



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Filogenia i filogeografia molecular de planàries terrestres (Tricladida, Platyhelminthes) del Bosc Atlàntic de Brasil i de la Península Ibèrica

Marta Álvarez Presas

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

TESI DOCTORAL
Departament de Genètica

Facultat de Biologia
Línia de recerca: Evolució i Desenvolupament

Filogenia i filogeografia molecular de planàries terrestres (Tricladida, Platyhelminthes) del Bosc Atlàntic de Brasil i de la Península Ibèrica

Memòria presentada per
Marta Álvarez Presas

Per optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

Vist-i-plau dels directors de la tesi

L'autora



Dra. Marta Riutort León
Prof. titular del Dept. de Genètica
Universitat de Barcelona



Dr. Julio Rozas Liras
Catedràtic del Dept. de Genètica
Universitat de Barcelona



Marta Álvarez Presas

Barcelona, gener de 2012

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701551777

A la meva mare.

“A humanidade só garantirá a qualidade de vida quando souber conviver em harmonia com o ambiente em que vive.”
-SOS Mata Atlântica

“Aquell que dubta i no investiga, es torna no només infeliç, sinó també injust”.
-Blaise Pascal

Agraïments

No sé per què, però tinc la sensació que la part dels agraïments és la última que s'escriu i a l'hora la que més gent llegeix...així que intentaré fer-ho el millor que pugui i no deixar-me ningú.

En primer lloc he de donar les gràcies a la Marta i al Julio, els meus directors, perquè sense ells això no hagués estat possible. La Marta m'ha ensenyat tot el que sé sobre filogènia, ha estat al meu costat, ha confiat en mi des del primer moment i m'ha tractat com a una filla i una amiga, cosa que l'hi agraeixo molt. Del Julio he après alguna cosa sobre la coalescència, la filogeografia i la genètica de poblacions, però sobretot, he après a fer les coses ben fetes, i RÀPID!! Per cert, a veure quan em convides a una paella de les teves...Gràcies als dos, de tot cor.

També vull fer menció especial de tres persones especials, el Fernando, l'Eduardo i el Ronald, perquè m'han ajudat molt en aquest camí, i m'han ajudat a veure "la llum" de la morfologia...Fernando i Eduardo, gràcies per les fotos i per la paciència...sé que sóc molt pesada...

Després hi ha tot un seguit de persones que han estat al meu costat al llarg d'aquesta tesi i de les que no em voldria oblidar: l'Iñaki (que va ser el primer que em va ensenyar a fer PCRs), el Jordi P. (amb qui hem viscut molts moments especials, i tinc un gran apreci), l'Eva L. (crec que he passat més hores amb tu al laboratori, que a casa amb el meu pare...això uneix, no?), la Mercè, la Juani, el Solana, el Miquelet, el Sisquet, el Kike, la Lydia, el Victor, l'Anna, la Marta I., la Cris, el Fèlix, la Mette, el Freddy, la Montse, el Chema, el Nacho i un llarg etcètera de gent que ha passat pel departament tots aquests anys (i són molts!). Edu, no m'oblido de tu, has arribat "tard", però ets el meu "padawan" i hem viscut moltes coses, així que per tu dedico aquest parell de línies.

L'Eva P. i la Gema, perquè són les meves amigues aquí dins, i a les que, sigui on sigui, no oblidaré mai. La Laia i l'Angi, les "nenes", que donen "vidilla" al laboratori i a les que s'agafa apreci de seguida.

La Noe i l'Oriel també són especials per mi. Hem compartit moltes coses dins i fora del departament. No em puc oblidar dels "veïns": la Laura, la Mònica, la Roser, l'Isaac, la Patri, la Cèlia, la Bàrbara, la Maria, la Marta, la Jenny i espero no deixar-me ningú. Ah, i també la Neus, que de tant en tant volta pel pis de dalt.

Els nous companys de laboratori, Cristian, gràcies pels teus comentaris i suggerències.

I també hi ha la gent d'"evo": la Roser, la Cris, el Pablito, la Francisca, la Sara, l'Alex (ha costado, pero al final ha salido, gracias), amb qui hem compartit hores de videos de tesi...La Gemma i el Victor Hugo, que han patit en paral·lel el llarg camí de l'escriptura.

I en quant al departament, no voldria deixar-me ningú, la Lluïsa, el Dani, la Susanna, la Montse, l'Emili, la Marta P., etc gràcies a tots.

Vull agrair també al Jaume en especial, perquè ell també ha confiat en mi i sempre està interessat en la meva feina.

I no em puc oblidar del Francesc M., el Rafa i la Dorcas, els meus companys de pràctiques!

Bé, espero no haver-me deixat ningú...i si ho he fet, perdoneu-me.

També vull agrair als companys de biologia animal, al Miquel Àngel, la Leti, el Salvi, el Josep, la Raquel, l'Enric, la Margarita, el Carles, etc.

Els meus amics de la carrera, que encara flipen que estigui al departament, Lein (gràcies per ser-hi sempre), Re (lo he conseguido), Yorch (esto ha sido mogollón chungo), Fran, Klaas, Laia, Mire, Neus, Tere, Nuri, Marta E., etc.

Enèsims, gràcies per fer-me ballar i oblidar els mals rotllos, sou especials, i ho sabeu. Somos uno!

I finalment no em puc deixar la família, que encara que no entenguin gaire bé què és el què faig, i per què no busco "una feina de veritat" d'una vegada, em recolzen incondicionalment, i això, no té preu. Gràcies tetes, teta Ter i pare, i també la família política, la Pepi, la Mar, el Jordi, la Tere, el Jordi T., la Nuria, el Martí, la Susy i el Ramón. Ah, i el Far i la Mònica, que no són família, però com si ho fóssin...vale Fran, y tu también, no te pongas gruñón...

I finalment, deixo el més important pel darrer. Gràcies Kito, perquè sense tu no sóc res, i tu has fet que arribi fins aquí. T'ESTIMO.

INTRODUCCIÓ	1
1. FILOGÈNIA I FILOGEOGRAFIA	3
1.1. Filogènia i dades moleculars	3
1.1.1. Taxonomia i filogènia	3
1.1.2. Filogènies amb dades moleculars	4
1.2. Fonaments de filogeografia	9
1.2.1. Conceptes bàsics	9
1.2.2. Variabilitat genètica i selecció natural	11
1.2.3. Quantificació de la variabilitat genètica i tests de neutralisme	12
1.2.4. Noves tendències en estudis filogeogràfics	13
1.2.5. Aplicació de la filogeografia a la conservació	15
2. EL BOSC ATLÀNTIC DE BRASIL	16
2.1. Els corredors biològics	17
2.2. Origen de la biodiversitat al Bosc Atlàntic	18
3. LES PLANÀRIES TERRESTRES	21
3.1. Característiques anatòmiques generals	21
3.2. La identificació d'espècies	21
3.3. Sistemàtica	22
3.4. Distribució, ecologia i comportament	25
3.5. Les planàries terrestres com a model	27
3.6. Les planàries terrestres del Bosc Atlàntic de Brasil	28
3.7. Les planàries terrestres de la Península Ibèrica	28
OBJECTIUS	33
RESULTATS	35
INFORME DELS DIRECTORS	37
CAPÍTOL 1: Molecular phylogeny of land and freshwater planarians (Tricladida, Platyhelminthes): From freshwater to land and back	39
CAPÍTOL 2: Molecular phylogeny of the Neotropical subfamily Geoplaninae (Platyhelminthes, Tricladida, Geoplanidae) with a morphological discussion	61
CAPÍTOL 3: Land planarians (Platyhelminthes) as a model organism for fine-scale phylogeographic studies: understanding patterns of biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot	91
CAPÍTOL 4: Molecular phylogeography of land planarians (Tricladida, Platyhelminthes): Insights into the origin of biodiversity patterns in the southern Brazilian Atlantic Forest hotspot	109
CAPÍTOL 4: Annex	147

CAPÍTOL 5: Evidence of the persistence of the land planarian species <i>Microplana terrestris</i> (Müller, 1974) (Platyhelminthes, Tricladida) in microrefugia during the Last Glacial Maximum in the northern section of the Iberian Peninsula.....	165
DISCUSSIÓ.....	187
1. OPTIMITZACIÓ DE METODOLOGIES PER L'ESTUDI MOLECULAR DE LES PLANÀRIES TERRESTRES.....	188
1.1. Purificació del DNA.....	188
1.2. Cerca de nous marcadors.....	188
1.3. El mostreig: ampliar el "taxon sampling".....	191
2. UN NOU ESCENARI FILOGENÈTIC / SISTEMÀTIC PELS TRICLÀDIDES.....	193
2.1. Delimitació i identificació d'espècies a planàries terrestres.....	193
2.2. Estat del coneixement de la biodiversitat de planàries terrestres.....	195
2.3. Canvis en la sistemàtica dels Continenticola.....	196
2.3.1. Canvis en la taxonomia d'alguns grups.....	198
2.4. Congruència entre dades moleculars, morfològiques i de distribució geogràfica.....	198
2.4.1. Els geoplànids i els dugèsids són grups germans?.....	198
2.4.2. Les planàries terrestres són monofilètiques?.....	199
2.4.3. Quin grup de planàries terrestres és més antic?.....	200
3. FILOGEOGRAFIA DE PLANÀRIES TERRESTRES.....	202
3.1. Bosc i planàries: una estreta relació.....	202
3.2. L'origen de les poblacions brasileres és molt antic.....	203
3.3. L'estructura genètica de les poblacions de planàries terrestres brasileres.....	203
3.4. Història evolutiva de les poblacions brasileres.....	204
3.4.1. El cas particular de les poblacions d'Augusto Ruschi (01-AR) i Praia de Cambury (19-PC).....	207
3.4.2. Comparació de dues espècies en un mateix territori.....	208
3.5. Patrons i nivells de variabilitat a les planàries ibèriques.....	208
3.6. Implicacions per la conservació.....	210
CONCLUSIONS.....	213
BIBLIOGRAFIA.....	217
ANNEXOS.....	231
ANNEX I: Mètodes.....	233
ANNEX II: Anatomia de planàries terrestres.....	243
ANNEX III: Taxonomia.....	249
ANNEX IV: Caracterització morfològica dels tàxons estudiats.....	255

INTRODUCCIÓ

1 FILOGÈNIA I FILOGEOGRAFIA

La filogenia i la filogeografia molecular són dues disciplines que, malgrat compartir moltes eines analítiques i aproximacions metodològiques, tenen objectius diferents. Mentre que l'anàlisi filogenètica té com a objectiu principal la reconstrucció de la història evolutiva d'un grup d'organismes així com determinar els temps de divergència, la filogeografia està més interessada en entendre els processos evolutius, demogràfics i biogeogràfics que han generat la distribució de la variació genètica, dins i entre poblacions d'una mateixa espècie. No obstant això, ambdues disciplines fan servir les molècules, principalment d'ADN i proteïnes, com a font d'informació i per tant és fonamental el coneixement dels seus patrons i taxes de canvi. A més, per reconstruir la història evolutiva d'espècies relativament properes és molt important conèixer com és i com s'ha originat la distribució de les genealogies dels gens que observem dins de les espècies. En tot cas, tant l'anàlisi filogenètica com filogeogràfica requereixen la identificació i interpretació dels canvis que els diferents processos evolutius han deixat en el material genètic, es a dir l'empremta molecular de l'evolució (Li i Graur, 1991).

1.1 Filogenia i dades moleculars

1.1.1 Taxonomia i filogenia

La **taxonomia** és la disciplina que s'encarrega de descriure, donar nom i classificar la diversitat biològica, i inclou les bases, principis, procediments i regles per dur a terme tots aquests processos. La **classificació zoològica** és el resultat de l'aplicació d'aquests procediments, donant lloc a l'ordenació dels animals en grups en base a les seves relacions d'associació, de proximitat, similitud o totes tres alhora. Fa uns 150 anys Darwin publicà l'"*Origen de les espècies*" en què proposava que aquestes no havien estat immutables des del seu origen, sinó que es dona una transformació en els éssers vius a través de les generacions mitjançant la selecció natural: és l'**evolució**. Per tant hi ha una única història natural de les espècies que descriu els lligams entre avantpassats i descendents. Aquesta nova visió de la història natural va canviar l'enfocament de les classificacions, que han d'intentar ser naturals i objectives: si l'evolució ha produït els grups naturals de la vida, la classificació ha de reflectir l'evolució. Les classificacions biològiques deixen de ser únicament un sistema d'emmagatzemar informació i es fa necessari conèixer les relacions evolutives entre els grups. La **filogenia** és la disciplina que intenta esbrinar les relacions evolutives existents entre els organismes actuals i també els extingits coneguts. L'ordenació dels organismes en grups i en tàxons, atenent a la seva filogenia, es coneix amb el nom de **taxonomia filogenètica**.

La filogènia, a més de servir per conèixer els grups naturals, permet establir la correlació entre la història evolutiva d'un grup d'organismes i altres aspectes, com la presència o absència de determinats caràcters (metabòlics, morfològics, del desenvolupament, etc.), tipus de sexualitat, distribució geogràfica, etc. Aquesta correlació és imprescindible per entendre com aquests caràcters poden haver aparegut i canviat al llarg del temps i, finalment, poder comprendre la diversitat en tots els aspectes biològics que observem.

Les primeres filogènies es basaven en l'anatomia comparada i usaven caràcters morfològics que denotessin semblances o diferències entre tàxons. Aquestes classificacions tenien força limitacions, especialment degut a que la interpretació i definició dels estats dels caràcters i la deducció de les relacions filogenètiques a partir d'aquests eren molt subjectius. L'aparició de la metodologia **Cladística**, introduïda per Willi Hennig al 1952, va representar un gran avanç per la inferència filogenètica, ja que estableix per primera vegada una metodologia rigorosa i objectiva. La metodologia cladista es basa en l'existència d'estats de caràcter compartits entre organismes per definir aquells grups que deriven d'un mateix ancestre, i així successivament establir les relacions entre grups fins a reconstruir tota la filogènia. En el Cladisme només els caràcters **homòlegs** (aquells que han sigut heretats de l'ancestre comú de les espècies comparades) aporten informació evolutiva.

A l'hora de reconstruir filogènies, els estats derivats d'un caràcter presents en un grup d'espècies però no compartits amb altres espècies (les **sinapomorfies**) permeten definir grups monofilètics. En aquests grups tots els organismes comparteixen un ancestre comú (aquell individu del qual tots els organismes del grup són descendents directes i que va presentar per primer cop l'estat derivat del caràcter). Un dels perills als que s'enfronta el cladisme és l'**homoplàsia**, on l'estat derivat observat en dos grups diferents no és degut a la presència del mateix en un ancestre comú, sinó a l'evolució paral·lela o convergent.

Les relacions filogenètiques es representen en forma d'**arbre filogenètic**, que és un gràfic compost per nodes (que representen les unitats taxonòmiques operacionals-OTUs, que poden ser espècies o gens) i branques (que defineixen les relacions entre les OTUs). Només una branca connecta qualsevol parell de nodes adjacents. En alguns casos l'arbre representa tan sols la topologia de les relacions entre OTUs (**cladogrames**), en d'altres la longitud de les branques es proporcional al nombre de canvis que s'han donat entre els dos nodes que uneixen (**filogrames**).

1.1.2 Filogènies amb dades moleculars

Zuckerlandl & Pauling (1962) en comparar les seqüències proteiques de l' α -globina de diferents organismes, van constatar que el nombre de diferències entre ells era aproximadament proporcional al temps transcorregut des de que havien compartit el darrer ancestre comú, es a dir, les molècules podrien utilitzar-se com un rellotge (**rellotge**

molecular). Aquest rellotge molecular es podria fer servir per esbrinar les relacions evolutives dels éssers vius a partir de les seves diferències genètiques. El desenvolupament de la biologia molecular, iniciat fa més de 40 anys, va aportar metodologies que permeten obtenir de forma ràpida i senzilla les seqüències de proteïnes i àcids nucleics, el que va accelerar la implementació de la filogenia molecular. Un avantatge d'aquesta metodologia és que permet quantificar el grau de suport estadístic de les diferents hipòtesis. Com que els caràcters són les posicions de la seqüència i els estats tan sols poden ser els 4 nucleòtids o els 20 aminoàcids, la filogenia molecular no presenta la subjectivitat de la interpretació dels estats dels caràcters. En l'actualitat existeixen diversos mètodes d'inferència filogenètica aplicables a dades moleculars (Annex I). Un punt clau de la filogenia molecular és establir els caràcters homòlegs (en aquest cas les posicions nucleotídiques), tasca que es du a terme mitjançant l'alineament de les seqüències. Aquest procés és senzill quan les seqüències són molt similars, però es va fent més complex a mesura que aquestes són més variables, especialment en longitud. A més, donat que les dades moleculars no permeten saber la direccionalitat dels canvis, és necessari disposar d'un grup extern per obtenir aquesta informació (arrelar els arbres).

1.1.2.1 Gens informatius en filogenia

No tots els gens són útils per inferir qualsevol relació filogenètica, les seqüències dels gens que s'usen han de complir una sèrie de condicions:

- ❖ Han d'estar presents a tots els organismes objecte d'estudi (universalitat).
- ❖ Han de ser homòlogues (en cas de gens duplicats, ortòlogues i no paràlogues).
- ❖ Han d'acumular mutacions a una taxa apropiada pel tipus d'anàlisi que vulguem fer i per evitar el problema de l'homoplàsia.
- ❖ Han de ser prou llargues per a donar informació vàlida estadísticament.

Gens nuclears

Els gens que codifiquen pels RNAs ribosomals (rRNAs) han estat molt utilitzats per inferir les relacions filogenètiques a diferents nivells taxonòmics (Fox i col. 1980; Halanynch i col. 1995; Ruiz-Trillo i col. 1999; Mateos i Giribet, 2008). En els eucariotes, els rRNAs nuclears són codificats per quatre gens, tres d'ells units en un clúster (18S, 5,8S i 28S) i el quart en una ubicació independent (5S). Existeixen dues regions espaiadores separant els tres gens, que per la seva elevada variabilitat genètica també s'han utilitzat en treballs filogenètics, especialment a nivell de poblacions, sobretot l'ITS-1. El gen més emprat en la resolució de filogenies fins ara ha estat el **18S**, que correspon a la subunitat petita del ribosoma, i que té una sèrie de característiques que el fan molt apte pels estudis filogenètics:

- ❖ La taxa d'evolució no és constant al llarg de la molècula: hi ha zones molt conservades, bones per a dissenyar encebadors universals i inferir relacions filogenètiques entre tàxons molt distants. Les regions més variables són bones per a inferir relacions filogenètiques entre tàxons propers.
- ❖ Degut a que els gens ribosomals formen part de la maquinària de transcripció, tant de la cèl·lula eucariota com de la cèl·lula procariota, aquests estan presents en tots els tàxons.

Un aspecte important dels gens ribosomals és que presenten un gran nombre de còpies per genoma eucariota. Aquestes còpies normalment es mantenen més semblants dins d'una mateixa espècie que entre espècies (Hillis i Dixon, 1991). La longitud del 18S rDNA (1.800 nucleòtids aproximadament) fa que la majoria d'investigadors l'hagin seqüenciat de forma completa, i per això hi ha un gran nombre de seqüències senceres de 18S rDNA disponibles al GenBank.

El **28S** rDNA, que correspon a la subunitat gran del ribosoma, té més de 4.000 nucleòtids de longitud i presenta les mateixes característiques esmentades pel 18S. A diferència d'aquest però, la variació en les taxes evolutives entre els seus dominis és molt més acusada (Hillis i Dixon, 1991). Aquest gen s'ha usat per estudiar fets evolutius del Paleozoic o Mesozoic (Guadet i col. 1989; Hillis i Dixon 1989), i també per intentar resoldre l'origen i radiació dels bilaterals (Christen i col. 1991; Adoutte i Philippe, 1993).

Malgrat ser bons marcadors, els gens ribosomals no tenen prou resolució a tots els nivells taxonòmics. Per això es va començar a incloure seqüències de gens codificants per proteïnes a les cerques filogenètiques. Entre ells, el **factor d'elongació 1-alpha** (EF1 α) és una proteïna que es troba en tots els llinatges d'eucariotes. És molt abundant al citosol, on participa en la unió dels tRNAs aminoacil al lloc A dels ribosomes (depenent de GTP), al segon pas des de la traducció d'mRNA a proteïna. S'han fet estudis amb aquest gen amb anèlids (Halanych i col. 2002) i també a nivell de família i gènere, principalment en insectes (Holston i col. 2007; Kutty i col. 2008) i fongs (Kiyuna i col. 2008) demostrant que l'EF1 α és un bon candidat per inferir la filogènia a aquests nivells en altres grups d'organismes.

Els gens mitocondrials

El DNA mitocondrial als metazous té una mida d'uns 16.000 pb, sol ser circular i està format per: 2 rRNAs (16S (d'uns 1.200 pb) i 12S (d'uns 800 a 900 pb)); 22 tRNAs; i 13 gens (que codifiquen per proteïnes de transport d'electrons, en general). No presenta fenòmens de recombinació i tampoc té introns, i a més té herència uniparental (de la mare). La taxa d'acumulació de canvis és de 4 a 10 vegades més gran que al DNA nuclear,

de manera que permet fer comparacions entre organismes molt més propers (per això els gens mitocondrials són els més emprats a nivell poblacional). Dels gens mitocondrials, el que codifica per la **Citocrom Oxidasa I** (COI o també anomenat *cox1*) és un dels més emprats en la inferència filogenètica. El COI té un paper molt important a la cadena de transport d'electrons de la respiració mitocondrial. El fet de codificar per una proteïna clau, converteix el COI en un gen ideal per fer estudis filogenètics. La taxa de variació i la mida de la seqüència ofereixen bones condicions per aquests estudis, sumat al fet que és present a la majoria dels éssers vius del planeta.

Supermatris i l'evidència "total" (combinació de diferents tipus de dades)

L'ús d'un sol gen per inferir filogènies cada cop és menys freqüent degut a que no tenen informació suficient per a obtenir la resolució desitjada. La millor opció per inferir filogènies és la combinació de gens amb diferents procedències, com els mitocondrials i els nuclears, per tal de sumar la informació present en aquests i crear les anomenades **supermatris**. D'aquesta manera és possible donar suport a les agrupacions obtingudes a tots els nivells (des del nivell poblacional fins a les categories superiors, com les famílies o subfamílies). Cal que aquests gens siguin prou informatius per poder detectar la variabilitat genètica existent, i que a més estiguin prou ben conservats per a poder fer un alineament amb ells. Si a més és possible l'addició de dades morfològiques ("total evidence"), la resolució serà millor.

1.1.2.2 Alguns problemes de la inferència filogenètica amb dades moleculars

Malgrat els seus avantatges sobre les dades morfològiques, les dades moleculars presenten problemes que cal tenir present en les anàlisis.

La duplicació gènica

Una de les problemàtiques que poden presentar les dades moleculars és la presència de paràlegs, o còpies múltiples d'un gen que s'han originat per un procés de duplicació i evolucionen independentment dins del genoma d'una mateixa espècie. Així, a l'hora d'inferir filogènies, és important distingir entre els homòlegs **paràlegs** (aquells que deriven d'un ancestre comú degut a un procés de duplicació gènica) i els **ortòlegs** (aquells que deriven d'un ancestre comú degut a un procés d'especiació (Fitch, 1970)). Només les seqüències ortòlogues es poden usar per inferir correctament la filogènia de les espècies. La utilització inadvertida de seqüències paràlogues podria conduir a la inferència de filogènies errònies.

Les taxes de substitució i la saturació

A la Natura no tots els canvis nucleotídics són igual de probables; així, per exemple, és més freqüent trobar **transicions** (canvis de purina a purina o de pirimidina a pirimidina)

que **transversions** (entre purina i pirimidina). Les diferents posicions d'una molècula també poden canviar a ritmes diferents. En els gens que codifiquen per proteïna els canvis són més freqüents a la tercera base dels codons, ja que en molts casos no suposen un canvi d'aminoàcid. La posició que evoluciona més lentament del codó és la segona. A més, les taxes de substitució també poden variar per a una molècula determinada al llarg del temps (**heterotàquia**). Cal tenir en compte aquestes característiques a l'hora d'aplicar els mètodes d'inferència.

Quan comparem seqüències en un estudi filogenètic amb cobertura per un període de temps molt ampli, moltes de les posicions hauran acumulat tants canvis que en les comparacions entre els organismes més allunyats, la presència d'un mateix aminoàcid o nucleòtid en una determinada posició no es deurà a que hagi estat heretat d'un ancestre comú. Aquest podria correspondre a un canvi convergent, per tant aquestes posicions no tenen informació filogenètica. Diem que un alineament de seqüències està **saturat** quan a la major part de les seves posicions s'ha produït més d'un canvi i per tant, l'alineament deixa de ser informatiu (degut a l'**homoplàsia**). Ocorre el mateix amb les filogènies més properes però amb seqüències que presenten taxes de canvi molt elevades (com per exemple les terceres posicions dels codons o els gens mitocondrials). Incloure seqüències saturades a les nostres anàlisis pot conduir a una filogènia errònia.

Una manera fàcil de determinar l'impacte de la saturació és mitjançant una gràfica on es representin el nombre de canvis observats entre un parell de seqüències i el nombre de canvis "reals" que s'han donat en el procés evolutiu. Aquest nombre "real" es pot calcular a través de les distàncies genètiques, aplicant algun tipus de correcció per a canvis múltiples o calculant les **distàncies patrístiques** (suma del nombre de canvis produïts a les branques en un camí entre un parell de tàxons) a partir de l'arbre filogenètic. Tot i calcular-lo, sempre estarem subestimant el nombre real de substitucions.

Quan la molècula que utilitzem mostra signes d'estar saturada, el més adequat és analitzar si tots els tipus de substitució (les transicions i les transversions) presenten els mateixos nivells de saturació. En el cas de gens codificants, podem analitzar quines posicions del codó estan saturades. Finalment, treballarem només amb el tipus de substitució (transversió o transició) o amb les posicions del codó que no estiguin saturades. Tanmateix, si la molècula no està gaire saturada, els models evolutius que tenen en compte les substitucions múltiples podran extreure la informació filogenètica malgrat la saturació d'algunes posicions. L'elecció d'aquest model és clau per obtenir la millor filogènia a partir de les nostres dades.

Els organismes fast-clock

Les taxes d'evolució també poden variar entre llinatges. Els organismes **fast-clock** són aquells que presenten una taxa evolutiva molt més elevada que els altres i acumulen

substitucions més ràpid que la resta. En les filogènies moleculars, els organismes *fast-clock* presenten branques més llargues que la resta de tàxons analitzats. Quan s'infereixen filogènies moleculars incloent aquest tipus d'organismes es produeix un artefacte filogenètic anomenat **long branch attraction** (LBA): els organismes amb branques llargues "s'atrauen" entre ells i queden agrupats en clades artificials (Felsenstein, 1978). A més, aquests grups solen situar-se a prop del grup extern de referència (outgroup), en una posició filogenètica errònia (Olsen, 1987), ja que la seva seqüència ha variat tant que és més semblant al grup extern que als tàxons germans.

Hi ha diferents sistemes per reduir la influència d'aquests organismes en les anàlisis, com per exemple incloure el màxim nombre de tàxons possible (Hillis, 1996). Així s'escurcen les branques llargues que separen els grups i es disminueix la probabilitat de que l'organisme *fast-clock* es situï en una branca que no li correspon. Una altra opció és seleccionar d'entre tots els tàxons aquells que tinguin una taxa evolutiva menor i fer l'arbre només amb ells (Aguinaldo i col., 1997). Això no sempre és possible, ja que hi ha ocasions en què els organismes *fast-clock* són importants per la nostra anàlisi i no els podem eliminar. També hi ha la possibilitat de fer servir mètodes menys sensibles a aquest problema (com la màxima versemblança, per exemple). Un mètode per detectar organismes *fast-clock* és el **Relative Rate Test** (RRT; Sarich i Wilson, 1973; Wu i Li, 1985; Li i Tanimura, 1987), que és un test estadístic que s'aplica a l'alineament i denota si hi ha espècies que evolucionen més ràpid que la resta.

Representació taxonòmica insuficient

En molts casos la inferència filogenètica amb un baix nombre de representants dels tàxons estudiats dona lloc a filogènies poc resoltes o inclús incorrectes (Hillis, 1996; Bergsten, 2005). Amb un mostreig ampli, molts dels problemes descrits anteriorment es poden resoldre, com per exemple el de l'atracció de branques llargues. És per tant important assegurar-se el disposar d'una alta densitat de mostreig taxonòmic del grup d'estudi.

1.2 Fonaments de filogeografia

1.2.1 Conceptes bàsics

La **filogeografia** és una disciplina que combina informació de diferents camps (biologia, genètica de poblacions, filogènia, evolució molecular, paleontologia, geoclimatologia i biogeografia) per estudiar els principis i els processos evolutius, demogràfics i biogeogràfics que determinen la distribució geogràfica de la variació genètica, dins i entre poblacions d'una mateixa espècie i a espècies properes. Aquesta anàlisi, a nivell molecular, es fa normalment mitjançant la comparació de la seqüència de DNA d'una regió determinada

del genoma (moltes vegades del DNA mitocondrial) a diversos individus.

Aquesta disciplina pot ajudar a comprendre els processos històrics que han donat forma a l'actual distribució geogràfica de la variació genètica, incloent els esdeveniments ambientals i ecològics, i els processos poblacionals, com ara episodis d'aïllament i els colls d'ampolla (Avice, 1998; Zink, 2002). Es poden obtenir, a més, estimes quantitatives de grandària poblacional històrica (Hugall i col. 2002).

La **filogeografia comparada** estudia aquests principis i processos analitzant els patrons de distribució de la variació genètica i els patrons genealògics d'espècies que coexisteixen en una mateixa regió geogràfica (**espècies simpàtriques**; Arbogast i Kenagy, 2001; Zink, 2002). Aquesta comparació pot aportar informació per deduir si els incidents com ara els esdeveniments de vicariança, les fluctuacions climàtiques, les barreres geogràfiques i les catàstrofes ambientals han afectat als diversos tàxons de la mateixa regió de manera similar (Arbogast i Kenagy, 2001). Patrons semblants en diferents espècies poden revelar la influència de factors ecològics i evolutius a la seva àrea de distribució, i fins i tot determinar si la regió d'estudi s'ha mantingut climàticament estable. Patrons incongruents entre taxons de la mateixa regió també poden ser informatius, ja que poden reflectir diferències en la història natural, en aspectes de la conducta o la fisiologia com a resposta a diferents pressions selectives (Avice, 1998).

La filogeografia fa servir una gran varietat de metodologies genètico-poblacionals i d'estadístics per a l'anàlisi i la interpretació de les dades moleculars: la reconstrucció de filogènies i genealogies, la construcció de xarxes d'haplotips, l'ús d'estadístics descriptius del grau de variació genètica, contrastos d'hipòtesis estadístics, etc. L'avaluació formal i estadística entre diferents prediccions i escenaris evolutius es realitza fent servir, entre altres, els mètodes de la **teoria de la coalescència**. Aquesta teoria, que es fonamenta en el model neutral de genètica de poblacions de Wright-Fisher (Hudson, 1983), descriu les propietats estadístiques de les relacions genealògiques d'una mostra d'al·lels (a nivell intraespecífic). A més, proporciona mètodes estadístics molt potents per estimar paràmetres poblacionals (com el flux gènic, la selecció natural, la mutació, etc.) i per realitzar inferències evolutives. Un aspecte molt rellevant per l'anàlisi filogeogràfica és que la variància estocàstica (per efecte de l'atzar) a diferents loci pot ser molt important; i a més, en moltes ocasions, els temps de coalescència poden ser molt superiors als temps de separació de les espècies (problemàtica de *l'arbre de gens vs l'arbre d'espècies*). Aquests fenòmens, òbviament, es tenen en compte a les anàlisis estadístiques basades en la teoria de la coalescència. Així doncs, els mètodes actuals de la filogeografia són eines molt potents per investigar la història recent de les espècies, incloent l'estructura poblacional, la divergència entre espècies i l'especiació.

1.2.2 Variabilitat genètica i selecció natural

La genètica evolutiva i de poblacions estudien la magnitud i direcció del canvi evolutiu, és a dir, els canvis que ocorren en les poblacions al llarg del temps. Un objectiu important és conèixer com es manté i com evoluciona la variabilitat genètica a les poblacions naturals, i quins són els factors que més influeixen en la seva freqüència. El principal mecanisme molecular que dóna lloc a la variabilitat genètica és la **mutació**. El concepte de **polimorfisme** es refereix a les mutacions o variants que es troben segregant (a una determinada freqüència) dins les poblacions. Parlem de **divergència**, en canvi, quan estudiem substitucions entre dues espècies diferents.

Darwin (1859) ja va fer referència al concepte de polimorfisme i a les **mutacions avantatjoses** (aquelles que incrementen l'eficàcia biològica de l'organisme) i les **mutacions deletèries** (les que redueixen aquesta eficàcia). Va proposar la **selecció natural** com el motor que promou l'increment de freqüència de les mutacions avantatjoses (**selecció adaptativa**) i l'eliminació de les deletèries (**selecció purificadora**), i que per tant redueix la variabilitat. Existeix un tercer tipus de mutacions, les **neutres**, que són aquelles que no tenen cap efecte en l'eficàcia biològica dels organismes; el destí evolutiu d'aquestes no està marcat per la selecció natural, sinó per la deriva genètica.

Al 1968 Kimura va desenvolupar la **teoria neutralista de l'evolució molecular**. Aquesta considera que la majoria de les mutacions que estan segregant en les poblacions naturals i que arriben a fixar-se entre espècies són selectivament neutres. La deriva genètica és el principal mecanisme responsable de la variabilitat observada (a nivell molecular) tant als nivells intra- com interespecífics. Òbviament no totes les mutacions són neutres, sinó que una gran part de les mutacions produïdes són deletèries (eliminades per l'acció de la selecció purificadora o negativa). Aquesta teoria considera que només una petita part de les mutacions serien beneficioses i, en conseqüència, fixades ràpidament per la selecció adaptativa (positiva). La teoria neutral de l'evolució molecular proporciona els fonaments teòrics que expliquen per què certs canvis nucleotídics s'han acumulat a un ritme semblant al llarg de l'evolució. Si la taxa de mutació no canvia amb el temps, aleshores el nombre de diferències moleculars (neutres) entre dos tàxons ha de ser un indicador del temps de divergència des del seu avantpassat comú més recent.

La **deriva genètica** és un mecanisme que pot produir canvis en la freqüència dels al·lels d'una població degut a l'atzar, independentment de l'acció de la selecció natural. Aquestes fluctuacions en les freqüències al·leliques es donen per l'elecció aleatòria de gàmetes durant el procés reproductiu. L'efecte de la deriva pot fer que determinats al·lels desapareguin completament de la població, o que arribin a fixar-se per atzar, eliminant variabilitat genètica en qualsevol cas. Degut a l'estocasticitat de la deriva, els seus efectes són majors en poblacions petites. Un aspecte important d'aquesta teoria és que prediu una correlació positiva entre el polimorfisme i la divergència. A més, mentre la deriva

genètica va eliminant i fixant al·lels, la mutació va introduint-ne de nous, fins que arriba un moment teòric en el què es podria arribar a l'equilibri. Un aspecte molt rellevant de la teoria neutralista és que és a la base dels anomenats tests del neutralisme (Annex I), que ens poden permetre identificar els diferents factors que han afectat les genealogies de gens (selecció natural, successos demogràfics, desviacions de l'aparellament aleatori, etc.), a partir del patró i nivell dels canvis nucleotídics.

1.2.3 Quantificació de la variabilitat genètica i tests de neutralisme

1.2.3.1 Variabilitat intra- i interpoblacional

El primer pas per conèixer els mecanismes evolutius subjacents als canvis observats és la seva quantificació a nivell intrapoblacional. En la comparació de seqüències de DNA podem trobar canvis nucleotídics de diferents tipus, des de substitucions que afecten un o pocs nucleòtids (SNPs) fins a canvis de longitud de seqüència (indels), reordenacions cromosòmiques, seqüències repetitives (com els microsatèl·lits) o duplicacions gèniques. Quan comparem seqüències a nivell intrapoblacional la majoria de posicions són **monomòrfiques**, és a dir, que la majoria d'individus presenten la mateixa variant a una posició determinada. Les posicions amb variants nucleotídiques diferents són les anomenades **polimòrfiques** o **segregants**. La quantificació de la variabilitat a nivell del DNA es fa mitjançant diversos estadístics sumaris. Un primer pas, i molt important, en els estudis filogeogràfics és el de quantificar el nivell i el patró de variabilitat genètica existent entre diferents poblacions d'una mateixa espècie. Els estadístics més importants es detallen a l'Annex I.

1.2.3.2 Tests de neutralisme

Els anomenats tests del neutralisme permeten detectar l'impacte de la selecció natural i els factors demogràfics mitjançant l'anàlisi del nivell i patró de variabilitat nucleotídica. En aquests tests típicament la hipòtesi nul·la assumeix un equilibri mutació-deriva. A més, pressuposen un aparellament a l'atzar (**panmixi**) i una grandària poblacional constant. Quan una o més de les premisses del model no es compleixen, i obtenim desviacions significatives dels tests, no podem saber (a priori) quin ha estat el principal responsable d'aquesta desviació (la selecció natural, factors demogràfics, etc). Un dels objectius fonamentals de la genètica evolutiva és determinar les forces que en el passat han influït en la variació genètica observada en el present. A partir de l'anàlisi del nivell i patró de canvi nucleotídic es poden inferir teòricament tant els processos demogràfics (com les **expansions poblacionals**, o els **colls d'ampolla**, on la grandària poblacional es redueix considerablement i després es recupera), com els selectius responsables d'aquesta variació. Per discriminar entre els mecanismes demogràfics i els selectius es poden estudiar diferents parts del genoma, ja

que els efectes demogràfics tendrien a afectar tots els gens de manera semblant, mentre que la selecció afectaria parts particulars del cromosoma. Els tests del neutralisme més utilitzats estan descrits a l'Annex I.

1.2.4 Noves tendències en estudis filogeogràfics

Els mètodes de la filogeografia s'han desenvolupat de forma molt significativa en els últims anys. Actualment no només fem servir les filogènies, les genealogies i la distribució dels haplotips per inferir la història evolutiva de les poblacions i espècies, sinó que també podem aplicar nous mètodes estadístics molt més potents (com per exemple la Computació Bayesiana Aproximada, ABC). També és necessària l'aplicació i millora dels models paleoclimàtics per inferir la història biogeogràfica d'una àrea concreta. La integració d'informació de camps com l'ecologia, la paleobotànica o la geologia amb la de la genètica és de gran ajut a l'hora d'interpretar les dades filogeogràfiques (Avice, 1998). Aquesta informació pot servir per formular una hipòtesi de partida més acurada, i a més servirà per interpretar millor els resultats (per exemple, la informació de plaques tectòniques ajuda a la interpretació dels esdeveniments de vicariança; els registres fòssils serveixen per tenir una idea de la distribució dels tàxons en el passat; o la predicció de refugis es pot fer servir per dissenyar models paleoclimàtics (Hugall i col. 2002)).

1.2.4.1 Anàlisi filogeogràfica mitjançant mètodes d'inferència bayesiana

El patró de variabilitat nucleotídica és el resultat d'una complexa interacció de molts processos. Avui en dia s'han desenvolupat mètodes molt sofisticats per poder inferir acuradament els processos demogràfics o selectius que han modelat aquestes dades. La inferència bayesiana, que permet estimar la distribució de la probabilitat posterior dels paràmetres donades unes dades, ha esdevingut en els últims anys una eina important per a l'anàlisi de processos demogràfics complexos. Fins fa ben poc, els mètodes bayesians eren poc utilitzats degut a la seva complexitat i a la incapacitat de calcular la versemblança analíticament. La Computació Bayesiana Aproximada (Approximate Bayesian Computation, **ABC**; Tavaré i col. 1997; Pritchard i col. 1999; Beaumont i col. 2002) permet aquesta anàlisi mitjançant l'ús de simulacions i resumint les dades a un conjunt determinat d'estadístics. Es tracta de contrastar els models que competeixen per explicar diferents escenaris evolutius, amb l'objectiu de determinar el model que millor s'ajusti a les dades.

La metodologia d'ABC es basa en un algorisme de rebuig simple, i s'ha fet servir en l'estima de paràmetres demogràfics a través de models per a diferents organismes (Beaumont i Rannala, 2004). El principi bàsic del mètode és la generació d'unes dades per simulació (D') donat un escenari evolutiu concret i fixant la grandària mostral (n) i el nombre de loci utilitzats per obtenir les dades observades (D). El valor dels paràmetres

per les simulacions s'obté a partir de les seves distribucions *a priori* (**priors**). Es desaran els valors dels paràmetres de les simulacions on D' sigui igual a D , i després seran utilitzats per aproximar la distribució de la probabilitat posterior. Com que és molt difícil que D sigui igual a D' en escenaris molt complexos, Pritchard i col. (1999) van proposar la substitució de les dades per un conjunt d'estadístics (s), de manera que es guardarien els paràmetres de les simulacions (s') només quan s' fos prou semblant a s . Més recentment, Beaumont i col. (2002) van proposar que es tindria en compte la diferència entre s i s' mitjançant una regressió lineal, que s'utilitzarà a l'hora de calcular la distribució posterior (**ABC-REG**). Malgrat tots aquests canvis i millores en la metodologia ABC, aquesta seguia sent massa costosa computacionalment. El problema s'ha intentat solventar amb la incorporació de Markov Chain Monte Carlo (**ABC-MCMC**; Marjoram i col. 2003). Més recentment s'ha anat millorant el mètode (Wegmann i col. 2009), principalment reduint-ne el cost computacional. Una de les propostes per optimitzar la tria d'estadístics que siguin informatius és l'ús del mètode **PLS** (un mètode de regressió de mínims quadrats; Boulesteix i Strimmer, 2007), que funciona de manera semblant a les anàlisis de components principals, i que bàsicament tria els components (dels estadístics descriptius) que millor expliquen la variabilitat de les dades reduint molt, per tant, el nombre d'estadístics. Gràcies a aquests mètodes, avui en dia és possible contrastar diferents escenaris evolutius complexos i estimar els valors dels paràmetres més rellevants de manera relativament eficient.

1.2.4.2 Els estudis amb models paleoclimàtics

Una de les múltiples aplicacions de l'anàlisi filogeogràfica és la interpretació de les respostes biòtiques davant dels canvis paleoclimàtics. Aquestes interpretacions biogeogràfiques poden tenir un valor predictiu davant dels canvis globals que ens afecten avui en dia. La modelització de la paleodistribució pot ajudar a proposar hipòtesis espacials explícites sobre les distribucions històriques dels tàxons per als quals no hi ha fòssils disponibles. Els models bioclimàtics prediuen les distribucions potencials de les espècies segons la projecció de punts de distribució coneguts i en una capa de clima d'una àrea en concret i per a una època determinada. Aquest mètode assumeix que les espècies tenen limitacions fisiològiques constants durant el període de temps estudiat, cosa que no és certa en alguns casos (Davis i Shaw, 2001; Hugall i col. 2002). Els models paleoclimàtics s'han utilitzat molt en els últims estudis filogeogràfics, ja que donen una visió més àmplia de quina pot haver estat la història evolutiva de les poblacions en una àrea determinada. Han servit també com ajuda per predir quines han estat les àrees d'endemisme més importants, combinant-los amb les dades d'absència/presència d'espècies en una àrea determinada. Malgrat això, aquests models tenen algunes mancances, ja que només tenen en compte algunes variables ambientals, com la temperatura o el règim de pluges, i és possible que

aquestes no siguin les més importants en el manteniment de l'hàbitat d'algunes espècies, de manera que la predicció no afectaria alguns tàxons i ens estaria donant informació incompleta o errònia. Una altra de les limitacions que presenten aquests models és l'escala temporal que cobreixen, ja que permeten fer hipòtesis d'esdeveniments ocorreguts fins fa uns 30.000 anys enrere, però no permeten predir fets més antics.

1.2.4.3 Combinació de diversos marcadors moleculars

De forma similar al que succeeix amb els estudis filogenètics, els estudis actuals en filogeografia cada cop fan servir més marcadors moleculars ja que d'aquesta manera s'incrementa molt la potència de les anàlisis. Fins ara els gens mitocondrials eren els marcadors més comuns per a estudis filogeogràfics, donat que mostren certs avantatges respecte als nuclears, com per exemple una herència monoparental, una variació nucleotídica inter- i intraespecífica més elevada i que no presenten recombinació. Malgrat això, els gens mitocondrials tenen mancances, com per exemple la incapacitat de reconstruir la història completa dels llinatges sexuals i de detectar certs esdeveniments entre poblacions, com ara la dispersió esbiaixada pel sexe, la hibridació i la presència/absència d'encreuament (Avice, 1998). La cerca de nous marcadors nuclears, que cal que presentin una variabilitat genètica adequada a nivell intrapoblacional, s'ha de centrar principalment en regions intergèniques i introns.

1.2.5 Aplicació de la filogeografia a la conservació

La biologia de la conservació té com a objectiu prioritari conservar la biodiversitat, i amb ella el potencial d'adaptació i evolució dels organismes (Avice, 2000). En aquest sentit, la filogeografia pot donar informació sobre quins són els processos crítics en l'evolució dels tàxons i en la generació de diversitat. A més a més, gràcies a la filogeografia és possible entendre quins són o poden ser els efectes i conseqüències de l'acció antropogènica en l'alteració dels patrons naturals que s'han generat durant milions d'anys. Això és especialment rellevant en conservació, ja que la pèrdua i la fragmentació de l'hàbitat, que majoritàriament són conseqüència de l'acció de l'home, són les dues majors amenaces per la biodiversitat. Els esforços de conservació amb les eines de la filogeografia comparada, per exemple, poden anar dirigits a detectar estructuració genètica per sota del nivell d'espècie, que no és detectable amb la morfologia. La detecció d'àrees on es troben els organismes amb la diversitat genètica més elevada ha de ser prioritària per a l'aplicació de les mesures de conservació. Així doncs, la filogeografia pot fer una contribució a la tasca prioritària de localitzar quins són els fragments de la natura que tenen alts nivells o aspectes únics de biodiversitat (Eeley i col. 2001; Hughes i col. 2005).

2 EL BOSC ATLÀNTIC DE BRASIL

El bioma del Bosc Atlàntic (denominat en portuguès Mata Atlântica) s'estén al llarg de la costa de Brasil entre les latituds 3 i 30° sud, ocupant una franja de 100 a 200 km d'amplada al llarg de la costa. Correspon, més o menys, al 15% del territori Brasiler, on el clima és humit gairebé tot l'any, amb una estació seca molt curta o inexistent. És extremadament ric en biodiversitat i presenta alts nivells d'endemisme. La variació és originada principalment per l'ampli rang latitudinal i d'elevació (des del nivell del mar fins als 1800 metres) de la zona, donant lloc a una gran variació en el nombre d'ambients. El Bosc Atlàntic es caracteritza per presentar una marcada estacionalitat, amb gradients ambientals forts deguts a la seva complexa topografia i orografia. La temperatura mitjana anual va des dels 18 fins als 24°C i la precipitació mitjana anual es troba entre els 1.250 i els 2.000 mm (més de 3.000 mm en alta muntanya), impulsada pels vents de l'est de l'Atlàntic tropical (Behling i Lichte, 1997; Carnaval i Moritz, 2008).

La cobertura vegetal original del Bosc Atlàntic era aproximadament d'1,4 milions de km² quan van arribar-hi els navegants europeus fa 500 anys. Actualment només se'n conserva entre un 11 i un 16% (Fig.1), principalment als vessants de les muntanyes i als cims, per ser zones de menor accessibilitat (Riberio i col. 2009). El Bosc Atlàntic ha experimentat una dramàtica modificació i fragmentació de l'hàbitat i encara avui està sota una pressió antropogènica severa, que és significativament major a les terres de més al nord. Aproximadament el 70% del total de la població de Brasil (uns 130 milions de persones) viu en una àrea que antigament era totalment coberta per bosc (Nimer, 1989). La degradació del bosc ve donada per activitats com la construcció d'infraestructures (carreteres i autopistes),

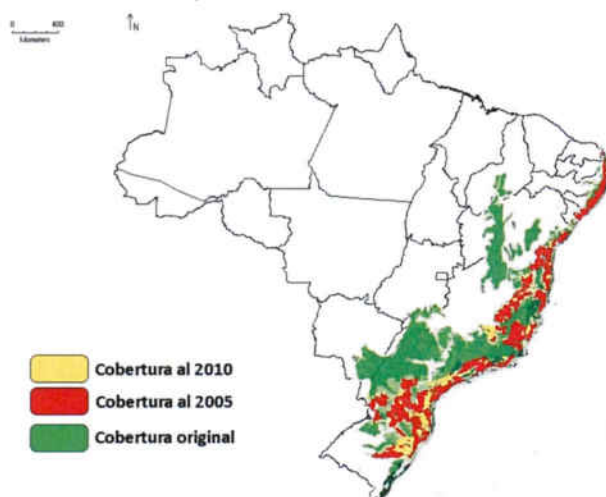


Figura 1. Contrast de la cobertura original del Bosc Atlàntic fa aproximadament uns 500 anys (verd) i la cobertura de bosc natural al 2005 (vermell) i al 2010 (groc). Dades obtingudes de la Fundació SOS Mata Atlântica.

la tala d'arbres descontrolada, les plantacions (sobretot de canya de sucre) i finalment també la pràctica de la ramaderia. La major biodiversitat es troba als boscos plujosos de les latituds més baixes, però aquests estan sent ràpidament desforestats i es troben en perill de desaparèixer abans que se'n pugui estudiar la riquesa i el comportament que podrien

presentar davant dels canvis climàtics. Així doncs, a més de ser un dels “hotspots” (punts calents) de biodiversitat més importants del planeta (és el segon bioma Neotropical en riquesa i un dels 5 biomes amb més prioritat per la conservació), el Bosc Atlàntic també és una de les zones més amenaçades amb altes taxes de pèrdua d’hàbitats (Myers i col, 2000).

2.1 Els corredors biològics

Per tal de frenar la pèrdua de biodiversitat, les autoritats brasileres han establert una sèrie d’**unitats de conservació** (parcs i altres àrees protegides per la llei). Aquestes són molt petites i estan molt distanciades les unes de les altres (degut a la fragmentació del bosc). El fraccionament del terreny no és només degut a l’acció directa de l’home, sinó que també hi ha causes naturals que el provoquen, com els incendis forestals o les riades i inundacions descontrolades, tot i que l’efecte d’aquestes és major per causa antropogènica. És de vital importància determinar a quines regions han de ser assignats estratègicament els recursos humans i financers per tal de garantir la conservació de la biodiversitat d’una manera efectiva. En aquest context, els **corredors de biodiversitat** o **corredors ecològics** són molt importants. Es tracta de vies que tenen com a objectiu final afavorir el flux d’éssers vius entre les parts d’un ecosistema fragmentat, mitjançant la recreació d’ambients naturals entre aquests fragments. D’aquesta manera augmenten la probabilitat de supervivència de les comunitats biològiques a llarg termini i ajuden a mantenir els processos dels ecosistemes necessaris per mantenir la biodiversitat en el futur. Pel disseny dels corredors cal informació de l’estat actual de conservació dels diferents fragments i la seva història biogeogràfica. El primer pas és diferenciar les **barreres** naturals de les antropogèniques. La conversió de terres cobertes de boscos en camps de conreu, per exemple, crea barreres de tipus antropogènic; però també una zona es pot haver mantingut aïllada durant milions d’anys, molt abans de l’arribada de l’home, per causa d’una barrera inexistent avui dia. En aquest cas, la reconstrucció d’un cinturó forestal per connectar les àrees de bosc adjacents podria ser discutible. La filogeografia proporciona eines per inferir l’existència d’aquestes barreres mitjançant l’anàlisi de la diversitat genètica dels organismes actuals.

El Govern de Brasil des de l’any 2000 està introduint corredors biològics per tal de protegir i recuperar la zona, dissenyats geogràficament en base a inventaris de flora i fauna, sense considerar la biologia i dinàmica de les poblacions. Així s’han creat, entre d’altres, el corredor de Serra do Mar (objecte d’aquesta tesi), el corredor Central i el corredor del Nord Est (Fig. 2).



Figura 2. Corredors biològics dissenyats al Bosc Atlàntic de Brasil ombrejats amb diferents tonalitats de marró. NAF: Nord del Bosc Atlàntic; CAF: Centre; SAF: Sud.

El corredor de **Serra do Mar** s'estén entre els estats de Rio de Janeiro (RJ) i Paraná (PR), delimitat al nord per una franja de bosc atlàntic semi caducifoli i pel sud amb el bosc plujós de Santa Catarina (SC). Hi ha diversos treballs sobre la biodiversitat de la zona, la majoria basats en espècies d'alta capacitat de dispersió. Aquests treballs, però, donen poca informació de la presència de barreres ecològiques i sobre les zones que han pogut mantenir millor les condicions ancestrals del bosc, donat que el patró de distribució geogràfica de la seva variabilitat genètica és molt uniforme dins del corredor. Resultats amb ocells (Harris i col. 2005) identifiquen parts del corredor de Serra do Mar, particularment a les costes dels estats de São Paulo (SP) i RJ, com a *hot spots* de diversitat d'espècies.

2.2 Origen de la biodiversitat al Bosc Atlàntic

Degut al perill en què es troba la biodiversitat dels Neotròpics, ens els darrers anys molts estudis filogeogràfics i de conservació s'han focalitzat en aquesta regió amb l'objectiu comú d'entendre com s'hi ha originat la biodiversitat present. Durant molt de temps, la hipòtesi més acceptada per explicar la diversitat Neotropical era la dels refugis, segons la qual, les glaciacions del Quaternari van fragmentar el terreny, donant lloc a una elevada taxa d'especiació al·lopàtrica en petites zones aïllades (Haffer, 1969; Whitmore i Prance, 1987; Rull, 2008). Actualment, però, s'ha descartat aquesta hipòtesi com a única responsable dels esdeveniments d'especiació en llinatges Neotropicals (Colinvaux i col. 2000; Bush i de Oliveira, 2006), ja que els temps de divergència dels tàxons són majoritàriament pre-Plistocènics (Costa, 2003; Rull, 2008). Això ha donat lloc a que altres autors defensin la hipòtesi d'un origen per la biodiversitat molt més antic, remuntant-se al Terciari (Simpson,

1979; Colinvaux i de Oliveira, 2001), quan van ocórrer alguns esdeveniments geològics que podrien haver generat la biodiversitat, com la formació dels Andes, el tancament de l'Istme de Panamà o la formació de les conques de l'Amazones i l'Orinoco (Nores, 2004), entre d'altres (Rull, 2008).

La majoria dels treballs centrats en el Bosc Atlàntic brasiler basen les seves hipòtesis en estudis d'endemisme i filogeografia comparada, i utilitzen tàxons d'alta mobilitat com els de Cabanne i col. (2007) i Pessoa (2007) ambdós amb ocells, o la publicació de Grazziotin i col. (2006), basada en rèptils. Recentment s'han aplicat noves tècniques per estudiar la biogeografia de la zona, com la modelització paleoclimàtica. Un exemple és el treball de Carnaval i Moritz del 2008, on mitjantçant models paleoclimàtics dedueixen la distribució del bosc durant el Quaternari, validant els resultats amb les dades dels registres de pol·len fòssil. Aquest estudi coincideix amb estudis geològics i palinològics (Behling i Negrelle, 2001; Behling, 2002; Ledru i col. 2005), que divideixen el Bosc Atlàntic en tres regions (Fig. 2), descrites per Cabanne i col. al 2008:

- ❖ El Nord (**NAF**), amb una elevada estabilitat forestal (el bosc ha estat present a l'àrea de manera continuada) a la costa est i curts períodes d'expansió del bosc humit (Veloso, 1991),
- ❖ el Centre (**CAF**), estable a l'est i amb curts períodes d'inestabilitat a l'oest,
- ❖ i el Sud (**SAF**), amb forta inestabilitat (regressió i fragmentació, i expansió durant l'Holocè mitjà i tardà).

Així, actualment molts treballs coincideixen en la predicció de la presència de bosc antic al nord del Bosc Atlàntic (Pellegrino i col. 2005; Grazziotin i col. 2006; Cabanne i col. 2007), mentre que els territoris del centre i sud han creat més controvèrsia i discussió. Com a conseqüència de la inestabilitat predita per les regions centre i sud, s'esperaria que la fauna i flora que trobem en l'actualitat en aquests territoris fos d'origen molt recent (posterior a les glaciacions) fruit d'una expansió des del nord, presentant patrons de poca estructuració i variabilitat genètica. Alguns estudis però troben al sud del Bosc Atlàntic llinatges divergents i patrons genètics no compatibles amb una colonització recent (Grazziotin i col. 2006; Cabanne i col. 2007) i d'altres, com el de Cabanne i col. laboradors de 2008, afirmen que el model de Carnaval i Moritz (2008) fallaria en la predicció d'àrees de bosc antic i estable al sud del Bosc Atlàntic, ja que la inestabilitat predita no explica l'alta incidència d'endemisme als boscos del sud (Costa i col. 2000; da Silva i col. 2004; Pinto-da-Rocha i col. 2005).

Per altra banda, l'origen de la diversitat que es troba al bosc no es pot explicar per un sol model de vicariància o de canvi climàtic (Costa, 2003), sinó que es tracta d'una història molt més complexa. Donada la gran extensió de l'hàbitat, hi ha diversos factors que han contribuït a la diversificació del bioma del Bosc Atlàntic. Segons el model de diversificació

per barreres (Marroig i Cerqueira, 1997; Moritz i col. 2000), alguns rius representen barreres al flux genètic (Cabanne i col. 2008). Pellegrino i col. (2005), Carnaval i Moritz (2008) i Sigrist i Carvalho (2008) descriuen barreres referint-se als rius Doce i São Francisco (Fig. 2), situats al límit de les zones que van ser predites com a refugis pels models climàtics. D'altra banda, alguns estudis moleculars (Cabanne i col. 2007) han demostrat que les històries biogeogràfiques d'algunes espècies s'han vist afectades per l'aïllament i la persistència d'organismes a refugis forestals durant les fluctuacions del Quaternari, resultats que s'ajusten a la teoria dels refugis de Haffer (1969).

3 LES PLANÀRIES TERRESTRES

3.1 Característiques anatòmiques generals

Les planàries terrestres pertanyen al grup dels triclàdides, (del grec *treis*: tres + *klados*: branques) inclosos en el filum dels plathelminths. Són animals de vida lliure amb el cos recobert per una capa de moc, que els dona un aspecte brillant. La seva superfície ventral, que està en contacte amb el substrat (sola ventral), presenta unes adaptacions especials. No tenen aparell circulatori ni respiratori (Ball i Reynoldson, 1981), per tant efectuen l'intercanvi gasós a través de la superfície corporal. Tampoc tenen estructures esquelètiques, cosa que condiciona la forma del seu cos, essent cilíndric en individus petits, i aplanat i allargat en individus més grans, per tal d'afavorir l'intercanvi de gasos. En general, les planàries terrestres poden mesurar entre 5 mm i prop d'un metre (com *B.nobile*).

A l'hora d'identificar les planàries terrestres, els trets morfològics externs són importants per a fer una primera classificació. Els caràcters més utilitzats són: la mida i forma general del cos; el color, les marques i patrons; la mida, nombre i distribució dels ulls; forma de l'extrem anterior; la posició relativa dels orificis del cos i l'amplada de la sola ventral. Una identificació més acurada s'aconsegueix gràcies a l'estudi de l'anatomia interna, sobretot de l'aparell copulador, estudiant trets com la posició i el nombre de testicles i ovaris, organització de la musculatura, tipus de faringe, fosses sensorials, etc. (Winsor, 1998). A l'Annex II hi ha detallades les característiques més importants de l'anatomia interna i externa d'aquests organismes.

3.2 Identificació d'espècies

L'assignació d'individus a una espècie en concret en organismes tan senzills i amb pocs caràcters morfològics com les planàries terrestres, no és una tasca fàcil. En planàries d'aigua dolça s'han utilitzat dades moleculars per identificació d'espècies del gènere *Dugesia* de manera exitosa (Lázaro i col. 2009). Concretament s'ha fet servir un fragment del gen COI

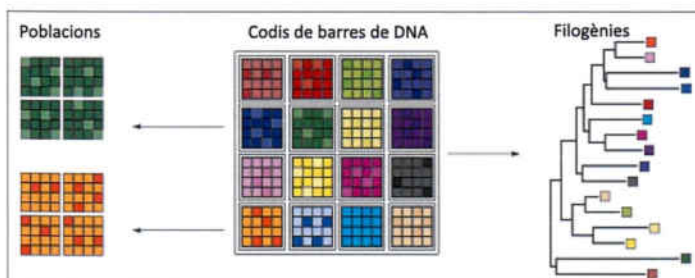


Figura 3. Esquema modificat a partir de Hajibabaei i col. (2007) on es mostra la posició de les dades de DNA respecte les filogènies i les dades de genètica de poblacions. Les espècies corresponen als diferents colors, i dins de cada color, les tonalitats representen la variabilitat. Cada quadre petit és un individu.

proposat com a eina d'identificació d'individus (codi de barres del DNA) pel Consortium for the Barcode of Life (Hebert i col. 2003). Els nivells de variabilitat d'aquesta regió del DNA

entre individus de la mateixa espècie normalment són més baixos que els existents entre espècies diferents, el que fa possible l'assignació d'individus a espècies conegudes (Fig. 3).

Les seqüències de DNA de la regió COI permeten a no especialistes en taxonomia l'assignació d'individus a espècies conegudes. Aquesta assignació se sol fer en base a l'obtenció d'una filogènia en la qual la ubicació de la seqüència problema ens permetrà fer la identificació. El grau de certesa d'aquesta dependrà de si a les bases de dades existeixen o no organismes de la mateixa espècie o propers i de si al propi estudi s'analitza tota la diversitat del grup en qüestió. A més, com l'obtenció de la seqüència es pot fer a partir de quantitats molt petites de material, es poden identificar les espècies a partir d'ous, d'individus immadurs, d'animals fragmentats, o fins i tot processats (formant part d'aliments). En el cas de les planàries terrestres és una eina molt interessant, ja que moltes espècies són críptiques (Fig. 4), presenten pocs trets morfològics definitoris d'espècie o, en moltes ocasions, els organismes trobats són immadurs, de manera que no tenen aparell copulador que es pugui analitzar morfològicament.

Figura 4. Dues imatges de planàries terrestres molt semblants pel que fa a la morfologia externa. A l'esquerra una espècie del gènere *Cephaloflexa* i a la dreta un espècimen de *Geoplana ladislavii*. Fotografies: F. Carbayo.



Aquesta metodologia és un avanç que pot accelerar molt la descripció d'espècies, ja que permet identificar ràpidament aquells individus que no es corresponen -a priori- amb espècies conegudes, facilitant per tant, el treball del taxònom que es pot centrar en els estudis morfològics en els casos més problemàtics o singulars.

3.3 Sistemàtica

Les planàries terrestres pertanyen a l'Ordre dels Triclàdides (Ph Platyhelminthes, Cl Turbellaria). La posició dels Platyhelminthes dins dels Metazoa no és gaire clara, malgrat que les dades moleculars més recents plantegen la possibilitat d'una posició com a grup germà dels Spiralia dins dels Lophotrochozoa (Fig. 5A). Els Triclàdides dins dels Platyhelminthes tenen una posició molt derivada, malgrat haver-hi pocs estudis. moleculars els més recents els situen com a grup germà dels Prolecithophora (Fig. 5B), i junt als Rhabdocels i un petit grup de gèneres de vida paràsita o comensal, constitueixen un clade monofilètic amb alt suport.

Els Triclàdides foren dividits per Hallez al 1890 en tres infraordres segons els seus requeriments ecològics: Maricola (les planàries marines), Terricola (planàries terrestres) i Paludicola (planàries d'aigua dolça). Ball (1977; 1981) seguint la divisió proposada per Steinböck (1925), va considerar que els Terricola (definites pel seu complex sistema nerviós diploneure) constituïen el grup germà del clade constituït per maricoles i paludicoles (Haploneure). Aquest clade no presentava cap sinapomorfia.

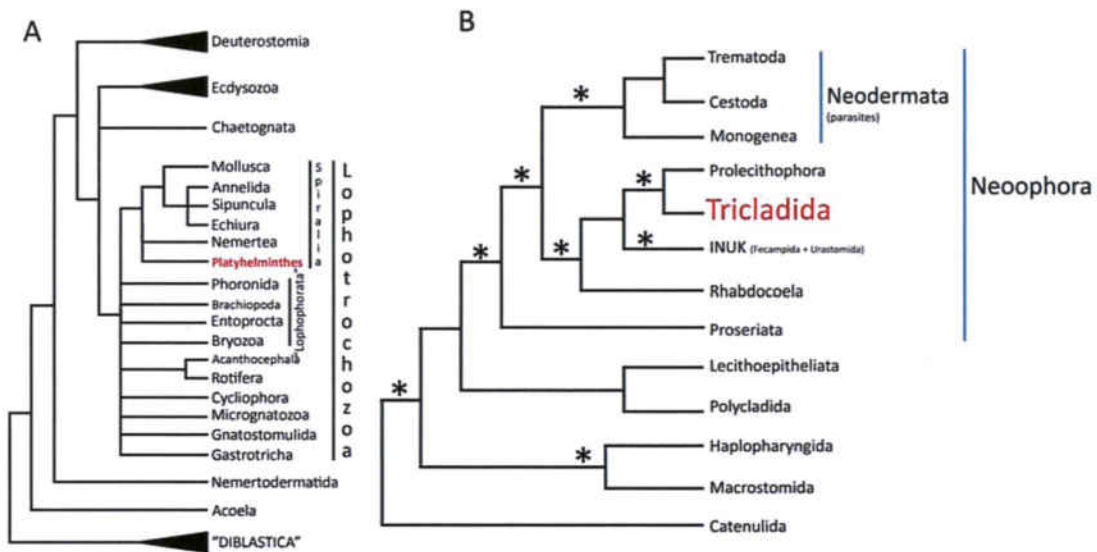


Figura 5. A: Esquema filogenètic de la posició dels Platyhelminthes dins dels Metazoa, segons Paps i col. 2009a. B: Posició filogenètica dels Triclàdides dins dels Platyhelminthes, segons un consens de dades de diferents estudis basats en gens ribosomals, modificat de Riutort i col. (2012).

Sluys (1989a) en una nova anàlisi dels caràcters morfològics va trobar que aquests donaven suport a la monofília dels tres grups (Maricola, Paludicola i Terricola), presentant les planàries terrestres tres sinapomorfies morfològiques: la presència de la sola ventral, un sistema nerviós diploneural i un tipus complex de musculatura a la faringe. A més aquesta revisió dels caràcters morfològics suggeria una relació més propera entre Paludicola i Terricola, canviant l'esquema evolutiu presentat per Ball.

Carranza i col. (1998a, b) van proposar l'existència d'un ancestre comú per DugesIIDae i Terricola basant-se en la presència en ambdós grups d'una duplicació del clúster ribosomal (Carranza i col. 1996). A Carranza i col. (1998b; Fig. 6) es proposa l'eliminació del subordre Paludicola (que ara seria parafilètic) i la creació del nou subordre **Continenticola**, format per les planàries d'aigua dolça i les planàries terrestres. Un treball posterior de Baguñà i col. (2001) confirma la hipòtesi sobre la posició de les planàries terrestres com a grup germà de DugesIIDae, però no aconsegueix demostrar molecularment la monofília de Terricola. A nivell morfològic, no hi ha cap treball que aprofundeixi en la filogènia interna de les planàries terrestres, de manera que és un camp totalment desconegut.

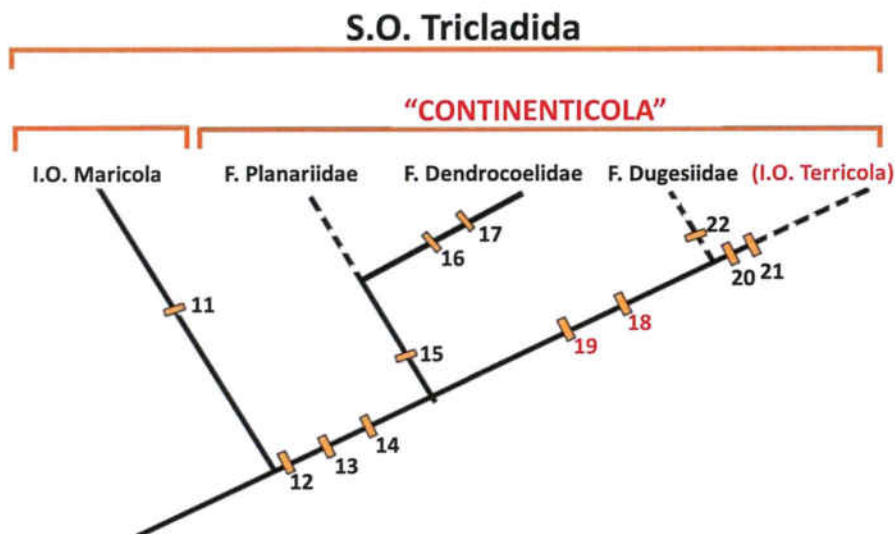
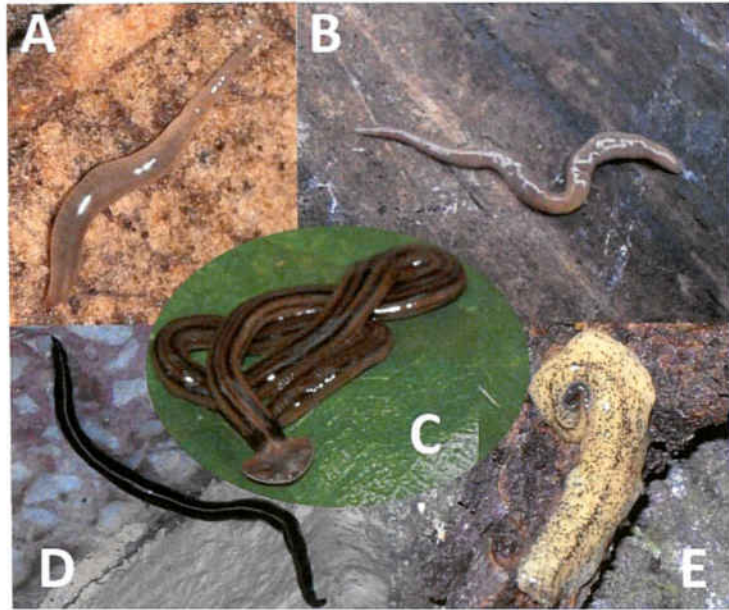


Figura 6. Relacions filogenètiques dels triclàdides basades en trets morfològics i moleculars. Modificat de Carranza i col. 1998b. Els números en negre corresponen a caràcters morfològics proposats per Ball (1981) i Sluys (1989a), mentre que els vermells representen els caràcters proposats per Carranza i col·laboradors com a sinapomorfies de l'agrupació de Dugesidae i Terricola, essent el 19 un caràcter molecular (la duplicació del cluster ribosomal). Les línies discontinúes indiquen els grups que no tenien suport a la filogènia molecular presentada a l'article.

Pel que fa a la taxonomia dins del grup dels Terricola (Taula III-1 de l'Annex III), actualment només se'n reconeixen tres famílies: Bipaliidae (Graff, 1896), Rhynchodemidae (Graff, 1896) i Geoplanidae (Stimpson, 1857) (Fig. 7). Dins dels **Bipaliidae** (individus amb el cos allargat i aplanat i amb el cap en forma de mitja lluna, amb nombrosos ulls marginals petits) Graff (1899) va reconèixer quatre grups en funció de la musculatura longitudinal (Winsor, 1983).

La família **Rhynchodemidae** és formada per dues subfamílies (Rhynchodeminae i Microplaninae). Rhynchodeminae es caracteritza per presentar organismes de cos allargat i forma aplanada, amb l'extrem anterior sovint cònic i allargat, amb ulls conspicus i papil·lapeniana absent o molt reduïda. Els components de la subfamília Microplaninae són petits, amb el cos arrodonit, sovint amb l'extrem anterior rom i els ulls petits. És freqüent que presentin papil·les penianes ben desenvolupades, amb o sense bossa seminal. Pel que fa a **Geoplanidae**, aquesta família (integrada per les subfamílies Caenoplaninae, Geoplaninae i Pelmatoplaninae) és formada per individus amb el cos relativament pla, que es fa progressivament més estret cap a la part anterior de l'animal. La sola ventral pot ocupar el 50% o més de l'amplada del cos. Tenen nombrosos ulls disposats als marges del cos de l'animal, sense aurícules ni tentacles. De vegades el cap té formes diferents: pot presentar-se aixecat o embolicat cap al dors (*Choeradoplana*, *Xerapoa*, *Enterosyringia*), o en forma de cullera invertida (*Issoca*). També poden tenir papil·les laterals com si fossin dits (*Xerapoa*).

Figura 7. Representació de les tres famílies de planàries terrestres. Rhynchodemidae (A: subfamília Rhynchodeminae; B: subfamília Microplaninae); Bipaliidae (C) i Geoplanidae (D: Caenoplaninae; E: Geoplaninae). Imatges de Fernando Carbayo i Marta Álvarez.



3.4 Distribució, ecologia i comportament

En l'estudi de Carbayo i Froehlich (2008) sobre l'estat de coneixement dels macroinvertebrats, s'indica que el nombre d'espècies de planàries terrestres descrites és de 830, de les quals quasi un 20% es troben a Brasil. Aquests valors poden estar esbiaixats pel fet que els pocs taxònoms especialistes en aquest grup es troben a zones Neotropicals, quedant àmplies regions del planeta on ni tan sols s'ha mostregat per conèixer l'existència d'aquests animals. El nombre real d'espècies probablement és molt més gran. Winsor (1997) va estimar que només s'havia descrit el 25% del nombre total d'espècies australianes. És per això que cal considerar-ne la distribució actual com un esquema i no com una sentència. Les planàries terrestres tenen una distribució cosmopolita, principalment pantropical i en trobem una major biodiversitat a l'Hemisferi Sud (Winsor i col. 1998). La distribució de **Geoplanidae** és molt homogènia, trobant-se únicament a Amèrica Central i del Sud i al Sud Est dels Estats Units; els membres de la família **Bipaliidae** es distribueixen bàsicament pel Sud-est asiàtic i es troben a Madagascar i l'Àsia oriental; finalment, **Rhynchodemidae** té distribució més àmplia que la resta, trobant-se a Europa, Àfrica, Amèrica, Àsia Oriental i Austràlia (Carbayo, 2003)(Fig. 8).

Les planàries terrestres formen part de la fauna criptozoica definida per Dendy (1889) com aquella constituïda per animals que viuen sota dels troncs i les pedres o a l'escorça dels arbres morts, incloent l'humus dels sòls forestals. Les planàries van colonitzar el medi terrestre fa un centenar de milions d'anys, però no han desenvolupat cap mecanisme especial per conservar l'aigua (Kawaguti, 1932), són estenohidres (només suporten un rang estret d'humitat (Froehlich, CG, 1955a)) i sensibles també a la temperatura del seu hàbitat (Froehlich, 1956; Winsor i col. 1998; Sluys, 1999; Carbayo i col. 2002). Hi ha algunes espècies que estiven o entren en letargia (diapausa) en condicions adverses (Carbayo, 2003). Durant

les hores principals del dia, degut a què la temperatura augmenta i la humitat disminueix, aquests organismes solen ocupar capes del sòl més profundes. La majoria d'espècies no fan nius, però fan servir els porus, esquerdes i buits per migrar entre les capes intersticials del sòl i sovint aprofiten els amagatalls d'altres animals. Malgrat alguna excepció, com *Rhynchodemus vejowskyi* o alguna espècie de *Geoplana* (Graff, 1899), que són actius de dia, les planàries terrestres tenen activitat nocturna. Les planàries terrestres són depredadors que es troben al cim de la xarxa tròfica i s'alimenten d'altres invertebrats. Hi ha algunes espècies necròfiles (Winsor, 1977) i és possible que es donin casos de canibalisme (Winsor, 1998). La competència intraespecífica pel menjar és probablement el factor més rellevant que restringeix la mida poblacional de les planàries terrestres (Boag i col. 1998), constituint un factor important que afecta la dispersió i l'establiment d'aquests animals.

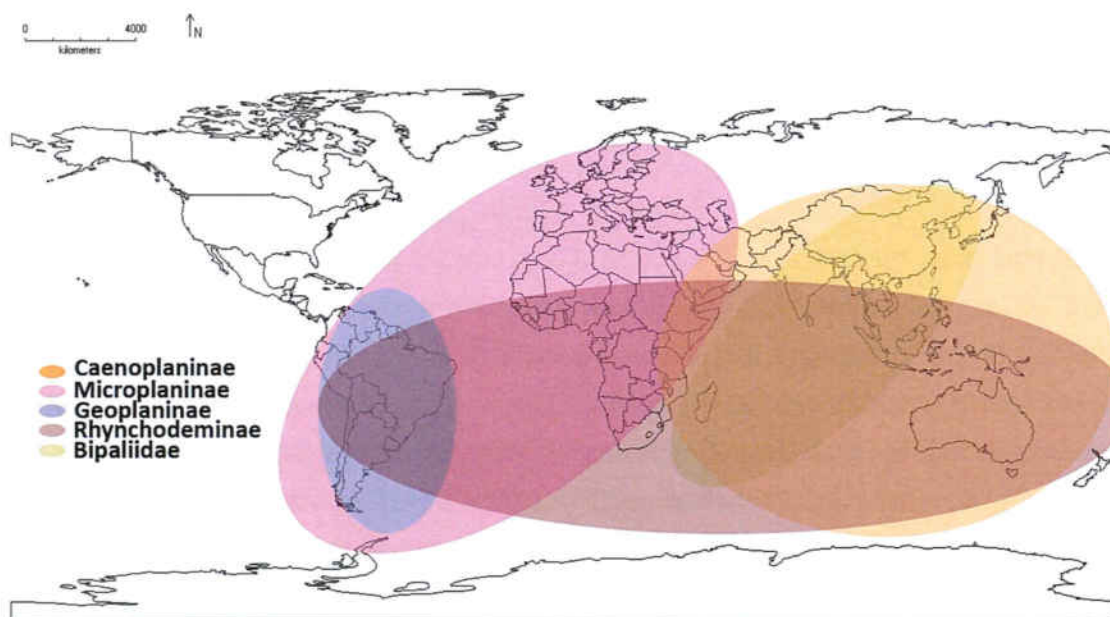


Figura 8. Distribució mundial de les principals subfamílies de planàries terrestres.

Es desplacen gràcies a la musculatura corporal i a la intervenció dels cilis de la sola ventral (Hauser i Marumann, 1959; Jones, 1978). Algunes espècies han perdut aquesta estructura, com per exemple les del gènere *Geobia* (Graff, 1912-17). Quan s'arrossequen en superfícies seques (algunes espècies també en les molt humides), la toquen només en alguns punts, el que resulta en un estalvi de moc (o evita que es mullin en excés; Froehlich, CG, 1955a). Algunes d'elles tenen comportaments de moviment curiosos, com el que descriu Froehlich al 1955 per *Choeradoplana*, que corba el seu extrem posterior cap endavant fins que toca de nou el substrat, roda cap endavant al llarg del cos, resultant en una espècie de salt mortal. Aquest moviment és causat per la capa muscular dorsal longitudinal subepidèrmica i l'hi serveix a l'animal per fugir.

Hi ha diversos motius pels quals s'ha considerat sempre que les planàries tenen una

baixa capacitat de dispersió: l'absència de parts rígides; no tenir cap part del cicle vital adaptada a la dispersió o la dependència extrema de la humitat ambiental, degut a que no tenen formes de resistència a la dessecació. Malgrat aquestes característiques, s'han detectat diversos casos de dispersió a grans distàncies majoritàriament explicables per antropocòria (Winsor, 1979; 1986; Sluys, 1995). Concretament, s'han registrat planàries terrestres a jardins botànics i hivernacles de tot el món, probablement viatjarien entre la terra humida de plantes ornamentals. És el cas per exemple de *Bipalium kewense* i *Arthurdendyus triangulatus*, que en alguns casos s'han convertit en espècies invasores i autèntiques plagues que afecten la fauna autòctona o granges de cultiu de cucs terrestres, sobretot als Estats Units i al Regne Unit (Dindal, 1970; Winsor, 1983; Jones i col. 1988; Ducey i col. 1999; Boag i Yeates, 2001). La presència d'aquests animals, però, no sempre té un efecte negatiu, sinó que hi ha casos on s'ha fet servir les planàries terrestres com a control de plagues de cargols (Muniappan, 1987; Kawakatsu i col. 1992; Sluys, 1999).

Els depredadors de les planàries terrestres són algunes larves de dípters i caràbids (Gibson i col. 1997; Hickman, 1964). Dendy (1890) va fer experiments amb gallines i va arribar a la conclusió que el moc del voltant del cos de les planàries té alguna substància desagradable per les aus, i per això no són depredades per aquest grup d'animals. Aquesta suposició podria servir també com a explicació de la manca de depredadors pertanyents a altres grups.

3.5 Les planàries terrestres com a model

Diversos autors han plantejat la utilitat de les planàries terrestres com a indicadors per estudis de biodiversitat i de l'estat de conservació dels seus hàbitats (Sluys, 1998; Carbayo i col. 2002). Com que són depredadors, depenen de la presència de les seves preses, i poden ser un bon indicador de la conservació de la xarxa tròfica del bosc i per tant del seu estat. Fins ara, la majoria d'estudis filogeogràfics utilitzaven espècies generalistes amb elevada capacitat de dispersió (majoritàriament vertebrats) que proporcionen una informació molt ambigua de l'estat del territori. Les espècies amb una baixa capacitat de dispersió, com les planàries, poden presentar una estructuració poblacional en regions geogràfiques petites (Garrick i col. 2004) cosa que les fa interessants per als estudis filogeogràfics (Sunnucks i col. 2006). A més, són més vulnerables a patir extincions locals i és menys probable que recolonitzin una àrea (Graham i col. 2006). El fet que siguin organismes especialistes fa que no puguin viure en zones on l'ambient hagi estat molt deteriorat. Alguns estudis demostren que la seva diversitat està inversament relacionada amb el grau de pertorbació de l'hàbitat (Carbayo i col. 2001; 2002; Leal-Zanchet i col. 2006). Sluys (1999) en vista a la seva biologia i requeriments ecològics va proposar l'ús de les planàries com a indicador d'àrees d'alt valor per al manteniment de la diversitat global.

3.6 Les planàries terrestres del Bosc Atlàntic de Brasil

Sluys al 1999 va identificar el Bosc Atlàntic com una de les àrees amb major diversitat de planàries terrestres a escala global. La majoria de les espècies que es troben a la Mata Atlàntica pertanyen a la subfamília Geoplaninae, tot i que també hi ha alguns Rhynchodeminae i Bipaliidae introduïts. Els estudis que s'han fet amb aquests organismes són purament taxonòmics i descriptius, tot i que també hi ha treballs sobre l'estat de les comunitats de planàries terrestres i la seva relació ecològica amb l'ambient i el tipus de bosc. Sluys (1999) basant-se en dades taxonòmiques de la literatura, va identificar 7 *hotspots* de diversitat de planàries terrestres, on els llocs més diversos eren São Paulo i Florianópolis (a Brasil). Tanmateix, la fauna de planàries terrestres del Bosc Atlàntic és força desconeguda, com demostra l'elevat nombre d'espècies noves que s'està trobant en els mostrejos realitzats per aquesta tesi.

Alguns estudis sobre l'estructuració de les comunitats de planàries terrestres al sud de Brasil mostren indicis de que aquests organismes són sensibles al reemplaçament del seu hàbitat natural per plantacions d'espècies exòtiques, presentant una major riquesa d'espècies en els boscos nadius (Carbayo i col. 2002), tot i que l'abundància i riquesa de tàxons varia amb el temps. Al 2006, Fonseca i col. van proposar les planàries terrestres com a millors tàxons indicadors de l'estat de conservació dels boscos d'*Araucaria*, basant-se en el tant per cent d'espècies registrades per cada tàxon.

El grup dels Geoplaninae ha radiat exitosament per Sud Amèrica (regió Neotropical) després de la separació de Gondwana de Nova Zelanda i Austràlia (Froehlich, 1967; Winsor i col. 1998). La gran majoria dels geoplànids Neotropicals pertanyen al gènere *Geoplanea* que, com a conseqüència d'alguns estudis taxonòmics (Carbayo i Leal-Zanchet, 2003; Leal-Zanchet i Froehlich, 2006; Carbayo, 2010), en els últims anys s'ha diversificat en altres gèneres. Per a l'estudi filogeogràfic que ens ocupa s'han utilitzat diverses espècies de planàries terrestres d'aquest grup: *Geoplanea goetschi* sensu Marcus (1951), *Cephaloflexa bergi*, *Geoplanea ladislavii*, *Geoplanea goetschi* sensu Riestler (1938), *Enterosyringia pseudorhynchodemus*, *Choeradoplana iheringi*, *Geoplanea quagga* i *Issoca* sp. nov. de les quals es pot trobar una descripció sobre els trets generals de la seva morfologia i distribució a l'Annex IV.

3.7 Les planàries terrestres de la Península Ibèrica

El coneixement general de les planàries terrestres a Europa és força pobre en comparació amb el de les planàries d'aigua dolça. Aquesta manca de coneixement segurament és deguda a la dificultat en la seva localització i a l'existència de pocs especialistes en el grup en el continent europeu. Les dues subfamílies predominants a Europa són Rhynchodeminae i Microplaninae, que són reconegudes com autòctones, mentre que també hi trobem representants de la subfamília Caenoplaninae i la família Bipaliidae en condició d'espècies

exòtiques introduïdes per l'home.

A la Península Ibèrica, fins al 2004, hi havia cites de planàries terrestres en molt poques localitats de la Península i només hi havia tres espècies autòctones descrites (*Microplana terrestris* a Menorca (Minelli, 1977); *Microplana nana* a Girona (Mateos i col. 1998) i *Rhynchodemus sylvaticus* a diferents localitats del territori ibèric (Boix i Sala, 2001)). Al 2004, Mateos i col·laboradors van constatar la presència de planàries terrestres del gènere *Microplana* a diferents localitats del Montnegre-Corredor (Catalunya). Només s'ha registrat la presència d'una espècie de planària exòtica, *Bipalium kewense* a Barcelona (Filella-Subirá, 1983), tot i que segurament n'hi ha d'altres.

L'abundància i diversitat d'espècies que potencialment poden existir dins del marc ibèric és una dada encara per descobrir. Dels tres gèneres autòctons del continent Europeu (*Rhynchodemus*, *Microplana* i *Geobenazzia*), dos d'ells ja han estat citats a la Península, essent, de moment, *Microplana terrestris* l'espècie més abundant.

OBJECTIUS

1 OBJECTIUS GENERALS

Els objectius generals d'aquesta tesi són:

- ❖ Resoldre la filogènia interna dels *Continenticola* i la de les planàries terrestres del Bosc Atlàntic de Brasil.
- ❖ Fer un estudi filogeogràfic amb planàries terrestres del Bosc Atlàntic de Brasil per investigar els processos evolutius que s'han donat dins i fora del corredor biològic de la Serra do Mar. Fer un estudi similar, encara que a molt menor escala, amb planàries terrestres de la Península Ibèrica i contrastar els resultats obtinguts.

2 OBJECTIUS ESPECÍFICS

Els objectius concrets del primer objectiu general, referent a la **filogènia molecular** són:

- Determinar si certes regions del DNA (gens nuclears, ribosomals i mitocondrials) són informatives per resoldre les filogènies a nivell de *Continenticola* i de planàries terrestres Neotropicals.
- Augmentar el nombre de tàxons en l'estudi de la determinació de les relacions filogenètiques internes dels *Continenticola*.
- Esbrinar si les planàries terrestres constitueixen un grup monofilètic.
- Aplicar els nous marcadors moleculars per resoldre la filogènia de les planàries terrestres Neotropicals.

Per a abordar el segon objectiu general referent a la **filogeografia molecular** es pretén:

- Avaluar la idoneïtat de les planàries terrestres per a fer estudis filogeogràfics en àrees geogràfiques reduïdes.
- Seleccionar les espècies òptimes per fer l'estudi filogeogràfic al Bosc Atlàntic de Brasil. Les espècies idònies seran aquelles que presentin distribucions solapades en un mateix territori i nivells de variabilitat genètica suficients.
- Seqüenciar el DNA de les regions COI i ITS-1 a una quantitat important d'individus en totes les poblacions de les espècies escollides.
- Aplicar noves metodologies de modelització bayesiana per tal d'inferir la història evolutiva que ha modelat les comunitats de planàries terrestres al centre (CAF) i sud (SAF) del Bosc Atlàntic de Brasil.
- Comparar els patrons de variabilitat obtinguts amb planàries terrestres del Bosc Atlàntic de Brasil amb els de les del gènere *Microplana* de la Península Ibèrica.

RESULTATS

Informe dels directors de la tesi especificant la participació feta pel doctorand en cada article, i si algun dels coautors d'algun dels treballs presentats en la tesi doctoral ha utilitzat, implícitament o explícitament aquests treballs per a l'elaboració d'una tesi doctoral

Els Drs. **Marta Riutort Leon** i **Julio Rozas Liras**, directors de la Tesi Doctoral elaborada per la Sra. **Marta Álvarez Presas**, amb el títol “**Filogenia i filogeografia molecular de planàries terrestres (Tricladida, Platyhelminthes) del Bosc Atlàntic de Brasil i de la Península Ibèrica**”,

INFORMEN

Que la tesi doctoral està elaborada com a compendi de 5 publicacions amb dades originals (publicacions 1-2-3-4-5 en el cos central de la tesi):

1. **ÁLVAREZ-PRESAS, M., BAGUÑÀ, J. and RIUTORT, M., 2008.** Molecular phylogeny of land and freshwater planarians (Tricladida, Platyhelminthes): From freshwater to land and back. *Molecular phylogenetics and evolution*, **47**(2), pp. 555-568. Factor d'impacte: **3.889**. Ocupa la posició **12** (sobre **45**) dins la categoria de *Evolutionary Biology*.
2. **CARBAYO, F., ÁLVAREZ-PRESAS, M., OLIVARES, C.T., MARQUES, F. and RIUTORT, M.** Molecular phylogeny of the Neotropical subfamily Geoplaninae (Platyhelminthes, Tricladida, Geoplanidae) with a morphological discussion. (en preparació).
3. **ÁLVAREZ-PRESAS, M., CARBAYO, F., ROZAS, J. and RIUTORT, M., 2011.** Land planarians (Platyhelminthes) as a model organism for fine-scale phylogeographic studies: understanding patterns of biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Journal of Evolutionary Biology*, **24**(4), pp. 887-896. Factor d'impacte: **3.656**. Ocupa la posició **16** (sobre **45**) dins la categoria de *Evolutionary Biology*.
4. **ÁLVAREZ-PRESAS, M., SÁNCHEZ-GRACIA, A., CARBAYO, F., ROZAS, J. and RIUTORT, M.** Molecular phylogeography of land planarians (Tricladida, Platyhelminthes): Insights into the origin of biodiversity patterns in the southern Brazilian Atlantic Forest hotspot. (en preparació).
5. **ÁLVAREZ-PRESAS, M., MATEOS, E., VILA-FARRÉ, M., SLUYS, R. and RIUTORT, M.** Evidence of the persistence of the land planarian species *Microplana terrestris* (Müller, 1974) (Platyhelminthes, Tricladida) in microrefugia during the Last Glacial Maximum in the northern section of the Iberian Peninsula. Aquest article s'ha enviat a la revista *Molecular Phylogenetics and Evolution*.

A les publicacions 1, 3, 4, 5 i 6 la doctoranda va realitzar les tasques de seqüenciació i d'anàlisi filogenètica i poblacional de les dades moleculars, havent participat també en les anàlisis de coalescència i d'ABC de la publicació 4. A la publicació 2 la doctoranda ha amplificat els gens EF-1 α i ATPasa- α , a més d'obtenir algunes seqüències de 28S rDNA, mentre que la resta de seqüències de l'article s'han obtingut al laboratori de la Universitat de São Paulo per Cláudia Olivares. A les publicacions 2, 3, 4 i 5, a més, va participar en el mostreig realitzat a Brasil i la Península Ibèrica i va redactar el primer esborrany dels manuscrits. En tots els casos ha participat en l'elaboració de la redacció final dels manuscrits. En cap cas s'ha utilitzat, implícitament o explícitament, els treballs presentats en aquesta tesi per a l'elaboració d'una altra tesi doctoral.



Dra Marta Riutort León



Dr. Julio Rozas Liras

CAPÍTOL 1

Molecular phylogeny of land and freshwater planarians (Tricladida, Platyhelminthes): From freshwater to land and back

Filogènia molecular de planàries terrestres i d'aigua dolça (Tricladida, Platyhelminthes): un retorn a l'aigua dolça des del medi terrestre

Marta Álvarez-Presas, Jaume Baguñà i Marta Riutort

Molecular Phylogenetics and Evolution 47 (2):555-568 (2009)

Resum

El subordre dels Triclàdides (Ph. Platyhelminthes) comprèn els platihelminths de vida lliure, taxonòmicament agrupats en tres infraordres segons els seus requeriments ecològics: Maricola (planàries marines), Paludicola (planàries d'aigua dolça), i Terricola (planàries terrestres). Donada la importància biològica del grup en diferents camps, com per exemple el desenvolupament, és molt important tenir-ne una classificació sòlida. Alguns autors com I. Ball o R. Sluys han intentat d'aconseguir-ne una filogènia mitjançant dades morfològiques, però la manca de sinapomorfies fa la tasca molt difícil. Les anàlisis moleculars han demostrat que els Paludicola són parafilètics i que els Terricola són el grup germà d'una de les tres famílies de Paludicola, els Dugesidae. No obstant això, ni el gen ribosomal 18S, ni els arbres basats en el gen mitocondrial COI han estat capaços de resoldre les relacions entre les espècies de Terricola i Dugesidae, i tampoc han permès corroborar la monofília dels Terricola. En aquest article presentem noves dades moleculars, incloent seqüències de gens nuclears (18S rDNA i 28S rDNA) i un gen mitocondrial (COI), ampliant el mostratge d'espècies de dugèsids i planàries terrestres respecte els treballs anteriors. Les noves seqüències s'han analitzat, juntament amb les seqüències obtingudes anteriorment, en anàlisis independents i concatenades usant màxima versemblança i mètodes bayesians. Els resultats, encara que algunes parts dels arbres segueixen presentant baixa resolució, donen suport a l'origen monofilètic de Terricola, seguit d'un possible retorn d'algunes espècies als hàbitats d'aigua dolça. Les relacions dins del grup monofilètic de Dugesidae es resolen amb claredat, i les relacions entre algunes subfamílies de planàries terrestres també estan clarament establertes i apunten a la necessitat d'una profunda revisió de la taxonomia dels Terricola.



Molecular phylogeny of land and freshwater planarians (Tricladida, Platyhelminthes): From freshwater to land and back

Marta Álvarez-Presas, Jaume Baguña*, Marta Riutort*

Dpt. de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Edifici annex, 3a planta, Av. Diagonal, 645, 08028 Barcelona, Spain

Received 10 May 2007; revised 10 January 2008; accepted 22 January 2008

Available online 6 February 2008

Abstract

The suborder Tricladida (phylum Platyhelminthes) comprises the well-known free-living flatworms, taxonomically grouped into three infraorders according to their ecology: Maricola (marine planarians), Paludicola (freshwater planarians), and Terricola (land planarians). Molecular analyses have demonstrated that the Paludicola are paraphyletic, the Terricola being the sister group of one of the three paludicolan families, the Dugesidae. However, neither 18S rDNA nor COI based trees have been able to resolve the relationships among species of Terricola and Dugesidae, particularly the monophyly of Terricola. Here, we present new molecular data including sequences of nuclear genes (18S rDNA, 28S rDNA) and a mitochondrial gene (COI) of a wider sample of dugesiid and terricolan species. The new sequences have been analyzed, together with those previously obtained, in independent and concatenated analyses using maximum likelihood and bayesian methods. The results show that, although some parts of the trees remain poorly resolved, they support a monophyletic origin for Terricola followed by a likely return of some species to freshwater habitats. Relationships within the monophyletic group of Dugesidae are clearly resolved, and relationships among some terricolan subfamilies are also clearly established and point to the need for a thorough revision of Terricola taxonomy.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: 18S rDNA; 28S rDNA; COI; Tricladida; Platyhelminthes; Molecular phylogeny; Continenticola; Terricola; Planarians; Dugesidae

1. Introduction

Within the free-living Platyhelminthes the triclads or planarians are perhaps the best known group, largely as a result of intensive research concerning cellular regeneration, pattern formation and, most recently, Hox gene expression (for a general review see Saló and Baguña, 2002). Planarians are globally distributed, occurring in marine, limnic and terrestrial environments. Recently, interest in the terrestrial planarians has been stimulated as a result of the introduction of non-native predatory species in regions where they have achieved pest status, e.g. in the case of the New Zealand flatworm, *Arthurdendys triangulatus*, and its invasion of the British Isles and continental Europe (Jones and Boag, 1996). Terrestrial planarians also seem to be good

biodiversity indicators (Sluys, 1999). In view of their biological importance in so many fields, a robust phylogenetic scheme is required both for taxonomic and comparative purposes.

The Tricladida was long considered a suborder (Ehlers, 1985) within the order Seriata, being a sister group to the suborder Proseriata. However, the new phylogenies obtained from molecular data (Willems et al., 2006; for a review see Baguña and Riutort, 2004) all point to the Tricladida being part of a clade of Rhabditophoran Platyhelminthes that includes the Prolecitophora and a group made up of four parasitic genera, this clade being in most analyses the sister group to the Rhabdocoela, although with low support. For over 100 years systematists have recognized three major groups within the Tricladida, for which they used Hallez (1890) ecological names: Paludicola, Terricola, and Maricola. A fourth clade, the Cavernicola which contained taxa formerly assigned to the Maricola but with

* Corresponding author. Fax: +34 934 034 420.
E-mail address: mriutort@ub.edu (M. Riutort).

apparent closer affinities to the Paludicola was proposed by Sluys (1990). The taxonomic rank of these groups has shifted between that of suborder and infraorder, the latter being the accepted rank today. The systematic and phylogenetic relationships of these infraorders have been discussed on the basis of morphological and ultrastructural characters by Ball (1977, 1981); Sopott-Ehlers (1985), and Sluys (1989a). Within triclads, Ball (1977, 1981) considered Terricola (defined by its complex diploneural nervous system) as the sister group of an undefined (no synapomorphies disclosed) clade formed by Maricola and Paludicola (Haploneura). Whereas no synapomorphies were found for the Maricola, two presumed synapomorphies defined

the Paludicola: their reduced precerebral diverticula and the probursal condition of the intestine.

Reassessment of previously used characters and the introduction of new ones were the basis of a new phylogenetic scheme by Sluys (1989a) (Fig. 1A). The new characters were found to support the monophyly of the Tricladida, the Terricola, the Maricola and the Paludicola, as well as to suggest the existence of a new clade, the Terricola–Paludicola clade. All infraorders were considered monophyletic. Under this scenario, land planarians evolved from marine ancestors whereas freshwater planarians came either from a land planarian ancestor or from a marine ancestor common to land and freshwater planarians.

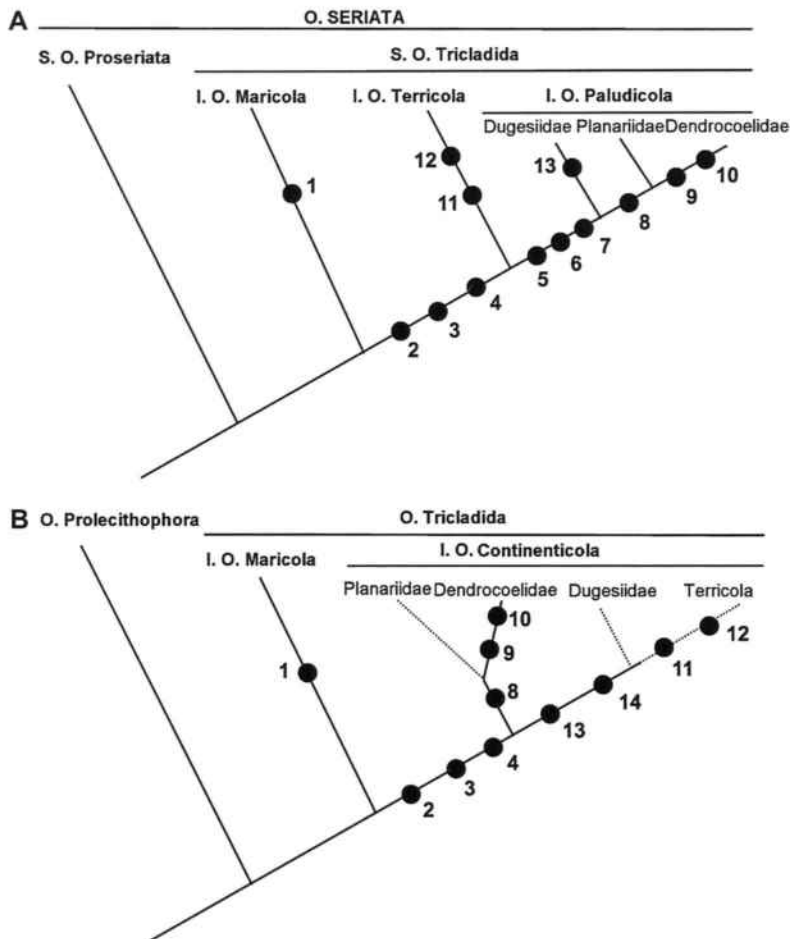


Fig. 1. (A) Phylogenetic relationships of the Tricladida based on morphological characters according to Sluys (1989a); (B) phylogenetic hypothesis for the Tricladida based on molecular characters (18S rDNA sequences and an 18S rDNA duplication event) (Carranza et al., 1998a). Dashed lines indicate groups that are not well-supported in the molecular phylogenetic analysis. Black circles indicate the hypothesized autapomorphies for each phyletic line. (1) Haftpapillen in annular zone; (2) loss of Haftpapillen; (3) resorptive vesicles; (4) reduction number of longitudinal nerve cords; (5) four subepidermal muscle layers; (6) spermatophore; (7) probursal condition; (8) common oviduct opening into atrium; (9) dendrocoelid pharyngeal musculature; (10) anterior adhesive organ; (11) creeping sole; (12) diploneural nervous system; (13) multicellular eye cup with numerous retinal cells; (14) two types of 18S rRNA genes.

A radically different view of infraorder relationships of Tricladida emerged from molecular studies based on sequences of 18S ribosomal genes, later confirmed by a molecular synapomorphy, the presence of a duplication of the ribosomal gene cluster shared by the Terricola and the family Dugesidae of the Paludicola (Carranza et al., 1998a,b; Fig. 1B). The resulting phylogenetic trees strongly indicated that the Paludicola is paraphyletic since the dugesiids share a more recent common ancestor with the terricolans than with the remaining paludicolans. As a result, the infraorders Terricola and Paludicola became redundant and were replaced by a new taxon, the Continenticola (Carranza et al., 1998a). A study using cytochrome oxidase I (COI) sequences (Baguña et al., 2001), lends further support to the clustering of Terricola and Dugesidae and to the sister group status of the Planariidae + Dendrocoelidae. However, neither 18S gene nor COI gene sequences support the monophyly of either the Terricola or the Dugesidae, rendering them, so far, paraphyletic.

Relationships within the infraorders based on morphological characters have been considered in some detail within the Maricola (Sluys, 1989b) and the Paludicola (Ball, 1974; De Vries and Sluys, 1991; Sluys, 1989a), but not for the Terricola. Within the Paludicola, Ball (1974) recognized three families: Dugesidae Ball, 1974, Planariidae Stimpson, 1857, and Dendrocoelidae Hallez, 1894. Planariidae plus Dendrocoelidae, or Planarioidea, were considered the sister group of the F. Dugesidae (Ball 1981). In Ball's proposal some uncertainties were left open, one of them being the closer similarities in eye structure between the Dugesidae and the land planarians (Terricola) than between Dugesidae and the non-dugesiid members of the Paludicola (Ball 1981; Sluys 1989a, b). However, in the new phylogenetic scenario based on the molecular data, the complex eye structure of the Dugesidae was considered a synapomorphy for the new Dugesidae + Terricola clade (Carranza et al., 1998a) (Fig. 1B). The Terricola are taxonomically divided into three families (Geoplanidae Stimpson 1857, Bipaliidae Stimpson 1857 and Rhynchodemidae Graff 1896) which are divided into a number of subfamilies (Supplementary data 1). Although some hypotheses on the ancestry of one or other subfamilies have been proposed (Marcus, 1953; Froehlich, 1967; Winsor et al., 1998), no cladistic study has been undertaken for this group of triclads.

In summary, to date molecular data strongly indicate that Dugesidae and Terricola constitute a monophyletic group. However, the origin of the terricolan species is uncertain. So far molecular data do not lend support to the monophyly of this group (and hence to the Dugesidae) because different terricolan species cluster with different dugesiid species. This opens the possibility of multiple independent origins for the transition from freshwater to terrestrial habitats.

To address these uncertainties, we have obtained new 18S and COI sequences and chosen four new genes to be tested for the presence of phylogenetic signal for the Tricladida (two nuclear genes, Histone H3 and 28S rDNA, and two mitochondrial ones, 16S and 12S rDNA). These genes were selected because they have been shown to be of use in similar studies for other groups of organisms. We have also undertaken denser taxon sampling, gathering representatives for 61 Tricladida, including representatives of 7 out of 9 genera of Dugesidae, and of all but one subfamily of Terricola (Table 1, Supplementary data 1). Of the four new genes tested only two were amplifiable from the Tricladida, and only one of these was informative (28S rDNA). The 28S sequences and the new sequences obtained for the two types of 18S rDNA and COI were analyzed together with those already existing in GenBank with the aims of: (1) further testing the new triclad phylogeny drawn from molecular data; (2) clarifying the monophyletic status of the Terricola and Dugesidae; and (3) inferring the internal phylogeny of the Dugesidae + Terricola clade.

2. Material and methods

2.1. Organisms

Table 1 lists the species studied with their taxonomic affiliation and the region of origin of the population studied (when known). New sequences obtained in this study are indicated with a superscript index letter.

2.2. DNA extraction, gene amplification, cloning and sequencing

High molecular weight DNA was purified from live or ethanol fixed specimens according to a modification of the guanidine isothiocyanate method (Carranza et al., 1998a,b) originally described for RNA (Chirgwin et al. 1979).

Specific primers (Table 2) were used to amplify the entire length of the 18S rDNA and partial sequences for COI, 16S, 12S, Histone H3 and 28S rDNA genes. The annealing temperatures used for each pair of primers are also specified in Table 2.

For 18S and 28S rDNA genes, the PCR products were cloned using HTP TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen). At least ten colonies were sequenced for each species in search of the two types of sequences present in Dugesidae and Terricola species. For the other genes, amplification products were sequenced directly using the same primers used in the PCR reaction. For cloned products, T3 and T7 primers supplied by the manufacturer of the sequencing kit were used. In all cases both chains were sequenced using Big-Dye (3.1, Applied Biosystems) and an automated sequencer ABI Prism 3730 (Unitat de Genòmica dels Serveis Científic-Tècnics de la UB).

Table 1

List of samples used in this study with sampling locality and GenBank accession numbers

Species	Region of origin	18S rRNA ^a		28S rRNA	COI
		Type I	Type II		
<i>Maricola</i>					
Family Procerodidae					
<i>Procerodes littoralis</i>	Iceland	Z99950		DQ665985 ^b	DQ666050 ^b
<i>Procerodes plebeja</i>	Iceland	DQ665997 ^b		DQ665987 ^b	DQ666051 ^b
Family Bdellouridae					
Subfamily Bdellourinae					
<i>Bdelloura candida</i>		Z99947		AY157154	DQ666029 ^b
Subfamily Palombiellinae					
<i>Palombiella stephensoni</i>	New Zealand	DQ666008 ^b		DQ665988 ^b	
Family Cercyridae					
<i>Cercyra hastata</i>	Catalonia (Spain)	DQ665995 ^u		DQ665962 ^b	
<i>Continenticola</i>					
Superfamily Planarioidea					
Family Planariidae					
<i>Phagocata ullala</i>	Catalonia (Spain)	AF013149			
<i>Phagocata vitta</i>	Catalonia (Spain)	DQ665998 ^b		DQ665989 ^b	DQ666052 ^b
<i>Phagocata sibirica</i>		Z99948			
<i>Phagocata</i> sp.	Catalonia (Spain)	AF013150		DQ665990 ^b	DQ666053 ^b
<i>Crenobia alpina</i>	Switzerland	M58345		DQ665960 ^b	AF178308
<i>Polycelis nigra</i>	Catalonia (Spain)	AF013151			
<i>Polycelis tenuis</i>	Catalonia (Spain)	Z99949		AF022762	AF178321
<i>Polycelis felina</i>	Catalonia (Spain)	DQ665996 ^b		DQ665984 ^b	DQ666049 ^b
Family Dendrocoelidae					
Subfamily Dendrocoelinae					
<i>Dendrocoelum lacteum</i>	France	AJ312271		DQ665967 ^b	AF178312
<i>Dendrocoelopsis lactea</i>	Menorca (Spain)	D85087			
<i>Baikalobia guttata</i>	Russia	Z99946			
<i>Dugesiiidae + Terricola</i>					
Family Dugesiiidae					
<i>Cura pinguis</i>	New Zealand	AF033043		DQ665963 ^b	AF178309
<i>Dugesia gonocephala</i>	Netherlands		DQ666002 ^b	DQ665965 ^b	DQ666033 ^b
<i>Dugesia etrusca</i>	Italy				AF178310
<i>Dugesia japonica</i>	Japan	AF013153	D83382	DQ665966 ^b	DQ666034 ^b
<i>Dugesia ryukyuensis</i>	Japan		AF050433	DQ665968 ^b	AF178311
<i>Dugesia sicula</i>	Catalonia (Spain)			DQ665969 ^b	DQ666035 ^b
<i>Dugesia subtentaculata</i>	Spain	M58343	AF013155	DQ665970 ^b	DQ666036 ^b
<i>Girardia anderlani</i>	Brasil		DQ666013 ^b	DQ665972 ^b	DQ666038 ^b
<i>Girardia dorotocephala</i>	Indiana (USA)				AF178314
<i>Girardia schubarti</i>	Brasil		DQ666015 ^b	DQ665976 ^b	DQ666041 ^b
<i>Girardia tigrina</i>	Montpellier (France)	AF013157	AF013156	DQ665977 ^b	DQ666042 ^b
<i>Neppia montana</i>		AF050432			AF178319
<i>Neppia</i> sp.	New Zealand	DQ665999 ^b		DQ665982 ^b	DQ666046 ^b
<i>Romankenkius libidinosus</i>			Z99951	AF022766	
<i>Schmidtea mediterranea</i>	Catalonia (Spain)	U31084	U31085	DQ665992 ^b	AF178322
<i>Schmidtea polychroa</i>	Catalonia (Spain)	AF013152	AF013154	DQ665993 ^b	AF178323
<i>Schmidtea lugubris</i>					AF290022
<i>Schmidtea nova</i>					AF290023
<i>Spathula</i> sp.	New Zealand		DQ666007 ^b	DQ665994 ^b	AF178324
<i>Spathula alba</i>	New Zealand	DQ666009 ^b	DQ666006 ^b	DQ665991 ^b	DQ666054 ^b
<i>Terricola</i>					
Family Bipaliidae					
<i>Bipalium adventitium</i>	Leingston (USA)		DQ666000 ^b	DQ665956 ^b	AF178306
<i>Bipalium kewense</i>		AF033039	AF033045	AF026119/AF022756	
<i>Bipalium multilineatum</i>			DQ666012 ^b	DQ665957 ^b	
<i>Bipalium nobile</i>	Japan		DQ666001 ^b	DQ665958 ^b	
<i>Bipalium</i> sp.	Japan			DQ665959 ^b	AF178307
<i>Novibipalium venosum</i>	Japan		DQ666019 ^b	DQ665981 ^b	DQ666048 ^b

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Species	Region of origin	18S rRNA ^a		28S rRNA	COI
		Type I	Type II		
Family Geoplanidae					
Subfamily Caenoplaninae					
<i>Artioposthia testacea</i>	Marlborough (Australia)		DQ666010 ^b	DQ665952 ^b	AF178305
<i>Artioposthia</i> sp.	Australia	L41133	DQ666011 ^b	DQ665954 ^b	AF178325
<i>Arthurdendyus triangulatus</i>		AF033038	AF033044	DQ665953 ^b	DQ666027 ^b
<i>Caenoplana caerulea</i>	Liverpool (UK)	AF033040	AF033046	DQ665961 ^b	DQ666030 ^b
<i>Caenoplana</i> sp.			AF048765	DQ665964 ^b	DQ666031 ^b
<i>Caenoplana</i> sp.4					DQ666032 ^b
<i>Newzealandia</i> sp.			AF050431		
<i>Australoplana</i> sp.	Australia	AF033041	AF050434	DQ665955 ^b	DQ666028 ^b
Subfamily Geoplaninae					
<i>Geoplana burmeisteri</i>	Santinhos (Brasil)		DQ666004 ^b	DQ665973 ^b	DQ666039 ^b
<i>Geoplana ladislavii</i>	Brasil		DQ666005 ^b	DQ665975 ^b	AF178315
<i>Geoplana quagga</i>	Brasil		DQ666014 ^b	DQ665974 ^b	DQ666040 ^b
<i>Geoplana</i> sp.	Uruguay		DQ666016 ^b	DQ665978 ^b	DQ666043 ^b
<i>Notogynaphallia</i> sp.	Sao Leopoldo (Brasil)		DQ666018 ^b	DQ665983 ^b	DQ666047 ^b
Family Rhynchodemidae					
Subfamily Rhynchodeminae					
<i>Dolichoplana</i> sp.			DQ666003 ^b	DQ665971 ^b	DQ666037 ^b
<i>Platydemus manokwari</i>	Townsville (Australia)		AF048766	DQ665986 ^b	AF178320
Subfamily Microplaninae					
<i>Microplana nana</i>	Catalonia (Spain)	AF033042			AF178316
<i>Microplana scharffi</i>	Cornwall (UK)		AF050435	DQ665979 ^b	DQ666044 ^b
<i>Microplana terrestris</i>	Catalonia (Spain)				AF178318
<i>Microplana</i> sp.	Catalonia (Spain)		DQ666017 ^b	DQ665980 ^b	DQ666045 ^b

^a Only species belonging to the Dugesidae + Terricola clade have two types of 18S rDNA gene. The rest have only one type.
^b Sequences obtained for this study.

Table 2
Forward (F) and reverse (R) PCR primers (also used in sequencing)

Name	Sequence 5'–3'	Annealing temperature (°C)	Source
18S rRNA			
18S_1F	TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAG	45	Carranza et al. (1996)
18S_5R	CTTGGCAAATGCTTTCGC		Carranza et al. (1996)
18S_5F	GCGAAAGCATTTGCCAAGAA		Carranza et al. (1996)
18S_9R	GATCCTTCCGCAGGTTCACTAC		Carranza et al. (1996)
18S_4F	CCAGCAGCCGCGCTAATTC		Carranza et al. (1996)
18S_7R	GCATCACAGACCTGTTATTGC		Carranza et al. (1996)
28S rRNA			
28S_1F	TATCAGTAAGCGGAGGAAAAG	52	This study
28S_3R	CCTTGGGTCCGTGTTTCAAGAC	52	This study
28S_2F	CTGAGTCCGATAGCAAACAAG	49	This study
28S_4R	CCAGCTATCCTGAGGG	49	This study
28S_3F	GTCTTGAAACATGGACCAAGG	53	This study
28S_6R	GGAACCCCTTCTCCACTTCAGT	53	This study
COI			
COIpr-a2	AGCTGCAGTTTTGGTTTTTTTGA	43	Bessho et al. (1992)
COIpr-b2	ATGAGCAACAACATAATAAGTATCATG		Bessho et al. (1992)
16S			
16SA	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	45	Arnedo et al. (2004)
16SB2	CTCCGGTTTGAAGTCAGATCA		Arnedo et al. (2004)
12S			
12SbS	TGAGGAGGGTGACGGGCGGT	40	
12SA	CTGGGATTAGATACCCCACTAT		
H3			
H3a_F	ATGGCTCGTACCAAGCAGAC(AGC)GC	48	Colgan et al. (1998)
H3a_R	ATATCCTT(AG)AT(AG)GTGAC		Colgan et al. (1998)

2.3. Sequence alignment

Alignments were obtained for those sequences successfully amplified (18S type I and type II, 28S, COI and 16S). SeqEd (v. 1.03, Applied Biosystems) was used to revise the chromatograms and obtain the definitive sequences. ClustalX (v. 1.8; Thompson et al., 1997) was used to align the sequences, and the alignments were finally revised by hand with the help of a computer editor (BioEdit v. 7.0). New 18S sequences were added to an existing alignment based on their secondary structure. The COI gene was aligned using the amino acids and then retranslated to nucleotides. In all cases, those positions that could not be unambiguously aligned were subsequently excluded from the analyses.

Individual alignments were merged in a concatenated alignment. Because species sampling for all genes was not identical (due to difficulties in amplifying certain genes, or insufficient amounts of sample) only those species with at least two completely sequenced genes were used in the concatenated alignment (Table 1). Missing genes were denoted as Ns.

The sequence alignments and the weighting masks that determine the nucleotides positions taken for the analyses are available from the authors and can also be downloaded from http://www.ub.es/geisan/MARTA_2.HTML.

2.4. Phylogenetic analysis

Prior to the reconstruction of phylogenies, a relative rate test for all taxa and for each gene was performed in RRTree (Robinson-Rechavi and Huchon, 2000), each taxon considered as a separate lineage. A saturation test was also performed for each gene using DAMBE (Xia and Xie, 2001) and a nucleotide composition test was run using TreePuzzle v. 5.2 (Schmidt et al., 2002).

To assess the orthology of the ribosomal sequences (i.e. their belonging to either the type I or type II of ribosomal cluster) for the dugesiid and terricolan species Neighbor-joining (NJ) trees were inferred. For 18S the two types of sequences were present while for 28S only one type of sequence was recovered. Henceforth, for 18S two independent alignments were used (named 18S-t1 and 18S-t2), one for each type of sequence, using the 18S sequences from the

Planarioidea and the Maricola triclads as the outgroup in both cases.

For phylogenetic inference six different datasets (Table 3) were analyzed: each gene independently (COI, 18S-t1, 18S-t2 and 28S datasets), the four genes concatenated (complete dataset), and a concatenated set excluding COI sequences (hence called t1 + t2 + 28 dataset).

NJ analyses and bootstrap resampling (1000 replicates) were performed using the set of programs in the PHYLIP package (Felsenstein, 1993), correcting the distances with the two-parameter method of Kimura (1980). ML trees were inferred using FastDNAmI (Felsenstein, 1981; Olsen et al., 1994), with global and jumble options; the gamma distribution was implemented using the parameters (eight categories) inferred with TREE-PUZZLE (v.5.2; Schmidt et al., 2002). Bootstrap values with FastDNAmI were calculated only for the t1 + t2 + 28 dataset (due to time limitations) using a parallel version of the program (<http://rac.uits.iu.edu/hpc/fastDNAmI/index.shtml>) at the MareNostrum supercomputer (Barcelona Supercomputing Center, BSC, IBM). BI trees were inferred using MrBAYES v. 3.0 (Ronquist and Huelsenbeck, 2005) with the model recommended by Modeltest (v. 3.6, Posada and Crandall, 1998) under the Akaike information criterion. One million generations for two independent runs were performed, to calculate the consensus tree the first 100,000 trees in the sample were removed to avoid including trees sampled before likelihood values had reached a plateau. For concatenated datasets the parameters for the model were unlinked for each gene.

Representatives of maricolans were chosen to root the Continenticola tree because they are known to be its sister group (Carranza et al., 1998a,b; Baguña et al., 2001). For the Terricola + Dugesidae trees, species of Dendrocoeliidae and Planariidae were chosen because they represent a closer root (see Section 3).

Competing topologies based on previous hypothesis were evaluated. The alternative topologies were constructed using TreeView and the approximately unbiased test (AU, Shimodaira, 2000) was performed (RELL; 1,000 replicates) in CONSEL (Shimodaira and Hasegawa, 2001), PAUP (Swofford, 2000) was used to prepare the input dataset for CONSEL.

Table 3

Number of sequences analysed for each gene and taxonomical group, the numbers in parenthesis indicate the number of sequences obtained for this study

Group	18S rRNA type I (t1)	18S rRNA type II (t2)	28S rRNA (28)	COI	T1 + T2 + 28	Complete
Maricola	5(3)	5(3)	5(4)	3(3)	5	5
Planarioidea	11(2)	11(2)	6(5)	6(3)	6	7
Dugesidae	9(2)	11(5)	14(13)	19(9)	14	16
Terricola	6	17(12)	21(20)	21(13)	20	22
Total	31(7)	44(22)	46(42)	49(28)	45	50
Total number of nucleotides in the alignment	1690	1690	1495	206	4875	5081

The last row indicates the length in nucleotides of the final alignment for each gene.

3. Results

3.1. New genes tested and sequences obtained

Of the 4 new genes to be tested as markers for phylogenetic inference in the Tricladida (nuclear: 28S rDNA, Histone H3; mitochondrial: 16S and 12S rDNA), two (Histone H3 and 12S) could not be amplified despite multiple attempts under different PCR conditions. Primers used were universal and had been used previously in multiple studies. However, tricladids might have sequence variations that hindered amplification. For 16S, sequences were obtained for 9 species (*A. triangulatus*, *B. adventitium*, *Dendrocoelum*, *C. alpina*, *S. alba*, *S. mediterranea*, *G. dorotocephala*, *B. multilineatum* and *D. subtentaculata*), but after alignment they showed a degree of variability unsuitable for the level of analysis required. Therefore sequencing of 16S was rejected. Finally, 28S was successfully amplified for most species.

Table 1 lists the studied species and successfully sequenced genes in this and previous studies. A total of seven new 18S type I, 22 type II, 42 28S and 28 COI sequences were obtained.

To avoid sequences carrying misleading phylogenetic information, tests were run prior to analysis. First, all sequences were found to have the same nucleotide composition. Moreover, the relative rate test showed that all pairs of sequences had equivalent rates of substitution. Therefore, neither biased nucleotide composition nor long-branch attraction problems among species seem likely.

3.2. Individual gene phylogenies

The number of sequences used in each analysis and the total length of each alignment is summarized in Table 3. For the COI gene (COI dataset), graphical analysis of saturation indicated the need to remove third codon positions. In fact, all three codon positions showed this molecule to be quite saturated.

Bayesian trees (not shown) were inferred from the four independent datasets using maricolans as outgroup. In all cases, the rooting resulted in Planarioidea being the sister group of the Dugesidae + Terricola clade. This topology confirms, using independent datasets, that paludicolans are paraphyletic because they include the Terricola, which have a closer relationship to the Dugesidae, as previously shown (Carranza et al., 1998a,b; Baguña et al., 2001).

BI trees obtained from these independent datasets using planarioidea as outgroup are shown in Supplementary data 2 (A, 18S-t1; B, 18S-t2; C, 28S; D, COI). The 18S-t1 and COI trees do not contain enough information to address the main questions posed for this study. For the former, this is due to poor sampling of dugesiid + terricolans. For the latter, despite rich sampling, the short length of the sequences and their saturation leads to a lack of resolution, giving rise to large polytomies (in which nodes with posterior probabilities under 0.5 have been collapsed).

The 18S-t2 and 28S trees have better resolved topologies and show some well-supported coinciding clades: the clustering with maximum support of the genera *Dugesia* and *Schmidtea*; the unexpected clustering, also with maximum support, of the Rhynchodeminae with the Caenoplaninae; and the monophyly of families and subfamilies within the Terricola (Geoplaninae, Caenoplaninae, Microplaninae, Rhynchodeminae and Bipaliidae) and of some dugesiid genera (*Schmidtea* and *Dugesia*). A second unexpected result is the grouping, also supported in both trees, of two dugesiid genera (*Spathula* and *Romankenkius*) within a terricolan clade, despite having a different sister group in each tree.

3.3. Concatenated phylogenies

For the whole alignment the average amount of missing data is 25%, with six species having ambiguous characters (N's, gaps and IUPAC uncertainties) over 50% (*Geoplanea* sp. (52.78%), *Notogynaphallia* (50.82%), *G. andersoni* (51.58%), *M. nana* (57.74%), *D. sicula* (54.18%), *N. montana* (62.72%)).

From this dataset we inferred a first bayesian tree using the species of Maricola as outgroup. The tree obtained (Fig. 2A) showed, as expected, the Planarioidea as the sister group to the Dugesidae + Terricola. Noteworthy features of this tree are the length of the branch separating the Maricola from the ingroup and the large distances between genera, distinctly greater than those for the other clades. Using the Planarioidea as outgroup the tree obtained (Fig. 2B) is basically similar to that of Fig. 2A though some posterior probability values have increased (green circles in Fig. 2B), probably due to removal of homoplasies (noise) generated by the too distant maricolan outgroup. A new tree was then inferred using maximum likelihood (Fig. 2C). Surprisingly, the main difference between BI and ML trees is their different rooting points. While in the BI tree the outgroup roots the Dugesidae + Terricola in the branch leading to the Geoplaninae (Fig. 2B), in the ML tree (Fig. 2C) the outgroup roots the Dugesidae + Terricola at the branch leading to the dugesiid genus *Neppia*.

Next we examined the effect of removing COI sequences from the concatenated dataset. Independent analyses of COI data (Supplementary data 2D) had shown this molecule to be non-informative at the level we were interested in. In this new dataset, some species were removed to avoid an increase in the missing data (again, only species with more than two genes were included). The trees obtained using BI and ML methods had identical topologies (Fig. 2D). Posterior probabilities compared to those of the previous tree (Fig. 2B) were usually higher (green circles in Fig. 2D), bootstrap values for ML were also calculated.

The above-mentioned rooting problem prompted us to carry out further analyses. We inferred a phylogeny without outgroup from the complete dataset using BI and

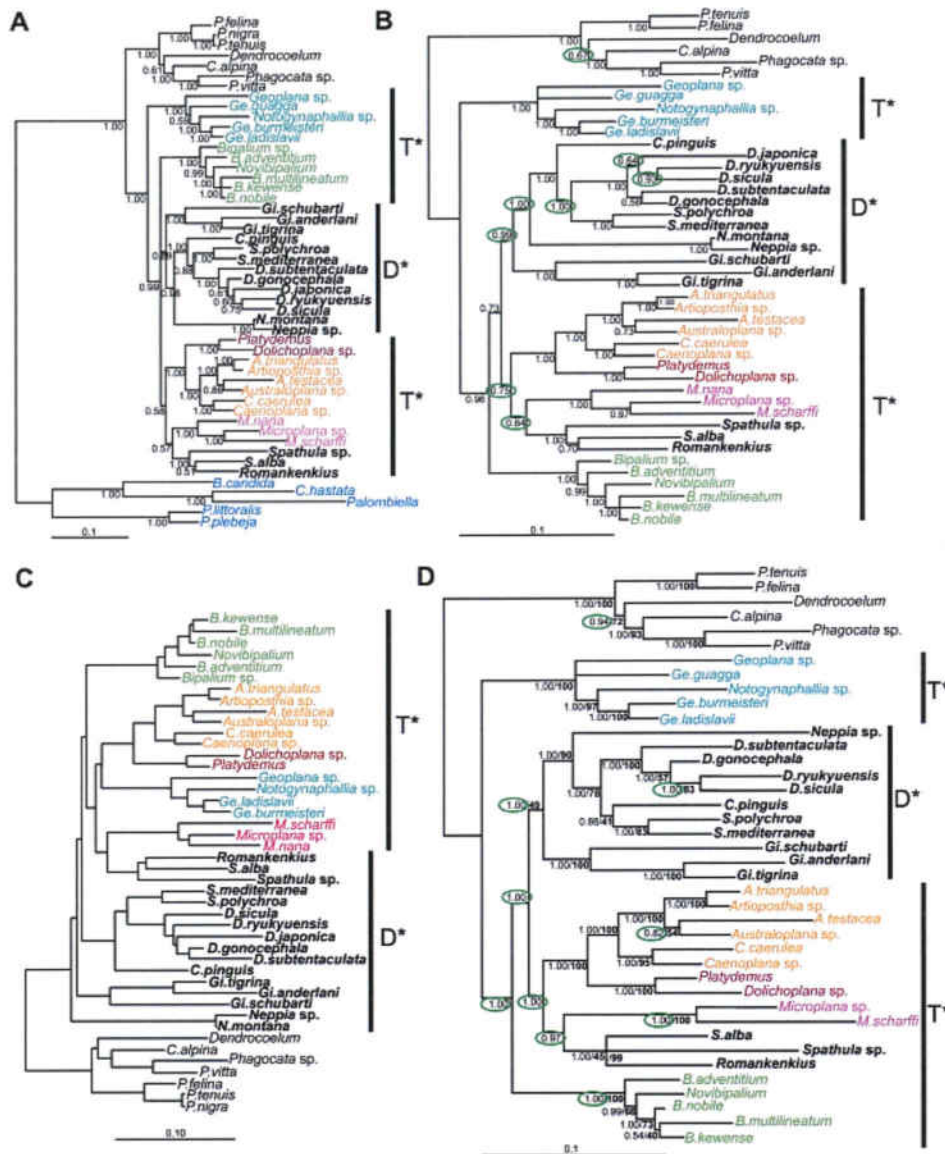


Fig. 2. (A) BI tree inferred from the complete dataset using maricola as outgroup, values at nodes are posterior probabilities (PP); (B) BI tree inferred using Planarioidea as outgroup, green circles indicate nodes that increase in support with respect to the analysis in (A); (C) Tree obtained by ML with the same data as tree in (B); (D) BI and ML tree obtained excluding COI from the alignment (t1 – t2 – 28S dataset), numbers at nodes are PP/ bootstrap values obtained by ML. Colors represent major groups: Dugesidae (bold black), Geoplaninae (light blue), Bipaliidae (green), Caenoplaninae (orange), Rhynchodermineae (brown), Microplaninae (magenta), Planarioidea (regular black), Maricola (dark blue). Scale bar represents number of substitutions per site. T* and D* stand for Terricola* and Dugesidae*, respectively.

ML (Fig. 3). The resulting trees have the same general topology, even when COI was not included only minor differences were observed in the relationships within or among some genera. A NJ tree including outgroup was also inferred (not shown, see Section 4 for an explanation). For this tree the rooting point was in the branch separating Dugesidae* from Terricola*.

Comparison of all the trees reveals several regularities, some highly supported. Firstly, for the concatenated alignment the paludicolan genera *Spathula* and *Romankenkius* always group within the Terricola clade. For this reason, and from now on, we will define Dugesidae* as the group of dugesiids analysed, excluding the paludicolan genera *Romankenkius* and *Spathula*, and Terricola* as the group

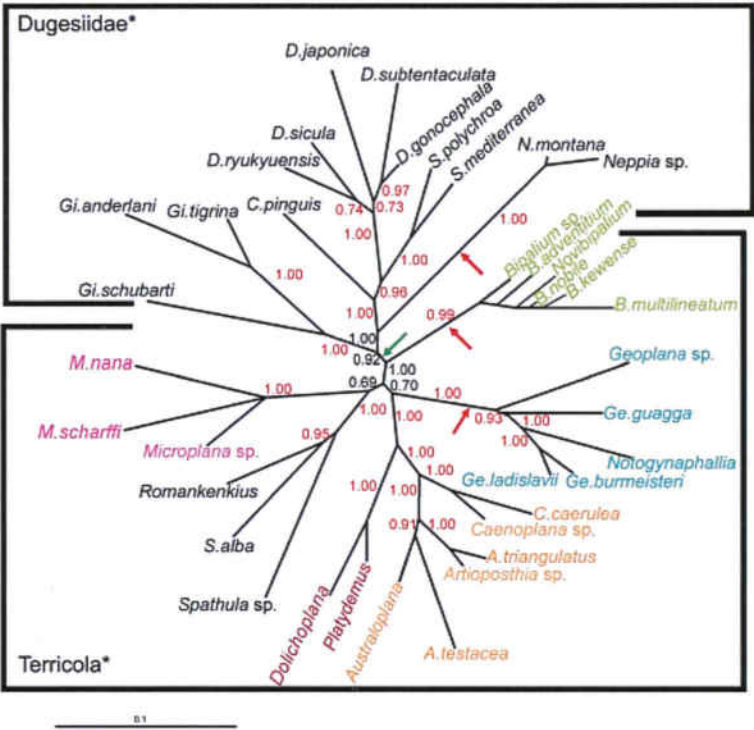


Fig. 3. Unrooted tree inferred from the complete dataset. Red arrows indicate the long branches where the outgroup roots the tree, the green arrow indicates the branch separating DugesIIDae* and Terricola*, for explanation see text. Values at nodes are posterior probabilities (PP). Color code as in Fig. 2 Scale bar represents number of substitutions per site. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

constituted by all the terricolans plus those two paludicolan genera. A monophyletic DugesIIDae* appears in all trees except in the ML tree obtained with the complete dataset (Fig. 2C), in which the outgroup roots the tree in the long-branch leading to the genus *Neppia*, thus rendering the DugesIIDae* paraphyletic. Within the DugesIIDae*, the genera *Girardia* and *Neppia* branch first, in that order, followed by a highly supported *Dugesia*, *Schmidtea*, and *Cura* clade, within which the groupings vary depending on the dataset (compare Figs 2 and 3).

A monophyletic Terricola* was recovered in the ML tree using the complete dataset (Fig. 2C) and also when no outgroup was included (Fig. 3, 0.92 PP for the branch separating DugesIIDae* from Terricola*). This group is also recovered in NJ analyses (trees not shown) both with the complete and the t1 + t2 + 28 datasets (87 and 72 Bootstrap support, respectively). In all other cases, the outgroup roots the tree within the branch leading to the Geoplaninae, rendering the Terricola* paraphyletic. Within the monophyletic Terricola* the branching order is also well reproduced: first the Bipaliidae, followed by two groups, both with low support. The first is a paraphyletic Geoplanidae that includes the

Rhynchodeminae (belonging to the Rhynchodemidae) as the sister group to the Caenoplaninae (always with high support). This anomalous grouping appears in all trees, even when the Terricola* is not monophyletic. The second group, also anomalous, groups the Micropalaninae (the second subfamily of the Rhynchodemidae examined in this study) with two paludicolan genera, *Romankenkius* and *Spathula*, though this is not always highly supported (Fig. 2B: 0.84; Fig. 2D: 0.97; Fig. 3: 0.69).

3.4. Comparison of topologies (hypothesis testing)

Alternative topologies (Table 4) were tested against the best tree obtained with the t1 + t2 + 28 dataset using ML and BI (see topology in Fig. 2D). First, to test the monophyly of the Terricola*, we compared two trees with a monophyletic Terricola* but with different internal topologies: Geoplaninae as basal terricolans (Table 4; 2a), or reproducing the relationships found in cases where the Terricola* are monophyletic (Fig. 2C and 3, Table 4; 2b). While the tree with basal Bipaliidae was not significantly

Table 4
Comparison of topologies using the approximately unbiased test

	Likelihood	P
(1) Original tree (Fig. 3D)	Best	
(2) Monophyly of the Terricola*		
(a) Geoplaninae basal	35989.75763313	0.025 ^a
(b) Bipaliidae basal	35983.43218467	0.238
(3) Positions for the genera <i>Romankenkius</i> and <i>Spathula</i>		
(a) Basal group to the monophyletic Terricola* with Geoplaninae in a basal position	36006.82646531	0.004 ^a
(b) Basal group to the monophyletic Terricola* with Bipaliidae in a basal position	36000.74366904	0.024 ^a
(c) Basal group to the rest of the Dugesiidae*	35986.87693657	0.010 ^a
(d) Basal group to the rest of the Dugesiidae* being Terricola* monophyletic with Geoplaninae basal	36016.39940067	2e-006 ^a
(e) Basal group to the rest of the Dugesiidae* being Terricola* monophyletic with Bipaliidae basal	36006.80022066	0.007 ^a
(f) Sister group to the rest of the Dugesiidae + Terricola	36009.94675608	0.002 ^a
(g) Sister group to the rest of the Dugesiidae + Terricola, Terricola* monophyletic with basal Geoplaninae	36015.41664591	9e-007 ^a
(h) Sister group to the rest of the Dugesiidae + Terricola, Terricola* monophyletic with Bipaliidae basal	36005.70958814	0.008 ^a
(4) Position of the Rhynchodeminae		
(a) Geoplaninae as sister group to the Caenoplaninae plus the Rhynchodeminae	35986.21495170	0.103
(b) Rhynchodeminae forming a monophyletic group with the Microplaninae	36021.44905437	9e-006 ^a
(c) Rhynchodeminae monophyletic with <i>Spathula</i> and <i>Romankenkius</i> as sister group	36039.74753573	7e-005 ^a
(d) Geoplaninae monophyletic, and Rhynchodeminae monophyletic too	36050.32814784	3e-004 ^a
(e) Geoplaninae monophyletic, and Rhynchodeminae too, with <i>Spathula</i> and <i>Romankenkius</i> as sister group	36059.04334583	3e-004 ^a

* Hypothesis rejected when P values < 0.05 for the approximately unbiased test.

worse than the best, the one with Geoplaninae branching first was significantly worse.

Secondly, we tested different positions for the genera *Romankenkius* and *Spathula*: as a basal group to the Terricola (Table 4; 3a and b), as a sister group to the rest of the Dugesiidae (Table 4; 3c–e), and as a sister group to the rest of the Dugesiidae + Terricola (topologies 3f–h, Table 4). In all cases, the alternative trees were significantly worse than the best tree.

Finally, we examined the position of the Rhynchodeminae, testing a tree with a monophyletic Terricola* in which the Geoplaninae included the Geoplaninae as a sister group to the Caenoplaninae plus the Rhynchodeminae (see trees 2C and 3, topology 4a in Table 4). This topology was not significantly worse than the best. If the Rhynchodeminae was moved to form a monophyletic group with the Microplaninae (also belonging to the Rhynchodeminae, topologies 4b–e, Table 4) the new topology was always worse, irrespective of whether *Romankenkius* + *Spathula* was kept within this clade or elsewhere in the tree.

4. Discussion

4.1. New data and informative content of the four genes used

Carranza et al. (1999) showed that the two ribosomal gene clusters present in Dugesiidae and Terricola evolved independently, being homogenised by concerted evolution within each of them, but not between them. This allows the two types of ribosomal genes to be used as independent data with which to infer the internal phylogeny of the Continenticola, increasing the amount of phylogenetic information available. Hence, we had three sets of data from the ribosomal cluster: 18S type I (18S-t1), 18S type II (18S-

t2) and 28S (unknown type, 28S). The independent analyses of the three datasets (Supplementary data 2) show 18S-t1 to have less resolving power than 18S-t2, probably due to the poor sampling of Dugesiidae + Terricola 18S-t1 and, most importantly, to its lower rate of substitution. 18S-t2 evolves on average 2.3 times faster than 18S-t1 (Carranza et al., 1999). 28S was sampled from more species, and its rate of substitution is higher than that of 18S-t2. This increases the information content at the family and higher taxonomic levels, while it does not exceed the threshold separating informative variation from homoplasy.

For COI there was good Continenticola sampling. However, all evidence (e.g. saturation tests, length of the branches in the tree, and lack of resolution at the family and upper taxonomic levels) shows this molecule to be too variable at this taxonomic level. At the genus level, while COI sequences show slow rates of change within and between some terrestrial genera (*Geoplanea*, *Artioposchia*, *Australoplanea*, *Caenoplanea*), it shows a high degree of variation within others, namely paludicolans (*Dugesia*, *Schmidtea*, *Girardia*). This indicates that COI can help to set out internal relationships within these latter genera, but not the former.

For the 16S mitochondrial gene we also found an excess of variation in the comparisons within the Continenticola. Combined with the COI results, this clearly indicates that the mitochondrial genome is not a good source of information for the Continenticola phylogeny.

4.2. Continenticola phylogeny, new strategies

The final data matrix of the concatenated dataset had a mean 25% missing data. Recent studies (Wiens, 2005; Philippe et al., 2004) demonstrate that the presence of missing

data (even reaching 90%) does not negatively affect the phylogenetic inference but, rather, it seems to increase resolution thanks to higher species sampling. Our results show that concatenated alignments increase the resolution of the inferred phylogenies compared to those from independent datasets. However, the fact that for the complete dataset the support values for most clades are lower than those obtained in the set excluding the COI gene (compare Figs. 2B and D) indicates that the inclusion of an excessively variable gene does not substantially improve the information content but, on the contrary, increases the noise/signal ratio, obscuring the information content of the other molecules.

4.3. Rooting problems

Comparison of the trees obtained with the different datasets and methods shows in most cases the Terricola + Dugesidae rooted at a branch within the Terricola*, namely the branch leading to Geoplaninae (Figs. 2A, B and D) or, in some cases, to Bipaliidae (not shown). In the remaining cases, they are rooted at the branch leading to the genus *Neppia* (Fig. 2C) within the Dugesidae*. In the unrooted tree (Fig. 3) the internal branches are clearly extremely short compared to the branches leading to families or genera. In particular, the three alternative branches (Fig. 3: red arrows) where the outgroup roots the Dugesidae + Terricola are extremely long compared to the more internal branches. Holland et al. (2003) performed a simulation study using a model tree with long external and short internal branches. Their results showed that the most common error was that outgroup was erroneously placed on one of the long branches. All methods analysed in that study (including MP, UPGMA, NJ and ML) are affected to a greater or lesser extent by this problem, but strangely enough NJ recovers the correct rooting in more cases than the other methods (for this reason we decided to infer a NJ tree for the complete and 18t1 + 18t2 + 28 datasets). Holland et al. also showed that in a few cases this misplacement also disrupted the real ingroup topology. When this happens, comparison of the ingroup topology obtained with and without outgroup showed the latter was more frequently correct. The present study suffers from this effect, termed long edge attraction by Hendy and Penny (1989), and is a special case of long-branch attraction. Although having selected the sister group as outgroup, this roots the Dugesidae + Terricola on one long-branch instead of on one internal short branch, due to long edge attraction. This leaves us with the uncertainty of where the root should actually be situated. However, there are a number of important points arising from all the trees inferred: (1) in the unrooted tree there is a clear split between the Terricola* and Dugesidae* supported by a PP of 0.92 (Fig. 3: green arrow), and the NJ trees (not shown) also root the tree in this branch; (2) the monophyletic Dugesidae* is highly supported and its internal relationships are identical in the rooted and unrooted trees; (3) the relationship

among families and subfamilies within the monophyletic Terricola* is also identical in the rooted and unrooted trees; and (4) in the comparison of topologies, the tree with a monophyletic Terricola* containing a basal Bipaliidae is not significantly worse than the best tree obtained (Table 4; 2b).

All these facts taken together with the observations of Holland et al. (2003) most likely indicate that the actual point of rooting for the Dugesidae + Terricola clade is the short branch separating Dugesidae* and Terricola* in the unrooted tree (Fig. 3; green arrow). Although more data are needed to give full support to this hypothesis, we think the present data clearly point to this and consequently, from now on, we consider it our working hypothesis.

4.4. Dugesidae + Terricola internal relationships

Fig. 4 shows the cladogram that summarizes our results. The Dugesidae + Terricola divides into two main monophyletic groups which we have named Dugesidae* and Terricola*. The former includes all species from that family except those belonging to the genera *Spathula* and *Romankenkius*, and the second group includes all terricolan species plus the *Spathula* and *Romankenkius* species.

Within the Terricola*, the subfamilies Caenoplaninae (family Geoplanidae) and Rhynchodeminae (family Rhynchodemidae) always cluster with high support. This clade is

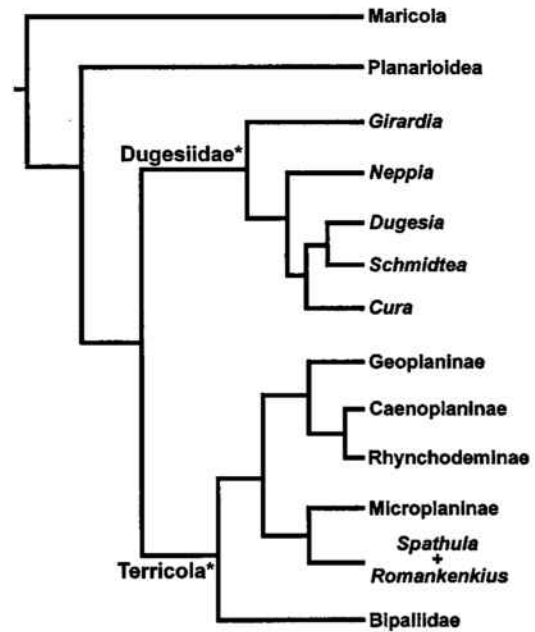


Fig. 4. Cladogram summarizing the results of our phylogenetic analyses, see text for discussion.

highly supported even in the phylogenies inferred from the individual gene alignments (Supplementary data 2), and hence by independent information coming from the nucleus and the mitochondria. A polyphyletic Rhynchodemidae together with a paraphyletic Geoplanidae have previously been described (Baguña et al., 2001). The paraphyletic Geoplanidae constituted by Geoplaninae + (Caenoplaninae + Rhynchodeminae) does not receive high support in the unrooted tree (0.7 PP Fig. 3) but comparison of the topologies shows that this topology is not significantly worse than the best obtained. On the other hand, all the topologies tested with a monophyletic Rhynchodemidae are significantly worse. A morphological revision of the members of the Rhynchodeminae subfamily is needed both to corroborate these molecular findings and to propose a likely taxonomic revision.

The second subfamily of the Rhynchodemidae, the Microplaninae, is mostly found forming a peculiar clade with species of the dugesiid genera *Spathula* and *Romankenkius*. This clade gets high support for the t1 + t2 + 28 dataset BI tree, and all the alternative topologies tested for *Spathula* and *Romankenkius* (sister group to Terricola*, to Dugesiidae* or to Dugesiidae + Terricola) result in significantly worse trees. Thus, all the molecular data clearly point to inclusion of these freshwater genera deep within the Terricola, and hence to a return to freshwater habitats from land. From a morphological point of view, Meixner (1928) and Ball (1981) considered the reduction of the anterior gut trunk (the precerebral coecum, present in the Maricola) to be a derived character and consequently an autapomorphy for the Paludicola. However, several species of Paludicola belonging to the genera *Spathula*, *Eviella* and *Romankenkius* bear a precerebral coecum. While some species of land planarians (Sluys, 1989a) also bear a precerebral coecum, the distribution of the character state over the groups is less well-known than in the Maricola and the Paludicola. Although this might indicate a synapomorphy between *Spathula*, *Eviella* and *Romankenkius* and the Terricola, wider taxon sampling for molecular analyses and more in depth morphological studies are clearly needed to lend further support to this unexpected result.

Finally, all the evidence (unrooted tree topology and hypothesis testing) points to Bipaliidae as being sister group to the rest of the Terricola*. These conflicts with all hypotheses put forward so far. Based on their worldwide distribution, Winsor et al., 1998 proposed that rhynchodemids are the most early divergent terricolans, while Marcus (1953) and Froehlich (1967) (cf. Sluys, 1989a), using characteristics of the copulatory organ, suggested that Microplaninae are the earliest divergent terricolan clade. However, as already mentioned, the lack of a real cladistic analysis within the Terricola and of an extensive character analysis of its species, prevents these hypotheses being accepted or rejected.

Within the Dugesiidae* the situation appears to be much clearer. This group always receives high support.

The genus *Girardia* (so far distributed both in America and Australia) splits first from the rest, followed by *Nepia*, which is restricted to the Southern hemisphere (South America, Australia, Madagascar and South Africa). Finally, a highly supported monophyletic clade includes the genera *Schmidtea*, *Cura* and *Dugesia*. The relationships among these three genera show a closer relationship among *Schmidtea* and *Dugesia* with high support. The geographical distribution of the three genera also fits this relationship. *Cura* includes species distributed in Australia, and South and North America. Species of *Dugesia* have a wide Palearctic and Ethiopian distribution (Africa, Asia and Europe), whereas species of *Schmidtea* are restricted to Europe. In vicariance terms, we can think of *Cura* as the oldest genus of this group, with an early cosmopolitan distribution now restricted to three areas, while the other two genera originated in Laurasia or the African part of Gondwana.

4.5. An evolutionary history for the land planarians

Based on the evidence given above we can make some preliminary, but interesting inferences on the evolution of the transition to land in this group of animals.

In the first place, the terrestrial planarians did not evolve from marine ancestors (Ball, 1981; Sluys, 1989b), but from a freshwater planarian, which in fact is a simpler transition. Secondly, the transition from freshwater to terrestrial life did occur only once. The group that performed that transition was not a member of any of the present day genera of Dugesiidae but, most probably, a common ancestor to both groups (dugesiids and terricolans). Once the terrestrial niche had been colonized, Bipaliidae would have been the first family to diverge from the rest, this group presenting some particular characteristics like the presence of many marginal eyes formed by a pigmented cell (Shirasawa and Makino, 1981; Sluys, 1989b), which is unique within the Terricola. After that divergence, the Microplaninae and the paraphyletic Geoplanidae would have arisen. To explain the presence of *Spathula* and *Romankenkius* within the Terricola* (highly supported in this study), it is necessary to hypothesize a secondary return to the freshwater habitat for these two genera. An alternative would be that the ancestor of the Terricola* clade was still adapted to live in freshwater habitats and the transition to land habitat occurred more than once within this group, which is a less parsimonious solution.

4.6. Final remarks

The comparisons made in this study, although at the level of families and genera, are of very ancient groups. Based on the molecular rates of substitution for the 18S genes in dugesiids and terricolans, Carranza et al. (1999) dated the age of the duplication event that occurred in the ancestor of the Dugesiidae + Terricola at around 100 million years ago. Hence, the genera belonging to the

Dugesidae and the Terricola are older than the mammal orders. This could explain the characteristics of the observed topology: very long terminal branches and extremely short internal (or basal) ones, and may also explain the difficulty of finding molecules suitable for solving the basal relationships of the group. The molecules used in this study have given important new information, but some points still remain to be solved, and new molecules that by themselves or added to the present dataset will produce the missing information have to be found. But also, morphological re-evaluation of many characters for species already studied and evaluation of those not yet studied is necessary to understand the evolution of this group, especially for the terricolan species. For the latter, major taxonomic revision is also clearly needed.

Acknowledgments

This research was supported by DGI-MEC Grant CGL2005-00371/BOS Grant to M.R. and CIRIT Grant 2005SGR00578 to J.B. We are indebted to the following individuals who provided us with fixed material: Salvador Carranza, Fernando Carbayo, Enrique Fernández, Cristina González, Ronald Sluys, Miquel Vila, and Leigh Winsor. We also thank Gemma Blasco for her invaluable technical assistance and Jo Ferrier for revising and correcting the manuscript language. We are also very grateful to the anonymous reviewers that with their comments and suggestions helped to ameliorate the final version of the ms. Part of the computing analyses were performed at the Barcelona Supercomputing Centre (BSC), and we thank David Vicente (BSC) for his kind help installing programs and resolving problems during their execution.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ympev.2008.01.032.

References

- Arnedo, M., Coddington, J., Agnarsson, I., Gillespie, R.G., 2004. From a comb to a tree: phylogenetic relationships of the comb-footed spiders (Araneae, Theridiidae) inferred from nuclear and mitochondrial genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31, 225–245.
- Baguña, J., Carranza, S., Paps, J., Ruiz-Trillo, I., Riutort, M., 2001. Molecular taxonomy and phylogeny of Tricladida. In: Littlewood, D.T.J., Bray, R.D. (Eds.), *The Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor & Francis, UK, CL, pp. 49–56.
- Baguña, J., Riutort, M., 2004. Molecular phylogeny of the Platyhelminthes. *Can. J. Zool.* 82, 168–193.
- Ball, I.R., 1974. A contribution to the phylogeny and biogeography of the freshwater triclads (Platyhelminthes: Turbellaria). In: Riser, N.W., Morse, M.P. (Eds.), *Biology of the Turbellaria*. McGraw-Hill, New York, pp. 339–401.
- Ball, I.R., 1977. On the phylogenetic classification of aquatic planarians. *Acta Zool. Fenn.* 154, 21–35.
- Ball, I.R., 1981. The phyletic status of the Paludicola. *Hydrobiologia* 84, 7–12.
- Bessho, Y., Ohama, T., Osawa, S., 1992. Planarian mitochondria I. Heterogeneity of cytochrome c oxidase subunit I gene sequences in the freshwater planarian, *Dugesia japonica*. *J. Mol. Evol.* 34, 324–330.
- Carranza, S., Giribet, G., Ribera, C., Baguña, J., Riutort, M., 1996. Evidence that two types of 18S rDNA coexist in the genome of *Dugesia* (Schmidtea) mediterranea (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida). *Mol. Biol. Evol.* 13 (6), 824–832.
- Carranza, S., Littlewood, D.T.J., Clough, K.A., Ruiz, I., Baguña, J., Riutort, M., 1998a. A robust molecular phylogeny of the Tricladida (Platyhelminthes, Seriata) and a reassessment of morphological synapomorphies. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265, 631–640.
- Carranza, S., Ruiz-Trillo, I., Littlewood, D.T.J., Riutort, M., Baguña, J., 1998b. A reappraisal of the phylogenetic and taxonomic position of land planarians (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida) inferred from 18S rDNA sequences. *Pedobiologia* 42, 433–440.
- Carranza, S., Baguña, J., Riutort, M., 1999. Origin of paralogous rRNA clusters within the flatworm family Dugesidae (Platyhelminthes, Tricladida). *J. Mol. Evol.* 49, 250–259.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., Rutter, W.J., 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294–5299.
- Colgan, D.J., McLauchlan, A., Wilson, G.D.F., Livingston, S.P., Edgecombe, G.D., Macaranas, J., Cassis, G., Gray, M.R., 1998. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Aust. J. Zool.* 46, 419–437.
- De Vries, E.J., Sluys, R., 1991. Phylogenetic relationships of the genus *Dugesia* (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola). *J. Zool. Lond.* 223, 103–116.
- Ehlers, U., 1985. *Das Phylogenetische System der Plathelminthes*. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368–376.
- Felsenstein, J., 1993. *PHYLLIP: Phylogeny Inference Package*, Version 3.5c. University of Washington, Seattle.
- Froehlich, C.G., 1967. A contribution to the zoogeography of Neotropical land planarians. *Acta Zool. Lilloana* 23, 153–162.
- Hallez, P., 1890. Catalogue des Turbellaries (Rhabdocoelides, Tricladides et Polycladides) du Nord de la France et de la Côte Boulonnaise. *Rev. Biol. Nord France* 2, 1–179.
- Hendy, M.D., Penny, D., 1989. A Framework for the quantitative study of evolutionary trees. *Syst. Zool.* 38 (4), 297–309.
- Holland, B.R., Penny, D., Hendy, M.D., 2003. Outgroup misplacement and phylogenetic inaccuracy under a molecular clock—a simulation study. *Syst. Biol.* 52, 229–238.
- Jones, H.D., Boag, B., 1996. The distribution of New Zealand and Australian terrestrial flatworms (Platyhelminthes: Turbellaria: Tricladida: Terricola) in the British Isles—the Scottish survey and Megalab worms. *J. Nat. Hist.* 30, 955–975.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 11–120.
- Marcus, E., 1953. *Turbellaria Tricladida. Exploration du Parc National de l'Upemba*, Fasc. 21, 1–62.
- Meixner, J., 1928. Der genitalapparat der tricliden und seine beziehung zu ihrer allgemeinen morphologie, philogenie, ökologie und verbreitung. *Zeitschr. Morphol. Okol.* 11, 570–612.
- Olsen, G.J., Matsuda, H., Hagstrom, R., Overbeek, R., 1994. FastDNAml: a tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maximum likelihood. *Comput. Appl. Biosci.* 10 (1), 41–48.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817–818.
- Philippe, H., Snell, E.A., Baptiste, E., Lopez, P., Holland, P.W.H., Casane, D., 2004. Phylogenomics of Eukaryotes: impact of missing data on large alignments. *Mol. Biol. Evol.* 21 (9), 1740–1752.
- Robinson-Rechavi, M., Huchon, D., 2000. RRTree: relative-rate tests between groups of sequences on a phylogenetic tree. *Bioinformatics* 16, 296–297.

- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2005. Bayesian analysis of molecular evolution using MrBayes. In: Nielsen, R. (Ed.), Statistical Methods in Molecular Evolution. Springer, New York.
- Saló, E., Baguña, J., 2002. Regeneration in planarians and other worms: new findings, new tools, and new perspectives. *J. Exp. Zool.* 292 (6), 528–539.
- Schmidt, H.A., Strimmer, K., Vingron, M., Von Haeseler, A., 2002. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets & parallel computing. *Bioinformatics* 18 (3), 502–504.
- Shimodaira, H., 2000. Another calculation of the *p*-value for the problem of regions using the scaled bootstrap resamplings. Stanford University, Palo Alto, California (Tech.Rep.No. 2000-35).
- Shimodaira, H., Hasegawa, M., 2001. CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics* 18 (3), 502–504.
- Shirasawa, Y., Makino, N., 1981. Light and electron microscopic studies on the normal and regenerating photoreceptor of a land planarian (*Bipalium fuscum*). *Bull. Tokyo. Med. Coll.* 7, 35–50.
- Sluys, R., 1989a. Phylogenetic relationships of the triclads (Platyhelminthes, Seriata, Tricladida). *Bijdr Dierk.* 59, 3–25.
- Sluys, R., 1989b. A Monograph of the Marine Triclad. Balkema, Rotterdam.
- Sluys, R., 1990. A monograph of the Dimarcusidae (Platyhelminthes, Seriata, Tricladida). *Zool. Scr.* 19, 13–29.
- Sluys, R., 1999. Global diversity of land planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola): a new indicator-taxon in biodiversity and conservation studies. *Biodiv. Cons.* 8, 1663–1681.
- Sopott-Ehlers, B., 1985. The phylogenetic relationships within the Seriata (Platyhelminthes). In: Conway Morris, S., George, J.D., Gibson, R., Platt, H.M. (Eds.), The Origin and Relationships of Lower Invertebrates. Clarendon Press, Oxford.
- Swofford, D.L., 2000. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4. In: S.Associates, ed., Sunderland, Massachusetts.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876–4882.
- Wiens, J.J., 2005. Can incomplete taxa rescue phylogenetic analyses from long-branch attraction? *Syst. Biol.* 54 (5), 731–742.
- Willems, W.R., Wallberg, A., Jondelius, U., Littlewood, D.T.J., Backeljau, T., Schockaert, E.R., Artois, T.J., 2006. Filling a gap in the phylogeny of flatworms: relationships within the Rhabdocoela (Platyhelminthes), inferred from 18S ribosomal DNA sequences. *Zool. Scr.* 35 (1), 1–17.
- Winsor, L., Johns, P.M., Yeates, G.W., 1998. Introduction, and ecological and systematic background, to the Terricola (Tricladida). *Pedobiologia* 42, 389–404.
- Xia, X., Xie, Z., 2001. DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered.* 92, 371–373.

Supplementary data1

List of described genera for the family Dugesiidae and for the Terricola, after “Tyler,S., Schilling,S., Hooge,M., Bush,L:F:, 2006. Turbellarian taxonomic database. Version 1.5 <http://turbellaria.umaine.edu>”. In bold blue are indicated the genera represented in this study.

Paludicola Hallez, 1892, Ball, 1974, 1981

Dugesiidae Ball, 1974

Bopsula Marcus, 1946
Cura Strand, 1942
 Curtisia Graff,1916
Dugesia Girard, 1851
 Eviella Ball, 1977
Girardia Ball, 1974
Neppia Ball, 1974
 Reynoldsonia Ball, 1974
Romankenkius Ball, 1974
Schmidtea Ball, 1974
Spathula Nurse, 1950

Terricola Hallez 1892

Bipaliidae Graff, 1896

Bipalium Stimpson, 1857
 Humbertium Ogren&Sluys, 2001
Novibipalium Kawakatsu, M, Ogren RE, Froehlich EM, 1998

Geoplanidae Stimpson 1857

Caenoplaninae Ogren RE, Kawakatsu, M 1991

Arthurdendyus Jones, 1999
Artioposthia Graff, 1896
 Australopacifica Ogren&Kawakatsu, 1991
Australoplana Winsor, 1991
Caenoplana Moseley, 1877
 Coleocephalus Fyfe, 1953
 Endeavouria Ogren&Kawakatsu, 1991
 Fletchamia Winsor, 1991
 Kontikia Froehlich, 1955
 Lenkunya Winsor, 1991
 Newzealandia Ogren&Kawakatsu, 1991
 Parakontikia Winsor, 1991
 Pimea Winsor, 1991
 Reomkago Winsor, 1991
 Tasmanoplana Winsor, 1991
 Timyama Froehlich, 1978
 Coenoplana Moseley, 1857

Geoplaninae Stimpson, 1857

Amaga Ogren&Kawakatsu, 1990

Choeradoplana Graff, 1896

Enterosyringa Ogren&Kawakatsu, 1990

Geobia Diesing, 1862

Geoplana Schul&Mull, 1857

Gigantea Ogren&Kawakatsu, 1990

Gusana Froehlich, 1978

Issoca Froehlich, 1954

Liana Froehlich, 1978

Notogynaphallia Ogren&Kawakatsu, 1990

Pasipha Ogren&Kawakatsu, 1990

Polycladus Blanchard, 1845

Pseudogeoplana Ogren&Kawakatsu, 1990

Xarapoa Froehlich, 1954

Pelmatoplaninae Ogren&Kawakatsu, 1991

Beauchampius Ogren&Kawakatsu, 1991

Pelmatoplana Graff, 1896

Rhynchodemidae Graff, 1896

Microplaninae Pantin 1953

Amblyplana Graff, 1896

Artiocotylus Graff, 1896

Diporodemus Hyman, 1938

Geobenazzia Minelli, 1974

Geodesmus Metschnikoff, 1865

Incapora Marcus, 1953

Microplana Vejdovsky, 1890

Othelosoma Gray, 1869

Pseudarticotylus Ikeda, 1911

Rhynchodeminae Correa, 1947

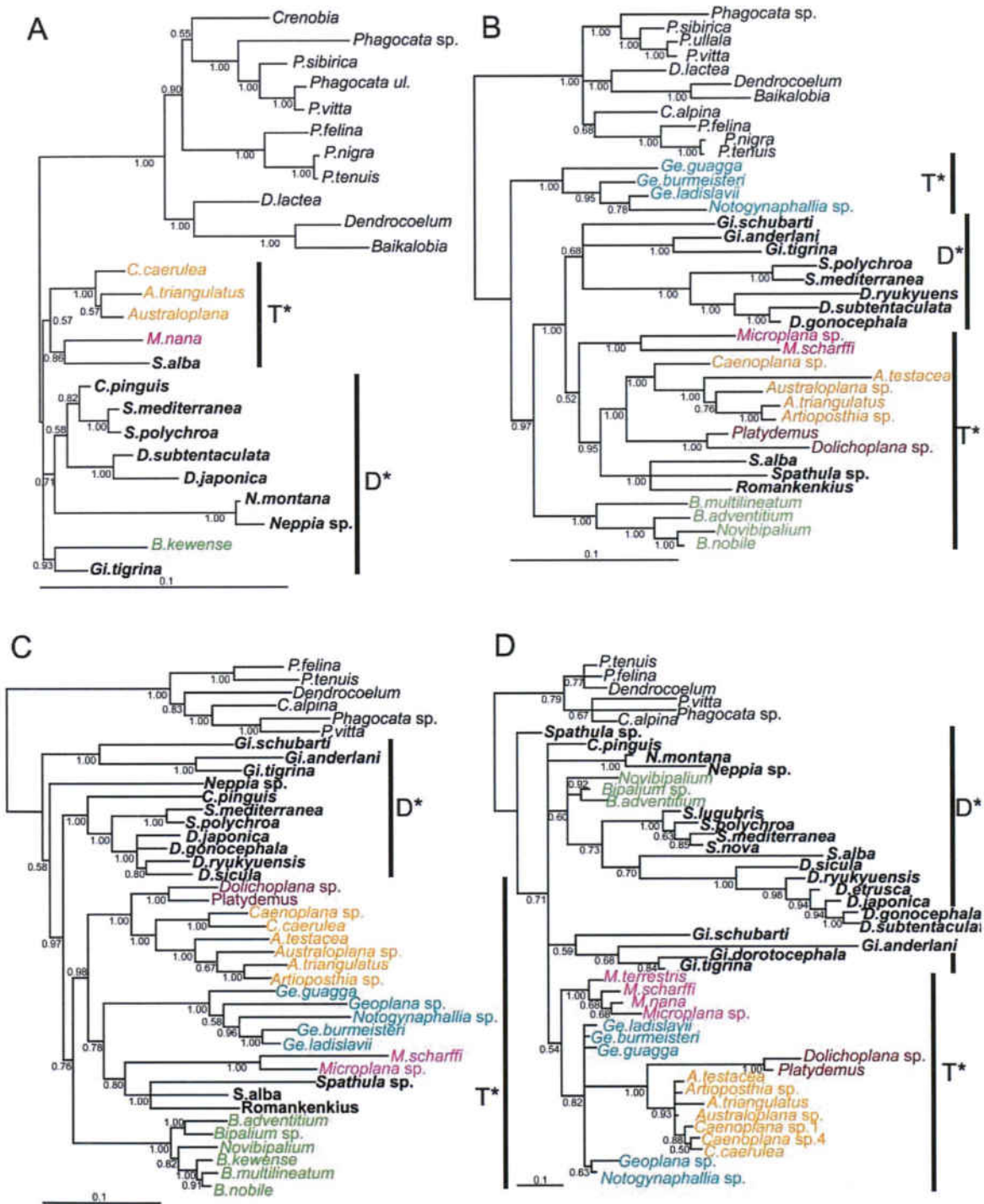
Cotyloplana Spencer, 1892

Digonopyla Fisher, 1926

Dolichoplana Moselev, 1877

Platydemus Graff, 1896

Rhynchodemus Leidy, 1851



Supplementary data 2. BI phylogenetic trees obtained with the 4 independent sets of data: A) 18S rDNA type I; B) 18S rDNA type II; C) 28S rDNA; D) COI. Values at nodes are posterior probabilities (PP). Colors represent major groups: Dugesiidae (bold black), Geoplaninae (light blue), Bipaliidae (green), Caenoplaninae (orange), Rhynchodeminae (brown), Microplaninae (magenta), Planarioidea (normal black), Maricola (dark blue). The scale bar represents number of changes per position.

CAPÍTOL 2

Molecular phylogeny of the Neotropical subfamily Geoplaninae (Platyhelminthes, Tricladida, Geoplanidae) with a morphological discussion

Filogènia molecular de la subfamília Neotropical Geoplaninae (Platyhelminthes, Tricladida, Geoplanidae) amb una discussió morfològica

Fernando Carbayo, Marta Álvarez-Presas, Cláudia T. Olivares, Fernando Marques i Marta Riutort

(en preparació)

Resum

Les planàries terrestres són un grup d'invertebrats força desconegut, malgrat ser, possiblement, un dels grups amb major diversitat dins dels triclàdides. Degut a la manca d'especialistes i claus taxonòmiques, entre altres problemes, la complexa taxonomia del grup es troba en constant canvi, cosa que dificulta la identificació d'espècies. No obstant, la necessitat d'obtenir-ne una classificació actualitzada és evident, donada la importància d'aquests organismes com a bioindicadors i com a model per estudis filogeogràfics. Des de 1990 no hi hagut cap proposta en ferm basada en dades morfològiques per resoldre la filogènia interna de la subfamília Geoplaninae, ni tampoc cap estudi molecular centrat específicament en el grup. Per aquest motiu, i donada la incorporació de nous gèneres en els últims anys, hem realitzat una filogènia molecular de la subfamília, reforçada amb trets morfològics, tant interns com externs. S'han utilitzat tres marcadors nuclears (18S i 28S rDNA, que s'havien usat en estudis previs; i EF-1 α , utilitzat per primer cop per inferir filogènies de planàries) i el gen mitocondrial citocrom oxidasa I, i hem realitzat l'anàlisi filogenètica per màxima versemblança i inferència bayesiana. Tot i que alguns punts de la filogènia no queden ben resolts, hi ha certes agrupacions molt interessants que denoten relacions no inferides prèviament i que conduiran a la proposta de nous gèneres i espècies en un futur. L'agrupació dels gèneres *Luteostriata*, *Issoca* i *Supramontana* és un dels resultats més robustos obtinguts, així com l'agrupació d'*Enterosyringia* amb *Xerapoa* i la confirmació de l'agrupació de les espècies *Geoplana goetschi* sensu Marcus 1951 i *Notogynaphallia guaiana*. A més, com ja era evident, el gènere *Geoplana* s'haurà de reestructurar i dividir en diferents gèneres, mantenint-se el grup de les espècies *Geoplana vaginuloides*, *G. chita* i *G. pulchella* com *Geoplana sensu stricto*. Després d'aquest treball, encara quedaran alguns gèneres per incloure a la filogènia, però s'ha obtingut un patró general que situa la subfamília Geoplaninae com una de les més diverses dins de les planàries terrestres.

Molecular phylogeny of the Neotropical subfamily Geoplaninae (Platyhelminthes, Tricladida, Geoplanidae) with a morphological discussion

Carbayo, Fernando¹; Álvarez-Presas, Marta²; Olivares, Cláudia³; Marques, Fernando³ and Riutort, Marta²

¹Escola de Artes, Ciências e Humanidades (EACH), Universidade de São Paulo (USP), Av. Arlindo Bettio, 1000 São Paulo, Brasil 03828-000.

²Departament de Genètica, Facultat de Biologia i Institut de Recerca de la Biodiversitat (IRBio), Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643 E-08028, Spain.

³Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), Rua do Matão, Travessa 14 Cidade Universitária, 05508-900 São Paulo, Brasil.

Abstract

Despite being probably the most diverse group within the Tricladida, land planarians have received little attention. Due to several problems (lack of taxonomic keys and specialists, among others), the complex taxonomy of the group is constantly changing, making it difficult to identify new or known species. The need to obtain an updated classification is obvious given the importance of these organisms as bioindicators and as a model for phylogeographic studies. Historically, only a few proposals on the relationships among some groups within the Geoplanidae, based on distribution data or some morphological features, have been done. Nonetheless, taxonomical studies have introduced new genera in recent years. In the present study it is proposed a molecular phylogeny of the subfamily and discussed on the light of morphological features, both internal and external. We have analysed three nuclear markers (18S and 28S rDNA, which had been used in previous studies, and EF-1 α , used for the first time to infer phylogenies of planarians) and the mitochondrial gene cytochrome oxidase I, with Maximum Likelihood and Bayesian Inference methods. Although the most basal nodes of the phylogeny are not well resolved we recover many monophyletic and supported clades. Some of these clades show interesting relationships that had not been previously inferred, which will lead to the proposal of new genera and species in the future. After this work, the subfamily Geoplaninae is placed as one of the most diverse within the land planarians.

Keywords: 18S rDNA, 28S rDNA, COI, elongation factor-1 α , Geoplaninae, molecular phylogeny, morphology, Platyhelminthes, Tricladida.

Introduction

The terrestrial planarians (Tricladida; Geoplanidae) are a poorly known group of Platyhelminthes although they probably house one of the highest diversities of species within the Tricladida. This situation stems from the fact that there are few specialists in the Geoplanidae. Moreover, terrestrial planarians have a complex taxonomy in constant change due to diverse factors: there are no taxonomic keys to identify the species; often, species identification is based on nuances difficult to detect; most descriptions are very old and based only in characters of external morphology; the type material of many species has been lost (Leal-Zanchet and Carbayo, 2000). The tasks of species identification and description of new species are, therefore, extremely complicated in this group. And, nonetheless, they have recently become a group of interest for various reasons. In one

hand, some tropical species have become invasive, even considered pests, in Great Britain and the United States (Cannon et al. 1999; Ducey et al. 1999; Iwai et al. 2010). On the other, they have been shown to be good models for low-scale phylogeographic studies (Sunnucks et al. 2006; Álvarez-Presas et al. 2011). Both facts press for the need to identify specimens' species easily and to have a good evolutionary frame that clarifies their relationships.

The family Geoplanidae includes all the terrestrial planarians and is currently divided into four subfamilies (Sluys et al. 2009; see Riutort et al 2011-12 for a revision): Geoplaninae, Bipaliinae, Microplaninae and Rhynchodeminae. They have a cosmopolitan distribution (Winsor et al. 1998), but most of the species are found in the southern hemisphere (Geoplaninae have an exclusively Central and South American distribution), while the Microplaninae and Rhynchodeminae are the subfamilies with the most northerly distribution (including Europe).

Several authors have contributed to the taxonomic study of the subfamily Geoplaninae Stimpson

Corresponding author: Fernando Carbayo, Escola de Artes, Ciências e Humanidades (EACH), Universidade de São Paulo (USP), Av. Arlindo Bettio, 1000 São Paulo, Brasil 03828-000. Email: baz@usp.br

1857, including acknowledged scientists such as Darwin, Müller and Hyman. However, few of them have ventured into the job of inferring their phylogeny. The finding of synapomorphies for deducing common ancestries from morphological characters is even more complex than the description of the species. As a consequence, the internal phylogeny of Geoplaninae is still unknown. There are, even so, a few phylogenetic proposals for land planarians based on morphological and distribution data. In 1899, Von Graff hypothesized that the terrestrial planarians originated in the lost continent of Antarctica and, as a consequence of the geological breakage of the continent, they split into two groups. On one side, a clade that diversified in Australia and New Zealand (old subfamily Caenoplaninae, now tribe Caenoplanini), and in the other a group that colonized South America (subfamily Geoplaninae) (cf. Froehlich, 1967). Based on their worldwide distribution, Winsor and collaborators (1998) proposed that rhynchodemids are the earliest divergent terricolans, while Marcus and Froehlich (cf. Sluys 1989), using characteristics of the copulatory organ, suggested that the Microplaninae should occupy that basal situation. Carbayo and Leal-Zanchet (2003) proposed that morphological characters hitherto unknown or that had not been considered before were needed to resolve the phylogeny of Geoplaninae. But, no phylogeny of land planarians based on morphological data has been proposed since that work. On some freshwater planarian groups the number of morphological characters has been found to be insufficient to obtain fully resolved phylogenies (Sluys, 1998). Although this still has to be tested in the land flatworms (there is a morphological work in progress based on the results by Grau, 2010), the incorporation of other resources of information, as has been done for aquatic planarians, will with no doubt streamline and optimize the process of inferring their phylogeny. Some authors began to incorporate molecular data in phylogenetic studies of planarians little more than a decade ago (Carranza et al. 1998a; b), and they have already resulted in an important taxonomic reorganization of the Tricladida, including the downshifting of the suborder Terricola to the category of family (Carranza

et al. 1998a, b; Sluys et al. 2009). Also a molecular study of the internal phylogenetic relationships of the Tricladida (Álvarez-Presas et al. 2008) suggests that land planarians are monophyletic, and placed the Geoplaninae as sister group of the subfamilies Rhynchodeminae and Caenoplaninae (in the new higher classification tribe Caenoplanini is included within subfamily Rhynchodeminae). Although the trees obtained on these studies are not fully resolved for the terrestrial planarians, they show the potential of this type of data to infer the phylogeny of this group of organisms.

The subfamily Geoplaninae is at present composed of 17 genera and about 260 described species. Graff (1912-17) divided the family Geoplanidae (now subfamily Geoplaninae) in 6 genera: *Polycladus* Blanchard 1845, *Geoplana* Stimpson 1857, *Geobia* Diesing 1861, *Pelmatoplana* Graff 1896, *Choeradoplana* Graff 1896 and *Artioposthia* Graff 1896, based mainly on features of their external anatomy, as the body shape, the length of ventral creeping sole (a modification of the epidermis in the ventral area that provides propulsion by ciliary or muscle action), the position of the body orifices and the existence of glands. He also included some characters from the internal anatomy, as the presence of adenodactyl (an additional structure of the male copulatory apparatus). Ogren and Kawakatsu (1990) reviewed the systematics of tropical land planarians splitting the genus *Geoplana* in six new genera: *Amaga*, *Notogynaphallia*, *Pasipha*, *Enterosyringia*, *Gigantea* and the group *Pseudogeoplana*, the latter being a mixed bag where all species for which the internal anatomy was not known were placed. These new genera have to be added to the existing ones: *Geoplana* sensu stricto, *Choeradoplana*, *Geobia*, *Issoca* C.G. Froehlich 1955, *Gusana* E.M. Froehlich 1978, *Liana* E.M. Froehlich 1978, *Xerapoa* C.G. Froehlich 1955 and *Polycladus*. Carbayo and Leal-Zanchet (2003) added *Cephaloflexa* and *Supramontana*, and Carbayo (2010) *Luteostriata*, reaching the 17 described genera within the subfamily Geoplaninae.

The aim of this work is to study land planarian biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest, and to obtain a robust phylogeny of the subfamily

Table 1. Forward and reverse PCR oligonucleotides (also used in sequencing)

Name	Gene	Sequence 5'-3'	Source
EFplatF	Elongation factor 1- α	GATTGCYCCWGGYCATCG	This study
EFplatR	Elongation factor 1- α	GCRATWGAYTCGTGRTGC	This study
EFplatR2	Elongation factor 1- α	CYTTVACTGARACGTTTTRAC	This study
ATPplanF	ATPase-alpha	CGGATACCTCAGAAAATC	This study
ATPplanR	ATPase-alpha	GCCGATCTGCACTTGGC	This study
18SA	18S rDNA	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	Medlin <i>et al.</i> , 1988
18SB	18S rDNA	TGATCCTTCCGCAGGTTACCT	Medlin <i>et al.</i> , 1988
18SC	18S rDNA	CGGTAATCCAGCTCCAATAG	Medlin <i>et al.</i> , 1988
18SY	18S rDNA	CAGACAAATCGCTCCACCAAC	Medlin <i>et al.</i> , 1988
18SL	18S rDNA	CCAACTACGAGCTTTTAACTG	Medlin <i>et al.</i> , 1988
18SO	18S rDNA	AAGGGCACCACAGGAGTGGAG	Medlin <i>et al.</i> , 1988
28SC1	28S rDNA	ACCCGCTGAATTTAAGCAT	Hassouna, 1984
28SD2	28S rDNA	TGGTCCTGTTTCAAGAC	Hassouna, 1984
28S2F	28S rDNA	CTGAGTCCGATAGCAACAAG	Álvarez-Presas <i>et al.</i> , 2008
28S1500R	28S rDNA	GCTATCCTGAGGGAAACTTCG	Tkach, 1999
28S6R	28S rDNA	GGAACCCCTTCTCCACTTCAGT	Álvarez-Presas <i>et al.</i> , 2008
FlatwormCOIF	Cytochrome oxidase I	GCAGTTTTTGGTTTTTGGACATCC	Sunnucks <i>et al.</i> , 2006
FlatwormCOIR	Cytochrome oxidase I	GAGCAACAACATAATAAGTATCATG	Sunnucks <i>et al.</i> , 2006
BarS	Cytochrome oxidase I	GTTATGCCTGTAATGATTG	Álvarez-Presas <i>et al.</i> , 2011
COIR	Cytochrome oxidase I	CCWGTYARMCCCHCCWAYAGTAA	Lázaro <i>et al.</i> , 2009

Geoplaninae including almost all the known genera. A resolved phylogeny of the group is key to have an evolutionary context in which to place other studies as the phylogeographic ones. With these aims we have made an intense sampling of terrestrial planarians belonging to the subfamily Geoplaninae in the Brazilian Atlantic Forest. We have analysed them morphologically and using various nuclear markers and a mitochondrial one. Specifically, we have also checked the correspondence between molecular clades and morphologically defined species, and we propose a taxonomic revision of the group basing on these data.

Material and Methods

Taxon sampling and fixation

The sampling was conducted in the Atlantic Forest of Brazil, including the Serra do Mar corridor (from the state Rio de Janeiro to Paraná) and adjacent lands northward and southward extending from the northernmost state Espírito Santo to the southernmost Rio Grande do Sul, covering a distance of ca. 2,500 Km.

The animals were collected sampling during the day (under rocks or rotten logs) or during the night (in open places, such as trails, since it is then when the terrestrial flatworms are active). Individuals collected were photographed and described by external morphology. Subsequently they were cut into two parts. One was fixed for morphological

studies (mainly for taxonomic descriptions) in a 10% solution of formaldehyde for later analysis of their internal anatomy. The other was fixed in 92-100% ethanol for the molecular study.

Morphological analysis and species identification

We have carried out analysis of the internal anatomy of most of individuals included in the work in order to identify the species. For histological preparations, the worms were cut into smaller pieces containing the anterior region of the body, the pre-pharyngeal region, the pharynx and the copulatory apparatus. The pieces were embedded in Paraplast, sectioned at 7 μ m, and stained with Mallory/Cason trichrome stain (Romeis, 1989). Drawings were prepared using a camera lucida. All vouchers are deposited in the Museum of Zoology at the University of São Paulo (N. MZUSP, Supplementary Data Table 1).

Molecular study (sequencing procedure)

Genomic DNA from two individuals per species (when it was possible) was extracted using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) following the protocol described in Álvarez-Presas *et al.* (2011). One mitochondrial and four nuclear genes were amplified, with the aim of having information from molecules with different levels of variability that could complement each other. The nuclear genes used were the ones

codifying for the RNA molecule of both ribosome subunits, the 18S rDNA (small) type II and 28S rDNA (large), which had been shown to be good for studies at family and genus level (Álvarez-Presas et al. 2008). We also tested two nuclear genes that had not been used to infer the phylogeny of planarians before: the elongation factor 1-alpha (EF) and the gene encoding ATPase-alpha. As for mitochondrial genes, we used the cytochrome oxidase I (COI) gene, which has already been shown in previous studies in flatworms to have low resolution for intrafamily relationships, but to be good for resolving terminal clades as the relations among closely related species within genera (Álvarez-Presas et al. 2008; Lázaro et al. 2009). Mitochondrial and ribosomal genes were sequenced mostly in the Universidade of São Paulo (USP), while the nuclear genes were sequenced in the Universitat of Barcelona (UB). The PCR reactions (25 µL) performed in the UB were carried out using Go Taq® DNA polymerase (Promega). The same primers were used for PCR amplification and sequencing (Table 1). PCR reaction for all genes consisted of an initial denaturation step at 95°C for 5 minutes, followed by 35 cycles with a denaturation step of 50 seconds at 94°C, a phase of 1 minute of annealing with temperatures of between 44° and 59°C (depending on the sample and the gene), and an extension step of 30 seconds at 72°C. Finally, a final extension step of 10 minutes at 72°C was conducted. The amplification products were purified with a vacuum manifold (Multiscreen®HTS Vacuum Manifold, Millipore Corporation, Billerica, MA 01821 U.S.A) and directly used as a template for sequencing using BigDye (3.1, Applied Biosystems). Sequencing reactions were run in an automated sequencer ABI Prism 3730 (Unitat de Genòmica dels Serveis Científic-Tècnics de la UB). It was not possible to amplify all genes for all individuals due to poor preservation or lack of enough tissue of some samples. We discarded the gene encoding the ATPase alpha as a candidate to infer phylogenies owing to problems with amplification and the poor quality of the few sequences obtained.

Phylogenetic inference

We used for the study only those sampled

Table 2. Number of sequences analysed for each gene and taxonomical group

Gene	Number of sequences	Number of species	Length
18S rDNA	117	61	1316
28S rDNA	117	61	1229
EF-1α	94	53	612
COI	108	61	679
Concatenated	117	60	3836

species for which we had been able to obtain at least 3 of the 4 genes for one or more individuals (Supplementary Data Table 1). In a few cases the sequences of two individuals (coming from the same population) were merged to have sequences from enough genes for their species. We prepared five different datasets, one for each individual gene (18S: 1421 nuc; 28S: 1359 nuc; EF: 612 nuc; COI: 679 nuc), and one for all the genes concatenated, in which sequences from individuals with missing genes were filled with Ns. Ribosomal RNA gene sequences were aligned using the online version of the software Mafft v. 6 (Kato et al. 2009) using maxiterate 1000 and globalpair in>out. In the case of the mitochondrial gene and the EF-1α, we used the translation into amino acids for optimal alignment of nucleotides, using Clustal W with the default settings in Bioedit v.7.0.9.0. (Hall, 1999). Software Gblocks 0.91b (Castresana and Talavera, 2007) was used to remove from the ribosomal genes alignments those regions presenting ambiguous homology (regions with high diversity and/or long indels). The parameters used were: number of contiguous nonconserved positions (10) and the minimum length of a block (5), allowing half of the gap positions. Maximum Likelihood (ML) analyses were run with the software RaxML 7.0.0 (Stamatakis, 2006) with bootstrap support values (Felsenstein, 1985) calculated from 10,000 replicates, and the Bayesian Inference (BI) analyses with the program Mr. Bayes v.3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). In both methods was used the GTR model for all datasets, leaving the inference programs to estimate the best values for all parameters and hence the model of evolution. For the concatenated dataset, were established partitions by gene, and

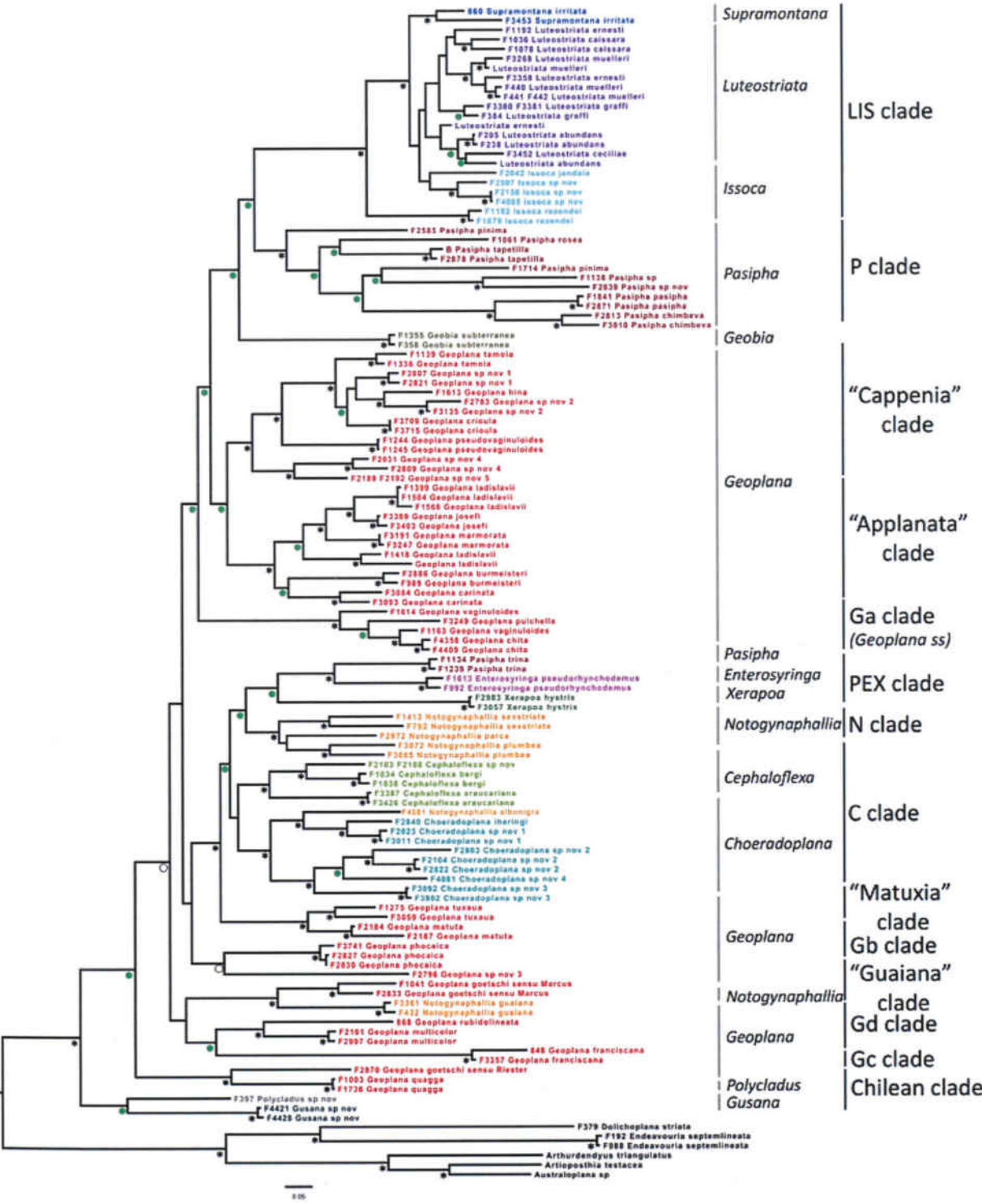


Figure 1. Bayesian inference tree inferred with the concatenated dataset. * maximum statistical support both in ML and BI inferences; ● maximum support with BI and a bootstrap value >75 in ML; ○ shows clades only supported by BI analyses (>0.85). Nodes without symbol correspond to clades appearing in the BI tree but without statistical support (nor bootstrap either PP).

within the coding genes (COI and EF) by positions, separating the two first codon positions from the third ones. Gamma distribution was estimated for the ribosomal genes, and in the protein coding genes the partition by positions was considered enough to account for positional variations of rates, hence the gamma function was not implemented. All parameters were unlinked. Bayesian analyses were made for 5 million generations, sampling every 1000 trees, using two independent runs with four

Table 3. Bootstrap/PP values supporting the monophyly of the clades

Clade	18S	28S	EF	COI	Concatenated
<i>Geoplana sensu stricto</i> clade (Ga) (<i>Geoplana vaginuloides</i> , <i>G. pulchella</i> , <i>G. chita</i>)	99/1	100/1	99/1	-/0.96	100/1
<i>Applanata</i> clade (<i>Geoplana burmeisteri</i> , <i>G. ladislavii</i> , <i>G. josefi</i> , <i>G. marmorata</i> , <i>G. carinata</i>)	-/-	77/1	98/1	-/-	100/1
<i>Cappenia</i> clade (<i>G. tamoia</i> , <i>G. hina</i> , <i>G. crioula</i> , <i>G. pseudovaginuloides</i> , <i>G. sp n 1, 2, 4, 5</i>)	86/0.98	81/0.99	↓/↓	-/-	98/1
<i>Guaiana</i> clade (<i>Notogynaphallia guaiana</i> , <i>G. goetschi sensu Marcus</i>)	-/-	98/1	82/1	-/-	100/1
<i>Matuxia</i> clade (<i>Geoplana matuta</i> , <i>G. tuxaua</i>)	95/1	100/1	100/1	-/-	100/1
<i>Gb</i> clade (<i>Geoplana phocaica</i> , <i>Geoplana sp n 3</i>)	-/-	↓/↓	?/?	-/-	↓/1
<i>Gc</i> clade (<i>Geoplana quagga</i> , <i>Geoplana goetschi sensu Riester</i>)	-/-	100/1	?/?	-/-	100/1
<i>Gd</i> clade (<i>Geoplana rubidolineata</i> , <i>G. multicolor</i>)	89/1	99/1	-/-	-/-	100/1
<i>Gd + Geoplana franciscana</i>	-/-	-/0.95	-/-	-/-	↓/0.97
<i>Chilean</i> clade (<i>Gusana</i> , <i>Polycladus</i>)	-/-	↓/0.93	?/?	-/-	94/1
<i>N</i> clade (<i>Notogynaphallia sextriata</i> , <i>N. plumbea</i> , <i>N. parca</i>)	-/-	80/1	97/1	0.91/↓	100/1
<i>P</i> clade (<i>Pasipha</i> , except <i>P. trina</i>)	↓/1	79/1	-/-	-/-	96/1
<i>Choeradoplana</i>	-/-	87/1	-/-	-/-	99/1
<i>C</i> clade (<i>Choeradoplana</i> , <i>Cephaloflexa</i>)	↓/↓	-/-	-/↓	-/-	↓/0.94
<i>Luteostriata</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	↓/↓
<i>Issoca-l.rezendei</i> monophyletic	-/-	-/-	96/0.97	-/-	↓/↓
<i>Supramontana</i>	100/1	100/1	98/0.96	-/-	100/1
<i>LIS</i> clade (<i>Luteostriata</i> , <i>Issoca</i> , <i>Supramontana</i>)	100/1	100/1	90/1	↓/↓	100/1
<i>PEX</i> clade (<i>P. trina</i> , <i>Enterosyringa</i> , <i>Xerapoa</i>)	-/-	83/1	?/?	?/?	93/1

- the clade does not exist; ↓ the clade has very low support; ? missing one or more components of the clade

chains each and the default priors implemented in the program (Revmat=dirichlet (1.00, 1.00, 1.00, 1.00, 1.00, 1.00); statefreq= dirichlet (1.00, 1.00, 1.00, 1.00); shape= uniform (0.00, 200.00); pinvar= uniform (0.00, 1.00); topology= all topologies equally probable a priori (uniform); Brlens= unconstrained: exponential (10.0)). In order to check that both runs have converged, the congruence of the topologies and model parameters of both runs were compared using the standard deviation of the split frequencies. To avoid using the parameters and trees analysed before reaching convergence, 30% of the saved trees were discarded as burn-in for the concatenated

dataset.

Results

In the samplings performed 13 genera of the subfamily Geoplaninae were found. 47 known (listed in Supplementary Data Table 1) plus 13 new species were included in the morphological and molecular analyses. Of the new species found, some have recently been described and others are presented in this paper and will be described in a future publication dedicated exclusively to the taxonomical revision of the group with detailed descriptions or

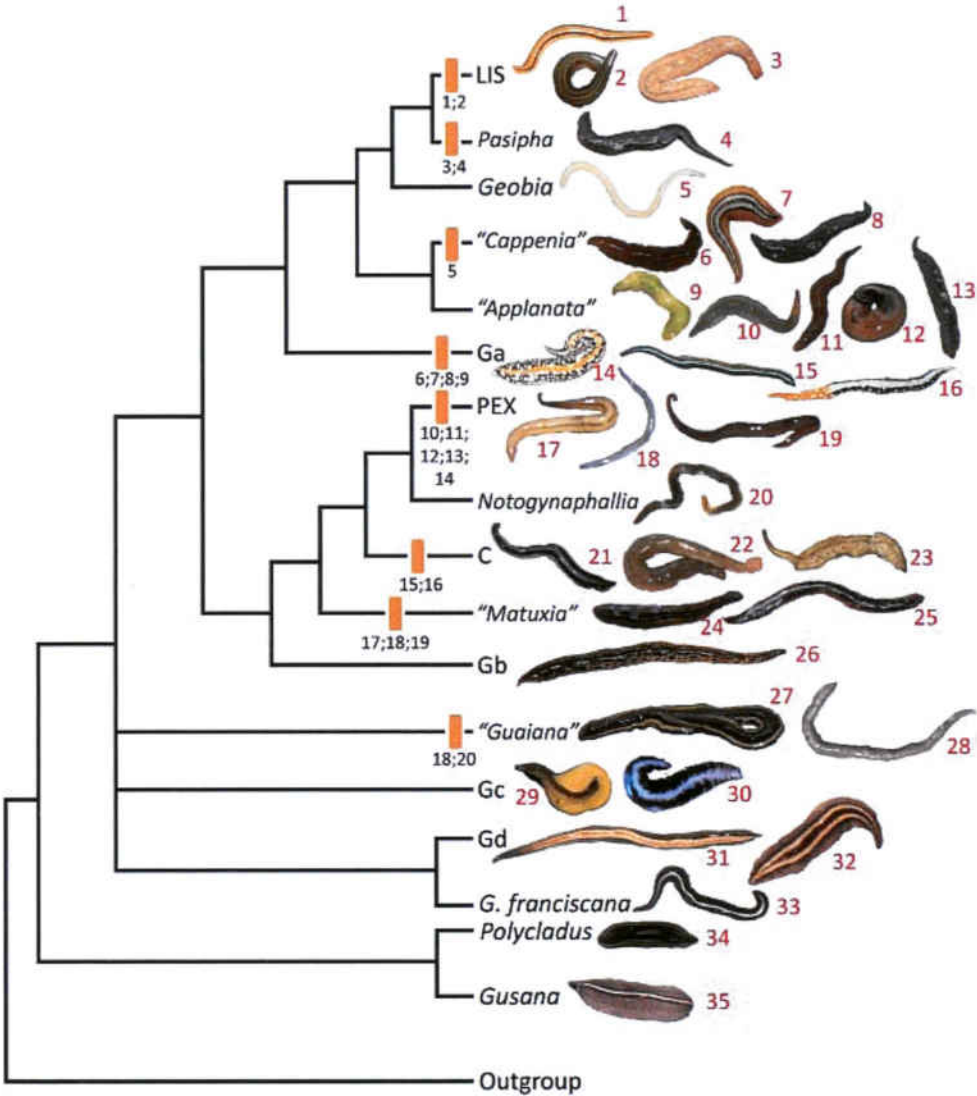


Figure 2. Summary tree showing the well supported clades and their relationships. Numbers correspond to the morphological characters reinforcing the groups, listed in supplementary data 1. Red numbers correspond to the species in the pictures: 1: *Luteostriata graffi*; 2: *Issoca rezendei*; 3: *Supramontana irritata*; 4: *Pasipha pinima*; 5: *Geobia subterranea*; 6: *Geoplana tamoia*; 7: *Geoplana pseudovaginuloides*; 8: *Geoplana crioula*; 9: *Geoplana ladislavii*; 10: *Geoplana josefi*; 11: *Geoplana marmorata*; 12: *Geoplana burmeisteri*; 13: *Geoplana carinata*; 14: *Geoplana chita*; 15: *Geoplana vaginuloides*; 16: *Geoplana pulchella*; 17: *Enterosyringia pseudorhynchodemus*; 18: *Pasipha trina*; 19: *Xerapoa hystrix*; 20: *Notogynaphallia sextstriata*; 21: *Cephaloflexa araucariana*; 22: *Choeradoplana iheringi*; 23: *Cephaloflexa bergi*; 24: *Geoplana tuxaua*; 25: *Geoplana matuta*; 26: *Geoplana phocaica*; 27: *Geoplana goetschi* sensu Marcus; 28: *Notogynaphallia guaiana*; 29: *Geoplana goetschi* sensu Riester; 30: *Geoplana quagga*; 31: *Geoplana rubidolineata*; 32: *Geoplana multicolor*; 33: *Geoplana franciscana*; 34: *Polycladus* sp. nov.; 35: *Gusana* sp. nov.

redescriptions of genera and species. To refer to the new taxa we will use the term sp. nov. in the nomenclature of the results.

The final molecular datasets are listed in Table 2. We used six outgroup species all of them belonging to the sister subfamily Rhynchodeminae (Supplementary Data Table 1).

Phylogenies of individual genes

In the four cases the inferences made by BI and ML gave similar results in terms of topology (not shown). The level of resolution displayed by the four genes is very different, with 28S being the gene that recovers more supported nodes. In Table

3 are shown the bootstrap and posterior probability values (BV and PPV) obtained in the individual gene analyses for all the monophyletic groups appearing in the concatenated tree.

Analyses of concatenated genes

The topology obtained is mainly the same with both methods (ML and BI), differences affecting only those nodes that have no statistical support in any of them, indicating that the differences are mostly due to lack of information in the data. In all cases the nodes with lower or no support are basal.

Figure 1 shows the tree obtained with Bayesian Inference, indicating nodes with statistical support for both ML and BI methods. We have given names (invalid for taxonomic purposes, after Art. 11 of the ICZN, 2000) to the clades that present high support for both methods. LIS clade (including genera *Luteostriata*, *Issoca* and *Supramontana*) is repeated in all the analyses (including individual genes trees, Table 3). Genus *Pasipha* is monophyletic (P clade, also in the phylogenies inferred with the ribosomal genes) except for the representative of the species *P. trina* that always appears in the PEX clade. Both groups (LIS and P) have as sister clade the species *Geobia subterranea*. The species *P. trina*, *E. pseudorhynchodemus* and *X. hystrix* (PEX) constitute another supported clade, sister of a group consisting on *Notogynaphallia sexstriata*, *N. plumbea* and *N. parca* (N clade). Genera *Choeradoplana* and *Cephaloflexa* are monophyletic and together form the C clade (a not statistically supported group). *Gusana* sp. nov. and *Polycladus* sp. nov. (Chilean clade) are grouped together having a sister-group relationship with the rest of geoplaninids.

The genus *Geoplana* is polyphyletic and appears divided into several groups, some of them with low support either for the group or for their position within the tree. Two big clusters are highly supported. One includes the species *G. tamoia*, *G. hina*, *G. crioula* and *G. pseudovaginuloides* (Clade *Cappenia*). This group is recovered in the four individual gene and the concatenated phylogenies, and contains some of the new species of *Geoplana* included in the study (*Geoplana* sp. nov. 1, 2, 4

and 5). The other important group, sister to the previous one, constituted by *Geoplana* species is the robust *Applanata* clade, formed by the species *G. burmeisteri*, *G. carinata*, *G. ladislavii*, *G. josefi* and *G. marmorata*. Other supported clades are the Ga or *Geoplana sensu stricto* clade (*G. pulchella*, *G. chita* and *G. vaginuloides*), the Gb clade (constituted by the species *G. phocaica* and the new species number 3), and *Matuxia* clade (*Geoplana matuta* and *G. tuxaua*, supported also independently by the three nuclear genes). This last group constitutes a monophyletic supported group with the clades C, N and PEX. Moreover, the species *N. guaiana* appears as a sister group of *Geoplana goetschi* sensu Marcus 1951 (*Guaiana* clade), while *Geoplana goetschi* sensu Riester, 1938 seems to be more related to the *Geoplana quagga* species (Gc clade), a group presenting different positions in the phylogenies. Finally, *Geoplana rubidolineata* and *G. multicolor* (Gd clade) appear usually grouped to *G. franciscana*.

Discussion

Phylogenetic informativeness of the genes studied

The phylogenetic information content of the 4 genes is very heterogeneous (Table 3). The 28S ribosomal gene is the one that has retrieved the maximum number of well resolved clades, while the mitochondrial COI gene is unable to recover most of the monophyletic clades found with the concatenated dataset. Genes 18S and EF have an intermediate situation. In the case of the EF, the lack of resolution in some parts of the tree can be due to the missing representatives of some species or genera. The concatenated dataset shows, as expected, a much better resolved phylogeny since the markers used are providing information that may be affecting different levels of the tree (either basal branches or internal clades) (Huelsenbeck et al. 1996; Soltis et al. 1999; Baldauf et al. 2000). Moreover, in some places the few positions giving support to nodes in each gene sum up to result in a well supported clade in the concatenated tree. The use of partitions, as a

strategy to try to avoid homoplasy in genetic data (Nylander et al. 2004; Brandley et al. 2009) reducing the systematic error, has also resulted in better estimates of posterior probabilities and likelihood scores (Brandley et al. 2005)(results not shown). Despite all the efforts invested in the analyses, there are still nodes lacking statistical support, mainly in the basal branches linking the major supported clusters. Probably more data are needed to recover a well resolved tree at all levels.

Molecular phylogeny of Geoplaninae with a morphological discussion

Of the 17 genera described to date, 13 have been included in this study. The proportion is quite good, considering that this is the first time that a molecular study is focused on this particular subfamily. The shared morphological features within and between the groups obtained in the molecular trees (listed in Supplementary data 1; Figure 2) are important to analyse and understand the evolution and relationships of the target taxa. Although most basal nodes of the Geoplaninae are not supported by high statistical values, we have achieved a good resolution in the intermediate and terminal nodes obtaining a quite clear overview of the phylogenetic relationships at the inter- and intra-genera level, resulting in the definition of a number of monophyletic groups. For some genera (*Enterosyringia*, *Geobia*, *Gusana*, *Polycladus*, *Supramontana* and *Xerapoa*) we cannot appreciate their monophyletic status because they are represented by only one species in our data. *Gusana* and *Polycladus*, however, deserve special mention as they are represented in this study by species new to science and share a different origin (Chilean) than the other species included in this work (all of them Brazilian). The resulting clades, discussed below, involve the future definition of new genera and redescriptions of some species, but also some clusters confirm previous morphological descriptions.

Geoplana group

For *Geoplana*, molecular data clearly shows it is not a natural group since it is divided in diverse

clusters, hence requiring a systematic revision to split it into different genera (as has happened in previous occasions). E.M. Froehlich in 1955 and C.F. Froehlich in 1967 already discussed about the existence of some groups within the genus but without proposing any formal change in its subdivision. Some of these suggested groups have a very similar composition to the clades got in our trees (Tables Supp. Data 2 and 3). Ogren and Kawakatsu (1990) formalized some of these groups by defining new genera and some subgenera (Table Supp. Data 2).

***Geoplana sensu stricto* (Ga) clade** (*G. vaginuloides*, *G. chita* and *G. pulchella*). Given that this clade harbors the type species of the genus (*G. vaginuloides*), its name should be maintained as *Geoplana*. The species in the clade share two derived morphological characters supporting the clade, i.e., a large and strongly muscular penis papilla (character 6) and a parenchymal longitudinal muscle layer (character 7). In addition, the ejaculatory duct muscles are well developed (character 8), and the prostatic vesicle is intrabulbar and canalicular (character 9). Froehlich (1956) described *G. chita* denoting that it was very close to *G. vaginuloides* (Table Supp. Data 3) because it presented anterior eyes with elongated cone shape and for the genital tract shape.

***Cappenia* clade** (*G. tamoia*, *G. pseudovaginuloides*, *G. crioula*, *G. hina* and the new species 1, 2, 4 and 5). The morphological synapomorphy confirming the group is the presence of the ejaculatory duct connected to the male atrium through a cavity in the end of the penis papilla (character 5). Moreover, in all the members of the clade the female genital channel opens to the dorsal posterior region of the female atrium. The first three species share certain morphological characters, described by E.M. Froehlich in 1955 (Table Supp. Data 3), such as the medium size of the flattened body, and the female canal bent to the back. Given the molecular and morphological coincidences, *Gen. nov.* 1 will be the first new genus proposed to be extracted from the genus *Geoplana*. This big clade appears as sister group of another *Geoplana* species group in the molecular trees, the "Applanata" clade.

Applanata clade (*Geoplana ladislavii*, *G. josefi*, *G. marmorata*, *G. burmeisteri* and *G. carinata*). Some morphological features are shared by all the members of the group although none can be considered synapomorphies. It is composed of large, flat and elongated worms with the eyes situated in marginal ridges with the exception of *G. josefi* where they are dorsal. In general, the penis papilla is occupying almost the entire atrium, and there is no separation between male and female atria, but there exists some variation in this character. The atrium in *G. marmorata* is different from the other species and in *G. josefi* the papilla is occupying the entire male atrium (Carbayo and Leal-Zanchet, 2001), as in *G. carinata* and *G. ladislavii*. A study by Alvarez and De Almeida (1999) shows the similarity of the karyotypes of *G. burmeisteri* and *G. carinata*. However, the karyotypes of the other species should be studied to check whether this feature could be a synapomorphy for the group. This will be the second new genus resulting of the division of the genus *Geoplana*, with almost all species in the group belonging to the *G. applanata*-group described by Froehlich (1967) (Table Supp. Data 2), although no morphological synapomorphies defining the genus have been found at present.

Matuxia clade (*Geoplana matuta* and *G. tuxaua*). They present exclusively marginal eyes with a well defined and constant penis papilla (E.M. Froehlich, 1955) crossed by an ejaculatory cavity (not a duct) (character 17). Moreover they share the stratified epithelium in the female atrium (character 18) and the intra-penial prostatic vesicle (Grau, 2010) (character 19). In fact, these two species were previously suggested to be closely related (Tables Supp. Data 2 and 3). A new genus will be proposed for the clade.

Guaiana clade (*Notogynaphallia guaiana* and *Geoplanagoetschi* sensu Marcus 1951). Morphological characters already indicated the proximity of *G. goetschi* Marcus to *Notogynaphallia guaiana* (see Leal-Zanchet and Carbayo, 2001). The main feature that defines the group is the longitudinal muscle layer of the sub and suprainstestinal parenchyma present

in addition to the transversal (character 20). The two species also share a multilayered lining in the female atrium, together with some characteristics of the copulatory apparatus (seminal vesicle with a forked extrabulbar portion, the male atrium strongly folded and the female atrium almost totally filled with the compact multilayered epithelium). The division of *G. goetschi* in two species was already suggested in a previous molecular study (Álvarez-Presas et al. 2011), where sequences of *G. goetschi* sensu Riester 1938 and sensu Marcus 1951 showed obvious differences in the trees. When checked at morphological level, mainly the longitudinal parenchymal muscle system, present in the species sensu Marcus, is absent in *G. goetschi* sensu Riester, 1938. The inclusion of *N. guaiana* in this group, far apart from the rest of *Notogynaphallia* species, also casts the need for revising the definition of this species. A new genus will be described including both species.

Species with unclear phylogenetic position

Some species, mainly belonging to the genus *Geoplana*, are found in non-supported groups or are located in morphologically heterogeneous groups not showing distinctive morphological features. In general these groups have a basal and non-supported situation in the tree. They are described below.

The clade made by *Geoplana phocaica* (species that has certain similarities with *Geoplana preta*, according to Marcus, 1951) and the new species of *Geoplana* number 3 (Gb) is one of these cases. Both species share some morphological characters such as a cylindrical pharynx and the presence of penis papilla, but for the moment, there are not synapomorphies characterizing the clade. *Geoplana goetschi* Riester, 1938 and *Geoplana quagga* (Gc) constitute a clade with no specific morphological characters to support it, although both species have a penis papilla, confirming their belonging to the genus *Geoplana sensu stricto*. *G. goetschi* Riester additionally has a penis papilla similar to the *Cappenia* clade species (the ejaculatory duct opens into a kind of cavity or dilation of the papilla, which is longer than the duct) although the molecular data does not give any sign of this grouping. The clade including the

species *Geoplana rubidolineata*, *G. franciscana* and *G. multicolor* (redescribed in Leal-Zanchet and Matos, 2011) (Gd), also has an unsupported situation in the tree. The three species have dorsal eyes and share some characters of the copulatory apparatus, such as the presence of extrabulbar vesicle and a female atrium with a reduced light. *G. rubidolineata* and *G. multicolor* have a similar colour pattern, presenting the first a greater number of striations and both being quite different from *G. franciscana*. The pharynx is cylindrical, as in most species of *Geoplana*.

Non-*Geoplana* clades

Chilean clade (*Gusana* and *Polycladus*). This clade, that presents a basal position on the trees, does not have any morphological synapomorphies supporting it. Due to their low dispersal ability and their worldwide distribution, C. G. Froehlich in 1967 proposed that terrestrial flatworms were likely originated in the upper Paleozoic, as many other terrestrial organisms did, and described the genus *Geoplana* as the older in the subfamily, and specifically the Chilean species as the most antique (including the current genus *Gusana*). Moreover, some evidence seem to indicate that land planarians arrived to South America from the Antarctic continent crossing Chile and, from there, they might had dispersed through the continent before the rising of the Andean range (Froehlich, 1967). However, the basal position of *Gusana* and *Polycladus* in the molecular phylogenies obtained just makes clear that there was an early split among these two genera and the species that diversified in Brazil. The analysis of a broader representation of Chilean genera would allow to check whether *Gusana* and *Polycladus* are a sister group of the remaining Geoplaninae. Moreover, morphological evidences are also needed to corroborate both the grouping of *Polycladus* and *Gusana* and their position in the Geoplaninae phylogeny.

***Pasipha* clade.** With the exception of *P. trina*, which situation will be discussed later, all the other species belonging to the genus *Pasipha* form a monophyletic group. The clade is homogeneous in the general form of the body (slender animals, with parallel borders).

Although the diagnosis of the genus currently does not provide any synapomorphy, there are some morphological features shared by the members of the P clade (as the regionalized prostatic vesicle (character 3) and the loss of penis papilla (character 4)). After E.M. Froehlich (1955) the genus *Pasipha* (Table Supp. Data 2) is characterized by animals with small eyes and male and female atria separated by a dorsal fold (feature also recognized by C.G. Froehlich (1967), together with an elongate body and female genital canal arriving from the ventral side). We have 6 representatives from the 22 species listed in Ogren & Kawakatsu, 1990 (Table Supp. Data 2) for the *Pasipha* genus, and two new species. A broader molecular sampling will be needed to fully comprehend the internal relationships of the group and to check its monophyly.

***Notogynaphallia sensu stricto* clade.** The diagnosis of the genus *Notogynaphallia* does not include any derived feature, but a combination of characteristics also present across other geoplaninid genera, and the molecular analyses seem to reflect that this lack of synapomorphies is a consequence of the group being polyphyletic. Over the years, the genus has undergone many changes (see Leal-Zanchet & Froehlich, 2006; Carbayo, 2006; Carbayo, 2010 and references therein; Tables Supp. Data 2 and 3). *N. plumbea* and *N. parca*, share a set of morphological features, namely the lack of penis papilla, marginal eyes, prostatic vesicle intrabulbar and amply communicated with the male atrium, and the female part very reduced, represented only by the female canal (bent dorsally). *Notogynaphallia plumbea*, *N. parca* and *N. sexstriata* are species with a compact genital apparatus and intrabulbar prostatic vesicle. There is still a fourth species, *Notogynaphallia mourei* Froehlich, 1956, very similar to the species of the clade *Notogynaphallia s.s.* in morphological aspects. Due to the scarce taxonomic representation of *Notogynaphallia* in our analyses (5 from 15 current nominal species), they are pending on the addition of other species to check whether the detected morphological heterogeneity is reproduced at the molecular level.

C clade (*Cephaloflexa* and *Choeradoplana*). The genera *Cephaloflexa* and *Choeradoplana* are the only of those represented by more than one species in our study that are monophyletic (plus *Luteostriata*, but this does not have statistical support). The clade C is supported by the presence of the cephalic end curved backwards (character 15) and the lack of eyes and sensory pits at the apex (character 16). Moreover, these two genera have the retractor muscle fibres orientated parallel to the sagittal plane and the sub-neural mesenchymal muscle layer is only present in the cephalic region. So the cluster supported by both morphological and molecular characters seems to be quite robust. We have included in the analyses the two described species of *Cephaloflexa* and one new to science (pending on morphological description). The diagnostic characters of the genus (very short anterior third of the body, anterior region folded into the back, lack of eyes and sensory pits at the front of the body, and a retractor muscle derived from the ventral longitudinal subcutaneous muscles; Carbayo and Leal-Zanchet, 2003) are shared by the three studied species, including the new one. The latter differs from *C. araucariana* and *C. bergi* by the presence of a penis papilla. From genus *Choeradoplana*, only one of the 7 described species (Table Supp. Data 2) is used in this study (*C. iheringi*). However, three new species have been found and included in the analyses, so that the representation of the genus is quite good. *Choeradoplana* (Graff, 1896) is constituted by animals with part of the ventral cutaneous longitudinal muscles partially sunk into the mesenchyma (Carbayo and Leal-Zanchet, 2003), the front end of the head rolled back, a muscle-glandular organ in the anterior region of the body, and other diagnostic characters shared by the three new species presented here and the already described ones. The presence of the species *Notogynaphallia albonigra* (Riester, 1938) in the C clade and specifically among the species of the genus *Choeradoplana* made us revise its morphology. The species shares the diagnostic characteristics of the genus *Choeradoplana*, as the presence of the ventral longitudinal subepidermal muscles partially sunk into the mesenchyma and musculo-glandular cephalic specializations. A deeper morphological study of the

species should be done, but the evidence suggests the need of a redescription of the species and its change to the *Choeradoplana* genus (*Choeradoplana albonigra*). Additionally, *C. iheringi* species, which seemingly is not monophyletic, deserves special attention and will be the subject of a deeper study in the future.

LIS clade (*Luteostriata*, *Issoca* and *Supramontana*). The high support values in the node clustering the three LIS genera in all the molecular inferred trees (Table 3) denote that the group is clearly monophyletic. There are also certain morphological characters that support this grouping, such as the presence of eyes and sensory pits surrounding the entire front end (which would be a symplesiomorphy), the presence of a retractor muscle in the anterior region of the body (with fibres oriented towards body margins in *Supramontana* and *Issoca*, and towards dorsal surface and body margins in *Luteostriata*) (character 1) and the presence of a sub-neural mesenchymal muscle layer transverse throughout the body (character 2). One of the most outstanding features of the genus *Luteostriata* (recently described in Carbayo, 2010; Table 4) is the presence of a cephalic musculo-glandular organ, consisting of glands crossing a U-shaped glandular ventral surface and a retractor muscle, modified from the ventral longitudinal cutaneous muscle fibres. Molecularly, the monophyly of the genus is recovered (we have included the 7 species assigned to the genus), although without statistical support. *L. abundans*, *L. muelleri*, *L. caissara* and *L. ceciliae* share some morphological characters such as the longitudinal stripes on the dorsal body side, a long genital apparatus and a female atrium with pleated cavities. Results of the molecular phylogeny of this genus are somewhat surprising; while *L. abundans*, *L. caissara*, *L. graffi* and *L. muelleri* seem to be clearly delimited species (although some of them paraphyletic), *L. ernesti* presents a particular situation. In fact, *L. muelleri* and *L. ernesti* are very similar species in the internal anatomy (Carbayo (2003) considered them synonyms), so that their identification "relies heavily on the externally observable differences, mainly colour pattern, and behaviour" (Leal-Zanchet & Froehlich, 2006). This

assumption of Carbayo would be supported by the presence of the individual F3358 within the clade formed by *L. muelleri*, leaving in doubt whether the rest of *L. ernesti* included in the analysis belong to this species or there was a misidentification due to the excessive plasticity of the characters used for the species diagnosis. Obviously, the genus *Luteostriata* deserves special attention and a more accurate analysis. The genus *Issoca* was described by Froehlich (1955b) and redescribed later by Carbayo and Leal-Zanchet (2003) and includes Geoplanidae with elongated body, a large creeping sole, strong cutaneous longitudinal musculature, mesenchymal longitudinal muscles very weak or absent, cephalic musculo-glandular organ, eyes and sensory pits surrounding the entire cephalic region, a sub-neural mesenchymal muscle layer interleaved with retractor muscle fibres and no sensory papillae or adenodactyl. 2 of the 5 described species have been included in our analyses: *I. rezendei* and *I. jandaia*. These two species are differentiated by the number and disposition of stripes and by internal features, such as the seminal vesicle (intra-bulbar in *I. rezendei* and extra-bulbar in *I. jandaia*). However, *I. rezendei* does not belong to the *Issoca* molecular group, consisting of *I. jandaia* and the new species (the latter also presenting extra-bulbar seminal vesicle). The genus *Supramontana* is monospecific, so that we cannot discuss about its monophyly.

The molecular phylogeny does not reproduce the grouping of the five genera presenting a cephalic retractor muscle (*Cephaloflexa*, *Choeradoplana*, *Issoca* and *Supramontana*; Carbayo and Leal-Zanchet, 2003; and *Luteostriata*; Carbayo, 2010) as could be expected. Instead they are molecularly divided into two groups (C and LIS) that reproduce the clustering proposed by Carbayo (2010), who partitioned the character in a set of them (Table 3 in Carbayo, 2010) analysed independently.

PEX clade (*Pasipha trina*, *Enterosyringia* and *Xerapoa*). This clade is supported by some important morphological features as the presence of a central nervous system in two longitudinal cords (character 10) (unlike the other Geoplaninae genera which until now have been found to present the central nervous

system as a “nerve plate”). The cooccurrence of a major morphological feature with the molecular clustering suggests that this is a natural group. Froehlich (1955b) proposed that there was a correlation between the size and body shape and the type of nervous system that land planarians have. Moreover, he gives an evolutionary sense to the character, and ventures to classify the nervous system in the form of longitudinal cords as more primitive (following Meixner (1928)), since it also appears land planarians considered basal, Microplaninae, as well as in aquatic planarians. This affirmation is debatable since which is the most basal group within the terrestrial flatworms (Álvarez-Presas et al. 2008) is still unclear. When the body size is small and cylindrical, a “nerve plate” nervous system would mean energetic waste to innervate all the parts of the body, which in this case are very close. Therefore, a simple nervous system would be a derived state in the subfamily Geoplaninae, and could be a regression (as adaptation) of the character state in PEX, instead of a primitive condition. The internal position of the group in the molecular analyses strengthens the possibility of the presence of a derived feature in this group.

The position of *Pasipha trina* species (without penis papilla or independent seminal vesicle), has been discussed previously (Tables Supp. Data 2 and 3) considering morphological data. One character differentiating *P. trina* from the other *Pasipha* species is the position of the eyes, in the first located in a marginal position and in the others widely scattered across the back. There are also other morphological characters that support the grouping of *P. trina* with *Enterosyringia* and *Xerapoa*, such as having a narrow creeping sole (character 11); the ovaries, above the parenchymal subintestinal muscle layer (character 12), are in a position prior to the pharynx (character 13) and the female channel back to forward, opening in the posterior region of the female atrium (character 14) (Grau, 2010). Concluding, *Pasipha trina* needs a revision, since the molecular data confirm what the morphology already predicted. We will propose the need of a genus change for this species, probably *Enterosyringia* (Marcus in his discussion about the species (1951) already noted its similarity to *E.*

pseudorhynchodemus), with some changes in the diagnosis of the genus.

Final remarks

It should be noted that there is still much work to be done concerning the phylogeny of Neotropical terrestrial planarians. It is necessary to add to the study representatives of the other genera described (*Amaga*, *Gigantea*, *Liana* and *Pseudogeoplana*) and the ones remaining to be described, the exhaustive samplings in the area of the Atlantic Forest performed allow us to predict that more new species and genera will appear. The other important factor is the use of new molecular markers that can resolve better the most basal nodes of the phylogeny. This problem was already noted in a previous work using molecular data to infer the phylogeny of Tricladida (Álvarez-Presas et al. 2008). In the present study we have added a new gene, the one encoding for the elongation factor 1- α , which seems to provide information that others do not have, but it is still not enough. We need a molecular marker with an intermediate variability between nuclear and mitochondrial markers (perhaps a nuclear intron), but for now this is a difficult search. Maybe the new next generation sequencing techniques will be helpful in order to find possible markers suitable for resolving phylogenies of terrestrial flatworms. Whereas the monophyletic status of some groups as described by morphological data is confirmed, there are others showing an imminent necessity of taxonomic revision. After all the proposed changes in species hitherto belonging to the genus *Geoplana*, the diagnosis of the genus should be amended with the resulting taxonomic implications. All this work will take place in a future publication exclusively dedicated to the taxonomical revision of the group.

Aknowledgements

This research was supported by Fundación BBVA of Spain (BIOCON 06–112) and by Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain CGL2008-00378/BOS. Dr Julio Rozas is thanked for his suggestions and valuable assistance to improve the content of this

ms. We are indebted to Júlio Pedroni, Débora Redivo, Cláudia Olivares, Marília Jucá, Leonardo Zerbone and Welton Araújo for sampling help and Italo D'Elia, Ana Cavalcanti and Lígia Domingos for the histological work.

References

- AKAIKE, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *Automatic Control, IEEE Transactions on*, **19**(6), pp. 716-723.
- ALVAREZ, L. and DE ALMEIDA, E.J.C., 1999. Comparative karyotypic analysis of two land-planarian species from Brazil: *Geoplana burmeisteri* and *Geoplana carinata* (Tricladida, Terricola). *Hereditas* **131**, 1-4.
- ÁLVAREZ-PRESAS, M., BAGUÑA, J. and RIUTORT, M., 2008. Molecular phylogeny of land and freshwater planarians (Tricladida, Platyhelminthes): From freshwater to land and back. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **47**(2), pp. 555-568.
- ÁLVAREZ-PRESAS, M., CARBAYO, F., ROZAS, J. and RIUTORT, M., 2011. Land planarians (Platyhelminthes) as a model organism for fine-scale phylogeographic studies: understanding patterns of biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Journal of Evolutionary Biology*, **24**(4), pp. 887-896.
- BAGUÑA, J., CARRANZA, S., PAPS, J., RUIZ-TRILLO, I. and RIUTORT, M., 2001. Molecular taxonomy and phylogeny of the Tricladida. In: LITTLEWOOD, D. T. J. & BRAY, R. A., ed, *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Systematics Association Special edn. pp. 49–56.
- BALDAUF, S.L., ROGER, A.J., WENK-SIEFERT, I. and DOOLITTLE, W.F., 2000. A Kingdom-Level Phylogeny of Eukaryotes Based on Combined Protein Data. *Science*, **290**(5493), pp. 972-977.
- BAPTISTA, V.d.A. and LEAL-ZANCHET, A.M., 2005. Nova espécie de *Geoplana* Stimpson (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola) do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* **22**, 875-882.
- BRANDLEY, M.C., SCHMITZ, A. and REEDER, T.W., 2005. Partitioned Bayesian Analyses, Partition Choice, and the Phylogenetic Relationships of Scincid Lizards. *Systematic Biology*, **54**(3), pp. 373-390.
- BRANDLEY, M.C., WARREN, D.L., LEACHÉ, A.D. and MCGUIRE, J.A., 2009. Homoplasy and Clade Support. *Systematic Biology*, **58**(2), pp. 184-198.
- CANNON, R.J.C., BAKER, R.H.A., TAYLOR, M. C and MOORE, J.P., 1999. A review of the status of the New Zealand flatworm in the UK. *Annals of Applied Biology*, **135**(3), pp. 597-614.
- CARBAYO, F. and LEAL-ZANCHET, A.M., 2001. A new species of terrestrial planarian (Platyhelminthes: Tricladida: Terricola) from South Brazil. *Brazilian Journal of Biology* vol.61, 1519-6984.
- CARBAYO F., 2003. Revisión de Notogynaphallia (Ogren & Kawakatsu, 1990) Platyhelminthes: Tricladida. Doctoral

- Thesis. Universidad de Salamanca, Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química agrícola.
- CARBAYO F. and LEAL-ZANCHET, A. M., 2003. Two new genera of geoplaninid land planarians (Platyhelminthes : Tricladida : Terricola) of Brazil in the light of cephalic specialisations. *Invertebrate Systematics*, **17**, pp. 449–468–449.
- CARBAYO, F., 2006. Redescription of two land planarian species of Notogynaphallia Ogren & Kawakatsu (Platyhelminthes, Tricladida, Geoplaninae) and confirmation of the heterogeneity of the genus. *Revista Brasileira De Zoologia*, **23**(3), pp. 746–757.
- CARBAYO, F., 2010. A new genus for seven Brazilian land planarian species, split off from Notogynaphallia (Platyhelminthes, Tricladida). *Belgian Journal of Zoology*, **140**(Suppl.), pp. 91–101.
- CARRANZA S., RUIZ-TRILLO I., LITTLEWOOD D.T.J., RIUTORT, M. and BAGUÑÀ, J., 1998a. A reappraisal of the phylogenetic and taxonomic position of land planarians (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida) inferred from 18S rDNA sequences. *Pedobiologia*, **42**, pp. 433–440.
- CARRANZA, S., LITTLEWOOD, D. T. J., CLOUGH, K. A., RUIZ-TRILLO, I., BAGUÑÀ, J. and RIUTORT, M., 1998b. A robust molecular phylogeny of the Tricladida (Platyhelminthes: Seriata) with a discussion on morphological synapomorphies. *Proceedings: Biological Sciences*, **265**(1396), pp. 631–640.
- CASTRESANA, J. and TALAVERA, G., 2007. Improvement of Phylogenies after Removing Divergent and Ambiguously Aligned Blocks from Protein Sequence Alignments. *Syst. Biol.*, **56**(4), pp. :564–577.
- DUCEY, P.K., MESSERE, M., LAPOINT, K. and NOCE, S., 1999. Lumbricid prey and potential herpetofaunal predators of the invading terrestrial flatworm Bipalium adventitium (Turbellaria: Tricladida: Terricola). *American Midland Naturalist*, **141**(2), pp. 305–314.
- FELSENSTEIN, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, pp. 783–791.
- FROEHLICH, E.M., 1955. Sobre espécies brasileiras do gênero Geoplanea. *Bol. Fac. Fil. Ci. Letras, Univ. São Paulo, Zool.*, **19**, pp. 289–369.
- FROEHLICH, C.G., 1955b. Sobre a morfologia e taxonomia das Geoplanidae. *Bol. Fac. Fil. Ci. Letras, Univ. São Paulo, Zool.*, **19**, pp. 195–279.
- FROEHLICH, C.G., 1956. Planárias Terrestres do Paraná. *Dusenía*, **7**(4), pp. 173–196.
- FROEHLICH, C.G., 1967. A contribution to the zoogeography of Neotropical land planarians. *Acta Zool. Lilloana*, **23**, pp. 153–162.
- FROEHLICH, E.M., 1978. On a collection of Chilean landplanarians. *Bol. Zool. Univ. São Paulo*, **3**, pp. 7–80.
- FROEHLICH, E.M. and LEAL-ZANCHET, A.M., 2003. A new species of terrestrial planarian of the genus Notogynaphallia Ogren & Kawakatsu (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola) from south Brazil and some comments on the genus. *Revista Brasileira de Zoologia*, **vol.20**(4), pp. 0101–8175.
- GRAFF, L. V., 1896. Ueber das System und die geographische Verbreitung der landplanarien. *Verhandl.deutsch.Zool.Ges*, **6**, pp. 75–93.
- GRAFF, L.V., 1899. Monographie der Turbellarien II. Tricladida terricola (landplanarien). *Engelmann, Leipzig*.
- GRAFF, L.V., 1912–1917. Tricladida. *Brown, H.G. (ed.), Klassen und Ordnungen des Tierreichs. Bd. IV. Abt. 1c. III. Leipzig*.
- GRAU, J.H., 2010. Relações filogenéticas entre os gêneros de Geoplaninae (Platyhelminthes, Tricladida) inferidas de caracteres morfológicos.
- HALL, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, pp. 95–98.
- HASSOUNA, N., MICHOT N. and BACHELLERIE, J. P. 1984. The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **12**: 3563–3583.
- HUELSENBECK, J.P., BULL, J.J. and CUNNINGHAM, C.W., 1996. Combining data in phylogenetic analysis. *Trends in Ecology & Evolution*, **11**(4), pp. 152–158.
- IWAI, N., SUGIURA, S. AND CHIBA S., 2010. Predation impacts of the invasive flatworm *Platydemus manokwari* on eggs and hatchlings of land snails. *Journal of Molluscan Studies*, **00**, pp. 1–4.
- ICZN, 2000. Código internacional de nomenclatura zoológica. Sociedad de Amigos del Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- KATOH, K., ASIMENOS, G. and TOH, H., 2009. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **537**, pp. 39–64.
- KAWAKATSU M, WU S-K, SLUYS R, SASAKI G-Y, KAWAKATSU M-Y, KAWAKATSU T., 2007-last update, An annotated bibliography of Taiwan land planarians, with lists of linked papers on this animal group [Homepage of Kawakatsu's Web Library on Planarians], [Online]. Available: <http://victoriver.com/tlbp.aspx>.
- LÁZARO, E.M., SLUYS, R., PALA, M., STOCCHINO, G.A., BAGUÑÀ, J. and RIUTORT, M., 2009. Molecular barcoding and phylogeography of sexual and asexual freshwater planarians of the genus *Dugesia* in the Western Mediterranean (Platyhelminthes, Tricladida, Dugesidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **52**(3), pp. 835–845.
- LEAL-ZANCHET, A. M. and CARBAYO, F., 2001. Two new species of Geoplanidae (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola) from Brazil. *J. Zool, London* **253**, pp. 433–446.
- LEAL-ZANCHET, A.M. and BERNARDES DE MATOS, L., 2011. *Geoplanea multicolor* Graff (Platyhelminthes: Tricladida): new records and taxonomic re-interpretation of morphological characters. *Zootaxa*, **2804**, pp. 41–55.
- MARCUS, E., 1951. Turbellaria Brasileiros (9). *Bol Fac Fil Ci Letr U Sao Paulo Zool*, **16**, pp. 1–217.
- MEDLIN, L., H. J. ELWOOD, S. STICKEL and M. L. SOGIN. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16Slike rRNA coding regions. *Gene* **71**:491–499

- MOSELEY, H.N., 1877. Structure of several forms of land planarians. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, **2-17**, pp. 273-292.
- NYLANDER, J.A.A., RONQUIST, F., HUELSENBECK, J.P. and NIEVES-ALDREY, J., 2004. Bayesian Phylogenetic Analysis of Combined Data. *Systematic Biology*, **53**(1), pp. 47-67.
- PAPS, J., BAGUÑÀ, J. and RIUTORT, M., 2009. Bilaterian phylogeny: A broad sampling of 13 nuclear genes provides a new lophotrochozoa phylogeny and supports a paraphyletic basal acoelomorpha. *Molecular biology and evolution*, **26**(10), pp. 2397-2406.
- POSADA, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol*, **25**(7), pp. 1253-1256.
- ROMEIS, B. 1989. Mikroskopische Technik. Urban und Schwarzenberg, München, 697 pp.
- RIUTORT, M., ÁLVAREZ-PRESAS, M., LÁZARO, E., SOLÀ, E. and PAPS, J. "Evolutionary history of the Tricladida and the Platyhelminthes: an up-to-date phylogenetic and systematic account". *International Journal of Development Biology*. In press
- RONQUIST, F. and HUELSENBECK, A. J. P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**(12), pp. 1572-1574.
- SLUYS, R., 1989. Phylogenetic relationships of the triclads (Platyhelminthes, Seriata, Tricladida). *Bijdr Dierk*, **59**, pp. 3-25.
- SLUYS, R., KAWAKATSU, M. and WINSOR, L., 1998. The genus *Dugesia* in Australia, with its phylogenetic analysis and historical biogeography (Platyhelminthes, Tricladida, Dugesidae). *Zoologica Scripta*, **27**(4), pp. 273-290.
- SLUYS, R., KAWAKATSU, M., RIUTORT, M. and BAGUÑÀ, J., 2009. A new higher classification of planarian flatworms (Platyhelminthes, Tricladida). *Journal of Natural History*, **43**(29), pp. 1763-1777.
- SOLTIS, P.S., SOLTIS, D.E. and CHASE, M.W., 1999. Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. *Nature*, **402**(6760), pp. 402-404.
- STAMATAKIS, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, **22**(21), pp. 2688-2690.
- TKACH, V. B. GRABDAKAZUBSKA, PAWLOWSKI, J. and SWIDERSKI, Z.. 1999. Molecular and morphological evidences for close phylogenetic affinities of the genera Macrodera, Leptophallus, Metaleptophallus and Paralepoderma (Digenea, Plagiorchioidea), *Acta Parasitol* **44**: 170-179.
- WINSOR, L., JOHNS, P.M., YEATES, G.W., 1998. Introduction, and ecological and systematic background, to the Terricola (Tricladida). *Pedobiologia*, **42**, pp. 389-404.

Supplementary Data Table 1. List of samples used in this study with sampling locality and GenBank Accession numbers.

Species	Collecting locality	Molecular code	N. MZUSP ^a	18S rDNA	28S rDNA	EF-1 α	COI
Geoplaninae							
<i>Cephaloflexa bergi</i> Graff, 1899	Cambury / SP	F1034	MZUSP PL 303	?	?	?	?
<i>C. bergi</i>	Cambury / SP	F1038	MZUSP PL 305	?	?	?	?
<i>C. araucariana</i> Carbayo & Leal-Zanchet, 2003	FLONA* / RS	F3387	MZUSP PL 1073	?	?	?	?
<i>C. araucariana</i>	FLONA / RS	F3426	MZUSP PL 1076	?	?	?	?
<i>Cephaloflexa</i> sp. nov.1	P.N.S. da Bocaina / SP	F2103/	MZUSP PL 1019	?	?	?	?
<i>Choeradoplana iheringi</i> Graff, 1899	FLONA / RS	F3449	MZUSP PL 533	?	?	?	?
<i>C. iheringi</i>	P.N.S. da Bocaina / SP	F2840	MZUSP PL 540	?	?	?	?
<i>Choeradoplana</i> sp. nov. 1	P.E.S. da Cantareira / SP	F2023	MZUSP PL 1000	?	?	-	?
<i>Choeradoplana</i> sp. nov. 1	P.E.S. da Cantareira / SP	F3011	MZUSP PL 477	?	?	?	?
<i>Choeradoplana</i> sp. nov. 2	P.N.S. da Bocaina / SP	F2104	MZUSP PL 1018	?	?	?	?
<i>Choeradoplana</i> sp. nov. 2	P.N.S. da Bocaina / SP	F2803	MZUSP PL 1049	?	?	?	?
<i>Choeradoplana</i> sp. nov. 2	P.N.S. da Bocaina / SP	F2822	?	?	?	-	?
<i>Choeradoplana</i> sp. nov. 3	P.E. Intervalles / SP	F3092	MZUSP PL 1063	?	?	?	?
<i>Choeradoplana</i> sp. nov. 3	P.E. Intervalles / SP	F3802	?	?	?	-	?
<i>Enterosyringia pseudorhynchodemus</i> Riester, 1938	São Paulo / SP	F992	?	?	?	-	?
<i>E. pseudorhynchodemus</i>	São Paulo / SP	F1013	?	?	?	-	?
<i>Geobia subterranea</i> Schultze & Müller, 1857	São Leopoldo / RS	F358	MZUSP PL 650	?	?	?	?
<i>G. subterranea</i>	P.N.S. dos Órgãos / RJ	F1355	MZUSP PL 673	?	?	?	?
<i>Geoplana burmeisteri</i> Schultze & Müller, 1857	São Paulo / SP	F989	MZUSP PL 658	?	?	-	HQ542895
<i>G. burmeisteri</i>	P.E.S. da Cantareira / SP	F2886	MZUSP PL 733	?	?	?	HQ542887
<i>G. carinata</i> Riester, 1938	P.E. Intervalles / SP	F3084	MZUSP PL 1062	?	?	?	?
<i>G. carinata</i>	P.E. Intervalles / SP	F3093	MZUSP PL 1064	?	?	?	?
<i>G. chita</i> Froehlich, 1956	Cambury / SP	F4358	MZUSP PL 1086	?	?	?	?
<i>G. chita</i>	Cambury / SP	F4409	MZUSP PL 1087	?	?	?	?
<i>G. crioula</i> Froehlich, 1954	P.E.S. da Cantareira / SP	F3709	MZUSP PL 1078	?	?	?	?
<i>G. crioula</i>	P.E.S. da Cantareira / SP	F3715	MZUSP PL 1079	?	?	?	?
<i>G. franciscana</i> Leal-Zanchet & Carbayo, 2001	FLONA / RS	848	MZUSP PL 935	?	?	?	?
<i>G. franciscana</i>	FLONA / RS	F3357	MZUSP PL 1069	?	?	?	?
<i>G. goetschi</i> sensu Marcus 1951	Cambury / SP	F1041	?	?	?	-	?
<i>G. goetschi</i> sensu Marcus 1951	P.N.S. da Bocaina / SP	F2833	MZUSP PL 404	?	?	?	HQ026439
<i>G. goetschi</i> sensu Riester 1938	P.E.S. da Cantareira / SP	F2870	MZUSP PL 412	?	?	-	?
<i>G. hina</i> Marcus, 1951	Parque Saint Hilaire / PR	F1613	MZUSP PL 1008	?	?	?	?
<i>G. josefi</i> Carbayo & Leal-Zanchet, 2001	FLONA / RS	F3389	MZUSP PL 1074	?	?	?	?
<i>G. josefi</i>	FLONA / RS	F3403	MZUSP PL 1075	?	?	?	?
<i>G. ladislavii</i> Graff, 1899	P.N.S. do Itajaí / SC	F1399	MZUSP PL 1007	?	?	?	?
<i>G. ladislavii</i>	P.N.S. do Itajaí / SC	F1418	MZUSP PL 681	?	?	?	?
<i>G. ladislavii</i>	P.N.S. do Itajaí / SC	F1504	MZUSP PL 698	?	?	?	?
<i>G. ladislavii</i>	P.N.S. do Itajaí / SC	F1566	MZUSP PL 707	?	?	?	?
<i>G. ladislavii</i>	FLONA / RS	?	?	DQ666005	DQ665975	?	AF178315

Supplementary data Table 1. continued.

Species	Collecting locality	Molecular code	N. MZUSP*	18S rDNA	28S rDNA	EF-1 α	COI
<i>G. marmorata</i> Schultze & Müller, 1856	P.E.S. do Tabuleiro / SC	F3191	MZUSP PL 1066	?	?	?	?
<i>G. marmorata</i>	P.E.S. do Tabuleiro / SC	F3247	MZUSP PL 1067	?	?	?	?
<i>G. matuta</i> Froehlich, 1954	P.E. do Desengano / RJ	F2184	MZUSP PL 1021	?	?	?	-
<i>G. matuta</i>	P.E. do Desengano / RJ	F2187	MZUSP PL 1022	?	?	?	?
<i>G. multicolor</i> Graff, 1899	P.N.S. da Bocaina / SP	F2101	MZUSP PL 1017	?	?	?	?
<i>G. multicolor</i>	P.E.S. da Cantareira / SP	F2997	MZUSP PL 1055	?	?	?	?
<i>G. phocaica</i> Marcus, 1951	P.N.S. da Bocaina / SP	F2827	MZUSP PL 457	?	?	?	?
<i>G. phocaica</i>	P.N.S. da Bocaina / SP	F2830	MZUSP PL 460	?	?	?	?
<i>G. phocaica</i>	P.E.S. da Cantareira / SP	F3741	?	?	?	-	-
<i>G. pseudovaginuloides</i> Riester, 1938	P.N.S. dos Órgãos / RJ	F1244	MZUSP PL 670	?	?	?	?
<i>G. pseudovaginuloides</i>	P.N.S. dos Órgãos / RJ	F1245	MZUSP PL 671	?	?	?	?
<i>G. pulchella</i> Schultze & Müller, 1857	P.E.S. do Tabuleiro / SC	F3249	MZUSP PL 1068	?	?	?	?
<i>G. quagga</i> Marcus, 1951	São Paulo / SP	F1003	?	?	?	-	?
<i>G. quagga</i>	Parque Saint Hilaire / PR	F1736	MZUSP PL 594	?	?	?	?
<i>G. rubidolineata</i> Baptista & Leal-Zanchet, 2005	FLONA / RS	868	MZUSP PL 936	?	?	?	?
<i>G. tamoia</i> Froehlich, 1954	P.N.S. dos Órgãos / RJ	F1139	MZUSP PL 665	?	?	?	?
<i>G. tamoia</i>	P.N.S. dos Órgãos / RJ	F1336	MZUSP PL 672	?	?	?	?
<i>G. tuxaua</i> Froehlich, 1955	P.N.S. dos Órgãos / RJ	F1275	?	?	?	-	?
<i>G. tuxaua</i>	P.E.S. da Cantareira / SP	F3059	MZUSP PL 1058	?	?	?	?
<i>G. vaginuloides</i> Darwin, 1844	Parque da Previdência / SP	F1163	MZUSP PL 666	?	?	?	?
<i>G. vaginuloides</i>	Parque Saint Hilaire / PR	F1614	MZUSP PL 1009	?	?	?	?
<i>Geoplana</i> sp. nov. 1	P.N.S. da Bocaina / SP	F2807	MZUSP PL 1050	?	?	?	?
<i>Geoplana</i> sp. nov. 1	P.N.S. da Bocaina / SP	F2821	MZUSP PL 1052	?	?	?	?
<i>Geoplana</i> sp. nov. 2	P.E. Intervalles / SP	F2783	MZUSP PL 1048	?	?	?	?
<i>Geoplana</i> sp. nov. 2	P.E. Intervalles / SP	F3135	MZUSP PL 1065	?	?	?	-
<i>Geoplana</i> sp. nov. 3	?	F2796	?	?	?	-	?
<i>Geoplana</i> sp. nov. 4	P.N.S. da Bocaina / SP	F2031	MZUSP PL 1014	?	?	?	?
<i>Geoplana</i> sp. nov. 4	P.N.S. da Bocaina / SP	F2809	MZUSP PL 1051	?	?	?	?
<i>Geoplana</i> sp. nov. 5	P.E. do Desengano / RJ	F2189/ F2192	MZUSP PL 348	?	?	?	?
<i>Gusana</i> sp. nov. 1	Parque Hualpén / Chile	F4421	MZUSP PL 1088	?	?	?	?
<i>Gusana</i> sp. nov. 1	Parque Hualpén / Chile	F4428	MZUSP PL 1089	?	?	-	-
<i>Issoca jandaia</i> Froehlich, 1954	P.N.S. da Bocaina / SP	F2042	MZUSP PL 1015	?	?	-	?
<i>Issoca rezendei</i> Schirch, 1929	Parque da Previdência / SP	F1182	MZUSP PL 667	?	?	?	?
<i>Issoca rezendei</i>	Parque Saint Hilaire / PR	F1679	MZUSP PL 1010	?	?	?	?
<i>Issoca</i> sp. nov. 1	P.E. do Desengano / RJ	F2158	MZUSP PL 1020	?	?	?	?
<i>Issoca</i> sp. nov. 1	R. B. Augusto Ruschi / ES	F2507	MZUSP PL 1045	?	?	?	?
<i>Issoca</i> sp. nov. 1	P.E. do Desengano / RJ	F4085	MZUSP PL 1085	?	?	?	?
<i>Luteostriata abundans</i> Graff, 1899	Parobé / RS	F205	MZUSP PL 646	?	?	?	?
<i>L. abundans</i>	Parobé / RS	F238	MZUSP PL 648	?	?	?	?
<i>L. abundans</i>	São Leopoldo	?	?	?	?	?	?
<i>L.caissara</i> Froehlich, 1954	Cambury / SP	F1036	MZUSP PL 659	?	?	?	?
<i>L.caissara</i>	E. B. Boracéia / SP	F1078	MZUSP PL 663	?	?	?	?

Supplementary data Table 1. continued.

Species	Collecting locality	Molecular code	N. MZUSP ^a	18S rDNA	28S rDNA	EF-1α	COI
<i>L. ernesti</i> Leal-Zanchet & Froehlich, 2006	FLONA / RS	F3358	MZUSP PL	?	?	?	?
<i>L. ernesti</i>	Parque da Previdência / SP	F1192	1070 MZUSP PL	?	?	?	?
<i>L. ernesti</i>	São Paulo / SP	866	?	?	?	?	-
<i>L. ceciliae</i> Froehlich & Leal-Zanchet, 2003	FLONA / RS	F3452	MZUSP PL	?	?	?	?
<i>L. graffi</i> Leal-Zanchet & Froehlich, 2006	Taquara / RS	F384	1077 MZUSP PL	?	?	?	?
<i>L. graffi</i>	FLONA / RS	F3380/ F3381	652 MZUSP PL	?	?	?	?
<i>L. muelleri</i> Diesing, 1861	Florianópolis / SC	F440	1072 MZUSP PL	?	?	?	?
<i>L. muelleri</i>	Florianópolis / SC	F441/F442	654 MZUSP PL	?	?	?	?
<i>L. muelleri</i>	PE Tabuleiro / SC	F3268	655	?	?	-	?
<i>L. muelleri</i>	São Paulo / SP	F346	?	?	?	?	-
<i>Notogynaphallia albonigra</i> Riester, 1938	P.E. do Desengano / RJ	F4081	MZUSP PL	?	?	?	?
<i>N. guaiana</i> Leal-Zanchet & Carbayo, 2001	FLONA / RS	F432	1083 MZUSP PL	?	?	?	HQ542894
<i>N. guaiana</i>	FLONA / RS	F3361	653 MZUSP PL	?	?	-	HQ542896
<i>N. sexstriata</i> Graff, 1899	São Paulo / SP	F792	1071 MZUSP PL	?	?	?	?
<i>N. sexstriata</i>	P.N.S. do Itajaí / SC	F1413	656 MZUSP PL	?	?	?	?
<i>N. parca</i> Froehlich, 1954	P.E.S. da Cantareira / SP	F2972	680	?	?	-	?
<i>N. plumbea</i> Froehlich, 1956	P.E.S. da Cantareira / SP	F3072	MZUSP PL	?	?	?	?
<i>N. plumbea</i>	?	F3085	1060	?	?	-	-
<i>Pasipha chimbeva</i> Froehlich, 1954	P.N.S. da Bocaina / SP	F2813	MZUSP PL	?	?	?	?
<i>P. chimbeva</i>	P.E.S. da Cantareira / SP	F3010	403 MZUSP PL	?	?	?	?
<i>P. pasipha</i> Marcus, 1951	PE Alberto Löfgren/SP	F1841	476 MZUSP PL	?	?	?	?
<i>P. pasipha</i>	P.E.S. da Cantareira / SP	F2871	1012 MZUSP PL	?	?	?	?
<i>P. pinima</i> Froehlich, 1954	Parque Saint Hilaire / PR	F1714	1053 MZUSP PL	?	?	?	?
<i>P. pinima</i>	P.N.S. dos Órgãos / RJ	F2585	1011 MZUSP PL	?	?	?	?
<i>P. rosea</i> Froehlich, 1954	São Bernardo do Campo/SP	F1061	717 MZUSP PL	?	?	?	?
<i>Pasipha</i> sp.	P.N.S. dos Órgãos / RJ	F1138	660 MZUSP PL	?	?	?	?
<i>P. tapetilla</i> Marcus, 1951	São Paulo / SP	B	664 MZUSP PL	?	?	?	?
<i>P. tapetilla</i>	P.E.S. da Cantareira / SP	F2878	938 MZUSP PL	?	?	?	?
<i>P. trina</i> Marcus, 1951	Teresópolis/RJ	F1134	732	?	?	-	?
<i>P. trina</i>	P.N.S. dos Órgãos / RJ	F1239	MZUSP PL	?	?	-	?
<i>Pasipha</i> sp. nov. 1	?	F2839	669	?	?	-	?
<i>Polycladus</i> sp. nov. 1	Valdivia / Chile	F397	?	?	?	-	?
<i>Supramontana irritata</i> Carbayo & Leal-Zanchet, 2003	FLONA / RS	860	MZUSP PL	?	?	?	?
<i>S. irritata</i>	FLONA / RS	F3453	937 MZUSP PL	?	?	?	?
<i>Xerapoa hystrix</i> Froehlich, 1954	P.E.S. da Cantareira / SP	F2983	772	?	?	-	-
<i>X. hystrix</i>	P.E.S. da Cantareira / SP	F3057	MZUSP PL	?	?	?	-
Rhynchodeminae							
<i>Arthurdendyus triangulatus</i> Dendy, 1895	Australia	-	-	AF033044	DQ665953	?	DQ666027
<i>Artioposthia testacea</i> Hutton, 1880	Marlborough (Australia)	-	-	DQ666010 ^b	DQ665952 ^b	?	AF178305
<i>Australoplana</i> sp.	Australia	-	-	AF050434	DQ665955	?	DQ666028
<i>Dolichoplana striata</i> Moseley, 1877	Igrejinha / RS	F379	?	?	?	?	?

<i>Endeavouria</i>								
<i>septemlineata</i> Hyman,	Maquiné / RS	F192	?	?	?	?	?	?
1939								
<i>E. septemlineata</i>	P. Ecológico do Tietê	F988	?	?	?	?	?	?
	/ SP							

*Floresta Nacional de São Francisco de Paula

*Vouchers are deposited in the Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP)

^b this sequence has been completed and updated in GenBank

Supplementary data 1. Selected morphological characters

1. Ventral subepidermal longitudinal musculature modified in a cephalic retractor muscle, fibres of which are opened radially near the anterior tip of the body.
2. Transversal subneural parenchymal muscle layer throughout the body.
3. Regionalized prostatic vesicle.
4. Loss of penis papilla.
5. Ejaculatory duct connected to the male atrium through a cavity in the end of the penis papilla.
6. Large and muscular papilla.
7. Parenchymal longitudinal musculature.
8. Very muscular ejaculatory duct.
9. Prostatic vesicle channel shaped.
10. Nervous system constituted by two ventral nerve chords.
11. Narrow creeping sole.
12. Ovaries above the parenchymal subintestinal muscle layer.
13. Ovaries placed posteriorly.
14. Female channel back to forward, opening in the posterior region of the female atrium.
15. Head rolled backwards.
16. Lack of a sensory border in the anterior tip of the body.
17. Penis papilla crossed by an ejaculatory cavity (not a duct).
18. Stratified epithelium in the female atrium.
19. Intra-penial prostatic vesicle.
20. Bundles of mesenchymal longitudinal musculature surrounding the intestine.

Supplementary data Table 2. Morphological classification listed in previous studies.

Publication	Group	Species in the group
E.M. Froehlich, 1955	A	G. pasipha , G. penhana , G. pinima , G. plana , G. pulchella , G. rosea , G. velutina , G. astraea , G. chimbeva
	B	G. argus , G. braunsi , G. carinata , G. divae , G. duca , G. itatayana , G. ladislavii , G. notocelis , G. arpi , G. blaseri , G. fryi
	C	G. pseudovaginuloides , G. metzi , G. evelinae , G. yara , G. taxiarcha , G. ferrussaci , G. nigrofusca , G. dictyonota , G. tamola , G. regia , G. pavani , G. trigueira , G. livia , G. splendida , G. crioula
	D	G. vaginuloides , G. leucophyna , G. hina
	E	G. barreirana , G. cassula , G. zebroides
	F	G. modesta , G. parca , G. albonigra , G. sexstriata , G. trina
C.G. Froehlich, 1956	Natural group 1	G. matuta , G. tuxaua
	Natural group 2	G. multicolor , G. phocaica , G. preta , G. incognita , G. quagga
	No classification	G. caissara , G. marginata , G. tapetilla , G. pseudorhynchodemus , G. bergi
	C	Group C in E.M. Froehlich (1955) + G. joia , G. polyophthalina
	D	Group D in E.M. Froehlich (1955) + G. chita
C.G. Froehlich, 1967	F	Group F in E.M. Froehlich (1955) + G. mourei , G. plumbea
	G. applanata-group	G. apeva , G. applanata , G. argus , G. assu , G. aymara , G. bimbergi , G. braunsi , G. bresslaui , G. burmeisteri , G. carinata , G. carrierei , G. catharina , G. chulpa , G. dictyonota , G. fryi , G. divae , G. glieschi , G. itatayana , G. ladislavii , G. lareta , G. marmorata , G. mayori , G. rufiventris , G. tamboensis , G. alterfusca , G. beckeri , G. caucasiensis , G. evelinae , G. ferrussaci , G. fuhrmanni , G. fusca , G. hina , G. joia , G. livia , G. multipunctata , G. pavani , G. poca , G. polyophthalma , G. pseudovaginuloides , G. pulla , G. regia , G. riesteri , G. schubarti , G. shapra , G. tamola , G. taxiarcha , G. toriba , G. trigueira , G. vicuna , G. yara
	G. taxiarcha-group 1	G. caapora , G. chiuna , G. crawfordi , G. crioula , G. fragai , G. gaucha , G. goettei , G. incognita , G. phocaica , G. preta , G. saima , G. suva , G. vaginuloides
	G. taxiarcha-group 2	G. barreirana , G. zebroides , G. elegans
	G. barreirana-group	G. astraea , G. caeruleonigra , G. cofusa , G. chimbeva , G. hauseri , G. oliveroi , G. pasipha , G. penhana , G. pinima , G. plana , G. rosea , G. splendida , G. velutina , G. chilensis , G. aphalla
	G. pasipha-group	G. abundans , G. albonigra , G. fita , G. marginata , G. mülleri
	G. abundans-group	G. gigantea , G. chiriquii , G. idaia , G. montana , G. picadoi , G. sandersoni , G. vunguenteni , G. camelliae
	G. gigantea-group	

Bold names correspond to the taxa included in this study.

Supplementary data Table 2. continued.

Publication	Group	Species in the group
C.G. Froehlich, 1967	G. amagensis-group	G. amagensis, G. becki, G. bogotensis, G. buergeri, G. bussoni, G. contaminans, G. ortizi
	No classification	G. goetschi
Ogren & Kawakatsu, 1990	Genus Geoplana; subgenus Geoplana	G. alterfusa, G. apeva, G. appianata, G. argus, G. arpi, G. assu, G. aymara, G. beckeri, G. blumbergi, G. blaseri, G. braunsi, G. bresslaui, G. burnmeisteri, G. caopora, G. caleta, G. cantata, G. carinata, G. cartieri, G. catharina, G. caucauensis, G. corya, G. chalana, G. chancea, G. chiliua, G. chita, G. chiuna, G. chuipa, G. crowfordi, G. crioula, G. dictyonota, G. divae, G. duca, G. eudoxiae, G. eudoximariae, G. evelinae, G. ferrussachi, G. fragai, G. fryi, G. fuhrmanni, G. fusca, G. gabrieliae, G. gaucho, G. gileschi, G. goettei, G. guacensis, G. hina, G. incognita, G. irua, G. itatoyana, G. jandira, G. joia, G. ladislavii, G. lama, G. lanbaya, G. lareta, G. leucophryna, G. livia, G. marginata, G. hino, G. marmorata, G. mayori, G. metzi, G. mirim, G. mixopulla, G. multicolor, G. multipunctata, G. nigra, G. notocelis, G. notophthalma, G. povoni, G. phocolica, G. pichuna, G. picta, G. placilla, G. poca, G. polyophthalma, G. preta, G. pseudovaginuloides, G. quogga, G. querna, G. quichua, G. regia, G. riesteri, G. rufiventris, G. ruiva, G. saima, G. schubarti, G. shapra, G. suva, G. takia, G. talpa, G. tamboensis, G. tamola, G. tapira, G. taxiarcha, G. tirua, G. toriba, G. trigueira, G. ubaquiensis, G. vaginuloides, G. vicuna, G. yara
	Genus Geoplana; subgenus Barreirana	G. (B) barreirana, G. (B) zebroides, G. (B) elegans, G. (B) cofusa, G. (B) cassula
	Genus Gigantea	G. gigantea, G. chiriquii, G. idala, G. montana, G. picadoi, G. sandersoni, G. wongunteri, G. camelliae, G. bistrata, G. unicolor
	Genus Pasipha	P. astraea, P. biseminalis, P. caeruleonigra, P. chimbeva, P. hauseri, P. oliveroi, P. pasipha, P. penhana, P. plinia, P. plana, P. rosea, P. splendida, P. velutina, P. chilensis, P. aphello, P. diminutiva, P. ercilio, P. pulchella, P. tapetilla, P. trina, P. velina, P. weyrauchi
	Genus Notogynaphallia	N. abundans, N. albonigra, N. fita, N. marginata, N. muelleri, N. plumbea, N. andino, N. atra, N. bergi, N. calissara, N. froehlichiae, N. garua, N. goetschi, N. matuta, N. meixneri, N. modesta, N. mourei, N. nana, N. nataliae, N. octostriata, N. parca, N. quinterestrata, N. schultzei, N. sexlineata, N. sexstriata, N. tuxaua
	Genus Amaga	A. amagensis, A. becki, A. bogotensis, A. buergeri, A. bussoni, A. contaminans, A. libbieae, A. oliveceae, A. ortizi, A. rigili, A. ruca
	Genus Choeradoplana	C. iheringi, C. catua, C. marthae, C. langi, C. bilix, C. ehrenreichi
	Genus Geobia	G. subterranea
	Genus Issoca	I. rezendei, I. jandala, I. piranga, I. potyra, I. spatulata
	Genus Gusana	G. cruciata, G. lata, G. platei
	Genus Liana	L. guasa
	Genus Enterosyringa	E. pseudorynchodemus
	Genus Xerapoa	X. hystrix, X. una
	Genus Polycladus	P. gayi

Supplementary data Table 2. continued.

Publication	Group	Species in the group
Froehlich & Leal-Zanchet, 2003	Genus <i>Pseudogeoaplana</i>	<i>P. albopunctata</i> , <i>P. andicola</i> , <i>P. atropurpurea</i> , <i>P. bilinearis</i> , <i>P. bilineata</i> , <i>O. blanchardi</i> , <i>P. bohlsi</i> , <i>P. bonita</i> , <i>P. brasiliensis</i> , <i>P. brittlebanki</i> , <i>P. burri</i> , <i>P. cardosi</i> , <i>P. collini</i> , <i>P. Columbiana</i> , <i>P. distinct</i> , <i>P. doederleini</i> , <i>P. ehlersi</i> , <i>P. elongate</i> , <i>P. eugeniae</i> , <i>P. flava</i> , <i>P. goeldii</i> , <i>P. gollmeri</i> , <i>P. gonzalezi</i> , <i>P. halbani</i> , <i>P. lumbricoides</i> , <i>P. maculate</i> , <i>P. maximiliani</i> , <i>P. meyerhansii</i> , <i>P. nephels</i> , <i>P. nigrocephala</i> , <i>P. nigrofusca</i> , <i>P. nobilis</i> , <i>P. obscura</i> , <i>P. octolineata</i> , <i>P. oerstedii</i> , <i>P. pallid</i> , <i>P. panamensis</i> , <i>P. pardalina</i> , <i>P. pavonina</i> , <i>P. perspicillata</i> , <i>P. pulla</i> , <i>P. reticulata</i> , <i>P.riedeli</i> , <i>P. rosenbergi</i> , <i>P. rostrata</i> , <i>P. sagittata</i> , <i>P. schirchi</i> , <i>P. semilineata</i> , <i>P. stoll</i> , <i>P. taenioides</i> , <i>P. theresopolitana</i> , <i>P. tricolor</i> , <i>P. tristriata</i> , <i>P. ucayalensis</i> , <i>P. wetzel</i>
	Group 1	<i>N. plumbea</i> , <i>N. sexstriata</i> , <i>N. garua</i> , <i>N. albonigra</i> , <i>N. parca</i> , <i>N. mourei</i> , <i>N. froehlichae</i>
	Group 2	<i>N. ceciliae</i> , <i>G. marginata</i> Graff, 1899, <i>G. marginata</i> Marcus, 1951, <i>N. abundans</i> , <i>N. muelleri</i> , <i>N. caissara</i> , <i>N. fita</i> , <i>N. gualaiana</i>
	No classification	<i>N. nataliae</i> , <i>N. atra</i> , <i>N. andina</i> , <i>N. modesta</i> , <i>N. quinquestriata</i> , <i>N. goetschi</i> , <i>N. matuta</i> , <i>N. tuxaua</i>
	Group 2	<i>N. ernesti</i> , <i>N. graffi</i> , <i>N. gualaiana</i> , <i>N. muelleri</i> , <i>N. fita</i> , <i>N. caissara</i> , <i>N. ceciliae</i> , <i>N. abundans</i>
Leal-Zanchet & Froehlich, 2006 Lemos & Leal-Zanchet, 2008	Group 2	<i>N. ernesti</i> , <i>N. graffi</i> , <i>N. gualaiana</i> , <i>N. muelleri</i> , <i>N. fita</i> , <i>N. caissara</i> , <i>N. ceciliae</i> , <i>N. abundans</i> , <i>N. arturi</i> , <i>N. pseudoceciliae</i>

Supplementary Data Table3. Morphological classification listed in previous studies of some of the genera/species included in this study.

Molecular clade	Species	Publ. 1	Publ. 2	Publ. 3	Publ. 4	Publ. 5	Publ. 6	Publ. 7
<i>Geoplana sensu stricto</i>	<i>Geoplana chita</i>	-	D Group	-	<i>Geoplana</i>	-	-	-
	<i>Geoplana pulchella</i>	A Group	-	-	<i>Pasipha</i>	-	-	-
	<i>Geoplana vaginuloides</i>	D Group	D Group	<i>G. taxiarcha-group 2</i>	<i>Geoplana</i>	-	-	-
Applanata clade	<i>Geoplana carinata</i>	B Group	-	<i>G. applanata group</i>	<i>Geoplana</i>	-	-	-
	<i>Geoplana burmeisteri</i>	-	-	<i>G. applanata group</i>	<i>Geoplana</i>	-	-	-
	<i>Geoplana josefi</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Geoplana ladislavii</i>	B Group	-	<i>G. applanata group</i>	<i>Geoplana</i>	-	-	-
	<i>Geoplana marmorata</i>	-	-	<i>G. applanata group</i>	<i>Geoplana</i>	-	-	-
Capenia clade	<i>Geoplana crioula</i>	-	-	<i>G. taxiarcha-group 2</i>	<i>Geoplana</i>	-	-	-
	<i>Geoplana hina</i>	D Group	D Group	<i>G. taxiarcha-group 1</i>	<i>Geoplana</i>	-	-	-
	<i>Geoplana pseudovaginuloides</i>	C Group	C Group	<i>G. taxiarcha-group 1</i>	<i>Geoplana</i>	-	-	-
	<i>Geoplana tamola</i>	C Group	C Group	<i>G. taxiarcha-group 1</i>	<i>Geoplana</i>	-	-	-
	<i>Geoplana goetschi</i>	-	-	No classif.	<i>Notogynaphallia</i>	No classif.	-	-
Guaiana clade	<i>Notogynaphallia guaiana</i>	-	-	-	-	Group 2	Group 2	No classif.
	<i>Geoplana matuta</i>	Natural gr. 1	-	-	<i>Notogynaphallia</i>	No classif.	-	-
Gb clade	<i>Geoplana tuxaua</i>	Natural gr. 1	-	-	<i>Notogynaphallia</i>	No classif.	-	-
	<i>Geoplana phocaica</i>	Natural gr. 2	-	<i>G. taxiarcha-group 2</i>	<i>Geoplana</i>	-	-	-
Gc clade	<i>Geoplana quagga</i>	Natural gr. 2	-	-	<i>Geoplana</i>	-	-	-
	<i>Geoplana goetschi</i>	-	-	No classif.	<i>Notogynaphallia</i>	No classif.	-	-
Gd clade	<i>Geoplana franciscana</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Geoplana multicolor</i>	Natural gr. 2	-	<i>G. taxiarcha-group 2</i>	<i>Geoplana</i>	-	-	-
	<i>Geoplana rubidolineata</i>	-	-	-	-	-	-	-
N clade	<i>Notogynaphallia parca</i>	F Group	F Group	-	<i>Notogynaphallia</i>	Group 1	-	-

Publ. 1: E. M. Froehlich, 1955; Publ. 2: C. G. Froehlich, 1956; Publ. 3: C. G. Froehlich, 1967; Publ. 4: Ogren & Kawakatsu, 1990; Publ. 5: Froehlich & Leal-Zanchet, 2003; Publ. 6: Leal-Zanchet & Froehlich, 2006; Publ. 7: Carbayo, 2010

Supplementary Data Table 3. continued.

Molecular clade	Species	Publ. 1	Publ. 2	Publ. 3	Publ. 4	Publ. 5	Publ. 6	Publ. 7
<i>Geoplana sensu stricto</i>	<i>Notogynaphallia plumbea</i>	-	F Group	-	Notogynaphallia	Group 1	-	-
	<i>Notogynaphallia sexstriata</i>	F Group	-	-	Notogynaphallia	Group 1	-	-
	<i>Geoplana chita</i>	-	D Group	-	Geoplana	-	-	-
Applanata clade	<i>Geoplana pulchella</i>	A Group	-	-	Pasipha	-	-	-
	<i>Geoplana vaginuloides</i>	D Group	D Group	G. taxiarcha-group 2	Geoplana	-	-	-
	<i>Geoplana carinata</i>	B Group	-	G. applanata	Geoplana	-	-	-
	<i>Geoplana burmeisteri</i>	-	-	G. applanata group	Geoplana	-	-	-
	<i>Geoplana josefi</i>	-	-	-	-	-	-	-
Cappenia clade	<i>Geoplana ladislavii</i>	B Group	-	G. applanata group	Geoplana	-	-	-
	<i>Geoplana marmorata</i>	-	-	G. applanata group	Geoplana	-	-	-
	<i>Geoplana crioula</i>	-	-	G. taxiarcha-group 2	Geoplana	-	-	-
	<i>Geoplana hina</i>	D Group	D Group	G. taxiarcha-group 1	Geoplana	-	-	-
	<i>Geoplana pseudovaginuloides</i>	C Group	C Group	G. taxiarcha-group 1	Geoplana	-	-	-
Guaiana clade	<i>Geoplana tamaia</i>	C Group	C Group	G. taxiarcha-group 1	Geoplana	-	-	-
	<i>Geoplana goetschi</i>	-	-	No classif.	Notogynaphallia	No classif.	-	-
	<i>Notogynaphallia guaiana</i>	-	-	-	-	Group 2	Group 2	No classif.
Matuxia clade	<i>Geoplana matuta</i>	Natural gr. 1	-	-	Notogynaphallia	No classif.	-	-
	<i>Geoplana tuxaua</i>	Natural gr. 1	-	-	Notogynaphallia	No classif.	-	-
Gb clade	<i>Geoplana phocaica</i>	Natural gr. 2	-	G. taxiarcha-group 2	Geoplana	-	-	-
Gc clade	<i>Geoplana quagga</i>	Natural gr. 2	-	-	Geoplana	-	-	-
Gd clade	<i>Geoplana goetschi</i>	-	-	No classif.	Notogynaphallia	No classif.	-	-
	<i>Geoplana franciscana</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Geoplana multicolor</i>	Natural gr. 2	-	G. taxiarcha-group 2	Geoplana	-	-	-
	<i>Geoplana rubidolineata</i>	-	-	-	-	-	-	-

Publ. 1: E.M. Froehlich, 1955; Publ. 2: C.G. Froehlich, 1956; Publ. 3: C. G. Froehlich, 1967; Publ. 4: Ogren & Kawakatsu, 1990; Publ. 5: Froehlich & Leal-Zanchet, 2003; Publ. 6: Leal-Zanchet & Froehlich, 2006; Publ. 7: Carbayo, 2010

Supplementary Data Table 3. continued.

Molecular clade	Species	Publ. 1	Publ. 2	Publ. 3	Publ. 4	Publ. 5	Publ. 6	Publ. 7
N clade	<i>Notogynaphallia parca</i>	F Group	F Group	-	<i>Notogynaphallia</i>	Group 1	-	-
	<i>Notogynaphallia plumbea</i>	-	F Group	-	<i>Notogynaphallia</i>	Group 1	-	-
	<i>Notogynaphallia sexstriata</i>	F Group	-	-	<i>Notogynaphallia</i>	Group 1	-	-
	<i>Pasipha chimbeva</i>	A Group	-	G. pasipha-group	<i>Pasipha</i>	-	-	-
Pasipha clade	<i>Pasipha pasipha</i>	A Group	-	G. pasipha-group	<i>Pasipha</i>	-	-	-
	<i>Pasipha pinima</i>	A Group	-	G. pasipha-group	<i>Pasipha</i>	-	-	-
	<i>Pasipha rosea</i>	A Group	-	G. pasipha-group	<i>Pasipha</i>	-	-	-
	<i>Pasipha tapetilla</i>	No classif.	-	-	<i>Pasipha</i>	-	-	-
C clade	<i>Cephaloflexa bergi</i>	No classif.	No classif.	Isolated	<i>Notogynaphallia</i>	<i>Cephaloflexa</i>	-	-
	<i>Cephaloflexa araucariana</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Choeradoplana lheringi</i>	-	-	-	<i>Choeradoplana</i>	-	-	-
	<i>Notogynaphallia albonigra</i>	F Group	F Group	G. abundans-group	<i>Notogynaphallia</i>	Group 1	-	-
LIS clade	<i>Issoca jandaia</i>	-	-	-	<i>Issoca</i>	-	-	-
	<i>Issoca rezendei</i>	-	-	-	<i>Issoca</i>	-	-	-
	<i>Luteostriata abundans</i>	-	-	G. abundans-group	<i>Notogynaphallia</i>	Group 2	Group 2	<i>Luteostriata</i>
	<i>Luteostriata caissara</i>	No classif.	-	-	<i>Notogynaphallia</i>	Group 2	Group 2	<i>Luteostriata</i>
Luteostriata clade	<i>Luteostriata ernesti</i>	-	-	-	-	-	Group 2	<i>Luteostriata</i>
	<i>Luteostriata ceciliae</i>	-	-	-	-	-	Group 2	<i>Luteostriata</i>
	<i>Luteostriata groyfi</i>	-	-	-	-	-	Group 2	<i>Luteostriata</i>
	<i>Luteostriata muelleri</i>	-	-	G. abundans-group	<i>Notogynaphallia</i>	Group 2	Group 2	<i>Luteostriata</i>
PEX clade	<i>Supramontana irritata</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Enterosyringia pseudorhynchodemus</i>	No classif.	-	Isolated	<i>Enterosyringia</i>	-	-	-
	<i>Pasipha trina</i>	F Group	F Group	-	<i>Pasipha</i>	-	-	-
	<i>Xerapoa hystrix</i>	-	-	-	<i>Xerapoa</i>	-	-	-
Sister group of LIS clade	<i>Geobia subterranea</i>	-	-	-	<i>Geobia</i>	-	-	-

Publ. 1: E. M. Froehlich, 1955; Publ. 2: C. G. Froehlich, 1956; Publ. 3: C. G. Froehlich, 1967; Publ. 4: Ogren & Kawakatsu, 1990; Publ. 5: Froehlich & Leal-Zanchet, 2003; Publ. 6: Leal-Zanchet & Froehlich, 2006; Publ. 7: Carbayo, 2010

CAPÍTOL 3

Land planarians (Platyhelminthes) as a model organism for fine-scale phylogeographic studies: understanding patterns of biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot

Les planàries terrestres (Platyhelminthes) com a organisme model per a estudis detallats de filogeografia: patrons de biodiversitat al hotspot del Bosc Atlàntic de Brasil

Marta Álvarez-Presas, Fernando Carbayo, Julio Rozas i Marta Riutort

Journal of Evolutionary Biology 24 (4):887-896 (2011)

Resum

El Bosc Atlàntic brasiler és una de les regions més riques en biodiversitat del món i també una de les més amenaçades. L'origen d'aquesta biodiversitat és encara una pregunta sense resposta. Els models paleoclimàtics han predit dues regions d'estabilitat important en el nord i centre, mentre que les regions del sud podrien haver patit una forta inestabilitat durant les glaciacions del Plistocè. S'espera, doncs, una elevada diversitat genètica en organismes que han sobreviscut en zones estables (al nord i al centre), i signes de colls d'ampolla i expansió poblacional en organismes provinents de zones inestables (el sud). La filogeografia molecular i els estudis d'endemisme mostren, però, resultats contradictoris: encara que alguns resultats validen aquestes previsions altres indiquen que els models paleoclimàtics no són capaços de predir les zones estables de selva tropical al sud. La majoria dels estudis, però, han examinat espècies amb taxes de dispersió relativament alta. És possible que tàxons amb capacitats de dispersió més baixa siguin millors predictors de l'estabilitat de l'hàbitat. En aquest cas, hem utilitzat dues espècies de planàries terrestres com organismes model per analitzar els patrons i nivells de diversitat nucleotídica en una localitat del sud del Bosc Atlàntic (Serra da Bocaina (SB)). Aquesta petita unitat de conservació del Bosc Atlàntic està situada a l'estat de São Paulo, on els models paleoclimàtics pre-diuen la presència de bosc fa 6,000 anys però no fa 21,000 anys (per l'últim màxim glacial). Alguns treballs, però, mostren alts nivells d'endemisme i suggereixen estabilitat. En aquest estudi trobem que les dues espècies presenten alts nivells de variabilitat genètica, sense mostrar l'empremta molecular d'una colonització recent o d'expansió poblacional; dades que apunten a un escenari d'estabilitat a llarg termini. Els resultats reflecteixen, per tant, que els models paleoclimàtics fallen en la detecció de refugis al Sud del Bosc Atlàntic, i que organismes amb baixa capacitat de dispersió i una alta especialització en l'hàbitat que ocupen poden millorar la resolució d'aquests models.

Land planarians (Platyhelminthes) as a model organism for fine-scale phylogeographic studies: understanding patterns of biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot

M. ÁLVAREZ-PRESAS*†, F. CARBAYO‡, J. ROZAS*† & M. RIUTORT*†

*Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

†Institut de Recerca de la Biodiversitat, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

‡Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Keywords:

coalescent methods;
cytochrome oxidase I;
Geoplaninae;
internal transcribed spacer-1;
Mata Atlântica biodiversity;
molecular phylogeny;
neutrality tests;
Tricladida.

Abstract

The Brazilian Atlantic Forest is one of the richest biodiversity hotspots of the world. Paleoclimatic models have predicted two large stability regions in its northern and central parts, whereas southern regions might have suffered strong instability during Pleistocene glaciations. Molecular phylogeographic and endemism studies show, nevertheless, contradictory results: although some results validate these predictions, other data suggest that paleoclimatic models fail to predict stable rainforest areas in the south. Most studies, however, have surveyed species with relatively high dispersal rates whereas taxa with lower dispersion capabilities should be better predictors of habitat stability. Here, we have used two land planarian species as model organisms to analyse the patterns and levels of nucleotide diversity on a locality within the Southern Atlantic Forest. We find that both species harbour high levels of genetic variability without exhibiting the molecular footprint of recent colonization or population expansions, suggesting a long-term stability scenario. The results reflect, therefore, that paleoclimatic models may fail to detect refugia in the Southern Atlantic Forest, and that model organisms with low dispersal capability can improve the resolution of these models.

Introduction

The Brazilian Atlantic Forest (AF) is one of the richest and most threatened biodiversity hotspots of the world (Myers *et al.*, 2000), still harbouring more than 8000 endemic species (Tabarelli *et al.*, 2003). Currently, the remaining 10–16% of its original extent is fragmented in small isolated patches caused by human activities as agriculture and transport networks (Fonseca & Rodrigues, 2000).

Understanding the origin of this biodiversity is critical to address political issues about protection and management. The origin of current biodiversity at the AF is, however, highly controversial. Simpson (1979) proposed

that geographic and climatic modifications caused by Tertiary geological events might have promoted species diversification that, in turn, would explain the high levels of biodiversity of the Atlantic Forest. In a different view, Haffer (1969) stated that the origin of this biodiversity would be the Pleistocene glacial cycles promoting vicariance of populations by the regression, fragmentation and expansion of the forest and by sea level changes. Paleoclimatic models, applied to test this latter hypothesis, have predicted two large areas of stability throughout the Late Quaternary in the Central Atlantic Forest (CAF; region extending north of the Doce River, Fig. 1), whereas southern regions (SAF) would presumably have had a lack of refuges (Carnaval & Moritz, 2008). These two scenarios may leave distinctive molecular fingerprint in the genome of organisms; a slow change associated with geological processes would allow populations to remain historically stable and smoothly adapt to the new conditions, thus displaying high nucleotide diversity.

Correspondence: Marta Riutort, Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.
Tel.: (+34) 93 4035432; fax: (+34) 93 4034420;
e-mail: mriutort@ub.edu



Fig. 1 Distribution of the studied Atlantic Forest sampling localities. Parque Nacional da Serra da Bocaina (SB) (yellow diamond); Estação Biológica de Boraceia (BB) (green diamond); Parque Estadual de Intervalos (PI) (light blue diamond) and Parque Nacional de Saint-Hilaire/Lange (SL) (dark blue diamond). CAF, Central Atlantic Forest area; SAF, South Atlantic Forest.

Alternatively, a rapid change associated with recent Pleistocene ice advances and retreats would lead to the characteristic footprint of recent bottlenecks or founder events and lower nucleotide diversity. Stability areas predicted by paleoclimatic models, with the subsequent differences in genome patterns, might explain the high species richness (Colinvaux *et al.*, 2000; Ridgely & Tudor, 1996; Bates *et al.*, 1998; Cabanne *et al.*, 2008) as well as the high levels of nucleotide diversity found in some taxa in the CAF and the signs of population expansion in SAF (Pellegrino *et al.*, 2005; Graziotin *et al.*, 2006; Cabanne *et al.*, 2008; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Carnaval *et al.*, 2009).

Nucleotide diversity patterns observed in some of these studies, however, suggest that paleoclimatic models fail to predict stable rainforest areas in the SAF. Cabanne *et al.* (2008), for instance, studied different subspecies of the bird *Xiphorhynchus fuscus* and detected some endemic lineages in the SAF that could be better explained if forested areas have persisted in that region. Carnaval *et al.* (2009) analysing three *Hyla* species, predicted a species-specific stable region for *H. faber* in the São Paulo area (situated within SAF) not found in the other two species. Moreover, other studies (Costa *et al.*, 2000; da Silva *et al.*, 2004; Pinto-Da-Rocha *et al.*, 2005) found centers of endemism in São Paulo (and southern regions) that could be explained by the geological history of the Serra do Mar and Serra da Mantiqueira prior to the Pleistocene glaciations. Moreover, some studies dating diversification processes in the SAF region have also

revealed older lineages (Prepleistocenic) than predicted by paleomodelling (Fitzpatrick *et al.*, 2009; Graziotin *et al.*, 2006); these studies, nevertheless, also found the genetic signature of recent Pleistocene events. As it has been repeatedly proposed, the current data suggest that the processes generating the Atlantic Forest diversity are complex.

Here we have focused the analysis on a small SAF region situated around the border between SP and RJ states (SP-RJ region, Fig. 1). The paleoclimatic model of Carnaval & Moritz (2008) predicts that it had been covered by patches of forest 6000 years ago, but with no-forest at all 21 000 years ago (see Fig. 4 in Carnaval & Moritz, 2008). Moreover, some studies (as those referred above, Cabanne *et al.*, 2008; Carnaval *et al.*, 2009; Graziotin *et al.*, 2006) also show that this SAF region has been stable, or harbours a high number of endemic lineages. These conflicting results might reflect the difficulty of detecting refugia in this area, perhaps because SAF refugia were smaller than those in northern regions. Indeed, many of the studies surveying the AF region suffer from important limitations, such as a low spatial resolution of the predictions for studied species (e.g. vertebrates) with great dispersal capacity (Carnaval & Moritz, 2008). Specialized and low-dispersal taxa likely would be better models for phylogeographic studies, as their distribution and richness are highly influenced by the historical habitat stability (Cruzan & Templeton, 2000; Hewitt, 2004a,b; Graham *et al.*, 2006; Garrick *et al.*,

2004; Sunnucks *et al.*, 2006). In this context, land planarians (Phylum Platyhelminthes) have adequate biological features as important physiological limitations (reduced retention capacity of body fluids and a high sensitivity to sunlight and heat) that limit their natural dispersal ability and, in consequence, they are likely to prevent the movement of planarians across forest fragments. Actually, they have been shown to be suitable to detect variability at low scale in a study on a system of montane forest in Australia (Sunnucks *et al.*, 2006).

We have applied the state-of-the-art population genetics and phylogeographic tools on two terrestrial planarian species to study a locality within the SAF region, the Serra da Bocaina National Park (SB), to understand the relative role of Pleistocene glaciations and geological events in shaping current patterns of genetic variability. If the SB habitat had been historically stable during long periods, even presenting relatively small fragments of forest, we should observe a pattern and level of nucleotide diversity different than that expected in areas shaped by recent glaciations, namely (i) a high intrapopulation genetic variability but lower than that expected between populations, (ii) no genetic evidence for bottlenecks or population expansions. Moreover and importantly, this pattern should be shared by the two studied species.

Materials and methods

Study site and fieldwork

We conducted the study in the SB Park, a 104 000 hectares protected area mainly covered with Atlantic Forest. The altitudes of the park range from sea level to 2132 m (Behling *et al.*, 2007). Three more southerly parks [Estação Biológica de Boraceia (BB), Parque Estadual de Intervales (PI) and Parque Nacional de Saint-Hilaire/Lange (SL)] within and outside the Serra do Mar corridor were also sampled to be used for the interpopulation analyses (Fig. 1; Table S1).

We have studied two terrestrial planarian species *Cephaloflexa bergi* (Riester, 1938) and *Geoplana goetschi* sensu Marcus (1951). They were chosen because of their relatively high abundance and broad distribution across the south Atlantic Forest (see also Carbayo & Froehlich, 2008). We searched for animals under fallen logs and litter for 240 h during the day and directly on the ground during the night using led torches, as worms are active at night. A total of 143 specimens belonging to 27 species were found. Ten and 16 of the specimens are *Cephaloflexa bergi* (Riester, 1938) and *Geoplana goetschi* sensu Marcus (1951), respectively, both used in the phylogenetic and population genetics analyses. Specimens were taken within a distance less than four km from the main entrance to the park. Each animal was assigned a code and cut in two pieces. One part was fixed in formalin for histological analysis and the other in absolute ethanol

for DNA extraction. The animals were identified by examining their external aspect and internal anatomy on histological sections together with the analysis of the cytochrome oxidase I (COI) sequences.

Morphological analysis

For each animal, we described the external features. Then, we poured boiling water on them to avoid them curling when fixing with 10% formalin, subsequently were stored in 80% ethanol. From ten specimens of each species, we embedded tissue blocks of the cephalic region, the pharynx or the copulatory organs in Paraplast, sectioned them at 7 μ m, and stained with Mallory/Cason trichrome stain (Romeis, 1989). As the copulatory apparatus is the main structure for unequivocal identification, we reconstructed the copulatory apparatuses with a camera lucida attached to a light microscope.

DNA extraction and sequencing

We analysed both the mitochondrial COI gene and the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS-1). DNA was isolated from the specimens preserved in 100% ethanol using the Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). We amplified a ~1 kb fragment covering part of the COI gene by polymerase chain reaction (PCR), using the following primers: BarT (ATGACDGCSCATGGTTTAATAATGAT; specifically designed for this study) and COIR [CCWGTYARMCCHC-CWAYAGTAAA (Lázaro *et al.*, 2009)]. To obtain DNA sequences we used the following internal primers: BarS (GTTATGCCTGTAATGATTG) and BBC (CCAAAAGAA-AAATCCTTNCC) specifically designed for this study, and COIF [CCNGGDTTGGDATDRTWTCWCA (Lázaro *et al.*, 2009)]. For the nuclear fragment ITS-1, we amplified ~500 bp using the primers ITS9F (GTAGGTGAACCTGCGGAAGG) and ITSr (TGCGITCAAATTGTCAATGATC) from Baguña *et al.* (1999). The same primers were used to obtain the sequences. The PCR amplification conditions for the COI region were: 30 cycles of 50 s at 94 °C, 45 s at 43 °C and 50 s at 68 °C, with an initial denaturation step of 2 min at 95 °C, and a final extension step of 4 min at 68 °C. The amplification reaction was performed in 25 μ L volume, using Go Taq[®] DNA polymerase (Promega) and the DNA template. Annealing temperature for ITS-1 was 45 °C, the rest of conditions were the same applied to COI. Amplification products were purified with the Illustra[™] GFX PCR DNA Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and directly sequenced using the PCR amplification primers or the internal ones. We determined the DNA sequence from both strands using Big-Dye (3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); the reaction products were separated on the ABI Prism 3730 automated sequencer (Unitat de Genòmica dels Serveis Científic-Tècnics de la UB).

Molecular datasets

COI and ITS-1 alignments were obtained using MAFFT version 6 (Katoh & Toh, 2008) with a final editing with Bioedit v. 7.0.9.0 software (Hall, 1999); for COI sequences, we used the translated amino acid sequences to guide the nucleotide alignment. We generated two COI datasets (of 822 bp each). COI-1 dataset includes all presumptive *G. goetschi* and *C. bergi* individuals (from the SB and the other three localities) together with sequences of closely related species and *Geoplana burmeisteri* and *Geoplana ladislavii* as outgroups (Table S1). COI-2 dataset includes only the sequences of *C. bergi* and *G. goetschi*. As the ITS-1 has length variability among species, caused by a high number of insertions and deletions, we performed independent alignments for each species and did not include an outgroup. Cb-ITS dataset contains *C. bergi* sequences (508 bp), and Gg-ITS dataset *G. goetschi* (428 bp).

Phylogenetic and population genetics analyses

We estimated the DNA sequence evolution model that best fits the data using jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008) and applying the Akaike Information Criterion (AIC) for all datasets. We estimated the phylogenetic relationships by Maximum Likelihood (ML) implemented in RAxML 7.0.0 software (Stamatakis, 2006), and Bayesian Inference (BI) using MrBayes v. 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), and applying the next more complex evolutionary model to the estimated with jModeltest present in the inference program. Bootstrap support (BS) values (Felsenstein, 1985) were obtained from 10 000 replicates in ML analyses. For the BI, we carried out 3 million generations using two independent runs. Markov chains were sampled at intervals of 100 generations to include 30 000 data points. The consensus tree was estimated after removing the first 500 saved trees as 'burn-in' (to avoid including samples before reaching stationarity), the 'burn-in' value was determined by inspection of the likelihood of the trees obtained in each generation. A 50% majority rule tree was obtained from the remaining data points. We estimated the Median Joining Networks (COI-2 dataset plus two outgroup species) to explore the haplotype relationships within and between populations in the two species using NETWORK 4.5.1.6 software (Bandelt *et al.*, 1999) with the default options. Haplotype networks for the SB population were constructed using the program TCS v1.21 (Clement *et al.*, 2000).

We used the program DnaSP v5.10 (Librado & Rozas, 2009) to conduct most of the population genetic analysis. The levels and patterns of nucleotide diversity were estimated by the haplotype (H_D) and nucleotide diversity (π); (Nei, 1987), whereas the levels of DNA divergence among populations from the same species by D_{xy} parameter (Nei, 1987). We carried out three different

approaches to determine if the pattern of polymorphism conforms to that expected under the neutral hypothesis. On the one hand, we applied three neutrality tests that use different pieces of information to try to detect the specific fingerprint of recent population expansions, heavy bottlenecks or other selective and demographic scenarios: Tajima's D (Tajima, 1989), Fu's F_s (Fu, 1997) and R_2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002) statistics. Their statistical significance was estimated by coalescent computer simulations (10 000 replicates). Secondly, we also searched for atypical patterns of variation along the DNA region by analysing the levels of polymorphism and divergence by the sliding window method (Rozas, 2009). We also estimated the levels of linkage disequilibrium (LD) to get insights on the genealogies pattern and shape, in particular to analyse a putative population structure. LD was computed between pairs of polymorphic sites by the correlation coefficient r^2 (Hill & Robertson, 1968), and their statistical significance by the χ^2 test. The global levels of LD were estimated by the Z_{ns} statistic (Kelly, 1997), being its statistical significance assessed by computer simulations (10 000 replicates) based on the coalescent process without recombination (Hudson, 1990). Lastly, we conducted a Monte Carlo coalescent simulation-based test to determine whether a structured genealogy with two sets of highly differentiated sequences (a deep genealogy) is compatible with that expected under the equilibrium neutral model, even in the absence of recombination (see Aguadé, 2001 for details). For this analysis, we examined if the number of substitutions (X) between the two deep genealogy lineages (descending from the root) are higher than that expected for a nonrecombining (such as the mtDNA) neutral region. The empirical distribution of X was generated by coalescent simulations (10 000 replicates) without recombination and conditioned on the observed levels of variation -Watterson θ -, sample size and the number of sequences in each subset. The statistical significance of the test was determined by comparing our observed X value with those of the empirical distribution (Rozas, 2009).

Results

Species identification

Cephaloflexa bergi (Riester, 1938). The mature worms are 5–7 cm in length. The body is subcylindrical, the anterior third narrowing very gradually. The cephalic region is rolled to the dorsal side, with a slightly concave ventral side. The ground colour of the dorsum varies from light brown to green olive; numerous dark-brown pigment spots spread onto the dorsum. Some worms have an additional irregular median line of the same colour at the level of the pharynx and the copulatory complex. The ventral side is ochre to light brown covered with brown spots visible to the naked eye. Internally, the cephalic

retractor muscle is lens-shaped in cross section; the pharynx is cylindrical; the copulatory complex (Fig. S1) is long, having an intrabulbar prostatic vesicle with the proximal quarter paired; a penial papilla is absent; the male and female atria are folded; the lining epithelium of the female atrium is ciliated.

Geoplana goetschi sensu Marcus (1951). The mature worms are up to 20 cm in length. The body is flattened, with parallel sides. The dorsal ground colour is dark green olive; a submaginal yellowish stripe contours the entire body. The ventral side is pale greyish. The eyes are located marginally. Additionally to the parenchymatic muscle layers common to virtually most Geoplaninae species (i.e. a dorsal diagonal with decussated fibres, a supra-intestinal transverse one, and a sub-intestinal transverse one), there is a tubular parenchymatic muscle layer of longitudinal fibres embracing the intestine. This muscle layer had been previously noted by E. M. Froehlich (pers. comm.) and reported (Carbayo, 2003; Froehlich & Leal-Zanchet, 2003). The pharynx is bell-shaped; the oesophagus long and strongly muscularized. The prostatic vesicle is extrabulbar and long, with the proximal third paired. The penial papilla is cylindrical, lined with a ciliated epithelium. The female atrium is a long and dilated cavity becoming narrower close to the gonopore, and with a length equal to three quarters of male atrium. A lacunar, pseudo-stratified, ciliated epithelium clothes throughout almost of the total length of the female atrium (Fig. S1).

The molecular phylogenetic analysis of COI-1 dataset (Fig. S2) clearly confirmed that all *G. goetschi*, as well as all *C. bergi*, individuals cluster together in monophyletic clades independently of any other species.

Phylogenetic relationships

We have analysed the COI DNA sequence variation in 38 individuals (COI-2 dataset) and in 36 individuals for ITS-1 (Cb-ITS and Gg-ITS datasets), and inferred their phylogenetic relationships. ITS-1 nucleotide variation within the species is much lower than that for COI

(Table 1; Fig. 2). Nonetheless, both markers uncover that the four populations are relatively well differentiated and show similar population clustering patterns in the two species.

COI phylogenetic trees inferred from the COI-2 dataset by ML (Fig. 2) and BI (not shown) have similar topologies, and are congruent with those obtained by the haplotype network (Fig. 3). The two methodologies show that the SB individuals in both species cluster together independently from the rest of populations, constituting a monophyletic group. Also in both species, COI data in the SB locality show two relatively high divergent clades, whereas all ITS-1 sequences are practically identical (in fact, there is nearly no nucleotide variability in this population, most variability is due to a few indels). The comparative phylogenetic analysis of two unlinked markers indicates, therefore, that the two deep mitochondrial clades of the SB population represent intraspecific genetic lineages.

Intraspecific DNA sequence variation

Table 1 summarizes the nucleotide variation for the COI-2, Cb-ITS and Gg-ITS datasets. The two species show high levels of nucleotide diversity in the SB population for COI, $\pi = 0.011$ and 0.017 for *C. bergi* and *G. goetschi*, respectively. The global levels of nucleotide diversity including the individuals from all four parks are much higher: $\pi = 0.057$ and 0.046 for *C. bergi* and *G. goetschi*, respectively. The levels of intrapopulation nucleotide diversity for ITS-1 are very low, precluding the use of this marker for the population genetic structure analyses.

Population structure in Serra da Bocaina using COI data

Despite the very high COI intraspecific nucleotide variability levels, the pattern of the Tajima's *D* neutrality test conforms to that expected by an equilibrium stationary population (Table 2). *Geoplana goetschi*, however, exhibits a positive Tajima's *D* value (1.689), and

Table 1 Summary of the nucleotide diversity estimates.

Locality	Species	<i>n</i>	No. of haplotypes	Haplotype diversity (<i>H_p</i>)	No. of polymorphic sites	Nucleotide diversity (π)
COI						
Parque Nacional da Serra da Bocaina (SB)	<i>Cephaloflexa bergi</i>	10	6	0.889	31	0.0109
All four localities (SB, BB, PI, SL)	<i>C. bergi</i>	16	11	0.950	123	0.0573
Parque Nacional da Serra da Bocaina (SB)	<i>Geoplana goetschi</i>	16	5	0.742	33	0.0170
All four localities (SB, BB, PI, SL)	<i>G. goetschi</i>	22	9	0.857	128	0.0463
ITS-1						
Parque Nacional da Serra da Bocaina (SB)	<i>C. bergi</i>	10	1	0	0	0
All four localities (SB, BB, PI, SL)	<i>C. bergi</i>	15	6	0.571	39	0.0431
Parque Nacional da Serra da Bocaina (SB)	<i>G. goetschi</i>	16	2	0.125	2	0.0008
All four localities (SB, BB, PI, SL)	<i>G. goetschi</i>	21	7	0.500	34	0.0157

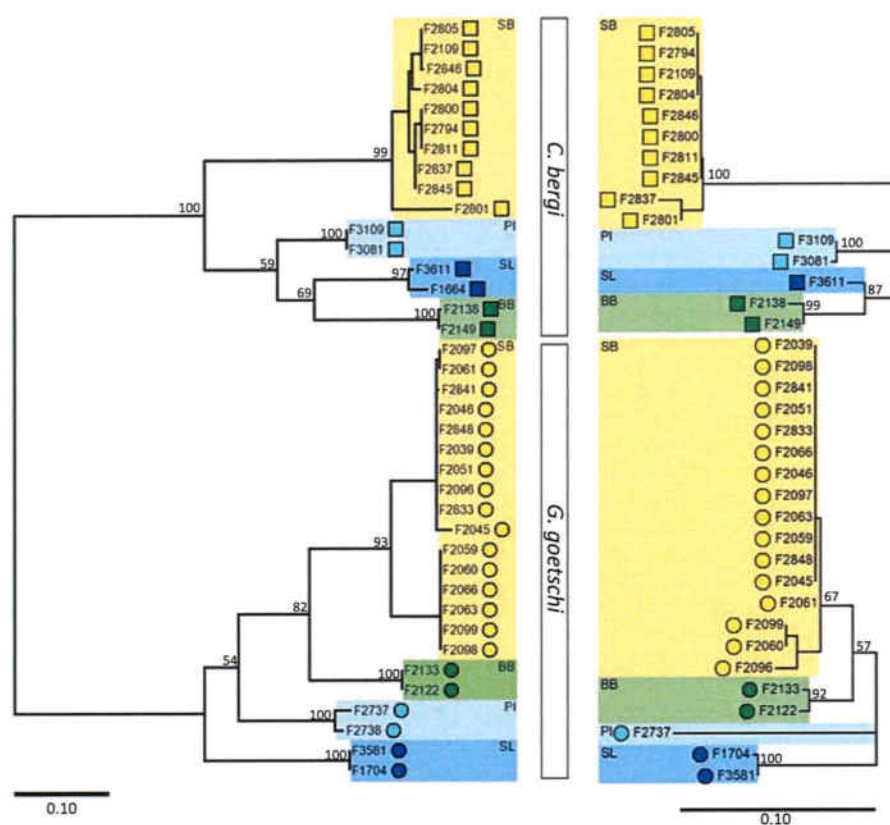


Fig. 2 Maximum likelihood trees (ML) inferred from the two genes. Left, COI-2 dataset, the tree has been rooted on the midpoint between the two species. Right-top, Cb-ITS dataset; Right-bottom, Gg-ITS dataset. Bootstrap values are shown only at nodes over population level.

although the value does not differ significantly from 0, it is very close to the critical point (right tail). This species also has a significant F_u 's F_s statistic (right tail). The R_2 -based neutrality test (Ramos-Onsins & Rozas, 2002) which is more powerful for small sample sizes, also yields a significant result (at the right tail). Although the F_s and R_2 parameters are not significant in *C. bergi*, they also lay at the right portion of the distribution. Therefore, there is no evidence that the SB population has been recently colonized or has suffered a population expansion. Indeed, in the latter case, the F_s and R_2 neutrality tests should exhibit statistics situated at the left tail of its distribution. Lastly, the polymorphism to divergence analyses using the sliding window approach (a useful approach for detecting some forms of selection acting along the DNA region) did not reveal any clear nonneutral signature (decoupling of polymorphism from divergence) in any of the two species (Fig. 4).

We also studied the intrapopulation linkage disequilibrium (LD) to analyse the pattern of the population genetic structure (Table 2). Although Z_{nS} values are high

(0.4811 and 0.6507 for *C. bergi* and *G. goetschi*, respectively), these values are significant only in *G. goetschi* (P -values obtained by coalescent simulations with no recombination). Moreover, *G. goetschi* has significant LD polymorphic site pairs even after applying the conservative Bonferroni correction (335 significant pairs out of 528). *C. bergi* has 210 significant pairs (out of 435), but none of them remains significant after applying the Bonferroni correction; nevertheless, the relation between the high number of pairs of polymorphic sites analysed (435) to the relative small sample size (10), precludes detecting any Bonferroni significant pair. These features, shown by the two species, indicate that the SB population has a clear molecular signature of population structure. These significant LD results are explained by the presence in both species of two very deep lineages, deeper than that expected for a nonrecombining region (Slatkin & Hudson, 1991). To assess if such deep genealogies are expected in a single panmictic population, we studied the distribution of the number of substitutions expected between the two most divergent lineages in a neutral genealogy (see Material and

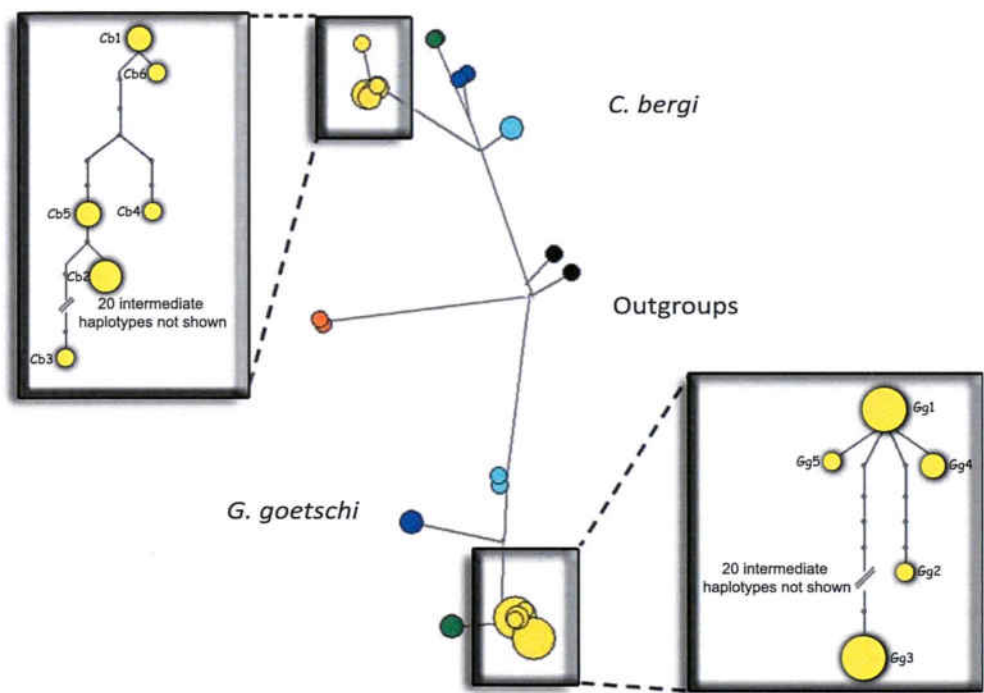


Fig. 3 Median joining network based on COI sequences. Code colour as in Figs1 and 2 for *Cephaloflexa bergi* and *Geoplana goetschi*, orange and black circles indicate that the species used as outgroups (*E. pseudorhynchodemus* and *C. iheringi*). Each circle represents an haplotype and the circle's area the haplotype's relative frequency. In the insets are displayed the haplotype networks for each particular species (left, *C. bergi*; right, *G. goetschi*) calculated with TCS software.

Table 2 Summary of the neutrality tests and LD values in the SB population.

Population	Neutrality test					Linkage disequilibrium			
	<i>n</i>	Tajima's <i>D</i>		Fu's <i>F</i> _S		Ramos-Onsins & Rozas <i>R</i> ₂		LD	
		<i>D</i>	95% CI	<i>F</i> _S	95% CI	<i>R</i> ₂	95% CI	<i>Z</i> _{TS}	95% CI
<i>Cephaloflexa bergi</i>	10	−0.9933	(−1.729, 1.655)	1.842	(−3.636, 4.782)	0.205	(0.104, 0.235)	0.4811	(0.145, 0.709)
<i>Geoplana goetschi</i>	16	1.6886	(−1.774, 1.692)	8.801**	(−4.519, 5.167)	0.204*	(0.087, 0.204)	0.6507*	(0.117, 0.589)

P* < 0.05, *P* < 0.01.

methods). This analysis was carried out separately for each species of the SB population. We found that the number of substitutions observed between the two most divergent lineages of *G. goetschi* (which generates two sets of 10 and 6 sequences) is under the neutral expectations (*P* = 0.213). The same happens for *C. bergi*: the genealogy exhibits two divergent lineages (of 1 and 9 sequences) which are also compatible with the neutral expectations (*P* = 0.171). Therefore, although the observed genetic structure is compatible with that expected of a nonrecombining region in a panmictic population, it might also reflect the presence of old lineages of a stable and structured population.

Discussion

Species identification

Cephaloflexa bergi is known to show several colour patterns; that of specimens from SB match the colour observed by Marcus (1951) for some of the specimens he sampled in São Paulo and surrounding areas. The internal morphology agrees with that described by Riester (1938), Marcus (1951) and Carbayo & Leal-Zanchet (2003). The identification of the second species deserves some major comments. The worms we identified as *Geoplana goetschi* are morphologically similar to

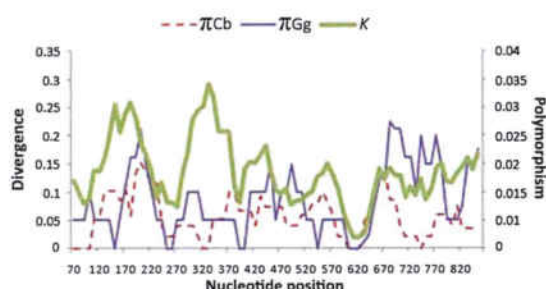


Fig. 4 Sliding window plot of the COI nucleotide diversity (B) within the SB population of *Cephaloflexa bergi* (red-dotted line) and *Geoplana goetschi* (purple), and nucleotide divergence (K) between *C. bergi* and *G. goetschi* (green, bold). Step size: 50 nucleotides; window size: 10 nucleotides.

those from São Paulo that Marcus (1951) studied and identified as *Geoplana goetschi* Riester, 1938. However, the morphology of Marcus's specimens is different in key diagnostic features from that of Riester's (1938). Unlike Marcus's specimens, Riester's specimens show a female atrium as long as the male one, or slightly longer; the pseudostratified epithelium of the female atrium occupies only the posterior half of it; and, more importantly, there is no parenchymatic tubular muscle layer of longitudinal fibres, as we have observed in specimens we have sampled. Furthermore, the reconstructed phylogenetic tree (Fig. S2) confirmed that all individuals of *G. goetschi* sensu Marcus (1951) used in our study form a different clade than that constituted by *G. goetschi* Riester, 1938. Thus molecular data confirmed the morphological results indicating that *G. goetschi* sensu Marcus (1951) is a different and undescribed species. Still, throughout the manuscript we denote *Geoplana goetschi* sensu Marcus (1951) as *Geoplana goetschi*.

Genetic variation in Serra da Bocaina

Our phylogenetic analyses show that all individuals of the SB population cluster together (Fig. 2). Nonetheless, current COI data reveals that both species have high levels of genetic variation in this locality (Table 1), clearly over the range observed in two Australian terrestrial flatworm species ($\pi = 0.0008\text{--}0.0073$; Sunnucks *et al.*, 2006). This population also shows neutrality test statistic values at the right tail of the distribution (some of them significant), and a good correlation between DNA polymorphism and divergence levels (Fig. 4). The results suggest, therefore, that the SB population has been historically stable, without any evidence for a recent population expansion.

There is, in addition, evidence of intrapopulation genetic structure in this sampling locality: the two species have two deep mtDNA lineages and that in turn generate high LD values. Despite the fact that this feature might

Table 3 COI sequence divergence between populations.

	SB	BB	PI	SL
SB		0.066	0.080	0.093
BB	0.101		0.077	0.094
PI	0.085	0.065		0.078
SL	0.095	0.065	0.060	

D_{xy} values among the four *Cephaloflexa bergi* (lower left) and *Geoplana goetschi* (upper right) populations.

indicate the co-existence of two reproductive isolated genetic groups (in each species) likely it is not the case. First, the deep lineages feature is not observed using information of the nuclear marker ITS-1; nevertheless, as mtDNA and nuclear markers differ on their mean coalescent times (four times lower for the mtDNA), these markers might uncover evolutionary histories at different times. Second, and more notably, our coalescent simulation analyses indicate that the genetic structure formed by the two deep lineages, although important, is compatible with the neutral equilibrium model, especially in the absence of recombination (such as for the mtDNA). Moreover, the values of the neutrality statistics tend to fall within the right part of the distribution; that is, a number of SNPs segregate at intermediate frequencies. Despite the fact that a number of evolutionary processes, such as balancing selection, population subdivision or population decline, might generate this pattern, it is compatible with a long-term habitat stability scenario, and actually is highly inconsistent with a recent population expansion or recolonization scenario. Remarkably, the two species share these features. It is important to note that the high levels of nucleotide variation observed within species do not correspond to any methodological species-identification problem.

Taken together, our results clearly suggest that the habitat of the SB population has been stable for a relatively long period of time. The observed population structure might be caused by some micro-spatial genetic structure or by an ancient population fragmentation with a subsequent admixture of the populations associated with ice advances and retreats during the Pleistocene. In the latter case, the ancient populations should be well differentiated. Results of the ITS-1 data, which do not show this intrapopulation structure, would not seem to support the admixture scenario. The ITS-1 results, however, are not completely conclusive as (i) this nuclear region harbours little nucleotide variation and (ii) the effective population size of nuclear regions is four times higher than that of the mitochondrial ones. Therefore it is possible that this admixture scenario really exists, and that it was only detected by the COI genetic data. Nonetheless, the interpopulation nucleotide divergence values (Table 3) of both species are much higher than within population estimates (Table 1; Fig. 2). All these features, intrapopulation nucleotide diversity values and

interpopulation coalescent times older than intrapopulation ones, are the genetic pattern expected for a low mobility species in a long-term stable habitat, and therefore with reduced gene flow among parks.

Origin and maintenance of the Atlantic Forest biodiversity

Our analyses of the patterns of genetic diversity do not support a recent colonization of the SB region, neither that they have suffered recent population growth. Taking all the results together, the patterns of genetic diversity found at the SB park fits well with that expected for a long-term stability region which, although reduced in area, would have maintained its functional ecological properties at least for small invertebrates. Indeed, the high levels of nucleotide variation and the strong genetic structure cannot easily be explained by recent climatic events, such as the last glacial periods (only tens of thousands years ago).

In conclusion, our analysis uncovers that paleoclimatic models are likely failing in the detection of refugia areas in SAF and that an invertebrate model organism as planarians, with low dispersal capability and high dependence on forest, can improve the resolution of these models. Further phylogeographic studies of land planarians would likely yield new and informative data on the origin and current maintenance status of the Atlantic Forest biodiversity. Undoubtedly, this information will be very useful to provide scientific-based guidelines for conservation-policy makers.

Acknowledgments

We thank the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) for sampling licence, Francisco Livino and co-workers for their kind help in logistic and field transportation in the SB Park. We also thank Júlio Pedroni, Débora Redivo, Cláudia Olivares, Marília Jucá and Welton Araújo for sampling help and Italo D'Elia, Ana Cavalcanti and Lígia Domingos for the histological work. This work was supported by Fundación BBVA grant BIOCON 06 – 112 to M.R. and Grup de Recerca Consolidat of the Generalitat de Catalunya: 2009SGR1462. We also thank two anonymous referees who helped to improve the original ms.

References

- Aguadé, M. 2001. Nucleotide sequence variation at two genes of the phenylpropanoid pathway, the FAH1 and F3H genes, in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Biol. Evol.* **18**: 1–9.
- Baguña, J., Carranza, S., Pala, M., Ribera, C., Giribet, G., Arnedo, M.A. et al. 1999. From morphology and karyology to molecules. New methods for taxonomical identification of asexual populations of freshwater planarians. A tribute to Professor Mario Benazzi. *Ital. J. Zool.* **66**: 207–214.
- Bandelt, H., Forster, P. & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 37–48.
- Bates, J.M., Hackett, S.J. & Cracraft, J. 1998. Area-relationships in the Neotropical lowlands: An hypothesis based on raw distributions of Passerine birds. *J. Biogeogr.* **25**: 783–793.
- Behling, H., Dupont, L., DeForest Safford, H. & Wefer, G. 2007. Late Quaternary vegetation and climate dynamics in the Serra da Bocaina, southeastern Brazil. *Quatern. Int.* **161**: 22–31.
- Cabanne, G.S., d'Horta, F.M., Sari, E.H.R., Santos, F.R. & Miyaki, C.Y. 2008. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Mol. Phylogenet. Evol.* **49**: 760–773.
- Carbayo, F. 2003. *Revisión de Notogynaphallia* (Ogren & Kawakatsu, 1990). PhD thesis. Universidad de Salamanca. Departamento de Biología Animal. Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola.
- Carbayo, F. & Froehlich, E.M. 2008. Estado do conhecimento dos macroturbelários (Platyhelminthes) do Brasil. *Biota Neotrop.* **8**: 177–197.
- Carbayo, F. & Leal-Zanchet, A.M. 2003. Two new genera of geoplaninid land planarians (Platyhelminthes: Tricladida: Terricola) of Brazil in the light of cephalic specialisations. *Invert. Syst.* **17**: 449–468.
- Carnaval, A.C. & Moritz, C. 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *J. Biogeogr.* **35**: 1187–1201.
- Carnaval, A.C., Hickerson, M.J., Haddad, C.F.B., Rodrigues, M.T. & Moritz, C. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* **323**: 785–789.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* **9**: 1657–1659.
- Colinvaux, P.A., De Oliveira, P.E. & Bush, M.B. 2000. Amazonian and neotropical plant communities on glacial time-scales: the failure of the aridity and refuge hypotheses. *Quatern. Sci. Rev.* **19**: 141–169.
- Costa, L.P., Leite, Y.L.R., Da Fonseca, G.A.B. & Da Fonseca, M.T. 2000. Biogeography of South American forest mammals: endemism and diversity in the Atlantic Forest. *Biotropica* **32**: 872–881.
- Cruzan, M.B. & Templeton, A.R. 2000. Paleocology and coalescence: phylogeographic analysis of hypotheses from the fossil record. *Trends Ecol. Evol.* **15**: 491–496.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783–791.
- Fitzpatrick, S.W., Brasileiro, C.A., Haddad, C.F.B. & Zamudio, K.R. 2009. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Mol. Ecol.* **18**: 2877–2896.
- Fonseca, R.C.B. & Rodrigues, R.R. 2000. Análise estrutural e aspectos do mosaico sucessional de uma floresta semidecídua em Botucatu, SP. *Scientia Forestalis* **57**: 27–43.
- Froehlich, E.M. & Leal-Zanchet, A.M. 2003. A new species of terrestrial planarian of the genus *Notogynaphallia* Ogren & Kawakatsu, 1990 (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola) from South Brazil and some comments on the genus. *Rev. Bras. Zool.* **20**: 745–753.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**: 915–925.

- Garrick, R.C., Sands, C.J., Rowell, D.M., Tait, N.N., Greenslade, P. & Sunnucks, P. 2004. Phylogeography recapitulates topography: very fine-scale local endemism of a saproxylic 'giant' springtail at tallaganda in the great dividing range of South-East Australia. *Mol. Ecol.* **13**: 3329–3344.
- Graham, C.H., Moritz, C. & Williams, S.E. 2006. Habitat history improves prediction of biodiversity in rainforest fauna. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 632–636.
- Grazziotin, F.G., Monzel, M., Echeverrigaray, S. & Bonatto, S.L. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Mol. Ecol.* **15**: 3969–3982.
- Haffer, J. 1969. Speciation in amazonian forest birds. *Science* **165**: 131–137.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**: 95–98.
- Hewitt, G.M. 2004a. A climate for colonization. *Heredity* **92**: 1–2.
- Hewitt, G.M. 2004b. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* **359**: 183–195.
- Hill, W.G. & Robertson, A. 1968. Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor. Appl. Genet.* **38**: 226–231.
- Hudson, R.R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. *Oxf. Surv. Evol. Biol.* **7**: 1–44.
- Katoh, K. & Toh, H. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief Bioinform* **9**: 286–298.
- Kelly, J.K. 1997. A test of neutrality based on interlocus associations. *Genetics* **146**: 1197–1206.
- Lázaro, E.M., Sluys, R., Pala, M., Stocchino, G.A., Baguña, J. & Riutort, M. 2009. Molecular barcoding and phylogeography of sexual and asexual freshwater planarians of the genus *Dugesia* in the Western Mediterranean (Platyhelminthes, Tricladida, Dugesidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **52**: 835–845.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451–1452.
- Marcus, E. 1951. Turbellaria Brasileiros (9). *Bol. Fac. Fil. Ci. Letr. U. Sao Paulo Zool.* **16**: 1–217.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**: 853–858.
- Nei, M. (ed.) 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Pellegrino, K.C.M., Rodrigues, M.T., Waite, A.N., Morando, M., Yassuda, Y.Y. & Sites, J.W. Jr 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biol. J. Linn. Soc.* **85**: 13–26.
- Pinto-Da-Rocha, R., Da Silva, M.B. & Bragagnolo, C. 2005. Faunistic similarity and historic biogeography of the harvestmen of southern and southeastern Atlantic rain forest of Brazil. *J. Arachnol.* **33**: 290–299.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* **25**: 1253–1256.
- Ramos-Onsins, S.E. & Rozas, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 2092–2100.
- Ridgely, R.S. & Tudor, G. 1996. *The Birds of South America: The Suboscine Passerines*. University of Texas Press, Austin.
- Riester, A. 1938. Beitrage zur Geoplaniden-Fauna Brasiliens. *Abh. Senckenberg Naturforsch. Ges.* **441**: 1–88.
- Romeis, B. 1989. *Mikroskopische Technik*. Urban und Schwarzenberg, München.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572–1574.
- Rozas, J. 2009. DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP. In: *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis; Methods in Molecular Biology Series Vol. 537* (D. Posada, ed.), pp. 337–350. Humana Press, NJ, USA.
- da Silva, J.M.C., de Sousa, M.C. & Castelletti, C.H.M. 2004. Areas of endemism for passerine birds in the Atlantic forest, South America. *Glob. Ecol. Biogeogr.* **13**: 85–92.
- Simpson, B. (ed.) 1979. *Quaternary biogeography of the high montane regions of South America*. Duellman WE, University of Kansas, Lawrence, Kansas.
- Slatkin, M. & Hudson, R.R. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* **129**: 555–562.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HP: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**: 2688–2690.
- Sunnucks, P., Blacket, M.J., Taylor, J.M., Sands, C.J., Ciavaglia, S.A., Garrick, R.C. et al. 2006. A tale of two flaties: different responses of two terrestrial flatworms to past environmental climatic fluctuations at Tallaganda in montane southeastern Australia. *Mol. Ecol.* **15**: 4513–4531.
- Tabarelli, M., Pinto, L.P., Silva, J.M.C. & Costa, C.M.R. 2003. The atlantic forest of brazil: endangered species and conservation planning. In: *The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Trends, and Outlook* (C.G.A.I.d.G. Câmara, ed.), pp. 86–94. Center for Applied Biodiversity Science and Island Press, Washington, DC.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**: 585–595.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1 A. *Cephalosflexa bergi*. Diagrammatic reconstruction of the copulatory apparatus in lateral view. B. *Geoplana goetschi* sensu Marcus (1951).

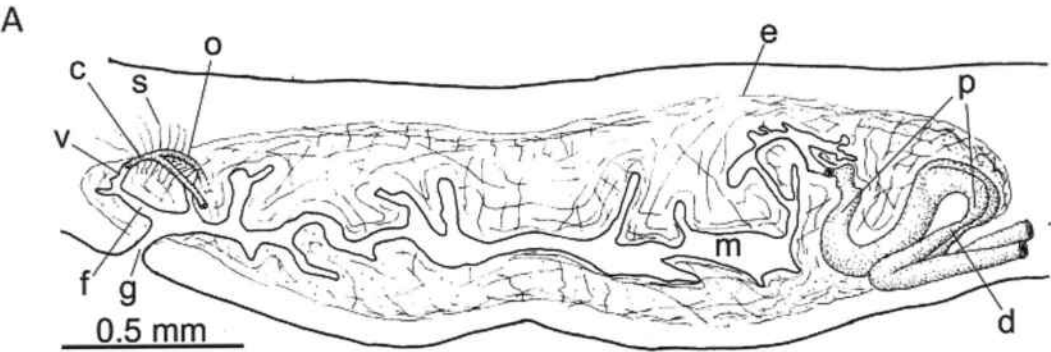
Figure S2 Maximum likelihood tree from COI-1 dataset.

Table S1 Sampling localities.

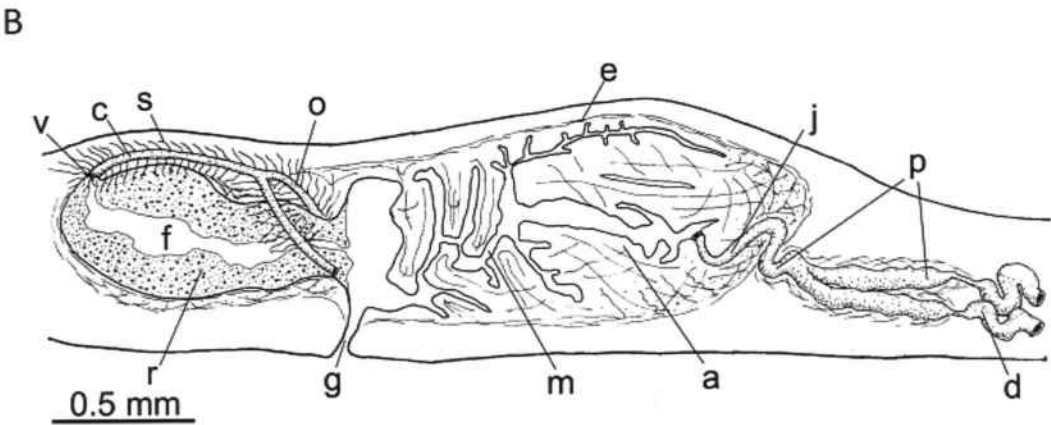
As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

Received 23 August 2010; revised 15 December 2010; accepted 20 December 2010

Supplementary Information



Cephaloflexa bergi (Riester, 1938). Specimen F2845



Geoplana goetschi sensu Marcus (1951). Specimen F2848

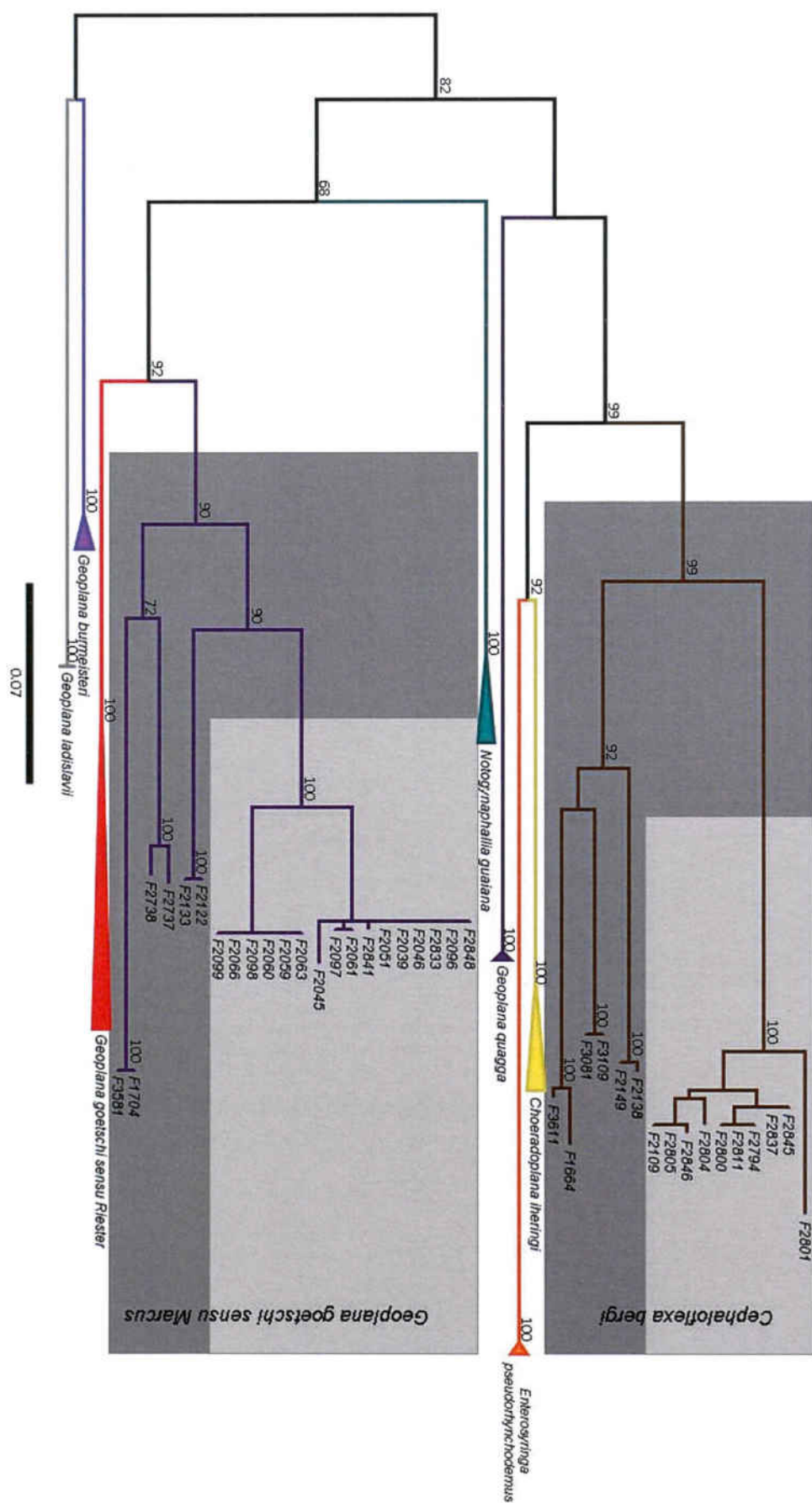


Table S1. continued

Species and Conservation Unit	Locality/ State	N. MZUSP ^a	Code	GenBank	Dataset
<i>Geoplanea goetschi</i> sensu Rießer (PO) Parque Nacional da Serra dos Órgãos (n=2)	São Paulo/ SP	MZUSP PL 733	F2886	HQ542887	COI-1
(PC) Parque Estadual da Serra da Cantareira (n=2)	Terresópolis/ RJ	MZUSP PL 366	F2616	HQ542886	COI-1
	São Paulo/ SP	MZUSP PL 883	F4336	HQ542893	COI-1
		MZUSP PL 420	F2927	HQ542888	COI-1
		MZUSP PL 773	F3707	HQ542892	COI-1
<i>Geoplanea ladislavii</i> (PT) Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (n=1)	Paulo Lopes/ SC	MZUSP PL 739	F3224	HQ542889	COI-1
		MZUSP PL 740	F3225	HQ542890	COI-1
<i>Geoplanea quagga</i> (PC) Parque Estadual da Serra da Cantareira (n=2)	PET- São Paulo/ SP	MZUSP PL 573	F1023	HQ542882	COI-1
	Instituto Butantan/ SP	MZUSP PL 581	F1188	HQ542883	COI-1
<i>Notogynophallia guaiana</i> (FN) Floresta Nacional de São Francisco de Paula (n=2)	São Francisco de Paula/ RS	MZUSP PL 653	F0432	HQ542894	COI-1
		MZUSP PL 1071	F3361	HQ542896	COI-1

^a Vouchers are deposited in the Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP)

CAPÍTOL 4

Molecular phylogeography of land planarians (Tricladida, Platyhelminthes): Insights into the origin of biodiversity patterns in the southern Brazilian Atlantic Forest hotspot

Filogeografia molecular de planàries terrestres (Tricladida, Platyhelminthes): estudi de l'origen dels patrons de biodiversitat al sud del hotspot del Bosc Atlàntic brasiler

Marta Álvarez-Presas, Alejandro Sánchez Gracia, Fernando Carbayo, Julio Rozas i Marta Riutort

(en preparació)

Resum

Des de fa dècades es qüestiona com s'ha originat i es manté la biodiversitat al Neotròpic, sent les hipòtesis més discutides aquelles que en responsabilitzen els refugis del Plistocè o els moviments tectònics del Terciari. El Bosc Atlàntic de Brasil (AF) és una de les regions més riques en biodiversitat, allotjant un gran nombre d'espècies endèmiques que mereixen una atenció especial, i alhora és una de les més malmeses per les activitats humanes. Recentment, s'hi ha introduït corredors biològics per protegir l'àrea i restaurar la funcionalitat dels ecosistemes. Alguns estudis filogeogràfics han predit un origen de la diversitat genètica a l'AF previ al Plistocè, durant el qual, els refugis glacials contribuirien en el seu manteniment. D'altra banda, les anàlisis de models paleoclimàtics prediuen dues regions estables en el AF central, mentre que les regions del sud podrien haver perdut el bosc durant les glaciacions, cosa que resultaria en un empobriment de la seva biota. No obstant això, alguns estudis de filogeografia molecular i els estudis d'endemismes indiquen que els models paleoclimàtics no són capaços de predir zones estables al sud. Per altra banda, la majoria dels estudis han utilitzat espècies amb taxes de dispersió elevades que, probablement, tenen una manca de resolució a una escala fina. Nosaltres hem demostrat en un treball anterior que la baixa capacitat de dispersió de les planàries terrestres les fa bons predictors de l'estabilitat de l'hàbitat, fins i tot per a les àrees petites. En el present treball hem analitzat els patrons i nivells de diversitat nucleotídica en 11 localitats (dins i fora del corredor de Serra do Mar, a l'AF) de l'espècie de planària terrestre *Cephaloflexa bergi*. Els resultats mostren un alt nivell de diversitat nucleotídica, poblacions estructurades genèticament i la marca molecular d'un procés d'aïllament per distància. Hem contrastat mitjançant anàlisis de ABC basats en models de coalescència diferents escenaris demogràfics per determinar els processos evolutius que han pogut intervenir en la formació d'aquests nivells i patrons de variabilitat genètica. Els nostres resultats recolzen l'existència de zones estables al sud de l'AF, més antigues que l'última glaciació, remarcant les limitacions dels models paleoclimàtics en estudis de biodiversitat i la necessitat d'estendre els corredors biològics més al sud de la seva extensió actual.

Molecular phylogeography of land planarians (Tricladida, Platyhelminthes): Insights into the origin of biodiversity patterns in the southern Brazilian Atlantic Forest hotspot

Marta Álvarez-Presas^{a1}, Alejandro Sánchez-Gracia^{a1}, Fernando Carbayo^b, Julio Rozas^a and Marta Riutort^a

^aDepartament de Genètica i Institut de Recerca de la Biodiversitat (IRBio), Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643 E-08028, Spain

^bEscola das Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo. Av. Arlindo Bettio, 1000 São Paulo, Brasil.

¹The first two authors have contributed equally to this work

Abstract

The origin and maintenance of extant biodiversity is a major and controversial topic in evolutionary biology. Moreover, the relative role of the Pleistocene refuges and the Tertiary tectonic movements in shaping biodiversity patterns has not been clearly established. The Atlantic Forest of Brazil, one of the richest biodiversity hotspots, is being severely damaged by human activities. To preserve this area and restore ecosystem functionality, a number of protected areas have been connected by biological corridors. To perform an efficient conservation policy decision on this matter, however, requires of a good knowledge of current biodiversity patterns and its evolutionary history. Here we conducted a comprehensive phylogeographic study in the Atlantic Forest with flatworms, organisms well suited for fine-scale biodiversity analyses, and using nuclear and mitochondrial DNA markers. We carried on the analyses under the ABC-coalescent framework and using published paleoclimate modeling data to evaluate competing evolutionary scenarios proposed to explain extant patterns of genetic diversity. We found that single population' harbors high levels of genetic diversity, sharing a very old common ancestor, clearly predating the Pleistocene. Remarkable, there is no molecular evidence for a recent colonization; on the contrary we detect a clear isolation-by-distance hallmark. Globally our results might be explained by recent secondary contacts over old patterns of genetic variation. Extant biodiversity patterns, therefore, have been shaped by the interaction of complex geological and evolutionary processes of which we begin to unveil its nature, and have relevance to inform future conservation policies. Our results, moreover, question the accuracy of paleoclimate modeling for small-scale predictions.

Keywords: Atlantic Forest, molecular phylogeography, biological corridors, abc-coalescent methods, refugia.

Introduction

The origin and maintenance of extant biodiversity is a central but controversial topic in evolutionary biology. For instance, an intense debate on the factors determining the high diversity of the Neotropics has been unfolded (cf. 1). The so-called refuge hypothesis (2) proposes that the recurrent aridity-humidity oscillations caused by the Pleistocene glaciations, would have led the alternation of vicariance and gene flow cycles, generating extant biodiversity levels. This hypothesis, however, has been dismissed by other paleoclimatic evidence and molecular dating results (cf. 3; 4). The alternative hypothesis proposes that the major diversification events occurred much earlier, during the Neogene, and would have been mainly promoted by geological reorganizations (tectonic or paleogeographical) (5). Moreover, it has been proposed that biotic factors

(soil adaptations, biotic interactions, dispersal ability, etc.) acting during the Quaternary and the Neogene (6), have also affected biodiversity assemblage. Yet, Rull (1) concludes that the origin of extant biodiversity would result of complex interactions among most of these processes, acting either at global or regional scales. Therefore, for a complete understanding of the origin and evolution of the biodiversity, is of outmost importance the knowledge not only of the particular geological and paleoclimatic history but also of the underlying evolutionary processes.

The Atlantic Forest of Brazil (AF) is one of the most important biodiversity hotspots (7) but, at the same time, one of the most threatened biomes on the planet, highly reduced (until 11-16% of its original coverage; 8) and seriously affected by habitat fragmentation. Current remaining biome fragments, however, harbor a considerable number of endemic species, which deserve special attention. Recently, a number of areas spread across the remaining forest fragments have been established as conservation

Corresponding author: Marta Riutort, E-mail: mriutort@ub.edu and Julio Rozas, E-mail: jroz@ub.edu, Departament de Genètica i Institut de Recerca de la Biodiversitat (IRBio), Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal, 643, E-08028, Barcelona, Spain.

units to preserve current biodiversity. The so-called biological corridors have also been introduced to connect the remaining forest fragments and, hence, to restore ecosystem functionality and promote gene flow among protected areas. An efficient and responsible conservation policy, however, requires the knowledge of current biodiversity patterns but, more importantly, a better understanding of its evolutionary history.

Recent studies surveying the AF region have applied a number of methods, including paleoclimate modeling (9; 10), phylogeographic analyses (11, 12, 13) and endemism distribution patterns (14), to infer the major processes responsible for the origin and maintenance of species' richness. Most surveys conclude that the origin of current genetic diversity predates the Pleistocene era dismissing, therefore, the refuge hypothesis as the major generator process; local refuges, yet, may have contributed to its maintenance. These studies, nevertheless, provide contradictory results on the particular influence of Pleistocene glacial cycles on extant patterns of genetic and species diversity. On the one hand, paleoclimate modeling and some genetic

studies uncovering the molecular fingerprint of recent recolonization at the southern AF (9; 10; 15; 16), support the presence of forest throughout the last glaciations in the North of the AF (NAF; Fig. 1; 17). On the other hand, endemism studies and other genetic analyses (12; 14; 18) support the hypothesis that the southern regions (SAF; Fig. 1) could also have kept diversity during the glaciations. The later findings would put into question the accuracy of paleoclimate modeling in detecting small patches covered by forest in the past. Furthermore, not all organisms have responded equally to the events that might shape extant biodiversity. Indeed, most of the previous studies have surveyed organisms with a high dispersal ability (basically vertebrates), which prevents to draw fine-scale predictions. Specialized and low dispersal organisms, on the contrary, can retain the genetic signature of past climate and geological events that might be lost in other taxa (19; 20; 21).

Here we conducted a comprehensive phylogeographic analysis to get insights into the processes shaping biodiversity in the AF using a terrestrial planarian species, *Cephaloflexa bergi*

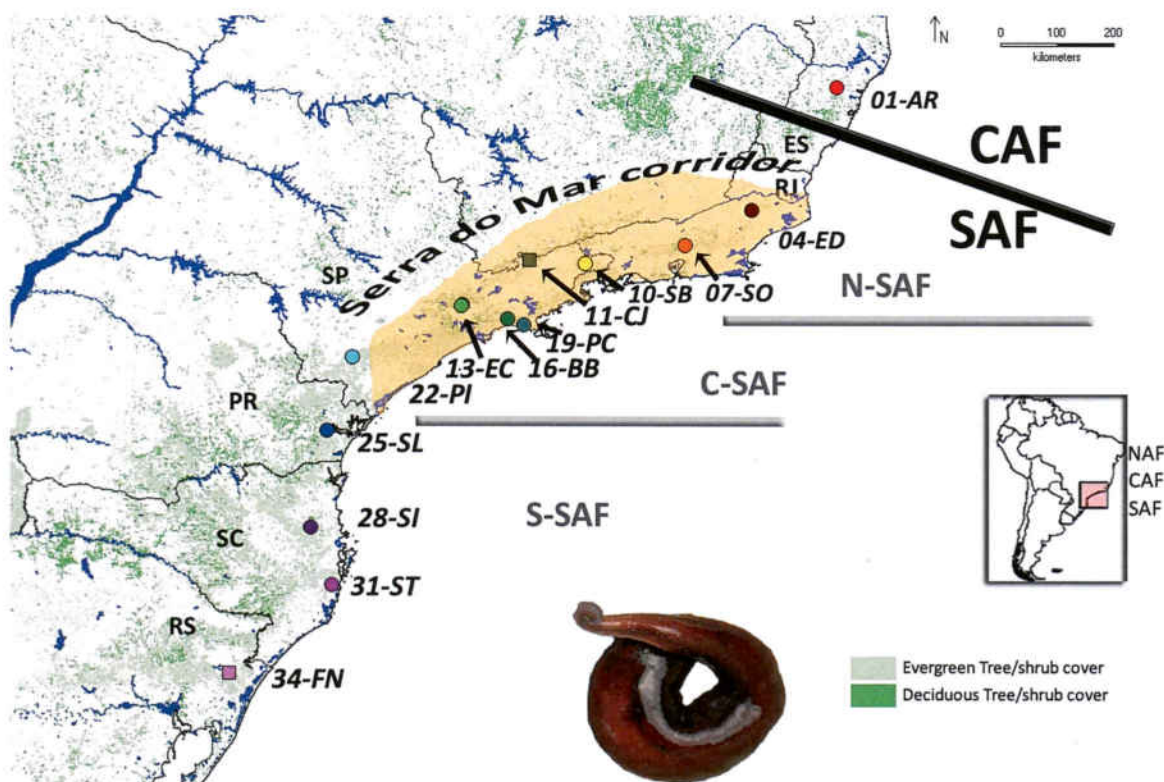


Fig. 1. Geographical location of the studied populations (see Table 1 for the precise sampling sites location). NAF, North Atlantic Forest; CAF, Central Atlantic Forest area; SAF, South Atlantic Forest (based on Cabanne et al. 2008); N-SAF, northern South Atlantic Forest; C-SAF, central South Atlantic Forest; S-SAF, southern South Atlantic Forest.

(Platyhelminthes, Tricladida, Geoplanidae). We showed that land planarians, a group with limited dispersal ability, are adequate organisms for fine-scale genetic studies at the AF (22). Since terrestrial flatworms are predators and also need a high degree of humidity to survive, most species depend entirely on the availability of well-preserved forests, making the flatworms highly susceptible to environmental changes. Their presence is an indication of the conservation of their habitat (23), the wet forest, becoming an ideal group for investigating historical biogeographical patterns of their community (Álvarez-Presas et al., submitted; Capítol 5). Moreover, *C. bergi*'s relative abundance, which allow us to perform a broad sampling (including many sampling points and several individuals per population), and its

high levels of genetic diversity (22), are fundamental to contrast competitive scenarios using rigorous statistical Bayesian coalescent methods (24).

Combining phylogenetic and statistical phylogeographic analyses and using paleoclimate modeling data we evaluate competing evolutionary scenarios proposed to explain extant patterns of genetic diversity. We focused the study in a single species, minimizing the problem that genetic differences among geographic regions could represent species-specific adaptations instead of reflecting the molecular fingerprint of past historical events. Our analysis allows us to determine whether nucleotide patterns of diversity predate Pleistocene glaciations, and get insights into the persistence of forest during that period. Particularly, we would

Table 1. Collecting localities and sample sizes.

Locality/Population	Sampling sites Coordinates		n (COI)	n (ITS-1) ^a	Forest 21 kya ^b	Forest 6 kya ^c	Current Forest region
	Longitude	Latitude					
Reserva Biológica Augusto Ruschi (01-AR)	-19.8781	-40.5385	10	7 (7)	YES	YES	CAF
	-19.9123	-40.5362	1	1 (0)	YES	YES	CAF
	-19.8875	40.5362	-	1 (1)	YES	YES	CAF
Parque Estadual do Desengano (04-ED)	-21.8768	-41.9228	9	1 (1)	YES	YES	N-SAF
	-21.8735	-41.9142	27	21 (20)	YES	YES	N-SAF
Parque Nacional da Serra dos Órgãos (07-SO)	-22.4558	-42.9963	44	13 (10)	YES	YES	N-SAF
Parque Nacional da Serra da Bocaina (10-SB)	-22.7474	-44.6181	6	6 (6)	YES	YES	N-SAF
	-22.7339	-44.6164	2	1 (1)	YES	YES	N-SAF
	?	?	2	2 (2)	YES	YES	N-SAF
Parque Estadual da Serra da Cantareira (13-EC)	-23.4300	-46.6333	1	10 (10)	YES	YES	C-SAF
	-23.4592	-46.6373	12	-	YES	YES	C-SAF
Estação Biológica de Boraceia (16-BB)	-23.6527	-45.8909	25	22 (22)	NO	YES	C-SAF
Praia de Cambury (19-PC)	-23.7520	-45.6310	20	11 (11)	NO	YES	C-SAF
Parque Estadual de Intervalos (22-PI)	-24.2749	-48.4162	22	14 (12)	NO	YES	C-SAF
Parque Nacional de Saint-Hilaire / Lange (25-SL)	-25.7614	-48.5933	1	-	NO	YES	S-SAF
	-25.7644	-48.6227	1	1 (0)	NO	YES	S-SAF
	-25.4622	-48.8201	1	-	NO	YES	S-SAF
	-25.4722	-48.8294	3	-	NO	YES	S-SAF
	-25.6911	-48.5905	1	1 (0)	NO	YES	S-SAF
	-25.7644	-48.6227	2	2 (2)	NO	YES	S-SAF
Parque Nacional da Serra de Itajaí (28-SI)	-27.0484	-49.0920	14	11 (11)	NO	YES	S-SAF
	-26.9606	-49.0676	1	-	NO	YES	S-SAF
Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (31-ST)	-27.9568	-48.7735	3	2 (2)	NO	YES	S-SAF
	-27.8417	-48.9254	5	3 (3)	NO	YES	S-SAF
Total			213	130 (121)			

^a Number of sequences used in the phylogenetic and in the population genetics (in parenthesis) analyses.
^b Predicted forest region 21 kya. ^c Predicted forest region 6 kya.

expect (i) significant genetic structure and high levels of genetic diversity within and among populations, in areas covered with forest throughout Pleistocene glaciations; (ii) signatures of population expansion and absence of genetic patterns of isolation-by-distance in areas depleted of forest during that glacial period. Moreover, if genetic variation has been mainly shaped by pre-Pleistocene events we may eventually determine the effect of ancient geological and evolutionary processes.

Our results do not support that the southernmost regions of the SAF have been recently colonized as expected for a region predicted to be uncovered of forest 21,000 years ago. Indeed, we detect high levels of genetic diversity, significant population structure—even within populations—and the isolation-by-distance hallmark. These features might be explained by the effect of recent secondary contacts over old patterns of genetic variation in geographic areas likely fragmented by recent climatic events. Extant patterns of diversity, therefore, are very ancient and have been shaped by the interaction of complex geological and evolutionary processes of which we begin to unveil its nature. These results have relevance to inform future conservation policies.

Results

Sampling and morphological identification. We found *C. bergi* in 11 of the 13 sampled localities (Table 1, Fig.1), being absent from 11-CJ and 34-FN. The species identity of the individuals have been checked morphologically, analyzing histological sections of the copulatory apparatus, and by inferring phylogenetic trees including other species to ensure the genetic monophyly of the individual group analyzed. We sequenced and compared the COI region in 213 individuals and the ITS-1 region in 130. GenBank accession numbers for COI and ITS-1 can be found in Table S1.

The superimposition of our sampling localities on the maps presenting the predicted distribution of forest 21,000 and 6,000 ya (9) shows that populations 01-AR to 13-EC are situated within areas covered by forest in the two periods (here called ancient forest), while the rest were only covered since the last 6,000

years (recent forest)(Fig.S1).

Phylogenetic relationships and interpopulation genetic variation. COI tree topologies inferred from both Maximum Likelihood and Bayesian Inference methods are similar (Fig. 2A and Fig. S2A), and define three well differentiated clusters clearly associated with population's geographical distribution: the N-SAF, C-SAF and S-SAF clades which mainly include northern, central and southern SAF populations, respectively (Table 1; Fig. 1). Two populations, however, have individuals in two of these clades (19-PC in the C-SAF and N-SAF clades, and 25-SL in the S-SAF and C-SAF). Nearly half of the populations are polyphyletic (19-PC, 25-SL, 28-SI and 31-ST); the rest are monophyletic but some also show a relatively high genetic structure (04-ED, 07-SO and 10-SB) (Fig. S2A). The 01-AR population (CAF area) also has two major groups of lineages, one basal to the rest of populations, while the other, with extremely long branches, is phylogenetically related to the N-SAF clade. Since long branches could result in artifactual clusterings, we reanalyzed the data after removing the fastest evolving sites (Fig. S3). The analyses show the 01-AR population monophyletic at different positions of the tree (relatively basal), while the rest of populations maintain their phylogenetic relationships (although less resolved). These results show that 01-AR long branches difficult a correct inference of its real position in the tree. Nuclear ITS-1 sequences display the same topology than the mitochondrial gene (Fig. 2B, Fig. S2B), reproducing the division in the three main clusters and the high within population structure.

Intrapopulation DNA sequence variation and neutrality tests. Table 2 and Table S2 show a summary of some genetic diversity and neutrality test analyses. Values of nucleotide diversity (π) are high for both nuclear and mitochondrial markers. The neutrality tests for COI (Tables 2A and S2A) at some populations (01-AR, 19-PC and 31-ST) have significantly positive Tajima's *D* values indicating, therefore, an excess of intermediate frequency variants. On the other hand we also find significantly negative *D* values in the 28-SI population, which suggest an excess of low

A

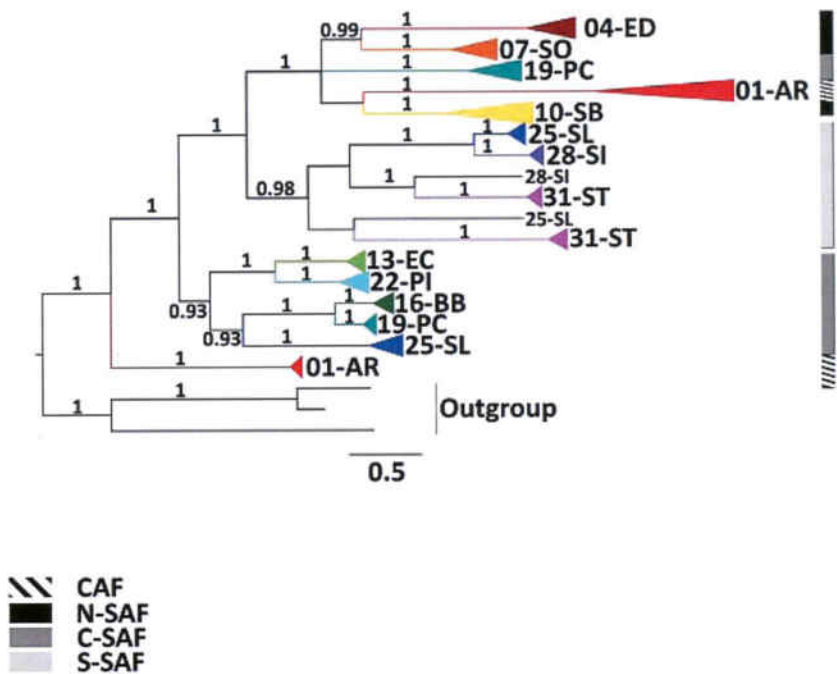
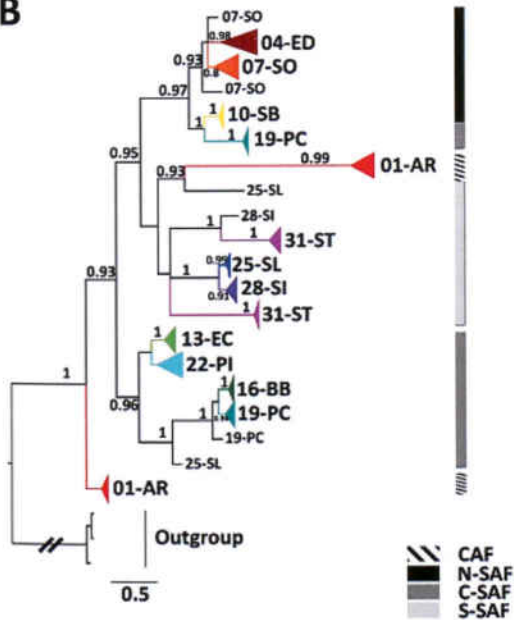
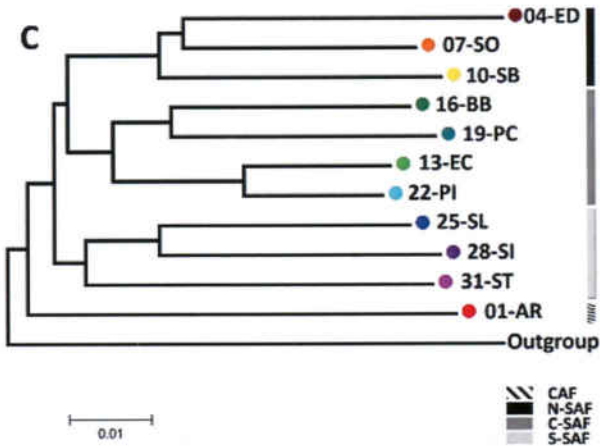


Fig. 2. (A) Bayesian Inference tree inferred from the COI (A) and ITS-1 (B) datasets. Values above the branches indicate the Posterior Probabilities. For the sake of clarity monophyletic groups constituted by individuals of the same population have been collapsed, the detailed tree is shown in Fig. S2. Scale bar represents the number of substitutions per site. (C) Neighbor-joining tree inferred from DXY values of the COI dataset and applying the Kimura-2-parameters correction.

B



C



frequency variants. Moreover, the COI pattern of nucleotide variation in some populations also shows significant departures from the neutral equilibrium applying Fu's F_s and Ramos-Onsins & Rozas R_2 test-

statistics. It is noteworthy that, in some cases, the direction of these departures is different among populations. Although there is not a general pattern, most significant values are found at the right tail of the empirical distribution of the statistics suggesting, therefore, evidence for some genetic structure. The same happens with the ITS-1 pattern of nucleotide variation across populations (Table 2B and Table S2B): not all populations depart from the neutral equilibrium, and the significant statistical values usually occur at the right tail. These results provide no evidence, therefore, of the molecular signature of a recent population expansion.

We also analyze the within-species genetic structure studying the distribution pattern of linkage disequilibrium (LD) applying the Z_{ns} and Wall's Q statistics (Table 2 and Table S2). For COI, these analyses also show high significant values in some populations (19-PC, 28-SI and 31-ST). These results are, in general, concordant with those obtained for the nuclear ITS-1 region (Table 2B and Table S2B), and with Fu's F_s and Ramos-Onsins & Rozas R_2 analyses indicating again the presence of genetically structured populations. The heterogeneity in the neutrality test results across sampled populations suggests a complex demographic scenario.

Interpopulation DNA divergence. To get insight into the pattern of genetic differentiation between populations we compared their pairwise genetic distances (Table S3). As anticipated by the inferred tree topology (Fig. 2A, B and Fig. S2) and the high nucleotide diversity values (Table 2), the D_{xy} and D_a estimates are quite high; for instance, D_{xy} reaches values of 0.10704 for COI and 0.15064 for ITS-1. The surveyed populations, moreover, are highly differentiated (Tables S4 and S5), which result on very low levels of gene flow ($Nm = 0.09$ and $Nm = 0.06$ for COI and ITS-1, respectively). The population relationships (Fig. 2C) also show that geographical close populations are genetically related, both for ITS-1 and for COI. And more importantly, we can clearly distinguish northern (N-SAF), central (C-SAF) and southern (S-SAF) geographical areas. Unlike the phylogenetic trees (Fig. 2A, B), the D_{xy} -based

dendrogram (Fig. 2C) displays a close relationship between N-SAF and C-SAF clades, although the internal branch connecting both groups is very short. This analysis, moreover, points out the 01-AR population (CAF) as basal to the other *C. bergii* populations.

We determined whether these interpopulation genetic differences also exhibit the molecular signature of an isolation-by-distance pattern. The analysis comparing geographical and genetic distances including all populations shows a positive and highly significant correlation (Table S6). Remarkably, the analyses conducted separately for ancient and recent forest populations also show positive correlations that are significant for recent forest populations and close to the critical value for ancient forest populations (Table S6).

ABC analyses: global analyses. We applied the ABC framework to investigate whether current range-wide scale distribution of nucleotide diversity might be explained by serial population founder events. We tested four putative demographic scenarios (Fig. S4). Although model 1, which assumes the northernmost population as the origin of genetic diversity, shows the highest posterior probability ($PP = 0.427$), none of the four evaluated scenarios fits significantly better the data than the other three (Table S7). Furthermore, estimates of the GLM for model 1 does not fit well the observed data (the fraction of retained simulations with a smaller or equal likelihood than the observed data under the GLM is very low, $f = 0.023$). These results indicate that the extant genetic diversity cannot be explained by the mere effect of successive founder events. Therefore we should consider more complex demographic scenarios to understand the relative importance of forces driving extant genetic distribution. Increasing the complexity of the model (i.e., increasing the number of parameters) makes the analysis computationally intensive and reduces the confidence of the parameter estimates. To avoid this problem, we modeled the history of each sampled population separately.

ABC analyses: within-population analyses. We evaluated three competing evolutionary scenarios

Table 2A. Summary of the COI nucleotide diversity estimates and neutrality tests

Locality	n	S	h	π	Tajima's <i>D</i>	Fu's <i>F_s</i>	<i>R_s</i>	<i>Z_{ns}</i>
01-AR	11	107	8	0.0650	1.464*	4.797*	0.245**	0.577
04-ED	36	12	7	0.0050	1.346	2.558	0.165	0.358
07-SO	44	20	15	0.0045	-0.758	-3.28	0.087	0.067
10-SB	10	31	6	0.0109	-0.993	1.842	0.205	0.481
13-EC	13	4	4	0.0019	0.792	0.514	0.191	0.425
16-BB	25	6	7	0.0011	-1.159	-3.176** ¹	0.082*	0.013
19-PC	20	81	13	0.0461	2.167**	3.964	0.228**	0.711**
22-PI	22	6	6	0.0016	-0.686	-1.367	0.103	0.166
25-SL	9	99	7	0.0530	0.549	3.536	0.27	0.476
28-SI	15	61	10	0.0115	-2.283** ¹	-0.157	0.232**	0.885**
31-ST	8	67	5	0.0457	2.464**	6.335**	0.279**	0.913**
All localities	213	226	88	0.0754	-	-	-	-

P* < 0.05 *P* < 0.01; ¹significant on the left tail

Table 2B. Summary of the ITS-1 nucleotide diversity estimates and neutrality tests

Locality	n	<i>S₁/S₂</i>	h	π	Tajima's <i>D</i>	Fu's <i>F_s</i>	<i>R_s</i>	<i>Z_{ns}</i>
01-AR	8	67/72	4	0.0436	-1.829*	6.094**	0.315**	0.927**
04-ED	21	8/26	8	0.0029	-1.587*	-4.204**	0.068**	0.120
07-SO	10	7/21	6	0.0048	-1.116	-2.082*	0.112**	0.188
10-SB	9	0/1	1	0	-	-	-	-
13-EC	10	3/3	2	0.0014	-1.562*	1.225	0.3	1**
16-BB	22	1/3	2	0.0002	-1.162	-0.957	0.208**	-
19-PC	11	59/64	5	0.0682	1.826*	9.334**	0.243**	0.850**
22-PI	12	12/21	6	0.0058	-1.865*	-0.849	0.156	0.306
25-SL	2	0/0	1	0	-	-	-	-
28-SI	11	35/40	2	0.0150	-2.181** ¹	9.321**	0.287**	1**
31-ST	5	61/63	4	0.0841	1.567*	3.843	0.283	0.945**
All localities	121	86/176	28	0.0673	-	-	-	-

S₁ = Complete deletion. *S₂* = Analysis using all positions. **P* < 0.05 ***P* < 0.01; ¹significant on the left tail

(Fig. 3). We found that in five populations (01-AR, 19-PC, 25-SL, 28-SI and 31-ST) our model choice procedure was able to significantly choose one of them (Table S8). From these populations only 19-PC is situated inside the Serra do Mar corridor, and only 01-AR was putatively covered by forest 21,000 years ago (according to paleoclimate models; 9). Noticeably, in all these five cases, the model that fits significantly better the data is the refugia (REF) model, a scenario where current variation might be explained by a secondary contact between populations exhibiting old divergent lineages. The 19-PC has a somewhat different pattern since the REF model has a high posterior probability (*PP* = 0.982), although does not explain well the empirical data (*f* = 0.026). Likely, a more complex model should be considered to explain the extant patterns of variation observed in this population. Remarkably, neither the bottleneck (BOT) nor the REF model can explain significantly better the data than the standard neutral model (SNM) in the other four populations (Table S8). In two cases (13-EC and 16-BB), however, the BOT model shows posterior probabilities over 0.60, which might indicate that these populations could have suffered changes in their population size.

It is important to note that the percentage of false positives of our model selection procedure is in all cases below the 5 %, which suggests that the procedure is accurate (Table S9). Moreover, we also investigated the stability of our results with regard to both the posterior probabilities computation method and the proportion of retained simulations (*Pa*). We found that repeating the model selection step under the GLM model using several *Pa* values or applying the method of Beaumont (25) we reached the same conclusions (results not shown).

In spite that we could be able to choose the best model, the prediction error plots for the PLS components indicate that the involved summary statistics do not provide enough information to estimate divergence time parameters. Bayesian analyses using BEAST (Fig. S5), nevertheless, reveal that the split between the main lineages of populations involved in the secondary contacts (between N-SAF, C-SAF and S-SAF; in populations 19-PC and 25-SL) are very old and coincident with the diversification of these three clades (aprox 8.5 and 7.5 Mya respectively). Although the common ancestor for within-population lineages in S-SAF is slightly more recent, they are also very old (~6.5

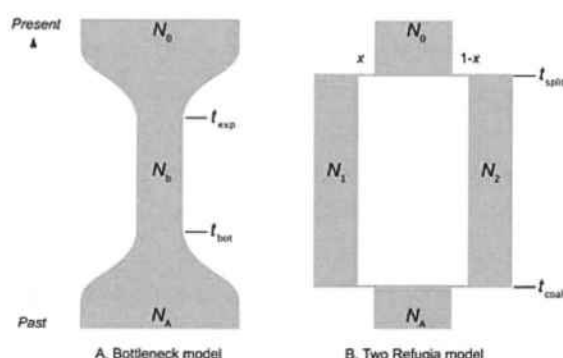


Fig. 3. Population demographic models used in the within-population ABC analyses. N_A , effective size of ancestral population relative to the current size, N_0 . (A) Bottleneck (BOT) model. N_b , population size after the reduction (the same that in the beginning of the expansion phase). t_{exp} , duration of the expansion event (in $4N_e$ generations from present to past). t_b , time of bottleneck. (B) Two refugia (REF) model. N_1 and N_2 indicate the population size of each population or refugia relative to the current size, N_0 . t_{split} , the time when the two refugia joined to form present population. t_{coal} , the time when the ancestral population splits up into two refugia; x and $1-x$, indicates the average frequency contribution of each refugia to the current population.

Mya). These results indicate that the origin of extant genetic variation in the surveyed populations backs to the Miocene, and its pattern of geographic distribution would primarily be shaped by old geological processes. On the other hand, the already observed strong within-population genetic structure clearly indicates that secondary contacts were extremely recent (in the order of thousands of years). This feature is also confirmed by the fact that in the most structured populations (such as 31-ST and 25-SL) individuals involved in the deepest lineages are the same for COI and ITS-1 markers. That is, the secondary-contact time has been so recent that recombination between mitochondrial and nuclear regions have not had the opportunity to occur. Likely, these contacts were related with recent climatic changes.

Discussion

Recent studies supporting that extant Neotropical biodiversity is ancient, and usually predates the early Pleistocene (11; 26), are debilitating the role of Pleistocene refugia as the major mechanism explaining species diversification. This fact does not mean that refugia do not have any functional role; instead, they have likely shaped extant biodiversity distribution by keeping old diversity in scattered points. Current molecular analyses on the distribution and impact of refugia, however, are quite scarce and biased: they have used high-mobility organisms and have usually conducted a species-level approach. Moreover, the few population-level analyses relied on few samples, on species with low genetic variability or on a statistically-inaccurate sampled strategy. Here,

we overcome some critical limitations by using a low mobility organism and affording a broad sampling intensity -including several individuals per locality -which allows conducting appropriate coalescent-bayesian analyses.

Ancient origin of *C. bergi* populations. With our approach we show that within-species diversity is very ancient; on the one hand, the inferred phylogenetic trees have deep nodes (both at the intra and interpopulation levels), and on the other hand, current estimates of within-population and between-population nucleotide diversities are also very high. Moreover, the combined molecular analysis using mitochondrial (COI) and nuclear (ITS-1) markers with morphological data allows us to be confident that the deep clades observed at the within-species level are not putative cryptic species, instead they represent old genealogical lineages. Our molecular dating results (Fig. S5) indicate that the extant levels of within-species diversity are clearly previous (~10 Mya) to the last glaciation periods (stretched from ~116,000 to 12,000 years ago, 27); that is the split of *C. bergi* from the close outgroup species occurred in the Miocene. But more importantly, many within-species interpopulation splits are also very old, predating the Early Pleistocene.

Genetic structure of extant SAF populations. Current predictions of paleoclimate models (Fig.S1) indicate that the S-SAF, at difference to N-SAF and C-SAF, had been completely depleted of wet forest during at least the LGM (21,000 ya; 9), having recovered only in recent years; the southern most regions, therefore, should have been recolonized by forest biota recently. Compiling empirical evidence, however, is

controversial. Not only paleoclimatic and molecular data are concordant in some studies (10; 13; 15; 16; 28), but they even have identified the molecular signature of a recent population expansion. However, Costa (29) and Thomé et al. (12), among others, came to very different conclusions rejecting the post-glacial colonization of southern territories as the major explanation for the observed diversity pattern or the levels of endemism. Our coalescent-based population-genetic results clearly do not support that S-SAF region was colonized recently (after the last glacial period). We have indeed, i) not found the characteristic molecular fingerprint left by a population expansion; ii) showed that the values of nucleotide diversity are rather high; and iii) observed that putative recent-covered forest populations have the characteristic isolation-by-distance signal, non-expected for a recently colonized region. It could be objected that the absence of a recent-expansion molecular signature might be due to some lack of statistical power. We think that this is not our case. First, our COI analyses are based on a relatively large sample size (an average of 19 individuals and 20 polymorphic sites per population; Table 2A).

Second, and more importantly, we found the specific fingerprint of the genetic structure applying both coalescent-based neutrality tests (Table 2) and coalescent-based ABC analyses (Fig. 4).

Our results in planarians, organisms depending exclusively on the presence of good condition forest are, therefore, compatible with a relatively stable scenario where important parts of the S-SAF regions had been covered by forest, at least in patches. Remarkably our findings question the accuracy of old forest-covered fragments predictions of paleoclimate modeling, and does not support a putative migration (from north to south) stated in 10; 13; 16 and 30. On the contrary our results support the conclusions of the studies identifying a high number of endemics pecies in southern regions (14; 18) and genetic signals of high diversity. A possible explanation for the inaccurate prediction of paleoclimate models could rely in the fact that the required ancient temperature and precipitation predictions might be not precise enough. Furthermore, these two parameters likely are not sufficient to predict correctly the presence of wet forest community.

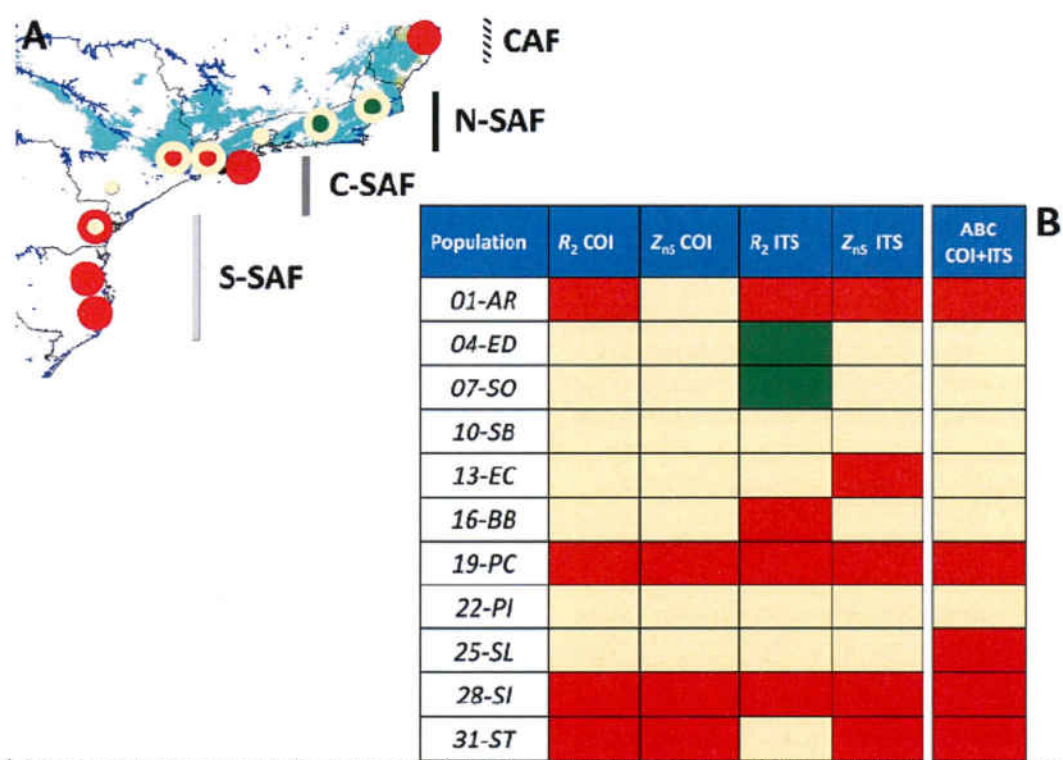


Fig. 4. Summary of significant results for the R_2 and Z_{nS} statistics -calculated separately for COI and ITS-1 datasets- and combining both markers in the ABC analyses.(A) Geographical distribution of the significant results for ABC (outer ring) and for marker-individual analyses (inner ring). (B) Tabular representation of the results. Red and green colors represent evidence for genetic structure and population expansion, respectively. Yellow figures indicate no significant results.

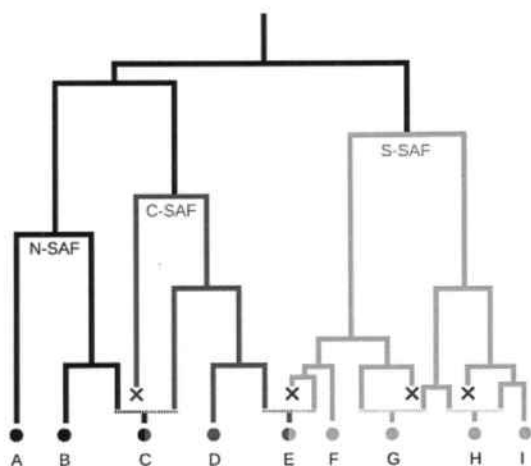


Fig. 5. Schematic representation of the putative evolutionary history of SAF populations. Red crosses represent population (lineages) extinctions caused by presumed reduction of forest-covered areas during the Pleistocene. Dashed lines represent recent secondary contacts of isolated, but geographically close, populations which remained covered by forest (refugia). For instance, populations 19-PC, 25-SL and 31-ST could have originated by a process as shown in populations C, E and G, respectively.

Results for the N-SAF and C-SAF populations are much more compatible with paleoclimate model predictions, showing a relatively neutral equilibrium pattern with no evidence for genetic structure or population expansion (Fig. 4). The single exception is the 19-PC (C-SAF) population that harbors two very divergent lineages, being one of them closely related to the lineages of N-SAF (see below). The 01-AR (CAF) also has a significant genetic structure. The basal position of this population (Fig. 2C), however, clearly suggests the existence of an ancient physical barrier to gene flow, between CAF and SAF. The lack of other CAF populations does not allow us to provide an explanation on the origin of the two lineages.

Evolutionary history of SAF populations. Our global coalescent-based ABC tests do not support any of the four assessed global models (Table S7). These results again do not support hypotheses dealing with a global range displacement. On the contrary, the high genetic structure observed within some (not all) populations and the single-population ABC analyses evaluating the SNM, BOT and REF models (Fig. 4 and Table S8), uncovers a much more complex evolutionary history. Globally our results indicate that the extant patterns of genetic diversity are high, ancient –predating the Pleistocene– and have

been shaped by complex interactions among diverse processes. Our findings, moreover, are compatible with a continuous presence of forest (at least in a number of patches) along the SAF.

Our genetic data reveal three major and old clades, delimiting three SAF regions (N-SAF, C-SAF and S-SAF; Fig. 2), whereas the 01-AR (CAF) population has a basal position. The origin of these regions could be explained by major geological or geographical barriers. For instance, the Guapiara lineament and the Paranapanema river are situated between populations 22-PI and 25-SL, and between 10-SB and 13-EC we find the Upper Rio São Francisco crustal discontinuity and the Campo do Meio fault zone (12). Also, the subdivision within the C-SAF into two groups (16-BB and 19-PC vs 13-EC and 22-PI) can be related to the Paraíba do Sul River Valley formation (from 15 to 1 Mya; 13; 31; 32) that resulted in two of the major AF mountain ranges, Serra do Mar and Serra de Mantiqueira. Noticeably, and as expected by a major geological event, this pattern is also observed in birds (13; 16), harvestman (18), and even in another land planarian species (data not shown).

Our data reveal that the three SAF geographic regions underwent a different recent evolutionary history. In this sense, the N-SAF likely has been the most climatically stable region, mostly covered by forest and with few or no important effects caused by the Pleistocene glacial activity (Fig. 5). Consequently these populations are essentially at mutation-drift equilibrium with no clear evidence of genetic structure or population expansion. The C-SAF genetic features also suggest that this region has been partially covered by forest for a long period of time. Nevertheless, the low altitude and close proximity to the ocean of population 19-PC could make it very sensitive to the sea level changes associated with Pleistocene cycles of glacial contractions and interglacial expansions (33). These changes might have produced repeated cycles of isolation and merging of populations that may explain the presence in population 19-PC of individuals coming from the north (closely related to the N-SAF populations) resulting on its high genetic structure (Fig. 5).

The evolutionary history of the S-SAF region has been more complex (Fig. 5). We show that this area was not recently colonized by land planarians, instead they probably were present for a long time (at least for 6-7 Mya, Fig. S5). Consequently, this region should be covered by forest, at least in many patches. Moreover, we also show that S-SAF populations are highly structured (Fig. 4). In this sense the single-population ABC analyses (which combined nuclear and mitochondrial information, genome regions with different effective population sizes) are very informative. These analyses indicate that the observed genetic structure is not compatible with the neutral equilibrium. Instead, it might represent recent secondary contacts among genetically differentiated populations (likely isolated in forest patches). Since the levels of genetic variation exhibited by S-SAF populations are high, these forest patches should not be small. Land planarian S-SAF populations could come in contact as a result of Pleistocene interglacial expansions. The analyses also uncover another putative secondary merge between populations situated at both sides of the ancient geological barriers that originated the three main clades. Indeed, some lineages of the 25-SL population are closely related to individuals of 16-BB and 19-PC (C-SAF) populations (Fig. 2A); feature that might indicate recent contacts between coastal C-SAF and S-SAF populations. These recent contacts through coastal regions contrast with the effectiveness of tectonic discontinuities preventing the gene flow in the interior (there is no evidence for secondary contacts between 22-PI and 25-SL being geographically very close), and again argues for sea level changes as a major factor explaining current patterns of genetic diversity.

Conclusions

Our exhaustive phylogeographic study at the AF using flatworms allowed us to contrast specific alternative hypothesis regarding the origin and the factors explaining extant patterns of genetic diversity. Current planarian's populations exhibit high levels of

genetic diversity that could be traced back, at least, to the Miocene. Moreover, our results would suggest that a number of S-SAF areas should be covered by forest for a relatively long time. We found no simplistic global evolutionary scenario that could fit the data, instead extant biodiversity patterns have been shaped by the interaction of complex geological and evolutionary processes. Remarkably, our results question the accuracy of paleoclimate modeling for small-scale predictions, and confirm flatworms as excellent organisms to improve the resolution of these models. This feature is particularly important to provide accurate scientific-based information to make sound conservation-policy decisions, for instance, in the establishment of the best areas to be protected before losing undocumented variability or to be connected to restore the ecosystem functionality. In this context, both a good knowledge of current and ancient biodiversity patterns, but also their evolutionary history, is critical.

Material and Methods

Study area and sample processing. The study area includes the Atlantic rain forest of the Brazilian states of Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ), and the East Coast of the states of São Paulo (SP), Paraná (PR), Santa Catarina (SC) and Rio Grande do Sul (RS). Sampling was performed in 13 conservation units within and outside the Serra do Mar corridor, altitudes of sampling localities ranged from sea level up to 1000 m (Table 1, Fig. 1). Of all species of land planarians sampled we selected *Cephaloflexa bergi* (34) (213 specimens) since it has the widest distribution across the SAF (only lacking in populations 11-CJ and 34-SN), a relatively high abundance, and for its level of genetic variability (22). The animals were collected directly on the ground in natural protected areas and surrounding localities. Each animal was photographed and cut into two pieces. One part was fixed in absolute ethanol (for DNA extraction) and the other in 10% formalin for identification after histological processing.

Palaeoclimatic models. We used DIVA-GIS software v. 7.1.7.2. (www.DIVA-GIS.org; 35) to determine which of our sampled populations are located in areas predicted to have been covered by forest during the last glacial maximum (LGM) and the Holocene era (21 and 6 kya)(9). We determined the predicted ancient forest cover by superimposing the geographical coordinates of our sampling points into the map produced by Carnaval & Moritz (9) basing on temperature and precipitation layers (Fig. S1).

Morphological analysis. 32 specimens were analyzed morphologically in order to confirm the species assignment. Tissue blocks of the cephalic region, the pharynx or the copulatory organs were embedded in Paraplast, sectioned at 7 µm, and stained

with Mallory / Cason trichrome stain (36). As the copulatory apparatus is the main structure for unequivocal identification, we reconstructed the copulatory apparatuses with a camera lucida attached to a light microscope. Vouchers are deposited in the *Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo* (MZUSP) (Table S1).

DNA extraction, gene amplification and sequencing. Samples preserved in 100% ethanol were digested in lysis buffer and Proteinase K overnight. Whole genomic DNA was extracted using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Approximately 10ng of DNA were used as template for polymerase chain reactions (PCR) to amplify a section of almost 1kb of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I (COI) using the following oligonucleotides: BarT: ATGACDGCSCATGGTTAATAATGAT (22) and COIR: CCWGTYARMCCCHCCWAYAGTAA (37). We also used three internal primers to acquire the sequences: BarS: GTTATGCCTGTAATGATTG, COIF: CCNGDDTTGGDATDRTWCWA and BBC: CCAAAAGAAAAATCCTTNCC (22). With primers ITS9F: GTAGGTGAACCTGCGGAAGG and ITSr: TGCCTTCAAATGTCAATGATC (38) we amplified ~500bp of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS-1) intron. In this case the same primers were used for both PCR amplification and sequencing. PCR conditions for COI using Go Taq® DNA Polymerase (Promega) were the same as those used in Álvarez-Presas et al. (22). Amplification products were purified with the Illustra™ GFX PCR DNA Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) or with a vacuum manifold (Multiscreen® HTS Vacuum Manifold, Millipore Corporation, Billerica, MA 01821 U.S.A). For COI we used the PCR products as template in sequencing reactions using Big-Dye (3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the reaction products were separated on the ABI Prism 3730 automated sequencer (Unitat de Genòmica dels Serveis Científic-Tècnics de la UB). ITS-1 sequences were carried out by MacroGen Inc. (Korea). After revising the chromatograms, we aligned sequences using MAFFT version 6 (39) and then checked them by eye with Bioedit v.7.0.9.0 software (40). COI sequences were translated into aminoacids and used as a guide for the nucleotide alignment. For ITS-1 sequences, those positions that could not be unambiguously aligned were subsequently excluded from the analyses using GBlocks 0.91b (41). The list of *C. bergi* individuals and outgroups included in the analyses together with its GenBank Accession Numbers are provided in Supplementary Table 1.

Phylogenetic analysis. We determined the evolutionary nucleotide model that best fits the data for all phylogenetic and dating analyses using jModelTest 0.1.1 (42) applying the Akaike information criterion (AIC). We used Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) methods to estimate phylogenetic relationships independently for COI and ITS-1 datasets. ML analysis was run in RAxML 7.0.0 software (43) and bootstrap support (BS) values (44) were calculated from 10,000 replicates. BI trees were inferred with MrBayes v. 3.1.2 (45). Two independent runs were performed for 3 million generations, sampling every 100 generations. The percentage of burn-in for each analysis was determined by plotting the log-likelihood values versus

generation number. To test whether population 01-AR, showing a long branch in the trees, could be wrongly situated due to a Long Branch attraction artifact, we performed two extra ML analyses. In one case we removed the most variable positions (5th category) estimated from the entire alignment. In the second case we removed (in all sequences) those variables positions from the 01-AR population. We applied the GTR model in MEGA 5 (46) to estimate the substitution rates for each position in the COI dataset.

We estimated the divergence time of the sampled populations with BEAST v. 1.6 (47) using the two most distant COI sequences of each population. We used the uncorrelated lognormal relaxed clock model with a mean substitution rate of 0.0173 nucleotide substitutions per site and per million year (calculated for *Dugesia*, a genus of freshwater planarians, Solà et al personal communication). We ran 10,000,000 iterations of the Markov Chain Monte Carlo (MCMC), from which we sampled 10,000 trees and discarded 2,500 (burn-in period) to obtain the posterior estimates of the node ages. We determined the convergence of the MCMC sampler using TRACER v1.5 (48).

Population genetic analysis and neutrality tests. The analyses were conducted using all COI sequences although we discarded a few ITS-1 sequences with ambiguity positions (Table 1). For both intra and inter-population genetic analyses we used the program DnaSP v5.10 (49). We estimate the intrapopulation genetic diversity by the number of haplotypes (*h*), haplotype (*Hd*), nucleotide diversity (π ; 50), and the Watterson parameter (θ_w) (51). In order to test if all the populations are under the neutral hypothesis for both nuclear and mitochondrial markers we conducted three neutrality tests (Tajima's *D*, (52); Fu's *F_s*, (53) and *R_s*, (54)), estimating their statistical significance by 10,000 replicates of computer simulations based on the coalescent process (55). To test for structure in the studied populations we estimated the global levels of linkage disequilibrium (*LD*) by the *Z_{ns}* (56) statistic and the association among segregating sites with the Wall's *Q* statistic (57), assessing their statistical significance by coalescence simulations (10,000 replicates). At the interpopulation level we measured the levels of nucleotide diversity between populations by the *D_{xy}* and *D_s* parameters (50). We determined whether these populations are genetically differentiated using the *S_{nn}* statistic (58), and estimated its statistical significant by performing a permutation test (10,000 replicates). We also estimate the levels of gene flow among populations from the *N_m* statistic (59) and assuming the infinite island model (60). A Mantel Test (61) was performed using the Isolation by Distance Web Service 3.2 (62) with 30,000 randomizations to assess the regression significance between pairwise genetic distances (*D_{xy}*) against the natural logarithm-transformed geographical distances. Most of these analyses were carried out using DnaSP version 5.10 (49).

Modeling the demographic history with ABC. We used the ABC-GLM method (63) to compare different coalescent-based evolutionary models for the land planarians from the AF of Brazil. We tested four scenarios (based on a structural serial founder model) to infer general patterns of the distribution of genetic diversity (Fig. S4). We assume that the time required for a new

founder event from an existing population (t_f), the population size of founder populations (x), and the duration of bottlenecks (t_b), are the same for all consecutive events. In the first model (model 1) we assume that populations originated by several serial founder events from the most northerly population (O1-AR) to the most southern latitudes (31-ST). In the second model (model 2) these events occur in the opposite direction, from higher latitudes (31-ST) to lower ones (O1-AR). The other two models assume that populations are founded from the ends toward the centre (model 3), and from the centre toward the ends of current species distribution (model 4). To avoid spurious results using populations at similar latitude (mainly C-SAF populations) we conducted this analysis using only 8 populations (all populations except 13-EC, 19-PC and 22-PI). Furthermore, we also assume in all models that there is no migration among populations due to the low mobility of the studied individuals.

Priors of parameters shared by all populations, i.e., coalescence times (t_o , t_c and t_b) and x , were set as uniform distributions, ranging from 0 to 5 (in units of $4N$ generations) and 0 to 1, respectively. We also estimated the effective population size (N) of all populations relative to that of population 1 (which was set to 1) by using a truncated normal distributed hyper prior with mean 1, and standard error uniformly distributed from 0.25 to 2.

We used the multilocus coalescent simulation program *mlcoalsim* (version 1.98) (64) to conduct the coalescent simulations and to calculate the summary statistics (of the simulated data) for the ABC analysis. The information of the two studied loci (*ITS-1* and *COI*) was mixed applying a chromosome factor of 1 (for the nuclear marker) and 0.25 (for the mitochondrial gene). We based our statistical inferences in 4 summary statistics of intraspecific variation (π , θ_w , H_d and K_w , the number of haplotypes divided by sample size), and one statistic capturing information of the level of genetic variation between populations, D_{xy} . We calculated these statistics separately for each gene, leaving a final vector of 198 statistics. In order to reduce the putative random noise introduced by the use of too many summary statistics in the estimation procedure we performed a PLS transformation (as proposed by Wegmann & Excoffier (65)), which finally results in 10 linear combinations of the initial vector of statistics.

We computed the 198 summary statistics vector in 1 million simulated data sets under each of the four competing evolutionary models. From these replicates, we retained the 10,000 replicates closest to the observed data to perform the post-sampling adjustment, and to obtain the marginal densities and p -values under the estimated general linear model (GLM). The model choice (among the four competitive models) was performed via posterior probabilities and Bayes factors (63).

We also performed separate ABC-GLM analyses for each individual population (11 independent analyses). For these analyses, we calculated a vector of 88 summary statistics describing the intra-population variation (i.e., the same statistics used for the global scenarios except D_{xy}) in 2 million simulated data sets. We evaluated three different population evolutionary scenarios, i) the standard neutral model (SNM model), ii) a

population that undergoes a bottleneck with a further recent expansion (BOT model), and iii) two isolated populations (refugia) with a subsequent secondary contact (REF model) (Fig. 3). Priors for coalescent times (t_{exp} and t_{bot} in BOT and t_{split} and t_{coal} in REF) and x (which represent the relative contribution of the different refugia to the present population size) were uniformly distributed as in previous analyses. Population size changes in the BOT model were modeled with a logistic curve as implemented in *mlcoalsim* program. The PLS transformation, the post-sampling adjustment and model choice steps (across the SNM, BOT and REF models) were performed as in the structural serial founder model analysis. We validated our model selection procedure based on Peter et al. (66). In particular, we simulated 1,000 data sets for each non-selected model in the model choice procedure, and computed for each pseudo-observed replicate, the posterior probability that this data was generated under each of the three competing models. The precision of the model choice procedure was estimated as the proportion of data sets correctly assigned to the selected model. ABC-GLM analyses were performed using programs and R scripts from the ABCtoolbox package (67), and Perl scripts specifically written for this analysis.

Acknowledgements

This research was supported by Fundació BBVA of Spain (BIOCON 06–112), by Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica of Generalitat de Catalunya, Spain, (2009SGR1287 and 2009SGR1462) and by the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain CGL2008-00378/BOS and BFU2010-15484. JR was also partially supported by ICREA Academia (Generalitat de Catalunya). We thank Júlio Pedroni, Débora Redivo, Cláudia Olivares, Marília Jucá, Leonardo Zerbone and Welton Araújo for sampling help and Italo D'Elia, Ana Cavalcanti and Lígia Domingos for the histological work, Sebastian Ramos-Onsins for assistance with the *mlcoalsim* program, and A. Carnaval and C. Moritz for kindly providing us the details of their paleoclimate models. Thanks are also due to Gema Blasco for technical support.

References

1. Rull V (2011) Neotropical biodiversity: Timing and potential drivers. *Trends in Ecology and Evolution* 26: 508–513.
2. Haffer J (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165: 131–137.

3. Rull V (2008) Speciation timing and Neotropical biodiversity: The Tertiary–Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Molecular Ecology* 17: 2722–2729.
4. Hoorn C, *et al* (2010) Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* 330: 927–931.
5. Simpson B (1979) Quaternary biogeography of the high montane regions of South America. In: The South American Herpetofauna: its Origin, Evolution, and Dispersal (ed. Duellman WE), pp. 157–188. Monograph of the Museum of Natural History, University of Kansas, Lawrence, Kansas.
6. Antonelli A & Sanmartín I (2011) Why are there so many plant species in the Neotropics?. *Taxon* 60: 403–414.
7. Myers N, Mittermeyer RA, Mittermeyer CG, Da Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
8. Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ and Hirota MM (2009) The brazilianatlantic forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141–1153.
9. Carnaval AC, Moritz C (2008) Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *J Biogeogr* 35: 1187–1201.
10. Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* 323: 785–789.
11. Fitzpatrick SW, Brasileiro CA, Haddad, CFB and Zamudio KR (2009) Geographical variation in genetic structure of an Atlantic coastal forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Mol Ecol* 18: 2877–2896.
12. Thomé MTC, Zamudio KR, Giovanelli JGR, Haddad CFB, Baldissera FA, Alexandrino J (2010) Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic forest. *Mol Phylogenet Evol* 55: 1018–1031.
13. D’Horta FM, Cabanne GS, Meyer D, Miyaki CY (2011) The genetic effects of late quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: Diversification of an Atlantic Forest passerine. *Mol Ecol* 20: 1923–1935.
14. Costa LP, Leite YLR, Da Fonseca GAB, Da Fonseca MT (2000) Biogeography of south American forest mammals: Endemism and diversity in the Atlantic Forest. *Biotropica* 32: 872–881.
15. Grazziotin FG, Monzel M, Echeverrigaray S & Bonatto SL (2006) Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): Past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Mol Ecol* 15: 3969–3982.
16. Cabanne GS, Santos, FR, Miyaki, CY (2007) Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): Vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 73–84.
17. Cabanne GS, d’Horta FM, Sari EHR, Santos FR, Miyaki CY (2008) Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Mol Phylogenet Evol* 49: 760–773.
18. Pinto-Da-Rocha R, Da Silva MB, Bragagnolo C (2005) Faunistic similarity and historic biogeography of the harvestmen of southern and southeastern Atlantic rain forest of Brazil. *J Arachnol* 33: 290–299.
19. Hugall A, Moritz C, Moussalli A & Stanislav J (2002) Reconciling paleodistribution models and comparative phylogeography in the wet tropics rainforest land snail *Gnarosophia bellendenkerensis* (Brazier 1875). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 6112–6117.
20. Sunnucks P, Blacket MJ, Taylor JM, Sands CJ, Ciavaglia SA, Garrick RC, Tait NN, Rowell DM, Pavlova A (2006) A tale of two flatfies: Different responses of two terrestrial flatworms to past environmental climatic fluctuations at Tallaganda in montane southeastern Australia. *Mol Ecol* 15: 4513–4531.
21. Marske KA, Leschen RAB, Buckley TR (2011) Reconciling phylogeography and ecological niche models for New Zealand beetles: Looking beyond glacial refugia.

Mol Phylogenet Evol 59: 89-102.

22. Álvarez-Presas M, Carbayo F, Rozas J, Riutort M (2011) Land planarians (Platyhelminthes) as a model organism for fine-scale phylogeographic studies: Understanding patterns of biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *J Evol Biol* 24: 887-896.

23. Carbayo F, Leal-Zanchet AM and Vieira EM (2001) Land planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola) as indicators of man-induced disturbance in a south brazilian rain forest. *Belg. J. Zool.* 131: 223-224.

24. Bertorelle G, Benazzo A, Mona S (2010) ABC as a flexible framework to estimate demography over space and time: Some cons, many pros. *Mol Ecol* 19: 2609-2625.

25. Beaumont M (2008) Joint determination of topology, divergence time, and immigration in population trees; in Matsumura S, Forster P, Renfrew C. *Simulation, Genetics and Human Prehistory* ed McDonald Institute Monographs: Cambridge McDonald Institute for Archeological Research, UK pp 134-154.

26. Mata H, et al (2009) Molecular phylogeny and biogeography of the eastern tapaculos (aves: Rhinocryptidae: *Scytalopus*, *Eleoscytalopus*): Cryptic diversification in Brazilian Atlantic Forest. *Mol Phylogenet Evol* 53: 450-462.

27. Ledru M, Mourguiart P, Riccomini C (2009) Related changes in biodiversity, insolation and climate in the Atlantic rainforest since the last interglacial. *Palaeogeogr, Palaeoclimatol, Palaeoecol* 271: 140-152.

28. Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite A N, Morando M, Yassuda Y Y, Sites Jr J W (2005) Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): Genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biol J Linn Soc* 85: 13-26.

29. Costa LP (2003) The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: A study of molecular phylogeography with small mammals. *J Biogeogr* 30: 71-86.

30. Pessoa RO (2007) Sistemática e biogeografia a histórica da família Conopophagidae (Aves: Passeriformes): Especiação nas florestas da América do Sul. PhD Thesis.

31. Petri S, Fúlvaro VJ (1983) *Geologia do Brasil—Fanerozoico*, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.

32. Silva JMC, Straube FC (1996) Systematics and biogeography of scaled woodcreepers (aves: Dendrocolpatidae). *Stud. Neotrop. Fauna Environ.* 31: 3-10.

33. Suguio K, Martin L (1978) Quaternary marine formations of the state of São Paulo and southern Rio de Janeiro. *International Symposium on Coastal Evolution in the Quaternary* 1: 55.

34. Riester A (1938) Beitrage zur geoplaniden-fauna brasiliens. *Abh Senckenberg Naturforsch Ges* 441: 88; 1.

35. Hijmans RJ, Guarino L, Jarvis A, O'Brien R, Mathur P, Bussink C, Cruz M, Barrantes I and Rojas E (2005) *DIVA-GIS version 5.2*. (Biodiversity International, Rome).

36. Romeis B (1989) *Mikroskopische Technik*, ed Urban und Schwarzenberg, München.

37. Lázaro EM, Sluys R, Pala M, Stocchino GA, Baguña J, Riutort M (2009) Molecular barcoding and phylogeography of sexual and asexual freshwater planarians of the genus *Dugesia* in the western Mediterranean (Platyhelminthes, Tricladida, Dugesidae). *Mol Phylogenet Evol* 52: 835-845.

38. Baguña J, Carranza S, Pala M, Ribera C, Giribet G, Arnedo MA, Ribas M, Riutort M (1999) From morphology and karyology to molecules. New methods for taxonomical identification of asexual populations of freshwater planarians. A tribute to professor Mario Benazzi. *Ital J Zool* 66: 207-214.

39. Katoh K, Asimenos G, Toh H (2009) Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods Mol Biol* 537: 39-64.

40. Hall TA (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

41. Castresana J, Talavera G (2007) Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol*

56: 564–577.

42. Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25: 1253–1256.

43. Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690.

44. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.

45. Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.

46. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739.

47. Drummond AJ & Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.

48. Rambaut A & Drummond AJ (2007) *Tracer v1.4*. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

49. Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.

50. Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.

51. Watterson GA (1975) On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor Popul Biol* 7: 256–276.

52. Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–595.

53. Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.

54. Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol Biol Evol* 19: 2092–2100.

55. Hudson RR (1990) Gene genealogies and the coalescent process. *Oxf Surv Evol Biol* 7: 1–44.

56. Kelly JK (1997) A test of neutrality based on interlocus associations. *Genetics* 146: 1197–1206.

57. Wall JD (1999) Recombination and the power of statistical tests of neutrality. *Genet Res* 74: 65–79.

58. Hudson RR (2000) A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics* 155: 2011–2014.

59. Lynch M & Crease TJ (1990) The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Mol Biol Evol* 7: 377–394.

60. Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97–159.

61. Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27: 209–220.

62. Jensen J, Bohonak A & Kelley S (2005) Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 13.

63. Leuenberger C, Wegmann D (2010) Bayesian computation and model selection without likelihoods. *Genetics* 184: 243–252.

64. Ramos-Onsins SE, Mitchell-Olds T (2007) Mlcoalsim: Multilocus coalescent simulations. *Evolutionary Bioinformatics* 3: 41–44.

65. Wegmann D, Leuenberger C, Excoffier L (2009) Efficient Approximate Bayesian Computation coupled with Markov chain Monte Carlo without likelihood. *Genetics* 182: 1207–1218.

66. Peter BM, Wegmann D, Excoffier L (2010) Distinguishing between population bottleneck and population subdivision by a model choice procedure. *Mol*

Ecol 19: 4648-4660.

67. Wegmann D, Leuenberger C, Neuenschwander S, Excoffier L (2010) ABCtoolbox: A versatile toolkit for Approximate Bayesian Computations. *BMC Bioinformatics* 11: 116-123.

Supplementary Information

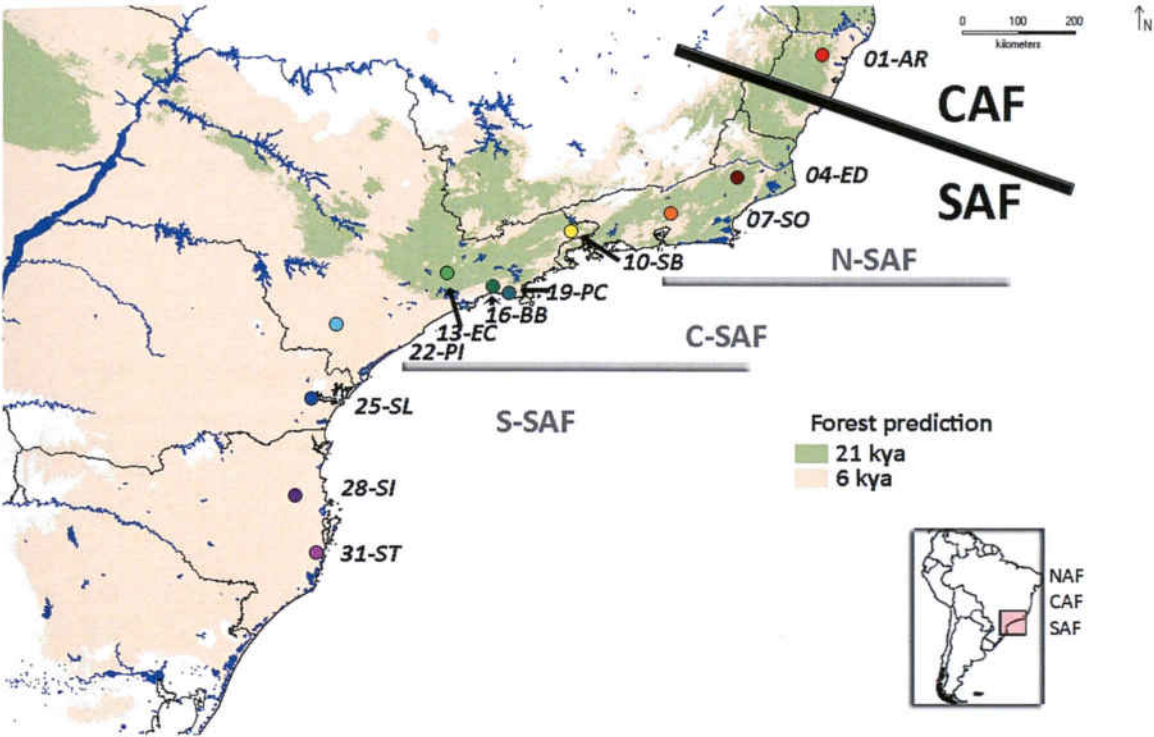


Fig. S1. Predicted forest-covered areas in the Atlantic Forest 21,000 years ago (green layer) and 6,000 years ago (salmon layer). Data from the narrower definition of Carnaval & Moritz (2008).

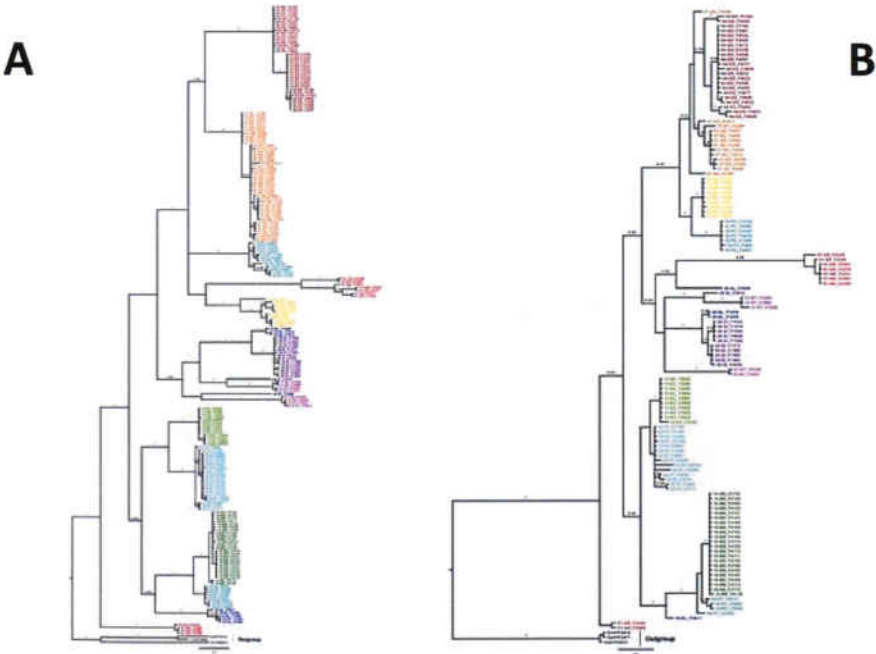


Fig. S2. Detailed Bayesian Inference tree for COI dataset (A) and ITS-1 data (B). Each color corresponds to one sampling locality and numbers at nodes indicate Posterior Probability.

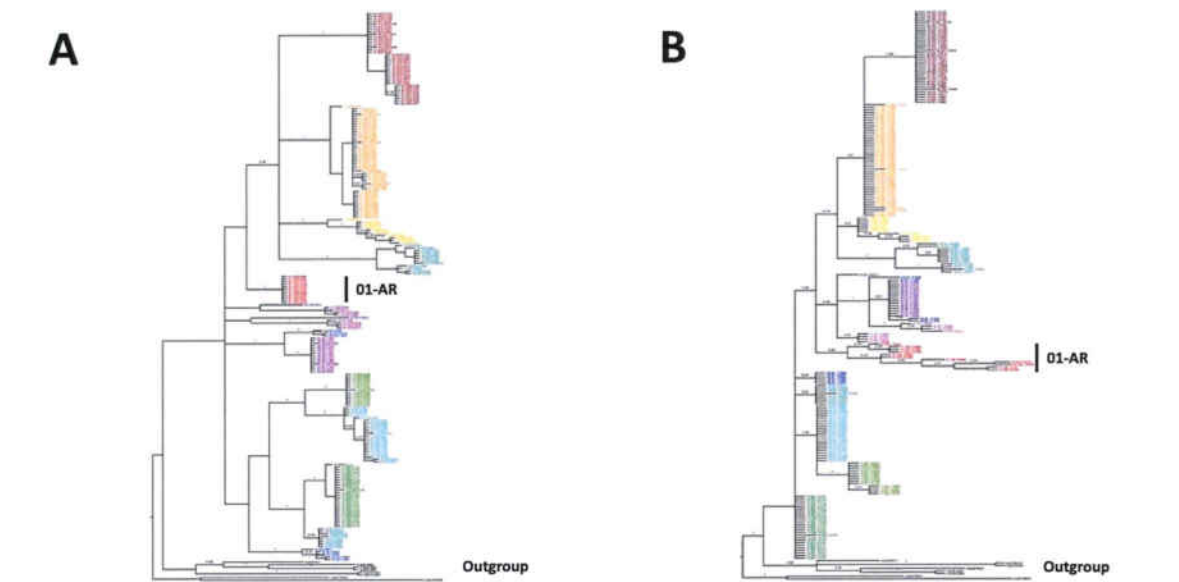


Fig. S3. COI Bayesian Inference trees built after removing the most variable positions (5thcategory) (A) Analyses conducted after removing in all sequences the most variable positions estimated from the 01-AR population. (B) Analyses conducted after removing in all sequences the most variable positions estimated using all sequences.

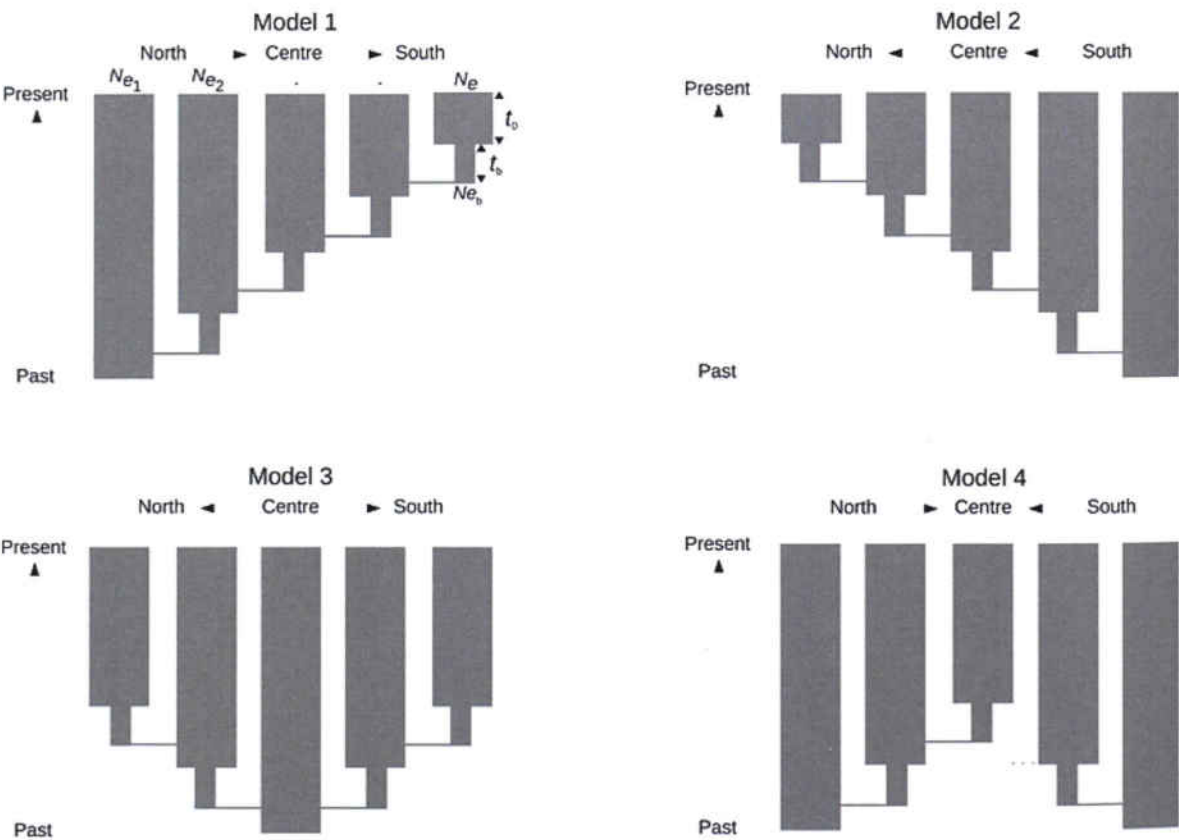


Fig. S4. Graphical representation of the four serial founder events-based models used in the global ABC analyses. Thicker arrows indicate a colonization event. t_0 , time to the last colonization event; t_b , bottleneck duration; t_c , time between the colonization event and the population recovery (to the current population size, N_e) after the bottleneck phase. Time parameters are expressed in $4N_e$ generation units.

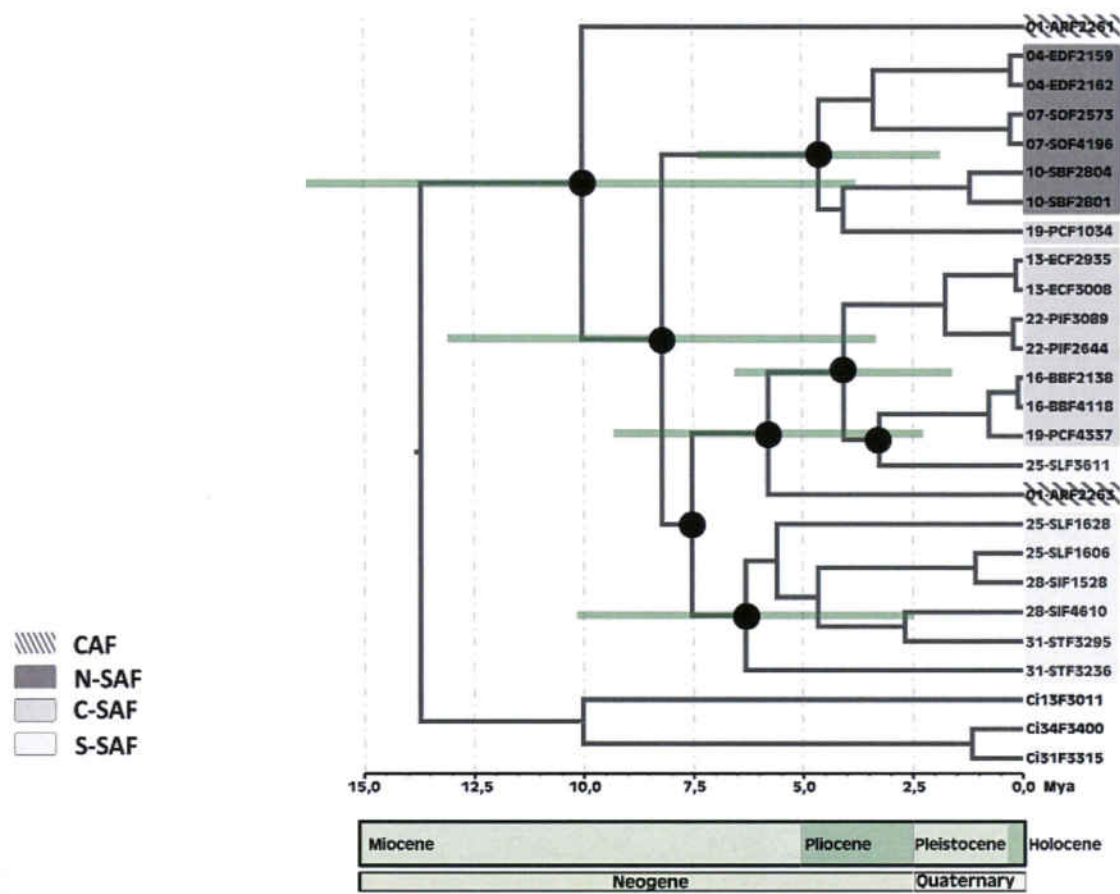


Fig. S5. Bayesian Inference tree inferred to estimate *C.bergi* diversification. The focal nodes are indicated by a black spot. The green horizontal bar indicates the 95% highest posterior density interval.

Table S1. Samples used in this study with their GenBank Accession numbers.

Collecting locality	Molecular code	N. MZUSP ^a	COI	ITS-1
R. B. Augusto Ruschi (01-AR) / ES	F2261	MZUSP PL 1106	?	?
	F2263	MZUSP PL 355	?	-
	F2270 ^b	MZUSP PL 1107	?	?
	F2288	MZUSP PL 356	?	-
	F2328	MZUSP PL 1110	?	?
	F2331	MZUSP PL 1111	?	?
	F2345	MZUSP PL 1112	-	?
	F2380	MZUSP PL 357	?	-
	F2395	MZUSP PL 1114	?	?
	F2401	MZUSP PL 1115	?	?
	F2408 ^b	MZUSP PL 1116	?	-
	F2449	MZUSP PL 1117	?	?
	F2486 ^b	MZUSP PL 359	-	?
P.E. do Desengano (04-ED) / RJ	F2159 ^b	MZUSP PL 339	?	-
	F2160	MZUSP PL 340	?	-
	F2161	MZUSP PL 341	?	-
	F2162	MZUSP PL 342	?	-
	F2163	MZUSP PL 343	?	?
	F2164	MZUSP PL 344	?	-
	F2165 ^b	MZUSP PL 345	?	-
	F2166	MZUSP PL 346	?	-
	F2186	MZUSP PL 347	?	?
	F2203	MZUSP PL 352	?	-
	F2220	MZUSP PL 353	?	?
	F2222	MZUSP PL 354	?	-
	F3987	MZUSP PL 620	?	?
	F4003	MZUSP PL 621	?	?
	F4009	MZUSP PL 622	?	?
	F4010	MZUSP PL 623	?	-
	F4013	MZUSP PL 624	?	?
	F4015	MZUSP PL 625	?	-
	F4021	MZUSP PL 626	?	?
	F4023	MZUSP PL 627	?	?
	F4025	MZUSP PL 628	?	?
	F4028	MZUSP PL 629	?	?
	F4033	MZUSP PL 630	?	?
	F4034	MZUSP PL 631	?	?
	F4037	MZUSP PL 632	?	?
	F4040	MZUSP PL 633	?	?
	F4046	MZUSP PL 634	?	-
	F4058	MZUSP PL 635	?	?
	F4064	MZUSP PL 637	?	-
	F4066	MZUSP PL 638	?	-
	F4069	MZUSP PL 639	?	?
	F4075	MZUSP PL 640	?	?
	F4077	MZUSP PL 641	?	?
	F4086	MZUSP PL 642	?	?
	F4091	MZUSP PL 643	?	?
	F4093	MZUSP PL 644	?	?
P.N.S. dos Órgãos (07-SO) / RJ	F2573	MZUSP PL 360	?	?
	F2603 ^b	MZUSP PL 363	?	-
	F4184	MZUSP PL 854	?	-

^a Vouchers are deposited in the Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP)

^b Individuals whose internal anatomy has been analyzed morphologically

* Floresta Nacional de São Francisco de Paula

? GenBank accession number not available yet

- Sequence not obtained

Table S1. continued.

Collecting locality	Molecular code	N. MZUSP ^a	COI	ITS-1
	F4191	MZUSP PL 855	?	-
	F4192	MZUSP PL 856	?	-
	F4193	MZUSP PL 857	?	-
	F4196	MZUSP PL 858	?	-
	F4198	MZUSP PL 859	?	-
	F4199	MZUSP PL 860	?	?
	F4201	MZUSP PL 861	?	-
	F4204	MZUSP PL 863	?	-
	F4205	MZUSP PL 864	?	?
	F4206	MZUSP PL 865	?	?
	F4207	MZUSP PL 866	?	?
	F4208	MZUSP PL 867	?	-
	F4209	MZUSP PL 868	?	?
	F4211	MZUSP PL 869	?	-
	F4213	MZUSP PL 870	?	-
	F4214	MZUSP PL 871	?	-
	F4258	MZUSP PL 897	?	-
	F4260	MZUSP PL 899	?	-
	F4265	MZUSP PL 900	?	-
	F4267	MZUSP PL 901	?	?
	F4274	MZUSP PL 905	?	?
	F4286	MZUSP PL 910	?	?
	F4290	MZUSP PL 913	?	?
	F4298	MZUSP PL 915	?	-
	F4299	MZUSP PL 916	?	-
	F4300	MZUSP PL 917	?	-
	F4302	MZUSP PL 919	?	-
	F4303	MZUSP PL 920	?	?
	F4304	MZUSP PL 921	?	-
	F4305	MZUSP PL 922	?	-
	F4306	MZUSP PL 923	?	-
	F4307	MZUSP PL 924	?	?
	F4308	MZUSP PL 925	?	-
	F4315	MZUSP PL 928	?	-
	F4318	MZUSP PL 930	?	-
	F4320	MZUSP PL 931	?	-
	F4324	MZUSP PL 932	?	-
	F4325	MZUSP PL 933	?	-
	F4326	MZUSP PL 934	?	?
P.N.S. da Bocaina (10-SB) / SP	F2109	MZUSP PL 328	HQ026416	HQ026455
	F2794	MZUSP PL 397	HQ026433	HQ026461
	F2800 ^b	MZUSP PL 398	HQ026434	HQ026462
	F2801 ^b	MZUSP PL 399	HQ026435	HQ026463
	F2804 ^b	MZUSP PL 400	HQ026436	HQ026464
	F2805 ^b	MZUSP PL 401	HQ026437	HQ026465
	F2811 ^b	MZUSP PL 402	HQ026438	HQ026466
	F2837 ^b	MZUSP PL 405	HQ026440	-
	F2845 ^b	MZUSP PL 407	HQ026423	HQ026470
	F2846 ^b	MZUSP PL 408	HQ026424	HQ026471
	F2935	MZUSP PL 422	?	?
	F2986	MZUSP PL 472	?	?
P.E.S. da Cantareira (13-EC) / SP	F2995	MZUSP PL 473	?	?
	F3008	MZUSP PL 475	?	?
	F3061	MZUSP PL 479	?	?
	F3066	MZUSP PL 545	?	?
	F3522	MZUSP PL 548	?	?
	F3524	MZUSP PL 549	?	-
	F3530	MZUSP PL 550	?	?

Table S1. continued.

Collecting locality	Molecular code	N. MZUSP ^a	COI	ITS-1
E.B. de Boraceia (16-BB) / SP	F3534	MZUSP PL 551	?	?
	F3546	MZUSP PL 552	?	-
	F3703	MZUSP PL 567	?	-
	F3742	MZUSP PL 569	?	?
	F2138 ^b	MZUSP PL 337	HQ026419	HQ026458
	F2149	MZUSP PL 338	HQ026420	HQ026459
	F4103	MZUSP PL 811	?	?
	F4110	MZUSP PL 813	?	?
	F4111	MZUSP PL 814	?	?
	F4118	MZUSP PL 815	?	?
	F4120	MZUSP PL 816	?	?
	F4121	MZUSP PL 817	?	-
	F4122	MZUSP PL 818	?	?
	F4123	MZUSP PL 819	?	-
	F4124	MZUSP PL 820	?	-
	F4126	MZUSP PL 822	?	?
	F4127	MZUSP PL 823	?	?
	F4147	MZUSP PL 830	?	?
	F4148	MZUSP PL 831	?	?
	F4149	MZUSP PL 832	?	?
	F4150	MZUSP PL 833	?	?
	F4164	MZUSP PL 846	?	?
	F4165	MZUSP PL 847	?	?
	F4166	MZUSP PL 848	?	?
	F4167	MZUSP PL 849	?	?
	F4168	MZUSP PL 850	?	?
	F4174	MZUSP PL 851	?	?
	F4175	MZUSP PL 852	?	?
	F4176	MZUSP PL 853	?	?
Cambury (19-PC) / SP	F1034	MZUSP PL 303	?	-
	F1035	MZUSP PL 304	?	?
	F1038	MZUSP PL 305	?	-
	F1045	MZUSP PL 306	?	-
	F1048	MZUSP PL 307	?	?
	F4337	MZUSP PL 939	?	?
	F4338 ^b	MZUSP PL 940	?	?
	F4339	MZUSP PL 941	?	?
	F4350 ^b	MZUSP PL 951	?	?
	F4352	MZUSP PL 952	?	-
	F4355	MZUSP PL 953	?	?
	F4356	MZUSP PL 954	?	-
	F4378	MZUSP PL 974	?	-
	F4380	MZUSP PL 975	?	-
	F4401	MZUSP PL 991	?	?
	F4403	MZUSP PL 992	?	?
	F4404	MZUSP PL 993	?	-
	F4407	MZUSP PL 994	?	?
	F4408	MZUSP PL 995	?	-
	F4410	MZUSP PL 996	?	?
P.E. Intervalles (22-PI) / SP	F2644	MZUSP PL 370	?	?
	F2697	MZUSP PL 377	?	?
	F2698	MZUSP PL 378	?	-
	F2702	MZUSP PL 379	?	?
	F2769	MZUSP PL 389	?	?
	F2785	MZUSP PL 392	?	?
	F3081	MZUSP PL 480	HQ026426	-
	F3082	MZUSP PL 481	?	-

Table S1. continued.

Collecting locality	Molecular code	N. MZUSP ^a	COI	ITS-1
Parque Saint Hilaire (25-SL) / PR	F3088	MZUSP PL 483	?	-
	F3089	MZUSP PL 484	?	?
	F3091	MZUSP PL 485	?	?
	F3095	MZUSP PL 486	?	?
	F3097	MZUSP PL 487	?	?
	F3100	MZUSP PL 489	?	-
	F3101	MZUSP PL 490	?	?
	F3104	MZUSP PL 491	?	-
	F3105	MZUSP PL 492	?	-
	F3109 ^b	MZUSP PL 494	HQ026427	HQ026474
	F3111	MZUSP PL 496	?	?
	F3146	MZUSP PL 500	?	?
	F3798	MZUSP PL 615	?	?
	F3805	MZUSP PL 616	?	-
	F1606	MZUSP PL 321	?	-
	F1610	MZUSP PL 322	?	?
	F1616	MZUSP PL 323	?	?
	F1628 ^b	MZUSP PL 324	?	?
	F1664 ^b	MZUSP PL 326	HQ026401	-
	F3583	MZUSP PL 558	?	-
Parque Nacional Serra do Itajaí (28-SI) / SC	F3585	MZUSP PL 560	?	-
	F3611	MZUSP PL 565	?	?
	F1528	MZUSP PL 308	?	-
	F1532	MZUSP PL 309	?	?
	F1555	MZUSP PL 310	?	-
	F1570	MZUSP PL 311	?	-
	F1572	MZUSP PL 312	?	?
	F1576	MZUSP PL 313	-	?
	F1580	MZUSP PL 314	?	?
	F1582	MZUSP PL 315	?	?
	F1583	MZUSP PL 316	?	-
	F1584	MZUSP PL 317	?	?
	F1585 ^b	MZUSP PL 318	?	-
	F1596	MZUSP PL 319	?	?
	F1598	MZUSP PL 320	?	?
	F4610	MZUSP PL 1103	?	?
	F4635	MZUSP PL 1104	?	?
	F4636	MZUSP PL 1105	?	?
Parque Estadual Serra do Tabuleiro (31-ST) / SC	F3230	MZUSP PL 501	?	-
	F3236	MZUSP PL 502	?	?
	F3257	MZUSP PL 504	?	?
	F3295	MZUSP PL 506	?	?
	F3306	MZUSP PL 507	?	?
	F3313	MZUSP PL 510	?	-
	F3906	MZUSP PL 617	?	?
	F3913	MZUSP PL 618	?	-
	Outgroup (<i>Choeradoplana banga</i>)			
	P.E.S. da Cantareira (13-EC) / SP	F3011	MZUSP PL 477	?
Parque Estadual Serra do Tabuleiro (31-ST) / SC	<i>Choeradoplana iheringi</i>			
	F3315	MZUSP PL 511	HQ542891	-
	FLONA* (34-FN) / RS	F3400	MZUSP PL 521	HQ026429
R. B. Augusto Ruschi (01-AR) / ES	<i>Cephaloflexa</i> sp.			
	F2473	MZUSP PL 1118	-	?
	F2474	MZUSP PL 1119	-	?
	F2477	MZUSP PL 1120	-	?

Table S2A. Summary of the neutrality tests for the COI gene

Population	n	Neutrality test					
		Tajima's D		Fu's F_s		Ramos-Onsins & Rozas R_2	
		D	95% CI	F_s	95% CI	R_2	95% CI
01-AR	11	1.464*	(-1.733 , 1.631)	4.797*	(-1.950 , 4.848)	0.245**	(0.097 , 0.219)
04-ED	36	1.346	(-1.691 , 1.817)	2.558	(-5.213 , 5.928)	0.165	(0.061 , 0.186)
07-SO	44	-0.758	(-1.700 , 1.920)	-3.28	(-5.197 , 5.943)	0.087	(0.055 , 0.180)
10-SB	10	-0.993	(-1.739 , 0.167)	1.842	(-3.713 , 4.738)	0.205	(0.104 , 0.235)
13-EC	13	0.792	(-1.685 , 1.872)	0.514	(-2.443 , 3.733)	0.191	(0.111 , 0.266)
16-BB	25	-1.159	(-1.686 , 1.941)	-3.176**	(-2.550 , 3.960)	0.082*	(0.077 , 0.242)
19-PC	20	2.167**	(-1.746 , 1.638)	3.964	(-4.504 , 5.190)	0.228**	(0.080 , 0.191)
22-PI	22	-0.686	(-1.678 , 1.917)	-1.367	(-2.756 , 4.043)	0.103	(0.084 , 0.242)
25-SL	9	0.549	(-1.669 , 1.612)	3.536	(-1.580 , 5.057)	0.207	(0.101 , 0.235)
28-SI	15	-2.283**	(-1.772 , 1.697)	-0.157	(-4.548 , 5.229)	0.232**	(0.089 , 0.209)
31-ST	8	2.464**	(-1.605 , 1.577)	6.335**	(-1.494 , 5.080)	0.279**	(0.106 , 0.251)

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

Population	n	Linkage Disequilibrium			
		Z_{ns}	95% CI	Wall's Q	95% CI
01-AR	11	0.577	(0.168 , 0.649)	0.489	(0.102 , 0.597)
04-ED	36	0.358	(0.046 , 0.502)	0.417	(0 , 0.518)
07-SO	44	0.067	(0.038 , 0.489)	0.210	(0 , 0.5)
10-SB	10	0.481	(0.142 , 0.717)	0.467	(0 , 0.692)
13-EC	13	0.425	(0.011 , 1)	0.500	(0 , 1)
16-BB	25	0.013	(0.003 , 1)	0	(0 , 1)
19-PC	20	0.711**	(0.113 , 0.543)	0.595**	(0.063 , 0.482)
22-PI	22	0.166	(0.004 , 1)	0	(0 , 1)
25-SL	9	0.476	(0.187 , 0.695)	0.330	(0.115 , 0.641)
28-SI	15	0.885**	(0.116 , 0.625)	0.877**	(0 , 0.580)
31-ST	8	0.913**	(0.201 , 0.726)	0.851**	(0.119 , 0.679)

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

Table S2B. Summary of the neutrality tests for the ITS-1 gene

Population	n	Neutrality test					
		Tajima's D		Fu's F_s		Ramos-Onsins&Rozas R_2	
		D	95% CI	F_s	95% CI	R_2	95% CI
01-AR	8	-1.829*	(-1.627, 1.634)	6.094**	(-2.531, 4.727)	0.315**	(0.106, 0.254)
04-ED	21	-1.587*	(-1.653, 1.900)	-4.204**	(-2.608, 4.020)	0.068**	(0.090, 0.248)
07-SO	10	-1.116	(-1.668, 1.830)	-2.082*	(-2.481, 3.779)	0.112**	(0.123, 0.3)
10-SB	9	-	-	-	-	-	-
13-EC	10	-1.562*	(-1.562, 1.641)	1.225	(-1.430, 2.429)	0.3	(0.146, 0.3)
16-BB	22	-1.162	(-1.747, 1.797)	-0.957	(-5.262, 5.604)	0.208**	(0.075, 0.192)
19-PC	11	1.826*	(-1.721, 1.617)	9.334**	(-2.907, 5.050)	0.243**	(0.097, 0.219)
22-PI	12	-1.865*	(-1.747, 1.816)	-0.849	(-2.897, 4.278)	0.156	(0.108, 0.265)
25-SL	2	-	-	-	-	-	-
28-SI	11	-2.181**	(-1.778, 1.713)	9.321**	(-3.679, 4.652)	0.287**	(0.101, 0.232)
31-ST	5	1.567*	(-1.203, 1.583)	3.843	(-0.365, 5.095)	0.283	(0.102, 0.348)

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

Population	n	Linkage Disequilibrium			
		Z_{ns}	95% CI	Wall's Q	95% CI
01-AR	8	0.927**	(0.190, 0.747)	0.910**	(0.087, 0.72)
04-ED	21	0.120	(0.004, 1)	0	(0, 1)
07-SO	10	0.188	(0.012, 1)	0.286	(0, 1)
10-SB	9	-	-	-	-
13-EC	10	1**	(0.012, 1)	1**	(0, 1)
16-BB	22	-	-	-	-
19-PC	11	0.850**	(0.157, 0.657)	0.898**	(0.08, 0.612)
22-PI	12	0.306	(0.018, 0.88)	0.818	(0, 1)
25-SL	2	-	-	-	-
28-SI	11	1**	(0.121, 0.724)	1**	(0, 0.706)
31-ST	5	0.945**	(0.281, 0.867)	0.933**	(0.182, 0.851)

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

Table S4. S_{nn} values for the COI dataset

Cb01	1 (0***)																			
Cb04	1 (0***)	1 (0***)																		
Cb07	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)																	
Cb10	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)																
Cb13	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)															
Cb16	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)														
Cb19	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)													
Cb22	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)												
Cb25	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)											
Cb28	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	0,91667 (0,0002***)										
Cb31	1 (0,0002***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0,0001***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0,0002***)	0,95652 (0***)									
Cb01		Cb04	Cb07	Cb10	Cb13	Cb16	Cb19	Cb22	Cb25	Cb28										

S_{nn} values for the ITS-1 dataset

Cb01	0,96552 (0***)																			
Cb04	0,94444 (0***)	1 (0***)																		
Cb07	0,94118 (0***)	1 (0***)	1 (0***)																	
Cb10	0,94444 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0,0002***)																
Cb13	0,96667 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)															
Cb16	0,94737 (0,0001***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)														
Cb19	0,95000 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)													
Cb22	0,90000 (0,0457*)	1 (0,0098**)	1 (0,0160*)	1 (0,0198*)	1 (0,0165*)	1 (0,0038**)	1 (0,0125*)													
Cb25	0,94737 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0***)	1 (0,0001***)	1 (0***)	1 (0***)	0,82343 (0***)												
Cb28	0,92308 (0,0025**)	1 (0***)	1 (0,0003***)	1 (0,0006***)	1 (0,0004***)	1 (0***)	1 (0,0001***)	1 (0,0001***)	1 (0,0960 ns)											
Cb01		Cb04	Cb07	Cb10	Cb13	Cb16	Cb19	Cb22	Cb25	Cb28										

*** P < 0,001

Table S6. Summary of the isolation-by-distance analysis obtained from D_{xy} values vs log geographical distance (km).

Localites	Z	COI r	P-value ($r \leq 0$)	Z	ITS-1 r	P-value ($r \leq 0$)
<i>Ancient Forest</i> 01-ED; 04-ED; 07-SO; 10-SB and 13-EC	2.1707	0.6015	0.0585	2.1152	0.6087	0.083
<i>Recent Forest</i> 16-BB; 19-PC; 22-PI; 25-SL; 28-SI and 31-ST	3.1481	0.5234	0.0398*	3.5223	0.4319	0.0433*
<i>All localities</i>	12.7441	0.5274	0.0003**	13.4694	0.426	0.0025**

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

Table S7 ABC results of the serial founder events models

Model	MD	PP	f
Model 1	1.93×10^{-6}	0.427	0.023
Model 2	1.38×10^{-6}	0.306	0.019
Model 3	3.69×10^{-7}	0.143	0.011
Model 4	8.38×10^{-7}	0.202	0.019

MD, Marginal Density

PP, Posterior Probability

f, Fraction of retained simulations with a likelihood value smaller or equal than of the observed data under the GLM and using 5 PLS components

Analysis based on 8 populations

Table S8. ABC results for the within-populations analyses.

Population	Standard Neutral Model (SNM)			Bottleneck Model (BOT)			Two Refugia Model (REF)		
	MD	PP	f	MD	PP	f	MD	PP	f
01-AR	5.26×10^{-6}	0.003	0.013	5.48×10^{-7}	2.8×10^{-4}	0.005	0.002	0.997***	0.565
04-ED	0.043	0.194	0.998	0.114	0.507	0.991	0.067	0.299	1.000
07-SO	0.025	0.250	0.980	0.050	0.492	0.993	0.026	0.257	0.974
10-SB	0.018	0.288	0.890	0.024	0.381	0.872	0.021	0.331	0.886
13-EC	0.073	0.139	0.990	0.357	0.683	0.980	0.093	0.177	0.992
16-BB	0.001	0.103	0.090	0.008	0.650	0.173	0.003	0.247	0.134
19-PC	0.000	0.015	0.002	7.02×10^{-8}	0.003	0.001	2.51×10^{-5}	0.982***	0.026
22-PI	0.012	0.176	0.548	0.031	0.454	0.542	0.025	0.370	0.729
25-SL	0.482	0.141	0.324	0.255	0.075	0.178	2.684	0.785*	0.960
28-SI	1.16×10^{-4}	0.051	0.068	6.46×10^{-52}	2.82×10^{-49}	0.000	0.002	0.949**	0.515
31-ST	8.11×10^{-5}	0.121	0.090	7.30×10^{-109}	1.09×10^{-105}	0.000	0.001	0.879*	0.427

MD, Marginal Density

PP, Posterior Probability

f, Fraction of retained simulations with a likelihood value smaller or equal than of the observed data under the GLM and using 5 PLS components

*, Bayes Factors > 1:5

**, Bayes Factors > 1:10

***, Bayes Factors > 1:50

Table S9. Validation results for ABC-based model choice approach

Population	Observed data	Pseudo-observed data sets					
	$PP\ REF^a$	$Q_{95\%}$	$PP\ REF(SNM)^b$	$P_i(\%)$	$Q_{95\%}$	$PP\ REF(BOT)^b$	$P_i(\%)$
01-AR	0.997		0.748	0.1		0.681	0
19-PC	0.982		0.739	0.3		0.597	0
25-SL	0.785		0.681	2.6		0.667	1.9
28-SI	0.949		0.776	1		0.490	0
31-ST	0.879		0.783	1.6		0.399	0

^a, Posterior Probability of observed data under the REF model

^b, Quantile 95% of the distribution of Posterior Probabilities of 1000 pseudobserved data (obtained from the model in parenthesis) under the REF model

P_i , Proportion of of data incorrectly asigned to REF model

CAPÍTOL 4

ANNEX

ANNEX

The original design of our Atlantic Forest study aimed to perform a comparative phylogeographic analysis, expanding with multiple populations our previous study surveying the Serra da Bocaina conservation unit (10-SB) (Álvarez-Presas et al. 2011). In that study the comparative analysis of *C. bergi* and *Geoplana goetschi* sensu Marcus 1951 revealed that both species have similar patterns of nucleotide variability distribution and suggested that the analysed geographic region would have remained stable. However, after extensive and intensive samplings we found no other planarian species -except *C. bergi*- with a geographic distribution covering all the southern part of the Atlantic Forest (SAF). Nonetheless, some species have partial overlapping distribution with *C. bergi* (Table 1, Fig. 1) and reasonable levels of genetic variation to conduct statistical contrast of their patterns of variation. In this sense, it is critical to have samples from two (or more) species in multiple overlapping localities to establish the species-specific patterns of variation and to finally determine the major evolutionary factors shaping nucleotide variation at the AF.

Table 1. Sampling sites where the species has been found.

Locality	<i>Cephaloflexa bergi</i>	<i>Geoplana goetschi</i> Marcus	<i>Geoplana goetschi</i> Riester	<i>Issoca</i> sp. nov.
Reserva Biológica Augusto Ruschi (01-AR)	X			X
Parque Estadual do Desengano (04-ED)	X			X
Parque Nacional da Serra dos Órgãos (07-SO)	X		X	
Parque Nacional da Serra da Bocaina (10-SB)	X	X		
Campos do Jordão (11-CJ)		X		
Parque Estadual da Serra da Cantareira (13-EC)	X	X	X	
Estação Biológica de Boraceia (16-BB)	X	X		
Praia de Cambury (19-PC)	X	X		
Parque Estadual de Intervales (22-PI)	X	X		
Parque Nacional de Saint-Hilaire / Lange (25-SL)	X	X		
Parque Nacional da Serra de Itajaí (28-SI)	X			
Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (31-ST)	X			
Floresta Nacional de São Francisco de Paula-FLONA (34-FN)				

Here we compare the distribution and genetic patterns found for *C. bergi* in the previous analyses with that from *Geoplana goetschi* sensu Marcus, *Issoca* sp. nov. and *Geoplana goetschi* sensu Riester 1938, species that are also present in some of the localities of the distribution range of *C. bergi* (Table 1, Fig. 1). *Geoplana goetschi* sensu Marcus is

the species with the wider distribution, overlapping with some localities where *C. bergi* is also found; nevertheless it is also present in a locality where *C. bergi* was not found (11-CJ). Table 1 shows the sampling localities of the three additional species, being the north covered by *Issoca* sp. nov. and *G. goetschi* Riester, the centre by *G. goetschi* sensu Marcus, an additional species in the south has not yet been found. Here we performed similar analyses to those done for *C. bergi*, except from the ABC, that will be conducted when we have greater number of samples. The GenBank accession numbers of individuals analysed are shown in Supplementary Table 1.

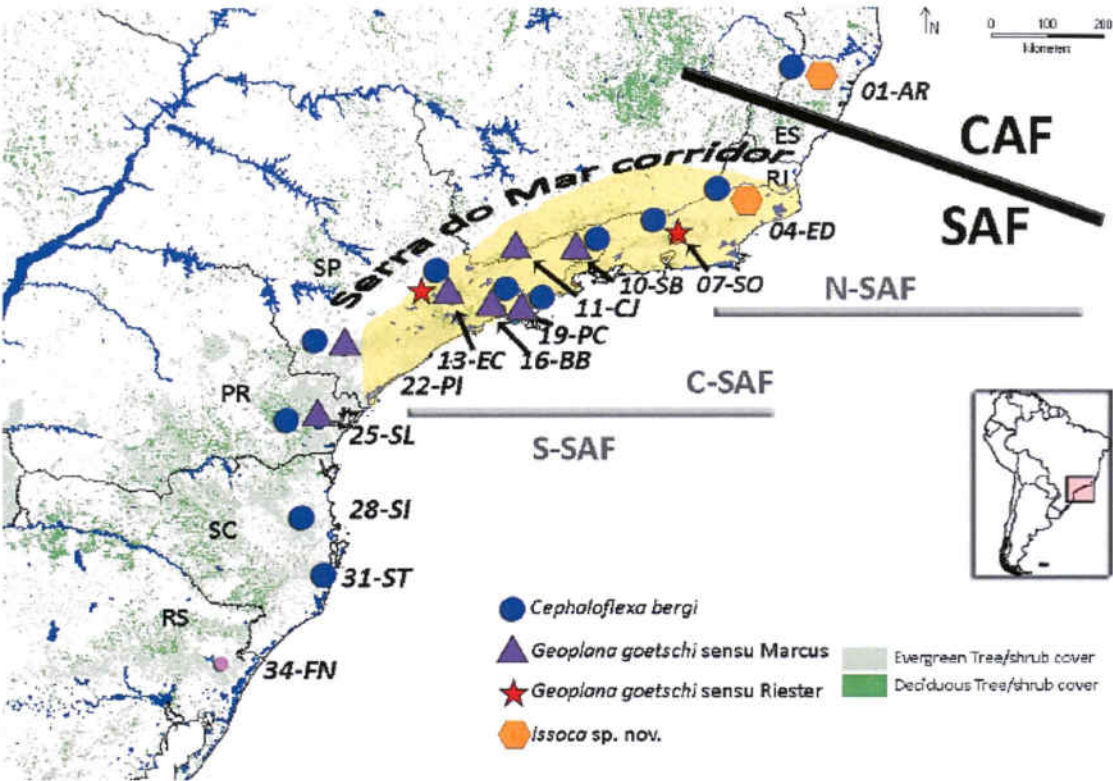


Figure 1. Distribution map of *Cephaloflexa bergi*, *Geoplana goetschi* sensu Marcus 1951 (according to Marcus 1951 and our own sampling results), *Geoplana goetschi* sensu Riester 1938 and *Issoca* sp. nov. species (both based only in our sampling).

We reconstructed the phylogenetic relationships (by ML and BI) for the 3 new species. Remarkably, the topology for *Geoplana goetschi* sensu Marcus 1951 (Fig. 2) does not reproduce the N-SAF, C-SAF and S-SAF divisions found for *C. bergi*. However, BI and ML trees show that most populations are polyphyletic (except for 22-PI and 25-SL). The phylogenetic relationships of ITS-1 gene are less conclusive (figure not shown) although has equivalent clustering pattern than that of the COI gene, maintaining a basal position for the population in 11-CJ. 22-PI and 25-SL remain monophyletic (as in the mitochondrial inferences), whereas the other conservation units are merged in one cluster.

Although with only two populations, the COI phylogenetic trees for *Geoplana*

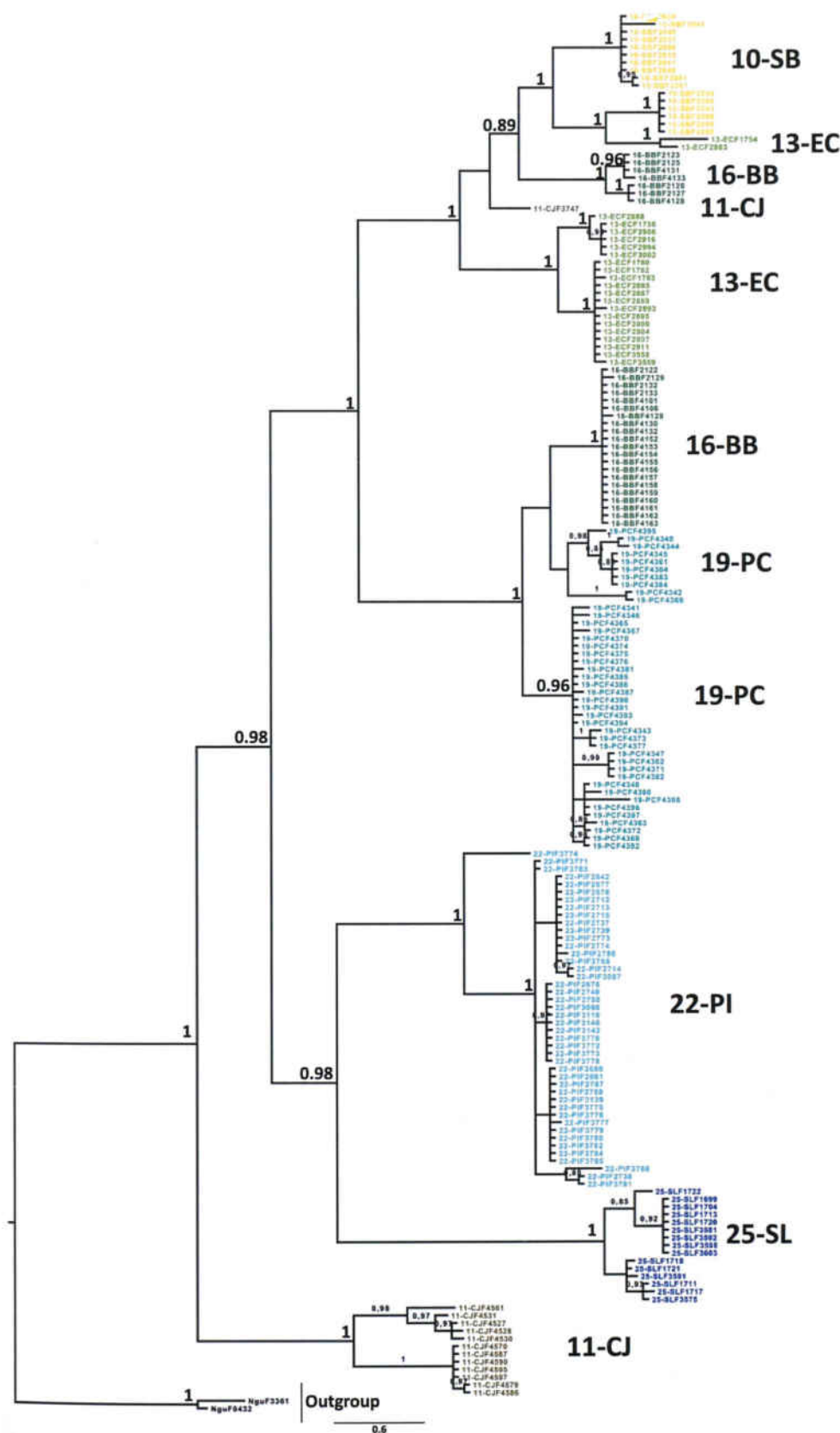


Figure 2. Bayesian inference tree from the COI data for *Geoplana goetschi* sensu Marcus 1951. The scale bar represents 0.6 nucleotide substitutions per site, and the values at nodes the Posterior Probabilities.

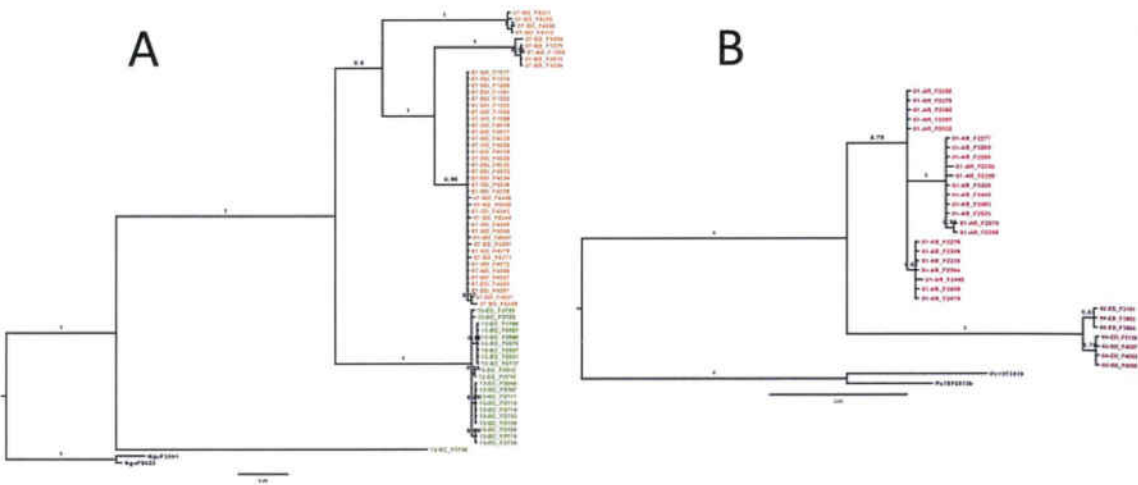


Figure 3. Bayesian inference trees from the COI genetic data of *Geoplana goetschi* sensu Riester 1938 (A) and *Issoca* sp. nov. (B). Numbers at nodes show the PP values.

goetschi sensu Riester 1938 show that population 07-SO is monophyletic and both populations (07-SO and 13-EC) have a pattern of genetic structure with two or more deep clades (highly differentiated) (Fig. 3A). The nuclear gene, however, does not recover the above monophyletic groups, suggesting that the genetic structure observed with the mitochondrial gene is not as old as that detected in this population of *C. bergi*, where both genes show the same structure. *Issoca* sp. nov. trees (Fig. 3B) show a clear separation between the two populations studied (01-AR and 04-ED), but lower levels of internal structure for the two populations analysed. Again there is a mix of sequences from the two populations regarding ITS-1 gene trees, which leads to the same conclusions as in the previous species. Interpopulational levels of variation (in terms of D_{XY} and D_a ; Fig. 4) for the COI gene in species with more than two populations (*G. goetschi* sensu Marcus) show that groupings are correlated with geographic distance as in the phylogenetic analyses for the COI gene.

Table 2 shows the results of nucleotide diversity estimates for COI and ITS-1 genes. Values of nucleotide diversity (π) are high for both nuclear and mitochondrial markers and in similar ranges to the found for *C. bergi*. The distribution pattern of variation among populations, however, differs across species. For instance, the population distribution of the *P* values of *G. goetschi* sensu Marcus, that has more populations in common with *C. bergi*, is not equivalent to that found for *C. bergi*. The same happens for the results of some neutrality tests and linkage disequilibrium values (Table 3): the populations with significant results are not the same across species (Fig. 5).

Table 2. Summary of the nucleotide diversity estimates

Locality	Species	n	h	Hd	S	π
COI						
Parque Nacional da Serra da Bocaina (10-SB)	<i>G. goetschi</i> Marcus	16	4	0.692	32	0.0169
Campos do Jordão (11-CJ)	<i>G. goetschi</i> Marcus	13	8	0.859	86	0.0292
Parque Estadual da Serra da Cantareira (13-EC)	<i>G. goetschi</i> Marcus	22	8	0.719	52	0.0138
Estação Biológica de Boraceia (16-BB)	<i>G. goetschi</i> Marcus	28	6	0.532	60	0.0267
Praia de Cambury (19-PC)	<i>G. goetschi</i> Marcus	42	23	0.956	48	0.0109
Parque Estadual de Intervalos (22-PI)	<i>G. goetschi</i> Marcus	44	10	0.811	34	0.0059
Parque Nacional de Saint-Hilaire / Lange (25-SL)	<i>G. goetschi</i> Marcus	15	7	0.724	14	0.0067
All localities	<i>G. goetschi</i> Marcus	180	66	0.967	202	0.0648
Parque Nacional da Serra dos Órgãos (07-SO)	<i>G. goetschi</i> Riester	45	16	0.615	70	0.0153
Parque Estadual da Serra da Cantareira (13-EC)	<i>G. goetschi</i> Riester	21	17	0.810	107	0.0143
All localities	<i>G. goetschi</i> Riester	66	23	0.804	152	0.0365
Reserva Biológica Augusto Ruschi (01-AR)	<i>Issoca</i> sp. nov.	24	7	0.804	14	0.0067
Parque Estadual do Desengano (04-ED)	<i>Issoca</i> sp. nov.	7	2	0.571	3	0.0021
All localities	<i>Issoca</i> sp. nov.	31	9	0.865	69	0.0302

Locality	Species	n	h	Hd	S ₁ / S ₂	π
ITS-1						
Parque Nacional da Serra da Bocaina (10-SB)	<i>G. goetschi</i> Marcus	14	3	0	2/3	0.0011
Campos do Jordão (11-CJ)	<i>G. goetschi</i> Marcus	11	8	0.891	21/24	0.0164
Parque Estadual da Serra da Cantareira (13-EC)	<i>G. goetschi</i> Marcus	11	3	0.455	19/20	0.0098
Estação Biológica de Boraceia (16-BB)	<i>G. goetschi</i> Marcus	20	3	0.511	7/12	0.0080
Praia de Cambury (19-PC)	<i>G. goetschi</i> Marcus	17	4	0.426	19/31	0.0071
Parque Estadual de Intervalos (22-PI)	<i>G. goetschi</i> Marcus	13	7	0.350	23/35	0.0148
Parque Nacional de Saint-Hilaire / Lange (25-SL)	<i>G. goetschi</i> Marcus	9	1	0	0/2	0
All localities	<i>G. goetschi</i> Marcus	95	23	0.688	57/114	0.0389
Parque Nacional da Serra dos Órgãos (07-SO)	<i>G. goetschi</i> Riester	23	7	0.462	8/12	0.0029
Parque Estadual da Serra da Cantareira (13-EC)	<i>G. goetschi</i> Riester	10	6	0.867	38/81	0.0433
All localities	<i>G. goetschi</i> Riester	33	7	0.509	39/95	0.0185
Reserva Biológica Augusto Ruschi (01-AR)	<i>Issoca</i> sp. nov.	25	4	0.230	8/17	0.0016
Parque Estadual do Desengano (04-ED)	<i>Issoca</i> sp. nov.	7	4	0.714	4/25	0.0058
All localities	<i>Issoca</i> sp. nov.	32	4	0.181	5/46	0.0077

h= number of haplotypes; π= nucleotide diversity; Hd= haplotype diversity; S₁= complete deletion
S₂=column by column

In general, the three surveyed species show high levels of genetic variation, with deep clades within the populations , similar to those found in *C. bergi*. Of these species *G. goetschi* sensu Marcus, with a wider distribution range, is the more informative to compare their patterns of variation with that found in *C. bergi*. Both species share the presence of genetically structured populations. These results, therefore, support the *C. bergi* conclusions, suggesting that SAF was not as unstable as was previously believed, and that the paleoclimatic models are not able to make reliable predictions in this region. Moreover, both species share the grouping of populations 16-BB and 19-PC. This relationship supports the idea of a secondary contact between 16-BB and 19-PC; since 19-PC lies close to the coast might have been influenced by sea level changes driven by Quaternary glaciations (Suguio and Martin, 1978).

There are, however, relevant differences across species. As stated above, the distribution patterns of nucleotide diversity and linkage disequilibrium results across populations differ among the 4 species (Tables 2 and 3). These results can reflect differences in the biology of the species, resulting in a distinct response to the same event, variations in their mobility or in the levels of gene flow (Zink et al. 2001; Fitzpatrick et al. 2009). For instance, the expansion of forests during the last glacial stage in São Paulo took place in

three distinct periods, each presenting a different floristic composition (Ledru et al. 2009). These forest expansions may be related to the community composition of land planarians,

Table 3. Summary of the neutrality tests for the COI gene

Population	Neutrality test						
	Tajima's D		Fu's F_s		Ramos-Onsins&Rozas R_2		
	n	D	95% CI	F_s	95% CI	R_2	95% CI
<i>Geoplana goetschi</i> sensu Marcus 1951							
Parque Nacional da Serra da Bocaina (10-SB)	16	1.814*	(-1.759 , 1.652)	11.206**	(-4.636 , 5.196)	0.210*	(0.086 , 0.202)
Campos do Jordão (11-CJ)	13	-0.821	(-1.766 , 1.655)	4.033*	(-3.685 , 5.081)	0.184	(0.872 , 1)
Parque Estadual da Serra da Cantareira (13-EC)	22	-0.989	(-1.755 , 1.711)	4.734*	(-5.528 , 5.826)	0.101	(0.076 , 0.191)
Estação Biológica de Boraceia (16-BB)	28	1.482*	(-1.714 , 1.778)	17.133**	(-6.113 , 6.121)	0.177*	(0.071 , 0.183)
Praia de Cambury (19-PC)	42	-0.957	(-1.673 , 1.861)	-4.344	(-6.681 , 7.163)	0.088	(0.059 , 0.173)
Parque Estadual de Intervalos (22-PI)	44	-1.406	(-1.683 , 1.826)	1.402	(-5.837 , 6.268)	0.095	(0.057 , 0.176)
Parque Nacional de Saint-Hilaire / Lange (25-SL)	15	0.780	(-1.789 , 1.714)	1.031	(-4.159 , 4.842)	0.178	(0.091 , 0.214)
<i>Geoplana goetschi</i> sensu Riester 1938							
Parque Nacional da Serra dos Órgãos (07-SO)	45	-0.874	(-1.643 , 1.741)	2.321	(-7.468 , 7.250)	0.086	(0.060 , 0.169)
Parque Estadual da Serra da Cantareira (13-EC)	21	-2.521**	(-1.709 , 1.721)	6.099**	(-5.345 , 5.516)	0.207**	(0.078 , 0.193)
<i>Issoca</i> sp. nov.							
Reserva Biológica Augusto Ruschi (01-AR)	24	1.670*	(-1.685 , 1.798)	2.655	(-4.869 , 5.318)	0.190*	(0.073 , 0.195)
Parque Estadual do Desengano (04-ED)	7	1.811*	(-1.524 , 1.811)	2.920*	(-2.159 , 3.643)	0.286	(0.143 , 0.350)

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

Population	Structure				
	n	Z_{ns}	Linkage Disequilibrium		
			95% CI	Wall's Q	95% CI
<i>Geoplana goetschi</i> sensu Marcus 1951					
Parque Nacional da Serra da Bocaina (10-SB)	16	0.690**	(0.116 , 0.589)	0.75**	(0 , 0.545)
Campos do Jordão (11-CJ)	13	0.468	(0.142 , 0.619)	0.457	(0.070 , 0.575)
Parque Estadual da Serra da Cantareira (13-EC)	22	0.505*	(0.094 , 0.530)	0.408	(0 , 0.506)
Estação Biológica de Boraceia (16-BB)	28	0.812**	(0.09 , 0.480)	0.8**	(0.037 , 0.437)
Praia de Cambury (19-PC)	42	0.12	(0.063 , 0.446)	0.233	(0 , 0.425)
Parque Estadual de Intervalos (22-PI)	44	0.294	(0.047 , 0.462)	0.25	(0 , 0.474)
Parque Nacional de Saint-Hilaire / Lange (25-SL)	15	0.343	(0.091 , 0.655)	0.154	(0 , 0.65)
<i>Geoplana goetschi</i> sensu Riester 1938					
Parque Nacional da Serra dos Órgãos (07-SO)	45	0.379	(0.066 , 0.437)	0.388*	(0 , 0.392)
Parque Estadual da Serra da Cantareira (13-EC)	21	0.943**	(0.098 , 0.536)	0.942**	(0 , 0.5)
<i>Issoca</i> sp. nov.					
Reserva Biológica Augusto Ruschi (01-AR)	24	0.460	(0.070 , 0.551)	0.5*	(0 , 0.552)
Parque Estadual do Desengano (04-ED)	7	1**	(0.028 , 1)	1**	(0 , 1)

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

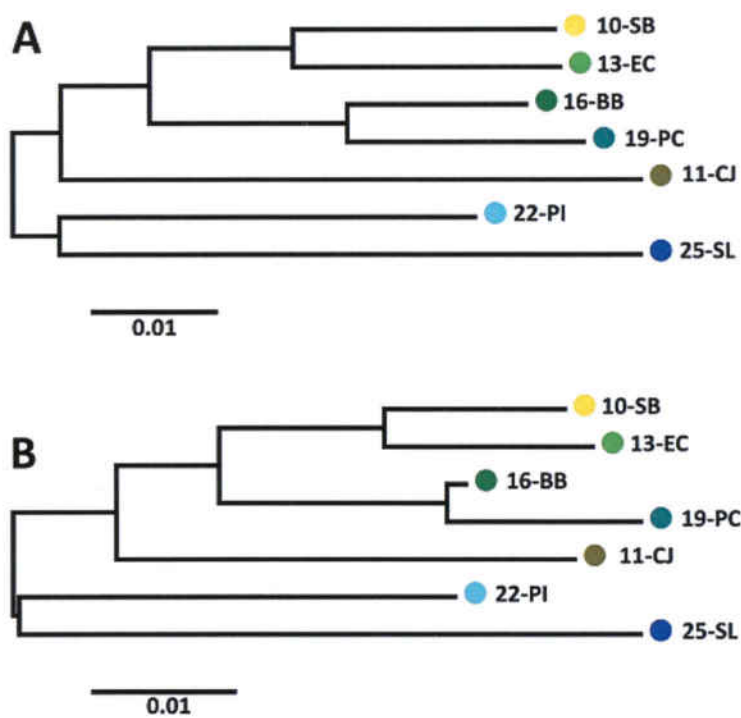


Figure 4. Neighbor-joining trees inferred from D_{xy} values (A) and D_a values (B) of the COI dataset and applying the Kimura-2-parameters correction.

closely linked to the presence of their habitat with each species perhaps related to a different type of forest. The fact that our focal species are not found in all sampled localities, being the sampling intensity equivalent, and that their distribution overlaps only in a few of them, may indicate differences in their ecological requirements. Another important point might be the different dispersal capability of these species. Sunnucks et al. 2006 proposed that certain differences in the composition and amount of mucus produced by two land planarians could affect their dispersal capabilities and therefore their diversity pattern distribution. Moreover, in another AF study comparing different species of small mammals, Costa (2003) found certain differences among taxa that were interpreted as caused by various vicariant events affecting differentially taxa at different times. Species with even similar ecological requirements, current distributions, effect of vicariant events, habitat fragmentation and dispersion rates, may exhibit different evolutionary histories (Marske et al. 2011), particularly in geologically dynamic environments as the AF. A more detailed comparative nucleotide diversity analysis of a number of land planarian species in a smaller region would be needed to clearly ascertain what are the main factors explaining the differences across species.

Even so, the differences found between species give further support to the idea that the evolutionary and demographic history of the SAF region has been very complex.

The levels and patterns of genetic variability found in all surveyed species here make it clear that current forests in the SE Brazilian AF have persisted for a long time (much more than predicted by palaeoclimatic models; Carnaval and Moritz, 2008). In any case, the high

	<i>Cephaloflexa bergi</i>		<i>Geoplana goetschi</i> Marcus		<i>Geoplana goetschi</i> Riester		<i>Issoca</i> sp. nov.	
Population	R_2	Z_{ns}	R_2	Z_{ns}	R_2	Z_{ns}	R_2	Z_{ns}
01-AR			—	—	—	—		
04-ED			—	—	—	—		
07-SO			—	—			—	—
10-SB					—	—	—	—
11-CJ	—	—			—	—	—	—
13-EC							—	—
16-BB					—	—	—	—
19-PC					—	—	—	—
22-PI					—	—	—	—
25-SL					—	—	—	—
28-SI			—	—	—	—	—	—
31-ST			—	—	—	—	—	—

Figure 5. Summary of significant results for the R_2 and Z_{ns} statistics calculated for COI dataset. Red colour represents evidence for genetic structure. Yellow figures indicate no significant results.

level of intraspecific variability is a factor that should be taken into account with regard to conservation policies (Hughes et al. 2005). The preservation of these areas is, therefore, necessary for the maintenance of present, past and future diversity.

References

- ÁLVAREZ-PRESAS, M., CARBAYO, F., ROZAS, J. and RIUTORT, M., 2011. Land planarians (Platyhelminthes) as a model organism for fine-scale phylogeographic studies: Understanding patterns of biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Journal of Evolutionary Biology*, **24**(4), pp. 887-896.
- CARNAVAL, A.C. and MORITZ, C., 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, **35**(7), pp. 1187-1201.
- COSTA, L.P., 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: A study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*, **30**(1), pp. 71-86.
- FITZPATRICK, S.W., BRASILEIRO, C.A., HADDAD, C. F. B. and ZAMUDIO, K. R., 2009. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Molecular Ecology*, **18**(13), pp. 2877-2896.
- HUGHES, M., MÖLLER, M., BELLSTEDT, D.U., EDWARDS, T.J. and DE VILLIERS, M., 2005. Refugia, dispersal and divergence in a forest archipelago: A study of *Streptocarpus* in eastern South Africa. *Molecular ecology*, **14**(14), pp. 4415-4426.
- LEDRU, M., MOURGUIART, P. and RICCOMINI, C., 2009. Related changes in biodiversity, insolation and climate in the Atlantic rainforest since the last interglacial. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **271**(1-2), pp. 140-152.
- MARCUS, E., 1951. Turbellaria Brasileiros (9). *Bol Fac Fil Ci Letr U Sao Paulo Zool*, **16**, pp. 1-217.
- MARSKE, K.A., LESCHEN, R.A.B. and BUCKLEY, T.R., 2011. Reconciling phylogeography and ecological niche models for New Zealand beetles: Looking beyond glacial refugia. *Molecular phylogenetics and evolution*, **59**(1), pp. 89-102.
- PETRI, S. and FÚLFARO, V.J., 1983. *Geologia do Brasil—Fanerozoico*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo.
- RIESTER, A., 1938. Beitrage zur Geoplaniden-Fauna Brasiliens. *Abh Senckenberg Naturforsch Ges*, **441**, pp. 88.
- SUGUIO, K. and MARTIN, L., 1978. Quaternary marine formations of the State of Sao Paulo and Southern Rio de Janeiro. *International Symposium on Coastal Evolution in the Quaternary 1978*, pp. 55.
- SUNNUCKS, P., BLACKET, M.J., TAYLOR, J.M., SANDS, C.J., CIAVAGLIA, S.A., GARRICK, R.C., TAIT, N.N., ROWELL, D.M. and PAVLOVA, A., 2006. A tale of two flatties: different responses of two terrestrial flatworms to past environmental climatic fluctuations at Tallaganda in montane south eastern Australia. *Molecular Ecology*, **15**(14), pp. 4513-4531.
- ZINK, R.M., KESSEN, A.E., LINE, T.V. and BLACKWELL-RAGO, R.C., 2001. Comparative phylogeography of some arid land bird species. *Condor*, **103**(1), pp. 1-10.

Table 1 Supplementary Data. Samples used in this study with sampling locality and GenBank Accession numbers.

Sampling locality	<i>Geoplane goetschi</i> Marcus 1951			<i>Geoplane goetschi</i> Riester 1938			<i>Issoca sp nov.</i>		
	Code	N. MZUSP ^a	COI	ITS-1	Code	N. MZUSP ^a	COI	ITS-1	Code
01-AR									
04-ED									
07-SO									

Table 1 Supplementary Data. continued

Sampling locality	Code	<i>Geoplana goetschi</i> Marcus 1951			<i>Geoplana goetschi</i> Riester 1938			<i>Issoca</i> sp. nov.		
		N. MZUSP ^a	COI	ITS-1	N. MZUSP ^a	COI	ITS-1	N. MZUSP ^a	COI	ITS-1
10-SB	F2039	MZSUP PL 287	HQ026403	HQ026442	F4227	MZSUP PL 874	?	?		
	F2045	MZSUP PL 288	HQ026404	HQ026443	F4229	MZSUP PL 876	?	?		
	F2046	MZSUP PL 289	HQ026405	HQ026444	F4230	MZSUP PL 877	?	?		
	F2051	MZSUP PL 290	HQ026406	HQ026445	F4231	MZSUP PL 878	?	?		
	F2059	MZSUP PL 291	HQ026407	HQ026446	F4232	MZSUP PL 879	?	?		
	F2060	MZSUP PL 292	HQ026408	HQ026447	F4233	MZSUP PL 880	?	?		
	F2061	MZSUP PL 293	HQ026409	HQ026448	F4234	MZSUP PL 881	?	?		
	F2063	MZSUP PL 294	HQ026410	HQ026449	F4235	MZSUP PL 882	?	?		
	F2066	MZSUP PL 295	HQ026411	HQ026450	F4236	MZSUP PL 883	HQ542893	?	?	
	F2096	MZSUP PL 297	HQ026412	HQ026451	F4238	MZSUP PL 885	?	?		
	F2097	MZSUP PL 298	HQ026413	HQ026452	F4239	MZSUP PL 886	?	?		
	F2098	MZSUP PL 299	HQ026414	HQ026453	F4240	MZSUP PL 887	?	?		
	F2099	MZSUP PL 300	HQ026415	HQ026454	F4242	MZSUP PL 889	?	?		
	F2833	MZSUP PL 404	HQ026439	HQ026467	F4243	MZSUP PL 890	?	?		
	F2841	MZSUP PL 406	HQ026422	HQ026469	F4244	MZSUP PL 891	?	?		
	F2848	MZSUP PL 409	HQ026425	HQ026472	F4245	MZSUP PL 892	?	?		
	F3747	MZSUP PL 787	?	?	F4246	MZSUP PL 893	?	?		
	F4527	MZSUP PL 1090	?	?	F4247	MZSUP PL 894	?	?		
11-CI					F4248	MZSUP PL 895	?	?		
					F4257	MZSUP PL 896	?	?		
					F4259	MZSUP PL 898	?	?		
					F4270	MZSUP PL 902	?	?		
					F4271	MZSUP PL 903	?	?		
					F4272	MZSUP PL 904	?	?		
					F4280	MZSUP PL 908	?	?		
					F4287	MZSUP PL 911	?	?		
					F4289	MZSUP PL 912	?	?		
					F4297	MZSUP PL 914	?	?		
					F4312	MZSUP PL 927	?	?		

Table 1 Supplementary Data. continued

Sampling locality	Code	Geoplana goetschi Marcus 1951 N. MZUSp ^a	COI	ITS-1	Code	Geoplana goetschi Riester 1938 N. MZUSp ^a	COI	ITS-1	Code	Issoca sp nov. N. MZUSp ^a	COI	ITS-1
13-EC	F4529	MZUSP PL 1092	-	?	F1769	MZUSP PL 1145	?	-				
	F4530	MZUSP PL 1093	?	?	F2867	MZUSP PL 410	?	?				
	F4531	MZUSP PL 1094	?	?	F2868	MZUSP PL 411	?	-				
	F4561	MZUSP PL 1095	?	?	F2870	MZUSP PL 412	?	-				
	F4570	MZUSP PL 1096	?	?	F2912	MZUSP PL 419	?	-				
	F4579	MZUSP PL 1097	?	-	F2927	MZUSP PL 420	HQ542888	-				
	F4586	MZUSP PL 1098	?	?	F2931	MZUSP PL 421	?	-				
	F4587	MZUSP PL 1099	?	?	F3049	MZUSP PL 478	?	-				
	F4590	MZUSP PL 1100	?	?	F3707	MZUSP PL 773	HQ542892	?				
	F4595	MZUSP PL 1101	?	?	F3708	MZUSP PL 774	?	-				
	F4597	MZUSP PL 1102	?	?	F3711	MZUSP PL 775	?	?				
	F1754	MZUSP PL 1141	?	?	F3714	MZUSP PL 776	?	?				
	F1760	MZUSP PL 1142	?	-	F3716	MZUSP PL 777	?	?				
	F1762	MZUSP PL 1143	?	-	F3717	MZUSP PL 778	?	-				
	F1763	MZUSP PL 1144	?	?	F3718	MZUSP PL 779	?	-				
	F2883	MZUSP PL 413	?	?	F3719	MZUSP PL 780	?	?				
	F2885	MZUSP PL 414	?	?	F3726	MZUSP PL 781	?	?				
	F2887	MZUSP PL 415	?	-	F3729	MZUSP PL 782	?	-				
	F2888	MZUSP PL 416	?	?	F3730	MZUSP PL 783	?	-				
	F2889	MZUSP PL 417	?	?	F3733	MZUSP PL 784	?	?				
	F2893	MZUSP PL 463	?	-	F3740	MZUSP PL 785	?	-				
	F2895	MZUSP PL 464	?	?	F3746	MZUSP PL 786	?	?				
	F2900	MZUSP PL 465	?	-								
	F2904	MZUSP PL 466	?	?								
	F2906	MZUSP PL 467	?	-								
	F2907	MZUSP PL 468	?	?								
16-BB	F2911	MZUSP PL 469	?	?								
	F2916	MZUSP PL 542	?	-								
	F2994	MZUSP PL 543	?	?								
	F3002	MZUSP PL 544	?	?								
	F3558	MZUSP PL 554	?	-								
	F3559	MZUSP PL 555	?	-								
	F2122	MZUSP PL 329	HQ542884	HQ542897								
	F2123	MZUSP PL 330	?	?								
	F2125	MZUSP PL 331	?	?								
	F2126	MZUSP PL 332	HQ026417	HQ026456								
	F2127	MZUSP PL 333	HQ026418	HQ026457								
	F2129	MZUSP PL 334	?	-								
	F2132	MZUSP PL 335	?	-								
	F2133	MZUSP PL 336	HQ542885	HQ542898								
	F4101	MZUSP PL 810	?	-								
	F4106	MZUSP PL 812	?	-								
	F4128	MZUSP PL 824	?	?								
	F4129	MZUSP PL 825	?	?								
	F4130	MZUSP PL 826	?	-								
	F4131	MZUSP PL 827	?	?								

Table 1 Supplementary Data. continued

Sampling locality	Code	Geoplana goetschi Marcus 1951		ITS-1	Geoplana goetschi Riestler 1938		ITS-1	Code	Issoca sp nov.	
		N. MZUSP ^a	COI		N. MZUSP ^a	COI			N. MZUSP ^a	COI
19-PC	F4133	MZSUP PL 829	?	?						
	F4152	MZSUP PL 834	?	?						
	F4153	MZSUP PL 835	?	?						
	F4154	MZSUP PL 836	?	?						
	F4155	MZSUP PL 837	?	?						
	F4156	MZSUP PL 838	?	?						
	F4157	MZSUP PL 839	?	?						
	F4158	MZSUP PL 840	?	?						
	F4159	MZSUP PL 841	?	?						
	F4160	MZSUP PL 842	?	?						
	F4161	MZSUP PL 843	?	?						
	F4162	MZSUP PL 844	?	?						
	F4163	MZSUP PL 845	?	?						
	F4340	MZSUP PL 942	?	-						
	F4341	MZSUP PL 943	?	-						
	F4342	MZSUP PL 944	?	-						
	F4343	MZSUP PL 945	?	-						
	F4344	MZSUP PL 946	?	-						
	F4345	MZSUP PL 947	?	-						
	F4346	MZSUP PL 948	?	?						
	F4347	MZSUP PL 949	?	?						
	F4348	MZSUP PL 950	?	-						
	F4360	MZSUP PL 956	?	-						
	F4361	MZSUP PL 957	?	?						
	F4362	MZSUP PL 958	?	?						
	F4363	MZSUP PL 959	?	-						
	F4364	MZSUP PL 960	?	?						
	F4365	MZSUP PL 961	?	-						
	F4366	MZSUP PL 962	?	-						
	F4367	MZSUP PL 963	?	-						
	F4368	MZSUP PL 964	?	-						
	F4369	MZSUP PL 965	?	?						
	F4370	MZSUP PL 966	?	?						
	F4371	MZSUP PL 967	?	?						
	F4372	MZSUP PL 968	?	?						
	F4373	MZSUP PL 969	?	-						
	F4374	MZSUP PL 970	?	?						
	F4375	MZSUP PL 971	?	?						
	F4376	MZSUP PL 972	?	?						
	F4377	MZSUP PL 973	?	-						
	F4381	MZSUP PL 976	?	-						
	F4382	MZSUP PL 977	?	-						
	F4383	MZSUP PL 978	?	?						
	F4384	MZSUP PL 979	?	-						
	F4385	MZSUP PL 980	?	-						
	F4386	MZSUP PL 981	?	-						
	F4387	MZSUP PL 982	?	?						

Table 1 Supplementary Data. continued

Sampling locality	Code	<i>Geoplana goetschi</i> Marcus 1951 N. MZUSP ^a	COI	ITS-1	Code	<i>Geoplana goetschi</i> Rießer 1938 N. MZUSP ^a	COI	ITS-1	Code	<i>Issoca</i> sp nov. N. MZUSP ^a	COI	ITS-1
25-SL	F3781	MZSUP PL 610	?	-								
	F3783	MZSUP PL 612	?	-								
	F3784	MZSUP PL 613	?	-								
	F3785	MZSUP PL 614	?	-								
	F1699	MZSUP PL 1133	?	-								
	F1704	MZSUP PL 264	HQ026402	HQ026441								
	F1711	MZSUP PL 1134	?	?								
	F1713	MZSUP PL 256	?	?								
	F1717	MZSUP PL 1135	?	?								
	F1718	MZSUP PL 1136	?	?								
	F1720	MZSUP PL 1137	?	-								
	F1721	MZSUP PL 1138	?	?								
	F1722	MZSUP PL 1139	?	?								
	F3575	MZSUP PL 556	?	?								
	F3581	MZSUP PL 557	HQ026430	HQ026477								
F3591	MZSUP PL 561	?	-									
F3592	MZSUP PL 562	?	-									
F3598	MZSUP PL 563	?	-									
F3603	MZSUP PL 564	?	-									
01-AR= R. B. Augusto Ruschi/ ES; 04-ED= P.E. do Desengano/ RJ; 07-SO= P.N.S. dos Orgãos/ RJ; 10-SB= P.N.S. da Bocaina/ SP; 11-CI= Campos de Jordão/ SP; 13-EC= P.E.S. da Cantareira/ SP; 16-BB= E.B. de Boracéia/ SP; 19-PC= Praia de Canbury/ SP; 22-PI= P.E. Intervalos/ SP; 25-SL= Parque Saint Hilaire/ PR												
? GenBank accession number not yet available												
Sequence not obtained												

Outgroups

Sampling locality	Species	Code	N. MZUSP ^a	COI	ITS-1
Parque Saint Hilaire (25-SL) / PR	<i>Issoca rezendei</i>	F1679	MZSUP PL 1010	-	?
FLONA* / RS	<i>Notogynopholia guaiana</i>	F432	MZUSP PL 653	HQ542894	?
		F3361	MZUSP PL 1071	HQ542896	?
		F2813	MZSUP PL 403	?	?
P.N.S. da Bocaina (10-PB) / SP	<i>Posipha chimbewa</i>	F3010	MZSUP PL 476	?	?
P.E.S. da Cantareira (13-EC) / SP					

*Floresta Nacional de São Francisco de Paula

^aVouchers are deposited in the Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP)

CAPÍTOL 5

Evidence of the persistence of the land planarian species *Microplana terrestris* (Müller, 1974) (Platyhelminthes, Tricladida) in microrefugia during the Last Glacial Maximum in the northern section of the Iberian Peninsula

*Evidències de la persistència de la planària terrestre *Microplana terrestris* (Müller, 1974) (Platyhelminthes, Tricladida) en microrefugis durant l'Últim Màxim Glacial a la regió nord de la Península Ibèrica*

Marta Álvarez-Presas, Eduardo Mateos, Miquel Vila-Farré, Ronald Sluys i Marta Riutort

(en preparació)

Resum

Les planàries terrestres (Tricladida, Continenticola, Geoplanidae) són platihelminths de vida lliure, incloent animals amb un plexe nerviós ventral auxiliar i una sola ventral diferenciada. Tot i que són poc conegudes, especialment a Europa, presenten característiques interessants que les situen com a bons bioindicadors. En un treball anterior sobre la diversitat de planàries terrestres a la Península Ibèrica, es va trobar que aquesta diversitat era més gran del què s'esperava. En aquest estudi ens centrem en *Microplana terrestris* (Müller, 1774), una espècie de planària terrestre que presenta una àmplia distribució a la part nord de la Península Ibèrica. Mitjançant la combinació de dades morfològiques (tant de l'anatomia externa com interna) i d'anàlisis moleculars (el gen mitocondrial citocrom oxidasa I i el nuclear ITS-1) hem avaluat l'estat taxonòmic d'aquesta espècie a la Península i hem inferit la seva història evolutiva i biogeogràfica. Els nostres resultats mostren que l'espècie està genèticament molt estructurada, presumiblement com a conseqüència d'haver sobreviscut en diversos refugis durant l'Últim Màxim Glacial. Els dos grups principals en què es divideix l'espècie a la Península Ibèrica (est i oest) semblen tenir un origen diferent: un és d'origen ibèric, mentre que l'altre pot venir d'una recolonització des del nord. També trobem que la història biogeogràfica de l'espècie reforça la hipòtesi filogeogràfica presentada per el seu hàbitat, és a dir, els boscos humits.

Evidence for the persistence of the land planarian species *Microplana terrestris* (Müller, 1774) (Platyhelminthes, Tricladida) in microrefugia during the Last Glacial Maximum in the northern section of the Iberian Peninsula

Marta Álvarez-Presas¹, Eduardo Mateos², Miquel Vila-Farré¹, Ronald Sluys³ and Marta Riutort¹

¹Departament de Genètica i Institut de Recerca de la Biodiversitat (IRBio), Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643 E-08028, Spain

²Departament de Biologia Animal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

³Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics, University of Amsterdam & Netherlands Centre for Biodiversity Naturalis (section ZMA), P.O. Box 9514, 2300 RA Leiden, The Netherlands

Abstract

This study focuses on *Microplana terrestris* (Müller, 1774), a species of land planarian that shows a wide distribution in the northern part of the Iberian Peninsula. By combining morphological data (both external and internal anatomy) and molecular analyses (mitochondrial cytochrome oxidase I and nuclear ITS-1 genes) we evaluate the taxonomic status of this species in the Peninsula as well as estimate its evolutionary and biogeographic history. Our results show the species to be genetically structured, presumably as a consequence of having survived in various refuges during the Last Glacial Maximum. The two main groups, in which the species is divided in the Iberian Peninsula, seem to have a different origin: one being of Iberian origin, while the other may have re-colonized from the north. We also find that the biogeographical history of the species reinforces the phylogeographical hypothesis put forward for its habitat, i.e. wet forests.

Keywords: beech, COI, ITS-1, oak, phylogeography, wet forest.

Introduction

The terrestrial flatworms (Tricladida, Geoplanidae) constitute a little known group of free-living Platyhelminthes including about eight hundred known species, although this number is presumably a small fraction of the total diversity of the group (Carbayo and Froehlich, 2008; Mateos et al., 2009; Vila-Farré et al., 2011). In recent years, extensive samplings, morphological studies and the application of molecular tools have revealed that the diversity of planarians is higher than presumed, not only in areas as the Atlantic Forest in Brazil, where many species were already known (Carbayo and Froehlich, 2008), but also in the Iberian Peninsula (Mateos et al., 2009; Vila-Farré et al., 2008; Vila-Farré et al., 2011). Terrestrial planarians are part of the cryptic soil fauna, making them hard to find with the usual sampling techniques, which is why there is a lack of knowledge about their distribution, origin of their populations and levels of genetic diversity. Nonetheless, their study may unveil the factors and processes generating and maintaining diversity due to their special characteristics: soil in humid

forests as preferred habitat, low dispersal capability since they depend on the wet soil and have no resistant life stages, top predators that rely on the availability of suitable prey. Hence, the distribution of terrestrial planarians requires the presence and good condition of wet forests, suggesting that they may be good indicators of forests health (Carbayo et al., 2002; Sluys, 1999) and also an excellent model for phylogeographic studies (Álvarez-Presas et al., 2011; Sunnucks et al., 2006).

Microplana terrestris (Müller, 1774) is the most common terrestrial planarian in Europe. It has a wide European distribution: from Norway to Spain and from Portugal to Romania, including the British Isles, and the islands of Crete, Madeira and Menorca (Ogren et al., 1997; Minelli, 1997; Kawakatsu et al., 2003; Fauna Europaea Web Service, 2004; Vila-Farré et al., 2011). It has been recorded also from Iceland (Lindroth et al., 1973), and from the USA and Canada (see references in Ogren and Kawakatsu, 1989). Semper (1881) cited *M. terrestris* (as *Planaria terrestris*) from Menorca (Balearic Islands, Spain), and its presence in mainland Spain has been documented both by molecular (Mateos et al., 2009) and morphological evidences (Vila-Farré et al., 2011). In those studies it was shown that the species has a

Corresponding author: Marta Riutort, Departament de Genètica i Institut de Recerca de la Biodiversitat (IRBio), Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal, 643, E-08028, Barcelona, Spain. E-mail: mriutort@ub.edu

wide distribution in the northern part of the Iberian Peninsula, where it was found with a high frequency, although several other species were also present. The external morphology of live *Microplana terrestris* specimens is rather characteristic (Jones, 2005; Jones et al., 2008; Johns, 1998): up to 2 cm long, 1-2 mm wide, grey or black body color, white ventral creeping sole, plump and round in cross-section when extended, anterior end blunt, with two little lateral eyes at the apical end. Also, its internal anatomy is well known (Bendl, 1908; Jones et al., 2008; Minelli, 1977; Von Kennel, 1882). Vila-Farré et al. (2011) mentioned the possible presence of interpopulation variability or cryptic species in Iberian specimens of *M. terrestris*. This variability consisted in the presence or absence of two small structures under the intestine and above the penis papilla, lined with an epithelium that is histologically very similar to that of the copulatory bursa and the genito-intestinal duct (here called "intestinal structure" or "is").

Microplana terrestris feeds mainly on molluscs, but also on earthworms and arthropods (McDonald and Jones, 2007; Winsor et al., 2004) and it is very sensitive to changes in climatic conditions and highly dependent on very specific habitats (Jones, 2005): microhabitats in forest soils with moderate temperatures and with a high humidity during part of the year. In the Iberian Peninsula these conditions

are found in forests composed of various *Quercus* species, riverbank forests, and *Fagus sylvatica* forests, most of these being situated in the northern third of the Peninsula (Blanco-Castro et al., 2005). Beech and oak forests have been extensively studied in Europe, based on pollen registers and genetic variability and thus a good account of their history through glacial periods is available (Magri et al., 2006; Magri, 2008; Petit et al., 2002a; Petit et al., 2002b). These studies show a complex genetic structure with several refugia being present in southern and central Europe. A general trend can be recognized among both groups of trees in the Iberian Peninsula. There were small scattered refugia, only in the north for *Fagus*, and during the Holocene the re-colonization resulted in a differentiation among the eastern and western regions in the Peninsula. Although the story for the two types of trees is slightly different, *Fagus* practically did not cross the Pyrenees to the north, whereas oaks crossed in different directions in the west and the east. All of this suggests the presence of two biogeographic regions in the northern Iberian Peninsula (Blanco-Castro et al., 2005). As Petit et al. (2002b) pointed out, it would be very interesting to find out whether this biogeographic break is paralleled in species having ranges encompassing both regions. In the case of terrestrial planarians, given their dependence on the presence of humid

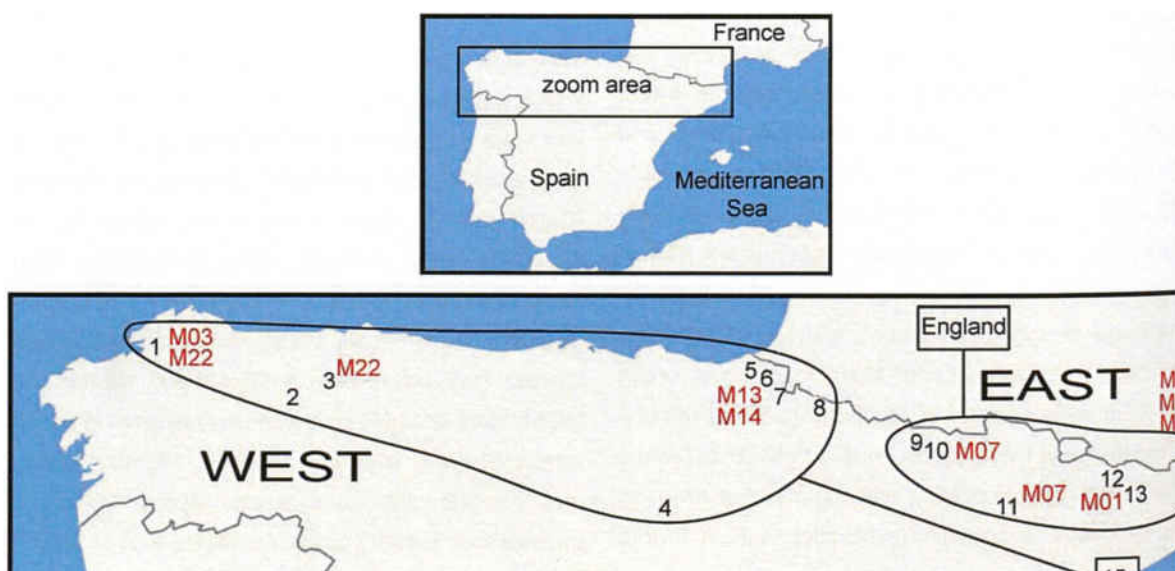


Figure 1. Area sampled in this study. Numbers indicate the localities where *Microplana terrestris* has been found (see Table 1 for the exact location of the different sampling sites within each locality). M## codes indicate other morphotypes present along with *M. terrestris* in the localities (see Table 1).

Table 1. Information on the 24 localities from where *Microplana terrestris* was collected. Localities of *Microplana robusta* (outgroup) are also shown.

Species	Province	Nearest town	Habitat	Coordinates (Lat. / Long.)	Altitude (m)	Sampling point Code	Loc Map	Ind coll Tot (M02)	Sp	Code sp
<i>M. terrestris</i>	A Coruña Asturias	Pontedeume	O	N 43.4171850 W 8.0635630	60	C015	1	26 (13)	3	Mt,M03,M22
		Cangas de Narcea	B	N 42.9997720 W 6.5936126	750	A223	2	1 (1)	1	Mt
		Pola de Somiedo	B, G	N 43.0766519 W 6.2309621	939	A218	3	3 (2)	2	Mt,M22
		Pola de Somiedo	O+B, G	N 43.1353527 W 6.3351729	640	A220	3	4 (1)	2	Mt,M22
		Pola de Somiedo	B+C, G	N 43.1246550 W 6.3256448	699	A221	3	1 (1)	1	Mt
		Pola de Somiedo	O+B, G	N 43.1536057 W 6.2520901	600	A222	3	1 (1)	1	Mt
	Logroño	Sierra de Cameros	B	N 42.0462600 W 2.6854500	1240	L048	4	4 (4)	1	Mt
		Lesaka	B	N 43.2732540 W 1.7751050	250	N060	5	2 (2)	1	Mt
	Navarra	Etxalar	B, G	N 43.2406460 W 1.6621930	80	N021	6	7 (2)	3	Mt,M13,M14
		Etxalar	B	N 43.2425460 W 1.6290700	80	N061	6	1 (1)	1	Mt
		Irurita	B	N 43.1130560 W 1.5388890	270	N062	7	1 (1)	1	Mt
		Isaba	B, G	N 42.8778350 W 0.8626350	1070	N034	8	1 (1)	1	Mt
		Torla	B	N 42.6483717 W 0.0664648	1320	H201	9	1 (1)	1	Mt
		Bielsa	B	N 42.6661755 E 0.0944698	1270	H200	10	3 (2)	2	Mt,M07
	Lleida	Cellers	HO	N 42.0665830 E 0.9017880	490	E023	11	4 (1)	2	Mt,M07
		Ribes de Freser	B	N 42.3112354 E 2.1995157	1060	G166	12	5 (4)	2	Mt,M01
	Girona	Pardines	B	N 42.3103879 E 2.2307683	1263	G167	12	2 (2)	1	Mt
		Planoles	P, G	N 42.3120895 E 2.1080712	1083	G212	12	10 (10)	1	Mt
		Toses	P	N 42.3229707 E 2.0490798	1283	G213	12	1 (1)	1	Mt
		Vallfogona de Ripollès	P+O+HA	N 42.1921964 E 2.2594213	831	G214	13	1 (1)	1	Mt
		Vallfogona de Ripollès	B+HA	N 42.1861406 E 2.2594109	880	G215	13	2 (2)	1	Mt
		Vallfogona de Ripollès	B	N 42.1932569 E 2.2910862	864	G217	13	1 (1)	1	Mt
<i>M. robusta</i>	Barcelona	Rabòs d'Empordà	HO, G	N 42.4642340 E 3.0570140	380	G006	14	10 (1)	4	Mt,M05,M07,M10
		Les Planes	HO, G	N 41.4379040 E 2.0567650	135	B002	15	1 (1)	1	Mt
	A Coruña	Pontedeume	O	N 43.4171850 W 8.0635630	60					
		P.N. Peneda Gerês (Portugal)	O	N41.7914574 W8.13771240	696					
	Gerês									

Legend. Ind coll indicates the total number of specimens found in the locality and, in parentheses, how many belonged to *M. terrestris*; Sp indicates the number of genetic clades detected in the molecular phylogenetic analysis; Code sp shows the morphotypes of the individuals not belonging to *Microplana terrestris* (Mt), codes M01 to M07 sensu Mateos et al. (2009), codes M10 to M22 are new morphotypes not previously described; Habitat HO: holm-oak; O: oak; B: beech; P: Pine; HA: hazel; C: chestnut; G: gallery forest.

forests, we expect their distributional history to be correlated with the refugial history of the wet forests.

For the present study, we have performed an intense sampling of terrestrial planarians in the northern part of the Iberian Peninsula, particularly in order to document the prevalence of *M. terrestris* in that region. Further, we have performed a morphological analysis of some adult specimens, and have analysed the genetic variability of two molecules (ITS-1 and COI) in order to examine whether there is any correlation between anatomical and molecular variability. Moreover, we have estimated the population structure of *M. terrestris* at the genetic level and its correlation to its habitat history.

Material and Methods

Study region and specimens

From 1996 to 2010, 68 sites located along an east-west transect in the northern Iberian Peninsula were sampled in search of terrestrial planarians, in particular *M. terrestris*. The habitats sampled were moist forest floors (beech, oak, gallery forests) and the methodology used was direct searches under rocks and fallen logs. All terrestrial planarians collected were placed in square plastic containers (5 x 5 cm) that had been previously filled with wet soil from the sampling sites. These containers were kept cool and were transported to the laboratory, where each individual flatworm was photographed and its external morphological characters recorded. Specimens were classified into morphospecies, according to Mateos et al. (2009). Subsequently, animals were fixed in 100 % alcohol for molecular analyses or were cut into two fragments. A small anterior portion was preserved for DNA analysis and the rest of the animal was fixed in Steinmann's fluid and then preserved in alcohol 70% for anatomical studies.

Morphological analysis

Fragments fixed in Steinmann's fluid and preserved in 70% alcohol were cleared in clove oil, dehydrated in an ascending series of alcohol

concentrations, and then embedded in synthetic paraffin wax, cut at intervals of 5–7 μ m, and mounted on albumen-coated slides. The sections were stained in Mallory–Heidenhain (cf. Sluys, 1989) or Harris haematoxylin (cf. Humason, 1967) and mounted in DePeX. Reconstructions of the copulatory apparatus were obtained using a camera lucida attached to a compound microscope. Vouchers are deposited in the Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics (University of Amsterdam, The Netherlands).

DNA extraction, gene amplification and sequencing

Specimens preserved in 100% ethanol were used for DNA extraction with the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). A small piece of tissue in lysis buffer and Proteinase K was digested overnight previous to the next extraction steps indicated by the manufacturer. In the case of the specimens used also by Mateos et al. (2009), DNA was re-extracted from the remaining tissue kept in the Animal Biology Department (Universitat de Barcelona). An approximately 1kb fragment of the cytochrome c oxidase I (COI) gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR), extending the length of the sequence already amplified for the Mateos et al. (2009)' specimens. We used the following primers: BarS: GTTATGCCTGTAATGATTG (Álvarez-Presas et al., 2011) and COIR: CCWGTYARMCCCHCCWAYAGTAAA (Lázaro et al., 2009). We also used internal primers, COIF: CCNGGDDTTGGDATDRTWTCWCA, and BBC: CCAAAGAAAAATCCTTNCC (Álvarez-Presas et al., 2011) to obtain better quality sequences from the DNA fragments. The nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS-1) fragment was amplified using the primers ITS9F: GTAGGTGAACCTGCGGAAGG and ITSr: TGCGTTCAAATTGTCAATGATC (Baguña et al., 1999). ITS-1 sequences had a final length of ~500 bp. For COI, PCR conditions using Go Taq® DNA Polymerase (Promega) and the DNA template were as follows: an initial denaturation step of 2 min at 95°C followed by 30 cycles of 50 s at 94°C, 45 s at 43°C, and 50 s at 68°C, and a final extension of 4 min at 68°C, on 25 μ L volume. In the case of ITS-1 the PCR conditions were an initial denaturation step of 5 min at 94°C

followed by 30 cycles of 45 s at 94°C, 30 s at 54°C, and 50 s at 72°C, and a final extension of 4 min at 72°C, on a 25 µL volume. Amplification products were purified with a vacuum manifold (Multiscreen®HTS Vacuum Manifold, Millipore Corporation, Billerica, MA 01821 U.S.A). DNA sequences were determined from both strands by using Big-Dye (3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the reaction products were separated on the ABI Prism 3730 automated sequencer (Unitat de Genòmica dels Serveis Científic-Tècnics de la UB).

Molecular species identification

Specimens were first classified into morphospecies by their external appearance. Unfortunately, most specimens were not big enough to be cut into two pieces (and thus to be analysed both anatomically and molecularly), and from those that could, only a small proportion turned out to be sexually mature. Therefore, we used COI barcodes to determine the taxonomic status of the specimens. We included in a RaxML Maximum Likelihood analysis all the individuals collected, independently of the morphotype assigned by external appearance. Additionally we included sequences from *Microplana nana* Mateos et al. 1998 (GenBank FJ969947, 48), *Microplana kwiskea* Jones et al. 2008 (GenBank EU334574, 76), *Microplana scharffi* (Graff, 1896) (GenBank DQ666044) and *Rhynchodemus* species (GenBank FJ969946); and seven specimens

morphologically identified as *Microplana terrestris* (Hugh Jones, personal communication) from England. The last-metioned animals were collected from under boards in a domestic garden near Thirsk, Yorkshire (Ordnance Survey grid reference: SE378848, UK; McDonald and Jones, 2007). One of these individuals had been used in a previous study by Jones et al. (2008; GenBank EU334581).

Data analysis

Mitochondrial coding DNA sequences were aligned using the translated amino acid sequences. A multiple alignment was obtained by Clustal W as implemented in Bioedit v.7.0.9.0. program (Hall, 1999). All sequences were unambiguously aligned. For ITS-1 sequences, the alignment was obtained using MAFFT version 6 (Katoh et al., 2009) with the default options. We estimated the DNA sequence evolution model that better fits the data using jModelTest 0.1.1. (Posada, 2008), applying the Akaike information criterion (AIC). Phylogenetic relationships were estimated by ML (using RAXML 7.0.0 software; Stamatakis, 2006) and Bayesian Inference (BI) (using MrBayes v. 3.1.2.; Ronquist & Huelsenbeck, 2003) methods. The best-fit model of sequence evolution for COI yielded TPM2uf+ Γ. However, HKY + Γ had the next highest likelihood and AIC scores. Therefore we used HKY + Γ in the Bayesian analyses for its easier implementation. In the case of Maximum Likelihood, RaxML only implements

Table 2. Summary of nucleotide diversity estimates

Province (Locality)		n	No. of haplotypes	Haplotype diversity (Hd)	No. of polymorphic sites	Nucleotide diversity (π)
West	COI					
	Coruña (1)	13	3	0.513	8	0.0027
	Asturias (2,3)	6	3	0.600	7	0.0033
	Logroño (4)	4	2	0.500	1	0.0006
	Navarra (5,6,7,8)	7	6	0.952	29	0.0108
East	Huesca (9,10)	3	3	1.000	7	0.0057
	Girona (12,13,14)	22	7	0.541	16	0.0023
	England	7	3	0.667	5	0.0030
	Western IP	30	12	0.800	43	0.0141
	Eastern IP	26	11	0.674	18	0.0031
	All localities	64	24	0.883	60	0.0210
West	ITS-1					
	Coruña (1)	10	5	0.844	3	0.0025
	Asturias (2,3)	6	1	0.000	0	0.0000
	Logroño (4)	4	2	0.667	2	0.0025
	Navarra (5,6,7,8)	5	2	0.600	1	0.0011
East	Huesca (9,10)	3	1	0.000	0	0.0000
	Girona (12,13)	21	2	0.095	1	0.0002
	England	3	2	0.667	1	0.0012
	Western IP	26	4	0.403	3	0.0009
	Eastern IP	24	2	0.083	1	0.0002
	All localities	54	5	0.242	4	0.0006

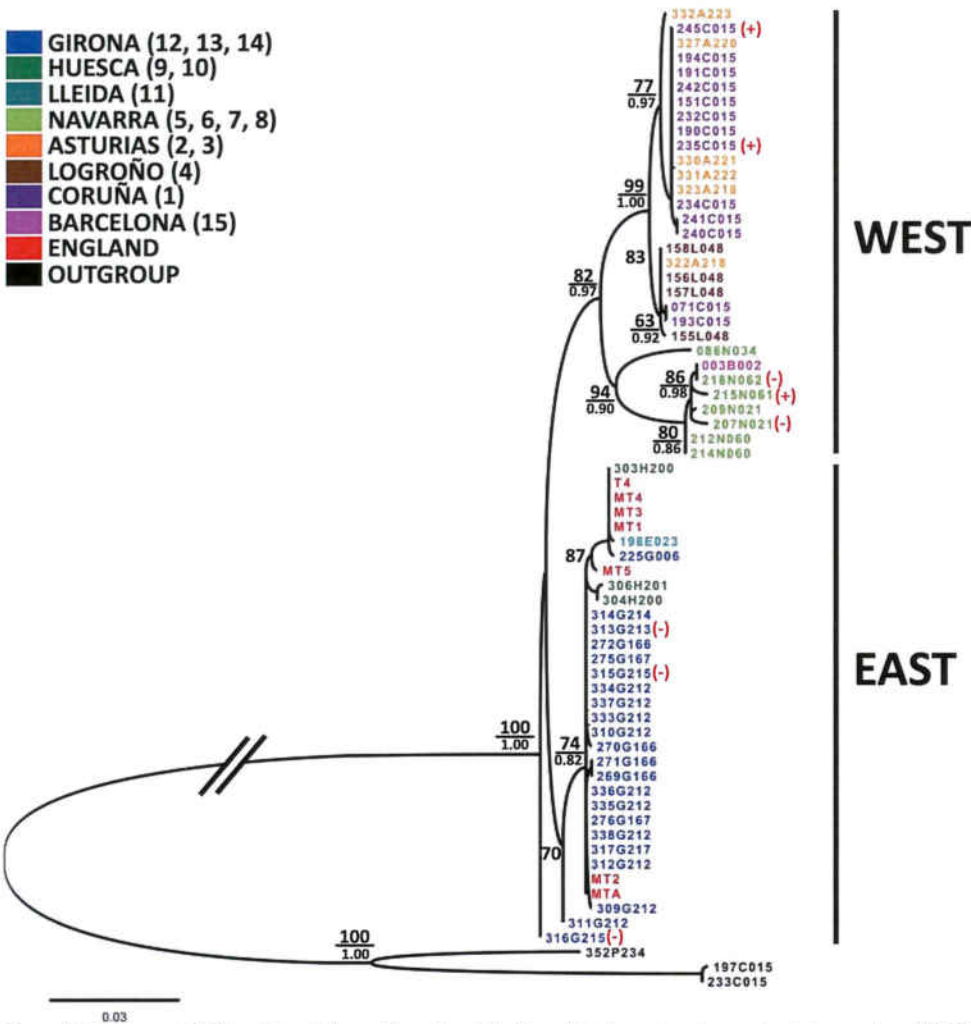


Figure 2. Maximum Likelihood tree inferred from the COI dataset. Values at nodes are bootstrap values (10,000 replicates) (above) and Posterior Probabilities (below). Scale bar represents number of substitutions per site. The (+) and (-) indicate presence or absence of the “intestinal structure” on those individuals that could be studied morphologically. The legend indicates the locality colour code. Taxon labels are the same as in supplementary Table 1.

the GTR nucleotide substitution model, so we used the GTR + Γ model. Bootstrap support (BS) values (Felsenstein, 1985) were obtained for ML trees from 10,000 replicates. Three million generations were run using the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) analysis in two independent runs for the BI. Sampling was every 1,000 generations and 3,000 trees were saved. Log likelihood values of the cold chains were checked and we verified convergence among runs. The first 20,000 generations for COI were removed as burn-in and 15,000 for ITS-1; a 50% majority rule consensus tree was generated from the remaining trees in both cases. For both markers we produced Median Joining Networks (Bandelt et al., 1999), using NETWORK 4.5.1.6.

Kimura-2-parameters (K2P) genetic

distances were calculated with MEGA5 (Tamura et al., 2011). For population genetic analyses the program DnaSP v5.10 (Librado and Rozas, 2009) was used. We joined in some cases sequences from geographically close localities. We excluded from those analyses sampling points represented by only one individual and that are geographically distant from any other locality: Les Planes (sampling point B002, Barcelona), Rabòs d’Empordà (G006, Girona), and Cellers (E023, Lleida). We estimated haplotype (H_d) and nucleotide diversity (π ; Nei, 1987); through the D_{xy} parameter (Nei, 1987) levels of DNA divergence among populations were examined. For both markers we applied three neutrality tests to determine whether the DNA polymorphism observed was expected under the neutral hypothesis (Tajima’s

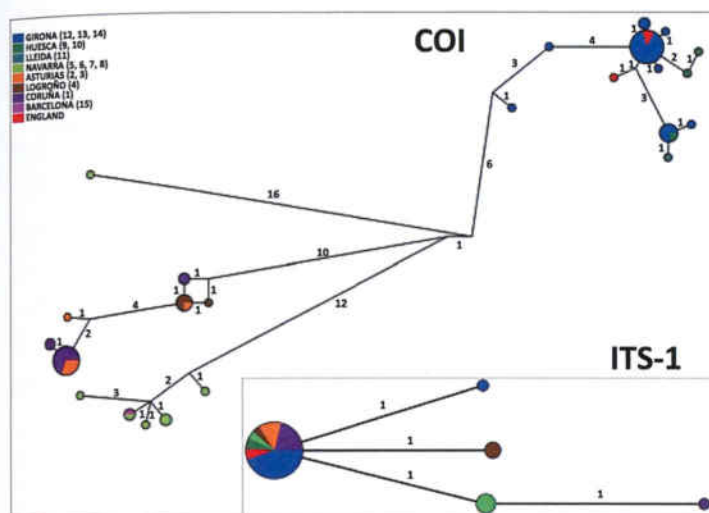


Figure 3. Median joining network of the mitochondrial haplotypes and ITS-1 alleles (inset).

D , Tajima, 1989; Fu's F_s , Fu, 1997 and R_2 , Ramos-Onsins and Rozas, 2002). Their statistical significance was estimated by coalescence computer simulations.

A Mantel Test was conducted to test whether populations showed the isolation-by-distance pattern. We used the F_{st} genetic distances and the log of the geographic distances in km, using the Isolation by Distance Web Service 3.16 (Jensen et al., 2005).

Results

Field collection, species identification and distribution

M. terrestris was detected in 24 of the 68 sampling sites, belonging to 15 Spanish localities situated in Coruña, Asturias, Logroño, Navarra, Huesca, Barcelona, Lleida and Girona (Table 1, Fig. 1) and represented 64.52% of the total number of terrestrial planarians found at these localities. Twenty-nine *M. terrestris* were fixed for morphological and molecular analyses; unfortunately, 21 were juveniles. Also, some of the 60 available Iberian individuals for molecular analyses could not be sequenced, so that finally 57 mitochondrial and 51 nuclear sequences and morphological data from 8 sexually mature individuals were used in this study.

The ML phylogenetic analysis run to identify the individual species molecularly resulted in 11 mitochondrial clades (Supplementary data Fig. 1), with *M. terrestris* showing the higher frequency and

abundance (Table 1). In the tree obtained, the 57 individuals identified as *M. terrestris* by their external appearance constituted a monophyletic group with the 7 *M. terrestris* specimens from the United Kingdom. Moreover, the morphological analysis of the 8 individuals for which it was possible to obtain sections of their copulatory apparatus showed all of them to have the diagnostic features of the species *M. terrestris*. We also found that morphotype M3 sensu Mateos et al. (2009) (corresponding to *Microplana robusta*; c.f. Vila-Farré et al., 2011) was very close to *M. terrestris*, hence we decided to use it as outgroup in the following analyses

Molecular datasets and phylogenetic relationships

Alignments of mitochondrial COI (822 bp; 64 *M. terrestris*) and nuclear ITS-1 (543 bp; 54 *M. terrestris*) sequences were used for phylogenetic analyses (GenBank accession numbers are shown in Supplementary Table 1).

The Maximum Likelihood tree inferred from the COI gene data is shown in Fig. 2; the phylogenetic tree inferred by BI displays the same topology but with different statistical support in some branches (values shown in Fig. 2). Sequences group into two main clades, corresponding to their geographic origin, either west or east. The western animals belong to populations from Coruña, Asturias, Logroño, Navarra, and Barcelona (1 to 8 and 15 in Fig. 1). The eastern clade is composed of animals from Huesca,

Table 3. Summary of COI neutrality tests

Study region	n	Tajima's <i>D</i>		Fu's <i>F_s</i>		Ramos-Onsins & Rozas <i>R₂</i>	
		<i>D</i>	95% CI	<i>F_s</i>	95% CI	<i>R₂</i>	95% CI
Coruña	13	-0.483	(-1.775, 1.773)	2.812	(-2.884, 4.149)	0.141	(0.106, 0.256)
Asturias	6	-0.631	(-1.408, 1.753)	1.624	(-2.518, 3.696)	0.222	(0.141, 0.373)
Logroño	4	-0.612	(-0.754, 1.893)	0.172	(-0.887, 1.716)	0.222	(0.000, 0.833)
Navarra	7	-1.435	(-1.567, 1.662)	-0.062	(-2.814, 4.581)	0.232	(0.113, 0.288)
Girona	22	-2.088*	(-1.729, 1.907)	-1.223	(-3.190, 4.442)	0.086*	(0.082, 0.224)
Eastern IP (9,10,11,12,13,14)	26	-1.733*	(-1.707, 1.853)	-3.519*	(-3.808, 4.983)	0.065**	(0.072, 0.206)
England	7	1.057	(-1.553, 1.811)	1.77	(-2.476, 3.968)	0.230	(0.137, 0.350)

P* < 0.05; *P* < 0.01

Lleida, Girona (9 to 14 in Fig. 1), and the United Kingdom. The phylogenetic trees are congruent with the reconstructed haplotype network (Fig. 3). In both types of analyses the western populations are differentiated into two groups: one including populations from Navarra and from Barcelona and the other consisting of populations from Coruña, Asturias, and Logroño. One of the sequences from Navarra (086N034) is highly differentiated from the rest, but it nonetheless clearly groups with the western group. In contrast, eastern populations are grouped in only one cluster in the trees, although one individual has a basal position, and show a close relationship among haplotypes in the network (Fig. 3).

Due to the high similarity between sequences, the topology obtained for ITS-1 was unresolved (not shown). The median joining network based on ITS-1 sequences (Fig. 3) shows that the majority of populations share the same haplotype, with only a few sequences differing in one or two positions. No structuring based on the nuclear marker exists.

DNA sequence variation and neutrality tests

Table 2 shows a summary of nucleotide and haplotype diversity in both genes. Mitochondrial

gene values of π (nucleotide diversity) are in general low (below $\pi=0.0057$), with the exception of Navarra, with a value of 0.0108 due to the presence of a very divergent individual (086N034, locality 8, Table 1). The number of haplotypes is the same in both regions (12) but the eastern ones are more similar among each other. Haplotype diversity per population is usually quite low. There are no shared haplotypes between east and west. Within the regions, only Logroño shares haplotypes with Coruña and Asturias (one with each) in the west, and Girona with Huesca in the east. For ITS-1, the π value is low (0.002 maximum) as well as the number of polymorphic sites (*S*) and of haplotypes (*h*). In fact, a single majority haplotype is shared by most individuals.

Given the reduced levels of variability in ITS-1 sequences, the rest of analyses were exclusively performed with COI. Within localities mean pairwise genetic distances estimated with the K2P correction are in the range of 0 to 1%. Values between the western localities range from 0 to 3%, while the eastern values vary between 0 and 1.6%. West and east present a difference of 2.4 to 4% and finally, the between-species difference is about 19% (*M. terrestris* vs *M. robusta*). *F_{ST}* values are high between the eastern and the western groups (0.73) as well as within the western Peninsula (4 groups: Coruña, Asturias, Logroño and Navarra, 0.81). In contrast, *F_{ST}*

is low within the eastern group (2 groups: Girona and Huesca, 0.13).

Neutrality tests were performed for those populations for which more than 3 individuals were available. In the east of the Peninsula this was only possible for Girona. Therefore, and in view of the geographical proximity of the eastern localities as well as their genetic closeness, we also performed a neutrality test including all eastern sampling points. The values of Tajima's D are negative for all the regions studied, except for the United Kingdom. For the populations of Girona alone and for the eastern region the test is significant (Table 3). Fu's F_s is statistically significant only for the eastern localities when grouped together but not for Girona alone. Lastly, R_2 (a test best suited for low numbers of individuals) was significant both in Girona and the eastern group. When we tested the correlation between genetic distance (F_{ST}) and log-linear geographic distance, including all the populations, a p-value of Mantel Test lower than 0.05 (0.011) showed that the levels of genetic differentiation have the characteristic pattern of isolation by distance. Analysing the western and eastern populations separately, no statistically significant p-values were found (0.084 and 0.085 respectively).

There are two unexpected results. First, the population (a single individual) from Barcelona (in the east) shares its haplotype with one individual from Navarra (western clade). Second, there is a great similarity between the UK individuals and those from the eastern clade in northern Spain, some of them sharing a haplotype with individuals from Girona (Fig. 1 and 2).

Morphology

Eight mature specimens were examined for the presence of the characteristic intestinal structure ("is") described by Vila-Farré et al. (2011). We found animals with this structure in the western clade (two individuals from sampling point C015, and one in N061, Figure 2). For the specimens from Navarra (N021, N061, N062) only one presents this feature (215N061), albeit with only one of the two structures being present. None of the eastern specimens

analysed (sampling points G213, G215) showed it, albeit that the sample size is very small (Fig. 2; Supplementary Table 1).

Discussion

Morphological variation vs genetic structure

The morphological variation of the "is" feature is clearly not uniform through the species range, not being exclusive of any of the molecular clades detected. Consequently, we do here interpret this structure as a morphological polymorphism not related to any recent speciation event, therefore, rejecting the possibility of a split of *M. terrestris* into two cryptic species in the north of the Peninsula (Vila-Farré et al., 2011).

Genetic variation in *Microplana terrestris*

Values of COI nucleotide diversity (π) are relatively low as compared with Brazilian populations of other terrestrial flatworm species (Álvarez-Presas et al., 2011), but in the same range as values reported in other land planarian analyses from Australia (Sunnucks et al., 2006). The locality of Girona and the entire eastern clade present significant negative values both for D and R_2 that can be interpreted as signal of a relatively recent population expansion. The other studied localities show not-significant negative values of Tajima's D , so that these populations may be considered closer to the neutral model, rather than the expansion one. The results of nuclear and mitochondrial genes are not fully coincident. The median joining network shows that variation in the nuclear marker is much lower than in the mitochondrial gene. This situation stems from the fact that nuclear DNA evolves slower than mitochondrial DNA, and hence the oldest coalescence event for DNA alleles is four times older than for the mitochondrial sequences (Brown et al., 1979; Hudson, 1990). This fact supplies us relevant information from the results of the two genes: the genetic variability and the isolation-by-distance pattern among all the studied localities observed with COI data reveal a considerable genetic structure of *M. terrestris* populations along an east-west transect

in the northern part of the Iberian Peninsula, while the lack of structure presented by the ITS-1 suggests that this differentiation is relatively recent. However, the distances found among and within groups for COI, reaching values of 3 and 4%, suggest that this differentiation cannot be due to events as recent as the last glacial periods (ending 18 Kya). Although we cannot calibrate a molecular clock with the present data, these levels of differentiation should have needed a time in the order of a few million years to accumulate, with the rates usually found in most animals (around a 2% per million years).

Phylogeographic patterns and refuges

The genetic structure observed in *M. terrestris* may result from isolation of their populations in various refuges during the last glaciations. In view of the fact that these animals are dependent on the presence of wet forest soils, the existence of their putative refuges may be reconstructed from information on the presence of humid forests in the north of the Iberian Peninsula before, during and after the glacial period. Extensive studies based on fossil wood, pollen registers and genetic variation have been published mainly for beech and oak forests in Europe (Magri et al., 2006; Magri, 2008; Petit et al., 2002a; Petit et al., 2002b; Petit et al., 2003; Ramil-Rego et al., 2000).

According to these studies, beech forests were reduced during the last glacial periods to a few refugia of extremely small size. Isozymes data show the presence of three groups in the present day beech forests in the north of the Iberian Peninsula. One group is restricted to the Cantabrian Mountains, one to the western Pyrenees, and the third group occurs in the eastern part and is connected with the populations in southern France (Magri et al., 2006; Magri, 2008); these three groups originated from different refugia. During the late Holocene, after the Last Glacial Maximum (LGM), there would have been a slow expansion of these forests. However, they would not have crossed the Pyrenees northward, and therefore Iberian Peninsula beech did not contribute to the re-colonization of this type of forest in northern Europe. Studies of chloroplast sequences from oaks

in the Iberian Peninsula show that the haplotypes present in the Cantabrian and Basque regions most probably persisted in a refuge on the west coast, whereas the haplotypes found on the south-east slopes of the Pyrenees and in Catalonia may have arrived from Italy, or even from the Balkans through France, during the late-glacial interstadial (similarly to what has been found for *Chorthippus parallelus*, *Alnus glutinosa* and *Triturus cristatus* (cf. Hewitt, 1999); Petit et al., 2002b). Thus, *Fagus* and *Quercus* coincide in showing a clear differentiation among eastern and western populations in the north of the Iberian Peninsula, and in the fact that the populations in the east probably have an eastern European origin, more or less distant, which will involve an important genetic divergence among both sides.

The mitochondrial genetic differentiation between the eastern and western clades of *M. terrestris*, the marked structure within the west region, and the low genetic variability and expansion signals in the eastern part, may all have resulted from the complex history of their habitat, i.e. the wet forests. When the glacial periods began, the planarian populations may have been restricted to a few refugia: the remnants of the wet forests, mostly situated in the west of the Peninsula, becoming isolated in a few distant localities. In the west, the populations may have expanded their range from the refuges and established secondary contacts after the LGM, probably following the northern expansion of oak, resulting in the present populations in Logroño, Asturias and Coruña. On the other hand, the populations from the Pyrenees (Navarra) would have remained isolated from the rest and among them resulting in the high differentiation found among localities (a single individual collected in locality 8 at high altitude has an extremely divergent haplotype with respect to the individuals coming from the valley regions). This fact suggests that due to the orography of the Pyrenees the genetic structure produced during the reduction of habitat in the glacial period has persisted until today, a situation that is also found for beech in that region (Magri et al. 2006; Magri, 2008).

The eastern planarian populations may have arrived with oak and beech forests (Magri et al. 2006;

Petit et al. 2002b). Petit et al. (2002b) hypothesize that populations of oak coming from the east and established in Catalonia would then have constituted a "secondary refuge" during the colder period of the Younger Dryas (11-10 ky BP). The low genetic structure found in eastern planarian populations may have resulted from the reduced number of refugia and their recent expansion following the humid forests (which started in the Pyrenees 4 to 3 kya (Magri, 2008; Petit et al., 2002b). This hypothesis could also explain the high genetic distances found between eastern and western clades in the Iberian Peninsula. According to this hypothesis, we predict that the planarian populations in the eastern Iberian Peninsula would have haplotypes that are more similar to the southern France populations than to the western clade.

British-East clade relationship

The fact that *M. terrestris* specimens from England group among the north-eastern populations of the Iberian Peninsula (Fig. 2) is difficult to explain as a consequence of the known history of the humid forest. The arrival of the species in the British Isles cannot be explained by *Fagus* dispersion, since beech did not colonize central and northern Europe from the Iberian Peninsula (Magri et al., 2006). Nevertheless, palaeobotanical data support a spread of oak from the west of the Iberian Peninsula along the Atlantic coast of Europe and the exposed English Channel to the British Isles (Petit et al., 2002b). With this data one may expect British *Microplana terrestris* to be closely related to the Iberian Peninsula west clade, leaving unexplained the close affinity among the British and eastern Iberian clade. However, in some localities in the British Isles the presence of two oak haplotypes coming from the south of France and Catalonia (Cottrell et al., 2002; Petit et al., 2002b) has been detected. This presence has been interpreted as the result of recent anthropogenic introduction due to oak forests planting and management in Britain (Cottrell et al., 2002). Although the localities of the terrestrial planarians analysed do not match exactly those of the exotic oak haplotypes, it is possible that after being introduced, terrestrial

planarians have dispersed through the island. Other well documented examples of human introduction of terrestrial planarians with plants already exist in the British Isles, as is the case of some Neotropical species (Cannon et al., 1999; Jones and Boag, 1996). However, the vast distribution of *M. terrestris* through the British Isles (H. Jones, personal communication) casts some doubt on this interpretation. The only *M. terrestris* specimen from Barcelona that clusters within the western clade seems another likely case of human introduction.

It will be necessary to do a wider sampling of *M. terrestris* in the British Isles to find out whether the haplotypes found in the present study are the only ones present there or, alternatively, whether they are mixed with others related to the western clade of the Iberian Peninsula. In the latter case, the situation will be equivalent to the one found for oaks. In the first case, if only introduced haplotypes for terrestrial planarians were found, there are two possible explanations. One is that *Microplana* populations from western Iberian Peninsula were not able to follow the rapid expansion of oaks through the British channel and, hence, the animals introduced from the south of France/Catalonia are the only *Microplana* that arrived to the British Isles. The second explanation would be that planarians from western Peninsula crossed the channel but were replaced by the recently introduced *M. terrestris*.

Despite the scarcity of samples, due to the difficulty in collecting high amounts of terrestrial planarians, our data clearly indicate the link between these animals history and the moist forest evolution during the last glacial periods. These data seem to indicate that terrestrial planarians, as other edaphic fauna, can be good models to corroborate, or even put forward, phylogeographical hypothesis on the forest community.

Acknowledgements

This research was supported by CGL2008-00378/BOS Grant (Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación) to M.R. We are grateful for the financial contribution of SEG and REDES for M.A-P's visit to

London. Jill McDonald and Hugh Jones are thanked for identifying and making available British animals. Dr. Tim Littlewood (NHM, London), kindly made available the body tissue of T4 individual. We also thank Dr. Julio Rozas for his advice and insightful discussions regarding population genetic analyses and molecular evolution. Thanks are also due to Cristina Cabrera and Eduard Solà for collecting some individuals and Gema Blasco for technical support.

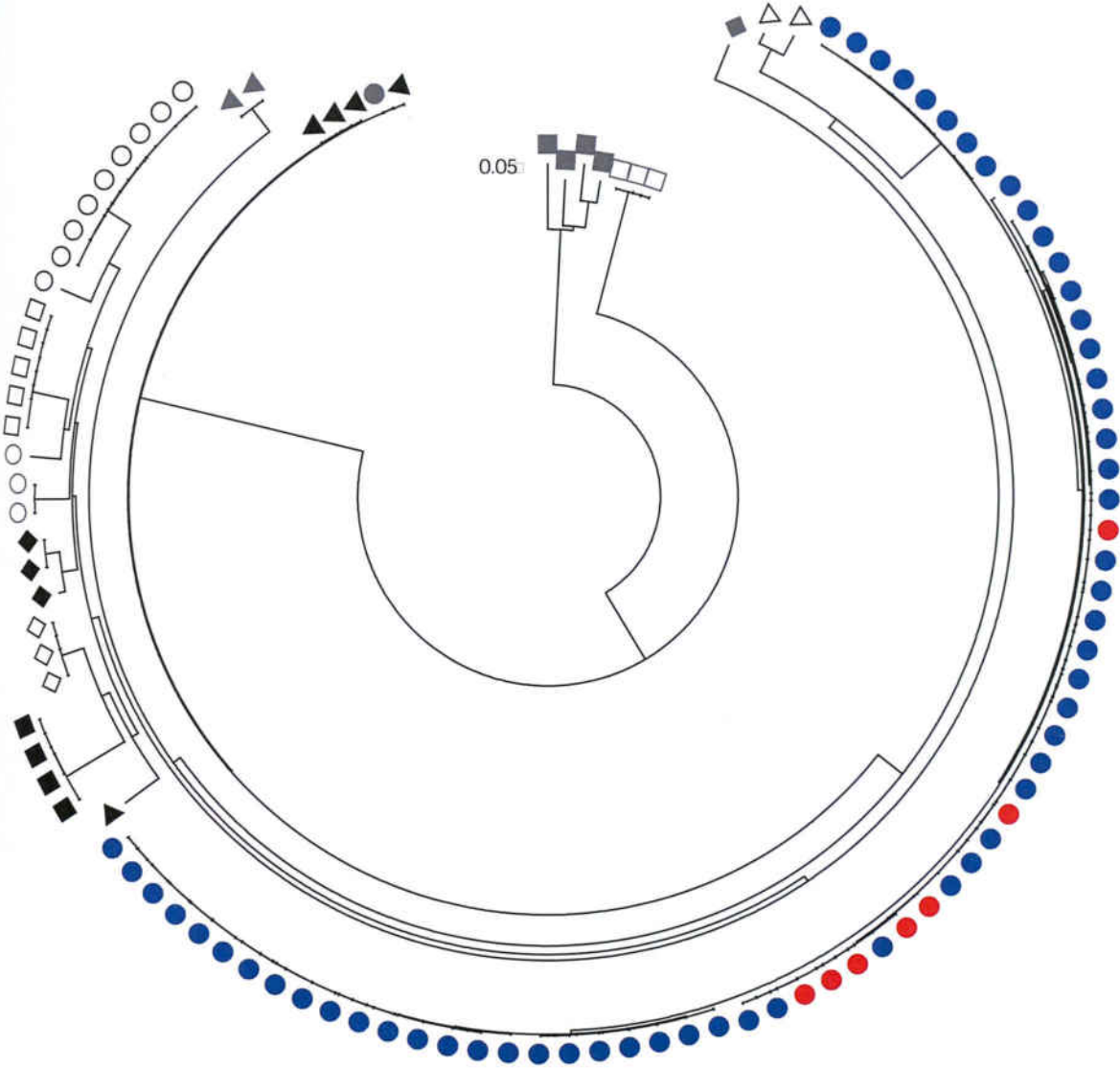
References

- Álvarez-Presas, M., Carbayo, F., Rozas, J., Riutort, M., 2011. Land planarians (Platyhelminthes) as a model organism for fine-scale phylogeographic studies: Understanding patterns of biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *J. Evol. Biol.* 24, 887-896.
- Baguñà, J., Carranza, S., Pala, M., Ribera, C., Giribet, G., Arnedo, M.A., Ribas, M., Riutort, M., 1999. From morphology and karyology to molecules. New methods for taxonomical identification of asexual populations of freshwater planarians. A tribute to Professor Mario Benazzi. *Ital. J. Zool.* 66, 207-214.
- Bandelt, H., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37-48.
- Bendl, W.E., 1908. Beiträge zur Kenntnis des Genus *Rhynchodemus*. *Z. wiss. Zool.* 89, 525-554.
- Blanco-Castro, E., Casado-González, M.A., Costa-Tenorio, M., Escribano-Bombín, R., García-Antón, M., Génova-Fuster, M., Gómez-Manzanique, A., Gómez-Manzanique, F., Moreno-Saiz, J.C., Morla-Jurasti, C., Regato-Pajares, P., Sainz-Ollero, H. (Ed.), 2005. *Los bosques ibéricos: Una interpretación geobotánica*. Editorial Planeta, Barcelona.
- Brown, W.M., George, M., Wilson, A.C., 1979. Rapid Evolution of Animal Mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 1967-1971.
- Cannon, R.J.C., Baker, R.H.A., Taylor, M.C., Moore, J.P., 1999. A review of the status of the New Zealand flatworm in the UK. *Ann. Appl. Biol.* 135, 597-614.
- Carbayo, F., Leal-Zanchet, A.M., Vieira, E.M., 2002. Terrestrial flatworm (Platyhelminthes: Tricladida: Terricola) diversity versus man-induced disturbance in an ombrophilous forest in southern Brazil. *Biodivers. Conserv.* 11, 1091-1104.
- Carbayo, F., Froehlich, E.M., 2008. Estado do conhecimento dos macroturbelários (Platyhelminthes) do Brasil. *Biota Neotrop.* 8, 197; 177.
- Cottrell, J.E., Munro, R.C., Tabbener, H.E., Gillies, A.C.M., Forrest, G.I., Deans, J.D., Lowe, A.J., 2002. Distribution of chloroplast DNA variation in British oaks (*Quercus robur* and *Q. petraea*): the influence of postglacial colonisation and human management. *For. Ecol. Manage.* 156, 181-195.
- Fauna Europaea Web Service (2004) Fauna Europaea version 1.1, Available online at <http://www.faunaeur.org>.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915-925.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95-98.
- Hewitt, G.M., 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol. J. Linn. Soc.* 68, 87-112.
- Hudson, R.R., 1990. Gene genealogies and the coalescent process. *Oxf. Surv. Evol. Biol.* 7, 1-44.
- Humason GL, 1967. Animal tissue techniques. 2nd ed. San Francisco (CA): W. H. Freeman.
- Jensen, J., Bohonak, A., Kelley, S., 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6, 13.
- Johns, P.M., 1998. The New Zealand terrestrial flatworms: A 1997-98 perspective. *Pedobiologia* 42, 464-468.
- Jones, H.D., Boag, B., 1996. The distribution of New Zealand and Australian terrestrial flatworms (Platyhelminthes: Turbellaria: Tricladida: Terricola) in the British Isles- the Scottish survey and Megalab Worms. *J. Nat. Hist.* 30, 955-975.
- Jones, H.D., 2005. Identification: British land flatworms. *British Wildlife* 16, 189-194.
- Jones, H.D.J., Webster, B.L., Littlewood, D.T.J., McDonald, J.C., 2008. Molecular and morphological evidence for two new species of terrestrial planarians of the genus *Microplana* (Platyhelminthes; Turbellaria; Tricladida; Terricola) from Europe. *Zootaxa* 1945, 1-38; 1.
- Katoh, K., Asimenos, G., Toh, H., 2009. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods Mol. Biol.* 537, 39-64.
- Kawakatsu, M., Froehlich, E.M., Jones, H.D., Ogren, R.E., Sasaki, G-Y., 2003. Additions and corrections of the previous land planarian indices of the world - 11. *Bull. Fuji Women's University* 41, 89-114.
- Lázaro, E.M., Sluys, R., Pala, M., Stocchino, G.A., Baguñà, J., Riutort, M., 2009. Molecular barcoding and phylogeography of sexual and asexual freshwater planarians of the genus *Dugesia* in the Western Mediterranean (Platyhelminthes, Tricladida, Dugesidae). *Mol. Phyl. and Evol.* 52, 835-845.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Lindroth, C.H., Anderson, H., Böddardsson, H., Richter, S.H., 1973. Surtsey, Iceland. The development of a new fauna, 1963-1970. *Terrestrial invertebrates. Entomol. Scandinavica, Suppl.* 5, 146-147.
- Magri, D., Vendramin, G.G., Comps, B., Dupanloup, I.,

- Geburek, T., Gömöry, D., Latałowa, M., Litt, T., Paule, L., Roure, J.M., Tantau, I., van der Knaap, W.O., Petit, R.J., de Beaulieu, J.L., 2006. A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: Palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytol.* 171, 199-221.
- Magri, D., 2008. Patterns of post-glacial spread and the extent of glacial refugia of European beech (*Fagus sylvatica*). *J. Biogeogr.* 35, 450-463.
- Mateos, E., Cabrera, C., Carranza, S., Riutort, M., 2009. Molecular analysis of the diversity of terrestrial planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Continenticola) in the Iberian Peninsula. *Zool. Scr.* 38, 637-649.
- McDonald, J.C., Jones, H.D., 2007. Abundance, reproduction, and feeding of three species of British terrestrial planarians: Observations over 4 years. *J. Nat. Hist.* 41, 293-312.
- Minelli, A., 1977. A taxonomic review of the terrestrial planarians of Europe. *Boll. Zool.* 44, 399-419.
- Müller, O. F., 1774. Vermium terrestrium et fluviatilium, seu animalium infusoriorum, helminthicorum et testaceorum, non marinorum, succincta historia. Vol. primi pars altera. Havniae et Lipsiae 4, 52-72.
- Nei, M. (Ed.), 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- Ogren, R.E., Kawakatsu, M., 1989. Index to the species of the Family Rhynchodemidae (Turbellaria, Tricladida, Terricola). Part II: Microplaninae. *Bull. Fuji Women's College* 27, 53-111.
- Ogren, R.E., Kawakatsu, M., Froehlich, E. M., 1997. Additions and corrections of the previous land planarian indices of the world (Turbellaria, Seriata, Tricladida, Terricola) Addendum IV. Geographic locus index: Bipaliidae; Rhynchodemidae (Rhynchodeminae; Microplaninae); Geoplanidae (Geoplaninae; Caenoplaninae; Pelmatoplaninae). *Bull. Fuji Women's College* 35, 63-103.
- Petit, R.J., Csaikl, U.M., Bordács, S., Burg, K., Coart, E., Cottrell, J., van Dam, B., Deans, J.D., Dumolin-Lapègue, S., Fineschi, S., Finkeldey, R., Gillies, A., Glaz, I., Goicoechea, P.G., Jensen, J.S., König, A.O., Lowe, A.J., Madsen, S.F., Mátyás, G., Munro, R.C., Olalde, M., Pemonge, M-H., Popescu, F., Slade, D., Tabbener, H., Turchini, D., de Vries, S.G.M., Ziegenhagen, B., Kremer, A., 2002a. Chloroplast DNA variation in European white oaks: Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *For. Ecol. Manage.* 156, 5-26.
- Petit, R.J., Brewer, S., Bordács, S., Burg, K., Cheddadi, R., Coart, E., Cottrell, J., Csaikl, U.M., Van Dam, B., Deans, J.D., Espinel, S., Fineschi, S., Finkeldey, R., Glaz, I., Goicoechea, P.G., Jensen, J.S., König, A.O., Lowe, A.J., Madsen, S.F., Mátyás, G., Munro, R.C., Popescu, F., Slade, D., Tabbener, H., De Vries, S.G.M., Ziegenhagen, B., De Beaulieu, J.-L., Kremer, A., 2002b. Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *For. Ecol. Manage.* 156, 49-74.
- Petit, R.J., Aguinalde, I., de Beaulieu, J., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., Mohanty, A., Müller-Starck, G., Demesure-Musch, B., Palmé, A., Martín, J.P., Rendell, S., Vendramin, G.G., 2003. Glacial Refugia: Hotspots But Not Melting Pots of Genetic Diversity. *Science* 300, 1563-1565.
- Posada, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253-1256.
- Ramil-Rego, P., Guitian, M.A.R., Sobrino, C.M., Gomez-Orellana, L., 2000. Some considerations about the postglacial history and recent distribution of *Fagus sylvatica* in the NW Iberian Peninsula. *Folia Geobot.* 35, 241-271.
- Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., 2002. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Mol. Biol. Evol.* 19, 2092-2100.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Semper, G., 1881. *Animal life as affected by the natural conditions of existence*. In: D. Appleton & Co. (Ed.), Lectures at the Lowell Institute, Boston, 1877. New York, pp. 186-187.
- Sluys R., 1989. A monograph of the marine triclads. Rotterdam and Brookfield: A. Balkema.
- Sluys, R., 1999. Global diversity of land planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola): a new indicator-taxon in biodiversity and conservation studies. *Biodivers. Conserv.* 8, 1663-1681.
- Stamatakis, A., 2006. RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688-2690.
- Sunnucks, P., Blacket, M.J., Taylor, J.M., Sands, C.J., Ciavaglia, S.A., Garrick, R.C., Tait, N.N., Rowell, D.M., Pavlova, A., 2006. A tale of two flatties: different responses of two terrestrial flatworms to past environmental climatic fluctuations at Tallaganda in montane southeastern Australia. *Mol. Ecol.* 15, 4513-4531.
- Tajima, F., 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.* First published online: May 4, 2011.
- Vila-Farré, M., Mateos, E., Sluys, R., Romero, R., 2008. Terrestrial planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola) from the Iberian Peninsula: new records and description of three new species. *Zootaxa*

- 1739, 1–20.
- Vila-Farré, M., Sluys, R., Mateos, E., Jones, H.D. 2011. Land planarians (Platyhelminthes: Tricladida: Geoplanidae) from the Iberian Peninsula: new records and description of two new species, with a discussion on ecology. *J. Nat. Hist.* 45, 869–891.
- Von Graff, L., 1896. Ueber die Morphologie des Geschlechtssapparates der landplanarien. *Verhandl. deutsch. Zool. Ges.* 6, 75–93.
- Von Kennel J., 1882. Die in Deutschland gefundenen Landplanarien *Rhynchodemus terrestris* O. F Müller und *Geodesmus bilineatus* Meczniokoff. *Arb. zool. Inst. Wurzburg* 5, 120–160.
- Winsor, L., Johns, P.M., Barker, G.M. 2004. Terrestrial planarians (Platyhelminthes: Tricladida: Terricola) predaceous on terrestrial gastropods. In: Barker, G.M. (Ed.), *Natural enemies of terrestrial molluscs*. Wallingford: CAB International, pp. 227–278.

Supplementary Information



Supplementary Figure 1. Maximum Likelihood tree inferred from COI data including 110 sequences corresponding to all the individuals collected in the Iberian Peninsula for this study (blue circles), plus the British animals identified as *M. terrestris* (red circles). Each symbol represents a different morphotype, black squares corresponding to the outgroup species used in the intraspecies analyses: *M. robusta*.

Table 1 supplementary material. List of samples used in this study with sampling locality and GenBank Accession numbers.

Code	Histology	Collectors	Date	GenBank Accession number COI	ITS-1
<i>M.terrestris</i>					
003B002		M	23/05/1996	JN379967	
225G006		M, C	06/11/2006	JN379976	JN380038
071C015*		M	01/07/2004	FJ969949	JN380022
151C015*		M	05/07/2005	FJ969952	JN380024
190C015	juv	M	12/04/2006	JN379969	JN380029
191C015*		M	12/04/2006	FJ969958	JN380030
193C015*		M	12/04/2006	FJ969959	JN380031
194C015*	juv	M	12/04/2006	FJ969960	JN380032
232C015		M	11/11/2006	JN379977	JN380039
234C015		M	11/11/2006	JN379979	JN380041
235C015	is	M	11/11/2006	JN379980	
240C015		M	11/11/2006	JN379981	JN380042
241C015		M	11/11/2006	JN379982	
242C015		M	11/11/2006	JN379983	JN380043
245C015	is	M	11/11/2006	JN379984	JN380044
207N021	normal	M, V	12/05/2006	JN379971	
209N021	juv	M, V	12/05/2006	JN379972	
198E023		V	16/04/2006	JN379970	
086N034*		M, V	21/08/2004	FJ969951	JN380023
155L048*		M	13/07/2005	FJ969953	JN380025
156L048		M	13/07/2005	JN379968	JN380026
157L048*		M	13/07/2005	FJ969954	JN380027
158L048*		M	13/07/2005	FJ969955	JN380028
212N060	juv	M, V	13/05/2006	JN379973	JN380034
214N060	juv	M, V	13/05/2006	JN379974	JN380035
215N061	is	M, V	13/05/2006	JN379975	JN380036
218N062*	normal	M, V	14/05/2006	FJ969979	JN380037
269G166		M	07/11/2008	JN379985	JN380045
270G166		M	07/11/2008	JN379986	JN380046
271G166		M	07/11/2008	JN379987	JN380047
272G166		M	07/11/2008	JN379988	JN380048
275G167		M	07/11/2008	JN379989	JN380049
276G167	juv	M	07/11/2008	JN379990	JN380050
303H200		M	30/05/2009	JN379991	JN380051
304H200	juv	M	30/05/2009	JN379992	JN380052
306H201	juv	M	31/05/2009	JN379993	JN380053
309G212	juv	M	12/09/2009	JN379994	JN380054
310G212	juv	M	12/09/2009	JN379995	JN380055
311G212	juv	M	12/09/2009	JN379996	JN380056
312G212	juv	M	12/09/2009	JN379997	JN380057
333G212		M	12/09/2009	JN380009	JN380069
334G212		M	12/09/2009	JN380010	JN380070
335G212	juv	M	12/09/2009	JN380011	JN380071
336G212		M	12/09/2009	JN380012	JN380072
337G212	juv	M	12/09/2009	JN380013	JN380073
338G212		M	12/09/2009	JN380014	JN380074
313G213	normal	M	12/09/2009	JN379998	JN380058
314G214	juv	M	25/09/2009	JN379999	JN380059
315G215	normal	M	25/09/2009	JN380000	JN380060
316G215	normal	M	25/09/2009	JN380001	JN380061
317G217		M	25/09/2009	JN380002	JN380062
322A218	juv	M, A, S	23/10/2009	JN380003	JN380063
323A218	juv	M, A, S	23/10/2009	JN380004	JN380064
327A220	juv	M, A, S	24/10/2009	JN380005	JN380065
330A221	juv	M, A, S	24/10/2009	JN380006	JN380066
331A222	juv	M, A, S	24/10/2009	JN380007	JN380067
332A223	juv	M, A, S	25/10/2009	JN380008	JN380068
MTA		J, A	09/05/2010	JN380021	
MT1		J, A	09/05/2010	JN380016	
MT2		J, A	09/05/2010	JN380017	JN380076
MT3		J, A	09/05/2010	JN380018	JN380077
MT4		J, A	09/05/2010	JN380019	
MT5		J, A	09/05/2010	JN380020	
T4*				EU334581	JN380078
<i>Outgroup</i>					
197C015*		M	12/04/2006	FJ969962	JN380033
233C015		M	11/11/2006	JN379978	JN380040
352P234		M, A, S	28/05/2010	JN380015	JN380075

Histology legend, is: intestinal structure present; normal: intestinal structure absent; juv: juvenile individual. **Collector Legend,** A: Marta Álvarez-Presas; C: Cristina Cabrera; J: Jill McDonald; M: Eduardo Mateos; S: Eduard Solà; V: Miquel Vila-Farré. * these animals had already been included in a previous study (Mateos et al., 2009) where a smaller fragment of COI was analysed and were completed to be used in the present analyses (GenBank records have been updated to add the new fragment sequenced). Codes in the first column correspond to a three-digit number specific to each individual according to the order of collection, followed by the code of the locality where it was found. Individuals collected in the United Kingdom are identified by the code MT or T.

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ GENERAL

Un dels principals objectius d'aquesta tesi era l'obtenció d'una filogènia ben resolta tant a nivell dels Continenticola com de les planàries terrestres Neotropicals de la subfamília Geoplaninae. L'estudi clàssic de la sistemàtica de les planàries requereix una inversió molt gran de temps per examinar l'anatomia interna (bàsicament de l'aparell copulador) de cada individu, ja que els caràcters morfològics externs en la majoria dels casos no són suficients per identificar espècies (Mateos i col. 1998). A més, el nombre de trets morfològics del què es disposa els fa insuficients per resoldre la filogènia del gran nombre d'espècies que existeix. Per aquests motius, abans del començament d'aquesta tesi hi havia un gran conjunt d'estudis morfològics però tots focalitzats en les descripcions taxonòmiques dels grups, sense resoldre'n explícitament les relacions filogenètiques. Els avenços de la biologia molecular han fet possible solucionar aquests problemes i agilitzar l'estudi taxonòmic i filogenètic de les planàries. Malgrat això, no és una tasca fàcil. Els seus hàbits nocturns, la poca tolerància a la llum i la dependència dels hàbitats humits condiciona que visquin en amagatalls. Per altra banda, la coberta de moc que tenen al voltant del cos dificulta l'obtenció d'un DNA de suficient qualitat per ser amplificat amb facilitat. Al llarg del desenvolupament d'aquesta tesi hem anat resolent aquests i d'altres inconvenients a l'hora de treballar amb aquests organismes. En són exemples la manca de marcadors genètics informatius, l'optimització del protocol d'extracció de DNA o l'obtenció d'un bon mostreig per intentar resoldre preguntes relacionades amb la filogènia, filogeografia i ecologia dels triclàdides. Els resultats obtinguts ens han estat útils per poder donar llum a una nova classificació d'aquest grup, intentant aprofundir en la seva sistemàtica, tant a nivell d'ordre com de subfamília. A més, el desenvolupament i millora de les metodologies moleculars a les planàries, junt amb les seves especials característiques, ens ha permès utilitzar-les com a eina per donar resposta a una pregunta clau que molts autors fa temps que es plantegen: quin és l'origen de la diversitat que s'observa avui en dia a les regions Neotropicals?

1 OPTIMITZACIÓ DE METODOLOGIES PER L'ESTUDI MOLECULAR DE LES PLANÀRIES TERRESTRES

1.1 Purificació del DNA

Per tal d'aconseguir unes seqüències de qualitat vam cercar la metodologia d'extracció de DNA que ens donava un producte més pur. Inicialment utilitzàvem una modificació del mètode tradicional d'extracció amb Isotiocianat de Guanidina i Fenol-Cloroform (Carranza i col. 1998a, b) descrit prèviament per RNA (Chirgwin i col. 1979). A més de ser molt costós i tòxic, en moltes ocasions aquest protocol donava mals resultats, ja que els polisacàrids del moc interfereixen en l'extracció de manera semblant al que ocorre amb els mol·luscs (que també tenen molt de moc; Sokolov, 2000) o amb les plantes (per la paret vegetal; Jobes i col. 1995). En individus vius és possible extraure el moc abans de l'extracció fent un tractament amb clorur de cisteïna, però aquest tractament no és possible en els individus fixats en alcohol. La majoria dels que arribaven al laboratori estaven fixats, per tant, el moc queda inclòs amb el teixit. Així doncs vam provar diversos productes comercials (veure Taula 1) específics per a fer extraccions de plantes i fongs (que presenten un problema semblant), i amb productes d'extracció general. Tant sols un va donar bons resultats, tot i havent de modificar força el protocol del fabricant (Wizard Genomic DNA Purification Kit, de Promega; Capítols 2, 3, 4 i 5). Una peculiaritat a destacar és que el DNAzol (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH), producte que es fa servir habitualment per fer extraccions de DNA amb planàries d'aigua dolça, no va donar bons resultats amb planàries terrestres. Això podria ser causat per una diferent composició del moc en els organismes aquàtics i en els terrestres.

Taula 1. Mètodes d'extracció assajats per tal d'obtenir bona qualitat de DNA de planàries terrestres.

Mètode	Casa comercial/ Referència	Efectivitat
Wizard Genomic DNA Purification Kit*	Promega	Bona
Isotiocianat de Guanidina*	Chirgwin i col. 1979	Força bona
Extracció específica de planàries*	Bessho i col. 1997	Força bona
SPEEDTOOLS TISSUE DNA EXTRACTION KIT	Bioteools	Baixa
DNAzol	Molecular Research Center	Baixa
E.Z.N.A. Fungal DNA Kit	Omega Biotek	Baixa
DNeasy Plant	Qiagen	Baixa
Protocol extracció mol·luscs	Winnepennickx i col. 1993	Baixa
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen	Nul·la
E.Z.N.A. Mollusc Extraction Kit	Omega Biotek	Nul·la
Tissue DNA Extraction Kit-GF1	Vivantis Technologies	Nul·la

*Aplicant algunes modificacions al mètode original

1.2 Cerca de nous marcadors

La cerca de nous marcadors moleculars per a planàries ha estat un dels punts més importants i costosos d'aquesta tesi. Hem provat una gran quantitat de gens, encara que la majoria d'ells sense èxit (Taula 2), ja sigui per problemes d'amplificació o bé per no presentar la variabilitat adequada al problema que es volia estudiar. Cercàvem gens que fossin conservats a nivell d'ordre o de subfamília, segons l'estudi, però que alhora presentessin variabilitat suficient per resoldre les branques més basals de les filogènies. Vam provar tant

Taula 2. Gens provats per les diferents anàlisis

Gen	Origen	Filogènia triclàdides	Filogènia Geoplaninae	Filogeografia
18S rDNA	Carranza i col. 1996	1	1	3
28S rDNA	Álvarez-Presas i col. 2008	1	1	3
28S rDNA TII	Tesi	3	3	3
Histona H3	Colgan i col. 1998	2	2	2
COI	Bessho i col. 1992; Lázaro i col. 2009; Álvarez-Presas i col. 2011; Tesi	1	1	1
16S	Arnedo i col. 2004; Tesi	3	3	3
12S	Desconegut	2	2	2
EF-1 α	Tesi	-	1	3
ATPasa-alpha	Tesi	-	3	-
ITS-1	Baguña i col. 1999	3	3	1
Actina	Tesi	2	2	2
Aldolasa	Tesi	2	2	2
EF2	Tesi	2	2	2
NADH-1	Desconegut	-	3	3
COx3	Desconegut	-	-	2
COx2	Desconegut	2	2	2
Citocrom b	Universal	3	3	-
NADH-5	Boore, 1999	2	2	2

¹Informatiu²No es va poder amplificar³No contenia informació a aquest nivell

-No es va provar per aquest estudi

gens nuclears (de proteïnes ribosomals, reguladors del metabolisme,...) com mitocondrials per les anàlisis filogenètiques i per les filogeogràfiques. La utilització de gens (o fragments de DNA) amb diferents orígens (nuclear i mitocondrial) és molt informatiu per resoldre filogènies a diferents nivells: els gens mitocondrials són més variables i aporten informació a nivell de població o espècie, mentre que els nuclears solen ser bons per resoldre parts més basals de les filogènies. Un dels problemes que poden haver afectat el baix rendiment del nombre de gens provats en vers els que es van poder amplificar, pot ser la poca disponibilitat de seqüències de planàries o grups filogenèticament propers a les bases de dades públiques. La divergència de les seqüències de planàries respecte a les trobades als bancs de dades i/o els alts nivells de variabilitat dins de les pròpies planàries dificulta la possibilitat de dissenyar bons jocs d'encebadors per amplificar gens nous.

Pel que fa als gens nuclears en particular, en el cas del 18 i 28S rDNA es va intentar buscar una estratègia per amplificar de forma específica el dos tipus presents a planàries (Carranza i col. 1996) per tal de poder disposar de la informació d'ambdues còpies.

Malauradament, en el cas del 28S una de les còpies no presentava prou variabilitat i es va descartar per als estudis filogenètics (capítol 2). Després de fallar en l'intent de fer servir altres gens nuclears per la filogènia de *Continenticola* (com la Histona H3; Taula 2), va ser possible amplificar dos marcadors nuclears més, l'EF-1 α i l'ATPasa- α , ja de cara al treball de filogènia de *Geoplaninae*. D'aquests dos, el cribratge de la variació nucleotídica només ens en va deixar un, l'EF-1 α , que presenta una bona resolució a nivell de branques internes. L'ATPasa, a més de ser poc variable a nivell de subfamília, ha donat problemes d'amplificació i s'ha descartat en aquesta ocasió. El fragment amplificat però presenta un petit intró que en el futur pot ser d'utilitat a altres nivells, com el poblacional per exemple. Així, el disseny de nous oligonucleòtids més específics per optimitzar l'amplificació d'aquest gen queda pendent per un futur.

En el cas dels gens mitocondrials, la proporció d'èxit en aconseguir nous marcadors va ser inferior, probablement degut a l'alt grau de variabilitat d'aquest genoma. Els gens ribosomals 16S i 12S rDNA, no van donar bons resultats a cap nivell; el 12S no el vam poder amplificar i el 16S era massa variable. Altres gens, com el COX2 o la NADH5 tampoc es van poder amplificar (Taula 2), de manera que després de moltes proves tan sols es va poder utilitzar el gen COI. Aquest ha estat útil per quasi totes les anàlisis d'aquesta tesi, tot i que a nivell de filogènia de triclàdides vam veure que els resultats eren millors si el descartàvem, perquè els alts nivells de saturació que presentava emmascaraven la poca senyal dels altres gens a nivell de les branques basals. Per la filogènia de *Geoplaninae*, en canvi, la saturació no va ser problema, i la seva informació, sumada a la dels altres gens, va ser important a nivell de branques internes. Per als estudis filogeogràfics, la manca de marcadors mitocondrials amb la variabilitat adequada per aquest tipus de treballs, ens ha limitat a utilitzar només el gen COI, que hem pogut complementar amb la informació de l'intró nuclear ITS-1, que ja s'havia utilitzat en altres estudis amb planàries (Baguñà i col. 1999; Lázaro i col. 2009).

En les anàlisis filogenètiques, la concatenació dels gens resulta sempre en una millor resolució que les anàlisis individuals. En general, els gens ribosomals estarien donant informació a nivell més basal dins les filogènies, complementat per la resolució que donen els altres gens a nivell més terminal. Concretament, en el cas de la filogènia de les planàries terrestres Neotropicals, el 28S sembla ser el gen que millor explica la història evolutiva del grup. Quan el concatenem amb la resta de gens (COI i EF-1 α) es manté la topologia obtinguda amb el 28S, variant tant sols els suports estadístics. Malgrat això, encara queden zones de les filogènies sense resolució. Actualment, en l'era de la genòmica, la cerca individual de nous gens és massa lenta i perd sentit. Utilitzar dades genòmiques (transcriptòmica) (Philippe i col. 2007; Dunn i col. 2008) o bé fer la cerca de nous marcadors a partir d'anàlisis de resultats de les noves tecnologies de seqüenciació (*ngs*) (Bybee i col. 2011) pot ser una molt millor estratègia tant pels estudis filogenètics com pels filogeogràfics. No obstant això, en les filogènies l'addició de més gens no té per què implicar millor resolució filogenètica

(Paps i col. 2009b) i és més important trobar l'equilibri entre el nombre de tàxons i la seva representació que no pas augmentar molt el nombre de posicions nucleotídiques o aminoacídiques.

1.3 El mostreig: ampliar el “taxon sampling”

Tenir un mostreig ampli és necessari per obtenir bones inferències. En aquesta tesi hem ampliat el mostreig d'alguns gèneres respecte anàlisis prèvies. S'han aportat seqüències dels gèneres *Dolichoplana*, *Novibipalium*, *Spathula* a les anàlisis filogenètiques dels *Continenticola*, a més de molts gèneres de planàries terrestres Neotropicals, com *Geoplana*, *Notogynaphallia* o *Issoca*, per l'anàlisi a nivell de la subfamília *Geoplaninae* amb les quals no s'havia treballat encara a nivell molecular. A més, s'ha aconseguit un objectiu important per als estudis filogeogràfics, que és tenir un mostreig en quantitats adequades per tota la regió d'estudi. S'ha trobat una espècie de distribució àmplia, *Cephaloflexa bergi* que cobreix tota la regió, mentre que se n'ha trobat d'altres amb distribució més restringida, que també han estat útils per comparar els resultats de la primera (Annex capítol 4).

Malauradament, en algun cas, com el del gen mitocondrial COI, l'adició de més tàxons ha resultat en filogènies interespecífiques menys resoltes. Aquest fet, que pot semblar contradictori amb l'afirmació de Paps i col. (2009b) esmentada anteriorment, pot ser degut a les altes taxes de substitució dels gens mitocondrials, sumades a l'antiguitat de les planàries. El COI es satura ràpidament, efecte que es multiplica a l'incrementar el nombre de tàxons estudiats. Així doncs, en cada cas cal considerar quins gens s'utilitzen, i a quin nivell, per determinar si la millor estratègia és augmentar el nombre de taxa o augmentar el nombre de gens.

2 UN NOU ESCENARI FILOGENÈTIC/SISTEMÀTIC PELS TRICLÀDIDES

L'estat del coneixement de la sistemàtica dels triclàdides abans del començament d'aquesta tesi era força pobre. La majoria d'estudis eren purament taxonòmics, basats en descripcions morfològiques, i cap d'ells tenia prou potència per poder inferir la filogenia del grup, degut a la dèbil informació filogenètica dels caràcters morfològics. Malgrat que ja hi havia estudis moleculars previs, cap d'ells havia aconseguit respondre algunes preguntes clau, com la verificació del monofiletisme de les planàries terrestres, les relacions entre els seus grups (relacions internes) i la filogenia de la subfamília Geoplaninae. Tot i que encara queden algunes qüestions pendents, les anàlisis realitzades en aquesta tesi han aconseguit resoldre alguns punts que han contribuït al millor enteniment de la posició d'aquests organismes i que seran el punt de partida per a estudis posteriors basats en aquests tàxons de gran interès ecològic.

2.1 Delimitació i identificació d'espècies a planàries terrestres

Per realitzar estudis filogeogràfics i filogenètics és imprescindible comprovar que tots els individus i poblacions que representen una determinada espècie realment pertanyen a aquesta. En el nostre cas hem realitzat aquesta comprovació sempre mitjançant una anàlisi filogenètica prèvia, a l'estil de la metodologia de DNA Barcoding (Hebert i col. 2003). Així abans de realitzar els estudis filogenètics o filogeogràfics hem assignat els individus a la seva espècie corresponent basant-nos en la informació del gen COI. (Fig. 3 de la Introducció). Els resultats d'aquestes anàlisis ens permetien identificar aquells individus que podrien haver estat mal identificats a nivell de la morfologia externa o bé que podien pertànyer a noves espècies. En tots els casos complementàvem aquests resultats amb un estudi de la morfologia interna dels individus afectats, per tal de comprovar si els resultats morfològics i els moleculars coincidien, ja que l'ús d'un sol gen per delimitar una espècie o bé per identificar un individu pot donar lloc a errors importants.

Un exemple de la utilitat d'aquesta estratègia és el cas de l'espècie *Geoplanea goetschi*. Estudis morfològics previs havien fet palès l'existència de certes diferències anatòmiques entre els individus identificats com a *G. goetschi* (Carbayo, 2003; capítols 2 i 3). Gràcies a l'anàlisi de les seqüències de COI, nosaltres vam poder corroborar que aquestes variacions es devien a la presència de dues espècies críptiques (Fig. 9). A posteriori s'han tornat a analitzar els individus a nivell morfològic i s'han trobat més trets, que en un futur seran útils per la descripció d'una espècie nova (*Geoplanea goetschi* sensu Marcus, 1951; Imatge de la dreta) i per dur a terme els canvis taxonòmics pertinents a l'altra (*Geoplanea goetschi* sensu





Riester, 1938; Imatge de l'esquerra), que segurament passarà a formar part d'un gènere nou, proposat a la tesi de F. Carbayo (2003) amb el nom de *Riesteria*.

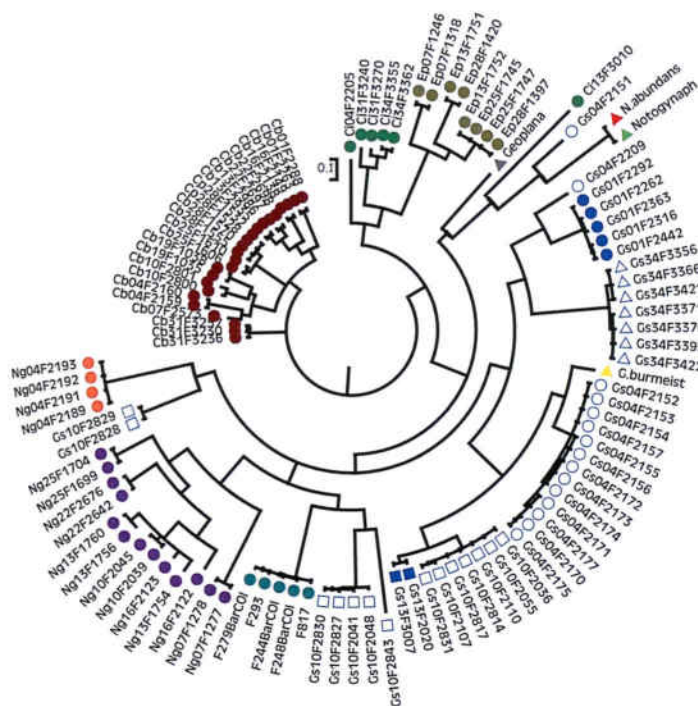


Figura 9. Arbre d'Inferència Bayesiana amb dades del gen COI sota el model GTR+I+G amb 3.000.000 de generacions que inclou representants de diverses espècies de la subfamília Geoplaninae. S'observa que els individus amb el símbol ● corresponen a l'espècie *Geoplanea goetschi* sensu Marcus 1951, mentre que els del símbol ● pertanyen a l'espècie *Geoplanea goetschi* sensu Riester, 1938, agrupacions clarament ben separades.



Figura 10. Imatge de dos individus del gènere *Microplana* que presenten un aspecte morfològic molt semblant. A l'esquerra un llinatge molecular nou encara per descriure a nivell morfològic (M22). A la dreta *Microplana terrestris*. Imatges: Eduardo Mateos.

El mateix ha ocorregut amb alguns individus del gènere *Microplana* de la Península Ibèrica. Al 2009, Mateos i col·laboradors van utilitzar dos marcadors genètics (COI i 18S) per esbrinar si els llinatges genètics coincidien amb els morfotipus definits amb caràcters anatòmics externs. Els seus resultats van indicar que molts dels trets morfològics externs no eren adequats per la identificació d'espècies, i que en bastants casos morfologies quasi

idèntiques corresponien a llinatges genètics força allunyats. En el nostre cas, molts dels espècimens identificats com *Microplana terrestris* per morfologia externa (aparentment idèntics, Fig. 10) han resultat pertànyer a diferents llinatges moleculars, pels quals, *a posteriori*, s'han trobat trets morfològics distintius (especialment a nivell del patró dels ulls). Tots aquests fets apunten a l'existència d'espècies críptiques; en un futur pròxim s'ampliaran les anàlisis amb estudis de l'anatomia interna del seu aparell copulador i, si és necessari, es descriuran les noves espècies.

El nombre d'espècies que ocupa un espai és important a l'hora de valorar-ne la biodiversitat. El concepte d'espècie ha estat molt debatut des de l'època de Darwin i fins i tot abans, i encara és motiu de controvèrsia. En el cas de les planàries, amb pocs trets morfològics a estudiar, de vegades és molt difícil discernir si les variacions observades són polimorfismes o bé caràcters distintius d'espècies. Per a les planàries brasileres, les evidències que s'han utilitzat per descriure noves espècies han estat morfològiques (estudi de l'anatomia interna de l'aparell copulador) i moleculars amb l'estudi de la variabilitat del gen mitocondrial COI i l'addició de la informació d'un gen nuclear, l'ITS-1. La conservació d'aquest fragment nuclear en general ens ha permès confirmar quan els individus pertanyen a la mateixa espècie. En algunes planàries d'aigua dolça hi ha diagnòstics d'espècies basades en pocs trets morfològics, de vegades tant sols un, però val la pena plantejar-se si realment una sola estructura anatòmica és suficient per separar espècies. Per exemple, la particularitat morfològica que van trobar a *M. terrestris* Vila-Farré i col. (2011) es va comprovar que era només un polimorfisme gràcies a l'estudi molecular (capítol 5). Per altra banda, la diferenciació molecular que s'observa en el DNA de *M. terrestris* entre l'est i l'oest de la Península Ibèrica, encara no s'ha reflectit en canvis morfològics, però podria ser un cas d'especiació incipient. Si es manté l'aïllament i manca de flux genètic entre els dos grups a llarg termini (potser d'aquí a centenars de milers o milions d'anys), es podria acabar produint un esdeveniment d'especiació **al·lopàtrica**, que s'hauria originat per causa de l'aïllament geogràfic inicial degut als moviments tectònics del terciari, i posteriorment agreujat per les glaciacions. En el cas de les dues espècies en què es divideix *G. goetschi* (molt més diferenciades a nivell genètic), no sembla que es tracti d'una especiació recent. En aquesta ocasió no parlàrem d'espècies críptiques, sinó que es tractaria més probablement de convergència evolutiva, assolint les dues espècies aparences externes molt semblants.

Així doncs, la combinació de diferents proves diagnòstiques (morfologia externa, DNA, aïllament reproductiu, comportament, citologia, ultraestructura dels caràcters, etc.) a l'hora de definir espècies de planàries terrestres és molt important, tot i que malauradament no sempre és possible. És molt més ràpid treballar amb eines moleculars que amb eines histològiques, per aquest motiu, la detecció de grups divergents dins de les espècies a nivell molecular (com ocorre a *Choeradoplana iheringi*, per exemple, al capítol 2), pot servir com a guia per un posterior estudi morfològic que ajudi a distingir els grups naturals.

2.2 Estat del coneixement de la biodiversitat de planàries terrestres

Una de les contribucions d'aquesta tesi a llarg termini serà la descripció de varies espècies noves, tant de planàries neotropicals, com de planàries ibèriques. Fins al 2008 s'havien descrit un total de 162 espècies de planàries terrestres només al territori brasiler; la majoria d'elles dins del Bosc Atlàntic (Carbayo i Froehlich, 2008). Aquest nombre representa gairebé el 20% del total conegut al món. Els nostres resultats indiquen clarament que el nombre d'espècies encara desconegudes pot ser molt més elevat. En els mostrejos realitzats per dur a terme les anàlisis filogeogràfiques i filogenètiques d'aquest treball, l'equip del Dr. Fernando Carbayo ha recol·lectat prop de 3.000 animals que representen unes 220 morfoespècies. Aquesta és una aproximació del nombre real d'espècies, doncs encara no s'ha pogut estudiar amb profunditat la histologia de tots els morfotipus, i per tant classificar-les correctament. De les 140 morfoespècies ja analitzades a nivell histològic, al menys unes 18 són espècies noves pendents de descripció morfològica (algunes incloses en aquesta tesi). Si la proporció es manté, arribaríem a tenir gairebé una trentena d'espècies noves, només en tres anys de mostrejos. Un cas especialment peculiar és el de la composició faunística de la Reserva Biológica Augusto Ruschi (població 01-AR al capítol 4). Fins ara no s'havien cercat planàries terrestres en aquest estat; en els mostrejos recents, en canvi, s'hi han trobat 55 morfoespècies, el major registre d'entre tots els parcs. Per altra banda, poques de les morfoespècies recollides a 01-AR es troben també en altres unitats de conservació del sud del Bosc Atlàntic. Aquesta localitat pertany al que està definit com a centre del Bosc Atlàntic (CAF), a diferència de la resta d'espais estudiats en aquest projecte, que pertanyen al sud (SAF). Les diferències trobades entre 01-AR i la resta de localitats ens indiquen que segurament la composició de les comunitats de planàries terrestres en les dues regions serà diferent, cosa que encara incrementarà més el nombre d'espècies en un futur.

Al contrari que a Brasil, les abundàncies d'individus per localitat de mostreig a la Península en general són petites, tot i que en algunes localitats es pot arribar a trobar un elevat nombre d'espècimens. Des de l'inici d'aquesta tesi el coneixement sobre les planàries terrestres a la Península Ibèrica ha augmentat exponencialment, sobretot gràcies al treball de Vila-Farré, Mateos i col·laboradors. Els estudis moleculars realitzats (Mateos 2009 i capítol 5), a més, han demostrat l'existència de diversos llinatges genètics que no es corresponen amb cap de les espècies descrites. Mateos i col. (2009) predeien la possibilitat d'arribar fins a un nombre de 15 espècies a la Península, i les anàlisis previes realitzades pel capítol 5 amb tots els individus recol·lectats (descartats per no ser *M. terrestris*), també apunten a la presència de noves espècies que podrien augmentar aquest nombre. Alguns d'aquests llinatges han estat ja analitzats a nivell de la seva morfologia interna i descrits i altres resten pendents de ser estudiats, de manera que la xifra de possibles espècies noves segueix en augment. Des de 2008 s'han descrit a nivell morfològic diverses espècies

autòctones de la Península i s'han localitzat punts on es poden trobar tàxons ja descrits a la resta d'Europa. La primera fou *Microplana groga* (Jones i col. 2008), procedent del parc de Collserola (a Barcelona) i paral·lelament, Vila-Farré i col. van descriure tres noves espècies més (*Microplana aixandrei*, *M. grazalemica* i *M. gadesensis*, totes procedents de Sierra de Grazalema, Andalusia). A més de les tres espècies gaditanes, Vila-Farré i col·laboradors han publicat al 2011 la descripció de dues espècies noves més (*M. hyalina* i *M. robusta*) i han donat noves cites de *M. monacensis* a Navarra (abans només localitzada a Mònaco), *M. groga* i *M. terrestris*, entre d'altres. Així doncs el nombre d'espècies descrites de planàries terrestres de la Península ha augmentat de 3 a 9 en els últims anys.

2.3 Canvis en la sistemàtica dels Continenticola

En l'estudi filogenètic molecular dels Continenticola, capítol 1, vam inferir una sèrie d'agrupacions que contradeien un bon nombre de tàxons definits fins aquell moment en base a la morfologia, i per tant proposàvem la necessitat de fer una revisió de la sistemàtica d'aquest grup (Fig. 11 esquerra). Aquests canvis, junt amb d'altres ja proposats anteriorment, han estat recollits en la nova taxonomia dels Tricladida publicada recentment (Sluys i col. 2009), basada sobretot en les nostres dades moleculars, donada la manca de dades morfològiques. Un dels resultats més importants del capítol 1 és que es corroborà definitivament que el grup germà de la família Geoplanidae és la família Dugesidae, fet que s'havia proposat anteriorment (Carranza i col. 1998a; b; Baguñà i col. 2001; Baguñà i Riutort 2004). En conseqüència, les planàries terrestres ara estan incloses definitivament dins del subordre **Continenticola** (Carranza i col. 1998b), la superfamília **Geoplanoidea** (Stimpson, 1857) i la família **Geoplanidae** (Stimpson, 1857) (Figura 11B) de manera que s'elimina l'ús del terme Terricola per denominar els triclàdides terrestres, i aquests deixen de ser un subordre per passar a ser una família. Aquest fet ha obligat a degradar un rang tots els seus tàxons, així, el que eren famílies han esdevingut subfamílies i aquestes, a part de patir reorganitzacions, han esdevingut tribus, en algunes ocasions (Taula 3). A més d'aquest canvi substancial les nostres anàlisis també van resultar en la necessitat de la reorganització interna d'alguns grups de planàries terrestres. Un exemple de canvi a nivell de les agrupacions internes és el fet que vam detectar que les dues subfamílies (Rhynchodeminae i Microplaninae) que

Taula 3. Comparació del grau filogenètic dels diferents grups de planàries terrestres estudiats, abans i després d'aquesta tesi.

Grup antic/nou	Nivell previ	Nivell actual*
Terricola / Geoplanidae	SubOrde	Família
Bipaliidae / Bipaliinae	Família	Subfamília
Geoplanidae / Geoplaninae	Família	Subfamília
Rhynchodemidae / Rhynchodeminae	Família	Subfamília
Caenoplaninae / Caenoplanini	Subfamília	Tribu
Microplaninae / Microplaninae	Subfamília	Subfamília
Rhynchodeminae / Rhynchodemini	Subfamília	Tribu

*Segons Sluys i col. 2009

constituïen la família Rhynchodemidae necessitaven una revisió morfològica i taxonòmica ja que no formaven un grup monofilètic (Figura 11A), proposta recollida en el treball d'Sluys i col·laboradors (2009) (Annex 3; Taula 3). Per tant, dins les planàries terrestres hi trobem actualment les subfamílies **Bipaliinae** (Graff, 1896), **Microplaninae** (Pantin, 1953), **Rhynchodeminae** (Graff, 1896) i **Geoplaninae** (Stimpson, 1857). Així també, dins de la que ara és la subfamília Rhynchodeminae, s'inclouen 5 tribus, entre elles Rhynchodemini i Caenoplanini, que en les nostres anàlisis apareixien sempre com a grups germans.

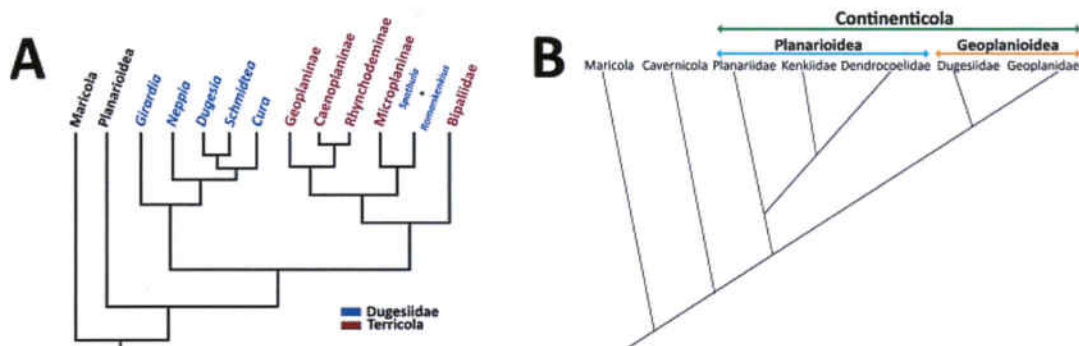


Figura 11. A: arbre resum de la filogenia molecular dels triclàdides (modificat d'Álvarez-Presas i col. 2008; Capítol 1), on els noms dels taxons segueixen la nomenclatura prèvia a Sluys i col. 2009 (Taula 3). B: esquema filogenètic dels triclàdides segons Sluys i col. 2009.

La nova taxonomia proposada però no recull totes les troballes del capítol 1 d'aquesta tesi. En els arbres obtinguts algunes espècies de dugèsids s'agrupen amb les planàries terrestres, el que podria representar un retorn a l'aigua dolça. Ball al 1981 ja havia denotat que aquestes espècies presentaven algunes peculiaritats a nivell morfològic. Dins d'aquest grup "especial", el gènere *Romankenkius* presenta adenodàctil, caràcter que l'apropa a les planàries terrestres, que solen tenir també aquesta estructura, tot i que no se'n coneix gaire bé el seu origen i funció. L'agrupació de *Romankenkius* i *Spathula* amb Microplaninae (Fig. 11A) és difícil d'explicar, ja que a més de que es tracta de planàries amb requeriments ecològics molt diferents, tenen distribucions completament separades (a la Fig. 12 es pot veure la distribució dels gèneres de dugèsids i a la Fig. 14 la dels geoplànids), que només podrien explicar-se mitjançant un possible ancestre comú present a Gondwana. Per tots aquests motius aquesta agrupació no s'ha tingut en compte en la nova taxonomia proposada. Quedaria pendent incloure a l'anàlisi més tàxons i sobretot més marcadors moleculars, capaços de donar informació sobre canvis tan antics, per tal d'augmentar la resolució dels arbres obtinguts i poder tenir una hipòtesi clara sobre quina és la posició filogenètica d'aquests gèneres. Un estudi morfològic detallat també seria interessant, ja que si aquests organismes provenen de planàries terrestres, haurien de tenir algun caràcter o resta de caràcter que els identifiqués com a tal, com per exemple restes de la sola ventral característica de les planàries terrestres, o algun tipus de musculatura especial.

En resum, malgrat que no s'han pogut resoldre totes les qüestions plantejades d'inici sobre la classificació de les planàries, l'esquema actual és molt més clar que fa uns anys. A l'Annex 3 es pot veure la comparació dels dos esquemes taxonòmics existents abans i després de la nostra aportació a la filogènia dels triclàdides.

2.3.1 Canvis en la taxonomia d'alguns grups

Els grans grups que trobem a les filogènies moleculars de Geoplaninae (capítol 2) són congruents amb algunes agrupacions morfològiques fruit d'un estudi de Grau i col·laboradors (Grau, 2010), encara no publicat i basat en algunes descripcions anteriors de F. Carbayo (2003). Gràcies a la comparació entre els resultats moleculars i aquests estudis és possible avaluar quins són els caràcters morfològics més informatius a l'hora de esbrinar les relacions entre gèneres. *A priori*, sembla ser que alguns dels caràcters més rellevants són aquells que estan relacionats amb el tipus de musculatura i la disposició dels feixos musculars, així com la distribució dels ulls i les fosses sensorials i el tipus de faringe. A partir de la combinació dels resultats moleculars i les diagnosi morfològiques, i com ja es proposa en el capítol 2, es descriuran noves espècies i fins i tot nous gèneres que renovaran la sistemàtica de la subfamília Geoplaninae, augmentant així la seva diversitat, i sobretot el seu coneixement.

Pel que fa a Microplaninae, encara no s'ha pogut fer un estudi profund sobre la seva filogènia interna (només disposem de representants del gènere *Microplana*), però sí que s'ha vist que la seva taxonomia canviarà en un futur, fruit de la incorporació de noves espècies, algunes d'elles trobades durant el curs d'aquesta tesi. No obstant això, aquesta subfamília està lluny de ser la més diversa en quant a gèneres i espècies com és el cas de Geoplaninae, ja que sembla presentar una variabilitat molt més monòtona i reduïda. El baix nombre de gèneres pertanyents a la subfamília Microplaninae contradiu la hipòtesi d'una posició més primitiva per al grup (Fig. 13B), donat que en general s'espera que un grup antic presenti major diversitat (Losos i Glor, 2003). No obstant això, alguns dels seus trets morfològics, així com la seva distribució cosmopolita (Fig. 14), recolzarien la seva condició més primitiva, que pel moment, quedarà com un altre interrogant i que comentarem a continuació.

2.4 Congruència entre dades moleculars, morfològiques i de distribució geogràfica

2.4.1 Els geoplànids i els dugèsids són grups germans?

Les evidències moleculars recolzen de forma molt clara l'agrupació de dugèsids i geoplànids com a grups germans, en canvi es difícil trobar evidències morfològiques que donin suport a aquesta agrupació. L'únic tret comú entre planàries terrestres i dugèsids trobat per Carranza i col·laboradors (1998b), l'estructura de l'ull, podria no ser una

sinapomorfia, ja que, segons Sluys i Kawakatsu (2006), també es dona en moltes espècies de dendrocèlids i fins i tot en alguns membres de la família Planariidae (Sluys i col. 2009). Treballs de Falleni i col. (2006 i 2009) han descrit alguns caràcters ultraestructurals de les gònades femenines de diverses espècies de planàries terrestres, com són la presència de rovell i la manca de grànuls corticals als oòcits, juntament amb l'existència de glòbuls de la closca de l'ou als vitel·lòcits, que suggereixen una proximitat filogenètica major entre les planàries terrestres i els dugèsids, que no pas amb les planàries marines ni amb les altres planàries d'aigua dolça (planàrids i dendrocèlids). A més, aquest caràcter no es troba en altres planàries d'aigua dolça ni en planàries marines o altres platihelminths (Sluys i col. 2009), fet que recolzaria les evidències moleculars.

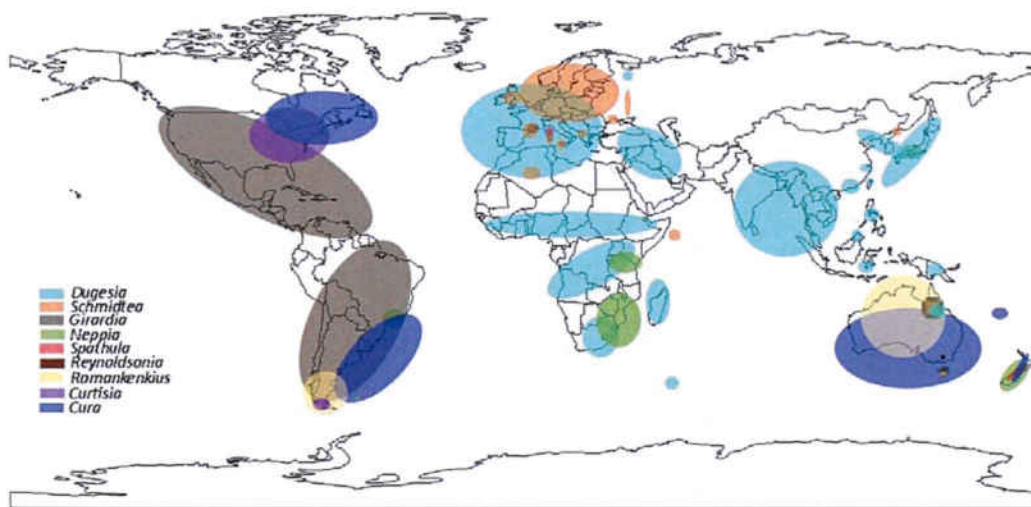


Figura 12. Mapa de distribució dels gèneres de la família Dugesidae. Informació extreta de <http://turbellaria.umaine.edu> (incloent cites tant d'endemismes com d'introduccions).

2.4.2 Les planàries terrestres són monofilètiques?

Un dels temes importants que concerneixen la filogènia dels Continenticola està relacionat amb la monofília de les planàries terrestres, que no s'ha pogut recuperar mitjançant cap dels estudis moleculars que s'han fet fins al moment. El nostre treball és sense dubte el més complert en quant a nombre d'espècies i grups inclosos en la filogènia, així com en nombre de gens implicats. No obstant això, encara no està clar si les planàries terrestres són un grup monofilètic o no. Les nostres dades semblen indicar que la resposta positiva és la correcta, però no podem oblidar que aquests resultats no han rebut mai un suport molt elevat degut a un artefacte de les dades en l'arrelament de l'arbre. L'atracció del grup extern cap a les branques llargues de diferents grups de planàries terrestres, en molts casos impedia recuperar aquest com un grup monofilètic. Aquest problema pot estar relacionat amb l'antiguitat del grup i amb una radiació, possiblement massa ràpida, relacionada amb la

colonització del medi terrestre. Sluys i col 2009 confirmen que existeixen tres sinapomorfies morfològiques que recolzarien la monofília del grup, (definides pel mateix Sluys al 1989(a)): la presència de la sola ventral, el sistema nerviós diploneure i un tipus de musculatura molt complexa a la faringe. Basant-nos en això, assumim la monofília dels geoplànids, a l'espera de noves dades moleculars que aconseguixin demostrar aquesta posició.

2.4.3 Quin grup de planàries terrestres és més antic?

D'acord amb els nostres resultats i tirant enrere en el temps, sembla ser que el que va emprendre l'aventura terrestre hauria estat l'ancestre dels geoplànids (descendent de l'ancestre comú de geoplanids i dugesids), acceptant les evidències de que el grup és monofilètic. Quin és el grup més proper a aquest possible ancestre dels que tenim en l'actualitat és el que no queda del tot clar, possiblement degut altre cop al problema de l'arrelament.

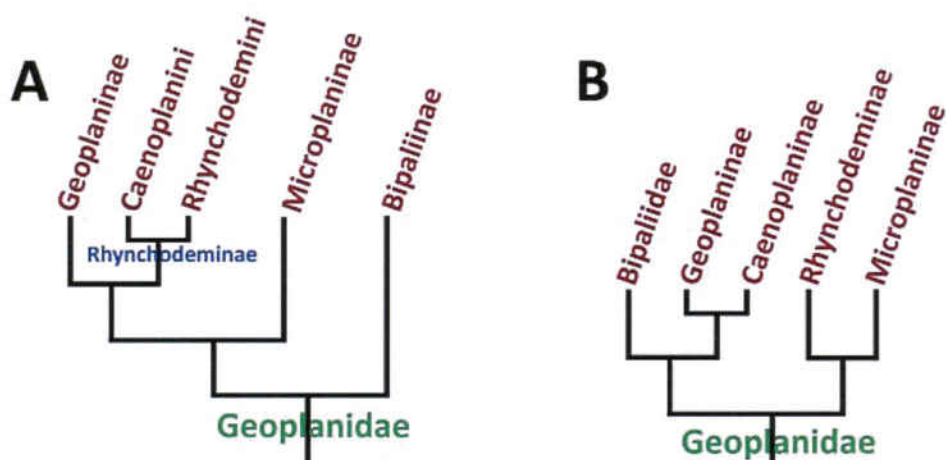


Figura 13. Esquema de la classificació de les planàries terrestres (Geoplanidae) que inclou només els grups que s'han estudiat en aquesta tesi, segons la nova nomenclatura proposada a Sluys i col. 2009 i sense incloure *Spathula* i *Romankenkius*. A: Opció que contempla els Bipaliinae com a més basals. B: Microplaninae a la base i agrupacions segons Marcus (1953) i Froehlich (1967) (amb nomenclatura antiga).

Un cop fora de l'aigua les nostres dades moleculars suggereixen que els Bipaliinae serien el primer grup en aparèixer (Fig. 13A), i posteriorment s'haurien separat els Microplaninae i l'agrupació formada per Geoplaninae i Rhynchodeminae (incloent els actuals Rhynchodemini i Caenoplanini; Annex 3). El fet de tenir molts ulls marginals formats per una cèl·lula pigmentada (Shirasawa i Makino 1981; Sluys 1989c), converteix els Bipaliinae en un excepció dins dels geoplànids i ens podria ajudar a entendre aquesta posició més basal del grup, ja que aquesta estructura és més propera a Maricola i Planariidae. Malgrat això, també es podria entendre l'estructura ocular de Bipaliinae com una pèrdua secundària i no com un caràcter primitiu. Això, sumat amb la restringida distribució del grup (contrària al que s'esperaria d'un grup taxonòmic més antic; Fig. 14) ens fa dubtar sobre la posició basal de Bipaliinae. A més, no s'ha plantejat anteriorment que aquest grup pogués ser basal.

Al contrari, Marcus (1953) i Froehlich (1967) suggeriren que la família Rhynchodemidae, i especialment la subfamília Microplaninae, seria la més primitiva, basant-se en la distribució biogeogràfica i les característiques morfològiques (petites espècies de cos cilíndric i allargat, amb l'extrem anterior arrodonit o truncat, i amb un parell d'ulls disposats anteriorment). D'altra banda, Bipaliidae i Geoplanidae serien derivats per ser geogràficament més limitats. Anteriorment, Froehlich (1955b) també havia proposat que els Microplaninae podien ser basals dins de les planàries terrestres degut a la presència d'un sistema nerviós en forma de cordons, caràcter que ell considerava més primitiu. Aquest estat de "primitivisme" seria compatible amb l'agrupació de Microplaninae amb les planàries d'aigua dolça dels gèneres *Spatula* i *Romankenkius*. Tot i això, no està clar que aquest tipus de sistema nerviós sigui un caràcter primitiu, ja que podria tractar-se d'una adaptació a la forma i mida del cos d'aquest grup (com passa també dins d'alguns gèneres de Geoplaninae; capítol 2). Així doncs, el problema sobre quin és el grup més basal de planàries terrestres segueix obert, a l'espera de noves dades que puguin pal·liar els efectes de la ràpida radiació que va patir el grup.

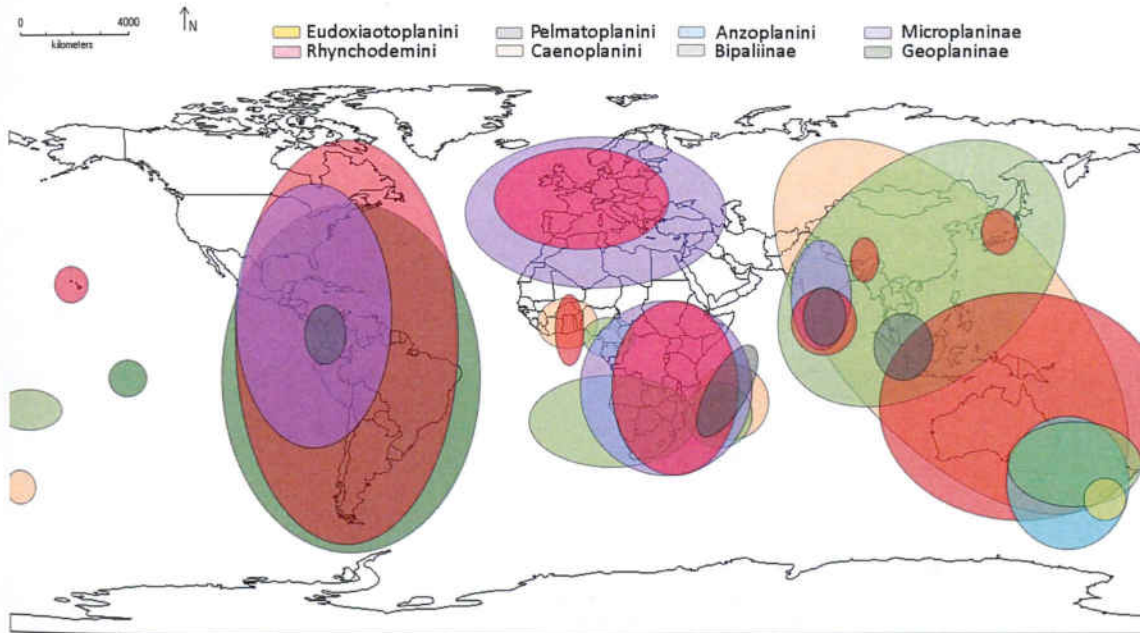


Figura 14. Distribució geogràfica de les subfamílies i tribus de planàries terrestres, segons les dades més recents, publicades a <http://turbellaria.umaine.edu>.

Es probable que l'origen dels dos grans grups (dugèids i geoplànids) sigui molt antic i la radiació de les planàries terrestres ràpida, cosa que s'observa en la curta longitud de les branques basals en contrast amb les molt llargues branques terminals (arbres filogenètics, capítol 1). Així doncs, calen altres evidències (altres gens, representants d'altres gèneres o altres caràcters morfològics) que facin possible determinar quina és la posició basal dins de les planàries terrestres.

3 FILOGEOGRAFIA DE PLANÀRIES TERRESTRES

3.1 Bosc i planàries: una estreta relació

Les característiques ecològiques dels tàxons són importants per entendre quina és la seva història evolutiva. Donada la seva dependència del medi que habiten, degut a la manca de mecanismes per controlar la humitat, els canvis en les comunitats de planàries terrestres estan molt interrelacionats amb els boscos en els què es troben (els boscos humits). A la Península es troben planàries terrestres tant a fagedes (Fig. 14A) com a boscos d'alzines i roures, així com també a zones de vegetació de ribera (pròpia de les vores dels rius). Sempre, però, en zones humides i ombrívols. Es solen trobar sota pedres, però també sota els troncs podrits i en comptades ocasions sota la fullaraca (possiblement, aquest és el lloc on realment hi ha major nombre d'individus, però també és el menys favorable per la cerca d'aquests). A més, a excepció de les espècies exòtiques, les planàries de la Península són sensibles a l'estat de conservació de l'hàbitat en el què es troben, i és difícil trobar-les en zones humanitzades (tot i que se n'han trobat en àrees de *picnic* o els voltants d'alguna casa enmig del bosc). Per contra, a les planàries brasileres no és infreqüent trobar algunes espècies generalistes als voltants de les cases o en nuclis urbans (fins i tot prop dels contenidors de la ciutat de São Paulo (Cláudia Olivares, comunicació personal)). Malgrat això, que són excepcions, els geoplànids brasilers es troben a boscos semicaducifolis i ombròfils densos (Fig. 14B), mostrant especial preferència pels territoris coberts d'*Araucaria* (Fig. 14C), de manera que també són molt dependents dels boscos que habiten.



Figura 14. Imatges dels boscos on es troben de forma preferent les planàries terrestres. A: bosc d'*Araucaria* del sud de Brasil (Floresta Nacional de São Francisco de Paula); B: bosc ombrívol dens de l'estat de Santa Catarina (Paulo Lopes); C: fageda típica de la Península Ibèrica (Astúries).

Aquesta connexió bosc-planària, més el fet que són organismes especialistes, fan de les planàries un marcador biològic molt útil per detectar canvis en la distribució històrica dels boscos. L'estreta relació de les planàries terrestres amb els boscos queda molt ben reflectida al capítol 5 d'aquesta tesi, on es veu com la història evolutiva de les planàries de la Península Ibèrica ha seguit fidelment la història del bosc humit. Aquesta situació ens

dóna més confiança a l'hora d'assegurar que la presència de planàries terrestres al Bosc Atlàntic és una clara indicació de la presència del bosc.

Per altra banda, les planàries terrestres són animals amb baixa capacitat de dispersió. Aquesta característica probablement ha contribuït en la generació del patró d'aïllament per distància que s'observa sobretot a les poblacions de *C. bergi* al llarg del Bosc Atlàntic, i en concret a les de més al sud (S-SAF), així com també a les poblacions de *M. terrestris* de l'oest de la Península Ibèrica. La baixa capacitat dispersiva es deu tant a la seva dependència del bosc (ja que si no hi ha bosc, no poden passar) com a la manca de formes resistents. Probablement aquests característiques junt amb la seva mida petita fan que no requereixin una superfície massa gran per mantenir les seves poblacions, de manera que poden persistir en refugis aïllats, de mida massa petita per als vertebrats (Garrick i col. 2007; Casu i col. 2011). De fet, tots els resultats obtinguts en aquesta tesi són els que esperàvem trobar en espècies amb poca mobilitat de regions ecològicament estables, sobretot en el cas del Brasil.

3.2 L'origen de les poblacions brasileres és molt antic

La gran variació genètica, tant dins com entre poblacions, que trobem a *C. bergi*, així com els nodes profunds de les filogènies inferides, indiquen que l'origen de la diversitat de les poblacions d'aquesta espècie és molt antic. El fet que l'ITS-1 presenti el mateix patró d'estructuració que COI a les poblacions brasileres també és un signe d'estabilitat a llarg termini i d'antiguitat. Finalment, la datació de la diversificació de les poblacions en fa uns 10 milions d'anys i dels tres grans grups (N-SAF, C-SAF i S-SAF) en fa uns 8 (Fig. S5, capítol 4), és una edat molt anterior al Plistocè. De fet, aquesta datació ja situaria les planàries en el bosc ancestral de l'actual Amazones i el Bosc Atlàntic que cobria la regió, i permetria explicar aquestes primeres grans divisions per esdeveniments geològics.

Així, l'origen de la diversitat actual d'alguns organismes (incloses les planàries terrestres), és tan antic que una de les hipòtesis més influents sobre l'origen de la diversitat Neotropical, la hipòtesi dels Refugis del Plistocè (Haffer, 1969; Vanzolini i Williams, 1970), no pot explicar la majoria dels esdeveniments d'especiació ja que moltes de les espècies es van originar abans que comencessin els cicles glacials del Quaternari (Hewitt, 1996; Taberlet i col. 1998; Hewitt, 1999; Costa, 2003; Rull, 2008; Hoorn i col. 2010).

3.3 Estructura genètica de les poblacions de planàries terrestres brasileres

L'anàlisi genètico-poblacional realitzada en aquesta tesi mostra que les poblacions de

planàries terrestres del sud del Bosc Atlàntic brasiler (SAF) tenen una elevada estructuració genètica. De fet, detectem tant uns alts nivells de diversitat genètica (dins i entre poblacions), com una alta estructuració genètica (inter- i intrapoblacional) i fins i tot la petjada molecular de l'aïllament per distància. La comparació dels nostres resultats amb els de Sunnucks i col. (2006), basats en dades de planàries terrestres australians, revela que, tot i utilitzant els mateixos organismes, *C. bergi* presenta valors molt més alts de variabilitat genètica. A més, no vam detectar signes d'expansió poblacional (sobretot al sud). El fet de no trobar l'empremta característica de colonitzacions recents contradiu resultats anteriors, alguns basats en models paleoclimàtics, que prediuen una alta inestabilitat a SAF (Carnaval i Moritz, 2008) amb una possible recolonització des dels territoris de més al nord. Els resultats obtinguts amb planàries impliquen la presència de boscos de manera relativament continua a les regions del sud del Bosc Atlàntic. Les nostres dades, per tant, donen suport a les conclusions derivades d'estudis on s'ha observat un nombre elevat d'espècies endèmiques precisament a les regions del sud (Costa i col. 2000; Pinto-da-Rocha i col. 2005). Una possible explicació per la inexactitud de les prediccions dels models paleoclimàtics podria residir en que les dades de precipitació i clima antics no tenen gaire precisió. A més, és possible que aquests dos paràmetres no siguin suficients per predir correctament la presència del bosc humit: de fet hi ha altres factors que també poden afectar la biota.

3.4 Història evolutiva de les poblacions brasileres

Els resultats de les anàlisis de coalescència i dels models d'ABC globals i individuals, suggereixen que la història evolutiva del Bosc Atlàntic ha sigut modelada per l'acció de diversos mecanismes. De fet, una de les conclusions més importants que es poden extreure de tots els treballs filogeogràfics realitzats al Bosc Atlàntic és que la història evolutiva de la zona ha estat molt complexa, i que un sol mecanisme evolutiu no és capaç d'explicar els patrons de variació que es puguin trobar al nord, al centre i al sud de la regió (Fitzpatrick i col. 2009). En una regió geogràficament tan diversa és poc probable que una única explicació basada en els refugis forestals, o les barreres geològiques pugui explicar la història evolutiva d'aquesta regió (Thomé i col. 2010). En el nostre cas, els nostres resultats permeten hipotetitzar el següent escenari evolutiu: l'ancestre comú de totes les poblacions de *C. bergi* seria molt antic (~13 milions d'anys) i es podia trobar distribuït al llarg de tot el Bosc Atlàntic. La primera limitació al flux gènic que va patir aquesta població ancestral (entre CAF i SAF, ~10 milions d'anys) podria correspondre a una barrera geogràfica antiga, com l'orogènesi del Riu Doce. Aquesta barrera al flux gènic també es detecta en altres organismes, com per exemple ocells (Cabanne i col. 2008), mamífers (Costa i col. 2000) i papallones (Brown, 2005). Així doncs, les diferències en el patró de variació entre la població de més al nord (01-AR), que es troba dins de CAF (Fig. 15) i la resta, tindria el seu origen a la limitació al flux gènic imposat per aquesta barrera geogràfica.

L'empremta filogenètica ens ha servit per dividir el SAF en tres grans regions geogràfiques (N-SAF, C-SAF o S-SAF) (Fig. 2, capítol 4). Probablement aquesta divisió del SAF es podria explicar també per la presència de barreres geogràfiques (Fig. 15). La divisió entre N-SAF i C-SAF no té una barrera geològica clara, tot i que a la zona de contacte s'hi troben un gran nombre de discontinuïtats que històricament poden haver limitat el flux gènic entre poblacions d'organismes. Per exemple, entre les poblacions 10-SB i 13-EC hi ha situada la zona de falla de Campo do Meio (4 en la Fig. 15) i la conca del riu São Francisco (5 en la Fig. 15), que van poder tenir influència en la separació d'aquestes regions. La divisió entre C-SAF i S-SAF és més clara, doncs coincideix amb la situació del lineament de Guapiara (1, Fig. 15), que es troba entre les poblacions 22-PI i 25-SL.

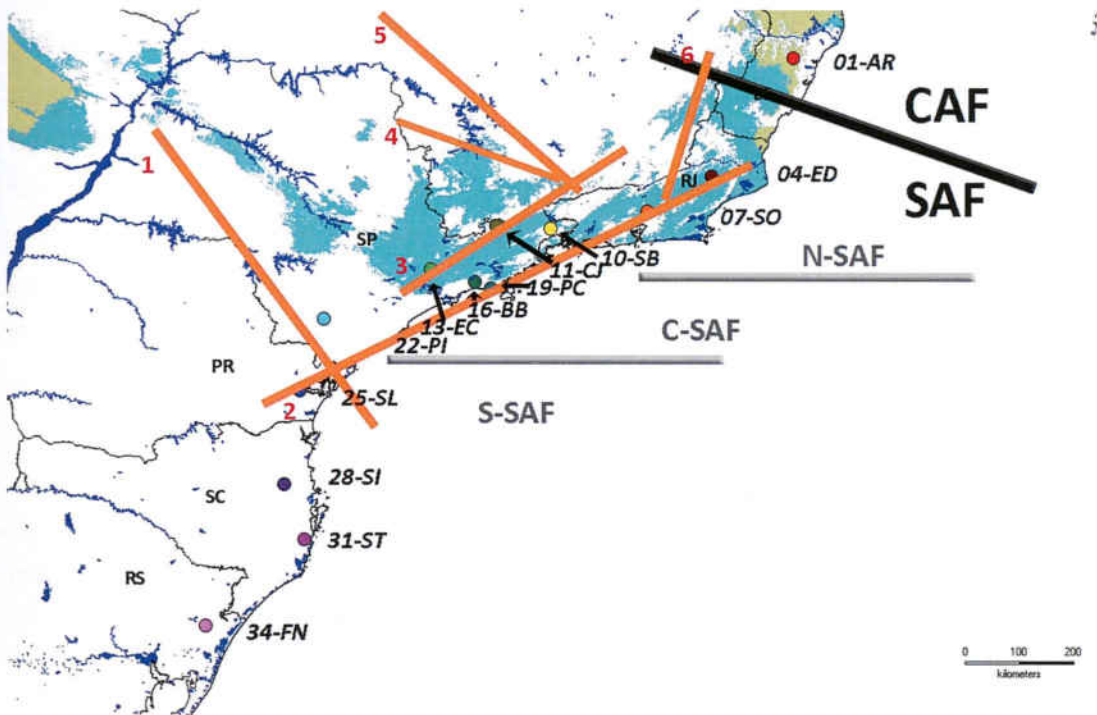


Figura 15. Principals barreres geogràfiques presents a la regió del Bosc Atlàntic basant-se en Thomé i col. 2010. 1: Lineament de Guapiara; 2: zona de cisallament de Cubatão; 3: discontinuïtat del riu Paraíba do Sul; 4: zona de falla de Campo do Meio; 5: discontinuïtat superior del riu São Francisco; 6: falla de Caratinga. CAF: Bosc Atlàntic central; SAF: Bosc Atlàntic sud; N-SAF: nord del Bosc Atlàntic sud; C-SAF: centre del Bosc Atlàntic sud; S-SAF: sud del Bosc Atlàntic sud. L'ombregiat blau cel correspon a la predicció de bosc segons Carnaval i Moritz (2008) fa 21,000 anys segons els models més restrictius.

És interessant destacar que les tres regions del SAF han tingut històries evolutives diferents. Així, les poblacions de més al nord (N-SAF) presenten característiques més compatibles amb les prediccions dels models paleoclimàtics de Carnaval i Moritz (2008). Es tractaria doncs d'una regió de clima més estable, majoritàriament coberta per boscos i amb pocs efectes de les glaciacions del Plistocè. Segons els resultats dels models d'ABC (Fig. 16) no hi ha evidències clares ni d'una expansió poblacional ni d'estructuració genètica deguda

a possibles contactes secundaris.

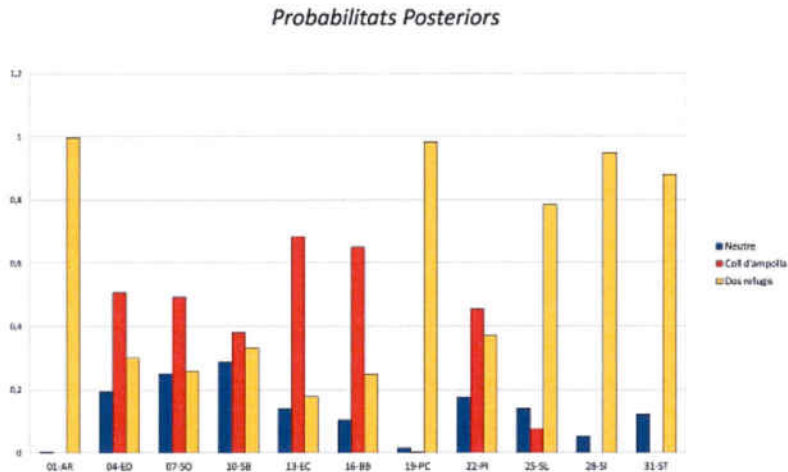


Figura 16. Comparació de les probabilitats posteriors dels tres models testats a cada població de forma individual (SNM -model neutre estàndard- en blau; BOT -model de coll d'ampolla- en vermell; REF -model de dos refugis- en groc).

Les característiques genètiques de C-SAF també suggereixen que aquesta regió ha estat coberta (com a mínim parcialment) per bosc durant un període prolongat de temps. Un cas singular dins d'aquesta regió és el de la població 19-PC, que mereix una menció especial (secció 1.4.1.). A més, a les poblacions de C-SAF (13-EC, 16-BB, 19-PC i 22-PI, Fig. 15) s'observa un patró d'agrupació filogenètica segons la proximitat de les poblacions al mar. S'agrupen per una banda 13-EC i 22-PI (amb una posició geogràfica més interior) i per l'altre 16-BB i 19-PC (més costaneres). Això es podria explicar per la presència de barreres físiques que impedeixen el flux gènic entre les poblacions més costaneres i les més interiors. La discontinuïtat de Cubatão (2, Fig. 15) podria ser una d'aquestes barreres, ja que separa clarament les poblacions de l'interior de les més properes a la costa. A més, la subdivisió de C-SAF en dos grups pot estar relacionada amb la formació de la vall del Riu Paraíba do Sul (3, Fig. 15), que va començar fa uns 15 milions d'anys (Petri i Fúlfaro, 1983; d'Horta i col. 2011). Aquesta va donar lloc a dues de les grans cadenes muntanyenques del Bosc Atlàntic (Serra do Mar i Serra da Mantiqueira). En els anys posteriors a la seva formació ha tingut efectes importants en les distribucions de diferents organismes, com algunes aus (d'Horta i col. 2011) o *Geoplana goetschi* sensu Marcus (Annex capítol 4). D'altra banda, la població 25-SL (S-SAF) presenta alguns individus més propers a 16-BB i 19-PC, totes elles costaneres. A les zones intermèdies entre la població 25-SL i les de més al nord en l'actualitat no hi ha bosc conservat perquè és una regió molt afectada per l'antropogenització, i per tant no han pogut ser mostrejades. Possiblement existia una continuïtat entre les poblacions costaneres, aquestes poblacions intermèdies (extingides en l'actualitat) presentarien una variabilitat semblant a la de la població 25-SL i la resta, que explicarien les semblances

que s'observen actualment entre les poblacions 25-SL i 16-BB i 19-PC, separades per molts kilòmetres de distància. Així, a C-SAF sembla que la influència dels canvis en el nivell del mar i la proximitat a la costa va ser més forta que a les altres regions (N-SAF i S-SAF).

La història evolutiva de S-SAF ha estat més complexa. Els nostres resultats indiquen que aquesta regió no ha estat colonitzada recentment per les planàries terrestres. En conseqüència, ha hagut d'estar coberta per boscos, com a mínim en fragments des de fa molt de temps. En aquest cas, tots els nostres resultats mostren una gran estructuració genètica, fet que concorda amb Thomé i col. (2010), que basant-se en dades de gripaus, van detectar un possible refugi a Rio Grande do Sul, que podria haver estat una de les fonts de la diversitat que actualment es detecta al S-SAF. A més, l'estructura genètica observada a les poblacions de S-SAF no és compatible amb un model d'equilibri neutral (SNM) (Fig. 16). Per contra, aquesta estructuració pot ser la marca molecular d'un procés en el que en el passat els organismes haguessin estat separats en fragments petits de bosc. De fet en aquestes poblacions el millor model d'ABC és el de refugi, on les poblacions actuals correspondrien a la barreja d'individus procedents de diferents refugis d'una mateixa àrea geogràfica (contactes secundaris). Les nostres anàlisis indiquen que aquests contactes secundaris han de ser relativament recents, de l'ordre de milers d'anys, i podrien correspondre amb el final de l'últim període glacial (ocorregut entre fa 23.000 i 12.000 anys; Ledru i col. 2009), quan els hàbitats tropicals es van desplaçar i expandir cap a latituds majors (Behling, 1995; Behling i Negrelle 2001; Bauermann, 2003; d'Horta i col. 2011).

3.4.1 El cas particular de les poblacions d'Augusto Ruschi (01-AR) i Praia de Cambury (19-PC)

Les poblacions 01-AR i 19-PC presenten unes particularitats que mereixen ser comentades. La població 01-AR es troba al nord del corredor de Serra do Mar (a l'estat d'Espírito Santo) dins del que Cabanne i col. (2008) consideren el centre del Bosc Atlàntic (CAF). La presència d'un bosc més antic en aquesta regió demostrada prèviament (Carnaval i Moritz, 2008; Carnaval i col. 2009), podria explicar l'alt nivell de diversitat nucleotídica que es troba en aquesta unitat de conservació, encara que també podria representar un contacte secundari recent entre poblacions molt diferents genèticament. Probablement aquesta població sigui més propera genèticament a altres poblacions no mostrejades situades més al nord de CAF. Aquest podria ser un dels motius pels quals observem una diferència tan notòria respecte la resta de poblacions de *C. bergi*. Un altre factor que podria estar influïent en la forta diferenciació de la població 01-AR és el canvi en el clima i l'augment de pluges que hi ha a l'estat d'ES respecte al nord de RJ (Oliveira-Filho i Fontes, 2000), i que estaria condicionant el tipus de bosc que s'hi troba, més favorable per les planàries terrestres. L'elevada variabilitat nucleotídica que es troba a la població 01-AR, juntament

amb algun polimorfisme morfològic existent (F. Carbayo, comunicació personal), podria indicar que ens trobem davant d'un cas d'especiació incipient, però caldrien més dades per confirmar-ho.

La població 19-PC també presenta dos clades filogenètics molt divergents (Fig. 2A i 2B del capítol 4): un que s'agrupa amb el conjunt de les poblacions del centre (C-SAF) i l'altre amb les del nord (N-SAF). Durant el Plistocè i l'Holocè la costa d'Amèrica del Sud va patir transgressions marines degudes bàsicament als canvis climàtics i les fluctuacions del nivell del mar (Suguio i col. 1985; Ribeiro, 2006). Tots aquests moviments poden haver afectat la composició de la població 19-PC (com s'ha proposat per altres organismes; Suguio i Martin, 1978), que pel que sembla, ha tingut una història molt complexa, influïda per molts altres aspectes. Un signe d'això és que cap dels models assajats amb ABC és suficientment probable encara que el de refugi presenta les probabilitat posterior més alta (Fig.16). Aquesta població i la 16-BB són molt properes a zones humanitzades, per tant, existeix la possibilitat que els individus de les dues localitats s'hagi barrejat en algun moment, fet que donaria lloc a les relacions que trobem avui (correspondria també, per tant, a un contacte secundari).

3.4.2 Comparació de dues espècies en un mateix territori

El patró de distribució de diferents espècies també ens pot ajudar a explicar la història evolutiva. De fet, al comparar diferents espècies pertanyents a les mateixes poblacions del Bosc Atlàntic brasiler (Annex capítol 4), no observem patrons generals. Les espècies tenen diferents requeriments ecològics, cosa que limita les seves distribucions de manera diferenciada. Una prova d'això és que hi ha poblacions dins del rang de distribució de *C. bergi* on no s'ha trobat aquesta espècie i en canvi sí que existeix *G. goetschi* sensu Marcus, per exemple. L'esforç de mostreig ha estat el mateix per totes les espècies, per tant, podem estar segurs que si no s'ha trobat és perquè no n'hi ha o que està present a una densitat molt més baixa. Fins i tot entre espècies amb requeriments ecològics similars, mateixa distribució actual i nivells de dispersió semblants, poden tenir diferents històries evolutives, particularment en ambients geològicament dinàmics (Marske i col. 2011). Així doncs, no és d'estranyar trobar resultats desiguals entre espècies. La futura cerca d'altres espècies, amb distribucions solapades a les de *C. bergi* o *G. goetschi*, ens permetrà realitzar anàlisis comparatives que ens podran donar una visió més global sobre la història evolutiva i demogràfica del Bosc Atlàntic brasiler.

3.5 Patrons i nivells de variabilitat a les planàries ibèriques

L'origen de la diversitat a les poblacions de la Península no sembla tan antic com el de

les espècies Brasileres. Tant pel gen mitocondrial com pel nuclear presenten uns nivells de variabilitat molt més semblants als de les planàries australians (Sunnucks i col. 2006) i als d'altres organismes, com poblacions de planàries d'aigua dolça (Lázaro i col. 2009) o algunes espècies de *Drosophila* (Baffi i Ceron, 2002). A més, les planàries terrestres Ibèriques presenten signes d'expansió poblacional relativament recent (malgrat que els resultats no sempre són significatius). Tots aquests fets són compatibles amb una major influència de les glaciacions en els patrons de diversitat observats en aquestes poblacions que a les del Brasil. En el cas d'Europa, es parla de tres focus de refugi, situats a les penínsules Ibèrica, Itàlica i dels Balcans (Hewitt, 1996; 2000; Rodríguez-Sánchez i col. 2011). Els microrefugis ibèrics poden haver estat reservoris de diversitat durant les glaciacions i explicar part de la variabilitat genètica que trobem actualment en els boscos.

La majoria dels treballs filogeogràfics que s'han fet amb espècies d'arbres de boscos humits de la Península Ibèrica presenten una distribució dels haplotips equivalent, amb dos llinatges (com a mínim) ben separats a l'est i l'oest de la Península (Fig. 17). La correspondència dels haplotips mitocondrials de les poblacions de *M. terrestris* amb els refugis de faig i roure (Magri, 2008; Petit i col. 2002) podria indicar la presència d'aquesta espècie en els fragments romanents de bosc durant les últimes glaciacions. Si això hagués estat així, les planàries haurien seguit les posteriors expansions del bosc després del desglaç.

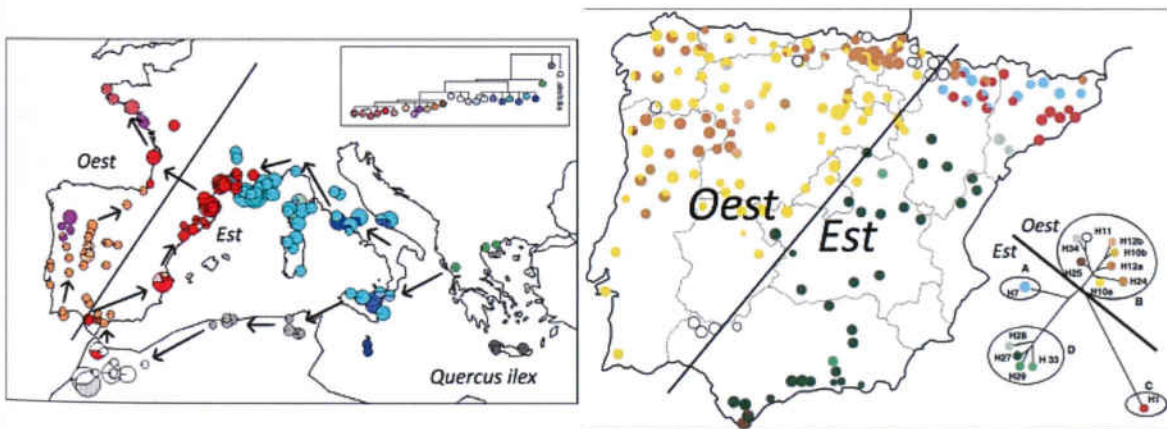


Figura 17. A l'esquerra, imatge modificada de Petit i col. 2005 (a Rodríguez-Sánchez i col. 2010) amb un esquema sobre la dispersió post-glacial de l'alzina (*Quercus ilex*). A la dreta, imatge modificada d'Oalde i col. 2002 on es mostra la distribució d'haplotips de roure de la Península Ibèrica.

Una de les poblacions que millor reflexa la presència de refugis al nord peninsular és la de Navarra, on s'observa una alta variabilitat, quedant separada de la resta de les poblacions de l'oest. La poca capacitat de mobilitat de les planàries confinades al refugi dels Pirineus explicaria que s'haguessin mantingut aïllades durant un període més llarg que la resta. Altres organismes també presenten poblacions diferenciades en els Pirineus, fet relacionat amb la història de les glaciacions (com per exemple la processonària dels pins;

Rousselet i col. 2010). Un exemple paral·lel al de *Microplana* és el dels cargols terrestres (Vialatte i col. 2008), amb requeriments ecològics similars als de les planàries terrestres. Per aquests animals es va inferir l'existència de refugis a Cantàbria, Picos d'Europa i els Pirineus. Durant els períodes interglacials les poblacions d'Astúries van patir una expansió ràpida cap al nord amb l'expansió dels boscos de roure. A l'hora, les poblacions dels Pirineus quedaven confinades als refugis glacials, com possiblement ha passat amb les planàries.

Igual que a Brasil, a Europa també hi ha evidències de moviments tectònics ocorreguts durant el Terciari. Les diferències entre est i oest que es troben tant en poblacions de planàries com en poblacions d'arbres, com l'alzina surera (*Quercus suber*; Magri i col. 2007), es poden atribuir a moviments antics de trencament tectònic (Oligocè o Miocè). A més, possiblement el procés de vicariança generat per aquests moviments és el que ha generat les semblances que es troben entre els roures de l'est ibèric i els genotips de França, Còrsega, Itàlia i Algèria (Petit i col. 2002), que pot haver afectat també les poblacions de planàries terrestres. Per aquest motiu és interessant, com es proposa al capítol 5, determinar el grau de variabilitat i semblança d'aquestes poblacions, així com de les del nord d'Europa i la Gran Bretanya, per tal de confirmar si els patrons de dispersió i vicariança de les poblacions de planàries segueixen en tots els casos els trobats en els boscos.

3.6. Implicacions per la conservació

Tots els nostres resultats, tant al Brasil com a la Península, denoten la clara necessitat de conservar els boscos on es troben els nostres individus model: les planàries terrestres. És difícil conservar una regió geogràfica si no es coneix la seva biodiversitat. Per això, cal fer més inventaris per prendre consciència de quines són les zones més diverses i alhora més amenaçades, i per tant, necessitant més plans de conservació. Un alt nivell de variació intraespecífica, com el que trobem a *C. bergi*, s'ha de tenir en consideració pels esforços de conservació (Matolweni i col. 2000; Hughes i col. 2005). Gràcies al coneixement dels requeriments ecològics i de l'alta dependència del seu hàbitat que presenten les planàries terrestres, hem pogut determinar àrees que històricament han estat cobertes de bosc. Per tant, aquestes àrees del sud del Bosc Atlàntic, a les que no s'havia donat gaire atenció, són també un gran reservori de biodiversitat (Fitzpatrick i col. 2009). Així doncs, seria necessari l'allargament del corredor de Serra do Mar cap a latituds més altes per recuperar la connexió entre àrees que actualment es troben aïllades.

Probablement el futur escalfament global intensificarà el moviment del Bosc Atlàntic cap a zones de més altitud o latitud (com ja va ocórrer en el passat) i reduirà l'àrea coberta per bosc a la Serra dos Órgãos (07-SO) i altres serralades del SE de Brasil (Behling i Safford,

2010). Els canvis que s'estan donant en l'actualitat a nivell global són molt més ràpids que els es van donar durant les eres glacials. Els organismes, en general, tenen una capacitat limitada d'adaptació al canvi; si el ésser humà redueix dràsticament els seus hàbitats, serà impossible que es mantingui en un futur proper la biodiversitat actual.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. La concatenació dels gens 18S rDNA, 28S rDNA i COI és resolutiva per inferir la filogènia interna dels triclàdides i de la subfamília Geoplaninae (on també ho és el gen EF-1 α). Malgrat això, cap dels gens utilitzats és resolutiu de forma individual.
2. Alguns dels nous marcadors provats per resoldre la filogènia dels triclàdides a nivell de família, subfamília i gènere no han pogut ésser utilitzats, ja sigui per problemes d'amplificació (Histona H3, ATPasa-alpha o 12S) o per un excés de variabilitat (16S).
3. Les dades moleculars han permès resoldre les relacions filogenètiques internes dins de geoplànids (planàries terrestres) i dugèsids. Les agrupacions obtingudes en alguns casos no es corresponen amb els tàxons definits en base a dades morfològiques. Aquests resultats, junt amb resultats moleculars previs, han donat lloc a una àmplia revisió taxonòmica de Tricladida.
4. Dins de la família Dugesiidae, els gèneres *Girardia* i *Neppia* són els més basals, i els gèneres *Schmidtea* i *Dugesia* són grups germans. D'altra banda, encara que les dades moleculars indiquen que la família Bipaliidae és la que apareix en posició més basal, aquesta posició no s'ha pogut confirmar amb seguretat. Aquesta manca de resolució pot ser deguda a la ràpida radiació que va patir aquest grup en el pas al medi terrestre.
5. La radiació de les planàries terrestres genera també un artefacte en l'arrelament dels arbres en les anàlisis filogenètiques de Geoplanoidea (Dugesiidae i Geoplanidae). Aquest fet podria explicar la manca de resolució en la determinació del caràcter monofilètic de les planàries terrestres i de Dugesiidae.
6. En la filogenia de Geoplaninae, es recuperen diversos grups amb un alt suport, alguns d'ells a més refermats per trets morfològics, com l'agrupació dels clades PEX o LIS, entre d'altres. A més, l'estat monofilètic d'alguns taxons, descrits en base a trets morfològics, es confirma amb les dades moleculars. Malgrat això, les relacions a nivell basal no han quedat prou resoltes.

7. La filogènia molecular de Geoplaninae també ha desvetllat que cal una revisió taxonòmica del grup, on hi ha gèneres i espècies per descriure *de novo* i d'altres, com *Geoplana*, que necessiten una redescrípció.
8. Les planàries terrestres, invertebrats amb baixa capacitat de dispersió, depredadors especialistes i amb alta dependència dels boscos, constitueixen un bon model per a estudis filogeogràfics a petita escala geogràfica.
9. Les poblacions de planàries brasileres presenten alts nivells de diversitat nucleotídica amb un origen molt antic, que es remunta possiblement al Miocè. A més, presenten patrons d'estructuració significatius dins i entre poblacions, i l'empremta molecular de l'aïllament per distància.
10. Els patrons de diversitat observats a *Cephaloflexa bergi* no es poden explicar com a conseqüència d'un únic escenari evolutiu global, sinó que han estat formats per la interacció de complexos processos geològics i evolutius.
11. L'anàlisi filogeogràfica al sud del Bosc Atlàntic (SAF) indica que han existit regions cobertes de bosc durant un període llarg de temps, com a mínim en forma de refugis, que els models paleoclimàtics han estat incapaços de predir.
12. Les poblacions de *Microplana terrestris* de la Península Ibèrica presenten un nivell de variabilitat nucleotídica menor que les poblacions brasileres, amb un patró de variabilitat i evolució probablement lligat a les glaciacions del Plistocè.
13. Les planàries ibèriques es troben estructurades en dos clades diferenciats a est i oest, que podrien tenir el seu origen en els desplaçaments dels boscos durant els cicles glacials.

BIBLIOGRAFIA

A

ADOUTTE A. and PHILIPPE, H., 1993. The major lines of metazoan evolution: summary of traditional evidence and lessons from ribosomal RNA sequence analysis. *EXS*, **63**, pp. 1–30.

AGUINALDO, A.M.A., TURBEVILLE, J.M., LINFORD, L.S., RIVERA, M.C., GAREY, J.R., RAFF, R.A. and LAKE, J.A., 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature*, **387**(6632), pp. 489–493.

ÁLVAREZ-PRESAS, M., BAGUÑÀ, J. and RIUTORT, M., 2008. Molecular phylogeny of land and freshwater planarians (Tricladida, Platyhelminthes): From freshwater to land and back. *Molecular phylogenetics and evolution*, **47**(2), pp. 555–568.

ARBOGAST, B.S. and KENAGY, G.J., 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography*, **28**(7), pp. 819–825.

AVISE, J.C., 1998. The history and purview of phylogeography: A personal reflection. *Molecular Ecology*, **7**(4), pp. 371–379.

AVISE, J.C., ed, 2000. *Phylogeography, the history and formation of species*. Harvard University Press.

B

BAFFI, M.A. and CERON, C.R., 2002. Molecular analysis of the rDNA ITS-1 intergenic spacer in *Drosophila mulleri*, *D. arizonae*, and their hybrids. *Biochemical genetics*, **40**(11–12), pp. 411–421.

BAGUÑÀ, J., CARRANZA, S., PALA, M., RIBERA, C., GIRIBET, G., ARNEDO, M.A., RIBAS, M. and RIUTORT, M., 1999. From morphology and karyology to molecules. New methods for taxonomical identification of asexual populations of freshwater planarians. A tribute to Professor Mario Benazzi. *Italian Journal of Zoology*, **66**(3), pp. 207–214.

BAGUÑÀ, J., CARRANZA, S., PAPS, J., RUIZ-TRILLO, I. and RIUTORT, M., 2001. Molecular taxonomy and phylogeny of the Tricladida. In: LITTLEWOOD, D. T. J. & BRAY, R. A., ed, *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Systematics Association Special edn. pp. 49–56.

BAGUÑÀ, J. and RIUTORT, A.M., 2004. Molecular phylogeny of the Platyhelminthes. *Can. J. Zool.*, **82**, pp. 168–193.

BALL, I., 1977. Turbellaria. *La faune terrestre de L'île de Sainte-Hélène. Quatrième Partie*. Ann. Ser. 8 edn.

Tervuren, Belgique: Mus. Roy. Afriq. Cent., pp. 492–511.

BALL, I. R. and REYNOLDSON, T. B., 1981. *British planarians*. Cambridge University Press. Synopses of the British fauna (new series) **19**, 141 pp.

BALL, I.R., 1981. The phyletic status of the Paludicola. *Hydrobiologia*, **84**, pp. 7–12.

BAUERMAN, S.G., 2003. Análises palinológicas e evolução paleovegetacional e paleoambiental das turfeiras de Barrocas e Águas Claras, Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. Tese de Doutorado, Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BEAUMONT, M.A., ZHANG, W. and BALDING, D.J., 2002. Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics*, **162**(4), pp. 2025–2035.

BEAUMONT, M.A. and RANNALA, B., 2004. The bayesian revolution in genetics. *Nature Reviews Genetics*, **5**(4), pp. 251–261.

BEHLING, H., 1995. Investigations into the late Pleistocene and Holocene history of vegetation and climate in Santa Catarina (S Brazil). *Vegetation History and Archaeobotany*, **4**(3), pp. 127–152.

BEHLING, H. and LICHT, M., 1997. Evidence of Dry and Cold Climatic Conditions at Glacial Times in Tropical Southeastern Brazil. *Quaternary Research*, **48**(3), pp. 348–358.

BEHLING, H. and NEGRELLE, R.R.B., 2001. Tropical rain forest and climate dynamics of the Atlantic lowland, southern Brazil, during the late Quaternary. *Quaternary Research*, **56**(3), pp. 383–389.

BEHLING, H., 2002. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: A synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **177**(1–2), pp. 19–27.

BEHLING, H. and SAFFORD, H.D., 2010. Late-glacial and Holocene vegetation, climate and fire dynamics in the Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro State, southeastern Brazil. *Global Change Biology*, **16**(6), pp. 1661–1671.

BERGSTEN, J., 2005. A review of long-branch attraction. *Cladistics*, **21**(2), pp. 163–193.

BESSHO, Y., TAMURA, S., HORI, H., TANAKA, H., OHAMA, T. and OSAWA, S., 1997. Planarian mitochondria sequence heterogeneity: relationships

- between the type of cytochrome c oxidase subunit I gene sequence, karyotype and genital organ. *Molecular Ecology*, **6**, pp. 129-136.
- BOAG, B., JONES, H.D., EVANS, K.A., NEILSON, R., YEATES, G.W. and JOHNS, P.M., 1998. The application of GIS techniques to estimate the establishment and potential spread of *Artioposthia triangulata* in Scotland. *Pedobiologia*, **42**, pp. 504-510.
- BOAG, B. and YATES, G.W., 2001. The potential impact of the New Zealand flatworm, a predator of earthworms, in Western Europe. *Ecological Applications*, **11**(5), pp. 1276-1286; 1276.
- BOIX, D. and SALA, J., 2001. Presència del gènere *Rhynchodemus* (Platyhelminthes; Tricladida; Terricola) a la Península Ibèrica. *SCIENTIA gerundensis*, **25**, pp. 31-32.
- BOULESTEIX, A. and STRIMMER, K., 2007. Partial least squares: A versatile tool for the analysis of high-dimensional genomic data. *Briefings in Bioinformatics*, **8**(1), pp. 32-44.
- BREMER, K., 1994. Branch Support and Tree Stability. *Cladistics*, **10**(3), pp. 295-304.
- BROWN, K.S., 2005. Geological, evolutionary, and ecological bases of the diversification of Neotropical butterflies: implications for conservation. In: BERMINHGAM, E., DICK, C.W., MORITZ, C., ed, *Tropical Rainforest: Past, Present and Future*. Chicago: University of Chicago Press, pp. 166-201.
- BUSH, M.B. and DE OLIVEIRA, P.E., 2006. The rise and fall of the Refugial Hypothesis of Amazonian speciation: a paleoecological perspective. *Biota Neotrop.*, **6**, pp. 1-17.
- BYBEE, S.M., BRACKEN-GRISSOM, H., HAYNES, B.D., HERMANSEN, R.A., BYERS, R.L., CLEMENT, M.J., UDALL, J.A., WILCOX, E.R. and CRANDALL, K.A., 2011. Targeted Amplicon Sequencing (TAS): A Scalable Next-Gen Approach to Multilocus, Multitaxa Phylogenetics. *Genome Biology and Evolution*, **3**, pp. 1312-1323.
- C**
CABANNE, G.S., SANTOS, F. R. and MIYAKI, C. Y., 2007. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, **91**, pp. 73-84.
- CABANNE, G.S., D'HORTA, F.M., SARI, E.H.R., SANTOS, F.R. and MIYAKI, C.Y., 2008. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Molecular phylogenetics and evolution*, **49**(3), pp. 760-773.
- CARBAYO, F., LEAL-ZANCHET, A.M. and VIEIRA, E.M., 2001. Land planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola) as indicators of man-induced disturbance in a South Brazilian rainforest. *Belg. J. Zool.*, **131**(1), pp. 223-224.
- CARBAYO, F., LEAL-ZANCHET, A.M. and VIEIRA, E.M., 2002. Terrestrial flatworm (Platyhelminthes: Tricladida: Terricola) diversity versus man-induced disturbance in an ombrophilous forest in southern Brazil. *Biodiversity and Conservation*, **11**(6), pp. 1091-1104.
- CARBAYO F., 2003. Revisión de *Notogynaphallia* (Ogren & Kawakatsu, 1990) Platyhelminthes: Tricladida. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca, Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química agrícola.
- CARBAYO F. and LEAL-ZANCHET, A.M., 2003. Two new genera of geoplaninid land planarians (Platyhelminthes : Tricladida : Terricola) of Brazil in the light of cephalic specialisations. *Invertebrate Systematics*, **17**, pp. 449-468-449.
- CARBAYO, F., 2005. Procedimentos de campo e laboratório para a caracterização das planárias terrestres neotropais. *Caderno La Salle XI*, **2**(1), pp. 131-144.
- CARBAYO, F. and FROELICH, E.M., 2008. Estado do conhecimento dos macroturbelários (Platyhelminthes) do Brasil. *Biota Neotrop*, **8**(4), pp. 197; 177.
- CARBAYO, F., 2010. A new genus for seven Brazilian land planarian species, split off from *Notogynaphallia* (Platyhelminthes, Tricladida). *Belgian Journal of Zoology*, **140**(Suppl.), pp. 91-101.
- CARNAVAL, A.C. and MORITZ, C., 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, **35**(7), pp. 1187-1201.
- CARNAVAL, A.C., HICKERSON, M.J., HADDAD, C.F.B., RODRIGUES, M.T. and MORITZ, C., 2009. Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science*, **323**(5915), pp. 785-789.
- CARRANZA, S., GIRIBET, G., RIBERA, C., BAGUÑA,

- J. and RIUTORT, M., 1996. Evidence that Two Types of 18s rDNA Coexist in the Genome of *Dugesia* (Schmidtea) mediterranea (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida). *Mol. Biol. Evol.*, **13**(6), pp. 824-832.
- CARRANZA S., RUIZ-TRILLO I., LITTLEWOOD D.T.J., RIUTORT, M., and BAGUÑA, J., 1998a. A reappraisal of the phylogenetic and taxonomic position of land planarians (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida) inferred from 18S rDNA sequences. *Pedobiologia*, **42**, pp. 433-440.
- CARRANZA, S. LITTLEWOOD, D. T. J., CLOUGH, K. A., RUIZ-TRILLO, I., BAGUÑA, J. and RIUTORT, M., 1998b. A robust molecular phylogeny of the Tricladida (Platyhelminthes: Seriata) with a discussion on morphological synapomorphies. *Proceedings: Biological Sciences*, **265**(1396), pp. 631-640.
- CASU, M., SANNA, D., COSSU, P., LAI, T., FRANCALACCI, P. and CURINI-GALLETI, M., 2011. Molecular phylogeography of the microturbellarian *Monocelis lineata* (Platyhelminthes: Proseriata) in the North-East Atlantic. *Biological Journal of the Linnean Society*, **103**(1), pp. 117-135.
- CHIRGWIN, J. M., PRZYBYLA, A. E., MACDONALD, R. J., RUTTER, W. J., 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**(24), pp. 5294-9.
- CHRISTEN, R., RATTO, A., BAROIN, A., PERASSO, R. and GRELL, K. G. and ADOUTTE, A., 1991. An analysis of the origin of metazoans, using comparisons of partial sequences of the 28S rRNA, reveals an early emergence of triploblasts. *The EMBO Journal*, **10**(3), pp. 499-503.
- COLINVAUX, P. A., DE OLIVEIRA, P. E. and BUSH, M. B., 2000. Amazonian and neotropical plant communities on glacial time-scales: The failure of the aridity and refuge hypotheses. *Quaternary Science Reviews*, **19**(1-5), pp. 141-169.
- COLINVAUX, P. A. and DE OLIVEIRA, P. E., 2001. Amazon plant diversity and climate through the Cenozoic. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **166**(1), pp. 51-63.
- COSTA, L. P., LEITE, Y. L. R., DA FONSECA, G. A. B. and DA FONSECA, M. T., 2000. Biogeography of South American forest mammals: Endemism and diversity in the Atlantic Forest. *Biotropica*, **32**(4 B), pp. 872-881.
- COSTA, L. P., 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: A study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*, **30**(1), pp. 71-86.
- CUMMINGS, M. P., HANDLEY, S. A., MYERS, D. S., REED, D. L., ROKAS, A. and WINKA, K., 2003. Comparing Bootstrap and Posterior Probability Values in the Four-Taxon Case. *Systematic Biology*, **52**(4), pp. 477-487.
- D**
- DA SILVA, J. M. C., DE SOUSA, M. C. and CASTELLETTI, C. H. M., 2004. Areas of endemism for passerine birds in the Atlantic forest, South America. *Global Ecology and Biogeography*, **13**(1), pp. 85-92.
- DARWIN, C., 1859. *On the Origin of Species*, ed. John Murray 71 (6) p. 473
- DAVIS, M. B. and SHAW, R. G., 2001. Range shifts and adaptive responses to quaternary climate change. *Science*, **292**(5517), pp. 673-679.
- DENDY, A., 1889. Zoological notes on a trip to Walhalla. *Victorian Naturalist*. Melbourne: pp. 128.
- DENDY, A., 1890. The Victorian Land Planarians. *Trans. R. S. of Victoria*, **7**, pp. 65-80.
- DINDAL, D. L., 1970. Feeding behavior of a terrestrial turbellarian *Bipalium adventitium*. *Am. Midland Nat.*, **83**, pp. 635-637.
- DUCEY, P. K., MESSERE, M., LAPOINT, K. and NOCE, S., 1999. Lumbricid prey and potential herpetofaunal predators of the invading terrestrial flatworm *Bipalium adventitium* (Turbellaria: Tricladida: Terricola). *American Midland Naturalist*, **141**(2), pp. 305-314.
- DUNN, C. W., HEJNOL, A., MATUS, D. Q., PANG, K., BROWNE, W. E., SMITH, S. A., SEAVER, E., ROUSE, G. W., OBST, M., EDGEcombe, G. D., SØRENSEN, M. V., HADDOCK, S. H. D., SCHMIDT-RHAESA, A., OKUSU, A., KRISTENSEN, R. M., WHEELER, W. C., MARTINDALE, M. Q. and GIRIBET, G., 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature*, **452**(7188), pp. 745-749.
- D'HORTA, F. M., CABANNE, G. S., MEYER, D. and MIYAKI, C. Y., 2011. The genetic effects of Late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic Forest passerine. *Molecular ecology*, **20**(9), pp. 1923-1935.
- E**
- EELEY, H. A. C., LAWES, M. J. and REYERS, B., 2001.

Priority areas for the conservation of subtropical indigenous forest in southern Africa: A case study from KwaZulu-Natal. *Biodiversity and Conservation*, **10**(8), pp. 1221-1246.

F

FALLEN, A., LUCCHESI, P., GHEZZANI, C., SILVEIRA, M. and VITTORIO, G., 2006. Ultrastructural and cytochemical aspects of the female gonad of *Geoplana burmeisteri* (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola). *Journal of Morphology*, **267**(3), pp. 318-332.

FALLEN, A., LUCCHESI, P., GHEZZANI, C., MCDONALD, J.C. and JONES, H.D., 2009. The female gonad in two species of *Microplana* (Platyhelminthes, Tricladida, Rhynchodemidae): Ultrastructural and cytochemical investigations. *Journal of Morphology*, **270**(9), pp. 1042-1054.

FARRIS, J.S., ALBERT, V.A., KÄLLERSJÖ, M., LIPSCOMB, D. and KLUGE, A.G., 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics*, **12**(2), pp. 99-124.

FELSENSTEIN, J., 1978. Cases in which Parsimony or Compatibility Methods Will be Positively Misleading. *Syst Zool*, **27**, pp. 401-410.

FELSENSTEIN, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J.Mol. Evol*, **17**, pp. 368-376.

FELSENSTEIN, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, pp. 783-791.

FELSENSTEIN, J. and KISHINO, H., 1993. Is there something wrong with the bootstrap on phylogenies? A reply to Hillis and Bull. *Systematic Biology*, **42**, pp. 193-200.

FILELLA-SUBIRÀ, E., 1983. Nota sobre la presència de la planària terrestre *Bipalium kewense* Moseley, 1878 a Catalunya. *Butlletí de la Institució Catalana de Història Natural*, **49**, pp. 151.

FITCH, W.M., 1970. Distinguishing homologous from analogous proteins. *Systematic zoology*, **19**(2), pp. 99-113.

FITZPATRICK, S.W., BRASILEIRO, C.A., HADDAD, C.F.B. and ZAMUDIO, K.R., 2009. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Molecular Ecology*, **18**(13), pp. 2877-2896.

FONSECA, C.R., GANADE, G., BALDISSERA, R., BECKER, C.G., BRESCOVIT, A., CAMPOS, L.M., FLECK, T., FONSECA, V.S., HARTZ, S., KLIFER, M., LEAL-ZANCHET, A.M., MARCELI, M., MONDIN, C.A., PETRY, M.V., SANTANNA, M.P., VERGARA, M. and MESQUITA, A.S. and VIEIRA, E.M., 2006. Araucaria forest indicators: contrasting indicator value distributions across nine taxonomic groups. In: R. LAFORTEZZA ALLD G. SALLE, ed, *Patterns and processes in forest landscapes. Consequences of human management*. Accademia Italiana di Scienze Forestali, pp. 125-125-130.

FOX, G.E., STACKEBRANDT, E., HESPELL, R.B., GIBSON, J., MANIOFF, J., DYER, T.A., WOLFE, R.S., BALCH, W.E., TANNER, R.S., MAGRUM, J., ZABLEN, L.B., BLAKEMORE, R., GUPTA, R., BONEN, L., LEWIS, B.J., STAHL, D.A., LUEHRSEN, K.R. and CHEN, K.N. AND WOESE, C.R., 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science*, **209**(4455), pp. 457-463.

FROELICH, E.M., 1955. Sobre espécies brasileiras do gênero *Geoplana*. *Bol. Fac. Fil. Ci. Letras, Univ. São Paulo, Zool.*, **19**, pp. 289-369.

FROELICH, C.G., 1955a. On the biology of land planarians. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo*, **20**, pp. 263-271.

FROELICH, C.G., 1955b. Sobre a morfologia e taxonomia das *Geoplanidae*. *Bol. Fac. Fil. Ci. Letras, Univ. São Paulo, Zool.*, **19**, pp. 195-279.

FROELICH, C.G., 1956. Tricladida Terricola das regiões de Teresópolis e Ubatuba. *Pap. Avul. Dep. Zool.*, **12**(16), pp. 344; 313.

FROELICH, C.G., 1967. A contribution to the zoogeography of Neotropical land planarians. *Acta Zool. Lilloana*, **23**, pp. 153-162.

FU, Y.X., 1997. Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics*, **147**(2), pp. 915-925.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA AND INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS, 2011. *Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2008-2010*. São Paulo.

G

GARRICK, R.C., SANDS, C.J., ROWELL, D.M., TAIT, N.N., GREENSLADE, P. and SUNNUCKS, P., 2004. Phylogeography recapitulates topography: Very fine-scale local endemism of a saproxylic 'giant' springtail at Tallaganda in the Great Dividing Range of south-

east Australia. *Molecular ecology*, **13**(11), pp. 3329-3344.

GARRICK, R.C., SANDS, C.J., ROWELL, D.M., HILLIS, D.M. and SUNNUCKS, P., 2007. Catchments catch all: Long-term population history of a giant springtail from the southeast Australian highlands - A multigene approach. *Molecular ecology*, **16**(9), pp. 1865-1882.

GIBSON, P.H., COSENS, D. and BUCHANAN, K., 1997. A chance field observation and pilot laboratory studies of predation of the New Zealand flatworm by the larvae and adults of carabid and staphylinid beetles. *Annals of Applied Biology*, **130**(3), pp. 581-585.

GRAFF, L.V., 1896. Ueber das System und die geographische Verbreitung der landplanarien. *Verhandl.deutsch.Zool.Ges*, **6**, pp. 75-93.

GRAFF, L.V., 1899. Monographie der Turbellarien II. Tricladida terricola (landplanarien). *Engelmann, Leipzig*.

GRAFF, L.V., 1912-1917. Tricladida. *Brown, H.G. (ed.), Klassen und Ordnungen des Tierreichs. Bd. IV. Abt. 1c. III. Leipzig*.

GRAHAM, C.H., MORITZ, C. and WILLIAMS, S.E., 2006. Habitat history improves prediction of biodiversity in rainforest fauna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(3), pp. 632-636.

GRAU, J.H., 2010. *Relações filogenéticas entre os gêneros de Geoplaninae (Platyhelminthes, Tricladida) inferidas de caracteres morfológicos*. Dissertação de Mestrado. São Paulo: Universidade de São Paulo (USP).

GRAZZIOTIN, F.G., MONZEL, M., ECHEVERRIGARAY, S. and BONATTO, S.L., 2006. Phylogeography of the Bothrops jararaca complex (Serpentes: Viperidae): Past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, **15**(13), pp. 3969-3982.

GUADET, J., JULIEN, J., LAFAY, J.F. and BRYGOO, Y., 1989. Phylogeny of some Fusarium species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Molecular biology and evolution*, **6**(3), pp. 227-242.

H

HAFFER, J., 1969. Speciation in amazonian forest birds. *Science*, **165**(3889), pp. 131-137.

HAJIBABAEI, M., SINGER, G.A.C., HEBERT, P.D.N.

and HICKEY, D.A., 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, **23**(4), pp. 167-172.

HALANYCH, K.M., BACHELLER, J.D., AGUINALDO, A.M., LIVA, S.M., HILLIS, D.M. and LAKE, J.A., 1995. Evidence from 18S ribosomal DNA that the lophophorates are protostome animals. *Science*, **267**(5204), pp. 1641-1643.

HALANYCH, K.M., DAHLGREN, T.G. and MCHUGH, D., 2002. Unsegmented annelids? Possible origins of four lophotrochozoan worm taxa. *Integrative and Comparative Biology*, **42**(3), pp. 678-684.

HALLEZ, P., 1890. Catalogue des Turbellaries (Rhabdocoelides, Tricladides et Polycladides) du Nord de la France et de la Côte Boulonnaire. *Rev.Biol. Nord France*, **2**, pp. 1-179.

HARRIS, G.M., JENKINS, C.N. and PIMM, S.L., 2005. Refining Biodiversity Conservation Priorities. *Conservation Biology*, **19**(6), pp. 1957-1968.

HAUSER, J. and MARUMANN, E., 1959. Studien ueber die Bewegungen des Genus Geoplanea. Studies on the movements of the genus Geoplanea (Turbellaria terricola). *Pesquisas (Posrto Alegre)*, **3**, pp. 631-646.

HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A. and BALL, SHELLEY L. AND DEWAARD, JEREMY R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **270**, pp. 313-321.

HEWITT, G.M., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**(3), pp. 247-276.

HEWITT, G.M., 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**(1-2), pp. 87-112.

HICKMAN V.V., 1964. On Planarivora insignis gen. et sp. n. (Diptera: Mycetophilidae), whose larval stages are parasitic in land planarians. *Papers and Proceedings of the Royal Society of Tasmania*, **99**, pp. 1-8.

HILLIS, D.M. and DIXON, M.T., 1989. Vertebrate phylogeny: evidence from 28S ribosomal DNA sequences. *FERNHOLM, B., BREMER, K. AND JORNVAL, H. eds. The hierarchy of life. Elsevier Science Publishers Biomedical Division. Amsterdam*, pp. 335-367.

HILLIS, D.M. and DIXON, M.T., 1991. Ribosomal DNA:

Molecular evolution and phylogenetic inference. *Q.Rev.Biol*, **66**, pp. 411-453.

HILLIS, D.M., 1996. Inferring complex phylogenies. *Nature*, **383**, pp. 130-131.

HOLSTON, K.C., IRWIN, M.E. and WIEGMANN, B.M., 2007. Monophyly and phylogenetic relationships of Thereva and therevine genus-groups (Insecta:Diptera:Therevidae) based on EF-1 α , 28S rDNA and mitochondrial 16S rDNA sequences. *Invertebrate Systematics*, **21**(3), pp. 279-296.

HOORN, C., WESSELINGH, F.P., TER STEEGE, H., BERMUDEZ, M.A., MORA, A., SEVINK, J., SANMARTÍN, I., SANCHEZ-MESEGUER, A., ANDERSON, C.L., FIGUEIREDO, J.P., JARAMILLO, C., RIFF, D., NEGRI, F.R., HOOGHMIESTRA, H., LUNDBERG, J., STADLER, T., SÄRKINEN, T. and ANTONELLI, A., 2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science*, **330**(6006), pp. 927-931.

HUDSON, R.R., 1983. Properties of a neutral allele model with intragenic recombination. *Theoretical population biology*, **23**(2), pp. 183-201.

HUDSON, R.R., KREITMAN, M. and AGUADÉ, M., 1987. A Test of Neutral Molecular Evolution Based on Nucleotide Data. *Genetics*, **116**(1), pp. 153-159.

HUELSENBECK, J.P. and RONQUIST, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **17**(8), pp. 754-755.

HUELSENBECK, J.P., 2002. Testing a covariotide model of DNA substitution. *Molecular biology and evolution*, **19**(5), pp. 698-707.

HUGALL, A., MORITZ, C., MOUSSALLI, A. and STANISIC, J., 2002. Reconciling paleodistribution models and comparative phylogeography in the Wet Tropics rainforest land snail *Gnarosophia bellendenkerensis* (Brazier 1875). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**(9), pp. 6112-6117.

HUGHES, M., MÖLLER, M., BELLSTEDT, D.U., EDWARDS, T.J. and DE VILLIERS, M., 2005. Refugia, dispersal and divergence in a forest archipelago: A study of *Streptocarpus* in eastern South Africa. *Molecular ecology*, **14**(14), pp. 4415-4426.

HYMAN, L.H., 1951. The invertebrates. II. Platyhelminthes and Rhynchocoela. *McGraw-Hill*, New York.

J

JOBES, D.V., HURLEY, D.L. and THIEN, L.B., 1995. Plant DNA Isolation: A Method to Efficiently Remove Polyphenolics, Polysaccharides, and RNA. *Taxon*, **44**(3), pp. 379-386.

JOHNS, P.M., 1998. The New Zealand terrestrial flatworms: A 1997-98 perspective. *Pedobiologia*, **42**(5-6), pp. 464-468.

JONES, H.D., 1978. Observations on the locomotion of two British terrestrial planarians (Platyhelminthes, Tricladida). *Journal of zoology*, **186**(3), pp. 407-416.

JONES, H.D., GREEN, J., PALIN, D.W., 1998. Monthly abundance, size and maturity in a population of the "Australian flatworm", *Australoplana sanguinea alba*. *Pedobiologia*, **42**, pp. 457-463.

JONES, H.D., 2005. Identification: British land flatworms. *British Wildlife*, **16**(3), pp. 189-194.

JONES, H.D.J., WEBSTER, B. L., LITTLEWOOD, D., T. J. and MCDONALD, J. C., 2008. Molecular and morphological evidence for two new species of terrestrial planarians of the genus *Microplana* (Platyhelminthes; Turbellaria; Tricladida; Terricola) from Europe. *Zootaxa*, **1945**, pp. 1-38.

JUKES, T.H. and CANTOR, C.R., 1969. Evolution of protein molecules. *Mammalian Protein Metabolism Academic Press, New York*, pp. 21-132.

K

KAWAGUTI, S., 1932. On the physiology of land planarians. *Mem. Fac. Sci. & Agr., Taihoku Imp. Univ., Formosa, Japan*, **7**, pp. 15-55.

KAWAKATSU, M., OGREN, R.E. and MUNIAPPAN, R., 1992. Resdescription of *Platydemus manokwari* de Beauchamp, 1962 Turbellaria: Tricladida: Terricola) from Guam and the Philippines. *Proc.Jap.Soc.Syst. Zool*, **47**, pp. 11-25.

KAWAKATSU, M., FROELICH, E.M., JONES, H.D., OGREN, R.E. and SASAKI, G-Y., 2003. Additions and corrections of the previous land planarian indices of the world – 11. *Bull. Fuji Women's University*, **41**(Ser. II), pp. 89-114.

KELLY, J.K., 1997. A test of neutrality based on interlocus associations. *Genetics*, **146**(3), pp. 1197-1206.

KIMURA, M., 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, **217**, pp. 624-626.

- KIMURA, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J.Mol. Evol.*, **16**, pp. 11-120.
- KIYUNA, T., AN, K.-., KIGAWA, R., SANO, C., MIURA, S. and SUGIYAMA, J., 2008. Mycobiota of the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan, focusing on the molecular phylogenetic diversity of *Fusarium* and *Trichoderma*. *Mycoscience*, **49**(5), pp. 298-311.
- KUTTY, S.N., PAPE, T., PONT, A., WIEGMANN, B.M. and MEIER, R., 2008. The Muscoidea (Diptera: Calyptratae) are paraphyletic: Evidence from four mitochondrial and four nuclear genes. *Molecular phylogenetics and evolution*, **49**(2), pp. 639-652.
- L**
- LÁZARO, E.M., SLUYS, R., PALA, M., STOCCHINO, G.A., BAGUÑA, J. and RIUTORT, M., 2009. Molecular barcoding and phylogeography of sexual and asexual freshwater planarians of the genus *Dugesia* in the Western Mediterranean (Platyhelminthes, Tricladida, Dugesidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **52**(3), pp. 835-845.
- LEAL-ZANCHET, A. M. and CARBAYO, F., 2001. Two new species of Geoplanidae (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola) from Brazil. *J. Zool.*, **253**, pp. 433-446.
- LEAL-ZANCHET, A.M. and de SOUZA, S.A., 2003. Redescription of *Choeradoplana iheringi* Graff (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola). *Revista Brasileira de Zoologia*, vol.20(3,), pp. 523-530.
- LEAL-ZANCHET, A.M., CAMPOS, L.M., BAPTISTA, V.A., GANADE, G. and FONSECA, C., 2006. Land flatworm community structure and composition in a mosaic landscape of Araucaria Forest and tree monocultures and the usefulness of land planarians in diversity and conservation studies. *10th International Symposium on Flatworm Biology 2006*, Berichte des naturwissenschaftlich-medizinischen Vereins, **16** (Supp) pp. 61.
- LEAL-ZANCHET, A.M. and FROELICH, E.M., 2006. A species complex in the genus *Notogynaphallia* Ogren and Kawakatsu (Platyhelminthes: Tricladida: Terricola) with a taxonomic revision of homonyms of *Geoplana marginata* Schultze & Müller and a reinterpretation of *Notogynaphallia caissara* (Froehlich) anatomy. *Belgian Journal of Zoology*, **136**(1), pp. 81-100.
- LEDRU, M.P., ROUSSEAU, D.D., CRUZ JR, F.W., RICCOMINI, C., KARMANN, I. and MARTIN, L., 2005. Paleoclimate changes during the last 100,000 yr from a record in the Brazilian Atlantic rainforest region and interhemispheric comparison. *Quaternary Research*, **64**(3), pp. 444-450.
- LEDRU, M., MOURGUIART, P. and RICCOMINI, C., 2009. Related changes in biodiversity, insolation and climate in the Atlantic rainforest since the last interglacial. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **271**(1-2), pp. 140-152.
- LI, W.-H. AND GRAUR, D., 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- LI, W. and TANIMURA, M., 1987. The molecular clock runs more slowly in man than in apes and monkeys. *Nature*, **326**(6108), pp. 93-96.
- LOSOS, J.B. AND GLOR, R.E., 2003. Phylogenetic comparative methods and the geography of speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, **18**(5), pp. 220-227.
- M**
- MAGRI, D., FINESCHI, S., BELLAROSA, R., BUONAMICI, A., SEBASTIANI, F., SCHIRONE, B. and SIMEONE, M. C. AND VENDRAMIN, G. G., 2007. The distribution of *Quercus suber* chloroplast haplotypes matches the palaeogeographical history of the western Mediterranean. *Molecular Ecology*, **16**, pp. 5259-5266.
- MAGRI, D., 2008. Patterns of post-glacial spread and the extent of glacial refugia of European beech (*Fagus sylvatica*). *Journal of Biogeography*, **35**(3), pp. 450-463.
- MARCUS, E., 1951. Turbellaria Brasileiros (9). *Bol Fac Fil Ci Letr U Sao Paulo Zool*, **16**, pp. 1-217.
- MARCUS, E., 1953. Turbellaria Tricladida. *Inst.Parc. Natn Congo Belge, Explor. Parc Natn Upemba, Miss, G.F. de Witte, Brussels*, **21**, pp. 1-62.
- MARJORAM, P., MOLITOR, J., PLAGNOL, V. and TAVARÉ, S., 2003. Markov chain Monte Carlo without likelihoods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(26), pp. 15324-15328.
- MARROIG, G. and CERQUEIRA, R., 1997. Plio-Pleistocene South American history and the Amazon Lagoon hypothesis: a piece in the puzzle of Amazonian diversification. *J. Comp. Biol.*, **2**, pp. 103-119-103.
- MARSKE, K.A., LESCHEN, R.A.B. and BUCKLEY, T.R., 2011. Reconciling phylogeography and ecological niche models for New Zealand beetles: Looking beyond glacial refugia. *Molecular phylogenetics and*

evolution, **59**(1), pp. 89-102.

MATEOS, E., GIRIBET, G. and CARRANZA, S., 1998. Terrestrial planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola) from the Iberian peninsula: first records of the family Rhynchodemidae, with the description of a new *Microplana* species. *Contributions to Zoology*, **67**(4), pp. 267-276.

MATEOS, E., VILA, M. and ROMERO, R., 2004. Presència de planàries terrestres del gènere *Microplana* (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola) al Parc del Montnegre i el Corredor. *IV Trobada d'Estudiosos del Montnegre i el Corredor*, pp. 101-104.

MATEOS, E. and GIRIBET, G., 2008. Exploring the molecular diversity of terrestrial nemertean (Hoploneurtea, Monostilifera, Acteonemertidae) in a continental landmass. *Zoologica Scripta*, **37**(3), pp. 235-243.

MATEOS, E., CABRERA, C., CARRANZA, S. and RIUTORT, M., 2009. Molecular analysis of the diversity of terrestrial planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Continenticola) in the Iberian Peninsula. *Zoologica Scripta*, **38**(6), pp. 637-649.

MATOLWENI, L.O., BALKWILL, K. and MCLELLAN, T., 2000. Genetic diversity and gene flow in the morphologically variable, rare endemics *Begonia dregei* and *Begonia homonyma* (Begoniaceae). *American Journal of Botany*, **87**(3), pp. 431-439.

MEIXNER, J., 1928. Der Genitalapparat der Tricladen und seine Beziehungen zu ihrer allgemeinen Morphologie, Phylogenie, Oekologie und Verbreitung. *Z. f. Morpho. u. Okol. d. Tiere*, **11**(5), pp. 570-612.

MINELLI, A., 1977. A taxonomic review of the terrestrial planarians of Europe. *Boll. Zool.*, **44**, pp. 399-419.

MINELLI, A., 1981. Of locomotion in terrestrial planarians. *Bolletino di zoologia*, **48**(1), pp. 41-50.

MORGAN, T., 1899. Regeneration in *Bipalium*. *Development Genes and Evolution*, **9**(4), pp. 563-586.

MORITZ, C., PATTON, J.L., SCHNEIDER, C.J. and SMITH, T.B., 2000. DIVERSIFICATION OF RAINFOREST FAUNAS: An Integrated Molecular Approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **31**(1), pp. 533-563.

MUNIAPPAN, R., 1987. Biological control of the giant African snail, *Achatina fulica* Bowdich, in the

Maldives. *FAO Plant Protection Bulletin*, **35**(4), pp. 127-133.

MYERS, N., MITTERMELER, R.A., MITTERMELER, C.G., DA FONSECA, G.A.B. and KENT, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**(6772), pp. 853-858.

N

NIMER, E., 1989. Climatologia do Brasil. *Série Recursos Naturais e Meio Ambiente*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, pp. 393 - 421.

NORES, M., 2004. The implications of Tertiary and Quaternary sea level rise events for avian distribution patterns in the lowlands of northern South America. *Global Ecology and Biogeography*, **13**, pp. 149-161.

O

OGREN, R. and KAWAKATSU, M., 1990. Index to the species of the family Geoplanidae (Turbellaria, Tricladida, Terricola). Part I: Geoplaninae. *Bull. Fuji Women's College*, **28**(Ser II), pp. 79-166

OLALDE, M., HERRÁN, A., ESPINEL, S. and GOICOECHEA, P.G., 2002. White oaks phylogeography in the Iberian Peninsula. *Forest Ecology and Management*, **156**(1-3), pp. 89-102.

OLIVEIRA-FILHO, A.T. and FONTES, M.A.L., 2000. Patterns of floristic differentiation among atlantic forests in southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica*, **32**(4 B), pp. 793-810.

OLSEN, G.J., 1987. Earliest phylogenetic branchings: Comparing rRNA-based evolutionary trees inferred with various techniques. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, **52**, pp. 825-837.

P

PANTIN, C.F.A., 1953. On the name of the ground fluke *Fasciola terrestris* O.F. Müller, on *Othelosoma symondsii* Gray, and on the genus *Amblyplana* von Graff. *Journal of the Linnean Society of London, Zoology*, **42** (285), pp. 207-218.

PAPS, J., BAGUÑÀ, J. and RIUTORT, M., 2009a. Lophotrochozoa internal phylogeny: new insights from an up-to-date analysis of nuclear ribosomal genes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **276**(1660), pp. 1245-1254.

PAPS, J., BAGUÑÀ, J. and RIUTORT, M., 2009b. Bilaterian phylogeny: A broad sampling of 13 nuclear genes provides a new lophotrochozoa phylogeny and supports a paraphyletic basal acoelomorpha. *Molecular biology and evolution*, **26**(10), pp. 2397-

2406.

- PELLEGRINO, K.C.M., RODRIGUES, M.T., WAITE, A.N., MORANDO, M., YASSUDA, Y.Y. and SITES JR., J.W., 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): Genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, **85**(1), pp. 13-26.
- PESSOA, R.O., 2007. *Sistemática e Biogeografia Histórica da Família Conopophagidae (Aves: Passeriformes): Especiação nas Florestas da América do Sul*. Universidade de São Paulo.
- PETIT, R.J., CSAIKL, U.M., BORDÁCS, S., BURG, K., COART, E., COTTRELL, J., VAN DAM, B., DEANS, J.D., DUMOLIN-LAPÈGUE, S., FINESCHI, S., FINKELDEY, R., GILLIES, A., GLAZ, I., GOICOECHEA, P.G., JENSEN, J.S., KÖNIG, A.O., LOWE, A.J., MADSEN, S.F., MÁTYÁS, G., MUNRO, R.C., OLALDE, M., PEMONGE, M., POPESCU, F., SLADE, D., TABBENER, H., TAURCHINI, D., DE VRIES, S.G.M., ZIEGENHAGEN, B. and KREMER, A., 2002. Chloroplast DNA variation in European white oaks: Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management*, **156**(1-3), pp. 5-26.
- PETIT, R.J., HAMPE, A. and CHEDDADI, R., 2005. Climate changes and tree phylogeography in the Mediterranean. *Taxon*, **54**(4), pp. 877-885.
- PETRI, S and FÚLFARO, VJ, 1983. *Geologia do Brasil—Fanerozoico*, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PHILIPPE, H., BRINKMANN, H., MARTINEZ, P., RIUTORT, M. and BAGUÑÀ, J., 2007. Acoel flatworms are not Platyhelminthes: Evidence from phylogenomics. *PLoS ONE*, **2**(8), e717.
- PINTO-DA-ROCHA, R., DA SILVA, M.B. and BRAGAGNOLO, C., 2005. Faunistic similarity and historic biogeography of the harvestmen of southern and southeastern Atlantic Rain Forest of Brazil. *Journal of Arachnology*, **33**(2), pp. 290-299.
- PRITCHARD, J.K., SEIELSTAD, M.T., PEREZ-LEZAUN, A. and FELDMAN, M.W., 1999. Population growth of human Y chromosomes: A study of y chromosome microsatellites. *Molecular biology and evolution*, **16**(12), pp. 1791-1798.
- R**
- RAMOS-ONSINS, S.E. and ROZAS, J., 2002. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Mol Biol Evol*, **19**(12), pp. 2092-2100.
- RANNALA, B. and YANG, Z., 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, **43**(3), pp. 304-311.
- RIBEIRO, A.C., 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, **4**(2), pp. 225-246.
- RIBEIRO, MILTON CEZAR, METZGER, JEAN PAUL, MARTENSEN, ALEXANDRE CAMARGO, PONZONI, FLÁVIO JORGE AND HIROTA, MÁRCIA MAKIKO, 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, **142**(6), pp. 1141-1153.
- RIESTER, A., 1938. Beitrage zur Geoplaniden-Fauna Brasiliens. *Abh Senckenberg Naturforsch Ges*, **441**, pp. 88; 1.
- RIUTORT, M., ÁLVAREZ-PRESAS, M., LÁZARO, E., SOLÀ, E. and PAPS, J. "Evolutionary history of the Tricladida and the Platyhelminthes: an up-to-date phylogenetic and systematic account". *International Journal of Development Biology*. In press
- RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, F., HAMPE, A., JORDANO, P. and ARROYO, J., 2010. Past tree range dynamics in the Iberian Peninsula inferred through phylogeography and palaeodistribution modelling: A review. *Review of palaeobotany and palynology*, **162**(3), pp. 507-521.
- ROMERO, R., 1987. *Anàlisi cel·lular i quantitativa del creixement i de la reproducció a diferents espècies de planàries*. Tesi doctoral. Barcelona: Universitat de Barcelona.
- ROUSSELET, J., ZHAO, R., ARGAL, D., SIMONATO, M., BATTISTI, A., ROQUES, A. and KERDELHUÉ, C., 2010. The role of topography in structuring the demographic history of the pine processionary moth, *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera: Notodontidae). *Journal of Biogeography*, **37**(8), pp. 1478-1490.
- ROZAS, J., GULLAUD, M., BLANDIN, G. and AGUADÉ, M., 2001. DNA variation at the rp49 gene region of *Drosophila simulans*: Evolutionary inferences from an unusual haplotype structure. *Genetics*, **158**(3), pp. 1147-1155.
- RUIZ-TRILLO, I., NTILDE, AKI, RIUTORT, M.,

LITTLEWOOD, D.T.J., HERNIOU, E.A., BAGU, AGRAVE and JAUME, 1999. Acoel Flatworms: Earliest Extant Bilaterian Metazoans, Not Members of Platyhelminthes. *Science*, **283**(5409), pp. 1919-1923.

RULL, V., 2008. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary-Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Molecular Ecology*, **17**, pp. 2722-2729.

S

SAITOU, N. and NEI, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, **4**(4), pp. 406-425.

SARICH, V.M. and WILSON, A.C., 1973. Generation time and genomic evolution in primates. *Science*, **179**(4078), pp. 1144-1147.

SEITENFUS, A. L. R. and LEAL-ZANCHET, A. M., 2004. Uma introdução à morfologia e taxonomia de plânarias terrestres (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola). *Acta Biologica Leopoldensia*, **26**(2), pp. 187-202.

SHIRASAWA, Y. and MAKINO, N., 1981. Light and electron microscopic studies on the normal and regenerating photoreceptor of a land planarian (*Bipalium fuscum*). *Bull. Tokyo. Med. Coll.*, **7**, pp. 35-50.

SIGRIST, M.S. and CARVALHO, C. J. B., 2008. Detection of areas of endemism on two spatial scales using Parsimony Analysis of Endemicity (PAE): the Neotropical region and the Atlantic Forest. *Biota Neotropica*, **8**(4), pp. 33-42.

SIMPSON, B., ed, 1979. *Quaternary biogeography of the high montane regions of South America*. University of Kansas, Lawrence, Kansas: Duellman WE.

SLUYS, R., 1989a. Phylogenetic relationships of the triclads (Platyhelminthes, Seriata, Tricladida). *Bijdr Dierk*, **59**, pp. 3-25.

SLUYS, R., 1989b. Sperm resorption in triclads (Platyhelminthes, Tricladida). *Invertebrate Reproduction & Development*, **15**(2), pp. 89 - 95.

SLUYS, R., 1989c. A monograph of the Marine Triclads. *Balkema, Rotterdam*.

SLUYS, R., 1995. Platyhelminthes as paleogeographical indicators. *Hydrobiologia*, **305**, pp. 49-53.

SLUYS, R., 1998. Land planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola) in biodiversity and conservation

studies. *Pedobiologia*, **42**, pp. 490-494.

SLUYS, R., 1999. Global diversity of land planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola): a new indicator-taxon in biodiversity and conservation studies. *Biodiversity and Conservation*, **8**, pp. 1663-1681.

SLUYS, R. and KAWAKATSU, M., 2006. Towards a phylogenetic classification of dendrocoelid freshwater planarians (Platyhelminthes): a morphological and eclectic approach. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **44**(4), pp. 274-284.

SLUYS, R., KAWAKATSU, M., RIUTORT, M. and BAGUÑA, J., 2009. A new higher classification of planarian flatworms (Platyhelminthes, Tricladida). *Journal of Natural History*, **43**(29), pp. 1763-1777.

SOKOLOV, E.P., 2000. An improved method for DNA isolation from mucopolysaccharide-rich molluscan tissues. *Journal of Molluscan Studies*, **66**(4), pp. 573-575.

STEINBÖCK, O., 1925. Zur Systematik der Turbellaria metamerata, zugleich ein Beitrag zur Morphologie des Tricladen-Nervesystems. *Zool.Anz*, **64**, pp. 165-192.

STIMPSON, W., RINGGOLD, C. and RODGERS, J., 1857. *Prodromus descriptionis animalium evertibratorum, quae in Expeditione ad Oceanum Pacificum Septentrionalem a Republica Federata missa, Johanne Rodgers Duce, observavit et descripsit. Pars I, Turbellaria Dendrocoela*. Philadelphia: Academy of Natural Sciences, 1857-1860.

SUGUIO, K., MARTIN, L., 1978. Quaternary marine formations of the State of Sao Paulo and Southern Rio de Janeiro. *International Symposium on Coastal Evolution in the Quaternary 1978*, pp. 55.

SUGUIO, K., L. MARTIN, A. C. S. BITTENCOURT, J. M. L. DOMINGUEZ, J. M. FLEXOR and A. E. G. AZEVEDO, 1985. Flutuações do nível relativo do mar durante o Quaternário superior ao longo do litoral brasileiro e suas implicações na sedimentação costeira. *Revista Brasileira de Geociências*, **15**, pp. 273-286.

SUNNUCKS, P., BLACKET, M.J., TAYLOR, J.M., SANDS, C.J., CIAVAGLIA, S.A., GARRICK, R.C., TAIT, N.N., ROWELL, D.M. and PAVLOVA, A., 2006. A tale of two flatties: different responses of two terrestrial flatworms to past environmental climatic fluctuations at Tallaganda in montane southeastern Australia. *Molecular Ecology*, **15**(14), pp. 4513-4531.

SUZUKI, Y., GLAZKO, G.V. and NEI, M., 2002. Overcredibility of molecular phylogenies obtained by Bayesian phylogenetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(25), pp. 16138-16143.

TABERLET, P., FUMAGALLI, L. and WUST-SAUCY, ANNE-GABRIELLE AND COSSON, JEAN-FRANÇOIS, 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, **7**, pp. 453-464.

TAJIMA, F., 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, **123**(3), pp. 585-595.

TAVARÉ, S., BALDING, D.J., GRIFFITHS, R.C. and DONNELLY, P., 1997. Inferring coalescence times from DNA sequence data. *Genetics*, **145**(2), pp. 505-518.

THOMÉ, M.T.C., ZAMUDIO, K.R., GIOVANELLI, J.G.R., HADDAD, C.F.B., BALDISSERA JR., F.A. and ALEXANDRINO, J., 2010. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular phylogenetics and evolution*, **55**(3), pp. 1018-1031.

V

VELOSO, H.P., 1991. *Classificação da Vegetação Brasileira, Adaptada a um Sistema Universal*. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

VIALATTE, A., GUILLER, A., BELLIDO, A. and MADEC, L., 2008. Phylogeography and historical demography of the Lusitanian snail *Elona quimperiana* reveal survival in unexpected separate glacial refugia. *BMC Evolutionary Biology*, **8**(1), pp. 339.

VILA-FARRE, M., MATEOS, E., SLUYS, R. and ROMERO, R., 2008. Terrestrial planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Terricola) from the Iberian Peninsula: new records and description of three new species. *Zootaxa*, (1739), pp. 1-20.

VILA-FARRÉ, M., SLUYS, R., MATEOS, E. and JONES, H.D., 2011. Land planarians (Platyhelminthes: Tricladida: Geoplanidae) from the Iberian Peninsula: new records and description of two new species, with a discussion on ecology. *Journal of Natural History*, **45**(15-16), pp. 869-891.

W

WALL, J.D., 1999. Recombination and the power of statistical tests of neutrality. *Genetical research*, **74**(1), pp. 65-79.

WATTERSON, G.A., 1975. On the number of

segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical population biology*, **7**(2), pp. 256-276.

WEGMANN, D., LEUENBERGER, C. and EXCOFFIER, L., 2009. Efficient approximate Bayesian computation coupled with Markov chain Monte Carlo without likelihood. *Genetics*, **182**(4), pp. 1207-1218.

WHITMORE, T.C. and PRANCE, G.T., ed, 1987. *Biogeography and Quaternary History in Tropical America*. Clarendon Press.

WINNEPENNINCKX, B., BACKELJAU, T. and DE WACHTER, R., 1993. Complete small ribosomal subunit RNA sequence of the chiton *Acanthopleura japonica* (Lischke, 1873) (Mollusca, Polyplacophora). *Nucleic Acids Research*, **21**(7), pp. 1670.

WINSOR, L., 1977. Terrestrial planarians and nemerteans of the Otway region. *Proceedings of the Royal Society of Victorian Museum*, **89**, pp. 137-146.

WINSOR, L., 1979. Land planarians (Tricladida : Terricola) of the Royal Botanic Gardens, Melbourne, Victoria. *Victorian Nat.*, **96**, pp. 155-161.

WINSOR, L., 1983. A revision of the cosmopolitan land planarian *Bipalium kewense* Moseley, 1878 (Turbellaria: Tricladida: Terricola). *Zool.J.Linn.Soc*, **79**, pp. 61-100.

WINSOR, L., 1986. Land planarians (Turbellaria: Tricladida : Terricola) introduced into Australia-2. *Kontikia orana* Froehlich, 1955. *Victorian Nat.*, **103**, pp. 9-11.

WINSOR, L., 1991. A provisional classification of Australian terrestrial geoplanid flatworms (Tricladida: Terricola: Geoplanidae). *Vict. Natur.*, **108**, pp. 42-49.

WINSOR, L., 1997. The biodiversity of terrestrial flatworms (Tricladida: Terricola) in Queensland: a preliminary report. *Memoirs of the Museum Victoria*, **56**, pp. 575-579.

WINSOR, L., 1998. Aspects of taxonomy and functional histology in terrestrial flatworms (Tricladida: Terricola). *Pedobiologia*, **42**(5-6), pp. 412-432.

WINSOR, L., JOHNS, P.M., and YEATES, G.W., 1998. Introduction, and ecological and systematic background, to the Terricola (Tricladida). *Pedobiologia*, **42**, pp. 389-404.

WRIGHT, S., 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.*, **15**, pp. 323-354.

WU, C.I. and LI, W.H., 1985. Evidence for higher rates of nucleotide substitution in rodents than in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**(6), pp. 1741-1745.

Z

ZINK, R.M., 2002. Methods in Comparative Phylogeography, and Their Application to Studying Evolution in the North American Aridlands1. *Integrative and Comparative Biology*, **42**(5), pp. 953-959.

ZUCKERLANDL, W. and PAULING.,L., 1962. Molecular disease, evolution and genic heterogeneity. *Horizons in Biochemistry*, M.Kash&B.Pullman. Academic Press, New York.

ANNEXOS

ANNEX I

MÈTODES D'INFERÈNCIA FILOGÈNETICA A PARTIR DE DADES MOLECULARS

1. *Mètodes basats en distàncies*

Els primers mètodes d'inferència filogenètica aplicats a les dades moleculars es basaven en la distància genètica entre les seqüències. Per estimar aquesta distància, el nombre de canvis observats entre dues seqüències es corregeix aplicant un model evolutiu. Existeixen molts models i cadascun assigna diferents probabilitats a cada tipus de canvi nucleotídic depenent de les assumpcions prèvies del model.

El model de **Jukes i Cantor** (1969) és un dels més utilitzats i assumeix que la probabilitat de substitució d'un nucleòtid per un altre és la mateixa per tots els casos. Més tard es va veure que les transicions són més freqüents que les transversions, assumpció que està a la base del model de **Kimura-2-paràmetres** (1980). De cada model evolutiu se'n pot deduir una correcció matemàtica amb la que podem estimar el nombre de canvis real entre dues seqüències a partir dels canvis observats.

Comparant les seqüències 2 a 2 i aplicant aquesta correcció obtenim la matriu de distàncies. Existeixen diferents mètodes de reconstrucció d'arbres a partir de la matriu de distàncies i el **Neighbor-joining** (NJ) és un dels més populars. El mètode de NJ (Saitou i Nei, 1987) agrupa les seqüències de forma que l'arbre resultant minimitza la distància total de l'arbre. En l'arbre representat, la longitud de les branques en general representa les distàncies genètiques.

L'avantatge dels mètodes que fan servir distàncies és que són molt ràpids i que donen com a resultat un únic arbre. No obstant això, recentment s'han desenvolupat mètodes estadístics, com la Màxima Versemblança o la Inferència Bayesiana, que també apliquen models evolutius en la inferència i aprofiten millor la informació continguda a les dades.

2. *Màxima Parsimònia*

La **Màxima Parsimònia** (MP) és un mètode d'inferència que prové de les filogènies morfològiques i es basa en el criteri **cladístic** (proposat per W. Hennig). En moltes ocasions, aquest mètode assumeix que sabem quin és l'estat primitiu i quin el derivat de cada caràcter (tot i que en dades moleculars això no és possible) i que els caràcters derivats compartits són una evidència de l'existència d'un grup monofilètic (definit per sinapomorfies). Implica que l'estat derivat ha aparegut només un cop (és a dir, que no existeix homoplàsia) i que no es pot tornar d'un estat derivat a l'ancestral. A la pràctica, i en les dades moleculars en concret,

aquestes assumpcions no sempre són certes. En MP per a cadascun dels arbres possibles relacionant els OTUs es calcula el nombre mínim de passes (canvis d'estat de caràcter) que explica els estats de caràcter observats a la matriu (l'alineament). Aquest procés es repeteix per cadascun dels caràcters (posicions de l'alineament) i es selecciona aquell/s arbre/s que requereix/en el mínim nombre de passes (canvis d'estat). En cas d'obtenir més d'un arbre es sol representar l'arbre consens. En els arbres de MP en general, la longitud de les branques no representa ni el temps evolutiu ni els canvis d'estat.

Alguns dels desavantatges de la MP són que és computacionalment costosa, que les dades moleculars poden ser molt homoplàsiques i que la manca d'ús de models evolutius l'exposa a la possibilitat de ser molt inconsistent sota determinats fenòmens evolutius (taxes diferents entre llinatges o entre posicions). També s'ha criticat dels mètodes de parsimònia l'ús poc eficient de la informació nucleotídica, ja que les posicions nucleotídiques informatives (criteri de parsimònia) representen només una fracció de totes les posicions variables.

Fins fa poc temps la MP era l'únic mètode que permetia estudiar alhora caràcters morfològics i moleculars, però actualment també és possible fer-ho mitjançant la inferència bayesiana.

3. *Màxima Versemblança*

La **Màxima Versemblança** (MV), proposada per Felsenstein al 1981, fa servir els mateixos models evolutius que els mètodes de distàncies. La MV estima la probabilitat de que un alineament (les dades) hagi estat el resultat d'un model i una determinada història evolutiva i selecciona l'arbre que té la major probabilitat de donar lloc a les nostres dades. Per fer-ho, es calcula la probabilitat d'obtenir les dades observades (l'alineament de seqüències) posició per posició, sota un determinat model evolutiu (probabilitats de canvi nucleotídic, freqüències nucleotídiques, etc.) i per cadascun de tots els arbres (topologies) possibles, triant aquell que presenta una probabilitat més alta pel total de les posicions. Normalment, a l'hora que s'infereix la topologia, també s'estima la longitud de les branques (proporcional als canvis acumulats) i els valors dels paràmetres del model evolutiu. D'aquesta manera aquesta metodologia no sols ens permet deduir les relacions filogenètiques entre OTUs, sinó que a més ens dona informació sobre el procés evolutiu que ha generat les seqüències comparades.

Al ser un mètode amb base estadística, la MV és molt flexible i permet la fàcil aplicació de tests estadístics. L'ús de models evolutius complexos i la possibilitat de tractar de forma diferent les regions del DNA depenent de la seva variabilitat, permetent que s'adapti a pràcticament qualsevol tipus de dades complexes. Però això també vol dir que a l'haver d'explorar més possibilitats, també es necessita molt de temps per inferir una

filogènia. Un model més complex per explicar l'evolució ha de calcular més paràmetres, que s'estimen a partir de les dades (per tant, s'incrementa la incertesa). Models més complexos poden explicar millor les nostres dades, però quants més paràmetres incorporem a l'anàlisi, incrementem el temps computacional i la taxa d'error, per això és important triar el model adequat a les nostres dades, sense escollir-ne un de més complex per defecte. Per altra banda, la impossibilitat computacional d'analitzar totes les topologies possibles, fa que els diferents algoritmes utilitzats en la reconstrucció (segons els programes que es facin servir) presentin diferents estratègies per cercar d'entre totes les possibles la topologia més probable sense haver d'avaluar-les totes. Aquest fet condiciona els arbres dels quals es calcularà la probabilitat, cosa que pot variar l'eficiència i l'eficàcia dels diferents programes.

4. *Inferència Bayesiana*

La **inferència Bayesiana** és el mètode més recent que, igual que la MV, es basa en les probabilitats derivades d'un model evolutiu, però a diferència d'aquella, s'analitzen les dades mitjançant el concepte de probabilitat posterior enunciada al Teorema de Bayes. El valor optimitzat és la probabilitat de l'arbre donades les dades observades i el model evolutiu escollit (probabilitat condicionada). Els primers a utilitzar la inferència bayesiana foren Rannala i Yang al 1996. L'aplicació de determinats algoritmes matemàtics (com l'anàlisi per cadenes de Markov) el converteix en un mètode ràpid i eficient. L'arbre amb la major probabilitat a posteriori serà la millor estima de la filogènia. Gràcies a les **cadenes de Markov (MCMC)** és possible cercar a l'atzar dins de l'espai d'arbres i anar-los desant segons un criteri establert. L'algoritme de MCMC funciona de manera que mitjançant un mètode estocàstic es proposa un nou estat per la cadena (aquest pot ser un nou arbre o uns nous valors pels paràmetres del model evolutiu), el nou estat es guarda amb una certa probabilitat d'acceptació. Aquesta és d'1 si el nou estat és millor que l'anterior i, en cas de ser pitjor, la probabilitat d'acceptació és proporcional a la diferència que existeix entre els dos estats (tindrà moltes probabilitats de ser acceptat si no és gaire pitjor que l'anterior i poques si ho és molt). Aquest procés es reitera milers o milions de vegades de manera que les cadenes mostregen l'espai d'arbres d'una forma molt eficient, i a partir de cert moment tots els arbres i paràmetres proposats es trobaran dins de la regió amb una probabilitat posterior més elevada de tot l'espai d'arbres. Direm llavors que la cadena ha assolit l'estabilitat ja que les noves propostes variaran al voltant dels mateixos valors de probabilitat. La proporció dels cops que un arbre apareix en les cadenes una vegada assolida la zona estable és una aproximació vàlida de la seva probabilitat posterior. Huelsenbeck i Ronquist al 2001 van millorar el mètode MCMC incorporant l'ús de cadenes de Markov fredes i calentes en paral·lel (**MC³**). Les cadenes calentes poden explorar millor l'espai d'arbres filogenètics, ja que els pics són més baixos i les valls menys profundes (cobrint una major àrea de l'espai

d'arbres), permetent amb major facilitat el pas d'un pic de probabilitat moderada a un de més alta. Si una cadena calenta troba un arbre millor aquesta passa a ser la freda, al final les inferències es basen només en els valors obtinguts a la cadena freda. L'arbre inferit és el consens de tots els arbres obtinguts un cop assolida l'estabilitat i la proporció amb que apareix cada grup monofilètic en aquests arbres és la seva probabilitat posterior. Un dels problemes que es pot trobar és que les cadenes no puguin sortir d'un pic perquè la vall que el separa del pic millor és massa profunda. En aquest cas l'arbre final no seria el millor perquè en la cerca s'hauria assolit un **màxim local**, és a dir, l'arbre escollit és el millor de la zona, però no és el millor de tots els arbres possibles. Per aquest motiu és recomanable fer més d'una cerca alhora (generalment dues). Si les dues execucions independents del programa convergeixen en el mateix resultat ens assegura que no s'han estancat en un màxim local (o és poc probable que la solució trobada correspongui a un màxim local).

5. Suport estadístic

Un cop hem construït l'arbre, ens cal una mesura de la confiança estadística que les dades ens donen per a cadascuna de les branques d'aquest. Per trobar aquests valors existeixen diverses metodologies. La més utilitzada és el **Bootstrap**, que es basa en generar un alt nombre de pseudorèpliques mostrejant posicions a l'atzar de la nostra matriu original. Les noves matrius tenen el mateix nombre de caràcters que aquesta i es permet repetir posicions. A partir de cada pseudorèplica s'infereix una filogènia i la confiança per a cada grup s'obté calculant en quin percentatge de les filogènies obtingudes apareix. Aquest valor és una aproximació de quina és la probabilitat de que una branca interna aparegui quan es faci de nou l'anàlisi amb una mostra independent (Felsenstein, 1985) i és pot interpretar com la probabilitat que la branca interna es trobi a l'arbre real (Felsenstein i Kishino, 1993). En general, es considera que els valors de bootstrap són molt conservadors, pel que s'accepta que un grup amb un suport del 75% o superior és un grup monofilètic segons les nostres dades, i la metodologia i el model evolutiu emprats. D'altra banda però, un valor de bootstrap baix no té per què ser indicatiu de què la relació sigui falsa, només vol dir que no té suport estadístic (amb les nostres dades i el model que haguem utilitzat).

El **jackknifing** (Farris i col. 1996) és un mètode similar al bootstrap. En aquest cas a cada pseudorèplica s'elimina de forma independent una proporció dels caràcters a l'atzar, amb la mateixa probabilitat per cada caràcter de ser eliminat, simplificant la relació entre freqüència i suport. El **suport de Bremer** (Decay index) (Bremer, 1994), només s'utilitza en MP. Mesura la diferència en nombre de passos entre l'arbre de MP que inclou el grup i el primer arbre que no l'inclou (en el qual el grup ja no és monofilètic). No té una interpretació estadística immediata.

La **probabilitat posterior (PP)** és el suport estadístic que s'utilitza a la inferència

bayesiana. Es tracta de la probabilitat de que un node sigui real donat el model i les dades utilitzats (Huelsenbeck, 2002). Al ser una probabilitat, el rang de valors està entre 0 i 1. En comparació amb els valors de bootstrap, els valors de PP solen ser molt menys conservadors (Suzuki i col. 2002; Cummings i col. 2003), acceptant com a monofilètic un grup segons les nostres dades, generalment quan presenten valors de PP superior al 0.90.

MESURES DE VARIABILITAT GENÈTICA I TESTS DE NEUTRALISME

1. *Mesures de variabilitat intrapoblacional*

Els estadístics més importants per la quantificació de la variabilitat dins de poblacions a nivell de DNA són:

- ❖ **Nombre de llocs segregants o polimòrfics (S):** és el nombre de llocs polimòrfics dins de cada espècie o població. Les posicions segregants tenen normalment dos nucleòtids diferents, encara que teòricament podrien presentar les quatre variants nucleotídiques. S és un estadístic que depèn de la grandària mostral i del nombre de nucleòtids estudiats.
- ❖ **Nombre de mutacions (Eta , η):** és un estadístic que indica el nombre mínim de mutacions necessàries per justificar el nombre S observat. Aquest valor és igual que S , o més gran, quan existeixen posicions tri-al·lèliques o tetra-al·lèliques (és a dir, com a mínim han calgut dues o tres mutacions per explicar aquestes posicions polimòrfiques).
- ❖ **Diversitat nucleotídica (π):** és el nombre mitjà de diferències nucleotídiques (k) per posició nucleotídica en comparar dues seqüències de DNA. Aquest és un dels millors estimadors, ja que és independent de la grandària mostral i del nombre de posicions estudiades. Pel seu càlcul es comparen les seqüències per parelles i es calcula el nombre promig (k) de diferències. k i π indiquen el mateix, però les unitats de k són la regió (o el gen) d'estudi mentre que π és per nucleòtid. Aquest paràmetre és molt utilitzat en els estudis poblacionals, ja que a més d'aportar informació sobre els nivells de variació a una seqüència de DNA, permet comparar els valors de diferents estudis. Aquest és un estimador, a més, de la **heterozigositat** per nucleòtid.
- ❖ **Estimador de Watterson (θ):** descrit per Watterson al 1975, aquest paràmetre és equivalent a k quan les mutacions són selectivament neutres, la població és panmíctica i es troba en equilibri mutació-deriva. El paràmetre es defineix com $\theta = N_e u$ (on N_e és la grandària efectiva de la població i u la taxa de mutació neutra per generació). Si dividim θ per la longitud del fragment que estudiem, obtindrem el càlcul de l'estimador de Watterson per nucleòtid (equivalent a l'heterozigositat per nucleòtid).
- ❖ **Nombre d'haplotips (h):** és el nombre de seqüències de DNA diferents que es troben a la mostra. Aquest estadístic depèn de la grandària mostral i a més de la longitud de la regió que estem estudiant. h dona informació sobre el nombre de seqüències, però no del nivell de variabilitat genètica. Si tota la variabilitat consisteix en una única posició polimòrfica, per exemple, només tindrem dos haplotips a la població, independentment de les seves freqüències.
- ❖ **Diversitat haplotípica (Hd):** és una estima del nombre d'haplotips d'una població

determinada que té en compte la distribució de les seves freqüències. Com més gran és el seu valor (el rang és comprès entre 0 i 1), més gran és el nivell de variabilitat.

- ❖ **Desequilibri de lligament (LD):** és el nivell d'associació entre dos o més loci. Diem que una població està en desequilibri de lligament quan el nivell d'associació és més alt del que s'esperaria per atzar. En una població, dos loci es troben en equilibri de lligament quan el genotip d'un cromosoma en un locus és independent del genotip a l'altre locus.

2. *Mesures de variabilitat interpoblacional*

Els estadístics més utilitzats per la quantificació de la variabilitat entre poblacions són:

- ❖ **D_{xy}:** és el nombre mitjà de diferències nucleotídiques per lloc entre dues poblacions. Quant més diferents siguin dues poblacions a nivell nucleotídic, més gran serà el valor d'aquest estadístic.
- ❖ **D_a:** és el nombre net de substitucions de nucleòtids per lloc entre les poblacions, és a dir, els valors de D_{xy} menys l'efecte de la variació dins de la població.
- ❖ **F_{ST}:** aquest estadístic mesura els nivells de variació genètica atribuïbles a les diferències existents dins de les poblacions. Per aquest índex, els valors es troben entre el 0 i l'1. Es basa en els estadístics originals de Wright (1951) i es pot fer servir per estimar els nivells de flux gènic (paràmetre N_m , on N és la grandària efectiva de la població i m la taxa de migració).

3. *Els tests de neutralisme*

Existeixen diversos tests estadístics que permeten contrastar la teoria neutralista a partir de la variabilitat detectada a les poblacions naturals (els denominats **tests de neutralisme**). El que fan aquests tests és detectar desviacions significatives no compatibles amb la hipòtesi nul·la. Quan una d'aquestes proves rebutja la hipòtesi nul·la és perquè alguna de les suposicions del model d'equilibri neutralista ha estat violada. Si cap d'aquests tests dona valors significatius, és perquè existeix una situació d'estabilitat demogràfica. S'han desenvolupat mètodes útils per contrastar diferents escenaris evolutius, i que capturen de manera diferencial diferents tipus d'informació:

- ❖ **Tests basats en dades intrapoblacionals:**
 - L'estadístic **D de Tajima** (Tajima, 1989), basat en l'espectre de freqüències, es calcula com les diferències entre el nombre de llocs segregants i el nombre mitjà de diferències nucleotídiques. Aquest test pot detectar variacions en l'espectre de seqüències, de manera que un resultat positiu indicaria un excés en el nombre

de variants de freqüències intermèdies (que podria ser degut a l'estructuració poblacional); i valors negatius es correspondrien amb un excés de variants de baixes freqüències (que podria ser degut a una expansió poblacional o a l'acció de la selecció positiva). Si les mutacions són neutres i les poblacions estan en equilibri el valor esperat de D seria 0.

- L'estadístic R_2 (Ramos-Onsins i Rozas, 2002) es basa en la diferència entre el nombre de mutacions úniques (*singletons*) en un llinatge particular i el nombre mitjà de diferències nucleotídiques. Aquest test és dels més potents per l'anàlisi de grandàries poblacionals petites. El fonament d'aquest test és que el nombre esperat de singletons en una genealogia després d'un creixement poblacional brusc recent és $k/2$, i en conseqüència s'esperen valors baixos de R_2 per casos amb aquest escenari demogràfic.
- L'estadístic **Fs de Fu** (Fu, 1997) fa servir informació de la distribució haplotípica i nucleotídica. Es basa en la probabilitat de tenir un nombre determinat d'al·lels en una mostra de seqüències donat un valor de θ . Els tests que calculen aquest estadístic són més potents quan es treballa amb grandàries mostrals grans. Tendeix a 0 en situació de neutralitat, igual que la D de Tajima. Un valor negatiu d'aquest estadístic podria indicar un excés d'al·lels poc freqüents produït per un excés de mutacions úniques causades per una expansió recent.
- Tests basats en els nivells d'associació entre posicions polimòrfiques i que poden servir per analitzar l'estructuració de les poblacions:
 - L'estadístic **ZnS** (Kelly, 1997), que és una mesura global dels nivells d'associació entre al·lels (LD) entre diferents parells de llocs polimòrfics.
 - L'estadístic **Za** (Rozas i col. 2001), és un estadístic semblant a ZnS, però només compara els polimorfismes adjacents i es pot fer servir per anàlisis dels nivells de recombinació.
 - **B** de Wall (Wall, 1999) és una mesura de l'associació entre llocs segregants, i els seus valors es troben entre 0 i 1. B és un test estadístic molt potent per anàlisis dels nivells de subdivisió poblacional.
 - **Q** de Wall (Wall, 1999), aquest estadístic és una correcció de l'anterior tenint en compte els parells de llocs segregants. Igual que B , els seus valors estan escalats de 0 a 1 i s'espera que siguin majors sota una situació de subdivisió geogràfica que sota el model neutral de panmixi. No està clar quin és l'efecte de la recombinació sobre aquest estadístic, ja que Q és la suma d'un terme que està positivament relacionat amb la recombinació i un que hi està negativament correlacionat.

Un aspecte molt important a tenir en consideració és el paper de la recombinació. S'ha

vist que la no incorporació dels nivells de recombinació en els tests de neutralisme redueix la seva potència estadística. Així doncs, a l'anàlisi de dades de gens nuclears s'haurien d'estimar els valors de recombinació, i fer les simulacions de coalescència tenint en compte aquest factor.

- ❖ Tests basats en dades intra- i interpoblacionals de polimorfisme i divergència: un exemple és el test de Hudson-Kreitman-Aguadé (**test HKA**; Hudson i col. 1987), que utilitza les dades d'una comparació interespecífica d'almenys dues regions del genoma així com les dades del polimorfisme intraespecífic de les mateixes regions com a mínim d'una espècie. El test està basat en el fet que per mutació neutra existeix una correlació positiva entre els nivells de variació intra- i interespecífica.
- ❖ Tests basats en dades interpoblacionals o interespecífiques. Una de les anàlisis més potents es basa en la comparació de la divergència: quan es comparen regions codificadores de diferents espècies i s'estimen el nombre de substitucions no sinònimes (K_a ; impliquen canvi d'aminoàcid) o les sinònimes (K_s ; no impliquen canvi d'aminoàcid). Si les mutacions fossin selectivament neutres, esperaríem que els dos valors fossin idèntics. ω és el quocient entre K_a i K_s i s'utilitza com a mesura del grau de limitació al canvi (limitació funcional) al què està sotmès un gen o proteïna. Així, un valor menor que 1 podria indicar que la selecció purificadora ha eliminat els canvis no sinònims, mentre que un valor més gran pot ser una evidència de la selecció adaptativa (la selecció ha actuat en favor d'alguns d'aquests canvis).

ANNEX II

Aspectes més rellevants de l'anatomia interna i externa de les planàries terrestres.

1. *Epidermis*

La superfície corporal de les planàries està coberta per un epitelí simple, format per cèl·lules que solen tenir formes que van des de cilíndriques a cúbiques. L'epidermis de la zona ventral degut a la seva adaptació al medi terrestre presenta una modificació específica i forma la **sola ventral**. Es caracteritza per la presència de cilis i el predomini relatiu de glàndules cianòfiles i dona força de propulsió per acció ciliar o muscular, o per la combinació d'ambdós. En algunes espècies la sola ventral és formada per un tipus d'epitelí especial constituït per cèl·lules epidèrmiques enfonsades profundament dins del teixit connectiu subjacent, enlloc d'estar disposades sobre una membrana basal. Aquest mecanisme protegeix les cèl·lules de l'estrès mecànic i la destrucció total i en facilita la regeneració (Winsor, 1998). La presència o absència de la sola ventral així com la seva amplada relativa són caràcters importants taxonòmicament.

La coloració de les planàries és deguda a l'existència de cèl·lules pigmentàries que es troben sota de l'epidermis (Romero, 1987). Existeix diferència en la coloració segons el grup i la distribució, presentant les planàries europees coloracions molt més monòtones i fosques, sense gaires patrons. Les planàries tropicals, en canvi, són molt més acolorides i amb dissenys molt diferents amb un patró de coloració viu i contrastat que abasta una àmplia gamma de colors, amb el dors mono o policromàtic, i el ventre sovint blanquinós. El color i la pigmentació fosca en general augmenta a mida que l'animal madura (Froehlich, EM, 1955), tot i que no té per què ser sinònim de maduresa sexual.

Hi ha diversos tipus de cèl·lules secretores que desemboquen en l'epidermis, les cèl·lules rabditògenes són molt característiques i són les responsables de la producció de **rabdites**, que són secrecions (cossos epidèrmics) en forma de bastons (Seitenfus i Leal-Zanchet, 2004). Els rabdites els ajuden a segregar una substància mucosa que els recobreix el cos i que pot tenir diverses funcions: adhesiva, de locomoció, funció de captura de preses, com a element repulsiu contra possibles predadors i també pot tenir una funció homeostàtica. A més tenen altres tipus de glàndules secretores de moc, entre elles, les glàndules eritròfiles, per exemple, que secreten grànuls amb propietats adhesives o que protegeixen l'epitelí contra la pèrdua d'humitat (Winsor, 1998).

2. *Musculatura*

Distingim dos tipus principals de musculatura en aquests animals:

❖ Musculatura subepidèrmica

Es troba sota la membrana basal (musculatura cutània) i generalment és tripartida,

amb una capa externa de músculs circulars, una capa intermèdia de fibres obliqües i una capa interna de fibres longitudinals, totes elles llises (Fig. II-1). Algunes espècies presenten un estrat de dues capes, però és estrany, per exemple a *Caenoplana coerulea* la musculatura externa és una simple capa de fibres circulars obliqües (Winsor, 1991). La formació de feixos de fibres i l'espessor relatiu de les capes serveixen per distingir entre els membres de les famílies Rhynchodemidae i Geoplanidae. Gràcies a aquestes fibres les planàries terrestres es mouen arrossegant-se mitjançant ondulacions musculars, d'una manera molt semblant a la dels cargols.

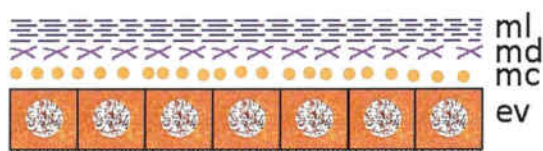


Figura II-1. Esquema de la musculatura subepidèrmica de les planàries terrestres. ml: capa de musculatura longitudinal; md: capa de musculatura diagonal; mc: capa de musculatura circular; ev: epidermis ventral. Basat en Sluys (1989a)

❖ Musculatura mesenquimàtica

Com en tots els platihelminths, l'espai entre els òrgans interns està ple de teixit connectiu lax anomenat mesènquima o parènquima, en el qual es produeixen les fibres musculars que constitueixen el mesènquima muscular (Seitenfus i Leal-Zanchet, 2004). En les planàries terrestres, aquesta musculatura parenquimàtica suposa una adaptació al medi terrestre (Meixner, 1928), ja que intervé activament en la locomoció, creant ones peristàltiques que fan que el cos es mogui (Jones, 1978; Minelli, 1981).

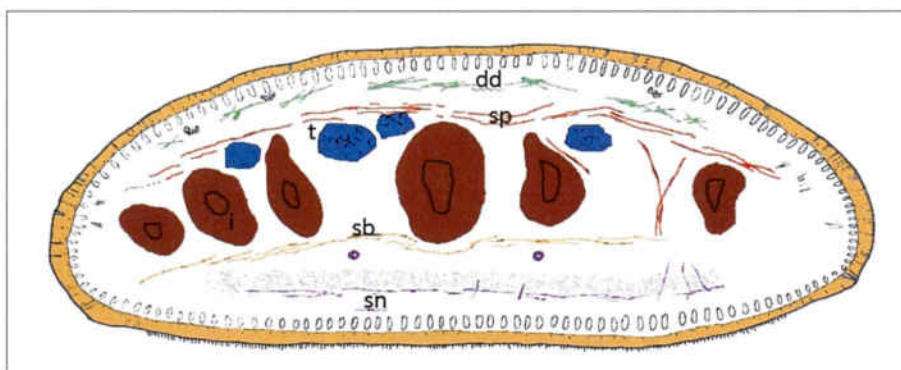


Figura II-2. Esquema dels tipus de musculatura mesenquimàtica d'una planària terrestre en tall transversal. dd: capa muscular doble diagonal dorsal; i: intestí; t: testicles; sp: capa muscular supra-intestinal; sb: capa muscular sub-intestinal; sn: capa muscular sub-neural (Modificat de Grau, 2010).

3. *Sistema digestiu*

La boca és un petit porus ventral, situat al començament de la meitat posterior del cos i està connectada amb una faringe evaginable (d'origen mesenquimàtic, segons Hyman (1951)), que depenent de la seva posició a les planàries terrestres pot ser de diferents tipus (cilíndrica, campaniforme o en collaret). La faringe rep dos o més tipus de cèl·lules

secretores (=glàndules faríngies; Seitenfus i Leal-Zanchet, 2004). Pot existir un esòfag que comunica la faringe amb l'intestí, que és format per tres branques o troncs ramificats, un anterior i dos posteriors amb diverticles i cec, sense anus. Efectuen **digestió extracel·lular** gràcies a enzims proteolítics. Les cèl·lules fagocítiques de la gastrodermis completen la digestió (**intracel·lular**) i l'aliment no digerit és expulsat per la faringe.

4. Sistema excretor

El seu sistema excretor té una importància crítica per a la regulació i conservació de l'aigua. Realitzen l'excreció i osmoregulació mitjançant **protonefridis** amb cèl·lules flamígeres i contenen un elevat nombre de nefridioporus. Les restes metabòliques s'eliminen en gran part per difusió a través de la paret del cos.

5. Sistema nerviós

Un dels caràcters que defineixen les planàries terrestres és el sistema nerviós central del tipus diploneural (Steinböck, 1925), situat en posició ventral. Aquesta estructura especialitzada probablement està relacionada amb la presència de la sola ventral (Sluys, 1989a). A les planàries d'aigua dolça els cordons nerviosos dorsals i laterals són conspicus o absents i les fibres nervioses s'uneixen a les comissures per formar una mena de plexe. A les planàries terrestres, en canvi, el sistema nerviós es caracteritza per presentar un part endinsada en el mesènquima, la **placa ventral nerviosa**, o, en espècies subcilíndriques, un parell de cordons nerviosos ventrals únics, i el **plexe nerviós ventral** (molt desenvolupat), ubicat directament sota la musculatura cutània. Els cordons nerviosos ventro-laterals estan units per una sèrie de **comissures transversals** (Fig. II-3). Les planàries terrestres tenen un **gangli cerebral** anterior ("cervell") constituït per dos lòbuls simètrics units per comissures nervioses.

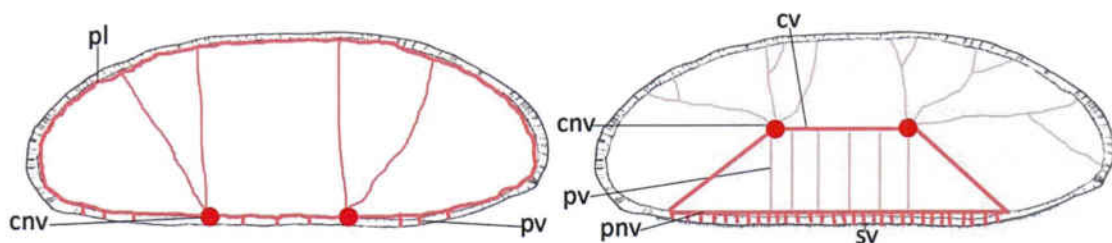


Figura II-3. Comparació del sistema nerviós d'una planària d'aigua dolça (esquerra) i una terrestre (dreta). pl: plexe; cnv: cordó nerviós ventral; pv: pont ventral; cv: comissura ventral; pnv: plexe nerviós ventral; sv: sola ventral. Basat en Sluys (1989a).

6. Òrgans sensorials

Els principals òrgans dels sentits són els ulls, les fosses sensorials i el marge o vora

sensorial, però a més hi ha diversos tipus de receptors sensorials (mecano i quimiorceptors) associats a l'epidermis (Seitenfus i Leal-Zanchet, 2004).

Els **ocel·les** o **ulls** són taques oculars sensibles a la llum (les planàries en general són fotosensibles). Els ulls (amb un diàmetre d'entre 20 i 50 µm en planàries terrestres) estan formats d'una capa de pigment que es produeix dins de les cèl·lules fotoreceptores. Els ulls de Geoplanidae i Bipaliidae són nombrosos i es troben espaiats pel llarg del cos o lateralment (Carbayo, 2005). En alguns grups (*Choeradoplana*, *Cephaloflexa*) els ulls estan absents en l'àpex de la regió cefàlica. El nombre i la posició dels ocel·les és un caràcter taxonòmic molt utilitzat per classificar planàries terrestres.

La **vora sensorial**, probablement associada amb la quimiorreceptió, és una franja fina al marge ventral anterior del cos (i de vegades també s'estén posteriorment), a través de la qual desemboquen papil·les i les **fossetes sensorials**. Aquestes són invaginacions tubulars epidèrmiques de 15 a 40 µm de profunditat (Carbayo, 2005), probablement responsables de quimiorreceptió, en les que hi ha terminacions sensibles i que estan distribuïdes en fileres (simples o ramificades).

7. Sistema reproductor

Les planàries terrestres són animals hermafrodites que es poden reproduir tant asexual com sexualment. En el seu grup germà, la família Dugesiidae, es presenten múltiples casos de reproducció asexual, ja sigui partenogenètica o per fissió. En el cas de les planàries terrestres és sabut que poden regenerar (Morgan, 1899), però no s'ha demostrat si s'utilitzen els mecanismes d'asexualitat com a sistema natural de reproducció. Pel que fa a la reproducció **sexual**, practiquen fecundació creuada i tenen un sistema reproductor complex. L'**aparell reproductor masculí** (Fig. II-4) consta de varis parells de testicles fol·liculars disposats en una o més sèries longitudinals (ventrals a Caenoplaninae i Pelmatoplaninae o dorsals a Geoplaninae) amb espermatozoides força especialitzats que s'emmagatzemen en un parell de conductes eferents que van a parar a la vesícula prostàtica ventralment a l'intestí (localitzada posteriorment a la faringe), amb la qual es realitza la transferència d'esperma entre individus. L'òrgan copulador masculí (el penis) es compon d'una part bulbosa (**bulb penial**) i una cònica, la **papil·la penial**, que pot ser molt petita o inexistent (caràcter important en la taxonomia del grup). El penis de les planàries terrestres pot ser protractil, més comú en Bipaliidae i Microplaninae, o evers (girat enfora), més freqüent en Rhynchodeminae i Geoplaninae. Aproximadament a l'altura de la faringe, en els animals adults, els conductes eferents es dilaten per formar falses vesícules seminals, anomenades així perquè emmagatzemen el semen i no són responsables de la producció de secrecions seminals. Aquests conductes desemboquen en la **vesícula prostàtica**, una regió que rep les secrecions dels nutrients necessaris per mantenir la viabilitat dels espermatozoides. La

vesícula prostàtica, situada interna o externament al bulb penial, continua amb el conducte ejaculador, que travessa la papil·la penial, quan és present, per donar lloc a una cavitat, l'**atri masculí** (Seitenfus i Leal-Zanchet, 2004). L'**aparell reproductor femení** està format per un parell d'ovaris, que normalment es troben en posició ventral al costat del cap i que continuen en un parell d'oviductes que viatgen cap a la part posterior del cos (rebut les secrecions de les glàndules vitel·lines) i s'obren en l'atri femení per mitjà d'una vagina més o menys conspícua. La posició i orientació del conducte glandular comú i de la vagina serveix per distingir entre els gèneres de Geoplaninae.

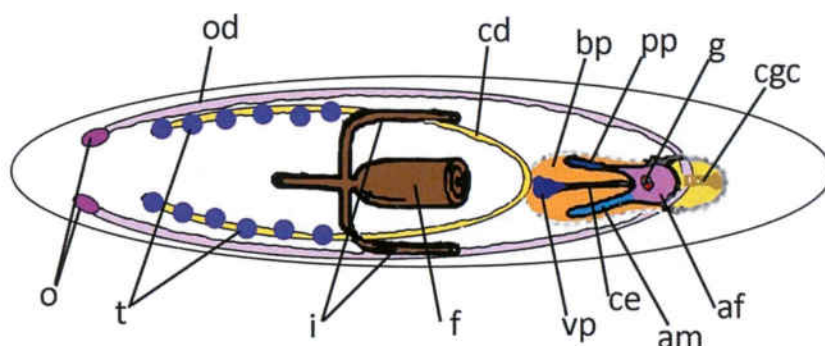
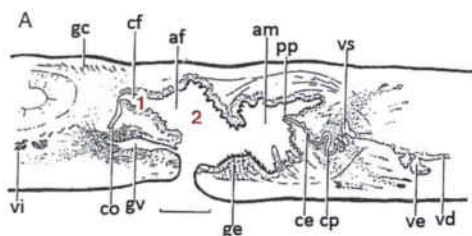
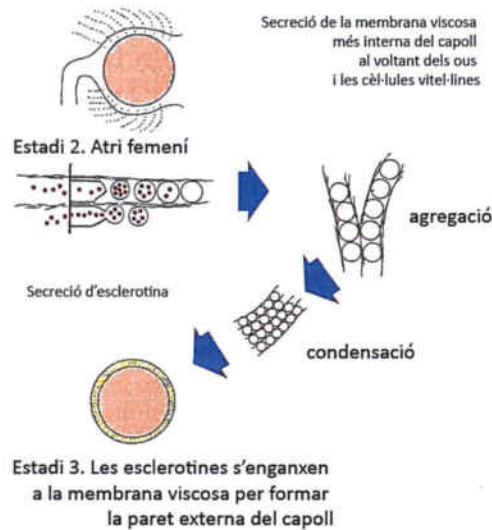


Figura II-4. Esquema de l'aparell reproductor masculí i femení d'una planària terrestre, modificat de Seitenfus i Leal-Zanchet, 2004. af: atri femení; am: atri masculí; bp: bulb penial; cd: conducte deferent; ce: conducte ejaculador; cgc: canal glandular comú; f: faringe; g: gonopori; i: intestí; o: ovari; od: oviducte; pp: papil·la penial; t: testicle; vp: vesícula prostàtica.

Els atris femení i masculí estan en contacte (a la zona de convergència és on es troba el gonopori o porus genital) i és on té lloc la fecundació. Durant la còpula, el penis d'un dels individus s'insereix en el gonopori de l'altre individu. L'esperma rebut s'emmagatzema a la bossa copuladora, que és una estructura de forma generalment ovalada o irregular (Sluys, 1989b) fins al seu ús reproductiu o bé per usar-lo com aliment. Aquesta bossa es comunica amb l'atri a través del canal de la bossa, que és allargat i sol rebre una abundant secreció glandular. Hi ha diversos tipus de cèl·lules secretores que desemboquen en l'aparell copulador, responsables de diverses funcions, com la lubricació, l'adhesió, la formació d'una càpsula que contindrà els ous, el manteniment de la viabilitat dels espermatozoides, entre d'altres (Graff, 1899, Hyman, 1951). Un o més ous són fecundats i, junt amb algunes cèl·lules amb vitel·les, es tanquen en un petit capoll (cocoon). La formació del cocoon (Fig. II-5) es dona en tres estadis, segons Winsor (1998). En algunes espècies es troba una estructura anomenada **adenodàctil**, que té forma digital, i està associada a l'atri genital. Té funció poc clara, tot i que podria estar relacionada amb la formació de la coberta del capoll (Winsor, 1998), sembla una petita papil·la del penis i està format per especialitzacions musculars i glandulars. El capoll acabat s'expulsa pel gonopori juntament amb secrecions de la glàndula viscosa, que cimenta el capoll al substrat, quedant fixat directament a la cara inferior de pedres



B Estadi 1. Canal glandular femení.



o plantes. Aquests capolls inicialment tenen un color vermellós o marró, que s'enfosqueix a mida que passen les hores. Tenen un desenvolupament embrionari altament modificat amb la presència d'una faringe embrionària transitòria i després d'unes setmanes surten de 5 a 10 juvenils de cada càpsula.



Figura II-5. Esquerra: imatge d'una planària terrestre a punt d'extreure un cocoon. Imatge: F. Carbayo. Inferior: imatge d'un cocoon de *Microplana terrestris*. Imatge: E. Mateos.



ANNEX III

Taula III-1. Estat de la taxonomia dels Terricola abans de l'inici d'aquesta tesi.

Família	Subfamília	Gènere	Autor, any
Bipaliidae		<i>Bipalium</i>	Graff, 1896
		<i>Novibipalium</i>	Stimpson, 1857 Kawakatsu M, Ogren RE, Froehlich EM, 1998
Geoplanidae	Caenoplaninae		Stimpson, 1857
			Ogren RE, Kawakatsu M, 1991
		<i>Artioposthia</i>	Graff, 1896
		<i>Australopacifica</i>	Ogren&Kawakatsu, 1991
		<i>Australoplana</i>	Winsor, 1991
		<i>Caenoplana</i>	Moseley, 1877
		<i>Coleocephalus</i>	Fyfe, 1953
		<i>Endeavouria</i>	Ogren&Kawakatsu, 1991
		<i>Fletchamia</i>	Winsor, 1991
		<i>Kontikia</i>	Froehlich, 1955
		<i>Lenkunya</i>	Winsor, 1991
		<i>Newzealandia</i>	Ogren&Kawakatsu, 1991
		<i>Parakontikia</i>	Winsor, 1991
		<i>Pimea</i>	Winsor, 1991
		<i>Reomkago</i>	Winsor, 1991
		<i>Tasmanoplana</i>	Winsor, 1991
		<i>Timyama</i>	Froehlich, 1978
		<i>Coenoplana</i>	Moseley, 1857
	Geoplaninae		Stimpson, 1857
		<i>Amaga</i>	Ogren&Kawakatsu, 1990
		<i>Choeradoplana</i>	Graff, 1896
		<i>Enterosyringa</i>	Ogren&Kawakatsu, 1990
		<i>Geoplana</i>	Schul&Mull, 1857
		<i>Geobia</i>	Diesing, 1862
		<i>Gigantea</i>	Ogren&Kawakatsu, 1990
		<i>Gusana</i>	Froehlich, 1978
		<i>Issoca</i>	Froehlich, 1954
		<i>Liana</i>	Froehlich, 1978
		<i>Notogynaphallia</i>	Ogren&Kawakatsu, 1990
		<i>Pasipha</i>	Ogren&Kawakatsu, 1990
		<i>Polycladus</i>	Blanchard, 1845
		<i>Pseudogeoplana</i>	Ogren&Kawakatsu, 1990
		<i>Xerapoa</i>	Froehlich, 1954
	Pematoplaninae	<i>Beauchampius</i>	Ogren&Kawakatsu, 1991
		<i>Pematoplana</i>	Ogren&Kawakatsu, 1991
Rhynchodemidae	Microplaninae		Graff, 1896
			Graff, 1896
			Pantin, 1953
		<i>Amblyplana</i>	Graff, 1896
		<i>Artiocotylus</i>	Graff, 1896
		<i>Diporodemus</i>	Hyman, 1938
		<i>Geodesmus</i>	Metschnikoff, 1865
		<i>Geobenazzia</i>	Minelli, 1974
		<i>Incapora</i>	Marcus, 1953
		<i>Microplana</i>	Vejdovsky, 1890
	Rhynchodeminae	<i>Othelosoma</i>	Gray, 1869
		<i>Pseudarticotylus</i>	Ikeda, 1911
			Correa, 1947
		<i>Cotyloplana</i>	Spencer, 1892
		<i>Dolichoplana</i>	Moseley, 1877
		<i>Platydemus</i>	Graff, 1896
		<i>Rhynchodemus</i>	Leidy, 1851

Classificació actual dels Triclàdides. Basat en Sluys i col·laboradors (2009), amb algunes modificacions. Marcats de color verd hi ha els gèneres que s'han utilitzat, ja sigui en anàlisis específiques del grup o com a grups externs, en aquesta tesi:

Order **TRICLADIDA** Lang, 1884

Suborder **MARICOLA** Hallez, 1892

Superfamily CERCYROIDEA Böhmig, 1906

Family CENTROVARIOPLANIDAE Westblad, 1952

Genus *Centrovarioplana* Westblad, 1952

Family CERCYRIDAE Böhmig, 1906

Genus *Stummeria* Böhmig, 1908

Genus *Oregoniplana* Holmquist and Karling, 1972

Tribe Cercyrini Böhmig, 1906

Genus *Probursa* Hyman, 1944

Genus *Pacifides* Holmquist and Karling, 1972

Genus *Puiteca* Du Bois-Reymond Marcus, 1955

Genus *Cerbussowia* Wilhelmi, 1909

Genus *Sabussowia* Böhmig, 1906

Genus *Cercyra* Schmidt, 1861

Family MEIXNERIDIDAE Westblad, 1952

Genus *Meixnerides* Westblad, 1952

Genus *Jugatovaria* Sluys and Ball, 1989

Superfamily BDELLOUROIDEA Diesing, 1862

Family UTERIPORIDAE Böhmig, 1906

Subfamily UTERIPORINAE Böhmig, 1906

Genus *Foviella* Bock, 1925

Genus *Uteriporus* Bergendal, 1890

Genus *Nexilis* Holleman and Hand, 1962

Genus *Allogenus* Sluys, 1989

Genus *Dinizia* Marcus, 1947

Genus *Leucolesma* Marcus, 1948

Genus *Vatapa* Marcus, 1948

Genus *Micaplana* Kato, 1937

Subfamily ECTOPLANINAE Bresslau, 1933

Genus *Obrimoposthia* Sluys and Ball, 1989

Genus *Nesion* Hyman, 1956

Genus *Tryssosoma* Ball, 1977

Genus *Paucumara* Sluys, 1989

Genus *Ectoplana* Kaburaki, 1917

Genus *Ostenocula* Sluys, 1989

Genus *Procerodella* Sluys, 1989

Genus *Miropilana* Kato, 1931

Family BDELLOURIDAE Diesing, 1862

Subfamily BDELLOURINAE Diesing, 1862

Genus *Nerpa* Marcus, 1948

Genus *Pentacoelum* Westblad, 1935

Genus *Syncoelidium* Wheeler, 1894

Genus *Bdelloura* Leidy, 1851

Subfamily PALOMBIELLINAE Sluys, 1989

Genus *Palombiella* Westblad, 1951

Genus *Miava* Marcus, 1954

Genus *Oahuhawaiiiana* Kawakatsu and Mitchell, 1984

Genus *Synsiphonium* Hallez, 1911

Superfamily PROCERODOIDEA Diesing, 1862

Family PROCERODIDAE Diesing, 1862

Genus *Procerodes* Girard, 1850

Genera Incertae Sedis:

- Genus *Micropharynx* Jägerskiöld, 1896
 Genus *Tiddles* Marcus, 1963
- Suborder **CAVERNICOLA** Sluys, 1990
 Family DIMARCUSIDAE Mitchell and Kawakatsu, 1972
 Genus *Balliania* Gourbault, 1972
 Genus *Rhodax* Marcus, 1946
 Genus *Opisthobursa* Benazzi, 1972
 Genus *Mitchellia* Kawakatsu and Chapman, 1983
- Suborder **CONTINENTICOLA** Carranza, Littlewood, Clough, Ruiz-Trillo, Baguña and Riutort, 1998
 Superfamily PLANARIOIDEA Stimpson, 1857
 Family PLANARIIDAE Stimpson, 1857
 Genus *Planaria* Müller, 1776
 Genus *Polycelis* Ehrenberg, 1831
 Genus *Phagocata* Leidy, 1847
 Genus *Ijimia* Bergendal, 1890
 Genus *Seidlia* Zabusov, 1911
 Genus *Crenobia* Kenk, 1930
 Genus *Atrioplanaria* De Beauchamp, 1932
 Genus *Digonoporus* An der Lan, 1941
 Genus *Hymanella* Castle, 1941
 Genus *Plagnolia* De Beauchamp and Gourbault, 1964
 Genus *Bdellasimilis* Richardson, 1968
 Genus *Paraplanaria* Ball and Gourbault, 1978
- Family DENDROCOELIDAE Hallez, 1892
 Genus *Dendrocoelum* Örsted, 1844
 Genus *Bdellocephala* De Man, 1875
 Genus *Anocelis* Stimpson, 1857
 Genus *Procotyla* Leidy, 1857
 Genus *Sorocelis* Grube, 1872
 Genus *Rimacephalus* Zabusov, 1901
 Genus *Protocotylus* Korotnev, 1908
 Genus *Polycladodes* Steinmann, 1910
 Genus *Archicotylus* Korotnev, 1912
 Genus *Baikaloplana* Berg, 1925
 Genus *Miodendrocoelum* De Beauchamp, 1929
 Genus *Dendrocoelopsis* Kenk, 1930
 Genus *Baikalobia* Kenk, 1930
 Genus *Acromyadenium* De Beauchamp, 1931
 Genus *Caspioplana* Zabusova, 1951
 Genus *Armillia* Livanov, 1961
 Genus *Hyperbulbina* Livanov and Porfirjeva, 1962
 Genus *Papilloplana* Kenk, 1974
 Genus *Hyperpapillina* Porfirjeva, 1973
 Genus *Atria* Porfirjeva, 1970
 Genus *Baikalocotylus* Porfirjeva, 1977
 Genus *Alaoplana* Kenk, 1974
- Family KENKIIDAE Hyman, 1937
 Genus *Sphalloplana* De Beauchamp, 1931
 Genus *Kenkia* Hyman, 1937
- Superfamily GEOPLANOIDEA Stimpson, 1857
 Family DUGESIIDAE Ball, 1974
 Genus *Girardia* Ball, 1974
 Genus *Bopsula* Marcus, 1946
 Genus *Cura* Strand, 1942
 Genus *Weissius* Sluys, 2007
 Genus *Schmidtea* Ball, 1974
 Genus *Dugesia* Girard, 1850

- Genus *Neppia* Ball, 1974
- Genus *Romankenkius* Ball, 1974
- Genus *Eviella* Ball, 1977
- Genus *Spathula* Nurse, 1950
- Genus *Reynoldsonia* Ball, 1974
- Family GEOPLANIDAE Stimpson, 1857
 - Subfamily BIPALIINAE Von Graff, 1896
 - Genus *Bipalium* Stimpson, 1857
 - Genus *Diversibipalium* Kawakatsu, Ogren, Froehlich and Sasaki, 2002*
 - Genus *Humbertium* Ogren and Sluys, 2001
 - Genus *Novibipalium* Kawakatsu, Ogren and Froehlich, 1998
 - Subfamily MICROPLANINAE Pantin, 1953
 - Genus *Amblyplana* Von Graff, 1896
 - Genus *Diporodemus* Hyman, 1938
 - Genus *Geobenazzia* Minelli, 1974
 - Genus *Incapora* Du Bois-Reymond Marcus, 1953
 - Genus *Microplana* Vejdovsky, 1890
 - Genus *Othelosoma* Gray, 1869
 - Genus *Pseudoartiocotylus* Ikeda, 1911
 - Genus *Statomicroplana* Kawakatsu, Froehlich, Jones, Ogren and Sasaki, 2003*
 - Subfamily RHYNCHODEMINAE Von Graff, 1896
 - Tribe Rhynchodemini Von Graff, 1896
 - Genus *Anisorhynchodemus* Kawakatsu, Froehlich, Jones, Ogren and Sasaki, 2003*
 - Genus *Cotyloplana* Spencer, 1892
 - Genus *Digonopyla* Fischer, 1926
 - Genus *Dolichoplana* Moseley, 1877
 - Genus *Platydemus* Von Graff, 1896
 - Genus *Rhynchodemus* Leidy, 1851
 - Tribe Caenoplanini Ogren and Kawakatsu, 1991
 - Genus *Arthurdendyus* Jones and Gerard, 1999
 - Genus *Artioposthia* Von Graff, 1896
 - Genus *Australopacifica* Ogren and Kawakatsu, 1991*
 - Genus *Australopelana* Winsor, 1991
 - Genus *Caenopelana* Moseley, 1877
 - Genus *Coleocephalus* Fyfe, 1953
 - Genus *Endeavouria* Ogren and Kawakatsu, 1991
 - Genus *Fletchamia* Winsor, 1991
 - Genus *Kontikia* C. G. Froehlich, 1955
 - Genus *Lenkunya* Winsor, 1991
 - Genus *Newzealandia* Ogren and Kawakatsu, 1991
 - Genus *Parakontikia* Winsor, 1991
 - Genus *Pimea* Winsor, 1990
 - Genus *Reomkago* Winsor, 1991
 - Genus *Tasmanopelana* Winsor, 1991
 - Genus *Timyma* E. M. Froehlich, 1978
 - Tribe Anzoplanini Winsor, 2006
 - Genus *Anzoplanina* Winsor, 2006
 - Genus *Fyfea* Winsor, 2006
 - Tribe Eudoxiatoplanini Winsor, 2009
 - Genus *Eudoxiatoplanina* Winsor, 2009
 - Tribe Pelmatoplanini Ogren and Kawakatsu, 1991
 - Genus *Beauchampius* Ogren and Kawakatsu, 1991
 - Genus *Pelmatopelana* Von Graff, 1896

Subfamily GEOPLANINAE Stimpson, 1857

- Genus *Amaga* Ogren and Kawakatsu, 1990
- Genus *Cephaloflexa* Carbayo and Leal-Zanchet, 2003
- Genus *Choeradoplana* Von Graff, 1896
- Genus *Enterosyringia* Ogren and Kawakatsu, 1990
- Genus *Geobia* Diesing, 1861
- Genus *Geoplana* Stimpson, 1857
 - Subgenus *Barreirana* Ogren and Kawakatsu, 1990
 - Subgenus *Geoplana* Stimpson, 1857
- Genus *Gigantea* Ogren and Kawakatsu, 1990
- Genus *Gusana* E. M. Froehlich, 1978
- Genus *Issoca* C. G. Froehlich, 1978
- Genus *Liana* E. M. Froehlich, 1978
- Genus *Luteostriata*** Carbayo, 2010
- Genus *Notogynaphallia* Ogren and Kawakatsu, 1990
- Genus *Pasipha* Ogren and Kawakatsu, 1990
- Genus *Polycladus* Blanchard, 1845
- Genus *Pseudogeoplana* Ogren and Kawakatsu, 1990*
- Genus *Supramontana* Carbayo and Leal-Zanchet, 2003
- Genus *Xerapoa* C. G. Froehlich, 1955

*indica grup col·lectiu.

**indica que aquest gènere es va descriure posteriorment a la publicació d'Sluys i col. 2009.

ANNEX IV

CARACTERITZACIÓ MORFOLÒGICA DELS TÀXONS ESTUDIATS

1. *Cephaloflexa bergi* Graff 1899

El gènere *Cephaloflexa* Carbayo i Leal-Zanchet (2003) és format per geoplanínids de cos allargat, subcilíndric o subsemicircular; amb el terç anterior del cos progressivament aprimat, sense constriccions o expansions; sense solcs a la regió ventral. *Cephaloflexa bergi* va ser descrita al 1899 per Graff com *Geoplana bergi* i inclosa per Ogren i Kawakatsu al 1990 dins del gènere *Notogynaphallia*. Actualment és l'espècie tipus del gènere *Cephaloflexa*. Pot fer fins a 8 cm de longitud i té coloracions que van des del taronja o marró fins al verd fosc i en algunes ocasions presenta una ratlla fosca sagital amb el cap de color negre (Marcus, 1951). En repòs, el cos queda enrotllat en una espiral plana, amb l'extrem anterior embolicat cap al dors (Fig. IV-1). Quan repten, l'extrem anterior del cos queda enrotllat cap al dors i ventralment còncav. En estat d'alarma, o quan perd el contacte amb el substrat, *C. bergi* estén l'extrem cefàlic, de manera que pot explorar un espai relativament gran per a tornar a la seva posició habitual (Froehlich, CG, 1955). La sola ventral és ampla i els ulls i les fossetes sensorials es troben absents a l'àpex anterior. No tenen musculatura mesenquimàtica longitudinal, mentre que la musculatura mesenquimàtica subneural transversal només està a la regió cefàlica. Pel que fa a l'aparell reproductor, no tenen papil·la peniana i les parets de l'atri masculí es troben plegades. Els testicles tenen una posició única entre la capa supraintestinal i l'intestí. La vagina està dirigida dors-anteriorment, sense papil·les sensorials ni adenodàctils (Carbayo, 2003). *Cephaloflexa bergi* Graff 1899 s'ha citat a 11 localitats de Brasil (Carbayo i Froehlich, 2008)(Fig.IV-1).

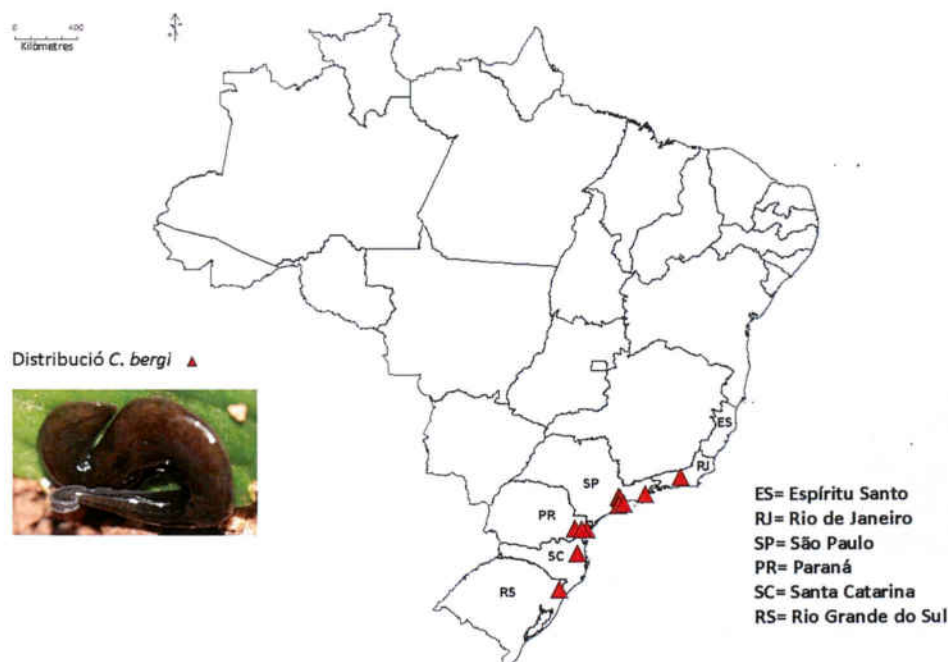


Figura IV-1. Mapa de la distribució de *C. bergi* al Bosc Atlàntic de Brasil basat en dades publicades (Carbayo i Leal-Zanchet, 2008) i resultats dels mostrejos d'aquesta tesi. Imatge: F. Carbayo.

2. *Geoplana goetschi* sensu Marcus (1951)

El gènere *Geoplana* Stimpson, 1857 el formen Geoplaninae de cos allargat, amb una sola ventral 1/3 més ampla que el cos. La musculatura subepidèrmica longitudinal està ben desenvolupada i la musculatura mesenquimàtica longitudinal no existeix o està poc desenvolupada. Referent al copulador, hi ha papil·la peniana i el canal femení desemboca dorsalment a l'atri. No tenen òrgans glandulars cefàlics, papil·les sensorials ni adenodàctils (Carbayo, 2003). Pel que fa a *Geoplana goetschi*, hi ha certa controvèrsia pel que fa a la seva classificació. *Geoplana goetschi* sensu Marcus (1951), que difereix significativament de *Geoplana goetschi* sensu Riester (1938). Riester va descriure l'espècie amb manca d'una papil·la peniana permanent, mentre que en una anàlisi posterior, Marcus i Froehlich van trobar que tots els individus tenien una papil·la peniana permanent (Leal-Zanchet i Carbayo, 2001). Segons Marcus, *Geoplana goetschi* comprèn animals de cos fins a uns 200 mm de longitud de cos pla i marges gairebé paral·lels al llarg de tot el cos. El dors és de color groguenc amb taques de color oliva fosc. La majoria dels animals tenen un parell de bandes laterals groguenques. La boca i el porus genital es troben en el quart quarter del cos. Gràcies a les peculiaritats histològiques del sistema muscular es pot reconèixer de forma inequívoca el material descrit per Marcus. Temporalment l'espècie *goetschi* s'ha assignat al gènere *Geoplana*, però característiques de l'aparell copulador indiquen que en un futur s'haurà de redescrivre l'espècie i segurament assignar-la a un gènere nou dins de Geoplaninae.



Figura IV-2. Mapa de la distribució de *Geoplana goetschi* sensu Marcus 1951 al Bosc Atlàntic brasiler, basat en dades dels mostrejos d'aquesta tesi, ja que les dades de Carbayo i Froehlich (2008) barregen les dues espècies (*Geoplana goetschi* Marcus i *Geoplana goetschi* Riester), de manera que no es poden distingir. Imatge: F. Carbayo

3. *Geoplana quagga* Marcus 1951

Es tracta d'organismes amb una franja dorsal mitjana de color blanc. Els ulls es disposen en sèries simples, concentrant-se més al davant que no pas al darrere.

Pel que fa al copulador, els conductes eferents es disposen dorsalment als ovovitel·loductes, dilatant-se a la zona post-faríngea, plens d'esperma. El conducte ejaculador comença sent curt, estret i amb musculatura pròpia, dilatant-se quan entra al bulb penià. Un anell muscular separa l'atri masculí del comú. L'atri femení és molt voluminós, de superfície esfèrica, revestit d'un epiteli sense cilis.

Aquesta espècie va ser una de les provades per l'estudi filogeogràfic del Bosc Atlàntic, però es va descartar per la seva poca variabilitat genètica. Aquesta baixa diversitat nucleotídica pot estar relacionada amb l'ecologia de l'espècie, ja que aquesta és generalista i és freqüent trobar-la en regions molt afectades per l'acció de l'home.

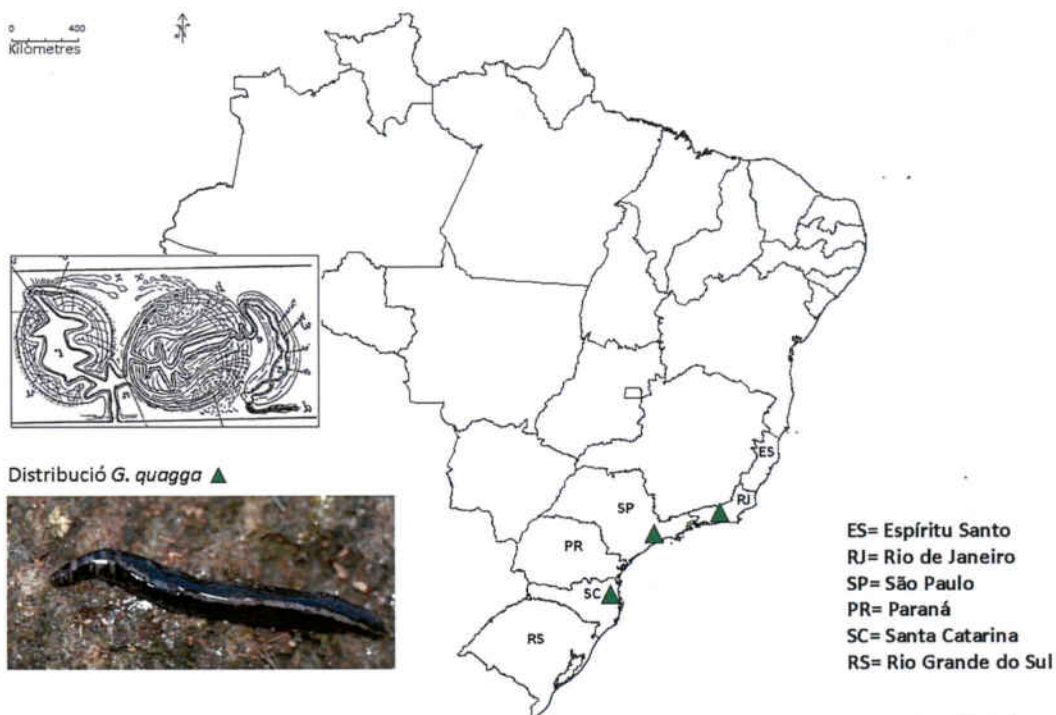
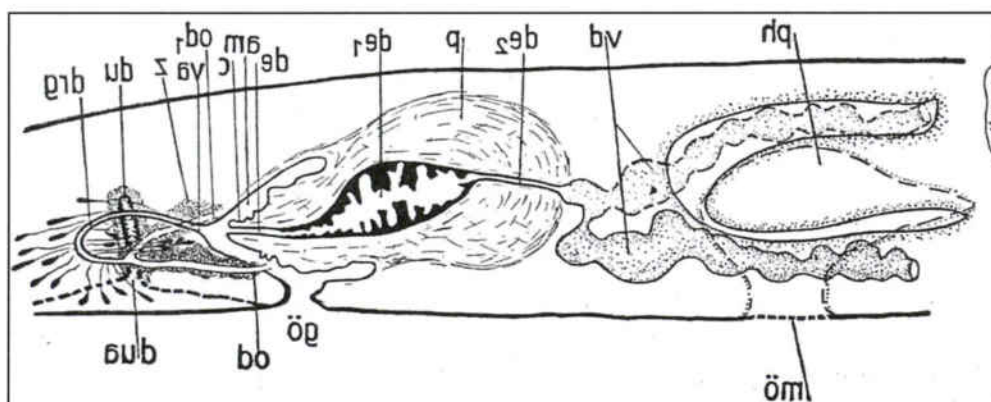


Figura IV-3. Mapa de la distribució de *Geoplana quagga* al Bosc Atlàntic de Brasil i detall del copulador segons Marcus, 1951. Imatge: F. Carbayo.

4. *Enterosyringa pseudorhynchodemus* Riester 1938

Aquesta espècie fou primerament descrita com a *Geoplana pseudorhynchodemus* per Riester (1938), i no va ser fins al 1990 quan Ogren i Kawakatsu van descriure el nou gènere *Enterosyringa*, al qual pertany aquesta espècie en l'actualitat. Es tracta de geoplanínids de cos linear i esvelt, amb una sola filera d'ulls marginals. La sola ventral ocupa un 50% de l'amplada ventral, amb musculatura cutània fina especialment sota del peu arrossegador. La musculatura cutània és més forta que la parenquimàtica. Un sol canal intestinal cutani s'obre a la cara ventral prop del copulador, amb testicles dorsals i papil·la penial ben desenvolupada. El canal femení entra horitzontalment i els conductes ovovitel·lins s'aproximen ventralment des de la part posterior. Ovaris posteriors, i més a prop de la base de la faringe que de l'extrem anterior. *E. pseudorhynchodemus* es caracteritza per presentar tots els caràcters generals del gènere, amb testicles en posició dorsal i el sistema nerviós en forma de dos cordons longitudinals, a diferència de la majoria de Geoplaninae. Aquesta espècie presenta la mateixa distribució que *G. quagga*. També va ser una de les candidates a l'estudi filogeogràfic, però la seva mida petita generava dificultats per trobar-la, i molts problemes a les extraccions de DNA, de manera que també es va descartar.



Enterosyringa pseudorhynchodemus (Riester, 1938)



Figura IV-4. Detall de l'aparell copulador de *Enterosyringa pseudorhynchodemus*, segons Riester, 1938 (superior). Imatge de l'espècie (inferior). Foto: F. Carbayo.

5. *Choeradoplana iheringi* Graff 1899

Els organismes pertanyents al gènere *Choeradoplana* (Graff, 1896) són geoplànids de cos allargat, sola ventral llarga, ocupant més d'un terç de la longitud del cos. Musculatura longitudinal cutània forta, presentant ventralment una porció interna del plexe nerviós cutani. Tenen una musculatura longitudinal parenquimàtica molt prima o absent. Els testicles són dorsals. L'extrem cefàlic té un òrgan musculo-glandular. Sense papil·les sensorials i aparell copulador sense adenodàctils (Froehlich, 1955). *Choeradoplana iheringi* (Graff, 1899) és l'espècie tipus del gènere, assignada per Froehlich al 1955. Presenta una musculatura subcutània formada per tres capes musculars subepitelials (circular, obliqua i longitudinal). El canal femení entra a l'atri genital dorsalment. Segons la redescrípció de Leal-Zanchet i de Souza (2003) el seu dors sol ser marró o color crema amb petites taques de color marró fosc o clar i els ulls marginals. L'extremitat anterior del cos està enrotllada dorsalment, tant si està reptant com si es troba en repòs (Fig. IV-5). Pel que fa a l'anatomia interna, la faringe és de tipus campalunifforme (potser com adaptació a alguna presa) i no tenen esòfag, de manera que la cavitat intestinal es comunica directament amb la llum de la faringe. La vesícula prostàtica o seminal té dues regions, una interna tubular i l'altra externa, de forma variable, molt ben comunicades amb l'atri masculí, que és ciliat. La vagina té forma de C, corbada dorso-anteriorment i és folrada per epiteli cilíndric pseudoestratificat. L'atri femení és allargat i ciliat. Donat que no tenen papil·la peniana (tret característic del gènere), la regió externa de la vesícula prostàtica es comunica directament amb la regió interna de l'atri masculí, sense la intervenció d'un conducte ejaculador. Com a peculiaritat, hi ha espermatozous associats a secrecions formant conglomeracions semblants a espermatòfors.

Pel que fa a la seva ecologia, aquesta espècie té preferència per hàbitats més alterats, de manera que pot ser un bon indicador biològic de les pertorbacions que pugui haver patit l'hàbitat en el qual es trobi (Carbayo i col. 2002). Es va provar per fer estudis filogeogràfics, però va resultar ser poc variable a nivell genètic.

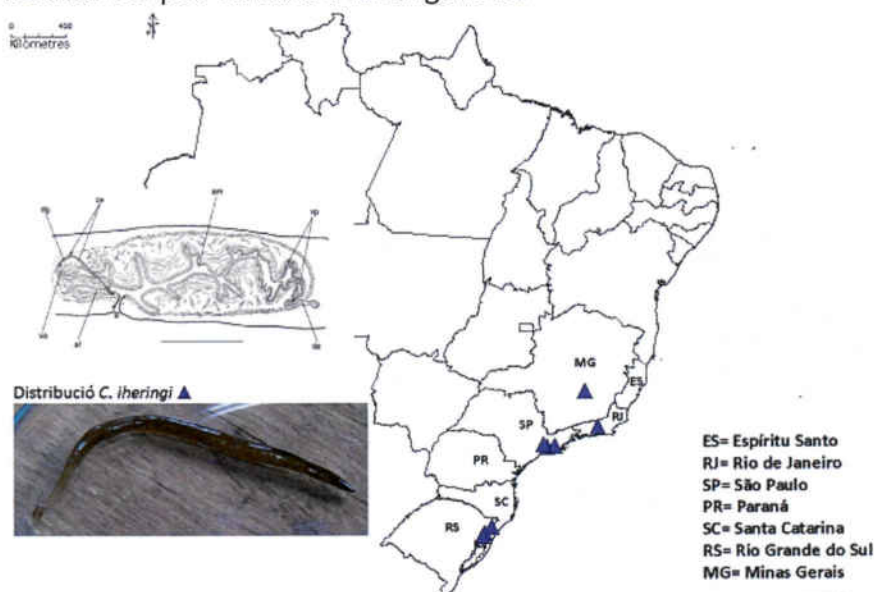


Figura IV-5. Mapa de la distribució de *Choeradoplana iheringi* amb detall del copulador segons Leal-Zanchet i Simone, 2003. Imatge: M. Álvarez-Presas.

6. *Issoca* sp. nov.

El gènere *Issoca* fou descrit per Froehlich al 1955 per a geoplànids de cos allargat i sola ventral allargada, ocupant més d'un terç de la longitud del cos. Igual que *Choeradoplana*, amb musculatura longitudinal cutània forta i la parenquimàtica molt fina o absent. També presenta els testicles dorsals i l'extremitat cefàlica amb un òrgan musculo-gladular, de superfície adhesiva. Sense papil·les sensorials i sense adenodàctils al copulador. Tampoc presenta papil·la peniana, en general, o és intra-atrial. En particular, l'espècie nova, que s'ha trobat només a dues localitats (Fig. IV-6), es caracteritza per ser gran (fins a 12 cm de longitud). Té el dors i el ventre de color blanc, amb el cap de color ataronjat, amb un parell de línies negres medials separades per una banda blanca mitjana groga sobre la qual hi ha una línia negra. Les regions laterals tenen taques arrodonides negres. La boca es troba en el cinquè anterior de la bossa faríngea, i la faringe és cilíndrica. L'aparell copulador té una vesícula prostàtica extrabulbar, piriforme, amb expansions laterals a la seva regió proximal. La papil·la peniana és tronc-cònica, disposada obliquament cap al ventre, menor que l'atri masculí. L'atri femení és ampli i sense plecs, en forma d'embut, tan llarg com el masculí i àmpliament comunicat amb aquest. La descripció morfològica d'aquesta espècie encara no ha estat publicada, i serà una de les feines futures d'aquesta tesi.

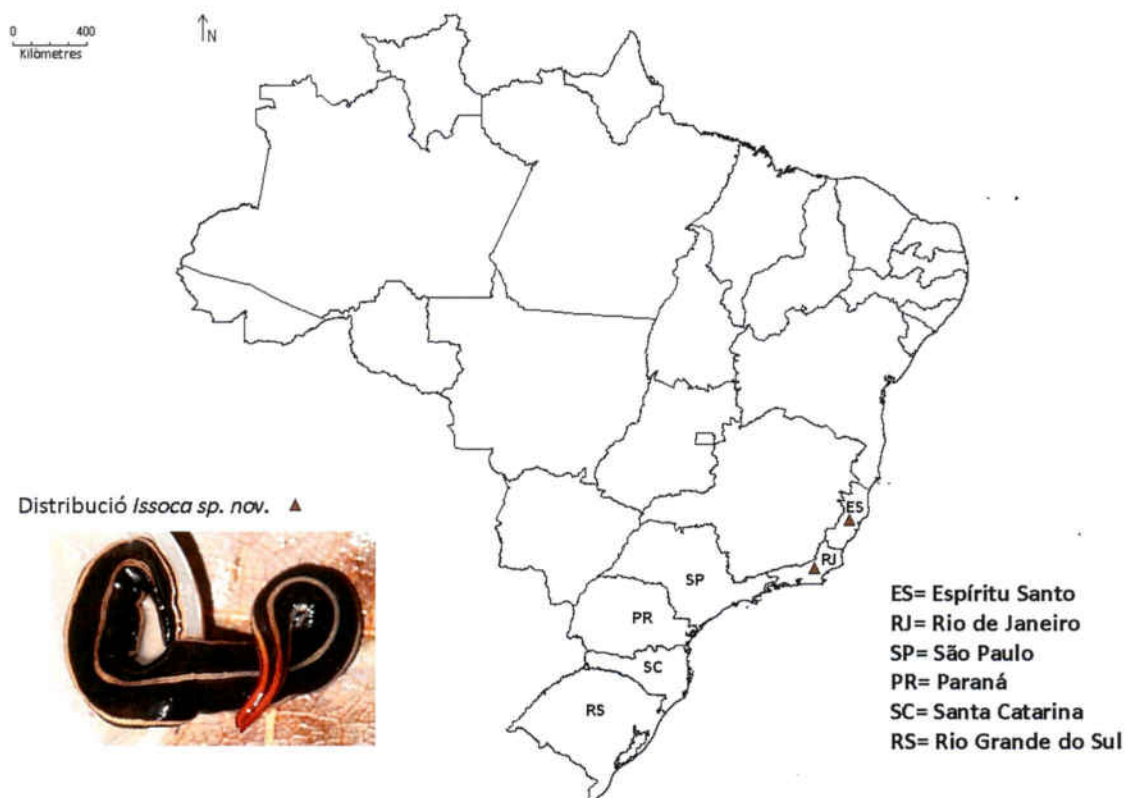


Figura IV-6. Mapa de distribució (on s'ha localitzat fins al moment, dins d'aquesta tesi) i imatge de la nova espècie del gènere *Issoca* cedida per F. Carbayo.

7. *Geoplana goetschi* sensu Riester (1938)

Segons una descripció de Froehlich (1956), són animals que per morfologia externa tenen el dors de color castany-ocre, amb una línia al mig fina, al marge una línia castany fosc (quasi negre) que per dins és groga. El ventre és de color crema i l'extrem anterior acostuma a ser més fosc. Pel que fa al copulador, no presenten papil·la peniana (tret que diferencia aquesta espècie de la descrita per Marcus al 1951 i de la que hem parlat anteriorment, *Geoplana goetschi* sensu Marcus (1951)), que és substituïda a l'atri masculí per un plec circular.

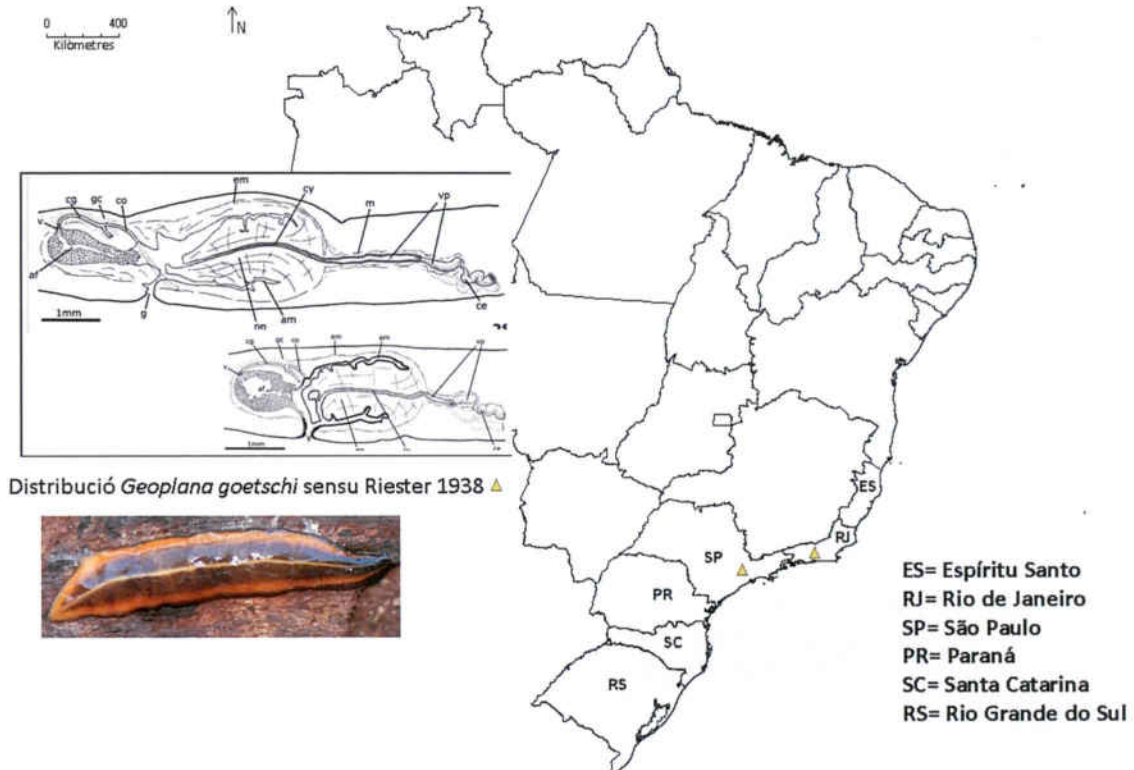


Figura IV-7. Mapa de la distribució de *Geoplana goetschi* sensu Riester 1938 segons les dades obtingudes en aquesta tesi. Detall de l'aparell copulador de segons Carbayo, 2003 i imatge cedida per F. Carbayo.

8. *Microplana terrestris* Müller 1774

Microplana terrestris va ser la primera planària terrestre descrita i és considerada la més abundant. Alguns dels caràcters del gènere *Microplana* (definit per Kawakatsu i col. al 2003) són: "Microplaninae amb el cos allargat i arrodonit, amb dos ulls petits, amb un penis ben desenvolupat a l'aparell copulador masculí, amb papil·la peniana i l'aparell femení amb un sol canal (vagina), desembocant a l'atri comú; sense adenodàctils, ventoses o tentacles". *Microplana terrestris* presenta aquests caràcters, i d'altres que el defineixen com espècie. Són organismes d'uns dos centímetres de longitud i 1 a 2 mm d'ample, amb el color del cos gris, marronós o negre però la sola ventral de color blanc. Amb el cos cilíndric, l'extrem anterior és arrodonit, amb dos ulls petits als laterals (Johns, 1998; Jones, 2005). L'anatomia interna és ben coneguda, com s'ha descrit anteriorment i es pot observar a la figura (Fig. IV-8). És possible que després dels resultats obtinguts en aquesta tesi, la distribució de *M. terrestris* canviï, ja que és possible que alguns dels registres que hi ha de l'espècie a Europa realment correspongui a alguna de les variants moleculars que s'han trobat, i que possiblement esdevindran noves espècies, molt semblants per morfologia externa a *M. terrestris* i fàcils de confondre.



Figura IV-8. Mapa de distribució de *Microplana terrestris* a Europa segons dades de www.faunaeur.org/distribution.php amb detall de l'anatomia interna de l'aparell copulador segons Ogren, 1984. Imatge: E. Mateos.