

Stammbaum der Articulaten
(Infusorien, Vermen und Arthropoden)
Jordi Paps
Tesi Doctoral
2008

2008



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

Als X-Men, Spider-man i molts altres per induir-me l'interès per la ciència

A la meva família filogenètica

A la meva família, la Victòria, el Carles, la Laia i la Ramona

A la Sara

The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not 'Eureka!' (I found it!) but "That's funny"

Isaac Asimov

Introducció

La morfologia

Ales de papallona, balenes i cucs microscòpics	1
Els objectes d'estudi	2
La dreta i l'esquerra	3
Cavitats veritables, falses i no-cavitats	4
D'on ve la boca?	6
La filogènia de Hyman	7
Els problemes dels hereus de Hyman	8
No deixis que els arbres no et permetin veure el bosc	10
I amb tants arbres, com devia ser el primer organisme bilateral?	15

Les molècules

La revolució molecular	16
Filogènia molecular i els metazous	18
Hyman tenia raó	20
Conclusions del 18S	22
Problemes del 18S	23
Dades moleculars qualitatives	23
Noves molècules	25
Centenar de gens	27
Passat, present i futur	28

Objectius	29
-----------------	----

Resultats	31
-----------------	----

Capítol I: A phylogenetic analysis of Myosin Heavy Chain type II sequences corroborates that Acoela and Nemertodermatida are basal bilaterians	33
--	----

Capítol II: Ribosomal RNA genes and Bilateria phylogeny revisited: new insights into Lophotrochozoa internal phylogeny	45
--	----

Capítol III Bilaterian Phylogeny: A Wide Sampling for 13 Genes Provides a New Lophotrochozoa Phylogeny and Solves Some Elusive Relationships	81
--	----

Discussió

Estratègies	115
Quantitat i qualitat dels marcadors	117
Arbre resum	119
Evolució de les característiques principals dels animals	121
Clivellament	121
Evolució de les cavitats corporals	123
Fases larvàries	124
Cutícula i Ciliació epidèrmica	126
Reflexions finals	127

Conclusions	129
-------------------	-----

Bibliografia	131
--------------------	-----

Apèndix I Descripció dels fílums bilaterals

Els antics Acelomats.....	I
Un calaix de sastre, els antics Aschelminthes	III
Animals celomats, protostomats, espirals i no segmentats	IX
Animals celomats, protostomats i segmentats	X
Lophophorata	XIV
Deuterostomats.....	XVI
Incertae sedis, els animals de posició incerta	XVIII

Apèndix II

Altres publicacions

Introducció

La morfologia

"The time will come I believe, though I shall not live to see it, when we shall have fairly true genealogical trees of each great kingdom of nature"

Carta de Charles Darwin a Thomas Huxley, 1857

Ales de papallona, balenes i cucs microscòpics

Des que Darwin va postular que les espècies actuals provenen d'espècies anteriors, els estudiosos han provat de copsar la immensa varietat dels éssers vius mitjançant la filogènia. Els animals pluricel·lulars (els **Metazoa**) presenten una diversitat i bellesa desconcertants; trobem meravelles com els colors de les llebres de mar o les ales d'una papallona, la magnificència d'un lleó o una balena blava o l'encisadora simplicitat dels invertebrats microscòpics que viuen als sediments marins. Darwin ens va ensenyar que, malgrat les grans diferències entre aquests organismes, tots ells estan emparentats.

Abans de Darwin, els naturalistes van provar d'organitzar els objectes naturals en conjunts de coses similars, simplificant així la complexitat del món natural mitjançant la classificació, que és tant una eina com una forma de comprendre el món. En el passat, les classificacions es van desenvolupar sota la premissa **fixista** de que les espècies han restat inalterables des del dia que van aparèixer sobre la Terra. Així ho reflecteixen les classificacions realitzades des d'**Aristòtil** (la Gran Cadena del Ser, s. IV aC.) fins a **Georges Cuvier** (1769-1832), passant pel *Systema Naturae* (1735) del suec **Karl von Linne** (1707-1778). En general aquestes classificacions responien a criteris antropocèntrics, artificials o, en el millor dels casos, pràctics.

Però tot va canviar al 1859 quan **Charles Darwin** (1809-1882) va publicar *The Origin of Species by Means of Natural Selection*. En ell, Darwin demostrava que sí existia el canvi al món viu i aquest tenia lloc pel mecanisme de la selecció natural. Així els éssers vius canviaven a través de les generacions i, en conseqüència, les espècies actuals deriven d'espècies anteriors diferents. El propi Darwin va simbolitzar el funcionament de l'evolució de les espècies en la forma de les branques d'un arbre evolutiu (Fig. 1), alterant radicalment les classificacions dels éssers vius.

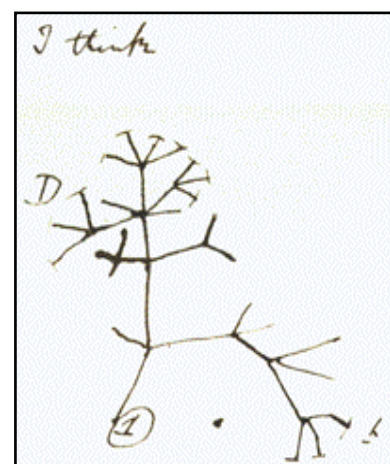


Fig. 1: esquema de Darwin explicant com creia que funcionava l'evolució

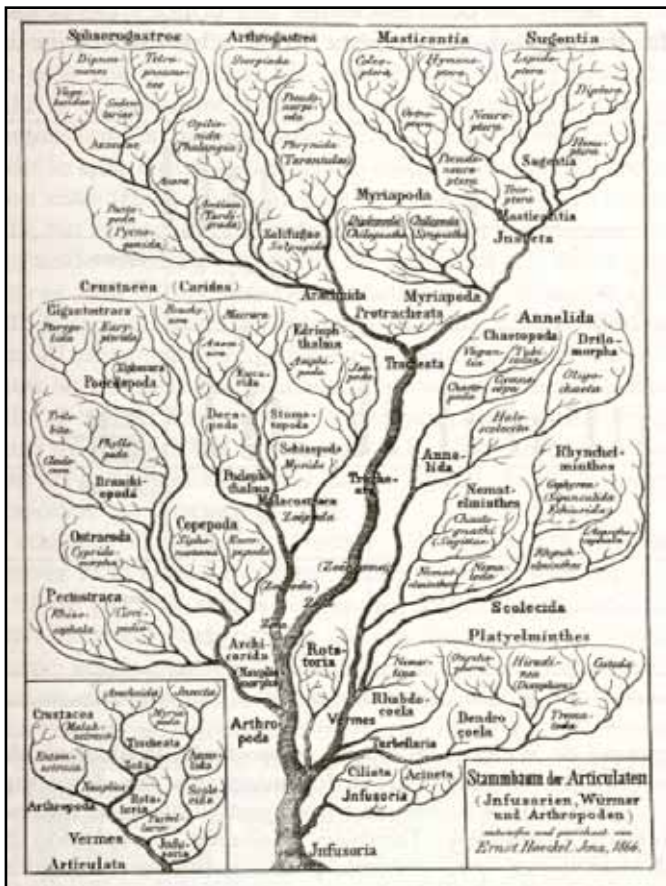


Fig. 2: arbre filogenètic dels Vermes (cucs) i els Artròpodes, per Haeckel a *Generelle Morphologie der Organismen* (1866).

Els objectes d'estudi

Tot i que la filogenia dels animals és única i natural, el seu estudi no ha estat fàcil. Durant el segle XX van aparèixer varies filogenies dels metazous que es diferenciaven tant per la tria dels caràcters morfològics analitzats com per la tècnica de classificació emprada. Actualment s'accepta l'existència d'uns **33 phyla**, o grups d'animals, que comparteixen característiques generals o de pla corporal. Per exemple, el *phylum Chordata* agrupa a tots els animals amb un tub neural dorsal, però dins del qual trobem formes tant diverses com una ascidia, un amfiox, un ximpanzé o un mamut.

Una de les filogenies animals "clàssiques" més referenciades és atribuïda a **Henrietta Libbie Hyman** (1888-1969). Hyman va treballar en la fisiologia de platihelminths i d'altres invertebrats. Al 1937, l'*American Museum of Natural History* de Nova York li va oferir un despatx i un laboratori, tot i que no un sou, per que escrivís un llibre sobre els invertebrats. Així va néixer *The Invertebrates*, una obra de 4000 pàgines en 6 volums (1940; 1951b; 1951a; 1955; 1959; 1967) que fins a la data no ha estat superada en magnitud per cap treball realitzat per un únic autor.

Després de Darwin ja no calia organitzar els organismes seguint normes artificials, ja que hi havia una única història natural de les espècies, una ordenació real dels éssers vius basada en les seves relacions de parentiu, els lligams entre avantpassats i descendents. Va néixer així la **Filogènia**, definida per **Ernst Heinrich Haeckel** (1834-1919), amic i defensor de Darwin. Haeckel va realitzar el primer arbre filogenètic dels animals (Fig. 2), basant-se en l'embriologia i anatomia comparades. Des de llavors, ja fa gairebé un segle i mig, s'ha provat de posar ordre a les relacions evolutives dels metazous mitjançant la filogenia.

Com ja s'ha dit, aquesta és una de les filogènies més populars dels metazous (Fig. 3). Curiosament no és tracta d'una veritable filogènia, si no de l'índex dels capítols de l'obra de Hyman, organitzats atenent a criteris pedagògics (Jenner 2000; Garey 2002). De fet Hyman sí proposava una filogènia dels animals, no tan coneguda, que es mostra més endavant. De totes formes, aquest esquema és un bon marc per presentar als protagonistes de la història natural dels animals. Descriurem ara les principals divisions de l'esquema de Hyman a on els phyla es troben agrupats segons el que es creia era el seu **grau de complexitat**, ordenant-se de més senzills a més complexes. Per una breu descripció de cadascun dels phyla, veure l'Apèndix I.

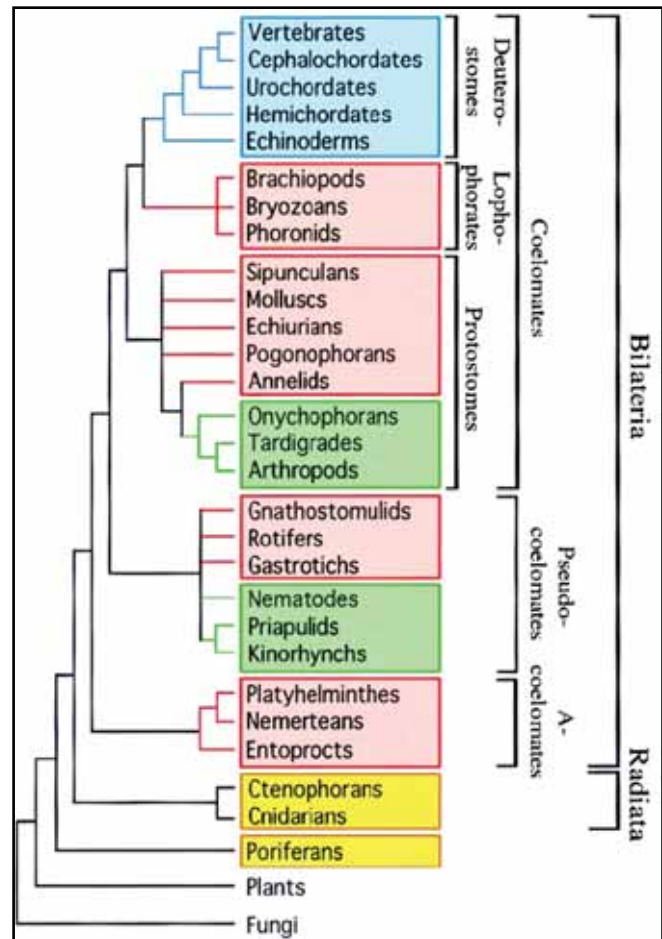


Fig. 3: filogènia dels Metazous erròniament atribuïda a Hyman; extret d'Adoutte *et al* (2000)

La dreta i l'esquerra

A l'esquema de Hyman, trobem una primera separació dels metazous en funció dels **plans de simetria**, plans que divideixen el cos en dos parts iguals que són la imatge especular l'una de l'altra. Segons aquest criteri, els animals es poden dividir en dos grans grups, els de simetria **radial (Radiata)** i els de simetria **bilateral (Bilateria)**. Els primers presenten **infinit plans de simetria** i un **únic eix corporal** (oral-aboral, Fig. 4 meitat inferior), i també s'anomenen **diploblàstics** perquè tenen dues fulles embrionàries, **endoderm** i **ectoderm** (respectivament la gastrodermis del sistema digestiu i l'epidermis que recobreix el cos); són diploblàstics els *Porifera* (esponges), els *Cnidaria* (pòlips i meduses) i els *Ctenòfors* (nous de mar). L'altre gran grup, els bilaterals, presenten un **únic pla de simetria** que divideix el cos en esquerra i dreta, i tenen el cos polaritzat al llarg de **dos eixos perpendiculars** (Fig. 4 meitat superior), l'**anteroposterior** o AP, que va del cap a la cua, i el **dorsoventral** o DV, que va d'esquena a ventre. A més, a l'embrió trobem una tercera fulla embrionària, el **mesoderm**, per la qual els bilaterals també es coneixen com **triploblàstics**. Més del 99% de les espècies animals existents, al voltant de 30 phyla, pertanyen als bilaterals. A què es deu el seu èxit evolutiu?

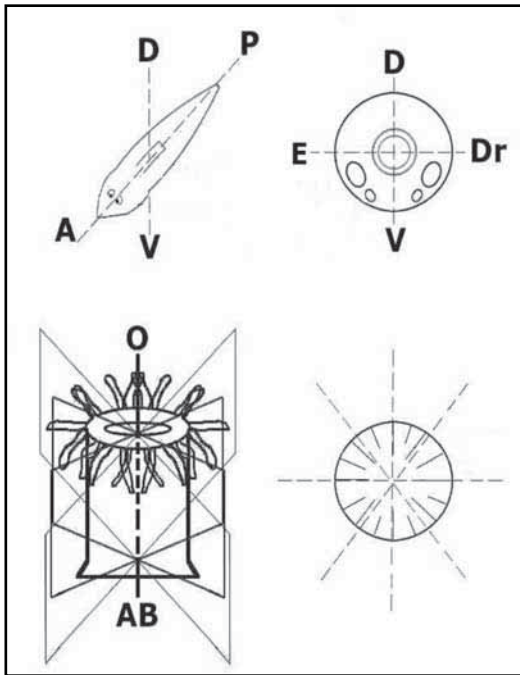


Fig. 4: simetria bilateral i radial. A la part inferior, esquema d'un organisme radial i tall transversal. A la part superior, esquema d'un bilateral i tall transversal del mateix, amb els eixos. A: anterior, P: posterior, D: dorsal, V: ventral, E: esquerra, Dr: dreta, O: oral, AB: aboral. Extret de Baguñà *et al* (2002).

Els radials són animals marins majoritàriament sèssils o que es troben suspesos a la columna d'aigua. En canvi, la majoria dels invertebrats bilaterals marins són mòvils i viuen sobre el fons marí. Els animals que viuen a la columna d'aigua han de buscar l'aliment en un ambient tridimensional, mentre que els que viuen al fons marí ho fan a un món bidimensional. La vida al substrat selecciona als animals amb una major concentració del sistema nerviós i dels òrgans sensorials a una banda del cos, seguint el principi de que és millor veure cap a on vas que d'on vens. Aquest procés s'anomena **cefalització** i donarà lloc a la polarització AP. Simultàniament apareix la polaritat DV, que especialitza una part dorsal enfrontada a l'ambient, que desenvolupa funcions protectores, i una part ventral en contacte amb el substrat, que s'especialitza en la locomoció. Per definició, quan aparèixen l'eix AP i el DV, obtens un bilateral.

A la vegada que la bilateralitat, també apareix el mesoderm, la tercera fulla embrionària, permetent un major repertori d'estructures que es poden especialitzar en diferents funcions i augmentar l'eficàcia de l'organisme. Així aquests primers bilaterals presentaven una **locomoció unidireccional** que els hi va permetre una millor exploració del medi, una cerca de l'aliment més activa i eficient i l'aparició de noves eines de supervivència, locomoció i defensa.

Cavitats veritables, falses i no-cavitats

La següent innovació evolutiva dels bilaterals és l'aparició de **cavitats corporals**. Als animals sense cavitats, els **acelomats**, el cos està farcit de parènquima (teixit connectiu), i els fluids corporals es troben als espais intercel·lulars d'aquest parènquima. Als acelomats la locomoció i la distribució d'elements dins del cos (nutrients, gasos, metabòlits, etc.) estan lligades als moviments del sistema digestiu; la capacitat de difusió dels elements a través dels teixits és restringida, limitant la grandària dels organismes. En canvi, als animals amb cavitats aquestes fan les funcions d'**esquelet hidrostàtic** (associat a la locomoció), de **mitjà de distribució dels elements** (p. ex. circulació, reproducció i excreció) i a més permeten l'aparició de **compartiments** dins del cos. Així, les cavitats

afecten als organismes a diferents nivells: 1) permeten que la locomoció s'independitzi dels moviments de tub digestiu i per tant aquest es pot especialitzar en l'absorció i la nutrició, 2) permeten una locomoció més eficient i l'aparició de noves formes de locomoció (p. ex. la capacitat de moure's sota el substrat accedint a nous recursos i estratègies), 3) la millor distribució d'elements dins del cos permet superar les limitacions fisicoquímiques de grandària dels acelomats i 4) les cavitats són un espai a on desenvolupar noves estructures, que gràcies als compartiments, es troben separades a diferents parts del cos permetent que s'especialitzin en distintes funcions.

La presència/absència de cavitats corporals va ser el caràcter utilitzat per Hyman per definir tres grans grups dins dels bilaterals. A la base dels triploblàstics situa els **Acoelomata**, animals sense cap cavitat corporal, seguits dels **Pseudocoelomata**, amb una "falsa" cavitat, i els seu clade germà els **Coelomata**, amb una cavitat "autèntica" (Fig 5). A nivell pràctic, determinar si un animal és acelomat, pseudocelomat o celomat no és fàcil, com tampoc ho és la distinció entre pseudoceloma i celoma; això és degut a que hi ha animals tant petits que la seva manipulació histològica és molt complicada. A més, les tècniques de microscòpia poden produir artefactes histològics que fan aparèixer cavitats a on no n'hi havia, o que no permeten diferenciar clarament un pseudoceloma d'un celoma. Això ha dut a polèmiques a l'hora de situar un fílum dins del diferents grups.

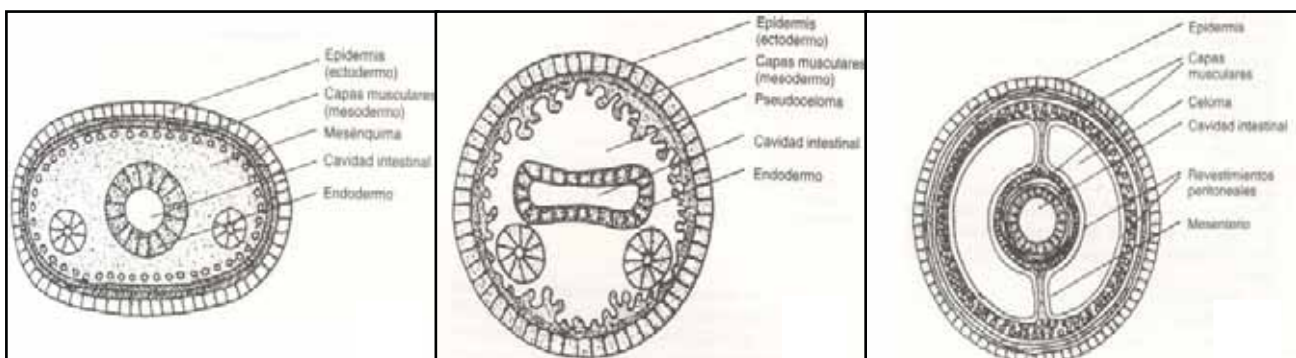


Fig. 5: cavitats corporals. Talls transversal d'un acelomat (esquerra), d'un pseudocelomat (centre) i un celomat (dreta). Extret de Rupert & Barnes (1995).

Als **acelomats** el cos és una massa compacte de teixit conjuntiu (Fig. 5A) i dins d'aquest grup Hyman situa als phyla *Platyhelminthes* i *Nemertea*. Altres autors també han inclòs en aquest grup als *Entoprocta* (Adoutte et al. 2000) i els *Gnathostomulida* (Halanych 2004), mentre que els *Gastrotricha* i els *Cycliophora* són dos phyla a on no s'han observat cavitats, però que no s'han classificat mai dins dels acelomats. Al següent grup de l'esquema trobem la dicotomia entre pseudocelomats i celomats. El **pseudoceloma** és una cavitat corporal primària (ja present a les primeres fases del desenvolupament) plena de fluid que envolta l'endoderm i el separa del mesoderm (Fig. 5B). Prové del **blastocel** de la blàstula o, en alguns casos, apareix per la cavitació del mesoderm, i està limitat per matriu extracel·lular, en contraposició a l'epiteli circumdant dels veritables celomes. Als

pseudocelomats trobem molts phyla, generalment cucs marins, que clàssicament es coneixien com **Aschelminthes** (veure Apèndix I). Els pseudocelomats no presenten **segmentació corporal** (amb l'excepció dels cinorincs) i els patrons de **clivellament** varien depenent del fílum (Ruppert and Barnes 1995). Es diu sovint que els pseudocelomats o "asquelmints" són un calaix de sastre, ja que inclouen tots aquells fílums que no encaixen com a acelomats o celomats. Hyman situava dins d'aquest grup a *Entoprocta*, *Gastrotricha*, *Priapulida*, *Kinorhyncha*, *Nematoda*, *Nematomorpha* i *Rotifera*. Altres autors han afegit a aquest grup els phyla *Acantocephala*, *Chaetognatha*, *Loricifera*, *Tardigrada*, *Gnathostomulida*, *Micrognathozoa* i *Cycliophora* (veure revisió a Schmidt-Rhaesa 2003). Tot i que avui en dia el terme "asquelmints" no té cap validesa filogenètica, encara es fa servir als llibres de text per conveniència. Finalment, la resta d'animals es troben dins dels **celomats**, a on el celoma no es forma a partir d'una cavitat de l'embrió, si no que apareix *de novo* (i per això es diu que és una cavitat secundària). EL celoma es troba recobert per un **epitel·li d'origen mesodèrmic** que millora la permeabilitat i la regulació de la distribució d'elements.

D'on ve la boca?

Els celomats es divideixen en tres grups en base als seus trets embriològics: **Protostomata**, **Deuterostomata** i **Lophophorata**. Els **protostomats** ("boca primària") són animals a on el blastopor (l'orifici que apareix a la blàstula) persisteix i dona lloc a la boca, o en alguns casos a la boca i l'anús (a alguns molluscs, onicòfors i poliquets); la majoria dels protostomats originen el mesoderm des de la **cèl·lula 4d** i el celoma es forma per **esquizocèlia** (proliferació i migració de cèl·lules del mesoderm). Seguint l'esquema atribuït a Hyman, són protostomats *Sipuncula*, *Echiura*, *Mollusca*, *Annelida*, *Onychophora* i *Arthropoda*. Als **deuterostomats** ("boca secundària") el blastopor dona lloc a l'anús, i la boca apareix *de novo*, mentre que el celoma es forma per **enterocèlia** (provenen d'unes "butxaques" que es formen a l'endoderm). Són deuterostomats els *Hemichordata*, els *Echinodermata* i els *Chordata*. Abans dels anys 60 també es situaven als *Pogonophora* dins dels deuterostomats, però els seus trets havien estat mal interpretats. Tanmateix Hyman va situar als *Chaetognatha* com deuterostomats, però la seva posició filogenètica real és incerta.

Els **lofoforats** (també anomenats **Tentaculata**) reben el seu nom per la presència d'una estructura d'alimentació tentacular anomenada lofòfor. El blastopor dona lloc a la boca, tenen **celoma**, que pot aparèixer per ambdós processos, **enterocèlia** i **esquizocèlia** i el seu **clivellament és radial**. Les excepcions les trobem als entoproctes, que no presenten celoma i a on el clivellament és espiral, i en els braquiòpodes, a on el **blastopor dona lloc a l'anús**. Altres característiques dels lofoforats els fan similars als hemicordats o als equinoderms i per això els lofoforats s'han vinculat sovint amb els deuterostomats.

Hyman va reunir dins dels lofoforats a *Phoronida*, *Brachiopoda* i *Bryozoa*. Més endavant els briozous es van separar en dos phyla, *Entoprocta* i *Ectoprocta*. Els principals trets dels tres grups de celomats es poden trobar a la següent taula.

	Protostomats	Deuterostomats	Lofoforats
Origen de la boca	Blastopor	Es forma <i>de novo</i>	Es forma <i>de novo</i> (?)
Clivellament	Espiral determinat	Radial indeterminat	Radial indeterminat (?)
Origen del celoma	Esquizocèlia	Enterocèlia	Enterocèlia i esquizocèlia
Sistema nerviós	Ventral	Dorsal	Heteroneures

Taula 1: resum de les principals característiques embriològiques dels tres grups de celomats: Protostomats. Deuterostomats i Lofoforats.

La filogènia de Hyman

L'esquema de Hyman comentat fins ara organitza l'evolució animal segons una tendència implícita cap a l'increment de la complexitat: radials vs bilaterals, acelomats-pseudocelomats-celomats i dins de celomats, la separació entre protostomats, lofoforats i deuterostomats. Però com ja s'ha esmentat, si bé l'esquema de Hyman és útil per veure els diferents plans corporals que existeixen i quines característiques son similars entre els phyla, no és un autèntic arbre filogenètic. La filogènia de Hyman real (Fig. 6) te alguns punts en comú amb l'esquema, però presenta algunes diferències clau.

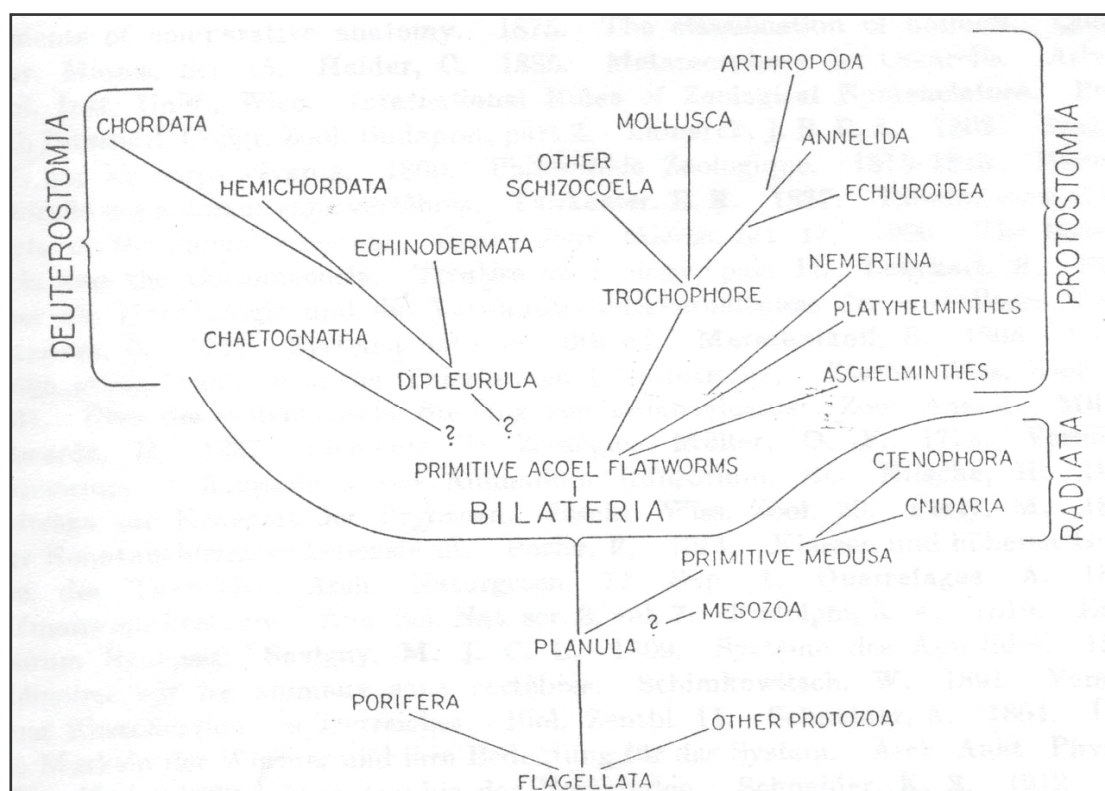


Fig. 6: veritable filogènia de Hyman (1940)

Hyman fa derivar als metazous a partir de **protistes flagel·lats**, a través d'un animal similar a la **larva plànula** dels cnidaris, que donaria lloc per una banda als radials/diploblàstics i per l'altre als bilaterals/triploblàstics. Les larves plànules presenten moltes similituds amb els platihelminths, i segons Hyman una forma d'acel seria l'ancestre comú a tots els triploblàstics. Els animals bilaterals es dividrien en protostomats i deuterostomats, desapareixent la divisió acelomats-pseudocelomats-celomats. Els protostomats presenten tres branques principals: els acelomats (platihelminths i nemertins), els pseudocelomats o "asquelmints" i una tercera branca formada per animals derivats d'una larva trocòfora (tot i que els artròpodes no en presenten). Aquest tercer grup també comprèn als "other schizocoela", que es corresponen amb els lofoforats als que Hyman va assignar un celoma esquizocèlic. Dins dels deuterostomats hi ha dos llinatges, per una banda el que porta als cordats, hemicordats i equinoderms (que deriven d'una larva diplèurula arquetípica) i per l'altre els quetognats (tot i que la pròpia Hyman posa un interrogant en aquestes branques).

Si es compara l'esquema de Hyman amb la seva filogènia, veiem que a la segona predominen les fases larvàries i l'origen del celoma com a criteris per establir les agrupacions. La tendència a l'increment de complexitat perd força, ja que dins d'un mateix grup, els protostomats, trobem tant acelomats com pseudocelomats i celomats. Si bé el concepte de complexitat creixent encara hi és parcialment implícit amb la posició dels acels primitius com a ancestre dels triploblàstics. Amb les dades existents en aquella època, les filogènies eren molt especulatives; així ho va expressar la pròpia Hyman: "*Anything said on these questions lies in the realm of fantasy*". Després de Hyman, molts autors van desenvolupar filogènies alternatives mitjançant reinterpretacions dels caràcters morfològics o a partir de caràcters desconeguts anteriorment. Però moltes de les divisions principals de Hyman encara són vigents, i bé es podria dir que tota la filogènia morfològica actual és només una nota a peu de pàgina de l'obra de Hyman.

Els problemes dels hereus de Hyman

Un any abans de la publicació de l'últim volum de l'obra de Hyman, es va publicar *Phylogenetic Systematics* (1966), una traducció a l'anglès del llibre *Grundzüge einer Theorie der Phylogenetischen Systematik*, escrit per **Willi Hennig** (1913-1976) al 1950. La traducció va tenir una difusió molt ampla i va revolucionar profundament la metodologia filogenètica, donant lloc a la **cladística**. Els postulats bàsics de la cladística són 1) en una filogènia les relacions entre els taxa han de ser **estrictament genealògiques** (els arbres han de representar relacions dicotòmiques de parentiu entre els llinatges), 2) per establir un ancestre comú entre dos grups cal trobar **caràcters homòlegs derivats i compartits (sinapomorfies)**, 3) entre hipòtesis filogenètiques alternatives es tria aquella que és recolzada pel màxim nombre de

sinapomorfies (aquest postulat s'anomena el principi auxiliar de Hennig) i 4) quan sigui possible, la taxonomia ha de ser consistent amb la filogènia, i per tant només es poden definir grups taxonòmics que siguin **monofilètics** (que contenen a l'ancestre comú del grup i tots els seus descendents). El producte de la metodologia cladista són els **cladogrames**, arbres filogenètics en els quals s'indiquen les sinapomorfies que defineixen cada grup.

Després de Hyman, es van proposar noves filogènies a on s'aplica la filosofia cladística a la sistemàtica dels metazous (Figs. 7 i 8). Malgrat la unificació metodològica aportada per la cladística i l'aparició de noves dades (sobretot del camp de la microscòpia electrònica), la filogènia dels metazous basada en dades morfològiques és un camp controvertit. Algunes de les principals divisions dels metazous proposades per Hyman son acceptades avui en dia, però les relacions específiques entre els diferents phyla o els grans grups són encara objecte de debat. Abans de Hennig, molts dels arbres es basaven en alguna assumpció prèvia, com per exemple un increment de complexitat en l'evolució o que determinats caràcters tenen més valor filogenètic que uns altres, idea reflexada per les sinapomorfies que defineixen els grups. Després de Hennig, les incongruències entre diferents filogènies cladístiques eren causades per diferències a l'hora d'establir l'homologia entre diferents caràcters, per com es codificaven els caràcters a les matrius morfològiques, i per l'assumpció de que els caràcters d'un o pocs representats d'un grup eren representatius de tot el grup.

Un altra de les dificultats de la morfologia deriva del fenomen anomenat **explosió càmbrica**. La problemàtica de l'explosió càmbrica es pot descomposar en tres components: 1) la seva velocitat, 2) la seva antiguitat i 3) la manca de grups intermediaris. Els primers rastres fòssils dels metazous daten de fa 700 ma (Conway Morris 2003), i els fòssils de tots els fílums coneguts de bilaterals apareixen sobtadament en un període de temps geològic molt curt, uns 50 ma, als estrats del **Cambrià** (fa uns 545 ma). Aquesta **aparició ràpida** s'ha interpretat com un reflex d'una radiació evolutiva real, en la que els principals grups animals van aparèixer ràpidament, i s'ha anomenat explosió càmbrica; aquest esclat de plans corporals s'ha explicat en base a canvis ambientals o a l'aparició de la bilateralitat i el mesoderm, factors que haurien permès molts experiments evolutius en un espai de temps curt. Un altre punt de vista sobre l'explosió càmbrica és que només es tracta d'un artefacte del registre fòssil, a on simplement veiem una fracció del que va passar i que produeix la falsa percepció d'una cladogènesi veloç.

A més de ràpida, l'aparició dels animals és molt **antiga**, i des d'aleshores els grups actuals han evolucionat independentment els uns dels altres; és probable que moltes característiques originals hagin estat "esborrades" per innovacions evolutives posteriors pròpies. Potser aquests trets desapareguts eren originalment sinapomorfies entre llinatges actuals, però s'han perdut a través dels milions d'anys. Finalment, als jaciments càmbrics es

troben fòssils de grups que no existeixen avui en dia i que podrien ser els **intermediaris** entre grups actuals. Aquests possibles intermediaris presentarien trets que són el lligam entre els grups actuals, però per desgràcia, hi ha determinada informació que no es pot aconseguir a partir dels fòssils, com per exemple els trets embriològics. A més, l'absència d'aquests intermediaris fa que els arbres moderns basats en els representants actuals dels metazous estiguin en certa manera "podats".

Així, una radiació ràpida amb poc temps per acumular sinapomorfies, la desaparició de sinapomorfies a través del temps i l'absència d'organismes intermediaris podrien explicar el dèficit d'informació morfològica, problemes que s'haurien d'afegir a la dificultat d'estudiar alguns trets en determinats animals actuals (com la presència o no de cavitats i la distinció entre pseudoceloma i celoma) i la subjectivitat dels autors. Però tots aquests problemes no han fet que els biòlegs evolutius s'aturin a l'hora de proposar noves filogènies dels metazous.

No deixis que els arbres no et permetin veure el bosc

Existeixen multituds d'arbres dels metazous, però si l'esquema morfològic de Hyman és potser el més popular, l'arbre cladístic del danès Claus Nielsen (Fig. 7, 1995; 2001) quedaria en segon lloc. A la filogènia de Nielsen els radials són parafilètics, ja que considera que els ctenòfors són triploblàstics, i els bilaterals són monofilètics. Dins dels bilaterals separa protòstoms de deuteròstoms i reparteix als lofoforats entre els dos grups: els antics briozous (entoproctes i ectoproctes) estarien dins dels protòstoms i els forònids i braquiòpodes als deuteròstoms. Dins dels protòstoms trobem en embrancaments successius: 1) als quetognats, 2) els pseudocelomats constituïts per dos grups separats i 3) als acelomats com a grup germà dels protostomats celomats. Aquests protostomats celomats són equivalents als de la filogènia de Hyman, a on provenien d'un ancestre similar a una larva trocòfora. Dins dels protostomats celomats, els anèl·lids i els artròpodes (i

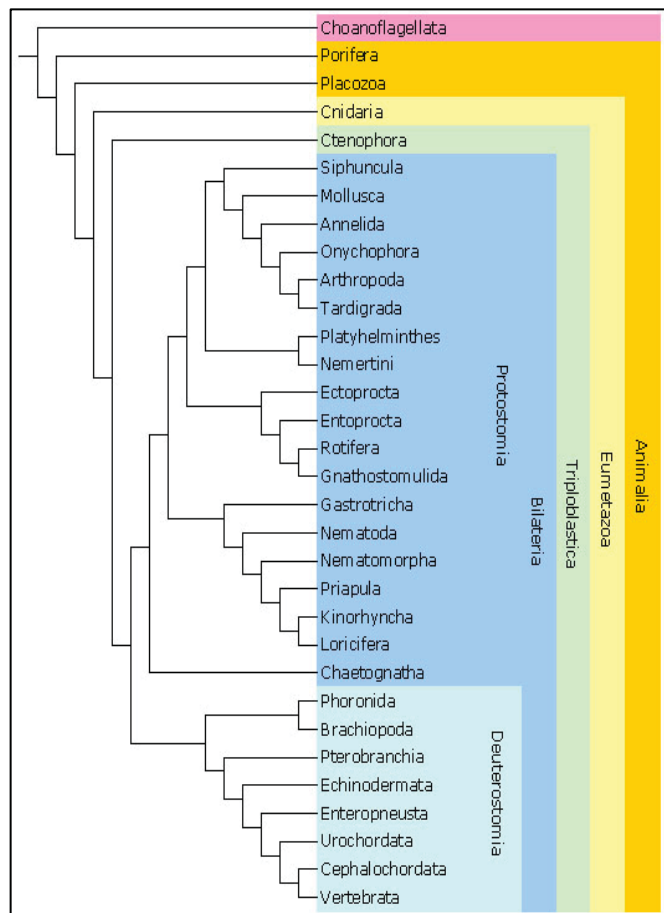


Fig. 7: filogènia de Nielsen (2001).

els seus relatius onicòfors i tardígrads) estan agrupats en el clade **Articulata**, grup que apareix molt freqüentment a les filogènies morfològiques. L'altre gran branca dels bilaterals seria la dels deuterostomats. El clade format per forònids i braquiòpodes seria el grup germà dels deuteròstoms de Hyman.

Cal destacar que aquesta filogènia de Nielsen prové de l'aplicació de la metodologia derivada del cladisme, i per tant no es tracta d'un arbre especulatiu com el de Hyman o els anteriors a Hennig. Nielsen també trenca la idea d'una complexitat creixent a l'evolució, com es pot veure en el cas "senzills" acelomats agrupats amb els protòstoms celomats, i tots ells anuats dins dels pseudocelomats. En canvi Hyman situava com a intermediaris entre els radials i els bilaterals uns animals d'anatomia sezilla com els platihelminths acels, implicant certa tendència a una complexitat creixent, idea que no apareix a l'arbre de Nielsen. Molts altres arbres moderns segueixen un perfil similar al de Nielsen, en els quals no es troben organismes intermediaris, i les discrepàncies entre ells són similars a les de Nielsen i Hyman: la posició i monofília de grans grups com els pseudocelomats i els lofoforats, i la situació de phyla concrets com els acelomats, quetognats i altres d'afiliació incerta.

Com a resum es presenta a continuació una selecció dels arbres filogenètics més rellevants (Fig. 8) així com les principals agrupacions taxonòmiques proposades en base a la filogènia morfològica (Taula 2). El fet de que el mateix conjunt de fílums rebi diferents noms indica com els autors discrepen en les sinapomorfies que defineixen als seus integrants. Cal destacar que, paradoxalment, hi ha certa tendència a que els arbres més moderns presentin més incertesa, reflexada en forma de major presència de politomies als arbres.

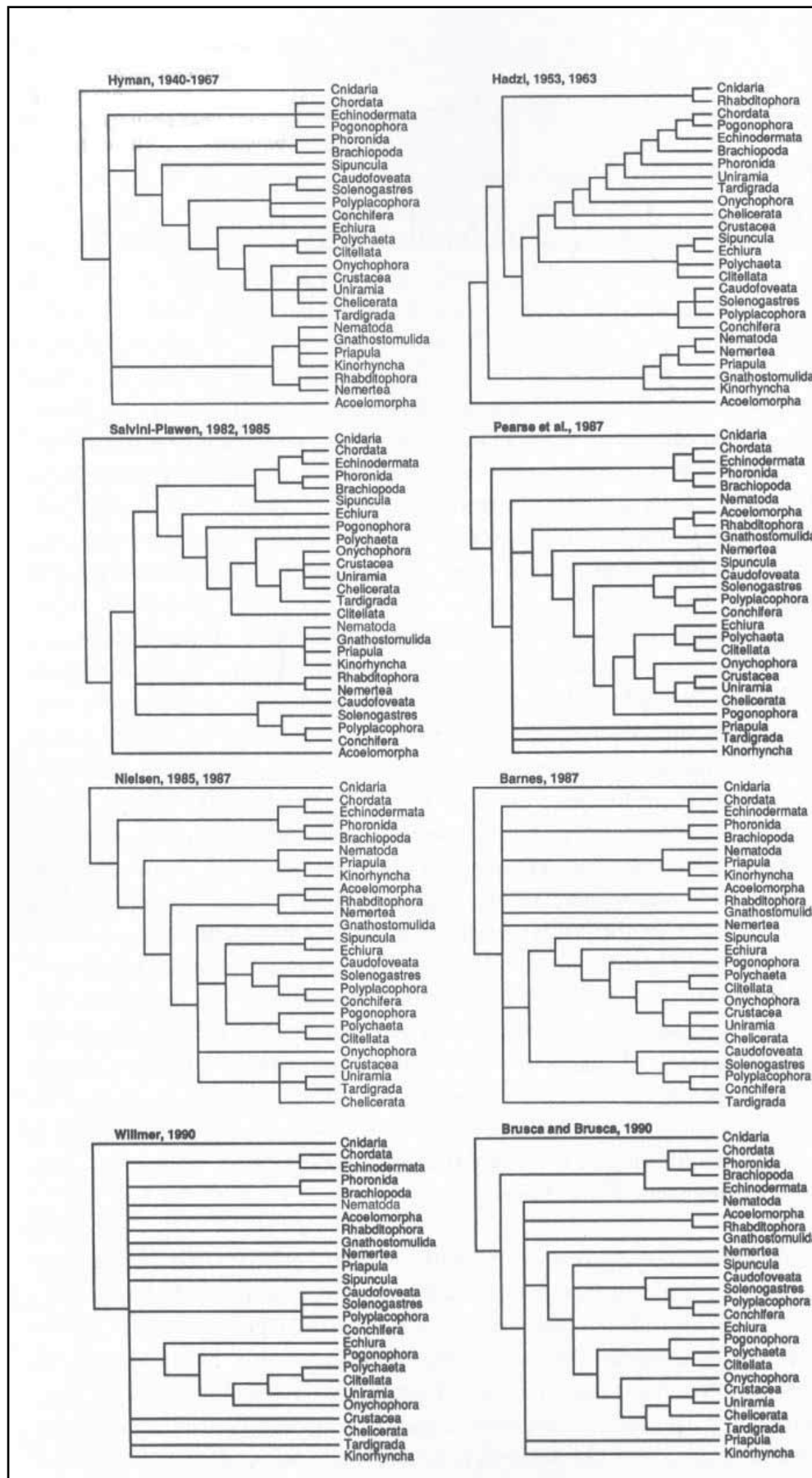


Fig. 8: resum de les principals filogènies morfològiques del segle XX; extret de Valentine (2004)

Taula 2: agrupacions més freqüents als arbre filogenètics moderns. Cada clade va seguit dels llistat de fílums que l'integren i a quin treball es van definir. S'indiquen tant les sinonímies (*syn.*) considerades pels mateixos autors com les equivalències d'aquests grups amb els d'altres treballs (amb un signe igual). Es destaquen en negreta aquells fílums que s'han afegit respecte treballs anteriors i s'indiquen els exclosos. Modificat des de Tree of Life Web Project (ToL).

1. ACOELOMATA

1. Acoelomata

Hyman 1951: *Platyhelminthes* i *Nemertea* (= **Parenchymia Nielsen 2001**)

2. PSEUDOCOELOMATA

2. Pseudocoelomata

Hyman 1951: *Entoprocta*, *Gastrotricha*, *Priapulida*, *Kinorhyncha*, *Nematoda*, *Nematomorpha* i *Rotifera*.

Lorenzen 1985: *Gastrotricha*, *Priapulida*, *Kinorhyncha*, *Loricifera*, *Nematoda*, *Nematomorpha* i *Rotifera* (exclou *Entoprocta*).

Kristensen & Funch 2000: *syn. Aschelminthes*: *Gastrotricha*, *Priapulida*, *Kinorhyncha*, *Loricifera*, *Nematoda*, *Nematomorpha*, ***Gnathostomulida***, *Rotifera* i ***Micrognathozoa*** (exclou *Entoprocta*).

2.1. Aschelminthes

Hyman 1951: *Gastrotricha*, *Priapulida*, *Kinorhyncha*, *Nematoda*, *Nematomorpha* i *Rotifera* (no inclou *Loricifers*, que encara no s'havien descobert).

Nielsen 1995: ***Chaetognatha***, *Gastrotricha*, *Priapulida*, *Kinorhyncha*, *Loricifera*, *Nematoda*, *Nematomorpha* i *Rotifera*.

Ehlers & al. 1996: *syn. Nemathelminthes*: *Gastrotricha*, *Priapulida*, *Kinorhyncha*, *Loricifera*, *Nematoda* i *Nematomorpha* (no inclou *Rotifera*).

Kristensen & Funch 2000: *syn. Pseudocoelomata*: *Gastrotricha*, *Priapulida*, *Kinorhyncha*, *Loricifera*, *Nematoda*, *Nematomorpha*, ***Gnathostomulida***, *Rotifera* i ***Micrognathozoa***.

2.1.1. Cycloneuralia

Ehlers & al. 1996, Peterson & Eernisse 2001: *Priapulida*, *Kinorhyncha*, *Loricifera*, *Nematoda* i *Nematomorpha* (= ***Introverta Nielsen 2001***).

Nielsen 2001: ***Gastrotricha***, *Priapulida*, *Kinorhyncha*, *Loricifera*, *Nematoda* i *Nematomorpha*.

2.1.2. Scalidophora

Ehlers & al. 1996, Peterson & Eernisse 2001: *Kinorhyncha*, *Loricifera* i *Priapulida* (= ***Scalidorhyncha Cavalier-Smith 1998***, = ***Cephalorhyncha Zrzavy & al. 1998, Nielsen 2001***).

2.1.3. Nematoidea

Ehlers & al. 1996: *Nematoda* i *Nematomorpha* (= ***Nematoida Cavalier-Smith 1998, Peterson & Eernisse 2001***, = ***Nematozoa Zrzavy & al. 1998***).

Continua de la pàgina anterior.

3. EUCOELOMATA

3. Eucoelomata

Hyman 1940: Annelida, Arthropoda, Mollusca, Sipuncula, **Lophophorata** i **Deuterostomia**.

3.1. Deuterostomia

Hyman 1959: *syn. Enterocoela*: Chaetognatha (dubtós), Chordata, Echinodermata i Hemichordata.

3.2. Lophophorata

Hyman 1959: Brachiopoda, Bryozoa (Entoprocta i Ectoprocta) i Phoronida.

3.3. Spiralia

Nielsen 1995: Onychophora, Tardigrada, Arthropoda, Platyhelminthes, Annelida, Mollusca, Nemertea, Sipuncula, Ectoprocta, Entoprocta i Gnathostomulida.

Ax 1996: Onychophora, Arthropoda, Platyhelminthes, Annelida, Mollusca, Nemertea, Sipuncula, Entoprocta i Gnathostomulida (no inclou Tardigrada ni Ectoprocta).

Garey & Schmidt-Rhaesa 1998: Platyhelminthes, Annelida, Mollusca, Sipuncula, Ectoprocta, Entoprocta, **Phoronida**, **Brachiopoda**, Gnathostomulida, **Rotifera** i **Gastrotricha** (exclouen als Nemertea, Arthropoda, Tardigrada i Onychophora).

Nielsen 2001: Onychophora, Tardigrada, Arthropoda, Platyhelminthes, Annelida, Mollusca, Nemertea, Sipuncula, Entoprocta, Ectoprocta, Gnathostomulida, **Micrognathozoa**, Rotifera i **Chaetognatha**.

Peterson & Eernisse 2001: Platyhelminthes, Annelida, Mollusca, Nemertea, Sipuncula, Ectoprocta, Entoprocta, Gnathostomulida, Rotifera i **Cycliophora** (exclouen als Arthropoda, Tardigrada i Onychophora).

3.3.1. Euspiralia

Ax 1996: Onychophora, Arthropoda, Annelida, Mollusca, Nemertea, Sipuncula i Entoprocta.

3.3.1.1. Panarthropoda

Nielsen 2001, Peterson & Eernisse 2001: Arthropoda, Onychophora i Tardigrada.

3.3.1.2. Trochozoa

Zrzavy & al. 1998: Annelida, Mollusca, Nemertea, Sipuncula, Entoprocta i Cycliophora.

Ax 2000: **Arthropoda**, Annelida, Mollusca, Sipuncula i Entoprocta (exclou Nemertea i Cycliophora).

Peterson & Eernisse 2001: Annelida, Mollusca, Nemertea, Sipuncula i Entoprocta (exclou Cycliophora).

3.3.1.2.1. Eutrochozoa

Ghiselin 1988: Annelida, Mollusca, Sipuncula i Brachiopoda.

Zrzavy & al. 1998, Peterson & Eernisse 2001: Annelida, Mollusca, Sipuncula i **Nemertea** (exclou Brachiopoda).

I amb tants arbres, com devia ser el primer organisme bilateral?

Ja des d'abans de Hyman hi han hagut moltes discussions sobre l'origen dels bilaterals i els grups d'anatomia senzilla (acelomats i pseudocelomats), mostrant com les assumpcions prèvies afecten la inferència filogenètica. Alguns autors defensen un primer bilateral complex (*Urbilateria*) que ja presentava trets com un celoma enterocèlic com el dels deuterostomats, i fins hi tot en algunes hipòtesi, la segmentació i la metameria. L'esquizocèlia dels protostomats derivaria de l'enterocèlia i els organismes senzills s'haurien simplificat secundàriament bé per adaptacions a la vida paràsita, o bé per la reducció de grandària corporal per adaptar-se a la vida als sediments del fons marí;. Aquestes teories col·lectivament reben el nom "**d'hipòtesi de l'archicelomat**" i presenten diferents variacions: la **hipòtesi de la gastrea** (Haeckel, 1874; Sedgwick, 1884), de la **bilaterosgastrea** (Jägersten, 1955), de la **trochaea** (Nielsen, 1985) i de les **set-aside cells** (Davidson *et al.*, 1995).

En canvi, altres autors defensaven un **ancestre acelomat** (com per exemple l'acel de Hyman), probablement amb clivellament espiral. A partir d'aquest animal sorgirien independentment el celoma esquizocèlic als protostomats i el celoma enterocèlic als deuterostomats. Per tant els grups senzills actuals són els representants de formes animals antigues, a partir de les quals haurien aparegut animals amb trets més complexes, com per exemple el celoma, la segmentació o la metameria. Per tant, hi hauria una tendència cap a l'increment de complexitat en l'evolució dels animals. Trobem dins d'aquesta línia de pensament la **teoria planuloide-aceloide** (von Graft, 1882; Metchnikoff, 1883; Hyman, 1951; Salvini Plawen), que fa derivar un primer bilateral acelomat des d'una larva plànula dels cnidaris i que és molt freqüent als llibres de text anglosaxons. Una altre és la **teoria sincítica** (Hadzi, 1953, 1963; Steinböck, 1963; Hanson, 1963, 1977), més especulativa i que en base a similituds superficials deriva els acels a partir d'un ciliat que es cel·lularitza; a partir d'aquest acel ancestral sorgirien els diploblàstics (que s'haurien simplificat i perdut la bilateralitat i el mesoderm) i els triploblàstics.

Les molècules

"The key element in deciphering the Cambrian explosion is to integrate the expanding insights of molecular phylogeny and developmental biology with the totality of paleontological evidence"

Simon Conway-Morris

La revolució molecular

Mentre tenien lloc els debats entre les filogènies morfològiques, va aparèixer una nova disciplina que revolucionaria la filogènia: la biologia molecular. La biologia molecular permet estudiar i analitzar les molècules biològiques i una de les seves principals aportacions al camp de la filogènia ha estat la seqüenciació de proteïnes i àcids nucleics. Al comparar les seqüències de diferents organismes es va veure que el nombre de diferències entre ells era aproximadament proporcional al seu temps de divergència (Zuckerkandl and Pauling 1962). L'existència d'aquest **rellotge molecular** va fer pensar que era possible esbrinar les relacions evolutives dels éssers vius mesurant les diferències genètiques entre ells.

Els mateixos Zuckerkandl i Pauling eren conscients d'alguns problemes d'aquesta aproximació. Per exemple, la taxa de canvi pot variar a través del temps o entre diferents llinatges, majoritàriament fruit de l'acció de la selecció natural a nivell molecular. Kimura va proposar que la major part de l'evolució molecular no es veu afectada per la selecció natural (Kimura 1968) i aquesta idea es va aplicar al desenvolupament dels primers algoritmes filogenètics. Aquests van començar amb models d'evolució molt senzills però que amb el temps s'han anat fent més complexos per acomodar-se a l'observació de diferents processos, com per exemple la variació en les taxes de canvi. Avui en dia la idea d'un rellotge molecular exacte ja no és acceptada, però va ser la llavor per desenvolupar un marc teòric sobre l'evolució dels gens, marc d'on va néixer la **filogènia molecular**.

Les dades moleculars presenten moltes avantatges. La quantitat de dades a les molècules biològiques és immensa i permeten quantificar les diferències entre els grups fàcilment i de forma objectiva; molts mètodes filogenètics moleculars donen lloc a arbres a on la longitud de cada branca és una estimació de la diferenciació genètica de cada llinatge. A més, les metodologies emprades permeten quantificar el grau de suport estadístic de les diferents hipòtesis. Es poden fer servir diferents molècules, que han evolucionat independentment per respondre una mateixa pregunta. I a l'hora de treballar amb DNA, les dades són generalment d'obtenció fàcil i ràpida.

Però la filogenia molecular també té els seus inconvenients. En el cas del DNA, només hi ha quatre estats de caràcter (les bases nucleotídiques A, C, T i G). Això pot generar problemes d'**homoplàsia** quan dos taxa comparteixen una mateixa base per atzar i no per que l'hagin heretat d'un ancestre comú. Un altre problema és la **saturació**: quan es compara un gen entre dues espècies, si la taxa de canvi del gen és massa alta, el nombre de diferències observades és inferior al nombre de canvis reals; això es deu a que una mateixa posició pot haver patit més d'un canvi des de la separació de les dues espècies, però a les seqüències actuals només es pot veure si aquella posició és igual (cap canvi) o diferent (un canvi). La saturació empitjora quan més llunyanes són les espècies comparades, quan més gran és la taxa de substitució i també és font d'homoplàsia. Un tercer problema són els taxa **fast-clock**, organismes a on el gen estudiat presenta taxes de canvi nucleotídic molt més altes que la resta dels organismes de l'arbre. Aquests organismes presenten branques molt llargues; la gran divergència d'aquestes seqüències fa que tendixin a agrupar-se entre elles a l'arbre. A més, al ser tan diferents del grup estudiat (**ingroup**) són propenses a situar-se a prop del grup extern de referència (**outgroup**). Per tot això, els organismes *fast-clock* d'un arbre es situen de forma artefactual tots junts i en ocasions a una posició propera a l'outgroup, fenomen conegut com **Long-branch attraction** (LBA; Felsenstein 1978)

Avui en dia existeixen mètodes filogenètics que permeten, en menor o major grau, detectar i solventar tots aquests problemes. S'han desenvolupat sofisticades modificacions dels models evolutius així com metodologies com la **Màxima Versemblança** i, en els darrers anys, la **Inferència Bayesiana** que tenen en compte aquestes alteracions. La **Màxima Parsimònia** és un altre mètode d'inferència filogenètica, una adaptació de la metodologia cladística a les dades moleculars i que no es basa en un model evolutiu explícit. Cada metodologia té les seves avantatges i inconvenients, discutides més en profunditat en els capítols dels resultats. Tot i que les anàlisi moleculars són fàcilment reproduïbles, determinats estudis semblen ser molt sensibles a la metodologia emprada i al mostratge dels taxa (quantes i quines seqüències s'han fet servir). Cada autor té accés a unes dades determinades i aplica els seus criteris a l'hora de triar la metodologia per analitzar-les, el que pot donar lloc a resultats diferents. Aquestes diferències han dut en algunes ocasions a que es posi en dubte la total objectivitat de la filogenia molecular.

Filogenia molecular i els metazous

Les dades moleculars es van presentar com una bona resposta a les problemàtiques de la filogenia dels metazous plantejades anteriorment. Un dels gens més informatius ha estat el del **RNA de la subunitat petita del ribosoma** (el **18S**). Els inicis van ser tímids, bàsicament per que el nombre de seqüències de 18S d'animals no era prou representatiu de la diversitat del grup i produïen grans desacords amb el paradigma evolutiu provinent de la morfologia. Un dels primers estudis va ser el de Field i col·laboradors (1988), a on es van analitzar 22 seqüències de 18S pertanyents a 10 fílums. L'outgroup estava constituït per protistes, plantes i fongs. Els metazous apareixien polifilètics ja que els cnidaris tenien un origen independent de la resta d'animals. Lake (1990) va desenvolupar un nou mètode d'inferència (mètode invariant) i va fer servir els cnidaris com a outgroup. L'arbre obtingut (Fig. 9) recupera la separació entre deuterostomats i protostomats.

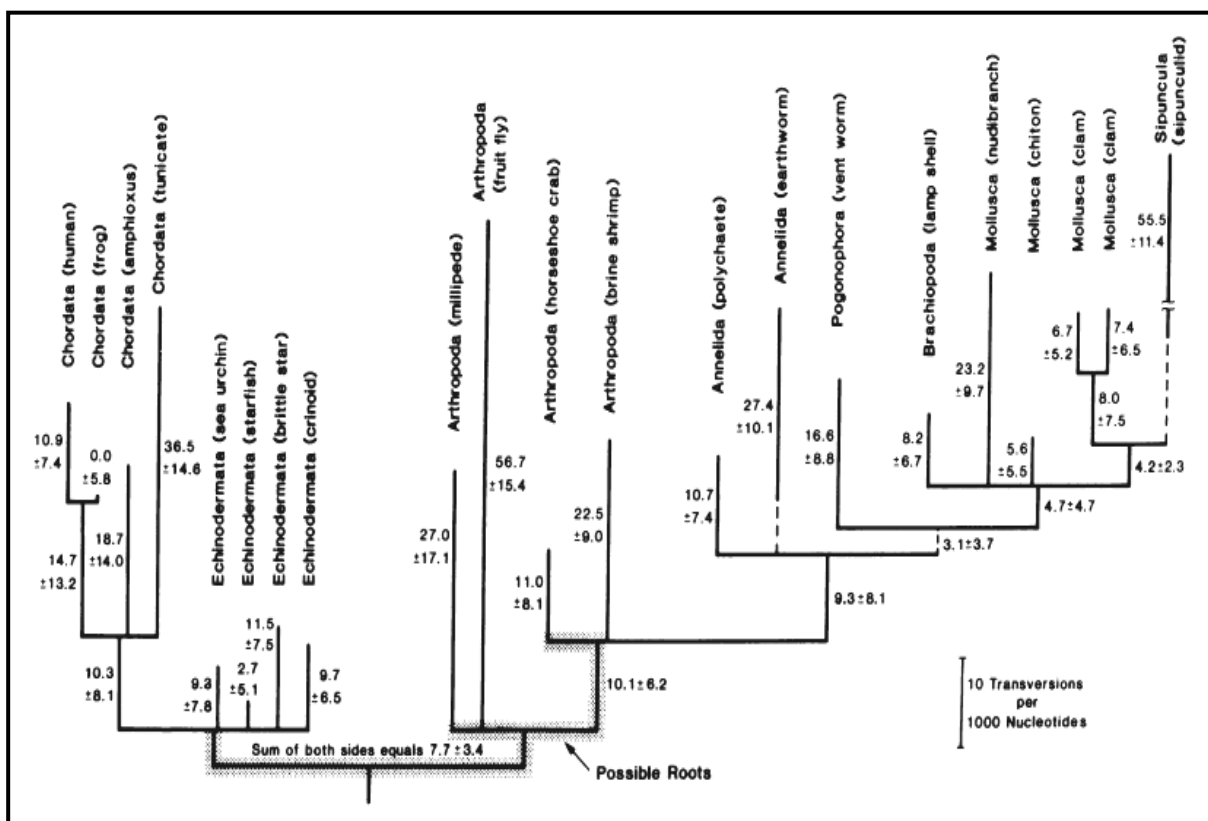


Fig. 9: arbre de Lake (1990).

Aquestes filogènies inicials van ser molt discutides degut a les diferències que presentaven respecte als arbres morfològics. Una d'elles era l'aparició d'un clade d'anèl·lids i mol·luscs que contradeïa la hipòtesi morfològica dels *Articulata* (anèl·lids + artròpodes). L'altre era la situació dels braquiòpodes (els únics representants dels lofoforats en aquests estudis) dins dels protostomats enlloc de la seva posició clàssica amb els deuterostomats. Tot i que Hyman ja els havia situat en una posició similar, el consens aleshores era que els

lofoforats estaven emparentats amb els deuterostomats. Moltes d'aquestes desavinences s'explicaven per un mostratge taxonòmic incomplet (per exemple, absència total de pseudocelomats) i l'existència d'artefactes com el LBA a l'hora d'inferir la filogenia.

Durant els 90 van aparèixer més treballs a on es provava de solucionar aquests problemes. Però hi ha dos treballs que destaquen per sobre dels altres. Halanych i col·laboradors (1995) estaven interessats en resoldre la posició dels lofoforats dins dels bilaterals. Per això van incrementar la mostra de seqüències de 18S dels mateixos. L'arbre resultant (Fig. 10) mostrava que els lofoforats no eren el grup germà dels deuterostomats, sino que formaven un clade amb mol·luscs i anèl·lids. Es va batejar aquest grup amb el nom de **Lophotrochozoa**. A més, la topologia de l'arbre semblava confirmar que els anèl·lids estan més estretament emparentats amb els mol·luscs que no pas amb els artròpodes.

Dos anys més tard, Aguinaldo i col·laboradors (1997) van provar de determinar la posició filogenètica dels nematodes. Els estudis moleculars anteriors els situaven a la base dels bilaterals, però les branques tan llargues que presentaven feien sospitar que es tractava d'organismes *fast-clock* i per tant susceptibles de patir LBA. Es van seqüenciar més nematodes fins trobar-ne un que no ho era. L'arbre resultant utilitzant aquesta seqüència (Fig. 11) mostrava l'existència d'un nou grup en el que s'inclouen, entre d'altres, nematodes i artròpodes, els **Ecdysozoa**, i refermava l'existència dels lofotrocozoos.

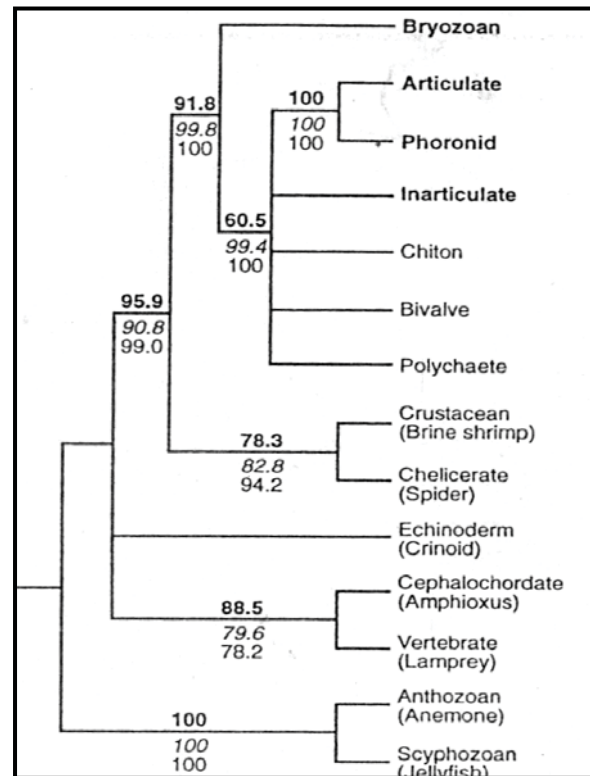


Fig. 10: arbre de Halanych *et al.* (1995).
Lofoforats en negreta

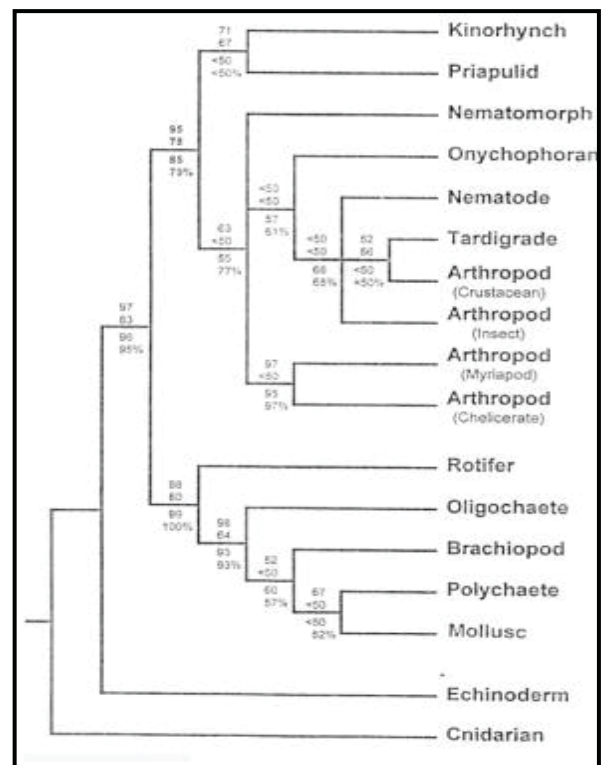


Fig. 11: filogenia d'Aguinaldo *et al.* (1997).

Així es van definir així dos nous grans clades dins dels protostomats: els ecdisozous i els lofotrocozous. Després d'aquests dos estudis, el nombre de seqüències de 18S ha anat incrementant i han afegit més fílums a cadascun d'aquests dos grans clades. Els ecdisozous són animals amb el cos envoltat per una **cutícula de quitina**, i que a mesura que creixen l'han de mudar (procés anomenat **ecdisis**); comprenen cinc dels fílums d'asquelmints (nematodes, nematomorfs, priapulids, loricífers i cinorincs), i els panartropodes (onicòfors, tardígrads i artròpodes). Els lofotrocozous és la divisió dels bilaterals que compren més tipus animals diferents, al voltant de la meitat dels fílums, i no existeix cap sinapomorfia morfològica que els agrupi; això ha portat a que de vegades s'hagi dubtat de quins són realment els seus integrants. En formen part els platihelminths, els nemertins, els quatre fílums de **lofoforats** i un grup d'animals celomats amb **clivellament espiral** i **larva trocòfora** (anèl·lids, mol·luscs, sipúnculs i equiürs). Hi ha també altres fílums dels antics pseudocelomats (gnatostomúlids, gastrotrics, rotífers i acantocèfals); i altres grups de descobriment recent, com els cicliòfors (Funch and Kristensen 1995) i els micrognatozous (Kristensen and Funch 2000).

Hyman tenia raó

Respecte a la posició evolutiva dels animals d'anatomia senzilla, la filogènia molecular des dels 18S mostra que els pseudocelomats són un grup polifilètic, ja que els seus antics integrants es troben repartits entre els lofotrocozous i els ecdisozous, i els acelomats platihelminths es troben dins dels lofotrocozous. Si aquesta hipòtesi és vàlida, no existeix cap tendència a l'increment de la complexitat en l'evolució animal. Acelomats i pseudocelomats no poden ser considerats bilaterals primitius, fet que dona suport a l'existència d'un primer bilateral celomat i complex. Però les coses no podien ser tan senzilles.

Els acels (*Ordre Acoela*), des d'un punt de vista morfològic, han estat considerats el grup més primitiu dels platihelminths (Rieger 1991) però les seves seqüències de 18S els separava de la resta de platihelminths i els situava com a grup germà de la resta de bilaterals (Katayama et al. 1993; Winnepenninckx, Backeljau, and De Wachter 1995; Winnepenninckx et al. 1995; Carranza, Baguñà, and Riutort 1997; Zrzavý et al. 1998). Igual que els nematodes, les seqüències dels acels eren clarament *fast-clock* i per tant sospitoses de presentar una posició basal degut al LBA. Si realment els acels eren el grup germà de la resta de bilaterals, els actuals integrants del grup serien descendents directes del primer bilateral; i per tant, l'ancestre de tots els bilaterals presentaria algunes característiques similars a les dels acels actuals, donant la raó a Hyman. L'estudi de les seves característiques morfològiques, embriològiques i genètiques serien clau per entendre què va passar durant l'explosió càmbrica i la transició entre els organismes radials i els bilaterals.

Per eliminar el LBA, Ruiz-Trillo i col·laboradors (1999) van aplicar la mateixa estratègia que Aguinaldo i van buscar l'acel amb la branca més curta;. Els seus resultats van confirmar que els platyhelminthes son lofotrocozoous, però els acels se situaven separats dels platihelminths i eren el grup germà de la resta de bilaterals. Més tard, també amb el 18S, es va demostrar que un altre ordre de platihelminths, els nemertodermàtides, era propers als acels, tal i com ja ja s'havia proposat des de la morfologia. I per tant també eren bilaterals basals (Fig 12, Jondelius et al. 2002) Aquesta posició dels **acelomorfs** (acels i nemertodermàtides) ha estat confirmada per evidències independents com els **canvis en el codi genètic** (Telford et al. 2000), **l'absència a tots els diblàstics i als acels d'un microRNA** (let-7) que sí està present a la resta de bilaterals (Pasquinelli et al. 2003), **la filogènia del gen del RNA ribosomal de la subunitat gran del ribosoma** (Telford et al. 2003) i **l'estudi dels gens mitocondrials** (Ruiz-Trillo et al. 2004)

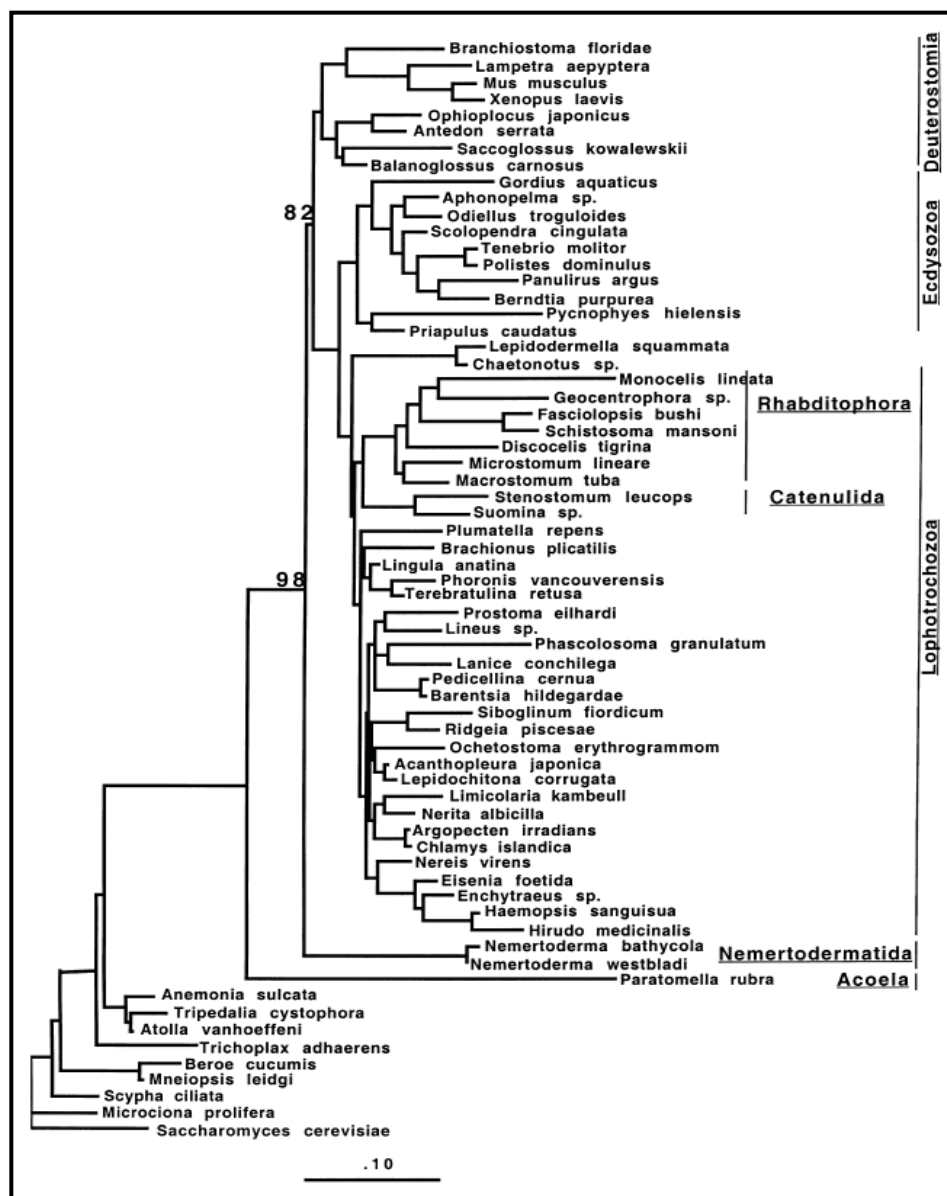


Fig. 12: Posició dels acelomorfs (parafilètics) com a grup germà de la resta dels bilaterals basada en el 18S. (Jondelius et al. 2002)

Conclusions del 18S

Com a sinopsi dels canvis introduïts per les dades moleculars a la filogènia dels metazous, es mostra un arbre resum (extret de Halanych 2004) dels principals treballs fets a partir de 18S (Halanych et al. 1995; Aguinaldo et al. 1997; Zrzavý et al. 1998; Ruiz-Trillo et al. 1999; Giribet et al. 2000; Peterson and Eernisse 2001). Algunes de les agrupacions internes que es poden observar en aquest arbre són discutides amb més profunditat als capítols dels resultats.

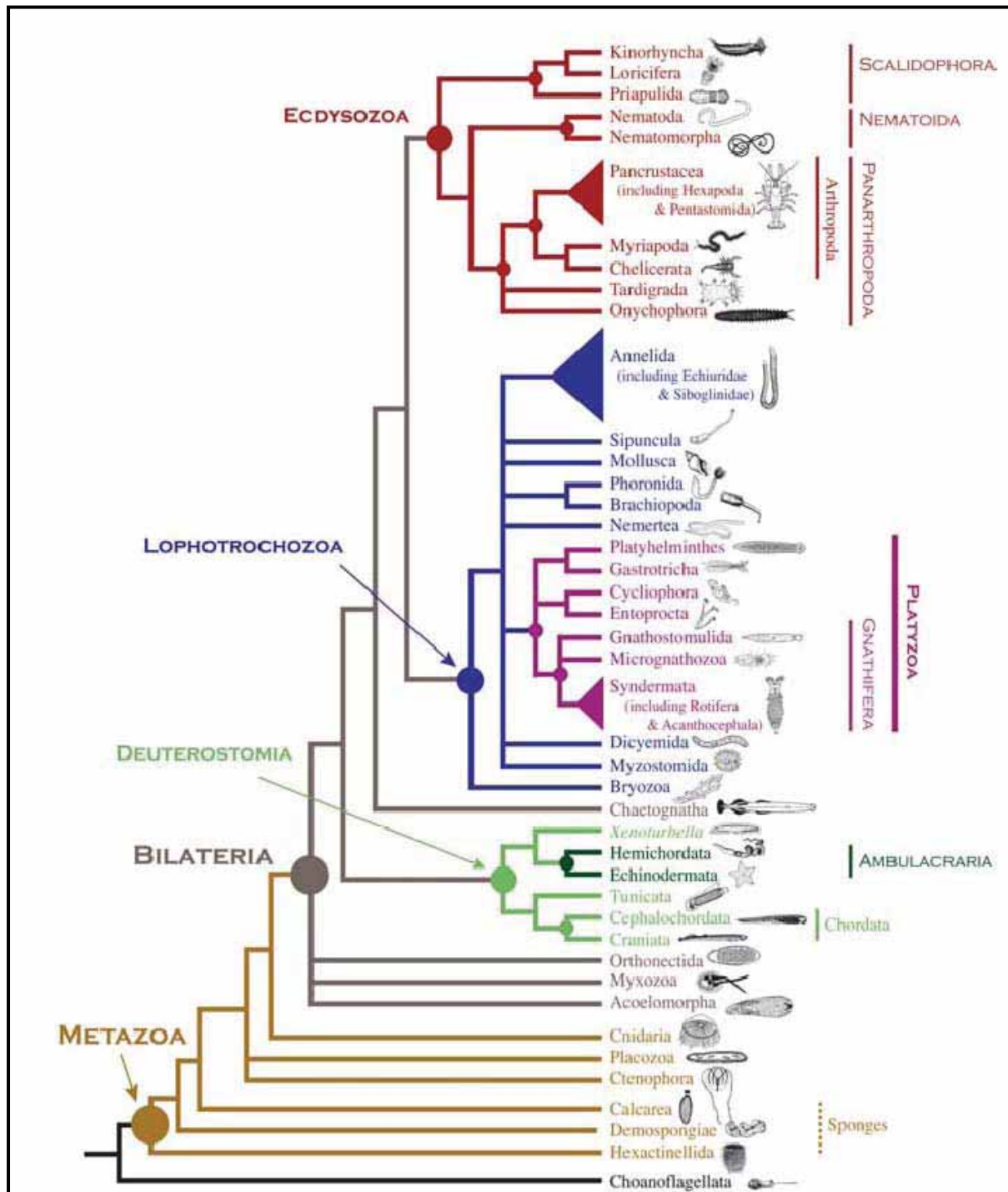


Fig. 13: consens de la filogènia molecular dels metazous, extret de Halanych (2004).

Problemes del 18S

Les dades moleculars actuals (principalment el **18S**) han estat incapaces de resoldre de forma contundent les branques més profundes de l'arbre, fins al punt que alguns autors dubtaven de la monofília d'algun superclade, com és el cas dels lofotrocozoous, o les relacions entre els tres grans grups. Hi ha dues possibles explicacions per aquesta manca d'informació que ens fan retornar a l'**explosió càmbrica**. La primera implica que l'explosió va ser real i va ser tan ràpida que no va haver prou temps per que el **18S** enregistrés la informació sobre les relacions evolutives dels diferents *phyla*. La segona es basa en que la divergència entre els fílums és un aconteixement molt antic, i podria ser que les substitucions nucleotídiques que van tenir lloc en aquell moment, aquelles que definirien els vincles entre els grups, hagin desaparegut sota l'efecte dels canvis posteriors. La informació en les molècules estaria soterrada pel "soroll de fons" produït des d'aleshores, i s'hauria perdut la senyal filogenètica.

Les dues explicacions no són excloents. I no es pot descartar la intervenció d'altres factors com l'**homoplasia**, la **saturació** i el **LBA**. En casos semblants, com l'estudi de l'origen i radiació dels eucariotes, ha estat possible trobar solució (Baldauf et al. 2000). Per una banda cal cercar més informació, nous gens, i per l'altre reduir el "soroll de fons" que s'ha acumulat des de l'aparició dels bilaterals.

Dades moleculars qualitatives

Una estratègia alternativa ha estat la cerca de sinapomorfies moleculars, com poden ser la presència de determinades signatures moleculars als **gens Hox**, o la pròpia presència/absència de determinats gens, la sintenia dels **gens mitocondrials** i, més recentment, la compartició de determinats **microRNAs**. Existeixen múltiples casos en que aquestes dades han permès confirmar agrupacions que altres mètodes no havien pogut resoldre. Per exemple, en el cas del **gens Hox**, trobem unes regions amb **residus signatura** o **parapèptids**, una seqüència característica de cada gran grup i que no està present als altres clades (Balavoine, de Rosa, and Adoutte 2002). Un d'aquests parapèptids corrobora la monofília dels protostomats, en el cas dels lofotrocozoous hi ha un total de cinc sinapomorfiques (*Lox 2, 4 i 5 i post1 i 2*), mentre que als ecdisozoous en trobem tres (*Ubx, abd-a i Abd-B*). A més dels residus signatura, la seva **presència/absència als fílums** també pot ser informativa, com per exemple el gen *Lox 5* que només està present als lofotrocozoous.

Respecte als gens mitocondrials, els **reordenaments gènics** del genoma mitocondrial han confirmat que els platihelminths estan dins dels lofotrocozoous (von Nickisch-Roseneck, Brown, and Boore 2001), que els anèl·lids són més propers als mol·luscs que no pas als artròpodes (Fig. 14, Boore and Brown 2000) i que els forònids formen part dels lofotrocozoous (Helfenbein and Boore 2004).

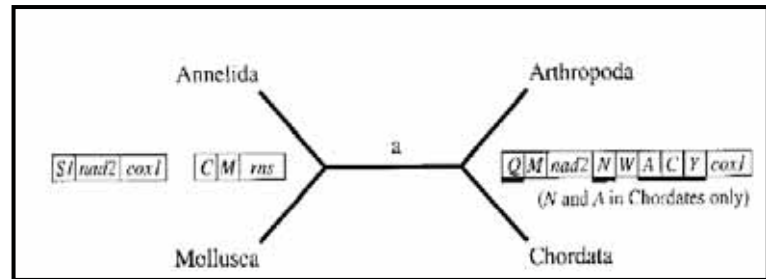


Fig. 14: l'ordenament dels gens del mtDNA mostren que els anèl·lids són més propers als mol·luscs que no pas als artròpodes, extret de Boore & Brown (2000).

Les molècules que s'han incorporat més recentment a l'estudi de l'evolució animal són els **microRNAs** (miRNA). Un dels primers miRNAs estudiats va ser el **let-7**, que està completament conservat a tots els animals a on s'ha trobat. Es va determinar que *let-7* és absent a diploblàstics i acels, mentre que és present a la resta dels bilaterals (Pasquinelli et al. 2003); així, aquest miRNA és una genuïna sinapomorfia apareguda a l'últim ancestre comú dels protostomats i deuterostomats actuals. Posteriorment, Sempere i col·laboradors (2006) van trobar més miRNAs que es comporten d'aquesta forma. En aquest estudi es mostren uns conjunt de miRNAs que apareixen al llarg de l'evolució de forma additiva i determinen perfectament els grans grups animals (Fig. 15).

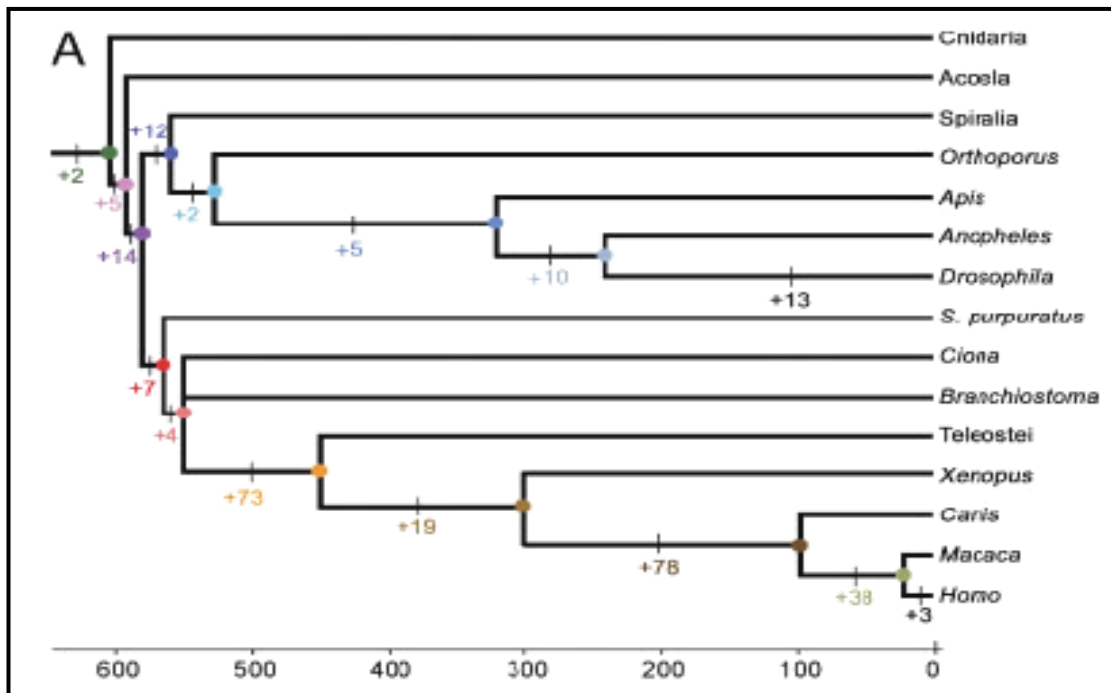


Fig. 15: distribució dels miRNAs a l'arbre dels metazous. A cada branca s'indica el nombre de nous miRNAs apareguts i exclusius d'aquell clade. *Spiralia* inclou un anèl·lid i un mol·lusc. Extret de Sempere et al. (2006).

Totes aquestes fonts de dades, encara que prometedores no deixen de tenir les seves propies desavantatges. La principal, tot i que de fàcil solució, és la del **mostratge taxonòmic escàs**, i lligat amb això, existeix el problema de determinar si aquests trets són o no veritables sinapomorfies: al desconèixer l'estat del caràcter a altres grups, es poden establir **falses sinapomorfies**. Una altra dificultat és la **impossibilitat de polaritzar** aquests trets en alguns casos. Això passa quan el tret estudiat presenta un estat de caràcter únic i diferent a cadascun dels altres clades; en aquest cas, el tret qualitatiu ens assegura la monofília de cada grup, però al ser diferent entre els clades, no ens permet associar els grups entre ells.

Noves molècules

Al marge del 18S, s'han cercat nous gens per fer estudis de comparació de seqüències. Tot i que potencialment poden aportar nova informació, és difícil que els nous marcadors igualin la representació de fílums que hi ha pel **18S** (pel qual hi ha seqüències de tots els fílums animals, amb l'excepció dels loricífers). Alguns exemples són la regió codificant de la **Histona H3**, amb una bona representació taxonòmica però que per si sola només te informació per l'estudi de fenòmens recents. S'han analitzat també individualment altres gens com l'**Elongation Factor 1-alpha** (EF-1alpha), el de la **subunitat petita de la RNA Polimerasa II** (POL II), i el de la **heat shock protein 70 kDa** (hsp70), però malauradament aquests gens analitzats individualment són incongruents amb la morfologia i el **18S**, i no presenten prou suport estadístic per si sols (Giribet 2002). La notable excepció és la subunitat alfa de l'**ATPasa sodi-potassi** (Anderson, Cordoba, and Thollessen 2004) que tot i presentar un mostratge limitat, resolvia per si sola varis nodes de l'arbre dels metazous.

Una altra alternativa és combinar la informació de diferents gens en el que s'ha anomenat supermatrius, que són analitzades pels mateixos mètodes filogenètics; Bàsicament la filosofia d'aquesta metodologia rau en la idea que si combinem varis gens, i aquests tenen senyal filogenètica, cada gen pot aportar informació per regions diferents de l'arbre (Giribet 2002). Per exemple, hi hauria un gen que contindria informació filogenètica per la transició radials-bilaterals, un altre que per la base dels bilaterals, o un altre per la radiació dels artròpodes (Fig. 16). Així, concatenant varis gens amb senyal per diferents regions, es podria reconstruir una filogènia completa per tots els nivells de resolució.

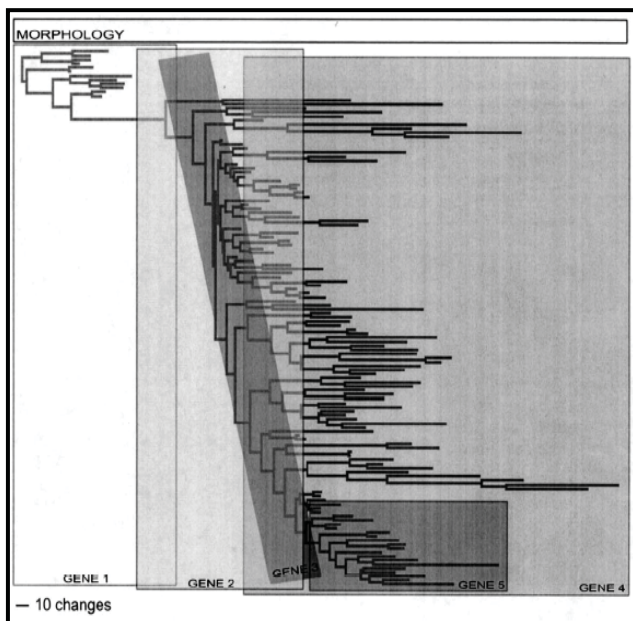


Fig. 16: Arbre a on es representa com gens hipotètics (rectangles grisos) contindrien informació per diferents nivells de resolució dins de l'arbre dels *Metazous*. Extret de Giribet

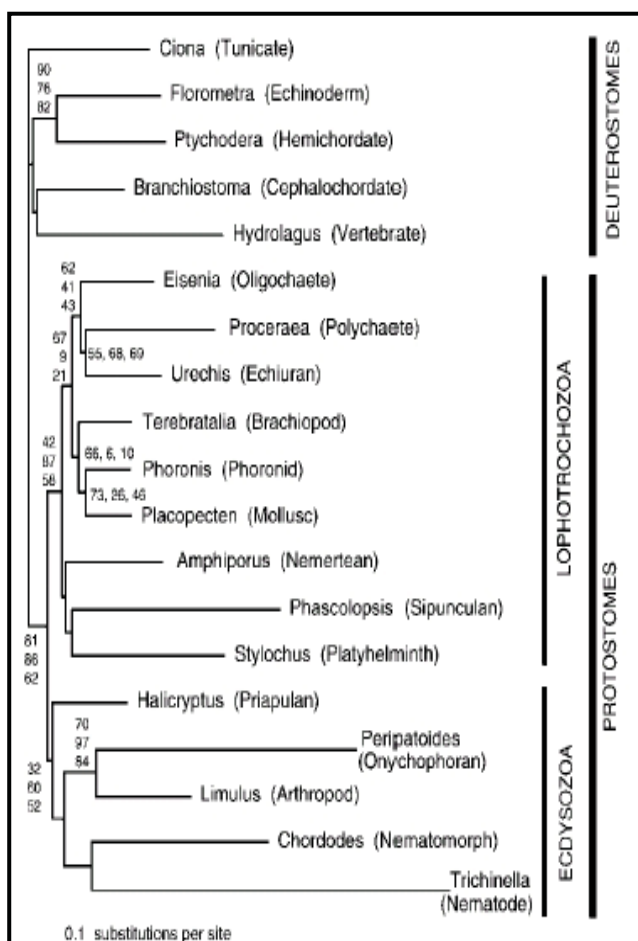


Fig. 17: Arbre de **18S+28S**; Mallat & Whintchell (2002).

Alguns dels primers exemples d'aquesta estratègia es troben fora de la filogènia de metazous. Qiu i col·laboradors (1999) van inferir la filogènia de les angiospermes a partir de les seqüències de 5 gens (nuclears, mitocondrials i plastídics), que sumaven un total de 8.733 bp. Per estudiar les relacions dels eucariotes, es van analitzar 4 proteïnes (Actina, Tubulina-alpha, Tubulina-beta i l'Elongation Factor 1-alpha) (Baldauf et al. 2000).

En el cas dels metazous, un dels primers gens que es va combinar amb el 18S va ser el del **RNA ribosomal de la subunitat gran del ribosoma** (el **28S**). Aquest gen és funcional i estructuralment similar al 18S, és més llarg, i per tant potencialment podria tenir més informació. Malauradament, els estudis amb el 18S i el 28S (Medina et al. 2001; Mallat and Winchell 2002; Telford et al. 2003) han demostrat que, encara que la seva filogènia és congruent amb la del 18S i incrementa el seu suport estadístic (Fig. 17), la combinació d'aquests dos marcadors no és suficient. A més, cap dels estudis existents ha maximitzat el mostratge disponible per ambdós gens. Exemples de filogènies multigèniques els trobem a la comparació de seqüències del mtDNA, que ha demostrat que els pogonòfors són membres dels anèl·lids (Boore and Brown 2000) o que els acels són el grup germà dels bilaterals (Ruiz-Trillo et al. 2004) entre d'altres.

Centenar de gens

Seguint aquesta filosofia, s'han aplicat les metodologies **high-throughput** a la filogenia molecular, donant lloc al que s'ha denominat filogenòmica. Aquesta consisteix en comparar un gran nombre de gens obtinguts a partir de la seqüenciació d'ESTs o bé de genomes complets. En el cas dels metazous, estudis recents fan servir fins a 183 gens per 15 phyla (Philippe, Lartillot, and Brinkmann 2005; Bourlat et al. 2006; Delsuc et al. 2006; Philippe et al. 2007). Tot i que aquests estudis confirmen l'existència dels tres grans clades de bilaterals, no han estat encara capaços de resoldre les seves relacions internes (Fig. 18, Philippe and Telford 2006). Una de les possibles explicacions per aquesta manca de resolució és el limitat mostratge taxonòmic; un exemple extrem és un estudi basat en 11 genomes complets d'eucariotes que rebutja l'existència dels ecdisozous en favor dels **Coelomata** (Dopazo, Santoyo, and Dopazo 2004).

A més, tot i que el nombre de representants per alguns phyla és significatiu, els propis estudiosos de la filogenòmica reconeixen que la incorporació d'un sol taxa per fílum produeix filogènies susceptibles d'artefactes (Philippe and Telford 2006). alguns exemples d'aquesta aproximació són els estudis que pretenien aclarir la situació filogenètica dels acels (Philippe et al. 2007) o dels tunicats (Delsuc et al. 2006), amb resultats que són incongruents amb evidències moleculars prèvies.

El més recent estudi filogenòmic fins a la data és el de Dunn *et al.* (2008), a on s'analitzen 150 gens per 77 taxa pertanyents a 30 fílums de metazous, l'estudi d'ESTs amb el major mostratge taxonòmic fins ara. L'arbre resultant recupera els tres grans clades de bilaterals, però ni els ecdisozous ni els lofotrocozous

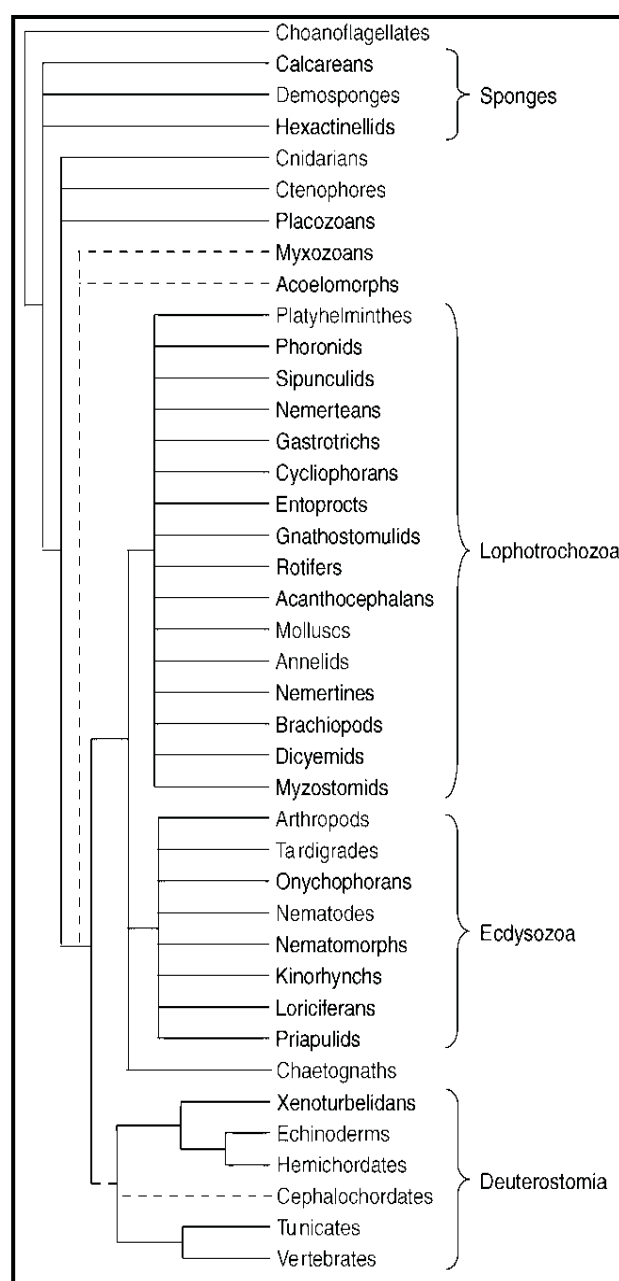


Fig. 18: Arbre resum de l'estat de la sistemàtica dels metazous tenint en compte els resultats dels ESTs. (Philippe and Telford 2006)

presenten suport estadístic. Els autors solucionen parcialment el problema eliminant 13 dels 77 taxa, quedant-se amb 22 dels 30 fílums, recuperant els tres gran clades amb suports significatius, però encara presenta nodes amb suports baixos o nuls.

Altres problemàtiques de la filogenòmica son les derivades dels errors de tipus sistemàtic com el LBA, i que a l'igual que passa amb els estudis d'un o pocs gens, s'agreuken quan hi ha grups amb pocs representants com en els estudis esmentats. Altres problemes possibles, no exclusius dels ESTs, però que es poden agreujar degut a treballar amb quantitats tan grans d'informació són les possibles paralogies, les contaminacions sense detectar, l'ús de gens que possiblement no aporten cap informació al nivell filogenètic investigat o l'ús de models evolutius de proteïnes, que tot i que optimitzats, encara són inferiors als models basats en nucleòtids.

També cal tenir en compte els nivells de missing data: si bé l'impacte dels missing data inicialment es va considerar no significatiu (Philippe et al. 2004), més recentment s'ha mostrat que pot tenir efectes pronunciats sobre la precisió dels arbres obtinguts (Hartmann 2008). A més, malgrat que la matrius d'aquest tipus d'estudi inclouen més de cent gens, en realitat el nombre promig de gens que se solapen entre un taxa i un altre és baix; per exemple, a l'estudi de Dunn et al (2008) hi ha un 55'5% de missing data, i la major part de parelles de taxa comparteixen solapen tan sols entre 20 i 30 gens compartits, i per tant a cada comparació hi falten un promig de 70% i 80% gens.

Passat, present i futur

En els passats 20 anys, la filogenia molecular ha resolt moltes incògnites i ha suposat un canvi de paradigma tant en la sistemàtica com en la comprensió de l'evolució dels animals. En són testimoni l'existència dels tres gran clades de bilaterals, així com la d'agrupacions de determinats grups com els pseudocelomats amb els artròpodes o l'ubicació dels lofoforats dins els lofotrocozoous o la posició basal dels acels. A més, tant les metodologies d'inferència com les fonts d'informació filogenètica han crescut en quantitat i qualitat, tot i que aquestes últimes no ho han fet de forma lineal.

El present ens mostra un nou arbre dels animals, amb algunes branques robustes i unes fulles fornides, però uns branquillons primis i febles. El flux de nova informació, ja sigui des de fonts qualitatives com els microRNAs o quantitatives com els ESTs, presenta un futur pròsper i esperançador. Però en el present aquestes noves aproximacions encara són incomplertes i precisen de temps per solucionar els seus problemes, el principal d'ells la manca de mostratge taxonòmic.

Objectius

Objectius

En aquesta Tesi Doctoral ens hem plantejat el següent objectiu principal: obtenir una filogènia interna dels bilaterals que resolgui les incerteses actuals d'aquest grup.

Els objectius específics que ens proposem són:

1. Comprovar la monofília dels tres grans superclades de bilaterals
2. Obtenir la filogènia interna dels tres gran superclades, amb especial interès pels Lofotrochozoa, els quals presenten encara molts enigmes:
 - a. Investigar quin és el grup més basal dels lofotrocozous.
 - b. Establir quin és l'estatus dels lofoforats dins dels lofotrocozous.
 - c. Resoldre l'estatus dels platihelminths dins dels lofotrocozous.
 - d. Determinar la monofília dels Spiralia i la seva filogènia interna.
 - e. Esbrinar quin és el grup germà dels Spiralia.
3. Determinar la posició d'organismes d'afiliació controvertida com els *Chaetognatha*, *Xenoturbella*, *Acoela* i *Nemertodermatida*.

Per respondre aquestes preguntes, hem emprat les següents estratègies:

- A. Analitzar les dades existents dels gens ribosomals dels bilaterals, aprofitant la seva riquesa taxonòmica i fent servir metodologies que minimitzin les seves problemàtiques.
- B. Cercar marcadors moleculars que aportin nova informació a la filogènia dels bilaterals, obtenint seqüències noves per tal de completar el mostratge taxonòmic.
- C. A partir dels tots els marcadors anteriors, aplicar una aproximació multigènica per inferir una hipòtesi filogenètica dels bilaterals a un nivell suprafilètic.

Dels resultats obtinguts esperem:

4. Estimar la vàlua filogenètica del conjunt de metodologies emprades i marcadors obtinguts.
5. Obtenir una hipòtesi filogenètica que ens permeti respondre les preguntes plantejades i fer inferències sobre l'aparició dels patrons corporals en la radiació dels bilaterals.

