènctic) és la condició ancestral als bilaterals. Altres consideren que la larva va ser una adquisició posterior i que el cicle vital ancestral era directe (sense larva). S'ha especulat que hi ha dos tipus bàsics de formes larvàries,

lligades a la diferenciació protòstoms/deuteròstoms (Willmer, 1990). D'una banda, la larva trocòfora, considerada característica dels protòstoms, tot i que ho és només d'alguns fílums agrupats en els Spiralia. Morfològicament és molt senzilla: una capa ectodèrmica i una endodèrmica que forma el digestiu. Aquest es troba envoltat de mesoderm. Es compon de pocs òrgans, tan sols un parell de protonefridis i un òrgan apical. La característica diagnòstica són les bandes de cilis externes. D'altra banda, trobem la larva dipleurula, considerada característica dels deuteròstoms i que és, de fet, un arquetipus de totes les larves dels deuteròstoms. És bilateralment simètrica, amb un ectoderm simple, un tub digestiu complet, boca i anus anteriors (o ventrals segons alguns autors), sense protonefridis i amb una banda continua de cilis que passa per damunt i per sota de la boca i lateralment pel cós. Utilitzar la forma larvària com a caràcter filogenètic és francament complex, ja que les larves es construeixen a partir d'uns pocs elements morfològics i les restriccions són, per tant, molt grans. Això implica una alta probabilitat de convergència. A més a més, no sempre l'assignació a un o altre tipus és directe i la banda ciliar, que és la principal característica definidora, sembla estar fortament associada al desenvolupament embrionari.

2. L'origen dels Bilateria: dades morfològiques i embriològiques

El pas d'organismes radials diblàstics a bilaterals triblàstics ha generat infinitat d'hipòtesis sobre com va tenir lloc aquesta transició (veure revisions a Willmer 1990, i Collins i Valentine 2001). Aquestes hipòtesis es poden dividir en dos grans grups: aquelles que suposen un ancestre complex (celomat), i les que parteixen d'un ancestre simple (acelomat).

2.1. A partir d'ancestres acelomats

2.1.1. La teoria planuloide-aceleide.

Proposada per von Graf (1882) i per Metchnikoff (1883) i defensada per Hyman (1951) i Salvini-Plawen (1978), és la teoria adoptada en la gran majoria de llibres de text anglosaxons. Proposa com ancestre un organisme amb una organització semblant a la larva plànula dels cnidaris actuals però reproductivament activa. D'aquest ancestre tipus plànula derivarien la resta de diblàstics i el primer bilateral, semblant en organització a un platihelminth acel actual. A partir d'aquest acel derivarien la resta de triblàstics protostomats i deuterostomats.

2.1.2. La teoria sincítica

La formulació moderna d'aquesta teoria és deu a Hadzi (1953, 1963), i ha estat defensada per Steinböck (1963) i Hanson (1963, 1977). La base és sencilla: la semblança, més aparent que real, entre els ciliats i els acels. Així, un procés de formació de barreres celulars, o cel·lularització, en un ciliat multinucleat donaria lloc, ràpidament i fàcilment, a un acel, que serien llavors, ancestrals a tots els metazous. El problema són els radials diblàstics, que haurien perdut tant el mesoderm com la simetria bilateral, ambdues coses de difícil explicació.

2.2 A partir d'ancestres celomats

2.2.1 La teoria de la gastrea-bilaterogastrea

La influència dels treballs clàssics de Haeckel (1874, 1875), en especial la teoria recapitulatòria, ha estat força important a l'hora d'hipotetitzar sobre l'origen dels metazous i els bilaterals. Així, la blastula dels embrions actuals es podria considerar que recapitula la blastea ancestral. El mateix Haeckel va proposar que el primer metazou era una agregació, simètricament radial, de cèl·lules flagelades (com un *Volvox* actual), que donaria lloc a la gastrea. L'estadi de gastrea es recapitula en l'embriogènesi per l'estadi de gàstrula, al diferenciar-se una part externa locomotora i una part interna digestiva. D'aquesta sencilla gastrea amb dues capes embrionàries van derivar els cnidaris (diblàstics). El primer bilateral sorgiria, a partir de cnidaris antozous adults, mitjançant el tancament dels complexos septes gàstrics (mesenteris) que es transformarien en compartiments celòmics (Sedgwick 1884), mentre que els sifonoglifs donarien el tub digestiu amb boca i anus. Altrament, com va proposar Jägersten (1955, 1959), l'ancestre dels primers bilaterals seria una gastrea bentònica amb simetria bilateral ("bilaterogastrea"). En qualsevol cas, el primer bilateral (o "Urbilateria") seria ja celomat, originant el concepte d'arquicelomat (l'ancestre celomat dels bilaterals). Una conseqüència important d'aquesta hipòtesi és que tant els triblàstics acelomats com els pseudocelomats es van originar per simplificació, ja sigui per progènesi (Rieger, 1985) o per reducció de les cavitats celòmiques en l'adult (Remane i col. 1980), a partir d'ancestres celomats. Si fos així, s'hauria de trobar una explicació raonable a la pèrdua d'una estructura tant important, llevat dels casos en que la pèrdua s'ha originat per parasitisme (p. ex. en mesozous o ciclofòrs) o per miniaturització (p. ex. en arquiànèlids).

Una variació recent d'aquesta teoria és la hipòtesi de les "set-aside cells", proposada per Davidson i col (1995). Postula que la major part de les estructures i

òrgans dels bilaterals actuals derivarien de grups concrets de cèl·lules "apartades" (d'aquí el nom "set-aside") presents a organismes bilaterals microscòpics, estructuralment semblants a les actuals larves trocòfora i diplèurula. Aquestes cèl·lules, de les que s'originen els teixits i òrgans finals de l'adult, podrien haver donat lloc a l'ancestre celomat dels bilaterals.

2.2.2 La teoria de la Trochaea

Proposada per Nielsen (1985) és, de fet, una variant de la bilaterogastrea de Jägersten. Considera com ancestre un organisme amb un cicle vital bifàsic. La forma larval pelàgica trocòfora (trochaea), que apareixeria després de la gastrea, es transformaria bentònicament en els Spiralia, mentre que alhora es transformaria en larva tornaeta. Aquesta donaria lloc als deuteròstoms bentònics, mantenint-se com a larva en aquells grups amb cicle vital bifàsic (p. ex. hemicordats i equinoderms). Els triblàstics acelomats i pseudocelomats haurien aparegut per progènesis a partir d'aquestes larves ancestrals.

2.2.3. La teoria colonial de Dewel

Proposada per Dewel (2000), suggereix que el pla corporal bilateral ancestral deriva d'un pla corporal colonial diblàstic. L'associació colonial inicial va donar lloc a esponges multicel·lulades, que al mateix temps s'associarien i donarien lloc, per una banda als cnidaris i per l'altre al bilateral ancestral. L'ancestre bilateral seria segmentat, celomat i relativament complexe. De nou, els fílums acelomats i pseudocelomats haurien derivat per simplificació.

2.3 El pas d'un sol eix (O-AB) a dos eixos corporals (AP i DV)

Un dels aspectes clau del pas radial-bilateral és l'origen dels eixos anteroposterior (AP) i dorsoventral (DV) a partir d'un únic eix oral-aboral (O/AB). Així, és l'eix O/AB homòleg a l'eix AP o a l'eix DV?. I si fos homòleg al aix AP, a què és homòloga la regió Oral dels diblàstics: a la regió P o a la regió A dels bilaterals?. En principi, cap de les teories esmentades anteriorment han donat respostes convincents a aquestes qüestions clau. Tot i això, és interessant diagramar (Figura 1) les dues hipòtesis principals amb els mecanismes suggerits (tret de Holland, 2000, i de Rieger i Ladurner, 2001, substancialment modificats).

1) a la teoria planuloid-aceloid (Figura 1a), l'ancestre diblàstic (el planuloid) adopta una posició bèntica, tal com fan no poques larves plànules de cnidaris actuals amb locomoció bèntica. D'aquesta manera l'eix O/AB correspondria a l'eix PA. La regió

oral (on es forma l'entrada a la cavitat digestiva), ara en posició posterior, s'hauria de desplaçar ventralment per esdevenir la futura entrada. D'aquesta manera, l'eix DV es forma *de novo*, mentre que els eixos AP i O/AB serien homòlegs.

2) a la teoria del arquicelomat (Figura 1b), l'ancestre diblàstic serien les postulades larves gastreia de Haeckel, bilaterogastreia de Jägersten, o Trochaea de Nielsen, totes elles planctòniques i amb cavitats celomàtiques i segmentació incipients. Les esmentades larves adoptarien una disposició bèntica amb la qual cosa l'eix O/AB coincidiria amb el futur eix DV. Tot seguit, el pol apical (on hi ha els òrgans nerviosos sensorials de la larva) es desplaçarien cap a un costat de la larva, esdevenint la futura regió A. D'aquesta manera, l'eix AP seria de nova formació i els eixos DV i O/AB, homòlegs. Alhora, el tancament ventral per amfistomia (Holland, 2000; Arendt et al, 2001) generaria *ex novo* el tub digestiu de via única amb la boca i anus als extrems.

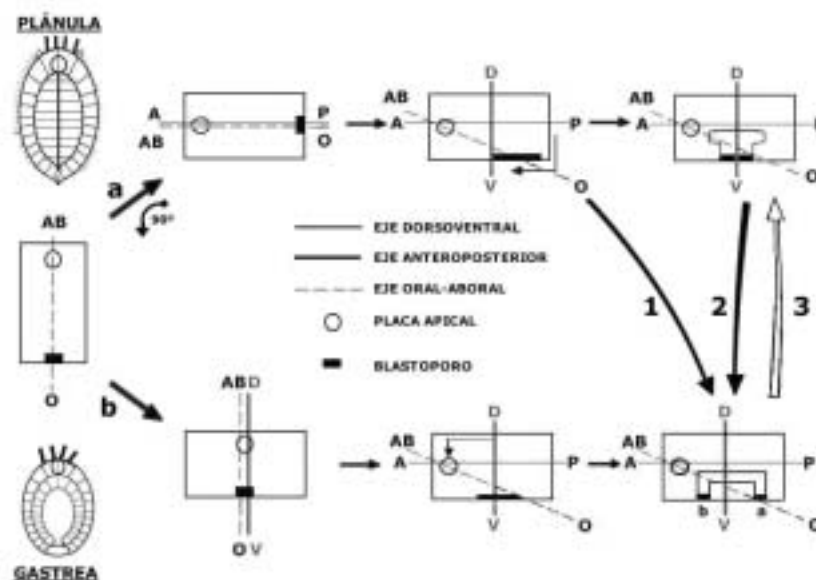


Figura 1. Esquema dels suposats canvis i correspondències axials necessaris durant la transició diblàstica-triblàstica. A la part superior (a) es representen els canvis que van tenir lloc segons la teoria planuloid-anceloid i a la part inferior (b) segons la teoria del arquicelomat. La fletxa quebrada de la part superior (a) indica el desplaçament de la regió blastoporal desde la regió posterior a una posició més ventral. La fletxa trencada de la part inferior (b) indica el moviment cap a la part anterior de la placa apical. Les fletxes 1 i 2 indiquen el pas o per tancament de la línia mitja blastoporal (1) o a partir d'un intestí cec (2) cap a un tub digestiu complet amb boca (b) i anus (a). La fletxa 3 indica el pas d'un organisme celomat, segmentat i amb intestí sencer (p. ex. Anèlids) a un organisme acelomat, no segmentat i amb intestí cec (p. ex. Plathelminths). Modificat substancialment de Rieger i Ladurner 2001 i Holland 2000.

És evident que saber com fou l'ancestre dels bilaterals (un aceloid, una larva planctònica o un arquicelomat complex) demana en primer lloc establir homologies clares entre l'eix dels diblastics i els eixos dels bilaterals. Aquesta tasca quedaria però enormement facilitada si es sabés quin grup de bilaterals actuals és el més proper als diblàstics actuals. Donades les dificultats de la morfologia i l'embriologia comparades en respondre aquesta pregunta clau, és evident que les dades moleculars poden ser un ajut inestimable.

3. L'origen dels Bilateria: dades moleculars.

Tot i que el pas de radials a bilaterals ha estat un dels problemes més estudiats de la història animal, ni la morfologia ni la embriologia comparada han arribat a un consens general sobre com va tenir lloc aquesta transició, bona prova és la varietat d'hipòtesis proposades. Cal no oblidar però, que estem parlant d'un esdeveniment que va succeir ara fa més de 550 milions d'anys, del que no hi ha pràcticament cap dada paleontològica clara. A més, tampoc no hi ha fòssils dels ancestres de molts dels fílums actuals (com ara el Platyhelminthes), degut a que la fossilització de parts tobes és difícil. El registre fòssil ens indica, això sí, la rapidesa amb que els bilaterals es van diversificar (l'explosió Càmbrica).

La morfologia i l'embriologia comparada han aportat dades importants que ajuden a comparar els diferents patrons corporals i agrupar-ne els fílums corresponents. Tot i això, aquestes dades no són prou objectives com per dilucidar completament les relacions filogenètiques entre els diversos fílums animals. Això es deu a que molts dels caràcters considerats (celoma, segmentació, estadis larvaris, ...) són d'origen probablement polifilètic, solucions convergents a problemes ambientals i biomecànics particulars, i per tant no homòlegs (Willmer 1990). L'homologia d'un caràcter ha de ser clarament establerta abans d'inferir relacions filogenètiques a partir d'aquest. És la base de la inferència filogenètica.

Disposar d'un marc filogenètic clar és imprescindible per abordar qualsevol problemàtica evolutiva. Aquesta va ser la raó per la que els filogenetistes varen aprofitar ràpidament l'arribada de la biologia molecular ara fa uns 25 anys. Les tècniques moleculars van obrir un nou món dintre de la filogènia de metazous, doncs la quantitat d'informació evolutiva que existeix dintre de les seqüències genòmiques de les espècies actuals és immens. A més a més, les dades moleculars presenten una sèrie d'avantatges respecte a les morfològiques (veure apartat Inferència filogenètica)

i ens permeten testar, de manera independent, hipòtesis previas o proposar-ne de noves.

3.1. La nova filogènia molecular dels Metazous

Entre altres molècules, la seqüència del gen 18S ribosomal, sembla la molècula ideal per fer estudis filogenètics. El 18S ribosomal és universal, amb taxes de mutació baixes i per tant força conservada. Al mateix temps, té regions amb certa o molta variabilitat, el que permet estudis tant de fenòmens evolutius recents com llunyans. El 1988, Field i col. van publicar a Science la primera filogènia inferida a partir de seqüències del gen ribosomal 18S. L'arbre contenia diversos fílums de metazous, un protista, un fong i una planta. A partir d'ací, aquest gen es va emprar per respondre multitud de qüestions evolutives que no tenien altra manera de ser abordades. Moltes es van contestar, contradient en alguns casos el que s'havia proposat en base a la morfologia o corroborant, en altres, algunes hipòtesis anteriors. En pocs anys, es va generar un gran nombre de seqüències de 18S de moltes espècies de metazous, el que va potenciar encara més aquesta molècula. A més a més aquesta informació es va fer pública i fàcilment accessible mitjançant la creació de les bases de dades tipus GenBank o EMBL. Al mateix temps, els mètodes i els programes informàtics d'inferència filogenètica a partir de dades moleculars augmentaven en rapidesa i qualitat.

Alguns dels canvis aportats per la filogènia molecular del 18S ribosomal a l'arbre dels metazous, acceptats avui en dia per molts investigadors, inclouen:

- a) la desaparició del clade Articulata, que des de Cuvier unia, en base al caràcter embriològic de segmentació de tipus teloblàstic, els artròpodes i els annèlids.
- b) els lofoforats, considerats propers als deuteròstoms, s'uneixen al gruix dels Eutrochozoa formant el nou superclade Lophotrochozoa, organismes amb larva trocòfora i/o lofòfor (Halanych i col. 1995).
- c) els asquelmints, que agrupa a la majoria dels pseudocelomats, com els nematodes, rotífers, gastrotrics, priapulids, etc., no formen un grup monofilètic ja que o bé s'agrupen amb els artròpodes (superclade Ecdysozoa, Aguinaldo i col. 1997) o bé es dispersen dintre dels Lofotrochozoa.
- d) els deuterostomats, sense els lofoforats, formen un tercer superclade monofilètic.

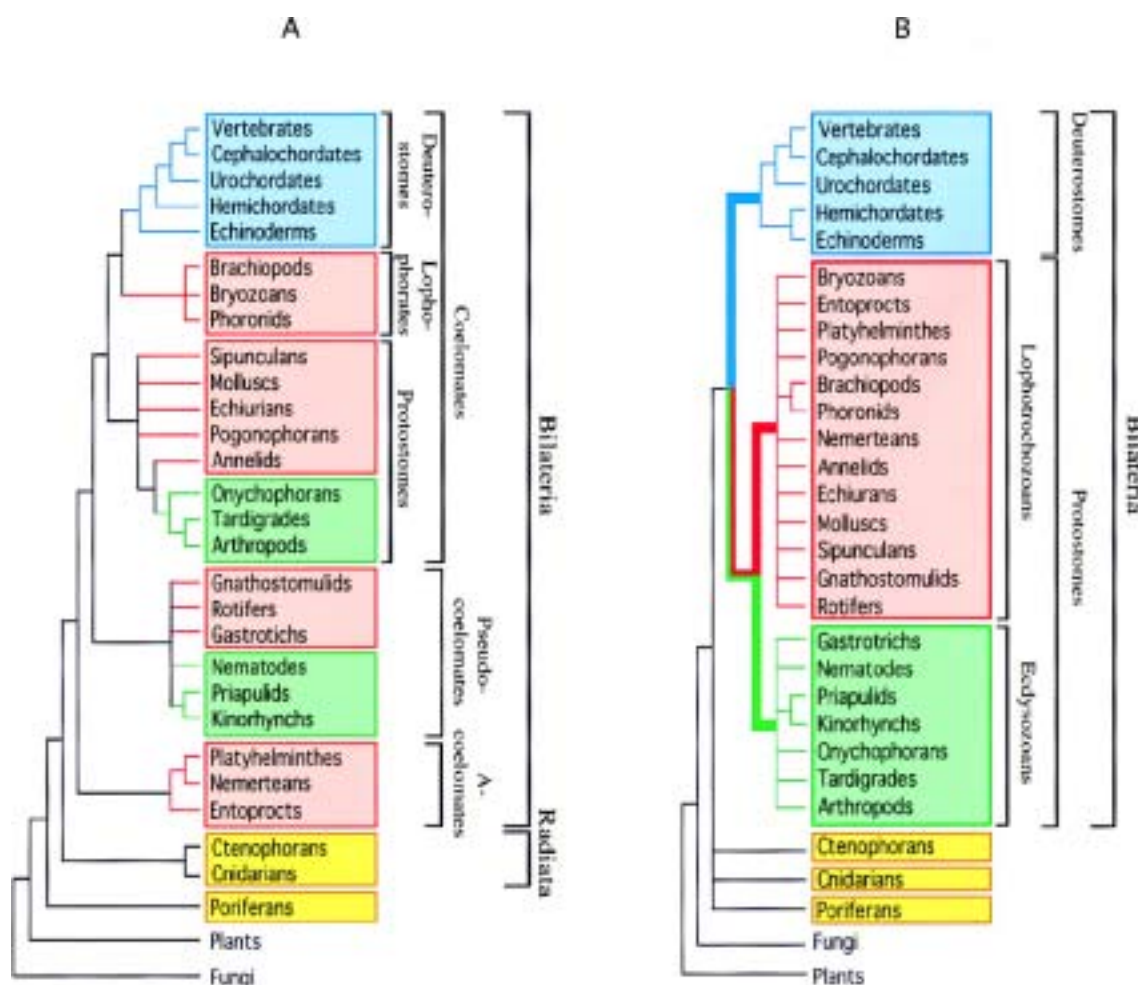


Figura 2. Arbres consensuats dels metazous pre-1995 (A) i segons alguns resultats moleculars, especialment del gen ribosomal 18S (B). És interessant ressaltar que segons B, els organismes acelomats i pseudocelomats queden ara inclosos dins d'algun dels tres superclades que formen els Bilateria (Deuterostomia, Lophotrochozoa i Ecdysozoa). Particularment il·lustratiu és el canvi dels Platyhelminthes, Nemertins i Nemàtodes. Adaptat de Adoutte i col. 2000.

Les conseqüències principals d'aquests estudis foren: 1) els Bilateria es divideixen en tres superclades, Lophotrochozoa, Ecdysozoa i Deuterostomia; 2) acelomats i pseudocelomats són grups distribuïts o a la base o en posicions més derivades dins dels Ecdysozoa o dels Lophotrochozoa; i 3) els Platyhelminthes, considerats bilaterals basals en bastantes hipòtesis filogenètiques, són en realitat lophotrocozous (Carranza i col. 1997; Aguinaldo i col. 1997; Balavoine 1997; Halanych i Passamaneck 2001).

La figura 2 resumeix la filogènia dels Metazous abans i després de les dades moleculars. El superclade Deuterostomia, clarament monofilètic, inclou els filums

Chordata, Urochordata, Hemichordata i Echinodermata. Els lofoforats, prèviament considerats deuteròstoms, queden ara exclosos d'aquest clade.

El superclade Ecdysozoa (Aguinaldo et al. 1997), que agrupa els protòstoms amb muda (raó per la qual també es coneixen amb el nom de "*the moulting clade*"), es divideix en Panarthropoda, que inclou els fílums Arthropoda i els artropodians Onychophora i Tardigrada, i els grups asquelmints Nematoda, Nematomorpha, Priapulida i Kinorhyncha. Aquest controvertit clade ha estat corroborat, recentment, amb dades moleculars independents, com són les dades dels gens Hox (de Rosa i col. 1999, tot i que atenció a Telford 2000), i les basades en una sinapomorfia molecular trobada en el gen que codifica la B-Thymosina compartida per artropòdes i nemàtodes (Manuel i col. 2000).

El superclade Lophotrochozoa (Halanych et al. 1995) és de lluny el més discutit, al incloure una gran diversitat de fílums, amb relacions interfilètiques molt incertes. Inclou fílums celomats com Mollusca, Annelida, Nemertea, Sipunculida, Echiura, Pogonophora, i els lofoforats (Bryozoa, Brachiopoda i Phoronida), junt a pseudocelomats com Rotifera i Gastrotricha i als acelomats Platyhelminthes i Gnathostomulida.

Qué deduir d'aquest marc filogenètic respecte a l'origen dels bilaterals? El fet que els organismes acelomats i pseudocelomats quedin agrupats dins d'un o altre dels tres superclades, i entre ells, especialment els Platyhelminthes, morfològicament molt senzills i considerats ancestrals per alguns zoòlegs, reforça la idea que el bilateral ancestral seria celomat i relativament complex (de Rosa i col. 1999; Adoutte i col. 1999, 2000; Holland 1998; Arendt i col. 2001). A partir d'aquest ancestre s'haurien originat els ancestres de cada un dels tres superclades, donant-se tres radiacions paral·leles (Balavoine i Adoutte 1998). Sota aquest nou escenari evolutiu, la teoria de l'arquicelomat guanyaria pes, i els organismes pseudocelomats i acelomats no serien ancestrals als celomats sinó derivats per simplificació a partir d'aquests.

4. La problemàtica dels Platyhelminthes i dels Acoelomorpha

El fílum Platyhelminthes, inclou una gran diversitat (unes 15-25.000 espècies) de cucs de vida lliure i paràsits, i ha estat gairebé sempre considerat un grup clau en l'origen i radiació dels Bilateria. La posició basal que ha gaudit, durant anys, a la majoria de textos de zoologia, s'ha vist recentment modificada pels resultats derivats del 18S ribosomal. A més a més, la seva monofília havia estat questionada temps ençà, degut a la manca d'autopomorfies morfològiques clares (Smith i col. 1986,

Brusca i Brusca 1990, Rieger i col. 1991, Haszprunar 1996) i també en base a algunes dades moleculars (Carranza i col. 1997, Carranza 1997).

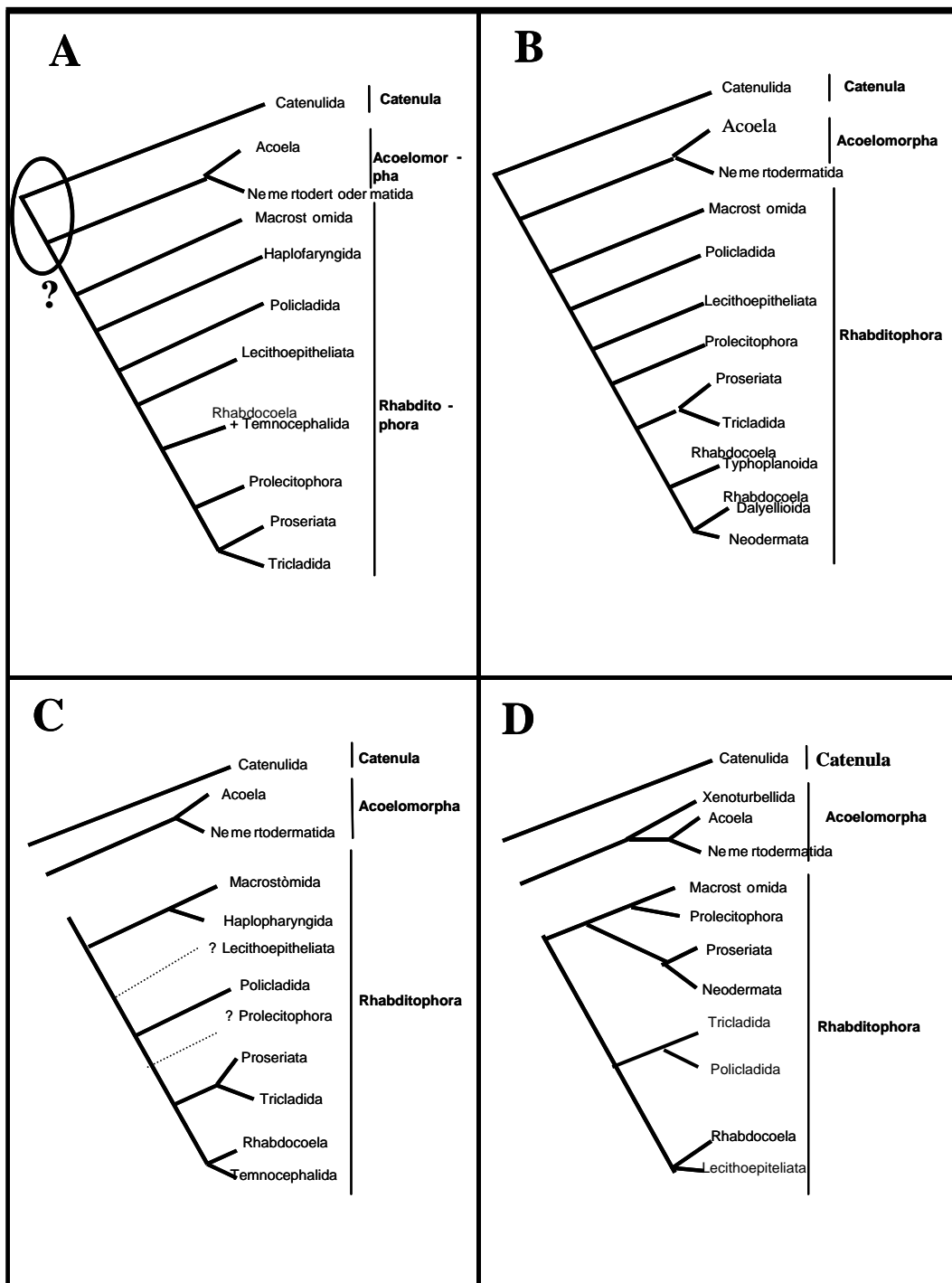


Figura. 3 Filogènies internes dels platihelminths segons: A, Karling (1974); B, Ehlers (1985), Ax (1996); C, Smith i col. (1986); D, Rohde (1990). A i B són teories monofilètiques, i C i D són polifilètiques. L'interrogant a l'esquema A representa que tant els catenulats com els acelomorfs podrien ser el grup més primitiu de platihelminths. Els interrogants a C indiquen posicions filogenètiques incertes. Les línies puntejades indiquen afinitats incertes entre diferents grups.

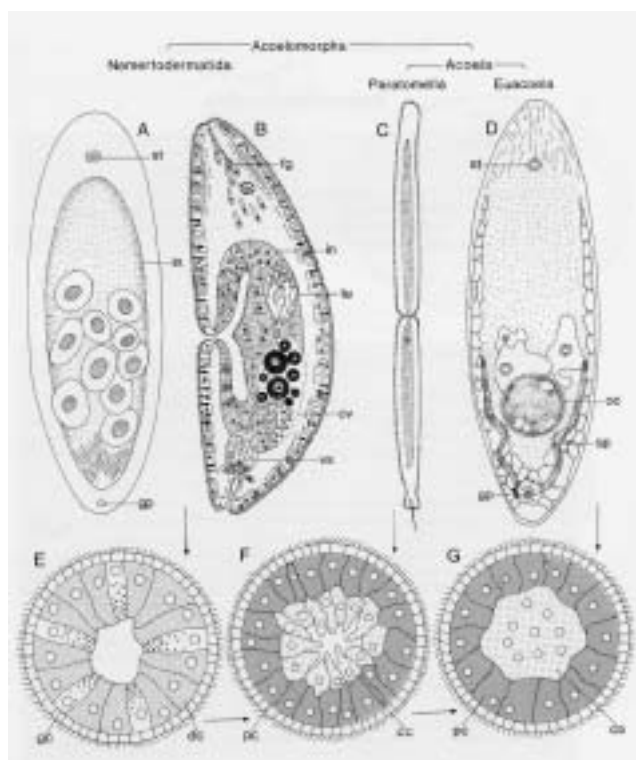


Figura 4. Esquemes de la morfologia externa, interna i de l'estructura de l'aparell digestiu (tall transversal) del nemertodermàtid *Nemertoderma* (A, B i E), de l'acel *Paratomella* (C i F) i de l'acel *Mecynostomum* (D i G).

4.1. Les dades morfològiques

Si hom compara els diversos esquemes proposats sobre filogènia dels platihelminths (Karling 1974; Ehlers 1985; Rohde 1990; Ax 1996), es reconeixen tres grups monofilètics clars (figura 3).

Un primer grup són els catenulats, basals a tots els Platyhelminthes. Un segon grup el formen els Acoelomorpha (Ehlers 1985) que inclou els ordres dels acels i dels nemertodermàtides (figura 4). Finalment, un grup molt més ampli que inclou tots els altres ordres de turbellaris més els ordres paràsits (Rhabditophora, Ehlers 1985). La qüestió és si aquests tres grups estan relacionats entre sí, i, si ho estan, quines són les seves relacions.

Des d'un punt de vista morfològic els dubtes sobre la monofília dels Platyhelminthes deriven de la feblesa de les sinapomorfies proposades per al grup: protonefridis biciliats, multiciliació de l'epidermis, i manca de mitosi a les cèl·lules somàtiques. Els arguments en contra, exposats per Smith i col. (1986) i Haszprunar (1996), es poden resumir en:

- 1) el pas d'una epidermis poc ciliada (catenulats) a l'epidermis multiciliada (acelomorfs i rabditòfors) no és una homologia clara, ja que ha tingut lloc independentment moltes vegades al llarg de la evolució dels metazous.
- 2) el protonefridi dels catenulats, considerat plesiomorfic dins dels platihelminths, és molt probablement una autopomorfia dels catenulats. Tot i que els acelomorfs no tenen protonefridis, aquest estat podria ser ancestral dins els platihelminths.
- 3) la homologia dels òrgans glandulars frontals d'acelomorfs i rabditòfors no és tampoc acceptable. Estructures similars es troben a d'altres organismes, com nemertins, poliquets progenètics (Rieger 1980), i larves de briozous d'aigua dolça (Sensenbaugh i Franzén 1998).

En resum, tot i els acurats estudis duts a terme per nombrosos investigadors, no hi ha cap sinapomorfia que uneixi als diferents grups de Platyhelminthes. Això suggereix que els Platyhelminthes podrien ser polifilètics.

D'altra banda, les sinapomorfies que uneixen els ordres Acoela i Nemertodermatida, formant el grup Acoelomorpha, són més consistents (Ax, 1996):

- 1) estructura complexa de les arrels ciliars (figura 5).
- 2) discontinuïtat terminal dels cilis epidèrmics (figura 5).
- 3) absència de protonefridis.
- 4) reducció (nemertodermàtides) o absència (acels) de la matriu extracel·lular.

Els Acels presenten a més un clivellament especial, regulatiu i espiral en duets (Henry i col. 2000). Aquest clivellament és prou diferent del típic clivellament determinatiu i espiral en quartets de la resta de Platihelminths i dels Spiralia com per considerar-ne orígens diferents. Malauradament, no hi ha informació publicada sobre el tipus de clivellament dels Nemertodermatida, tot i que anàlisis preliminars semblen apuntar cap a un clivellament en duet (U. Jondelius, comunicació personal).

Segons Haszprunar (1996), el conjunt d'aquestes característiques i d'altres, dels Acoelomorpha, podrien ser plesiomorfiques dins dels Bilateria. D'ací que proposés els Acoelomorpha, seguit dels Rhabditophora + Catenulida com a grup basals dins dels bilaterals. Sota aquest prisma, els Platyhelminthes serien parafilètics amb els Acoelomorpha basals.

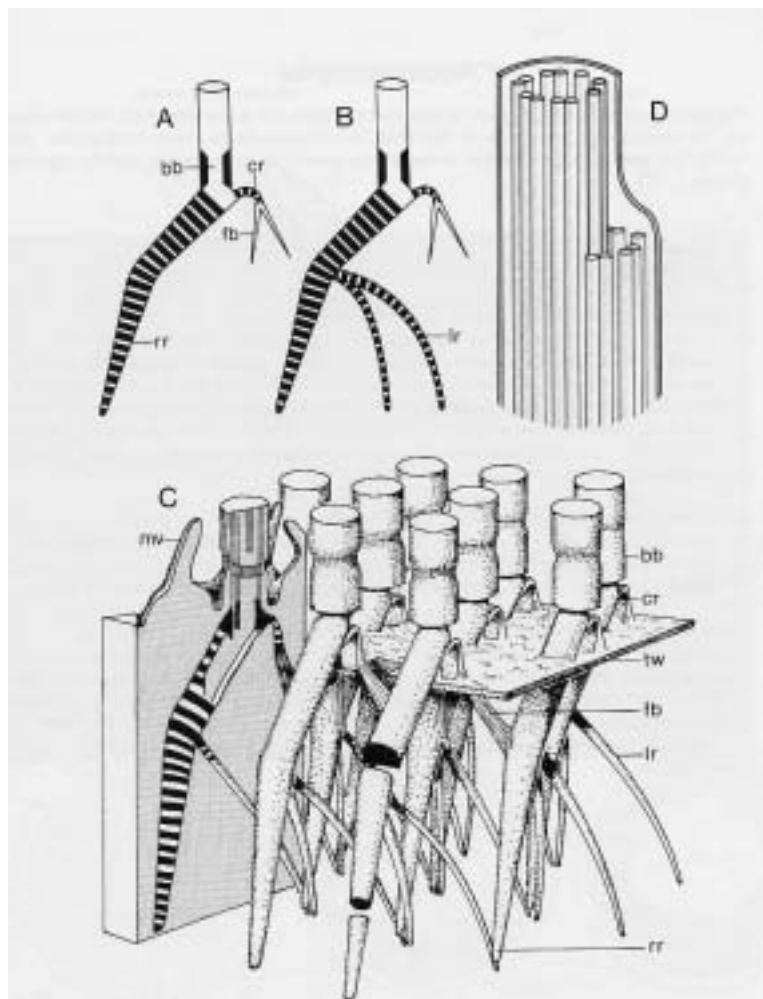


Figura 5. Esquema de la ultraestructura dels cilis epidèrmics dels Acoelomorpha. A i B mostren l'estructura de l'arrel ciliar en nemertodermatides (A) i acels (B). A (C) es representa el complex ciliar i les connexions interciliars. D representa la discontinuïtat a la regió distal dels cilis típica dels Acoelomorpha. Extret de Ax (1996).

4.2. Dades moleculars i comportament *fast-clock* dels acels.

La primera anàlisi a fons, a nivell molecular, del fílum Platyhelminthes, va ser publicada per Carranza i col. (1997). Els resultats mostraren els Plathelminths polifilètics. Els Rhabditophora queien dins el superclade Lophotrochozoa, els Catenulida en una posició fluctuant entre grup germà de la resta de bilaterals o com a grup basal dels Rhabditophora, i els Acoelomorpha polifilètics: Acoela com a grup germà dels bilaterals, i Nemertodermatida com a un grup de Rhabditophora.

Segons Carranza i col. (1997), les seqüències del gen 18S ribosomal dels dos acels seqüenciats eren extremadament variables respecte a la de la resta de metazous. Això feia difícil alinear-los amb la resta de taxons. Els acels eren, doncs, organismes *fast-clock* per aquest gen. Quan en una anàlisi d'inferència filogenètica a partir de dades moleculars hi ha branques més llargues, producte de taxons *fast-clock*, aquestes tenen un comportament especial: s'atrauen entre sí, i es col·loquen en una posició basal, just després del grup extern (veure apartat 5, inferència filogenètica, i figura 6). Que això era el que pasava amb els acels es deduia de la

llargada de les branques, molt més llargues que la resta, i del fet que el grup germà teòric, els nemertodermàtides, quedàven, amb una branca curta, dins dels rabditòfors.

En qualsevol cas, el problema de LBA no era nou; un cas paradigmàtic eren els nemàtodes (Winnepenninckx i col. 1995), que quedaven com a grup germans dels bilaterals amb branques molt llargues. La solució a la posició incerta dels nemàtodes la donà Aguinaldo i col. (1997). Aquests autors van seqüenciar una col·lecció de nemàtodes fins trobar-ne un amb taxes de substitució més semblants a la resta de taxons (no eren *fast-clock*). A l'utilitzar aquesta espècie en l'inferència filogenètica, els nematodes no apareixien més com a grup germà dels bilaterals, sino com a grup germà dels artròpodes, formant un nou superfílum anomenat Ecdysozoa. A més a més, l'ús de metodologies menys sensibles als problemes de LBA, o seqüenciar gens diferents al 18S ribosomal, ajudaren a posicionar tàxons amb problemes de LBA. En concret, els mesozous és varen assignar recentment als lofotrocozous al seqüenciar les regions flanquejants d'un gen central del cluster Hox (Kobayashi i col. 1999, però veure revisió crítica per Telford 2000).

5. Inferència Filogenètica a partir de dades moleculars

La idea bàsica de la filogènia molecular és el concepte del "rellotge molecular", és a dir, que els canvis de nucleòtids s'acumulen d'una manera constant en el temps. Així, al disposar de les seqüències d'un gen donat de varies espècies, les seves diferències aporten, teòricament, informació del temps que ha passat des que aquestes varen tenir un ancestre comú. D'aquesta manera es poden inferir relacions ancestre-descendent per les distàncies genètiques entre els taxons estudiats. Avui en dia, el "rellotge molecular", tot i haver-se comprovat que no és real (Ayala i col. 1998, Conway-Morris, 2000), és encara present en algunes metodologies d'inferència filogenètica.

5.1. La filogènia molecular. Avantatges i inconvenients.

Les dades moleculars presenten una serie d'avantatges respecte a les morfològiques : 1) les diferències entre grups són més fàcilment quantificables, i per tant més objectives (homologia més clara), 2) aquestes diferències es poden quantificar fins i tot entre espècies o fílums molt llunyans, la qual cosa és molt difícil de fer amb els caràcters morfològics, 3) es poden seleccionar una o més molècules adequades a la pregunta formulada, per exemple segons la taxa de substitució, 4) la

metodologia es molt més reproduïble, i 5) és poden obtenir àcids nucleics a partir de petites mostres de teixit.

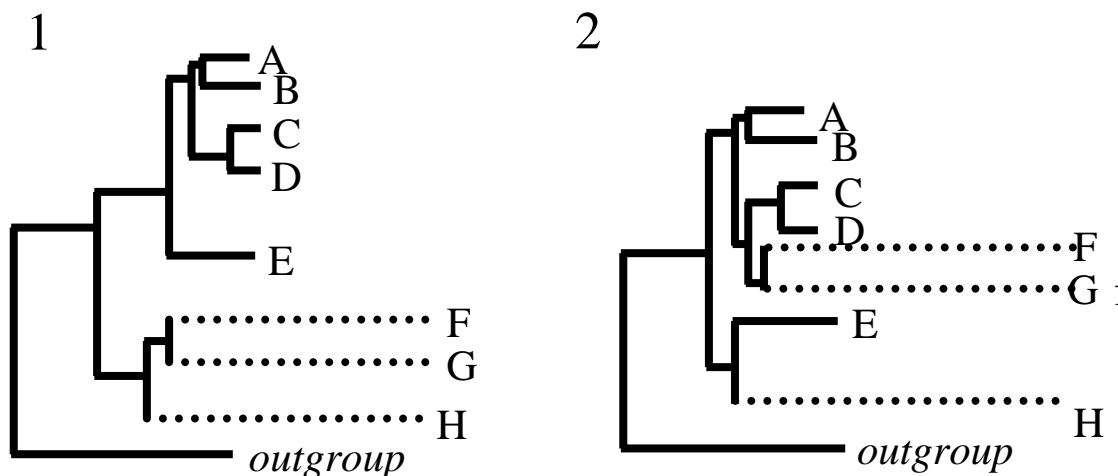


Figura 6. Efecte de les branques llargues (*long-branch attraction, LBA*) a l'inferir filogènies. Les branques llargues (F, G, H) tendeixen a unir-se i col·locar-se en una posició basal, just després de l'*outgroup*, donant la topologia 1. La topologia real és la 2.

També hi ha inconvenients metodològics a l'obtenir i tractar dades moleculars (veure revisió a Maley i Marshall 1998). La majoria estan causats pel fet que, en el cas de les dades nucleotídiques, només disposem de quatre estats diferents per comparar (A, C, T i G), el que pot crear problemes greus d'homoplàsia: la presència d'una mateixa base a dues espècies per atzar i no per descendència a partir d'un mateix ancestre. Un altre inconvenient és el problema de saturació de les dades. Si un gen ha variat tant com per esborrar el senyal dels canvis succeïts en comparar dues espècies, observariem un sol nucleòtid de diferència (per exemple A versus T) quan de fet en serien dos o més (ja que, per exemple, la T podria haver estat una C prèviament). D'aquesta manera, com només disposem de les seqüències actuals i no de les transitòries, hi haurà canvis que no detectarem. Aquest problema, en general, s'agreuja contra més llunyanes són les espècies que volem comparar. En qualsevol cas, hi ha mètodes per detectar aquest fet, de manera que abans d'inferir la filogènia podem tenir una idea de si el nostre gen és addient per respondre la nostra pregunta. Un tercer problema són els taxons *fast-clock*, taxons amb taxes de substitució més altes que la resta. Aquests apareixen en l'arbre amb branques molt més llargues, i tendeixen a ajuntar-se entre elles i col·locar-se en una posició basal totalment artefactual. És el que s'anomena *Long-branch attraction, LBA* (veure descripció a Felsenstein 1978; i revisions a Huelsenbeck 1997, i a Maley i Marshall 1998). Finalment, diferents posicions d'una molècula tenen taxes de substitució diferents (es

el que s'anomena *among-site rate variation*, veure Yang 1996). Avui en dia, però, es disposa de les eines estadístiques addients per detectar i solventar aquest efecte.

En resum, les dades moleculars no són ni millors ni pitjors que les morfològiques. Les dues són, i haurien de ser, plenament compatibles i complementàries. Això sí, el fet que les topologies aconseguides a partir de dades moleculars no estiguin directament relacionades amb les aconseguides a partir de dades morfològiques o embrionàries, les fan molt útils per, d'una manera totalment independent, testar hipòtesis previes o per proposar-ne de noves.

5.2. Inferència filogenètica

La reconstrucció filogenètica a partir de dades moleculars s'ha de realitzar amb molta cura. Els programes i els mètodes d'inferència filogenètica a l'abast són molt diversos i el sistemàtic molecular pot perdre's entre una oferta tan gran i variada. Cal saber primer quina és la pregunta a respondre i quins mitjans cal emprar per respondre-la. Així, els passos a seguir en una anàlisi filogenètica serien: a) disseny del mostreig taxonòmic, b) aliniament, c) anàlisi previa de les dades, d) inferència filogenètica i e) suport per els nodes.

a) Disseny del mostreig taxonòmic.

Ha de ser el més gran i amb el màxim de diversitat possible (veure Maley i Marshall 1998), escollint molt acuradament el grup extern (*l'outgroup*) més proper. Un *outgroup* proper permet una millor inferència al haver-hi caràcters històricament semblants compartits per *l'outgroup* i els *ingroup*, caràcters que llavors es consideren plesiomòrfics (Wheeler, 1990). Amb un *outgroup* llunyà els caràcters compartits entre aquests i els *ingroup* poden basar-se en l'atzar i no en la història evolutiva. Si, a més a més, inclouem un mostreig gran d'*outgroups*, els resultats encara seran més estables (Nixon i Carpenter 1994).

b) Aliniament.

Amb les seqüències obtingudes s'identifiquen les posicions homòlogues, mitjançant l'estructura secundària, en el cas dels ribosomals, o mitjançant una acurada aliniació dels aminoàcids en els gens codificants (veure Morrison i Ellis, 1997 i Goldman 1998, revisant l'importància de l'aliniament). Es seleccionen només les posicions clarament homòlogues, evitant totes aquelles posicions dubtoses.

c) Anàlisi previ de les dades.

És un punt clau, ja que aporta informació de com són i com es comporten les dades. S'analitzen, entre d'altres coses: 1) el grau de saturació, comparant els canvis observats amb els canvis reals, segons un model evolutiu; 2) la informació filogenètica continguda a la molècula, que es pot testar mitjançant un anàlisi en quartets (taxons de quatre en quatre) que et mostra el nombre de quartets completament definits segons el model evolutiu (Strimmer i von Haeseler, 1997); 3) la composició nucleotídica o aminoacídica dels diferents taxons, que idealment hauria de ser homogènia entre tots ells, ja que tots seran tractats sota el mateix model evolutiu (Strimmer i von Haeseler, 1996); i 4) les taxes de substitució, mitjançant un *relative rate test*, RRT (Wilson i col. 1977, Li i Tanimura 1987), que permet saber si hi ha espècies amb una taxa estadísticament superior o inferior a la resta. És la manera de detectar els possibles organismes *fast-clock* a les dades.

d) Inferència filogenètica.

Tot i haver-hi diverses "filosofies", totes tenen com a objectiu obtenir la millor estima d'una història evolutiva determinada (la real), basant-se en les dades moleculars de que es disposa. Entre els mètodes (o "filosofies") per inferir filogènia, quatre són els més utilitzats pels sistemàtics moleculars (veure revisions a Steel i Penny 2000, i Whelan i col. 2001):

-Neighbor-joining. És un mètode algorítmic basat en el supòsit que la distància entre dos taxons, entesa com a mesura de la seva dissimilitud, es relaciona directament amb la seva relació filogenètica (Saitou i Nei 1987). Les distàncies genètiques, però, són corregides per tenir en compte els possibles canvis superimposats (diversos canvis produïts sobre una mateixa posició). Així la matriu de caràcters es transforma en una matriu de distàncies (corregides) que representa el grau de dissimilitud entre els diferents taxons. A partir d'aquesta matriu de distàncies es construeix un arbre inicial en forma d'estel. L'arbre s'anirà, llavors, construint a mesura que s'uneixen els nodes amb les distàncies més curtes. La seva rapidesa el fa ser molt emprat, tot i les crítiques de que es depenen de l'ordre del taxons (Farris i col. 1996), que només mostra un únic arbre, i que utilitza models evolutius (Carpenter 1992).

-Màxima parsimònia. Un dels mètodes basats en criteris d'optimització. En el cas de la parsimònia aquest criteri és molt simple. Utilitza directament els caràcters i els seus estats sense cap transformació, preferint les hipòtesis senzilles a les

complexes. És a dir, selecciona els arbres amb el menor nombre de passos evolutius, minimitzant així l'homoplàsia. Aquesta senzillesa i l'absència de model evolutiu són les avantatges esgrimides pels defensors de la parsimònia (Farris 1983). Però és justament aquesta absència de model evolutiu la crítica més gran, ja que contra més divergents són les seqüències, més gran el grau d'homoplàsia, i si aquesta no es corregeix la *màxima parsimònia* falla en recuperar el veritable arbre. També l'absència d'un model evolutiu, i el fet de no poder treballar amb una "gamma distribution" que tingui en compte l'*among-site rate variation* (Yang 1996), per exemple, són limitacions que provoquen que sigui el mètode més sensible al problema de *long-brach attraction* (Felsenstein 1978).

-Màxima versemblança. Es basa també en un criteri d'optimització. En aquest cas s'escolleix l'arbre que, en base a un determinat model evolutiu, faci més probables les dades observades. Aquest mètode té el problema que es computacionalment molt costós. Però, és un dels mètodes més robusts, degut a la possibilitat d'utilitzar complexos models evolutius, incloent l'estima dels paràmetres dels models a partir de les dades (com la *gamma distribution* per tenir en compte variacions en les taxes de substitució entre posicions- *among-site rate variation*). És el mètode menys afectat per errors de mostreig (Swofford i col. 1996) o per la presència d'organismes *fast-clock* (Huelsenbeck 1997).

Una variant de la màxima versemblança és l'inferència mitjançant *quartet puzzling* (Strimmer i von Haeseler, 1996), que construeix l'arbre analitzant els taxons de quatre en quatre, assignant automàticament a cada branca un valor de suport (anomenat també *quartet puzzling*) semblant al *bootstrap*.

-Inferència Bayesiana. És el més recent dels quatre mètodes. Es basa en la noció de probabilitats posteriors: probabilitats que són estimades, basant-se en algun model, després d'haver après quelcom sobre les dades (Huelsenbeck & Bollback, 2001; Huelsenbeck i col, 2001). La "filosofia" és lleugerament semblant a la *màxima versemblança*, busca l'arbre que maximitza la probabilitat (en aquest cas posterior) de l'arbre donades les dades i el model evolutiu. És ràpid i aporta mesures probabilístiques de la robustesa de l'arbre que són fàcilment comparables a les mesures de l'estadística tradicional.

e) Suport per a l'arbre obtingut.

Hi ha diversos mètodes per obtenir una estima estadística del suport per a cada branca o bé de quan "millor" és una topologia obtinguda respecte a un altre, testant així la seva fiabilitat.

-**Bootstrap.** Es basa en generar un nombre elevat de pseudorèpliques de la matriu original i analitzar-les utilitzant qualsevol dels mètodes de reconstrucció filogenètica. Les pseudorèpliques s'obtenen mitjançant el remostreig a l'atzar amb repitició de les columnes de la matriu original per a obtenir una nova matriu del mateix tamany que l'original (Felsenstein 1985). El resultat final (el valor de *bootstrap*) és el valor del nombre de vegades que una branca determinada s'ha obtingut en el total de rèpliques. Es considera que un valor superior al 75% indica un bon suport estadístic per aquell nodus.

-**Comparació de topologies alternatives.** Una vegada obtingut l'arbre, hi ha la possibilitat, sigui mitjançant el criteri de *màxima versemblança* o de *màxima parsimònia*, de testar estadísticament topologies alternatives. Els testos més utilitzats, són: 1) el test de Kishino-Hasegawa (Kishino i Hasegawa 1989), paramètric, i el test de Shimodaira-Hasegawa (Shimodaira i Hasegawa 1999), no-paramètric, per anàlisis de *màxima versemblança*; i 2) Kishino-Hasegawa, paramètric, i Templeton i el winning-site test, com a no-paramètrics, per anàlisis de *màxima parsimònia*.

6. Aproximacions moleculars al problema dels Acoelomorpha i a la seva posició dins dels Bilateria

La polifilia dels Platyhelminthes i dels Acoelomorpha, i el comportament *fast-clock* dels acels seqüenciats fins aleshores, demanaven noves estratègies per corroborar-ho o refutar-ho. Les estratègies més addients eren tres: 1) seqüenciar el gen ribosomal 18S de noves espècies d'acels, 2) buscar nous gens filogenèticament informatius a aquest nivell, i 3) buscar sinapomorfies moleculars, com ara nombre i tipus de gens Hox, absència o presència de zones indels, i l'ordre dels gens al genoma mitocondrial.

6.1. El gen ribosomal 18S

El 18S o SSU rRNA, d'uns 1800 nucleòtids, és el gen nuclear que codifica el rRNA de la subunitat petita del ribosoma en els eucariotes (homòleg del 16S dels procariontes i del 12S del genoma mitocondrial). Aquest rRNA es combina amb proteïnes ribosomals i amb el rRNA de la subunitat gran (28S) per formar els

ribosomes, els orgànuls cel·lulars que s'encarreguen de dirigir la síntesi de proteïnes a partir de l'RNA missatger.

Hem comentat ja les grans avantatges del 18S. A més a més, el gran nombre de seqüències fetes fins a la data permet disposar de dades de gairebé tots els filums animals actuals, la qual cosa contribueix a fer una anàlisi més exhaustiva de l'arbre dels metazous i, per tant, una filogènia més completa. L'estratègia hauria de ser semblant a l'emprada per Aguinaldo i col. (1997) amb els nemàtodes: seqüenciar el màxim d'espècies d'acels, amb la màxima diversitat morfològica possible, i inferir l'arbre utilitzant només l'espècie o espècies que no fossin *fast-clock*.

6.2. La cerca de nous gens

Tot i que el gen ribosomal 18S ha estat fins ara, filogenèticament parlant, la millor molècula; n'hi ha d'altres útils a diferents nivells, com ara el gen ribosomal 28S (Medina i col. 2001, Mallat i col. 2002), el factor d'elongació alfa-2 (Regier i Shultz 2001), i algunes proteïnes mitocondrials (Boore i Staton 2002). Ara bé, trobar una molècula prou conservada amb posicions clarament homòlogues en grups molt llunyans i, al mateix temps, prou divergent com per tenir informació filogenètica al nivell que ens interessa (inter-fílum) és una tasca difícil, però no impossible. Com a exemple recent d'una promesa fracassada hi ha el factor d'elongació 1-alfa utilitzat per inferir relacions llunyanes i, més en particular, per rebutjar la posició basal dels acels (Berney i col. 2000). Tal i com demostràren Littlewood i col (2001), els resultats de Berney i col. eren inconsistents i totalment irreproduïbles, degut a la manca d'informació filogenètica al nivell en que es va emprar i a l'ús incorrecte dels aliniaments.

D'entre les possibles molècules que semblen tenir els requisits necessaris hi ha les miosines, histones, citokinines, etc. Les miosines són una gran família de proteïnes mecanoquímiques involucrades en activitats tan diverses como citoquinesis, contracció muscular i mobilitat dels orgànuls cel·lulars. Es troben en fongs, plantes i animals i contenen una o dues cadenes pesants i una o més de lleugeres. Les cadenes pesants contenen un cap globular, que és el domini catalític, seguit per un coll, i per una cua o extrem carboxiterminal en forma d'hèlix- α . La classe II és la convencional, entenent per això la que consta de dos caps i una cua. Les cues mostren una divergència molt gran a nivell d'aminoàcids, però les regions del cap tenen un elevat grau d'identitat aminoacídica, fins i tot entre espècies filogenèticament allunyades. És aquesta seqüència del cap la que s'ha mostrat filogenèticament interessant, al contenir

informació evolutiva a nivell de fílums (Goodson i Spudich 1993; Korn 2000; i Cebrià 2000).

6.3. La cerca de sinapomorfies moleculars

A part de les dades nucleotídiques o aminoacídiques, el genoma forneix dades moleculars qualitatives, com ara: 1) les zones compartides d'inserció-delecció (indels) amb alguna informació evolutiva; 2) el número i el tipus de gens Hox (de Rosa i col. 1999, Kobayashi i col. 1999, Saló i col. 2001, però veure Telford 2000 per una revisió crítica); 3) la variació en el codi genètic (Telford i col. 2000); i 4) l'ordre dels gens en el genoma mitocondrial (veure Boore i Brown 1998 per una revisió) . En aquest darrer cas, una sinapomorfia en l'ordre dels gens mitocondrials va confirmar l'unió entre hexàpodes i crustacis (Boore i col. 1995, Boore i col. 1998, veure figura 7), proposar l'unió de miriàpodes amb quelicerats (Hwang i col. 2001) o discernir la filogènia interna dels equinoderms (Smith i col. 1993).

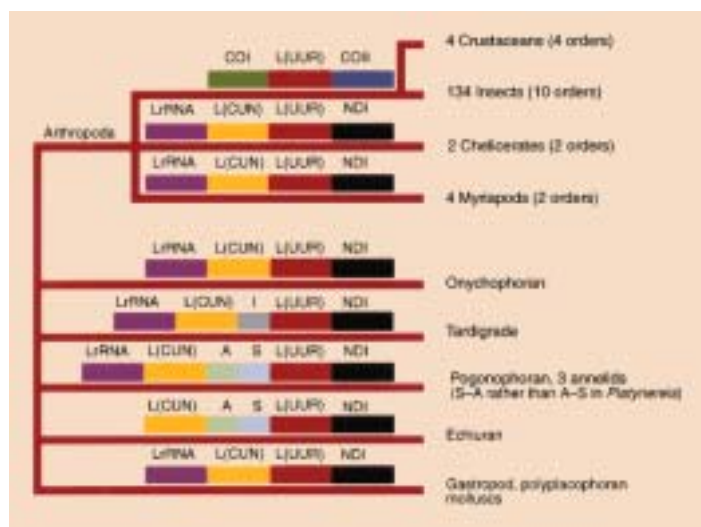


Figura 7. Esquema de la sinapomorfia molecular compartida entre crustacis e insectes, basada en l'ordre dels gens mitocondrials. Crustacis i insectes comparteixen la posició del *tRNA(Leucina)*, que es troba entre el gen *cox1* i el gen *cox2*. Quelicerats i miriàpodes el tenen entre els gens *rrnL* i el gen *nd1*. Tret de Boore i col. (1998).

6.4. El genoma mitocondrial

El genoma mitocondrial dels metazous és circular, té una llargada d'unes 15 kilobases i conté 37 gens (excepte en nemàtodes i platihelminths paràsits, que han perdut el gen *atp8*, fig. 8):

-2 gens ribosomals (el gen de la subunitat petita o 12S, *rrnS*; i el de la subunitat gran o 16S, *rrnL*).

era l'ordenació canònica dels diblàstics. Manca, per tant, un ordenament de referència (un *outgroup*) per polaritzar els canvis posteriors dintre dels bilaterals.

En qualsevol cas, el nombre de genomes mitocondrials publicats augmenta dia a dia, incrementant el nostre coneixement sobre els diferents reordenaments existents en diversos metazous. Alhora, aquest augment d'informació de genomes mitocondrials de metazous permet tenir una millor idea de com es produeixen aquests reordenaments, i el seu mecanisme subjacent, el que a la llarga resultarà en una millor interpretació d'aquestes dades.

De lo exposat fins ara, en aquesta Tesi Doctoral ens plantejem els següents objectius:

1. Saber si els Platyhelminthes són monofilètics, parafilètics o polifilètics.
2. Resoldre la posició d'acels i nemertodermàtides dins els metazous bilaterals, és a dir, discernir entre les següents hipòtesis:
 - a. Ambdós grups pertanyen al fílum Platyhelminthes.
 - b. Els Acoela són bilaterals basals i els Nemertodermatida són Platyhelminthes.
 - c. Els Nemertodermatida són bilaterals basals i els Acoela són Platyhelminthes.
 - d. Ambdós són grups de bilaterals basals.
3. Esbrinar quin és el grup de bilaterals actuals més proper a l'ancestre dels bilaterals i així discernir entre les hipòtesis proposades per l'origen dels Bilateria (ancestre celomat o acelomat, complexe o simple?).

Per respondre aquestes preguntes, hem emprat les següents estratègies:

- a. Obtenir noves seqüències del gen ribosomal 18S tan d'acels com de nemertodermàtides.
- b. Iniciar una aproximació multigènica a la filogènia dels bilaterals mitjançant la cerca de nous gens codificants amb informació filogenètica a nivell suprafilètic.
- c. Generar les primeres dades dels genomes mitocondrials d'acels, nemertodermàtides i rhabditòfors.

Dels resultats obtinguts esperem, a més:

4. Evaluar la capacitat resolutiva de les noves metodologies emprades.
5. Generar una hipòtesi filogenètica, morfològica i molecularment congruent, sobre l'origen dels Metazous bilaterals.