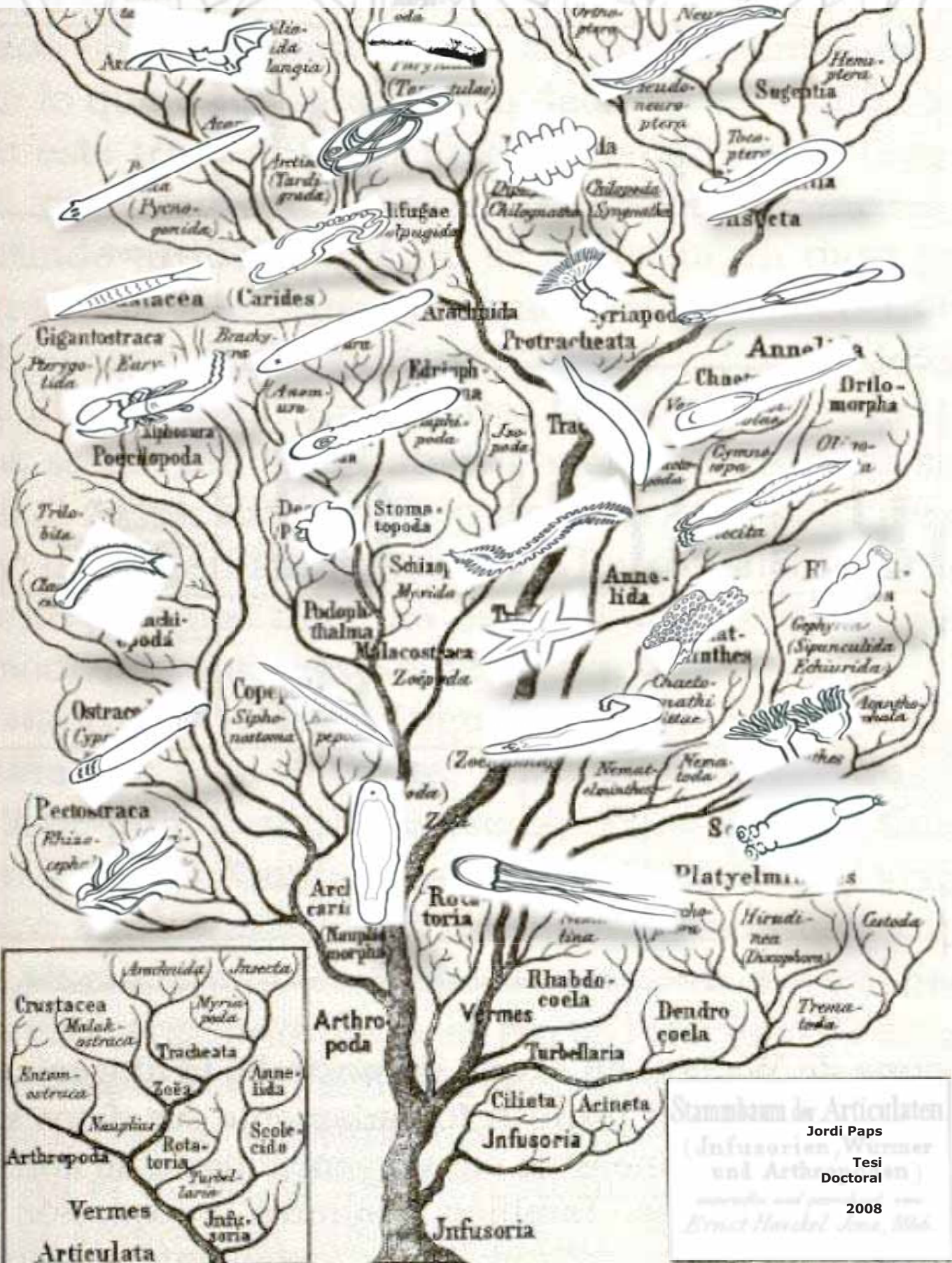


# Filogènia Molecular dels Bilaterals: una aproximació multigènica







Departament de Genètica

Programa de Genètica

Bienni 2001-2003

# **Filogènia Molecular dels Bilaterals: una aproximació multigènica**

Memòria presentada per

**Jordi Paps Montserrat**

Per optar al grau de

**Doctor**

Barcelona Juliol del 2008

La directora

L'autor

Dra. Marta Riutort León

Jordi Paps Montserrat

# Discussió



*"Without this historical background knowledge of interesting anatomical structures or behaviours, these molecular phylogenies would have little or no interest to science"*

Ward Wheeler

### **Estratègies**

En aquesta tesi hem intentat abordar la problemàtica biològica plantejada mitjançant dues estratègies. La primera, presentada al Capítol II, consisteix en l'ús d'una matriu de dades amb un mostreig de taxa molt important, que assegura la representació de la majoria de fílums, en la majoria dels casos amb un bon nombre de representants; per construir aquesta matriu es varen fer servir els dos gens ribosomals, malgrat que han estat objecte de crítiques en quan a la seva capacitat resolutiva i al grau d'errors que poden induir. La segona estratègia, mostrada als Capítols I i III, consisteix en la construcció d'una nova matriu de dades, seleccionant més gens de forma individual i concatenant-los; a l'augmentar el nombre de gens també s'incrementa el missing data (40%). El resultat d'ambdues estratègies es compara amb els resultats d'estudis previs, alguns molt recents, tant basats en gens individuals com en estratègies de high throughput, així com amb els resultats morfològics.

En ambdós casos s'han tingut en compte les problemàtiques que solen afectar les anàlisis moleculars, amb aproximacions com ara la utilització de mètodes probabilístics amb models evolutius complexos, o en el cas del Capítol II, anàlisis específiques per les espècies problemàtiques. L'ús de mètodes i models adequats és sobretot important donada les alteracions que presenten les dades moleculars quan es treballa amb successos tan antics, en els que la dinàmica evolutiva dels gens es veu afectada per fenòmens com les diferències de taxa de substitució a diferents posicions d'una molècula, la variació de taxa d'evolució d'una mateixa posició a través del temps (heterotàquia), els organismes fast-clock, la saturació i finalment, relacionada amb les anteriors, el LBA.

El Capítol II demostra els bons resultats d'aquesta aproximació. Es pot veure com s'eludeixen problemàtiques com el LBA, molt delicat en el cas dels gens ribosomals, demostrat per la posició interna de les branques llargues, separades entre elles i situades en punts dels arbres amb un alt sentit biològic a la majoria dels casos. El Capítol II també mostra l'èxit de l'aproximació de compartimentar les anàlisis dels organismes problemàtics. Tot i que la filogènia total i les compartimentades ens donen unes topologies molt similars, probablement gràcies a l'ús dels representants amb les branques més curtes, els suports estadístics incrementen sensiblement en les segones. Això podria indicar que realment la confluència de masses seqüències problemàtiques en una mateixa matriu fa que incrementi el "soroll" (generat per totes les alteracions en l'evolució dels gens indicades abans), i per

tant els nostres resultats aconsellen analitzar-les per separat per tal d'incrementar la senyal filogenètica.

Finalment, en el Capítol II també resulta clar que no tots els algoritmes basats en màxima versemblança són igual d'eficients. Així, els programes Treefinder i PhyML tendeixen a donar resultats subòptims, en general afectats per LBA; això és probablement degut a que inicien la cerca de topologies des d'un arbre de distàncies, sensible a fenòmens com el LBA i per tant susceptible de patir agrupacions artefactuals, agrupacions que la seva estratègia de cerca en l'espai d'arbres no es capaç de desfer. En canvi, tant la Inferència Bayesiana com el *Maximum Likelihood* inferit amb el programa RaxML comencen les seves cerques amb arbres aleatoris i obtenen topologies amb poc o gens efecte del LBA. Ambdós mètodes obtenen arbres molt similars entre ells però amb les conegudes diferències en quan a suport: mentre les probabilitats posteriors en general són molt generoses, els valors de bootstrap solen ser més baixos, sent en alguns casos les diferències molt acusades per nodes equivalents.

Aquesta discrepància, observada a ambdós estudis (Capítol II i III), ens planteja alguns dubtes. La relació entre les probabilitats posteriors i el bootstrap no és lineal, ja que en certs casos els valors de bootstrap baixos es corresponen amb valors de probabilitat posterior alts però n'hi ha d'altres a on valors de bootstrap baixos es corresponen amb valors de probabilitat posterior també baixos. Aquesta última situació contradiu la idea de que la probabilitat posterior és senzillament una sobreestima del suport de la inferència bayesiana, com s'ha dit en algunes ocasions. El bootstrap obté els seus suports mitjançant alteracions aleatòries de la matriu de dades, de forma que si un grup està recolzat per moltes posicions, la pèrdua a l'atzar d'una part d'elles no afectarà a la capacitat de recuperar aquell grup; però aquestes alteracions de la matriu també alteren la dinàmica evolutiva dels marcadors que la componen i les rèpliques produïdes presenten paràmetres diferents a la matriu original. En canvi, l'algoritme que es fa servir per la inferència bayesiana obté el seu suport a través de l'exploració intensiva de l'espai d'arbres en aquells punts on els paràmetres evolutius són més òptims; els seus valors provenen del consens de totes aquelles topologies que estan al voltant de l'arbre més òptim. Tot i que el bootstrap s'ha fet servir durant molt de temps, potser és una forma grollera d'obtenir els suports estadístics, mentre que la inferència bayesiana és més eficient. De totes formes, el significat d'aquest fet ha estat molt discutit i esbrinar l'origen d'aquestes diferències queda fora de l'objectiu d'aquesta tesi.

### **Quantitat i qualitat dels marcadors**

Cal recordar aquí que el que s'està buscant és tenir una imatge ben definida de la filogènia dels bilaterals; això implica aconseguir una topologia que estigui ben resolta, és a dir en que no hi hagi grups inestables que variïn de posició depenent de la resta d'organismes presents o de les dades utilitzades, i amb un suport alt per tots els nodes. Aquests doncs són els dos criteris que podem utilitzar per jutjar la bondat de les metodologies i els marcadors emprats, ja que, malauradament, no coneixem l'història natural real dels organismes.

Pel que fa a les molècules utilitzades, els gens ribosomals han demostrat ser més resolutius del que s'havia establert fins ara, especialment gràcies a les estratègies metodològiques esmentades i a l'ampli mostreig utilitzat. Els gens codificants per proteïnes aporten informació important, tal i com queda demostrat per la millora d'algunes parts de l'arbre (Capítol I i III) quan s'incorporen aquests marcadors. Cal dir, però, que tant pels resultats obtinguts aquí, com pels recents estudis basats en ESTs, no sembla que l'adició de gens i l'increment de resolució segueixin una relació lineal. La matriu dels gens ribosomals (Capítol II) i la del concatenat (Capítol III) contenen nombre de taxa similars (respectivament 104 taxa vs 90, i 29 fílums vs 27), però la segona conté aproximadament 2,5 vegades més caràcters que la primera (3'7 kb vs 8'9 kb respectivament); tot i que la segona obté una topologia més resolta, és evident que l'increment de resolució no és proporcional a la quantitat de dades afegides.

Aquesta manca de linearitat es fa també patent si es compara la filogènia ribosomal (Capítol II, Fig. 2) amb l'estudi més recent basat en ESTs (Dunn et al. 2008). Hi ha diverses agrupacions amb màxim suport pels gens ribosomals que no es recuperen a la filogènia basada en ESTs, a on a més la posició suggerida no té cap suport, com per exemple la posició basal d'acels. Altres regions no reben suport de cap dels dos jocs de dades, com la monofília dels ecdisozoous, la dels lofotrocozoous, la base dels lofotrocozoous o la posició dels quetognats o els briozoous. I finalment hi ha agrupacions amb més suport pels ESTs que pels ribosomals, com la monofília de deuterostomats o la dels cordats (però veure discussió sobre la problemàtica dels urocordats al capítol II).

Un dels punts més problemàtics de l'anàlisi de Dunn i col és l'aparició d'un grup d'animals a la base dels lofotrocozoous constituït per gnatostomúlids, gastrotrics polifilètics, platihelminths, acels, mizostòmids, rotífers i briozoous. Per alguns dels components d'aquest grup (acels i mizostòmids) existeixen altres dades que de forma força inequívoca demostren que tenen posicions diferents a l'arbre. A més, en el mateix estudi filogenòmic es fa una anàlisi dels organismes que presenten un comportament inestable, per tal d'eliminar-los en una anàlisi posterior, i curiosament tots els components d'aquest grup excepte un queden



dins d'aquesta classe, el que fa sospitar que es tracti d'un grup artefactual, al menys en part. Quan eliminen aquells taxa que presenten inestabilitat, obtenint un arbre amb 19 fílums, comparable ara als arbres obtinguts amb els jocs de dades "bàsic" o el "acels" per nombre de filums (encara que uns pocs filums varien) (Capítol II, Fig. 3F i 3A); en aquest cas, l'arbre dels gens ribosomals presenta una resolució equivalent, o inclús superior en alguns punts, a l'obtingut pels ESTs per totes les regions, excepte la monofília dels cordats i deuterostomats.

Com a resum d'aquesta comparació, podríem dir que tant els gens ribosomals com els ESTs són capaços de resoldre regions de l'arbre que l'altre joc de dades no pot, que ambdós presenten regions que no es resolten, i d'altres on coincideixen; els dos jocs de dades es beneficien de l'eliminació dels taxa problemàtics. Per tant, tenint en compte tant la comparació amb els ESTs com amb el nostre propi set de dades concatenat, no es pot dir que l'increment en el nombre dels marcadors *per se* proporcioni una millora important.

Si comparem l'estudi basat en ESTs amb el nostre arbre pel concatenat de gens (Capítol III), veiem que ambdós presenten un mostratge taxonòmic similar (77 taxa vs 90, ambdós estudis amb 27 fílums de bilaterals) i un nombre similar de caràcters (entre 9.900 i 11.200 aminoàcids vs 8.880 nucleòtids). La filogènia obtinguda en aquest estudi filogenèmic presenta discrepàncies amb grups ben recolzats pel nostre concatenat, com la posició dels acels o la monofília dels cordats; ambdós coincideixen en algunes posicions, com la dels entoproctes, la dels onicòfors (quan s'exclou el quetognat del concatenat) o la inclusió de braquiòpodes i foronidis dins dels Spiralia. També hi ha coincidència en la manca de suport per determinats grups (la monofília dels lofotrocozoous, la dels ecdisozoous, i la filogènia interna d'ambdós), tot i que a l'arbre basat en ESTs apareix el grup sospitós anomenat anteriorment. Així el nostre estudi concatenat millora la resolució de la nostra filogènia basada en els gens ribosomals, però l'increment de dades al concatenat o a l'aproximació dels ESTs no incrementa els suports, ni tant sols l'estabilitat en el cas dels ESTs, de la forma esperada. El que ens porta a la conclusió de que més quantitat no vol dir forçosament més qualitat.

Vol dir això que la idea exposada a la Introducció de que concatenant diferents gens que resolguin diferents parts de l'arbre obtindrem una filogènia ben resolta és falsa? Almenys en el nostre cas no podem dir que sigui així. A les filogènies individuals dels nostres gens, fetes per determinar la seva ortologia, cap dels marcadors resol pràcticament res; molts d'aquests arbres ni tan sols recuperen la monofília dels tres grans clades. I una cosa similar suposem deu succeir amb els estudis basats en ESTs; per exemple, a l'estudi de Dunn *et al.* (2008) es presenta una matriu d'uns 10.000 aminoàcids pertanyents a 150 gens, el qual vol dir que com a promig cada gen aporta 66 aminoàcids, és dubtós que un sol dels gens resolgui cap part de l'arbre amb tan poques posicions. Tant en un cas com en

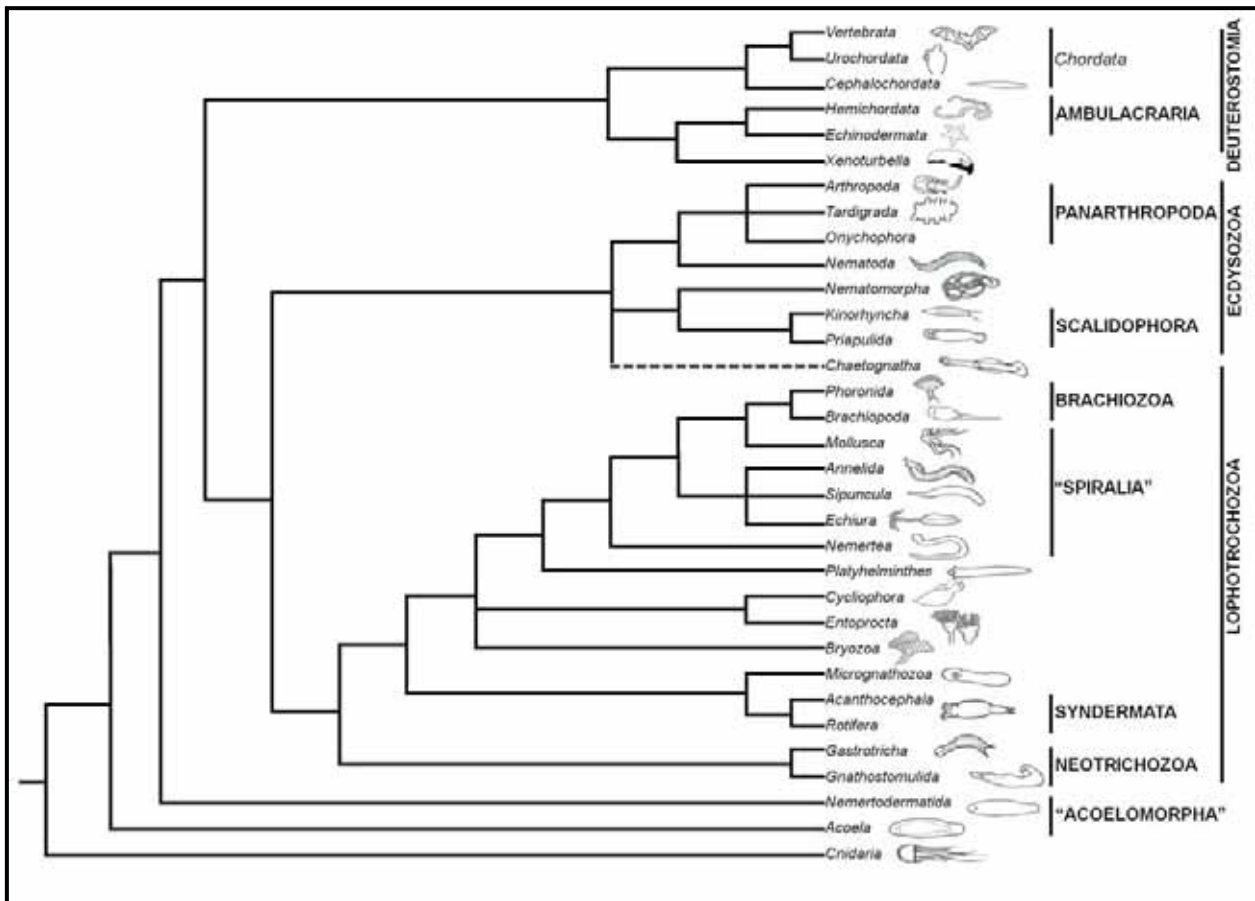
l'altre, ens hem de plantejar quina és la contribució dels diferents marcadors al nostre estudi. Això inclou reconsiderar quin és l'efecte d'afegir un gen que resol una regió de l'arbre sobre les altres que no resol: afegeix soroll o senyal? O potser tots els gens contribueixen, en diferents mesures, a les diferents regions de l'arbre? Tot apunta a que la solució no és simplement afegir més dades de forma indiscriminada, si no que caldrà filtrar i tractar amb molta cura la nova informació.

De la suma dels nostres dos estudis (Capítols II i III) s'han aconseguit unes filogènies amb un bon nivell de resolució i amb topologies que són congruents entre ambdós estudis. Com s'ha comentat a les discussions d'ambdós capítols, els resultats d'aquesta filogènia dels bilaterals es veuen recolzats per la seva coincidència amb anàlisis prèvies, tant moleculars com morfològiques, i que estaven centrades en grups concrets. També s'ha aconseguit una hipòtesi sobre les relacions internes dels lofotrocozous, fins ara el més esquívol dels grups, que és força estable i congruent en molts punts amb els caràcters morfològics. Seran necessaris més gens per poder resoldre definitivament i amb suport alguns dels embrancaments, sobretot les relacions internes dels lofotrocozous.

### **Arbre resum**

La primera part d'un treball filogenètic es obtenir un arbre per tal de poder realitzar la segona part, inferir l'evolució dels trets dels organismes. Es proposa tot seguit aquí arbre resum dels resultats obtinguts. Donat algunes diferències entre el mostratge dels estudis, s'ha fet servir com a esquelet principal l'arbre obtingut amb els tretze gens concatenats degut als seus suports superiors (Capítol III, Fig. 2) i sobre aquest arbre s'han afegit els organismes que estaven representats a l'estudi del ribosomal, però no al concatenat. Així per exemple, dins dels lofotrocozous, s'ha afavorit l'agrupació de gnatostomúlids i gastrotrics ben suportada al concatenat enlloc de la posició basal dels gnatostomúlids seguits dels gastrotric com a grup germà de la resta dels lofotrocozous mostrada pels ribosomals. Tant al joc de dades ribosomal com al concatenat, al següent clade dels lofotrocozous trobem els Syndermata (rotífers i acantocèfals), als quals s'han afegit els micrognatozous.

Si bé el següent clade de l'arbre basat en els gens ribosomals mostra als platihelminths com a grup germà de briozous, entoproctes i cicliòfors, el seu baix suport i la robusta posició dels platihelminths com a germà dels espirals al concatenat ens ha fet afavorir aquesta segona opció. Per tant, els platihelminths es mostren com a grup germà dels animals espirals, i aquest clade forma una tricotomia amb els briozous i els entoprocta, als quals s'han afegit els cicliòfors. Tot i que l'arbre d'inferència bayesiana del concatenat mostra als nemertins com a grup germà dels platihelminths amb un suport baix, tant l'arbre de maximum likelihood com els arbres dels ribosomals mostren als nemertins com a germà



**Fig. 19:** arbre que resumeix els resultats d'aquest estudi, principalment les filogènies obtingudes als Capítols II i III. Els clades parafilètics s'indiquen amb cometes. La procedència de cada clade és discutida al text.

de la resta de clades espirals, situació que se li ha donat aquí. La resta de relacions dins dels espirals, inclosa l'afiliació dels braquiòpodes i foronidis amb els mol·luscs, és recolzada per tots els jocs de dades i anàlisis.

Respecte els ecdisozous, la filogènia aquí presentada és reflexe directe dels arbres obtinguts per ambdós jocs de dades. Donada la conducta artefactual dels quetognats, s'ha preferit no determinar la seva afiliació dins dels ecdisozous i situar els onicòfors amb els artròpodes, posició molt robusta al concatenat quan es fan les anàlisis sense els quetognats (Capítol III). L'agrupació de nematodes i nematomorfs (Nematoida) només apareix en algunes de les filogènies amb mostratge parcial dels gens ribosomals. En canvi, la majoria dels arbres basats en els gens ribosomals i el concatenat afavoreixen la unió de nematodes amb els panartròpodes, ja sigui amb *Tardigrada+Arthropoda* als gens ribosomals, però amb baix suport, o amb *Onychophora+Arthropoda* al concatenat, a on mostren alt suport. Els nematomorfs se situen com a grup germà dels priapulíds i cinorrincs a ambdós estudis (amb baix suport pels gens ribosomal, però alt pel concatenat). Finalment, les relacions dins dels deuterostomats són idèntiques a ambdós estudis, amb l'excepció de la problemàtica dels gens ribosomals amb la monofília dels cordats.

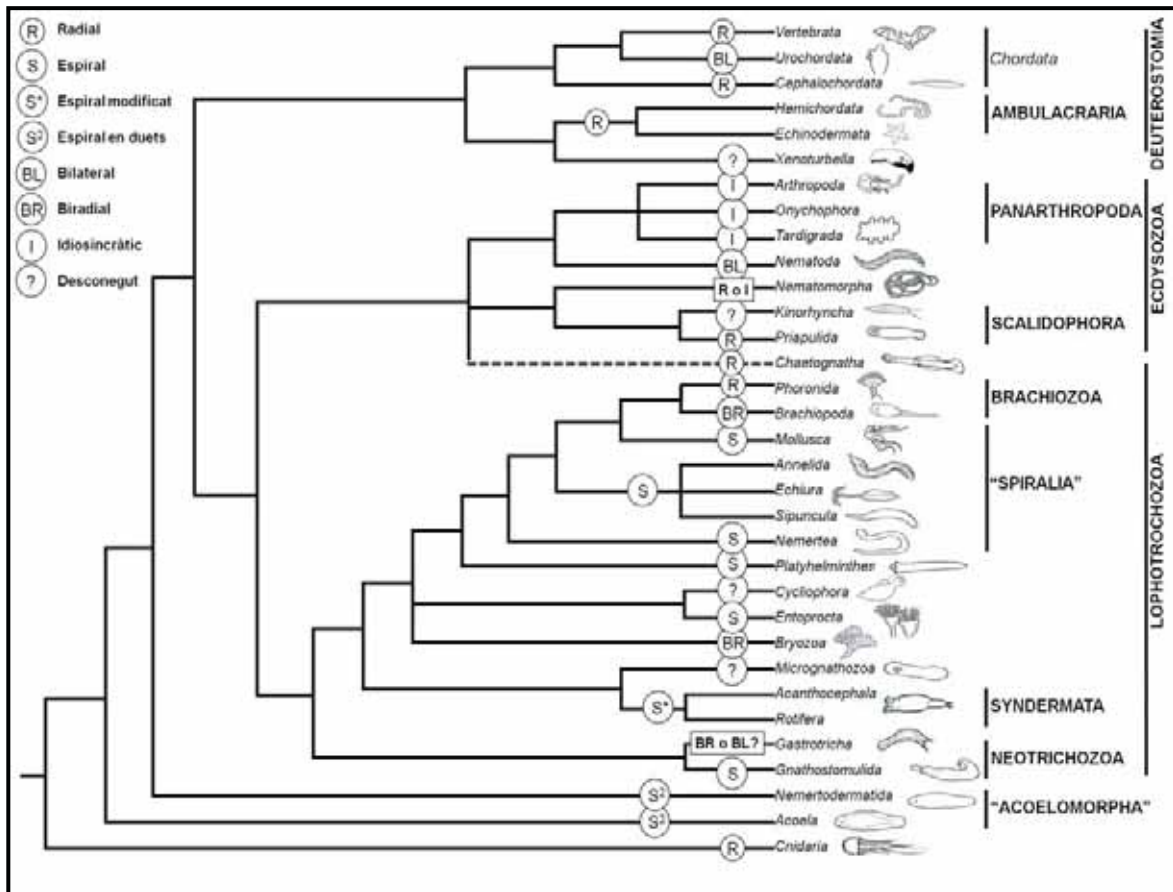
### **Evolució de les característiques principals dels animals**

Ara que disposem d'una filogènia, ens proposem realitzar la segona part del treball filogenètic: situar sobre ella les principals característiques que defineixen el pla corporal dels animals per tal de poder discutir el seu origen i evolució. Aquesta pràctica no és molt habitual als articles de filogènia, ja sigui per limitacions d'espai o per que pot ser altament especulativa, i és utilitzada més freqüentment als articles de revisió. Els trets que farem servir són un compendi de diferents fonts (veure Apèndix I). Si bé una tècnica habitual és fer servir mètodes de parsimònia, o més recentment likelihood, per inferir els canvis d'estat de caràcter, la nostra inexperiència en aquest àmbit, així com dubtes a l'hora de codificar els trets o establir les seves homologies, ens ha portat a adoptar l'aproximació que en fa Andreas Schmidt-Rhaesa al seu llibre *The evolution of organ systems* (2007). En aquesta obra, Schmidt-Rhaesa fa servir un arbre consensuat dels metazous, sobre el qual situa els diferents trets dels animals per tal d'inferir com i quan van aparèixer aquestes característiques. Si bé aquesta aproximació pot ser especulativa de vegades, també estimula la discussió i reflexió sobre l'evolució dels animals.

### **Clivellament**

Els patró de clivellament ha estat un dels trets més utilitzats per definir clades, tant a les filogènies morfològiques clàssiques com als grups resultants de les filogènies moleculars més actuals. Existeixen al voltant de sis patrons de clivellament que estan presents a més d'un fílum (veure llegenda de la Fig. 20). El de tipus radial, present als diploblàstics, sempre és el considerat el més primitiu. L'estatus parafilètic dels acelomorfs a la base dels bilaterals és d'una importància clau: qualsevol de les característiques compartides entre els acels i els nemertodermàtides havia d'estar present a l'ancestre dels bilaterals, ja que l'alternativa és que aquests trets han aparegut dues vegades independentment per evolució paral·lela. Cal notar aquí que a l'hora de situar els caràcters als arbres, només s'han situat en branques internes quan tots els descendents presenten aquell caràcter; és per això que pot semblar que els trets pels acels i nemertodermàtides apareguin dos cops en l'evolució, quan el més probable és que apareguessin a la branca que va des dels cnidaris fins els acels.

En el cas del patró de clivellament, els acels i nemertodermàtides presenten de tipus espiral en duets, que malgrat aquest nom, no té una clara relació amb el clivellament espiral. Segons l'arbre presentat aquí, el patró espiral en duets derivaria del radial dels cnidaris i seria l'estat plesiomòrfic per a la resta dels bilaterals.



**Fig. 20:** L'evolució dels patrons de clivellament

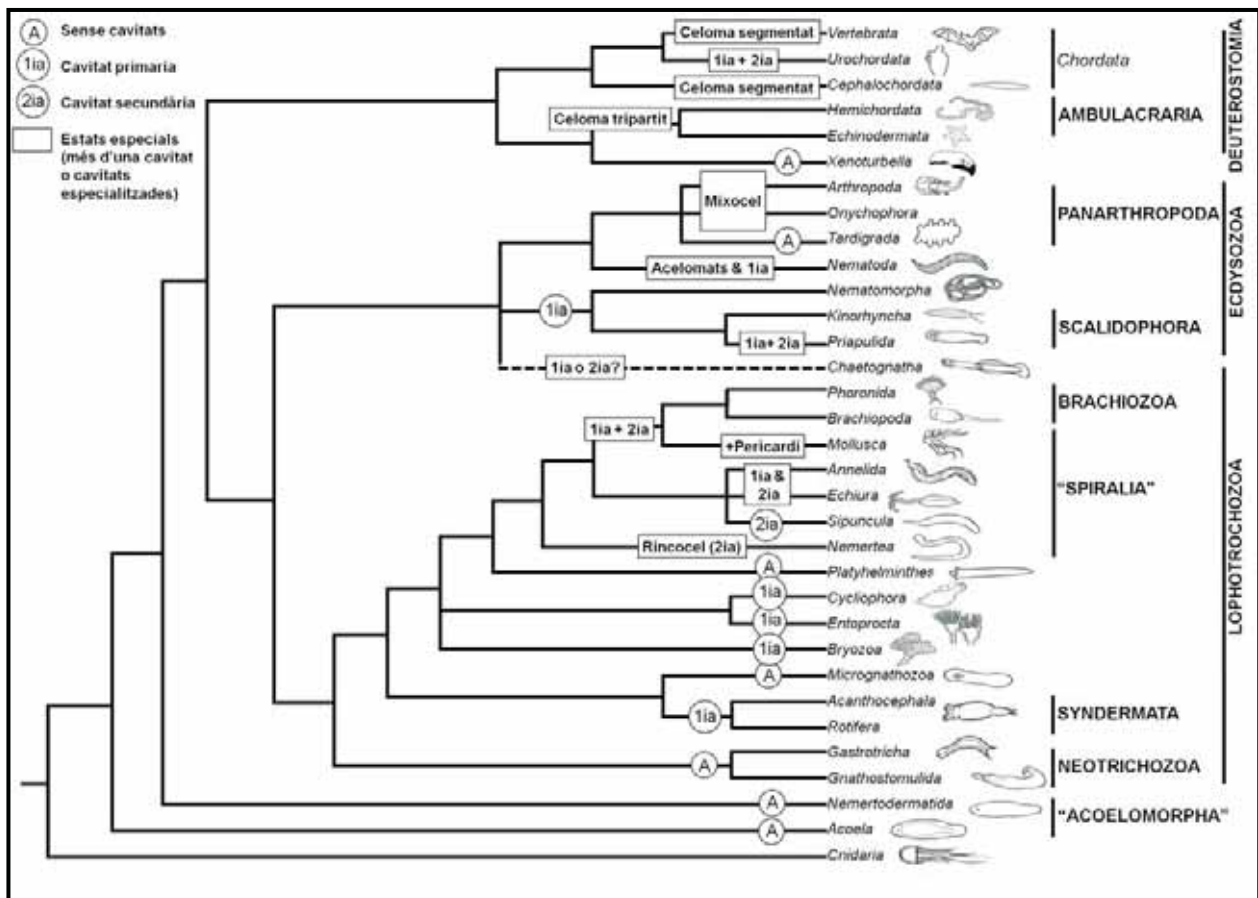
La topologia interna dels lofotrocozous, amb embrancaments succesius de pocs fílums ens els que predomina el patró espiral, recolza l'existència al seu ancestre d'un patró espiral, que hauria derivat cap a radial o biradial (una modificació del radial) un mínim de tres (als lofoforats foronidis, braquiòpodes i briozous) o quatre (depenent de l'estatus real dels gastrotrics), per evolució convergent. No podem concloure res del patró dels ecdisozous, ja que presenten un ampli repertori de patrons que són exclusius de cada fílum. Si bé tenen representants amb clivellament radial, la profusió de patrons idiosincràtics i la tricotomia interna dificulta establir la possible evolució del clivellament en aquest grup.

Crida l'atenció el fet de que la majoria de deuterostomats presenten el clivellament radial, com el dels cnidaris, mentre els parafilètics acelomorfs que es troben entremig el tenen espiral en duets. Però una possible aparició secundària del patró radial ja s'ha vist als lofotrocozous, i a més el desconeixement de l'embriologia de *Xenoturbella* no ens permet descartar els diferents escenaris evolutius. Finalment, el clivellament bilateral, que no s'ha pogut vincular fins ara a cap dels dos patrons principals (radial i espiral), es troba present a tres grups, i cadascun d'ells a un superclade diferent. Caldria una revisió profunda d'aquests tres grups per establir si realment presenten el mateix patró de clivellament o es tracta d'un calaix de sastre.

En definitiva, l'evolució dels patrons de clivellament és molt plàstica, i cap d'ells ens serveix per establir relacions evolutives entre els fílums. La posició intermitja i parafilètica dels acelomorfs força a la reparició del clivellament radial als deuterostomats, com també ho fa l'aniuament dels lofoforats dins dels majoritàriament espirals lofotrocozoos.

**Evolució de les cavitats corporals**

Les cavitats corporals també han estat un dels grans criteris per establir les afinitats evolutives dels bilaterals. Les cavitats es classifiquen en dos tipus, primàries i secundàries. Les primàries, com per exemple el pseudoceloma, ja estan present als primers estadis embrionaris; les secundàries, com el celoma, que es formen *de novo* a l'embrió tardà. Les cavitats hi eren presents a l'esquema de Hyman, i s'havien fet servir per suggerir una tendència a l'increment de complexitat. Per exemple, es pensava en el pseudoceloma com en un estat intermig en l'evolució des de l'estat acelomat cap al celomat. Amb el que sabem avui en dia, això no te massa sentit, ja que l'origen embrionari del celoma és completament diferent al del pseudoceloma. A més, la presència d'un tipus de cavitat no exclou la de l'altre, amb el qual no poden ser diferents passes d'una successió.



**Fig. 21.** Arbre de l'evolució de les cavitats corporals.

Un altre cop l'estatus dels acels i nemertodermàtides ens permet afirmar que el primer animal bilateral era de tipus acelomat (Fig. 21). Això recolza la posició de dos grups d'acelomats, gnatostomúlids i gastrotrics, a la base dels lofotrocozous. A més, un d'ells, els gnatostomúlids, presenta un sistema digestiu d'una sola via (el mateix orifici fa de boca i anus), a l'igual que els acelomorfs. Mentre que l'estat del caràcter a les branques intermèdies dels lofotrocozous és difícil de determinar degut a la seva falta de resolució, sí que està clar que l'últim ancestre comú dels Spiralia + Brachiozoa presentava algun tipus de cavitat. En els ecdisozous, l'existència de dos fílums amb representants acelomats i la indeterminació respecte a la situació dels quetognats dificulta donar una resposta clara a l'evolució de les cavitats dins d'aquest superclade. Tot el contrari passa als deuterostomats, on el seu clar estatus celomat només és veu alterat per la presència de l'acelomat *Xenoturbella*.

Cal destacar que si bé la posició basal dels acelomorfs ha respost la vella pregunta respecte a com era el primer bilateral, no ens ajuda a establir si els grups d'anatomia senzilla són simples o simplificats. Tots els representants acelomats dels bilaterals es troben en branques relativament properes al node que defineix el seu superclade, amb l'excepció dels platihelminths; però no són clarament les més basals, menys en el cas dels gnatostomúlids i gastrotrics. En aquest escenari, és tan possible que provinquin d'ancestres amb cavitats i que ells les hagin perdut per tal d'adaptar-se a nous estils de vida (com el parasitisme o la reducció de tamany), com que l'ancestre del superclade fos acelomat i ells hagin retingut l'estat plesiomòrfic. Tot i que donada la posició dels simples acelomorfs a la base, la segona opció sembla més atractiva.

### **Fases larvàries**

El desenvolupament indirecte a través de les fases larvàries també han tingut un paper destacat als debats filogenètics. Com s'ha esmentat a la Introducció, Hyman feia servir les fases larvàries com a via per establir la filogènia dels bilaterals (Fig. 6). Per exemple, proposava que la larva plànula dels cnidaris hauria donat lloc a un primer bilateral semblant a un acel. Hipotesi que és totalment compatible amb la nostra filogènia (Fig. 22). A més, la posició dels acelomorfs ens assegura que el primer bilateral presentava un desenvolupament directe (sense fases larvàries). La presència de gnatostomúlids i gastrotrics, sense fases larvàries, a la base dels lofotrocozous fa que aquest sigui l'únic grup a on es pot afirmar que l'últim ancestre comú presentava desenvolupament directe gràcies a la manca de larves als dos primers clades que es ramifiquen dins dels lofotrocozous. Just tot el contrari es pot dir del altres superclades, on l'abundància de fases larvàries, tot i que de no clara homologia en alguns grups, apunta a un primer ancestre amb desenvolupament indirecte. Un altre cop, *Xenoturbella* presenta un estat de caràcter molt diferent de la resta dels deuteròstoms, i similar al dels acels. Les larves dels metazous són molt variades, i n'hi

ha als tres superclades. Però la única amb una estructura clàrament compartida per més d'un grup es la trocòfora dels lofotrocozous.

La primera larva que trobem als lofotrocozous és la larva paràsita dels acantocéfals, que es considera d'evolució tardana, i per tant no present a l'ancestre dels Syndermata. Al següent clade dels lofotrocozous, trobem les larves dels briozous, les múltiples larves dels ciclìofors i destaquen les larves trocòfores dels entoproctes; la presència de trocòfora als entoprocta recolza la seva posició com a grup germà de la resta d'animals amb larva trocòfora que s'obté a la nostra filogènia del concatenat (Capítol II i III, Figs. 2 i 3). Tant les larves de platihelminths com las de nemertins s'han relacionat amb les trocòfores sovint, però com només es troben en representants de grups derivats i no a tot el fílum, es dubte de la seva homologia. També cal destacar la pèrdua de trocòfora i l'aparició de la larva actinotroca i glottidia als braquiòpodes i foronidis respectivament; un altre cop, la posició dins dels Spiralia dels Brachiozoa, uns animals tant poc representatius de la morfologia dels lofotrocozous, capgira el punt de vista sobre l'evolució dels trets, afavorint la idea de l'evolució convergent per molts caràcters.

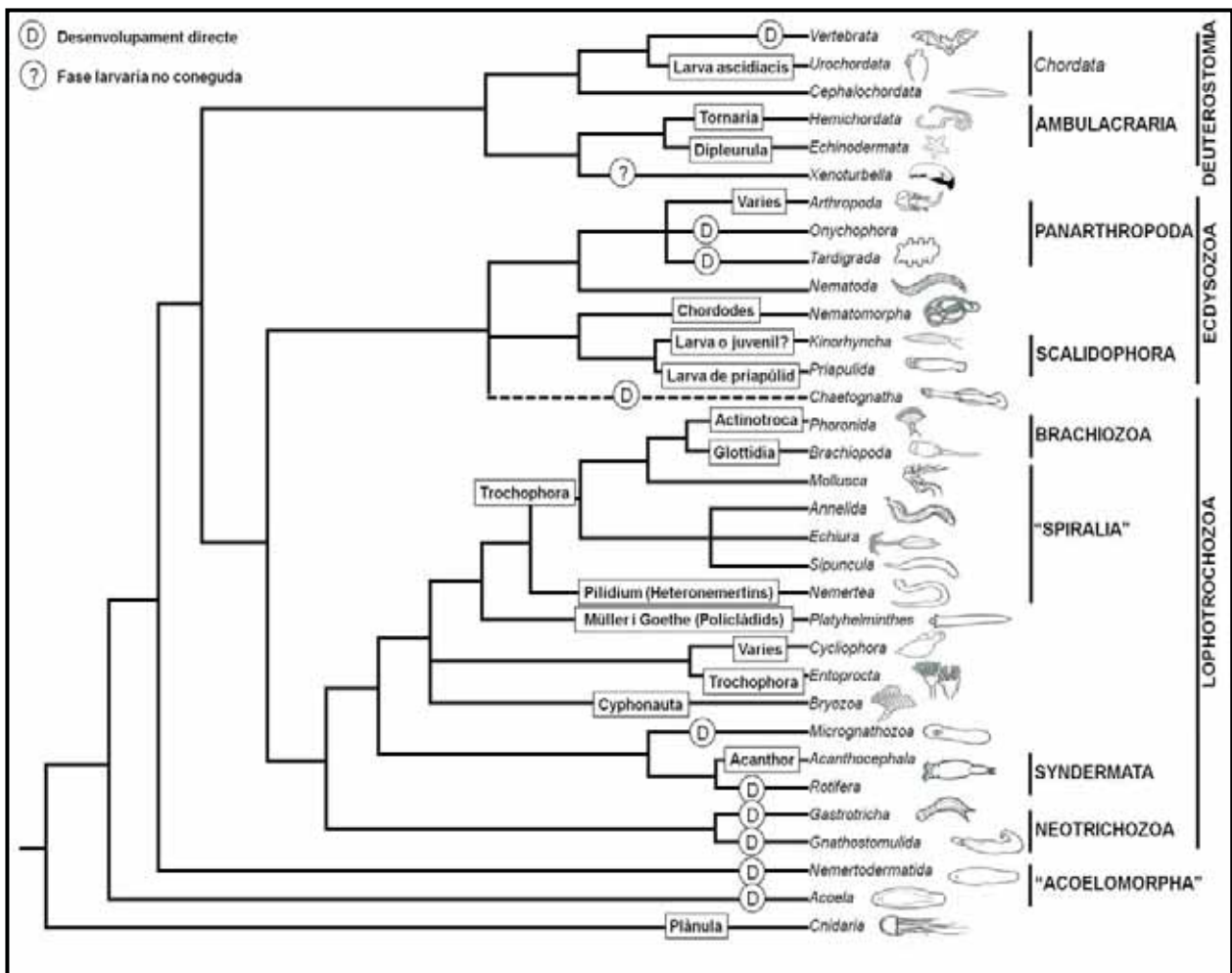
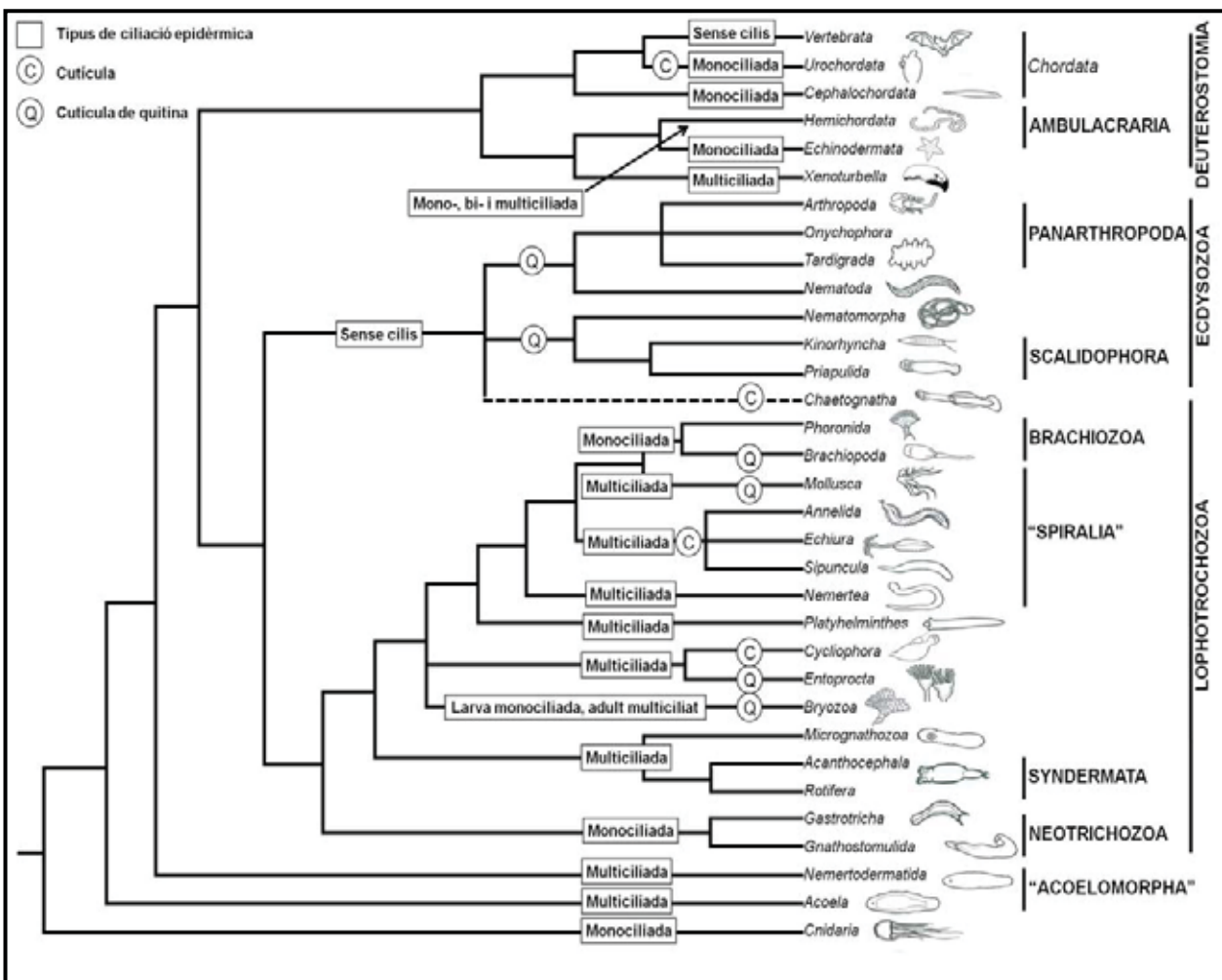


Fig. 22. Arbre de l'evolució de les fases larvàries.



**Cutícula i Ciliació epidèrmica**

Les cutícules i la ciliació epidèrmica no han jugat un paper massa important a les filogènies morfològiques clàssiques. Però les cutícules han guanyat importància gràcies als resultats de les dades moleculars i el seu paper en la definició dels ecdisozous. Si ens fixem a l'evolució de les cutícules (Fig. 23) ens adonem de que estan molt exteses al món animal. Un fet que crida l'atenció és que les cutícules de quitina no són exclusives dels ecdisozous, si no que també en trobem a briozous, entoprocta, braquiòpodes i mol·luscs; cal tenir en compte que l'estructura en tres capes de la cutícula dels ecdisozous sí que és exclusiva d'ells. La cutícula sense quitina dels quetognats, encara que presenten mandíbules quitinoses, no els vonvula amb la resta dels ecdisozous. La majoria de cutícules no quitinoses acostumen a ser riques en col·làgena. Són l'excepció els urocordats, que presenten una cutícula feta de tunicina, una molècula similar a la cel·lulosa i única en els animals. A partir d'aquest esquema podem veure que la distribució de les cutícules no és informativa en quan a les relacions evolutives dels seus portadors.



**Fig. 23.** Arbre de l'evolució de les cutícules i la ciliació epidèrmica.

Més interessant sembla el cas de la ciliació epidèrmica. Les cèl·lules epidèrmiques poden presentar 1 cili per cèl·lula, o dos, o múltiples. Sovint s'ha proposat que la condició del bilateral ancestral és la monociliada, a l'igual que als cnidaris. Novament els acels i nemertodermàtides contradiuen els punts de vista clàssics presentant ambdós epidermis multiciliades; i un altre cop *Xenoturbella* és la ovella negra dels deuteròstomats, presentant una epidermis multicilada com la dels acels en un superclade ple de monociliats. Freqüentment s'ha proposat que la presència d'una cutícula rígida per sobre de l'epidermis era incompatible amb la ciliació d'aquesta; si bé podem veure aquesta correlació als ecdisozous, n'hi ha forces representants dels lofotrocozous que no la compleixen. A més, els quetognats tampoc no presenten cilis, si bé la perdua pot ser deguda a la seva forma de vida pelàgica. Respecte els lofotrocozous, la ciliació és el primer caràcter de tots els explorats en els que el gastrotrics i gnatostomúlids difereixen del primer bilateral; mentre aquests són monociliats, el primer bilateral seria multiciliat. El fet de que la resta dels lofotrocozous comparteixen l'estat de caràcter multicilat (excepte els Brachiozoa dins dels Spiralia), dona suport a la seva monofília, tret que ja havia estat proposat per Zrzavý (1998).

### **Reflexions finals**

La filogènia dels bilaterals és la clau per inferir com ha estat l'evolució dels animals. Un bon arbre be resultat és un marc indispensable per establir l'aparició de novetats evolutives tan importants com les cavitats corporals, els patrons de clivellament, les fases larvàries i moltes altres característiques del patró corporal dels animals. La morfologia ha proveït un cabdal d'informació molt valuosa respecte els trets dels animals, però malauradament tot aquest coneixement no és suficient per resoldre les relacions entre els grans grups. Les dades moleculars donen accés a una enorme quantitat d'informació que ha anat creixent ràpidament, a la vegada que s'han desenvolupat mètodes filogenètics que s'han sofisticat cada cop més per tal d'acomodar-se a les observacions sobre l'evolució molecular dels organismes. La filogènia molecular, que ja porta vint anys estudiant les relacions dels bilaterals, ha desenvolupat noves hipòtesis filogenètiques com l'existència dels tres grans clades de bilaterals, ha desterrat antigues idees com la unió entre els artròpodes i els anèl·lids, però també ha plantejat nous enigmes molts dels quals encara s'han de resoldre.

A l'inici d'aquest projecte, les úniques dades disponibles eren pràcticament les del 18S. La idea de fer servir nous marcadors, com el 28S, començava a prendre forma i l'aplicació de la tecnologia d'ESTs als problemes de la sistemàtica era encara impensable. Com a conseqüència de la feina aquí presentada (Capítol I), es va introduir el primer marcador molecular no ribosomal capaç de resoldre determinades regions de l'arbre dels

bilaterals, en aquest cas, la seva base. Aquest primer estudi presentava 750 parells de bases de la miosina per 29 taxa pertanyents a 12 grups de bilaterals més l'outgroup.

Des de la publicació del primer estudi basat en la miosina, s'han sortejat molts obstacles, com obtenir material biològic per la majoria dels fílums de bilaterals, que s'ha fet possible gràcies a la col·laboració de molts experts; altres problemes eren insalvables amb els nostres mitjans, com per exemple la problemàtica de treballar amb quantitats limitades de RNA de grups microscòpics o amb primers degenerats. Tot i així s'han obtingut 135 seqüències, que junt amb les dades presents a les bases de dades, ens ha permès elaborar una matriu final que consta de 90 taxa pertanyents a 27 grups de bilaterals i una extensió de 8.880 parells de bases provinents de 13 gens diferents (Capítol III). En una època molt competitiva, a on les matrius publicades presenten dotzenes de gens i d'organismes, la matriu presentada aquí és capaç d'igualar, i en alguns casos superar, la capacitat resolutiva dels estudis més moderns i que han estat realitzats amb molts més mitjans.

També em provat d'extreure tanta informació com fos possible dels gens ribosomals, ja que es pensava que es trigaria molt de temps en igualar la seva representativitat taxonòmica; a més, em pogut explorar els problemes associats a aquest tipus de dades, relacionats amb el mostratge i que eren fàcils d'abordar amb tota la informació disponible (Capítol II). Aquests dos estudis ens han permès valorar tan la importància d'afegir nous marcadors com l'impacte de l'ús de mètodes d'inferència i models que s'ajusten a la problemàtica. Els seus resultats han estat resumits en una única filogènia, que ens ha permès especular sobre l'evolució de trets morfològics rellevants dins dels bilaterals, i que en alguns casos presenten alta coherència evolutiva amb la filogènia proposada.

# Conclusions



## **Conclusions**

1. La filogènia obtinguda ens ha permès, dins dels bilaterals, comprovar la monofília dels tres grans superclades així com la posició basal de *Acoela* i *Nemertodermatida*.
2. S'ha pogut resoldre la filogènia interna dels Deuterostomia, mentres que la filogènia interna dels Ecdysozoa resulta en una tricotomia.
3. Es mostra una nova filogènia dels *Lophotrochozoa*, a on cal destacar:
  - I. Els gnatostomúlids i els gastrotrics com al primer embrancament dels lofotrocozous.
  - II. La condició polifilètica dels lofoforats.
  - III. La posició dels platihelminths com a grup germà de la resta d'espírels.
  - IV. L'estatus parafilètic dels Spiralia degut a la posició dels Brachiozoa (braquiòpodes i foronídis) com a grup germà dels mol·luscs.
4. La filogènia obtinguda situa *Xenoturbella* com a deuteròstom amb un suport molt baix. El conjunt de resultats però no permet descartar una posició més basal.
5. Els *Chaetognatha* pertanyen clarament als ecdisozous. La seva situació dins d'aquest grup no es pot resoldre.
6. L'ús de mètodes probabilístics amb models evolutius complexos permet resoldre part de les problemàtiques que presenten els gens ribosomals, obtenint una filogènia més ben resolta que les que s'havia obtingut fins ara per aquests marcadors.
7. La cerca de nous marcadors moleculars que aportin nova informació ha mostrat ser una estratègia valuosa per inferir una filogènia dels bilaterals resolta. Malgrat això, l'increment de dades no resulta en un increment lineal de la resolució.
8. La filogènia obtinguda ens ha permès avaluar l'evolució de determinats caràcters del patró corporal, mostrant la plasticitat en la seva aparició dins dels bilaterals i la prevalència de l'adquisició independent d'alguns d'aquests trets.



**Bibliografía**

- Adoutte, A., G. Balavoine, N. Lartillot, O. Lespinet, B. Prud'homme, and R. de Rosa. 2000. The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:4453-4456.
- Aguinaldo, A. M., J. M. Turbeville, L. S. Linford, M. C. Rivera, J. R. Garey, R. A. Raff, and J. A. Lake. 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* **387**:489-493.
- Anderson, F. E., A. J. Cordoba, and M. Thollessen. 2004. Bilaterian phylogeny based on analyses of a region of the sodium-potassium ATPase alpha-subunit gene. *J Mol Evol* **58**:252-268.
- Ax, P. 1956. Die Gnathostomulida, eine rätselhafte Wurmgruppe aus dem Meeressand. *Abhandlungen der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Klasse*:1-32.
- Baguña, J., Paps, J, Riutort, M & Ruiz-Trillo, I. 2002. Origen y evolución de los ejes corporales y la simetría bilateral en animales in M. Soler, ed. *Evolución : la base de la biología*. Proyecto Sur.
- Balavoine, G., R. de Rosa, and A. Adoutte. 2002. Hox clusters and bilaterian phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **24**:366-373.
- Baldauf, S. L., A. J. Roger, I. Wenk-Siefert, and W. F. Doolittle. 2000. A Kingdom-Level Phylogeny of Eukaryotes Based on Combined Protein Data. *Science* **290**:972-977.
- Boore, J. L., and W. M. Brown. 2000. Mitochondrial Genomes of Galathealium, Helobdella, and Platynereis: Sequence and Gene Arrangement Comparisons Indicate that Pogonophora Is Not a Phylum and Annelida and Arthropoda Are Not Sister Taxa. *Mol Biol Evol* **17**:87-106.
- Bourlat, S. J., T. Juliusdottir, C. J. Lowe, R. Freeman, J. Aronowicz, M. Kirschner, E. S. Lander, M. Thorndyke, H. Nakano, A. B. Kohn, A. Heyland, L. L. Moroz, R. R. Copley, and M. J. Telford. 2006. Deuterostome phylogeny reveals monophyletic chordates and the new phylum Xenoturbellida. *Nature*.
- Carranza, S., J. Baguña, and M. Riutort. 1997. Are the Platyhelminthes a monophyletic primitive group? An assessment using 18S rDNA sequences. *Mol Biol Evol* **14**:485-497.
- Conway Morris, S. 2003. The Cambrian "explosion" of metazoans and molecular biology: would Darwin be satisfied? *Int. J. Dev. Biol.* **47**:505-515.
- Delsuc, F., H. Brinkmann, D. Chourrout, and H. Philippe. 2006. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* **439**:965-968.
- Dopazo, H., J. Santoyo, and J. Dopazo. 2004. Phylogenomics and the number of characters required for obtaining an accurate phylogeny of eukaryote model species. *Bioinformatics* **20**:i116-121.
- Dunn, C. W., A. Hejnol, D. Q. Matus, K. Pang, W. E. Browne, S. A. Smith, E. Seaver, G. W. Rouse, M. Obst, G. D. Edgecombe, M. V. Sorensen, S. H. D. Haddock, A. Schmidt-Rhaesa, A. Okusu, R. M. Kristensen, W. C. Wheeler, M. Q. Martindale, and G. Giribet. 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* **452**:745-749.
- Felsenstein, J. 1978. Cases in which Parsimony or Compatibility Methods Will be Positively Misleading *Syst Zool* **27**:401-410.
- Field, K. G., G. J. Olsen, D. J. Lane, S. J. Giovannoni, M. T. Ghiselin, E. C. Raff, N. R. Pace, and R. A. Raff. 1988. Molecular phylogeny of the animal kingdom. *Science* **239**:748-753.
- Funch, P., and R. M. Kristensen. 1995. Cyclophora is a new phylum with affinities to Entoprocta and Ectoprocta. *Nature* **378**:711-714.



- Garey, J. R. 2002. The Lesser-Known Protostome Taxa: An Introduction and a Tribute to Robert P. Higgins. *Integr. Comp. Biol.* **42**:611-618.
- Giribet, G. 2002. Current advances in the phylogenetic reconstruction of metazoan evolution. A new paradigm for the Cambrian explosion? *Mol Phylogenet Evol* **24**:345-357.
- Giribet, G., D. L. Distel, M. Polz, W. Sterrer, and W. C. Wheeler. 2000. Triploblastic relationships with emphasis on the acoelomates and the position of Gnathostomulida, Cycliophora, Plathelminthes, and Chaetognatha: a combined approach of 18S rDNA sequences and morphology. *Syst Biol* **49**:539-562.
- Haeckel, E. 1866. *Generelle Morphologie der Organismen. Allgemeine Grundzüge der organischen Formen-Wissenschaft, mecanisch begründet durch die von Charles Darwin reformirte Descendenz-Theorie.* 2 vols. Verlag von Georg Reimer, Berlin.
- Halanych, K. M. 2004. The new view of animal phylogeny. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **35**:229-256.
- Halanych, K. M., J. D. Bacheller, A. M. Aguinaldo, S. M. Liva, D. M. Hillis, and J. A. Lake. 1995. Evidence from 18S ribosomal DNA that the lophophorates are protostome animals. *Science* **267**:1641-1643.
- Hartmann, S., Vision, T.J. 2008. Using ESTs for phylogenomics: Can one accurately infer a phylogenetic tree from a gappy alignment? *BMC Evolutionary Biology* **8**:95.
- Helpenbein, K. G., and J. L. Boore. 2004. The Mitochondrial Genome of *Phoronis architecta*--Comparisons Demonstrate that Phoronids Are Lophotrochozoan Protostomes. *Mol Biol Evol* **21**:153-157.
- Hennig, W., D. D. Davis, and R. Zangerl. 1966. *Phylogenetic Systematics.* University of Illinois Press, Urbana, Illinois.
- Hyman, L. H. 1940. *The invertebrates: Protozoa through Ctenophora.* Vol 1., New York.
- Hyman, L. H. 1967. *The invertebrates. Mollusca, Aplacophora, Polyplacophora, Monoplacophora, Gastropoda. The coelomate bilateria.* Vol 6., New York.
- Hyman, L. H. 1959. *The invertebrates: Smaller coelomate. Groups Chaetognatha, Hemicordata, Pogonophora, Phoronida, Ectoprocta, Brachiopoda, Sipunculida. The coelomate bilateria.* Vol 5., New York.
- Hyman, L. H. 1955. *The invertebrates: Echinodermata. The coelomate bilateria.* Vol 4., New York.
- Hyman, L. H. 1951a. *The invertebrates: Acanthocephala, Aschelminthes and Entoprocta. The pseudocoelomate bilateria.* Vol 2., New York.
- Hyman, L. H. 1951b. *The invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchoela. The acelomate bilateria.* Vol 2., New York.
- Jenner, R. A. 2000. Evolution of animal body plans: the role of metazoan phylogeny at the interface between pattern and process. *Evolution & Development* **2**:208-221.
- Jondelius, U., I. Ruiz-Trillo, J. Baguna, and M. Riutort. 2002. The Nemertodermatida are basal bilaterians and not members of the Platyhelminthes. *Zoologica Scripta* **31**:201-215.
- Katayama, T., M. Yamamoto, H. Wada, and N. Satoh. 1993. Phylogenetic position of Acoel turbellarians inferred from partial 18S rDNA sequences. *Zoologica Scripta* **10**:529-536.
- Kimura, M. 1968. Evolutionary Rate at the Molecular Level. *Nature* **217**:624-626.

- Kristensen, R. M., and P. Funch. 2000. Micrognathozoa: A new class with complicated jaws like those of Rotifera and Gnathostomulida. *Journal of Morphology* **246**:1-49.
- Lake, J. A. 1990. Origin of the Metazoa. *PNAS* **87**:763-766.
- Mallatt, J., and C. J. Winchell. 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**:289-301.
- Medina, M., A. G. Collins, J. D. Silberman, and M. L. Sogin. 2001. Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:9707-9712.
- Nielsen, C. 2001. *Animal Evolution: Interrelationships of the Living Phyla*. Oxford University Press; 2Rev Ed edition (31 Mar 2001), Oxford.
- Nielsen, C. 1995. *Animal Evolution: Interrelationships of the Living Phyla*. Oxford University Press, Oxford.
- Pasquinelli, A. E., A. McCoy, E. Jimenez, E. Salo, G. Ruvkun, M. Q. Martindale, and J. Baguna. 2003. Expression of the 22 nucleotide let-7 heterochronic RNA throughout the Metazoa: a role in life history evolution? *Evolution & Development* **5**:372-378.
- Peterson, K. J., and D. J. Eernisse. 2001. Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: inferences from morphology and 18S rDNA gene sequences. *Evol Dev* **3**:170-205.
- Philippe, H., H. Brinkmann, P. Martinez, M. Riutort, and J. Baguña. 2007. Acoel Flatworms Are Not Platyhelminthes: Evidence from Phylogenomics. *PLoS ONE* **8**:e717.
- Philippe, H., N. Lartillot, and H. Brinkmann. 2005. Multigene Analyses of Bilaterian Animals Corroborate the Monophyly of Ecdysozoa, Lophotrochozoa, and Protostomia. *Mol Biol Evol* **22**:1246-1253.
- Philippe, H., E. A. Snell, E. Bapteste, P. Lopez, P. W. H. Holland, and D. Casane. 2004. Phylogenomics of Eukaryotes: Impact of Missing Data on Large Alignments. *Mol Biol Evol* **21**:1740-1752.
- Philippe, H., and M. J. Telford. 2006. Large-scale sequencing and the new animal phylogeny. *Trends Ecol Evol* **21**:614-620.
- Qiu, Y.-L., J. Lee, F. Bernasconi-Quadroni, D. E. Soltis, P. S. Soltis, M. Zanis, E. A. Zimmer, Z. Chen, V. Savolainen, and M. W. Chase. 1999. The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature* **402**:404-407.
- Rieger, R. M., Tyler, S., Smith III, J. P. S., & Rieger, G. E. 1991. *Platyhelminthes: Turbellaria*. Wiley-Liss, New York.
- Ruiz-Trillo, I., M. Riutort, H. M. Fourcade, J. Baguna, and J. L. Boore. 2004. Mitochondrial genome data support the basal position of Acoelomorpha and the polyphyly of the Platyhelminthes. *Mol Phylogenet Evol* **33**:321-332.
- Ruiz-Trillo, I., M. Riutort, D. T. Littlewood, E. A. Herniou, and J. Baguna. 1999. Acoel flatworms: earliest extant bilaterian Metazoans, not members of Platyhelminthes. *Science* **283**:1919-1923.
- Ruppert, E. E., and R. D. Barnes. 1995. *Zoología de los Invertebrados*. McGraw Hill - Interamericana, Madrid.

- Schmidt-Rhaesa, A. 2007. *The Evolution of Organ Systems*, First Edition. Oxford University Press, Oxford.
- Schmidt-Rhaesa, A. 2003. Old trees, new trees - is there any progress? *Zoology* **106**:291-301.
- Schmidt-Rhaesa, A. 2007. *The Evolution of Organ Systems*, First Edition. Oxford University Press, Oxford.
- Sempere, L. F., C. N. Cole, M. A. McPeck, and K. J. Peterson. 2006. The phylogenetic distribution of metazoan microRNAs: insights into evolutionary complexity and constraint. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **306**:575-588.
- Telford, M. J., E. A. Herniou, R. B. Russell, and D. T. J. Littlewood. 2000. Changes in mitochondrial genetic codes as phylogenetic characters: two examples from the flatworms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:11359.
- Telford, M. J., A. E. Lockyer, C. Cartwright-Finch, and D. T. Littlewood. 2003. Combined large and small subunit ribosomal RNA phylogenies support a basal position of the acoelomorph flatworms. *Proc Biol Sci* **270**:1077-1083.
- ToL. Guide to Names Used in the Higher Classification of Animals ([http://www.tolweb.org/notes/?note\\_id=55](http://www.tolweb.org/notes/?note_id=55)).
- Valentine, J. W. 2004. *On the Origin of Phyla*. University Of Chicago Press.
- von Nickisch-Roseneck, M., W. M. Brown, and J. L. Boore. 2001. Complete Sequence of the Mitochondrial Genome of the Tapeworm *Hymenolepis diminuta*: Gene Arrangements Indicate that Platyhelminths Are Eutrochozoans. *Mol Biol Evol* **18**:721-730.
- Winnepenninckx, B., T. Backeljau, and R. De Wachter. 1995. Phylogeny of protostome worms derived from 18S rRNA sequences. *Mol Biol Evol* **12**:641-649.
- Winnepenninckx, B., T. Backeljau, L. Y. Mackey, J. M. Brooks, R. Dewachter, S. Kumar, and J. R. Garey. 1995. 18s Ribosomal-Rna Data Indicate That Aschelminthes Are Polyphyletic in Origin and Consist of at Least 3 Distinct Clades. *Molecular Biology and Evolution* **12**:1132-1137.
- Zrzavý, J., S. Mihulka, P. Kepka, A. Bezdek, and D. Tietz. 1998. Phylogeny of the Metazoa Based on Morphological and 18S Ribosomal DNA Evidence. *Cladistics* **14**:249-285.
- Zuckerandl, E., and L. Pauling. 1962. Molecular disease, evolution, and genic heterogeneity. Pp. 189–225 *in* M. Kasha, and B. Pullman, eds. *Horizons in Biochemistry*. Academic Press, New York.