



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Filogenia molecular i taxonomia de planàries d'aigües dolces (Platihelminths, Turbellaris, Tricladides)

Marta Riutort i León



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

**FILOGENIA MOLECULAR I TAXONOMIA DE PLANARIES
D'AIGUES DOLCES (PLATHELMINTS, TURBEL·LARIS,
TRICLADIDES)**

Memòria presentada per optar al grau
de Doctor en Biologia per la
Universitat de Barcelona per



Marta Riutort i León.

Vist i plau
El Director de la Tesi

Dr. Jaume Baguñà i Monjo
Catedràtic del Departament de Genètica
de la Facultat de Biologia de
la Universitat de Barcelona.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700184518

Barcelona, Maig de 1991

AGRAIMENTS

Voldria expressar el meu agraïment al Dr. Jaume Baguñà director d'aquesta tesi, per la seva confiança, i pel seu ajud en la realització d'aquest treball.

Vull expressar el meu reconeixement al Departament de Genètica per les facilitats materials que han estat imprescindibles pel meu treball.

També vui agrair a la Dra. K. Field, al Dr. R. Raff i a tots els companys de laboratori tant de l'IU (Indiana University) com de l'OSU (Oregon State University), les facilitats donades per a la realització de part d'aquest treball, i alhora el companyerisme i l'amistat que em van oferir en les meves estades.

Al Dr. J.A. Tapies Director Tècnic Sanitari del Servei de Veterinària de l'Escorxador Municipal de Barcelona, i a totes les Institucions que han permès o facilitat la realització d'aquest treball, gràcies.

A tots els companys i amics del grup de "EPI", tant els nou vinguts com aquells que ja fa anys que ens coneixem, i sense oblidar els que han marxat, a tots ells moltes gràcies. També el meu agraïment a tots els demés companys del departament, amb els que, una mica apretadets, compartim espai, temps, eufòries i depres.

Als meus amics, especialment a la Bego, el Frede i l'Elvira que en més d'una ocasió no han dubtat de ficar-se de peus al riu a la recerca del "material bàsic" per aquest treball.

Vui expressar el recolçament que en tot moment he rebut de la meva família, a tots els membres de la qual estic molt agraïda. I finalment, un agraïment molt especial a l'Enric, a ell i a la meva mare dedico el present treball.

Index

INTRODUCCIO

1. TAXONOMIA, SISTEMÀTICA I FILOGENIA.	2
2. INTRODUCCIO A LA TAXONOMIA FILOGENÈTICA.	2
2.1 TAXONOMIA EVOLUTIVA	3
2.2 TAXONOMIA CLADISTA	3
2.3 TAXONOMIA NUMÈRICA	4
3. COM FER UNA FILOGENIA?	4
3.1 EL TIPUS DE CARACTERS.	4
3.1.1 Caràcters morfològics	5
3.1.2 Caràcters cariològics.	5
3.1.3 Caràcters biogeogràfics.	6
3.1.4 Proteïnes.	6
3.1.5 Àcids nucleics.	8
3.2 EL TRACTAMENT DE LES DADES.	9
3.2.1 Mètodes basats en matrius de distàncies	9
3.2.1.1 Clustering	10
3.2.1.2 Mètodes additius	10
3.2.2 Mètodes basats en dades discretes	11
3.2.2.1 Màxima parsimonia.	11
3.2.2.2 Compatibilitat.	12
4. FILUM PLATHELMINTHES	14
4.1 ORDRE SERIATA (BRESSLAU 1928-33)	16
4.1.1 Subordre Tricladida	16
5. ESTUDIS TAXONÒMICS I FILOGENÈTICS DELS PALUDICOLES A LA CONCA MEDITERRÀNEA	19
5.1 FAMÍLIA DUGESIIDAE (BALL, 1974)	19
5.1.1 subgènere <i>Dugesia</i> (Girard, 1850)	21
5.1.2 Subgènere <i>Girardia</i> (Ball 1974)	23
5.1.3 Subgènere <i>Schmidtea</i> (Ball 1974)	25
5.2 FAMÍLIA PLANARIIDAE	26
5.2.1 Gènere <i>Polycelis</i> (Ehrenberg 1831)	27
5.2.2 Gènere <i>Crenobia</i> (Kenk 1930)	28
5.3 FAMÍLIA DENDROCOELIDAE (HALLEZ 1894)	28
5.3.1 Gènere <i>Dendrocoelum</i> (Oersted 1844)	29

OBJECTIUS	30
------------------	-----------

MATERIAL I MÈTODES

1. ESPÈCIES I POBLACIONS ESTUDIADAES	34
2. ISOELECTROENFOCAMENT DE PROTEÏNES TOTALES	35

2.1. PREPARACIO DE LA MOSTRA.	35
2.2. ISOELECTROENFOCAMENT	35
2.3. TINCIO, SECAT I DENSITOMETRIA.	35
2.4. ANALISI DE LES DADES.	35
3. ELECTROFORESI PER A LA DETECCIO D'ENZIMS	37
3.1. LOCI ENZIMATICS ESTUDIATS.	37
3.2. PREPARACIO DE LA MOSTRA.	37
3.3. ELECTROFORESI.	38
3.4. REVELAT ENZIMATIC.	38
3.5. ANALISI DELS RESULTATS.	39
4. SEQUENCIACIO DEL RNA RIBOSOMIC 18 S	39
4.1. PRINCIPI DEL METODE	39
4.2. EXTRACCIO DE RNA TOTAL.	40
4.3. REACCIONS DE TRANSCRIPCIO INVERSA.	40
4.4. ELECTROFORESI	41
4.5. ALINEACIO DE LES SEQÜENCIES.	41
4.6. QUANTIFICACIO DE LA SIMILITUD ENTRE SEQÜENCIES.	41
5. ARBRES FILOGENETICS	42
5.1. ARBRES BASATS EN UNA MATRIU DE DISTANCIES	42
5.1.1. Mètode UPGMA.	42
5.1.2. Mètode dels mínims quadrats.	43
5.2. ARBRES BASATS EN DADES DISCRETES	44
5.2.1. Mètode de Màxima Parsimonia.	44
5.2.2. "Bootstrap".	45
RESULTATS	
1. ISOELECTROENFOCAMENT	47
2. ANALISI ENZIMATICA	50
3. SEQÜENCIES DE rRNA 18S	55
4. FAMILIA DUGESIIDAE	72
4.1. GÈNERE <i>DUGESIA</i>	72
4.1.1. Subgènere <i>Girardia</i>	72
4.1.2. Subgènere <i>Dugesia</i>	74
4.1.2.1 Comparació espècies grup " <i>gonocephala</i> ".	74
4.1.2.2 Biotips de <i>Dugesia</i> (<i>D</i>) <i>iberica</i>	79
4.1.3. Subgènere <i>Schmidtea</i>	81
4.1.4. Relacions entre els tres subgèneres	85
4.1.4.1 Dades enzimàtiques	85
4.1.4.2. Dades del rRNA 18S	88

5. FAMILIA PLANARIIDAE	90
5.1. GENERES <i>CRENOBIA</i> i <i>POLYCELIS</i>	90
6. FAMILIA DENDROCOELIDAE	91
6.1. GÈNERE <i>DENDROCOELUM</i>	91
7. RELACIONS ENTRE LES TRES FAMÍLIES	92
7.1.1.1 Dades enzimàtiques	92
7.1.1.2 Dades del rRNA 18S	94
8. RELACIONS DELS TURBELLARIS AMB ALTRES PLATIHELMINTS I METAZOOS	95
DISCUSSIO	
1. FAMLIA DUGESIIDAE	98
1.1. GÈNERE <i>DUGESIA</i>	98
1.1.1. Subgènere <i>Girardia</i>	98
1.1.2. Subgènere <i>Dugesia</i>	99
1.1.3. Subgènere <i>Schmidtea</i>	102
1.2. RELACIO ENTRE SUBGÈNERES	106
2. FAMILIA PLANARIIDAE	107
3. FAMILIA DENDROCOELIDAE	107
4. COMPARACIO ENTRE FAMÍLIES	107
5. COMPARACIO AMB ALTRES PLATIHELMINTS I METAZOOS	108
6. CONSIDERACIONS TAXONOMIQUES	109
7. CONSIDERACIONS EVOLUTIVES	110
7.1. LA MANCA DE POLIMORFISME	110
7.2. LA DIFERENCIACIO MOLECULAR	112
8. PROTEINES I ÀCIDS NUCLEICS COM A CARACTERS TAXONÒMICS I FILOGENÈTICS EN LES PLANÀRIES D'AIGÜES DOLCES	113
8.1. PROTEINES	113
8.2. SEQÜÈNCIES DE rRNA 18S	115
9. CONSIDERACIONS METODOLÒGIQUES	116
10. CONSIDERACIÓ FINAL	117
CONCLUSIONS	119
BIBLIOGRAFIA	122

Introducció

1. TAXONOMIA, SISTEMÀTICA I FILOGENIA.

El concepte de filogènia està relacionat amb els conceptes de sistemàtica, taxonomia i classificació pel que sovint s'han confós entre ells. Cal doncs definir breument cada un dels quatre conceptes.

Sistemàtica: Llatinització de la paraula grega *systema*.

Fou aplicada pels primers naturalistes (Linné, *Systema Naturae*, 1a ed. 1735) per a referir-se a la classificació dels organismes. La sistemàtica és l'estudi científic de les classes i la diversitat dels organismes i de les relacions entre ells. El mot relació aquí fa referència a tot tipus de relacions biològiques (Simpson, 1961).

Taxonomia: Deriva de la paraula grega *taxis*, ordenació, i *nomos*, llei.

La paraula va ésser proposada per DeCandolle (1813) per a la teoria de classificació de les plantes. La definim com la teoria i pràctica de classificar els organismes.

De fet aquests dos termes són utilitzats de forma equivalent en moltes ocasions, fent referència al fet de dur a terme una classificació dels éssers vius.

Classificació: El resultat de qualsevol d'aquests dos processos.

Filogènia: Del greg *phylum*, raça o tribu.

Estudi de les relacions evolutives entre els organismes actuals i també els extingits coneguts. Indaga quins organismes comparteixen un ancestre comú més recent. L'ordenació dels organismes en grups i taxons segons les seves filogènies s'el coneix per Sistemàtica o Taxonomia filogenètica. Així en la taxonomia filogenètica podem distingir 2 processos diferents: 1) el de deducció de les relacions filogenètiques entre els organismes, i 2) el consistent en agrupar els organismes en taxons atenent a la filogènia trobada i assignar un rang a aquests taxons.

2. INTRODUCCIO A LA TAXONOMIA FILOGENETICA.

La justificació per a la realització d'una taxonomia filogenètica és senzilla: qualsevol classificació ha d'intentar ésser natural i objectiva; l'evolució ha produït els grups naturals de la vida; per tant la classificació ha de representar l'evolució (Ridley, 1986).

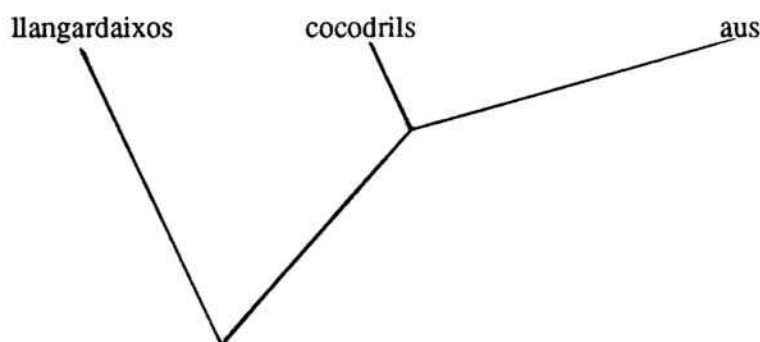
Amb aquesta premisa van sorgir dues escoles de taxonomia filogenètica, a més d'una tercera que, amb la premisa de l'objectivitat, va renunciar a la filogènia com a eina classificadora:

1. Taxonomia evolutiva.
2. Taxonomia cladista.
3. Taxonomia numèrica.

2.1 TAXONOMIA EVOLUTIVA

Són representants d'aquesta escola Mayr, Linsley i Usinger (1953) i Simpson (1961) entre d'altres. Es l'escola taxonòmica clàssica i considera que la classificació s'ha de basar en la filogènia dels organismes. Per esbrinar la filogènia es basen en la comparació d'un nombre limitat de caràcters. Per a fer la selecció d'aquests caràcters distingeixen aquells que són homòlegs dels que són anàlegs (que no inclouran), a més atribueixen un pes a cadascun dels caràcters seleccionats en funció del seu major o menor valor per donar-nos pistes de les relacions filogenètiques dels organismes en estudi. Tots aquests processos són duts a terme d'una forma molt intuitiva o subjectiva.

Quan han de plasmar la filogènia en una classificació tenen en compte els dos tipus de processos de l'evolució: la cladogènesi i l'anagènesi. La primera ens determina els embrancaments succesius (especiacions) i la segona els canvis produïts entre dues cladogènesis consecutives, els processos de l'anagènesi són els que donen lloc a la diferenciació fenotípica. Quan aquests dos tipus de processos entren en conflicte prefereixen donar més importància a l'anagènesi. Per ex. en el cas dels llargardaixos, els cocodrils i les aus tot i saber que cocodrils i aus comparteixen filogenèticament un ancestre comú més recent:



l'escola taxonòmica evolutiva preferirà agrupar els cocodrils amb els llargardaixos i fer un grup apart (de categoria taxonòmica superior) per a les aus donat que han sofert un procés anagènic més accentuat.

2.2 TAXONOMIA CLADISTA

El representant principal d'aquesta escola és Hennig (1966). A l'igual que l'escola anterior, basa la classificació en la filogènia dels organismes. Presenta, però, dues diferències bàsiques. Pel que fa a la forma d'esbrinar la filogènia Hennig va intentar evitar la subjectivitat de l'escola anterior desenvolupant una metodologia més científica (objectiva). Aquesta substitueix el pesat subjectiu dels caràcters per una anàlisi detallada de cadascun d'ells en que s'intenta distingir l'estat o estats derivats (apomòrfics) de l'ancestral (plesiomòrfic) de manera que permeti definir grups en funció de la compartició de l'estat derivat per a un o més caràcters.

L'altre diferència afecta a la forma de plasmar la filogènia en una classificació. Aquesta escola fa la taxonomia basant-se exclusivament en els fenòmens cladogènics, de tal manera que,

en el cas exposat anteriorment, les aus i els cocodrils haurien de compartir un taxó que tindria com a taxó germà els llangardaixos.

2.3 TAXONOMIA NUMERICA

Aquesta escola té com a representants Michener i Sokal (1957) i Sokal i Sneath (1963) entre d'altres. Neix com a una reacció front a la subjectivitat de la sistemàtica clàssica. Pretén convertir la pràctica tradicional intuitiva d'aquesta en una ciència objectiva, amb aquesta finalitat basen la seva classificació en la comparació d'un gran nombre de caràcters, sense fer cap tipus de distinció entre ells ni intentar deduir cap direccionalitat evolutiva per als seus estats.

Aquesta escola renuncia a la filogènia com a eina taxonòmica en funció de conseguir una major objectivitat en la classificació, ja que consideren que la filogènia real no es podrà arribar a conèixer mai. Per això les seves no són taxonomies filogenètiques sino fenètiques (basades en la similitud fenotípica). Tanmateix és important esmentar-les aquí donat que els seus mètodes poden, sota determinades condicions que exposaré més endavant, ésser utilitzats per a la determinació de filogènies.

3. COM FER UNA FILOGENIA?

Les metodologies per a elaborar una filogènia consideren dues parts:

- 1) Els tipus de caràcters en que es basarà;
- 2) El tractament de les dades extretes dels caràcters per deduir la filogènia.

3.1 EL TIPUS DE CARACTERS.

El tipus de caràcters emprats en la construcció de filogènies es poden classificar en:

- a. morfològics.
- b. cariològics
- c. biogeogràfics.
- d. proteïnes.
- e. àcids nucleics.

Probablement, cap d'aquests caràcters pot, per si sol, resoldre la problemàtica de la filogènia, i cal la conjugació de tots o part d'ells per poder arribar a tenir una idea el més clara possible de la història dels organismes vivents.

3.1.1 Caràcters morfològics

Aquests inclouen la morfologia externa, anatomies internes o d'estructures especials i l'embriologia.

Tradicionalment, han estat els més utilitzats en la reconstrucció filogenètica i la classificació dels organismes. El fet que la morfologia general sigui un reflex d'una gran part del genotip i, per tant, permeti globalment unes conclusions fiables de relacions filètiques (Mayr, 1969) justifica aquesta utilització. Malgrat ésser de gran utilitat, els caràcters morfològics presenten deficiències com a caràcters filogenètics per diverses raons:

- 1) La morfologia reflecteix sols una part del genoma i pot no reflectir les relacions genètiques de forma acurada;
- 2) La morfologia externa és de vegades enganyosa degut a adaptacions especials, o a la influència ambiental que pot donar lloc a variabilitats no genètiques;
- 3) Els caràcters convergents i el fenòmen del paral·lelisme són difícils de destriar;
- 4) La morfologia de certs grups no subministra suficients caràcters;

Per aquests motius no té res d'estrany que en les classificacions actuals hi hagin incongruències i grups molt mal definits i de difícil ubicació, el que ha dut a buscar altres tipus de caràcters.

En el cas de les planàries els principals caràcters morfològics utilitzats són la morfologia externa (forma, nombre i posició dels ulls, coloració) i la de l'aparell copulador (molt complex). La simplicitat de la primera i la falta del segon en bon nombre de poblacions (fissípares) els ha fet sovint insuficients per a una anàlisi correcta de les relacions filogenètiques d'aquests organismes.

3.1.2 Caràcters cariològics.

La cariólogia estudia el nombre i la morfologia dels cromosomes de cada espècie, la presència de reordenacions, etc.. Els caràcters cariològics dels organismes són propis de l'espècie a la que pertanyen, i en permeten una diagnosi inequívoca. A més, els patrons cromosòmics són d'extrema importància per a establir línies filogenètiques. La major part dels canvis cromosòmics són esdeveniments únics; són pertant característics per a tots els descendents de la població ancestral en la que el nou patró va apareixer (Mayr, 1969). Aquesta característica, sumada al desenvolupament de les tècniques de bandeig G, que permeten reconèixer inequívocament braços o inclús troços de cromosomes d'una espècie a un altre, ha permès la realització d'estudis filogenètics força interessants i reeixits (O'Brien *et al.*, 1985).

En les planàries s'ha realitzat un gran nombre d'estudis cariològics (veure apartat Plathelminthes per referències), però la impossibilitat d'aplicar les tècniques de bandeig (per ara sols aplicables a animals de sang calenta, Cuny *et al.*, 1981; Thiery *et al.*, 1976), ha impedit un perfecte reconeixament dels cromosomes, en molts casos molt nombrosos i de mida similar, i

per tant també de les diverses anomalies cromosòmiques que ajudarien a establir correctament les relacions filogenètiques.

3.1.3 Caràcters biogeogràfics.

El valor filogenètic de la distribució geogràfica es deu a l'evolució i la morfologia: com que totes les espècies d'un taxó són descendents d'un ancestre comú, cada colonització a través d'una barrera serà duta a terme per una espècie fundadora. Per tant, hi ha una probabilitat molt elevada de que espècies relacionades filogenèticament que es trobin en àrees contigües siguin descendents d'un ancestre comú. Per altre banda, serà estrany que es doni un altra espècie d'aquest grup (taxó) en un lloc disjunt molt distant (Mayr, 1969). En varies ocasions les dificultats per explicar la distribució de determinats organismes ha acabat revelant l'origen independent de grups que originalment s'havien situat en un mateix taxó (rosegadors S. Amèrica i Àfrica, Wood, 1950). Inversament, la certesa en el parentiu filogenètic (no convergent) entre grups d'organismes geogràficament molt distants ha servit per suggerir l'existència de connexions geogràfiques entre regions o àrees avui en dia molt distants.

A les planàries d'aigües dolces, i donada la seva limitada capacitat de migració, aquest tipus d'estudis poden ésser d'interès, tant per esbrinar relacions de proximitat entre espècies o poblacions de planàries, com per, inversament, recolzar teories paleogeogràfiques de desplaçaments de plaques, etc. (Baguña, 1973; Baguña *et al.*, 1981; DeVries *et al.*, 1984). Aquesta suposada manca de migració pròpia pot veure's contrarrestada per dades que indiquen l'existència de migració pasiva deguda a l'activitat de l'home (exportació-importació de plantes aquàtiques, etc.) en no poques espècies.

3.1.4 Proteïnes.

Com a caràcters filogenètics les proteïnes poden estudiar-se per mètodes indirectes com són les tècniques immunològiques o l'electroforesi o directes com és la seqüenciació. Les proteïnes permeten una aproximació indirecta als canvis que s'han produït a nivell genòmic (que és a on actua en primer terme la mutació). Respecte als caràcters morfològics tenen l'avantatge de ser una expressió molt directa del genoma, no estant influïts per l'ambient, ni patint canvis al llarg de la vida dels organismes (exceptuant-ne variacions en l'expressió).

Les tècniques immunològiques van ésser les primeres en aplicar-se amb finalitats filogenètiques (Nuttall, 1901; Bateson, 1913) fins i tot molt abans d'entendre's la seva base molecular. En general, són poc acurades, ja que donen una estimació molt indirecta de les diferències entre proteïnes de les diferents espècies (sempre en forma d'una matriu de distàncies).

L'electroforesi de proteïnes, en canvi, és una de les més utilitzades. Aquesta es basa en la diferent mobilitat que presenten les proteïnes, amb petits canvis en la seva composició d'aminoàcids, quan són sotmeses a un camp elèctric. El caràcter que s'examina és la mobilitat en un determinat conjunt de condicions electroforètiques i aquest pot presentar dos estats: igual o diferent.

hi ha una gran diversitat de tècniques electroforètiques. Aquestes varien quant als tipus de matrius utilitzades (acrilamida, midó, agarosa, ...), al criteri de separació de les proteïnes (pes molecular, punt isoelèctric) i a la tècnica de detecció de proteïnes (totals, glicoproteïnes, enzims concrets, etc.).

La detecció d'enzims ha estat molt utilitzada en taxonomia ja que permet la caracterització de bandes proteiques diagnòstiques per a espècies o races (Ayala, 1983). A més de ser de gran utilitat en estudis de variabilitat intrapoblacional (Ayala, 1983) o bé en estudis filogenètics de rang superior (espècies congenèriques i subgèneres o inclús gèneres) (Aquadro i Avise, 1982; Ferguson i Fleming, 1983). Per a aquesta última finalitat, però, Lewontin (1974) i Selander (1976) van estimar que almenys caldria analitzar 100 loci electroforèticament per a obtenir una estima precisa. Això requeriria un gran nombre d'electroforesis per activitats enzimàtiques o bé alguna tècnica electroforètica que permetés la separació simultànies d'aquest gran nombre de productes gènics.

Les electroforesis convencionals per pes molecular o per punt isoelèctric amb tinció de proteïnes totals podrien ésser una solució. Les segones, tot i permetent un enfocament en bandes molt fines de major resolució, no superen els 50-70 productes gènics per gel. El desenvolupament de la tècnica d'electroforesi bi-dimensional (O'Farrell, 1975), que separa les proteïnes en una primera dimensió per punt isoelèctric i en una segona per pes molecular, sí que permet separar un nombre elevat de proteïnes (de centenars a milers, Garrels, 1979) incloent no tan sols enzims sino també altres tipus (ribosòmiques, reguladores, estructurals, ...). Aquesta tècnica però, presenta els inconvenients de la dificultat en determinar les homologies de les taques proteiques en les "constelacions" bi dimensionals que en resulten. A més, les comparacions fetes per Aquadro i Avise (1981) entre aquest tipus d'electroforesis i les unidimensionals demostren que les primeres no resulten en millors dades en proporció amb la major complexitat metodològica.

La seqüenciació de proteïnes com a eina filogenètica va ésser utilitzada per primera vegada per Fitch i Margoliash (1967) comparant les seqüències del citocrom c de varies espècies. Aquesta tècnica dona informació acurada sobre on i quins són els canvis que s'han produït en la proteïna. Els caràcters són en aquest cas cadascuna de les posicions, i els estats els 20 possibles aminoàcids que poden ocupar-les. En una sola molècula estarem doncs comparant un gran nombre de caràcters.

El desenvolupament de tècniques que permeten la seqüenciació directa dels gens responsables de la codificació de les proteïnes està fent pràcticament obsoleta aquesta tècnica, ja que la seqüenciació d'àcids nucleics a més d'ésser igual de ràpida, dona molta més informació (canvis silenciosos, localització d'introns, ...).

Tot aquest conjunt de tècniques electroforètiques i la seqüenciació no han estat aplicades a l'anàlisi filogenètica de les planàries d'aigües dolces, ni tampoc als triclads o als turbel·laris, exceptuant els casos puntuals de: Nixon i Taylor (1977) a varies poblacions de *Polycelis coronata* per isoelectroenfocament; Teshirogi i Ishida (1981) comparant diverses espècies del gènere *Polycelis* del Japó per electroforèsis de proteïnes totals; i Biersma i Wijsman (1981) estudiant activitats enzimàtiques a *Polycelis nigra* i *Polycelis tenuis*.

3.1.5 Àcids nucleics.

Incloem aquí l'estudi i comparació dels àcids nucleics (DNA i RNA), ja sigui per enzims de restricció, hibridació DNA-DNA o seqüenciació de gens concrets.

El descobriment als anys 50 de l'estructura molecular del material genètic (Watson i Crick, 1953), va subministrar una font molt important de nous caràcters filogenètics. Si considerem que els canvis evolutius es donen primerament a nivell de seqüència de nucleòtids, la comparació d'aquestes han de revelar de forma directe l'història dels organismes que en són portadors.

L'anàlisi per restricció dels àcids nucleics s'ha utilitzat com a caràcter filogenètic a diversos grups d'organismes. Es basa en la comparació de les variacions en les longituds dels fragments de restricció (conseqüència del guany o pèrdua de dianes de restricció). Les molècules més freqüentment escollides per a aquest tipus de comparació són el DNA mitocondrial (Ward *et al.*, 1989; Dowling i Brown, 1989) o el cloroplàstic (Palmer, 1987; Palmer *et al.*, 1988) i també el ITS ("Internal Transcribed Spacers") del rDNA (McLain i Collins, 1989). Totes elles presenten gran variabilitat, característica necessària per a aquest tipus d'anàlisi, ja que sols ens informa d'una part dels canvis que s'han produït, aquells que hagin afectat a les dianes de restricció. En cap cas però sabem si la pèrdua d'una d'aquestes dianes s'ha degut a un o més canvis.

La hibridació DNA-DNA tampoc representa una anàlisi directa de la composició nucleotídica del DNA sino que ens dona una idea del percentatge de posicions que presenten un nucleòtid diferent entre dues espècies pel seu DNA de còpia única. S'ha utilitzat per investigar les relacions filogenètiques entre virus, bacteris, plantes i animals (Benveniste i Todaro, 1976; Sibley i Ahlquist, 1981; 1983; Benveniste, 1985; O'Brien *et al.*, 1985; Caccone i Powell, 1989). Les tècniques emprades són però cares i llargues de realitzar degut a la necessitat de marcar radiactivament el DNA d'una de les espècies (Ferguson, 1980). Es necessari, a més, realitzar comparacions recíproques que no sempre donen resultats coincidents i és impossible realitzar comparacions entre espècies que difereixin en més d'un 20 % de les seves seqüències, ja que aquestes són incapaces de formar duplex (Ferguson, 1980).

La seqüenciació de gens concrets dona una informació més detallada dels canvis i les posicions a on s'han produït. Com a la seqüenciació de proteïnes, els caràcters són les posicions al llarg de la molècula i els estats cadascun dels 4 nucleòtids. La possibilitat d'escollir entre molècules de divers grau de conservació permet un ampli ventall de comparacions filogenètiques a diferents rangs taxonòmics. Perquè les comparacions entre seqüències siguin correctes cal assegurar-se de l'homologia de les posicions comparades (alineació de les seqüències). D'ací que en alguns casos cal recórrer a l'estructura dels productes gènics (les proteïnes o el RNA de transferència o ribosòmic) per assessorar aquesta alineació.

D'entre els molts gens a seqüenciar, el RNA ribosòmic presenta una sèrie d'avantatges. D'una banda tècniques: la possibilitat de seqüenciar directament a partir de RNA total de l'organisme, sense caldre aïllar o clonar el gen (Lane *et al.*, 1985; Lane *et al.*, 1988) gràcies a la presència d'unes zones molt conservades que permeten el disseny d'encebadors universals que faciliten la seva localització i seqüenciació. Per altra banda, com a caràcter filogenètic: es tracta d'una molècula present a tota l'escala evolutiva, sempre amb la mateixa funció, pel que és fàcil

establir l'homologia d'un organisme a un altre. De les 3 molècules de rRNA: 5S, 18S i 28S les tres han estat utilitzades com a caràcters filogenètics. La 5S va ésser la primera (Hori i Osawa, 1979; Fox *et al.*, 1982; Hori *et al.*, 1985), presentant l'inconvenient de ser molt curta i per tant presentant un nombre petit de caràcters. La 18S és una molècula relativament conservada, posseint fragments que han romàs sense canvis durant almenys 3 mil milions d'anys i d'altres amb taxes de canvi mitjanament elevades, el que permet fer comparacions de grups molt allunyats (filum, classe) i intermitjos (ordre, família) (Woese i Olsen, 1986; Field *et al.*, 1988). La 28S presenta dominis molt més variables i altres de conservats essent molt més llarga, el que permet unes filogènies a nivells taxonòmics més baixos (Lenaers *et al.*, 1988; Qu *et al.*, 1988).

Amb l'excepció de seqüències del rRNA 5S de 2 espècies de turbel·laris (Ohama *et al.*, 1983; Hori *et al.*, 1988), la seqüència parcial del rRNA 18S del triclada *Dugesia (G) tigrina* (Field *et al.*, 1988) i seqüències parcials de la subunitat ribosòmica gran d'uns pocs Plathelminths paràsits (Gill *et al.*, 1988) no s'han aplicat a l'anàlisi filogenètica d'aquest grup d'organismes dades procedents de rRNA o de cap altre molècula.

3.2 EL TRACTAMENT DE LES DADES.

Els mètodes pel tractament de les dades els podem dividir en funció del tipus de dades dels que partim i poden ésser:

- a) Mètodes basats en matrius de distàncies.
- b) Mètodes basats en dades discretes.

Dins dels primers trobem els primers mètodes numèrics que van ésser utilitzats per a inferir filogènies: els "clusterings" o agrupaments i també tot un altre grup de mètodes que s'anomenen additius. En el segon grup tenim bàsicament 2 tipus, els anomenats de màxima parsimonia i els de compatibilitat.

3.2.1 Mètodes basats en matrius de distàncies

Les distàncies poden derivar de diferents tipus de caràcters tenint un significat diferent en cada cas. Hi ha caràcters, com són la hibridació DNA-DNA i els immunològics, que donen com a únic resultat una matriu de distàncies entre parelles de OTUs (Operational Taxonomic Units).

En el cas de les dades morfològiques i altres tipus de dades moleculars (electroforesis, restricció i seqüències), a partir de les dades discretes (estats dels caràcters) és possible calcular unes distàncies (anomenades fenètiques per la morfologia, genètiques en el cas de les electroforèsis i evolutives per a les seqüències). Aquestes distàncies es calculen a partir de coeficients d'identitat o similitud. Existeixen un gran nombre de coeficients (més de 14 sols per dades electroforètiques, Nei, 1981); tots ells solen estar correlacionats malgrat que poden diferir bastant en els seus valors absoluts (Avice, 1983). Les distàncies més utilitzades són les de Nei (1971) i de Rogers (1972) per proteïnes i la de Jukes i Cantor (1969) per seqüències.

Una crítica general a tots el mètodes basats en distàncies és que la reducció de les dades a distàncies produeix una pèrdua d'informació. Malgrat això, es pot comprobar que les distàncies mantenen molts dels aspectes importants de les dades inicials (Felsenstein, 1982).

3.2.1.1 Clustering

Els clusterings o mètodes d'agrupament inclouen tota una sèrie de mètodes fenètics (UPGMA, WPGM, etc) desenvolupats per l'escola taxonòmica numèrica per fer agrupaments taxonòmics i classificacions basant-se exclusivament en la similitud fenètica entre taxons (Michener i Sokal, 1957; Sokal i Sneath, 1963). Consisteixen en l'agrupació dels OTUs en funció de la seva major similitud fenotípica (o menor distància) succesivament fins a obtenir una total jerarquització dels grups estudiats.

Aquests mètodes no pretenen en principi esbrinar l'història evolutiva dels grups considerats. Diversos estudis (Colless, 1970; Moore, 1971) però han demostrat que el seus resultats poden ésser bones estimes de la filogènia si es compleixen 2 premises:

- a) considerar tots els grups obtinguts com a monofilètics;
- b) suposar que les taxes d'evolució no varien de forma molt diferent entre els llinatges.

La segona condició resulta molt restrictiva ja que s'ha demostrat, especialment en estudis moleculars, l'existència de grans variacions en el nombre de substitucions acumulades des de la divergència entre diferents llinatges animals (Raff *et al.*, 1988; Field *et al.*, 1988).

Aquestes dificultats, conegudes pràcticament des de l'inici, han impedit l'ús dels mètodes fenètics d'agrupament per a propòsits filogenètics. Aquests mètodes s'han utilitzat principalment per generar arbres amb distàncies genètiques calculades a partir de freqüències al·lèliques, utilitzant principalment la distància de Nei (1972) éssent l'UPGMA el mètode més utilitzat.

3.2.1.2 Mètodes additius

Aquests intenten ajustar un arbre a una matriu de distàncies entre OTUs. Tots ells intenten, essencialment, resoldre el mateix problema, de formes lleugerament diferents. El que es preten és trobar un arbre sense arrel (esquema de relacions i distàncies entre els taxons sense definir en quin punt s'està més proper a la forma ancestral), que s'acosti tan com sigui possible a la predicció de les distàncies observades (minimitzi la diferència entre les distàncies esperades i les observades). Els mètodes difereixen sobretot en la mesura d'aquesta diferència.

Aquests mètodes fan dues assumpcions:

- 1) l'additivitat, les distàncies entre els taxons són resultat de la suma de la longitud dels segments que els separen al llarg de l'arbre;
- 2) les distàncies es mesuren independentment unes de les altres.

En el cas que aquestes dues premises es compleixin aquests mètodes posseeixen una propietat estadística molt desitjable, la consistència: a mesura que acumulem més dades, les

distàncies observades entre taxons s'apropen més a les distàncies esperades. Una altra característica important d'aquests mètodes és que, a diferència dels anteriors, no són sensibles a les diferències en les taxes d'evolució pels diferents llinatges, mantenint-se consistents inclús quan aquestes són grans.

El primer mètode additiu va ésser el de Fitch i Margoliash (1967). Posteriorment, han aparegut tota una sèrie de metodologies alternatives, millorant o no la primera segons els criteris dels diferents autors (Cavalli-Sforza i Edwards, 1967; Hartigan, 1967; Farris, Kluge i Eckardt, 1970; Buneman, 1971; Farris, 1972; Li, 1981).

3.2.2 Mètodes basats en dades discretes

Són bàsicament dos: màxima parsimònia i compatibilitat. Els dos responen a dues formes diferents de resoldre el dilema que surgeix d'aplicar el mètode cladista de Hennig (1950, 1965, 1966), en el que es basen tots dos.

Partint dels estats del caràcter per a les espècies actuals i coneixent quin és l'estat ancestral i quin el derivat per a cadascun, el mètode de Hennig considera que cada caràcter demostra l'existència d'un grup monofilètic en la filogènia. Això es basa en suposar que cada estat derivat ha aparegut sols una vegada, i en que és impossible que un caràcter que té l'estat derivat torni a l'estat ancestral, essent l'evolució irreversible per aquests caràcters. La presència de caràcters en estat derivat (apomorf) en un grup seria indicativa de la monofília d'aquest. Successivament, trobariem caràcters compartits per grups més restringits el que ens aniria delimitant grups monofilètics a diferents nivells.

La principal dificultat d'aquest mètode és que per qualsevol grup de dades el més habitual és que no tots els caràcters coincideixin en indicar-nos els mateixos grups filogenètics (dilema de Hennig). Per solucionar aquest problema Hennig proposà el repassar la interpretació feta dels caràcters, fins que es resolguessin totes les incompatibilitats de les dades. Hi ha casos però en que cap mena de reinterpretació de les dades salva la incompatibilitat, sobre tot a nivell molecular (seqüència proteica o de DNA) on és biològicament possible que independentment en diferents llinatges una determinada posició presenti el mateix aminoàcid o nucleòtid. Es fa necessari per tant un altre criteri, millor que la reinterpretació. Les dues solucions donades han estat:

- 1) Permetre que els caràcters puguin revertir d'un estat derivat a l'ancestral, o permetre que l'estat derivat aparegui més d'una vegada (paralelisme), i trobar la filogènia que minimitzi el nombre d'aquests esdeveniments extres: màxima parsimonia.
- 2) Trobar el grup més gran de caràcters mutuament compatibles i utilitzar sols aquests per a construir la filogènia: compatibilitat.

3.2.2.1 Màxima parsimonia.

Els mètodes que intenten trobar la solució més parsimoniosa es diferencien en dos punts bàsics. En primer lloc, en les assumpcions biològiques que fa; en segon lloc en l'algoritme que

utilitzen per trobar entre tots els possibles arbres (topologies) la millor, és a dir la que encaixa millor amb les suposicions biològiques fetes.

Tractarem primer aquest segon problema ja que és comú a tot el grup de mètodes, fent després una breu descripció d'algun dels mètodes en funció de les seves premisses biològiques.

Pel que fa a l'algoritme la problemàtica radica en que caldria, per trobar realment l'arbre més parsimoniós, analitzar tots els possibles arbres (topologies) per un grup donat de taxons. Aquest és un nombre que s'incrementa molt ràpidament en quan el nombre de taxons augmenta (desde una única topologia per a tres taxons passem a 2×10^6 per deu taxons i a 3×10^{74} per 50) això fa que ni tant sols amb l'ajut de grans ordinadors es pugui, en un temps raonable, fer aquesta anàlisi i, per tant, cal fer aproximacions i analitzar subgrups dels arbres. Generalment, els diversos algoritmes el que fan és iniciar la recerca fent un arbre (senzillament agrupant les espècies per ordre, o bé fent un arbre per un mètode d'agrupament, ...) i a partir d'aquí canvien branques o subgrups de l'arbre de posició i anoten cada cop que s'obté un arbre pel que calen menys "pasos". S'arriba així a una solució que possiblement sigui la més parsimoniosa.

L'altre diferència entre mètodes consisteix en les premisses biològiques inherents a cadascun. Aquestes fan referència a si es permet o no la reversibilitat dels caràcters, si es coneix quin és l'estat ancestral o si un estat pot apareixer més d'una vegada (paral·lelisme). En el mètode de Camin i Sokal es suposa que es coneix l'estat ancestral, que no és possible la reversió de l'estat derivat a l'ancestral i permeten múltiples orígens d'un mateix estat derivat. En el mètode més parsimoniós de Wagner (Eck i Dayhoff, 1966; Kluge i Farris, 1969) es suposa que no es coneix l'estat ancestral (cas majoritari especialment per dades moleculars) i a més es permeten reversions de l'estat derivat a l'ancestral. Evidentment, en aquest segon cas, el desconèixer l'estat ancestral dels caràcters ens impedeix situar la rel de l'arbre. A diferència dels arbres additius, aquests mètodes donen topologies en les que no es determina la longitud dels braços. Aquesta sol representar-se proporcional al nombre de canvis que s'hagi donat a cada branca sempre que això es pugui calcular.

En tots aquests mètodes, l'aparició d'un mateix estat derivat més d'una vegada (paral·lelisme) es minimitza al màxim o no es permet. Això fa que per aquells grups en que aquest fenomen és molt accentuat (fet més freqüent del que habitualment es considera per a alguns grups d'organismes, Sluys, 1990) ens puguin conduir a conclusions filogenètiques errònies.

Aquests mètodes, malgrat no ésser tan sensibles a les diferències de taxes evolutives entre llinatges com ho són els clusterings, tendeixen a donar estimacions inconsistentes de la filogènia, si aquestes diferències són molt accentuades. També donen resultats inconsistentes si les taxes de canvi són molt grans.

3.2.2.2 Compatibilitat.

Agrupen aquells mètodes que per a solucionar el dilema de Hennig escullen aquella filogènia que té un nombre major de caràcters compatibles amb ella (partint de la premissa que no s'han de produir reversions en cap caràcter).

El principal problema d'aquest mètode és que el grup més gran de caràcters compatible pot ésser molt petit, de manera que la informació parcial continguda en la majoria dels caràcters no s'utilitza per definir la topologia de l'arbre.

De fet el mètode intuitiu utilitzat pels taxonomistes tradicionals s'acosta al mètode de compatibilitat, en el que el grup majoritari de caràcters compatibles ens defineix la topologia general. L'anàlisi ulterior dels caràcters restants permet dividir els taxons en grups i aconseguir una topologia en la que s'acoblen la majoria dels caràcters.

Aquests mètodes perden la propietat de consistència si les taxes de canvi no són petites. Els dos mètodes, parsimònia i compatibilitat estan molt relacionats i ambdós poden justificar-se com a mètodes de màxima versemblança, però sota circumstàncies diferents. Els dos demanen que la majoria de caràcters tinguin una taxa de canvis baixa, i tots dos assumeixen que la homoplàsia (convergència) es poc freqüent. Si esperem que les homoplàsies estiguin repartides a l'atzar entre tots els caràcters, llavors el de màxima parsimonia és el millor mètode. Si esperem que es concentrin en uns pocs caràcters, que no sabem quins són per endavant, llavors la compatibilitat resulta millor estadísticament (Felsenstein, 1982).

4. FILUM PLATHELMINTHES

El mot platihelminths prové del grec *platys* = pla i *helminthes* = cucs. El filum Plathelminthes agrupa tots els cucs plans o aplanats dorsoventralment, que presenten simetria bilateral, acelomats, sense anus definitiu i sense sistemes circulatori ni respiratori (Minot 1876).

Les teories per explicar l'origen del grup són diverses i estan en relació amb l'origen hipotetitzat per als metazoos. La majoria de teories popularment acceptades suggereixen que els platihelminths deriven directament de la forma planula/acel (figura 1). Aquests metazoos primitius haurien adoptat una forma de vida bentònica, adquirint conseqüentment una major bilateralitat i cefalització associada amb la direccionalitat del desplaçament en dues dimensions i els inicis d'un intestí propiament dit a mesura que es produïa una diferenciació completa dels teixits en tres capes.

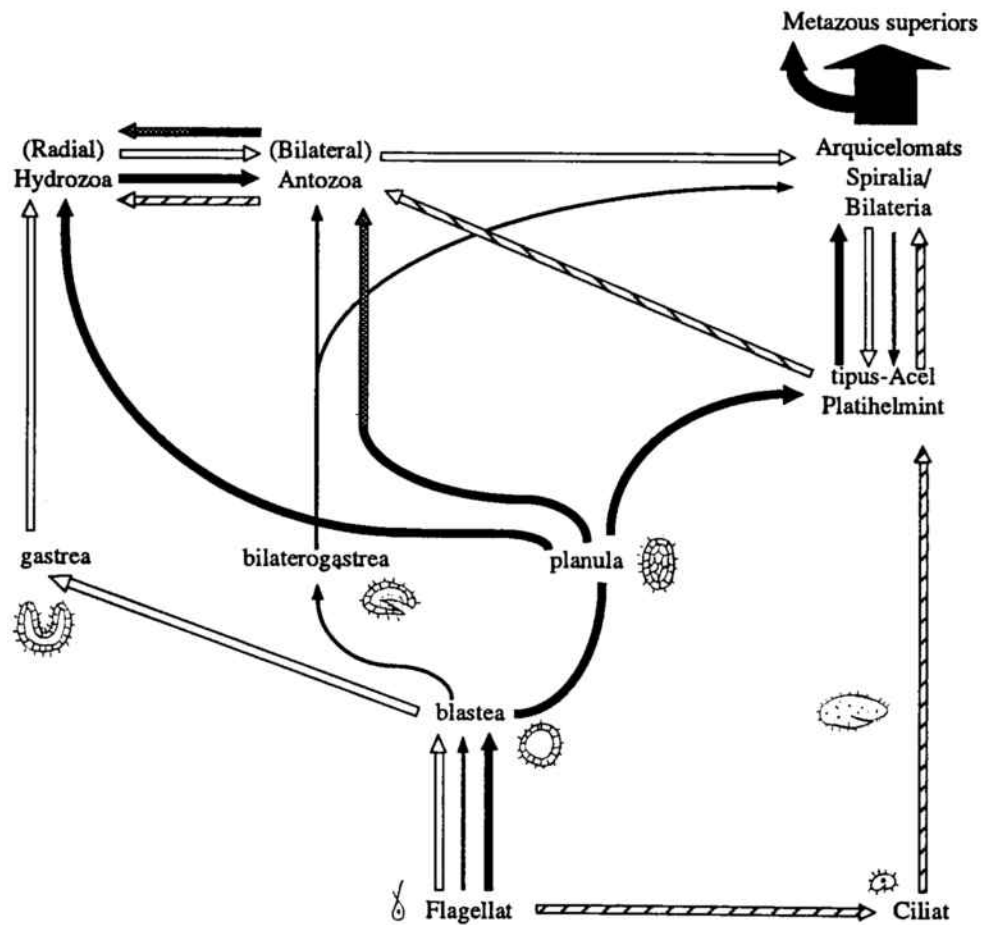


Fig. 1. Resum de les diferents teories de l'origen dels metazoos (tret de Willmer, 1990). Es mostren els diversos camins entre les hipotètiques formes ancestrals i els grups moderns:

- Teoria de la planula de Hyman (1951a), Salvini-Plawen (1978) i altres, amb la variant de Hyman per a l'evolució dels Cnidaris (.....)
- Teories de la gastrea derivades directament de Haeckel, amb ancestres arquicelomats (Remane, 1963); — versió bilaterogastrea de Jägersten (1955)
- Teories sincitials com les de Hadzi (1963) i Hanson (1963).

Altres autors, principalment alemanys (Jägersten, 1972; Remane, 1967; Rieger, 1980, 1985; Siewing, 1980), situen a les planàries i altres cucs senzills com a formes derivades secundàriament a partir de l'estat celomat o per progènesi a partir d'estadis embrionaris d'organismes celomats (fig. 1).

En el primer grup de teories, els platihelminths constitueixen un grup de metazous molt primitius que es trobaria a la base de la radiació dels metazoos bilaterals, mantenint-se probablement molt similar a aquestes formes inicials. En el segon cas, són formes derivades, d'escasa importància en l'evolució del reste de metazoos.

El filum es divideix en 4 classes: Turbellària, Monogenea, Trematoda i Cestoda. Inclou la primera tots els organismes de vida lliure agrupats en un gran nombre d'ordres; les altres 3 classes són exclusivament parasitàries.

La majoria d'autors consideren, en consonància amb la teoria planula/accel, que la tendència evolutiva dins dels platihelminths aniria de les formes més petites i no especialitzades (ordres catenulats, nemertodermàtides i acels) cap a les més grans d'organització més complex (ordre polícladis)(fig. 2). No hi ha acord en quin seria d'entre els més simples el grup més primitiu havent-se hipotetitzat (Smith et al., 1986) un possible origen independent per a cadascun d'aquests (catenulats, nemertodermàtides i acels). Si així fos, el filum Plathelminthes i la classe turbel·laris serien grups polifilètics.

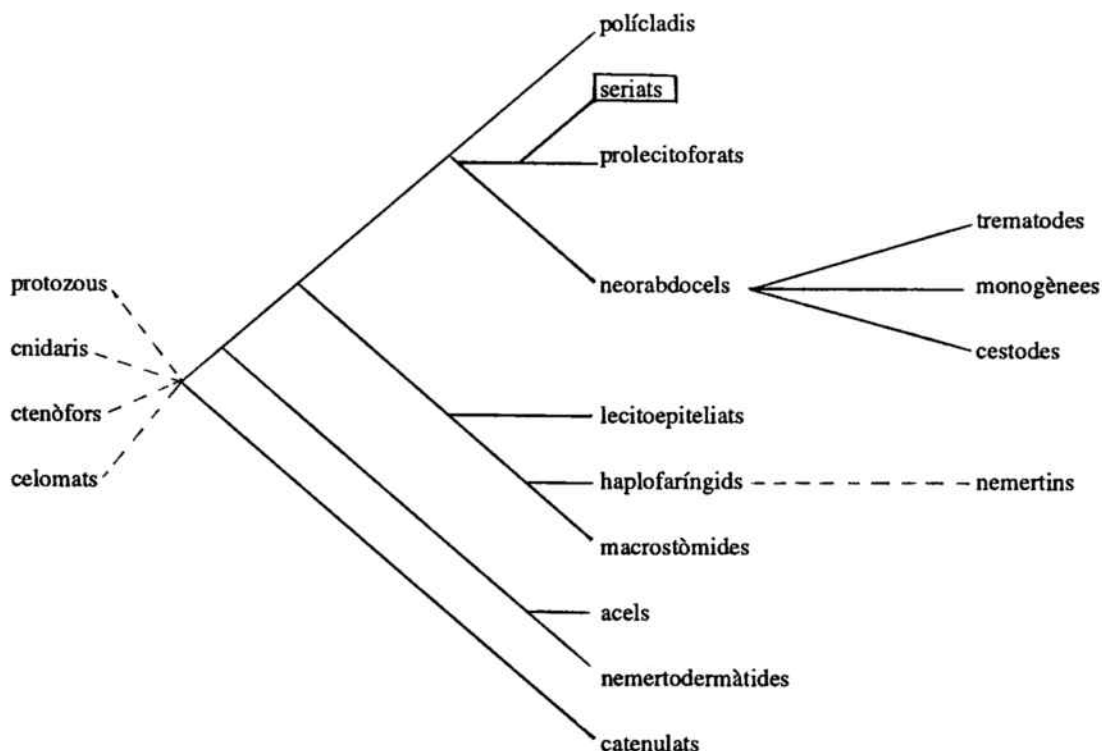


Fig. 2. Esquema de l'origen i les relacions filogenètiques entre els ordres de Turbellària, incloent la derivació hipotètica de les classes de platihelminths parasitàries i el filum dels Nermertins (tret, amb modificacions de Karling, 1974). Enquadrat, l'ordre dels seriats a la que pertanyen la majoria d'espècies d'aquest estudi.

Contràriament, els partidaris de l'escola alemanya (Rieger, 1985), consideren una direccionalitat evolutiva inversa partint de formes grans i complexes (que haurien derivat de l'estat celomat) cap a formes més senzilles per progènesi. Aquesta teoria té avui en dia pocs defensors.

Les tres classes de platihelminths paràsits (trematodes, monogènees i cestodes) tenen el seu origen en algun ancestre proper a l'actual ordre neorabdocels (Ehlers, 1985a i b)(fig. 2). Si aquesta teoria és certa, la classe turbel·laris esdevé parafiletica, i tècnicament perd el seu sentit (Ax, 1987), malgrat segueix essent útil en sentit descriptiu.

4.1 ORDRE SERIATA (BRESSLAU 1928-33)

Els seriats tenen com a caràcters comuns la possessió d'una faringe tubular, i l'ordenació seriada de les gònades de desenvolupament folicular (testicles i vitel·lària). Es divideix en dos subordres: Subordre Proseriata (Meixner 1928) i Subordre Tricladida (Lang 1884)(Fig. 3). El primer inclou organismes de mida petita, majoritàriament marins.

4.1.1 Subordre Tricladida

El caràcter monofilètic del subordre Tricladida rau en la possessió de nombroses sinapomorfies: una faringe embrionària temporal, la posició cerebral de les gònades femenines, l'arreglament seriati dels nefridiofors i la presència d'una zona anular constituïda per les obertures de les glàndules adhesives (Ehlers, 1985b; Sluys, 1989).

Es divideix en tres infraordres (Hallez, 1894): els Paludícoles o triclads d'aigües dolces, els Marícoles o triclads marins i els Terrícoles o planàries terrestres (Fig. 3). Malgrat que des d'un punt de vista filogenètic aquesta divisió és pobrement definida, té una base taxonòmica que la fa útil (Sluys, 1989).

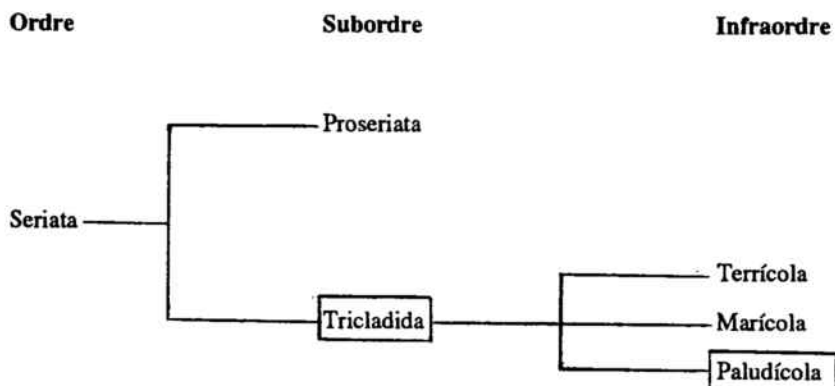


Fig. 3. Esquema de les divisions taxonòmiques de l'ordre seriats. Encaixats, el subordre dels triclades i l'infraordre dels paludícoles als que pertanyen la majoria d'espècies d'aquest estudi.

Dins dels Paludícoles o planàries d'aigua dolça, Ball (1974a) va reconèixer 3 famílies: DugesIIDae (Ball, 1974a), amb una distribució mundial, i Planariidae (Stimpson, 1857) i Dendrocoelidae (Hallez, 1894), que estan restringits a l'hemisferi nord. Les famílies Planariidae i Dendrocoelidae són considerades grups derivats, basant-se en la situació dels seus oviductes que s'obren a l'atri. Aquestes dues famílies formen una superfamília, Planarioidea, que és el grup bessó de la família DugesIIDae. Aquesta última presenta la condició plesiomòrfica, trobada també en els Marícoles i Terrícoles, dels oviductes obrint-se al canal de la bossa copuladora (Fig. 4A).

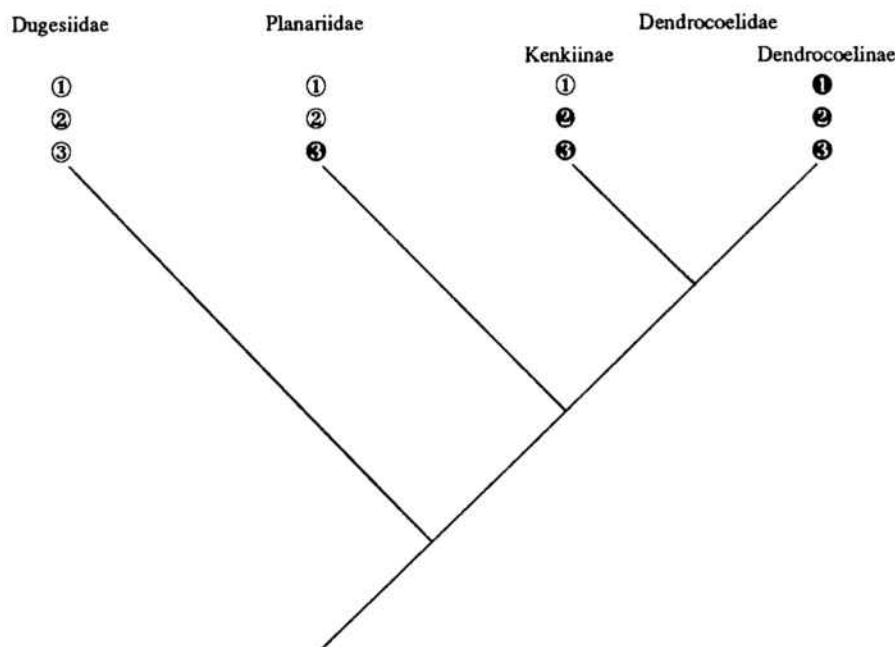


Fig. 4A. Relacions filogenètiques de les famílies dels triclads paludícoles (segons Ball, 1974a): ○ caràcters plesiomòrfics ● caràcters apomòrfics. 1) fibres musculars de la faringe en capes separades ○ o barrejades ●; 2) organ adhesiu absent ○ o present ●; 3) oviductes abocant al canal de la bossa copuladora ○ o a l'atri ●.

La divisió entre les famílies Planariidae i Dendrocoelidae es basa en dos caràcters: la possessió d'un organ adhesiu anterior per part dels dendrocoelids (Hallez 1894); i la distribució de les fibres musculars de la faringe (Kenk, 1930), els planàrids presenten dues capes separades, la longitudinal i la circular, mentre que els dendrocelids les presenten barrejades.

A part dels tres caràcters plesiomòrfics que la marquen com a més primitiva, la família DugesIIDae posseeix un caràcter apomòrfic que la defineix com a grup monofilètic: l'estructura complexa del seu ull (Ball, 1981). No és així per la família Planariidae, que comparteix amb la Dendrocoelidae el caràcter apomòrfic dels oviductes, però no en té cap de definitori propi, el que deixa al grup com a un taxó no ben definit (Ball, 1981; Sluys, 1989).

Les relacions de les tres famílies de paludícoles amb els altres triclads (marícoles i terrícoles), tampoc està clarament definida. Malgrat hi ha dos caràcters definitoris com a grup monofilètic per als Paludicola (condició "probursal" i el ducte cefàlic reduït, Ball, 1974a), aquests caràcters són posicionals més que caràcters estructurals complexos i per criteris generals de relacions homòlogues (Riedl, 1978) s'han de considerar com a poc definitoris (Ball,

1981). Aquest fet, sumat a la difícil explicació de l'aparició de planàrids i dendrocelids a partir de formes dugesides (que obligaria a suposar la perdua secundària de la complexa estructura ocular (Ball, 1981)), va dur a aquest autor a proposar un nou esquema evolutiu per a aquests infraordres (fig. 4B), que suposa un possible origen difilètic per als paludícoles a partir d'ancestres marins similars als actuals proseriats.

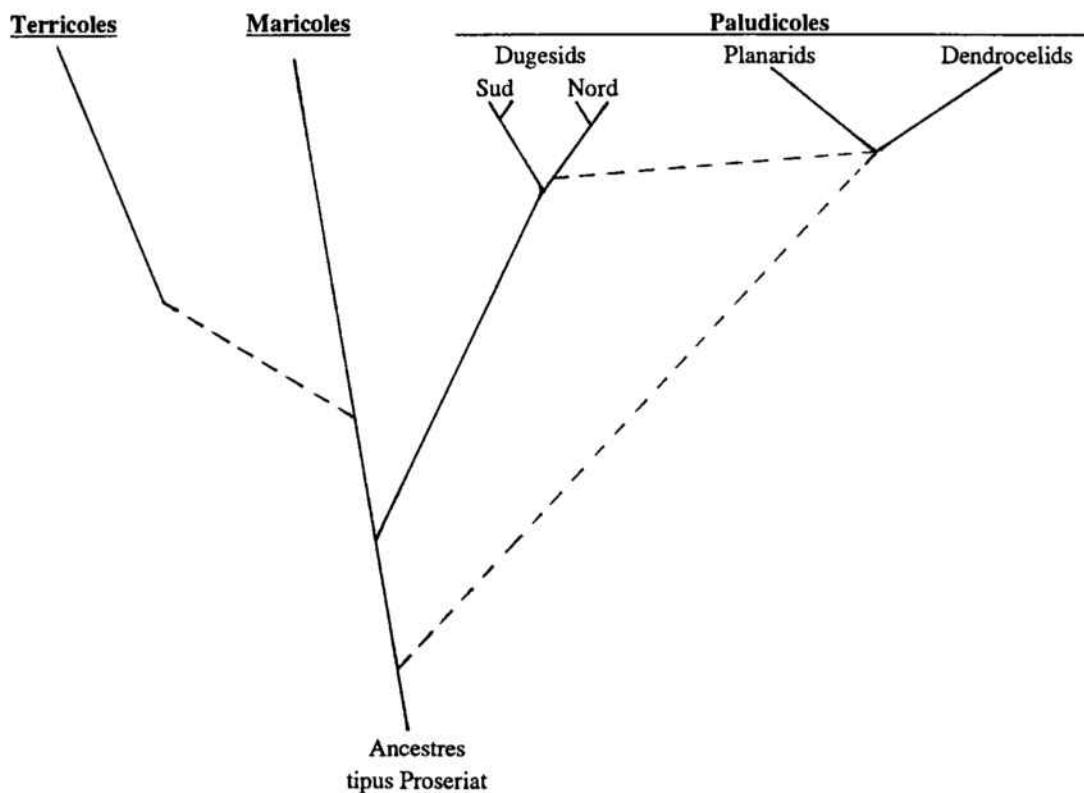


Fig. 4B. Esquema filogenètic dels trícclads (Ball, 1981). Les línies a traços indiquen relacions incertes.

5. ESTUDIS TAXONOMICS I FILOGENETICS DELS PALUDICOLES A LA CONCA MEDITERRANEA

5.1 FAMILIA DUGESIIDAE (BALL, 1974)

La família DugesIIDae presenta com a caràcter definitori la possessió d'un ull complex (multicel·lular). Les relacions intrafamiliars dels dugèsids han estat estudiades per Ball (1974a, 1977a) i per De Vries (1987). Ball (1974a) reconeixia, entre un cert nombre de gèneres monotípics i pobrement definits (*Rhodax* i *Bopsula*) un gènere principal (*Dugesia*) dividit en 6 unitats taxonòmiques, a les que es va assignar el rang de subgènere: *Dugesia*, *Schmidtea*, *Girardia*, *Cura*, *Neppia* i *Spathula*. Mentre aquests 3 últims han estat elevats al rang de gèneres (Ball 1974b, 1977a), les tres primeres, que comprenen més del 90% de les espècies de dugèsids, encara mantenen el rang subgenèric.

Els tres subgèneres actuals (*Dugesia*, *Girardia* i *Schmidtea*, fig. 5) del gènere *Dugesia* són els únics dugèsids presents a Europa, essent *Girardia* (l'espècie *Dugesia* (G) *tigrina*) una introducció recent procedent de Nord Amèrica (Ball i Reynoldson, 1981; Ribas et al., 1989).

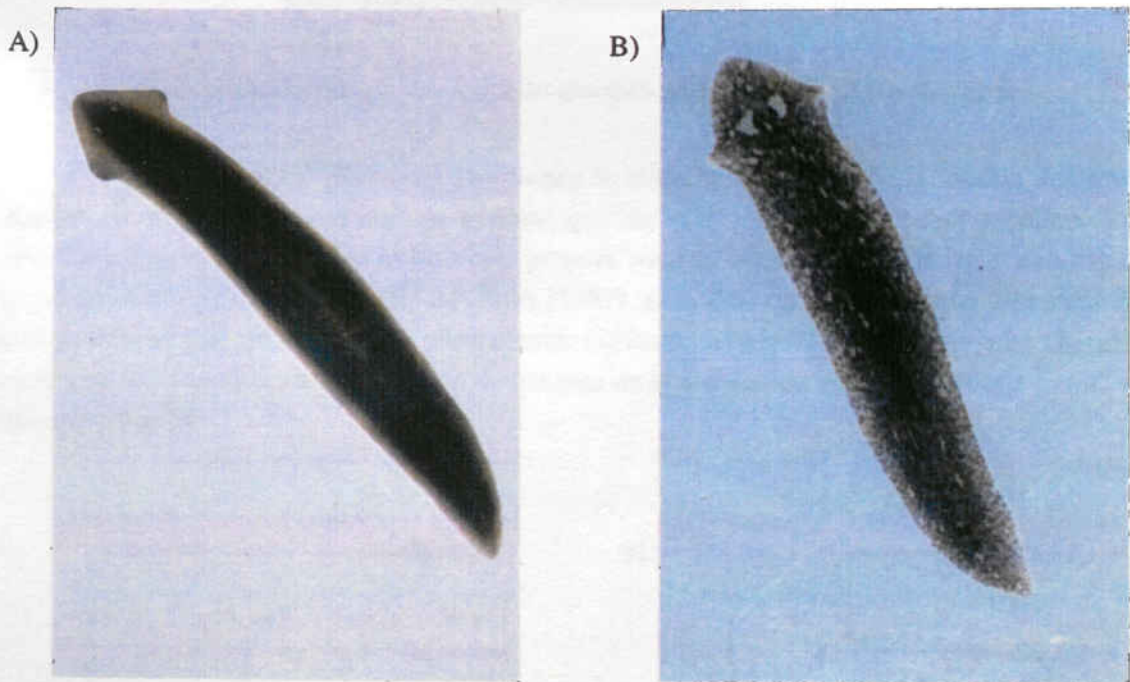


Fig. 5a. Espècies representatives dels tres subgèneres del gènere *Dugesia*: A) *Dugesia* (D) *iberica*; B) *Dugesia* (G) *tigrina*.

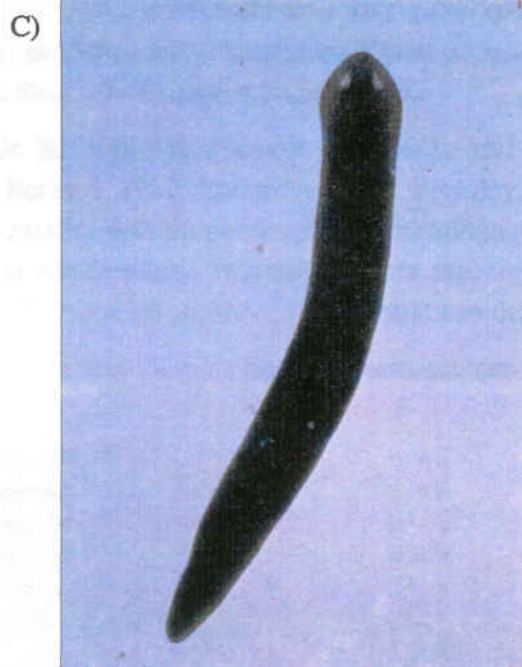


Fig. 5b. Espècies representatives dels tres subgèneres del gènere *Dugesia*: C) *Dugesia (S) mediterranea*.

Donat que aquests subgèneres comprenen la majoria d'espècies de la família, les seves relacions filogenètiques són d'interés, malgrat que de moment romanen sense resoldre. Ball (1974a, 1977a) va suggerir una relació més propera entre *Schmidtea* i *Dugesia* que amb cap de les espècies de *Girardia*, en canvi, De Vries (1987), basant-se en un sol caràcter sinapomòrfic molt dubtós, va suggerir una major afinitat entre *Girardia*, *Schmidtea* i *Cura* que amb *Dugesia*, constituint aquesta última amb el reste de gèneres de la família un grup monofilètic germà de l'anterior (fig. 6).

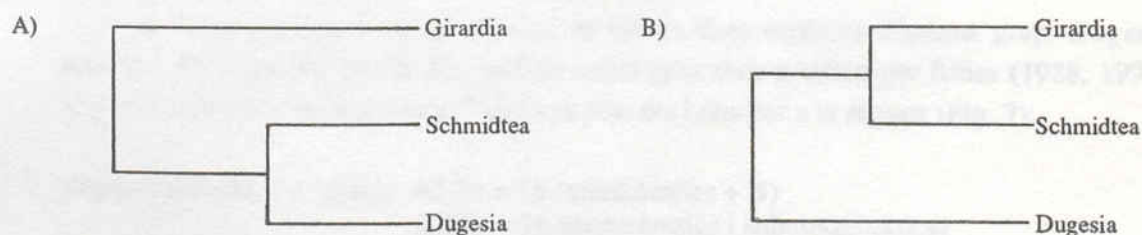


Fig. 6. Cladogrames representant les relacions filogenètiques dels 3 subgèneres principals del gènere *Dugesia* de la família DugesIIDae segons A) Ball (1974a, 1977a) i B) De Vries (1987).

5.1.1 subgènere *Dugesia* (Girard, 1850)

Les seves característiques morfològiques principals són: forma triangular del cap, presència de dos ulls i faringe despigmentada (fig. 5A). Aquest subgènere ha estat considerat també com a una superespècie (*Dugesia* (*D*) *gonocephala* s.l.). Comprén un gran nombre d'espècies, molt properes, diferenciades en alguns aspectes de la seva morfologia i cariologia (Benazzi, 1955; Benazzi i Benazzi-Lenttati, 1976).

Moltes de les espècies d'aquest grup tenen una distribució bàsicament mediterrània (Lepori, 1951; Benazzi, 1961; Codreanu, 1961; Bromley, 1974; De Vries, 1984; 1985). De la majoria d'elles existeix una simple descripció morfològica, especialment per a aquelles espècies procedents de la Mediterrània Oriental (de tres espècies d'Israel (Bromley, 1974) sols una, *Dugesia biblica*, Benazzi i Banchetti 1972, ha estat ben descrita).

A la Mediterrània Oest i Central trobem set espècies amb els següents complements haploids:

<i>Dugesia</i> (<i>D</i>) <i>gonocephala</i> s.s.	n = 8
<i>Dugesia</i> (<i>D</i>) <i>iberica</i>	n = 8
<i>Dugesia</i> (<i>D</i>) <i>benazzi</i>	n = 8
<i>Dugesia</i> (<i>D</i>) <i>sicula</i>	n = 9
<i>Dugesia</i> (<i>D</i>) <i>etrusca</i>	n = 8
<i>Dugesia</i> (<i>D</i>) <i>ilvana</i>	n = 8
<i>Dugesia</i> (<i>D</i>) <i>brigantii</i>	n = 8

Al ser les més freqüents, les 4 primeres han estat objecte d'un nombre considerable d'estudis (Vandel, 1925; Benazzi, 1947; Benazzi, 1961; Benazzi-Lenttati i Deri, 1977; Gourbault i Benazzi, 1979). Al tenir una morfologia molt similar, sols és possible distingir-les atenent a la morfologia del seu aparell copulador. Això representa un problema per a aquelles poblacions de reproducció exclusivament fissipara o aquelles que sols presenten individus inmadurs. Nombrosos estudis cariològics (Benazzi, 1955; Benazzi i Benazzi-Lenttati, 1976; Gourbault, 1981; Oki et al., 1981; Lepori i Pala, 1982; Pala et al., 1985; De Vries, 1986; Ribas et al., 1988; Tamura et al., 1988; Ribas, 1990) han revelat l'existència de diferents biotips dins de cadascuna de les espècies, responen a diverses ploidies o diferents morfologies cromosòmiques. Aquests estudis no han aclarit però gaire la situació càdica generada per la falta de diferències morfològiques externes, la existència d'un gran nombre de poblacions asexuals, l'existència de formes poliploids, i la presència aparent de formes aneuploids.

A l'àrea corresponent als PP.CC. es troben dues espècies d'aquest grup: *Dugesia* (*D*) *iberica* i *Dugesia* (*D*) *sicula*. Els estudis cariològics duts a terme per Ribas (1988, 1990) van revelar l'existència de dos biotips* per a la primera i dos per a la segona (Fig. 7):

<i>Dugesia</i> (<i>D</i>) <i>iberica</i> : biotip	A1 2n = 16 (metacèntrics + B)
	A2 2n = 16 (metacèntrics i submetacèntrics)
	B 3n = 24 (metacèntrics).
<i>Dugesia</i> (<i>D</i>) <i>sicula</i> : biotip	A 2n = 18
	B 3n = 27.

* veure nota al peu de la pàgina següent.

El biotip B, triploid ($3n=27$), de *Dugesia (D) sicula* fou considerat generalment com formes aneuploides de l'espècie *Dugesia (D) iberica* o de *Dugesia (D) gonocephala* s.l. (Gourbault, 1981; De Vries, 1986a,b). Estudis cariològics recents indiquen clarament la seva pertinença a *Dugesia (D) sicula* (Ribas et al., 1988).

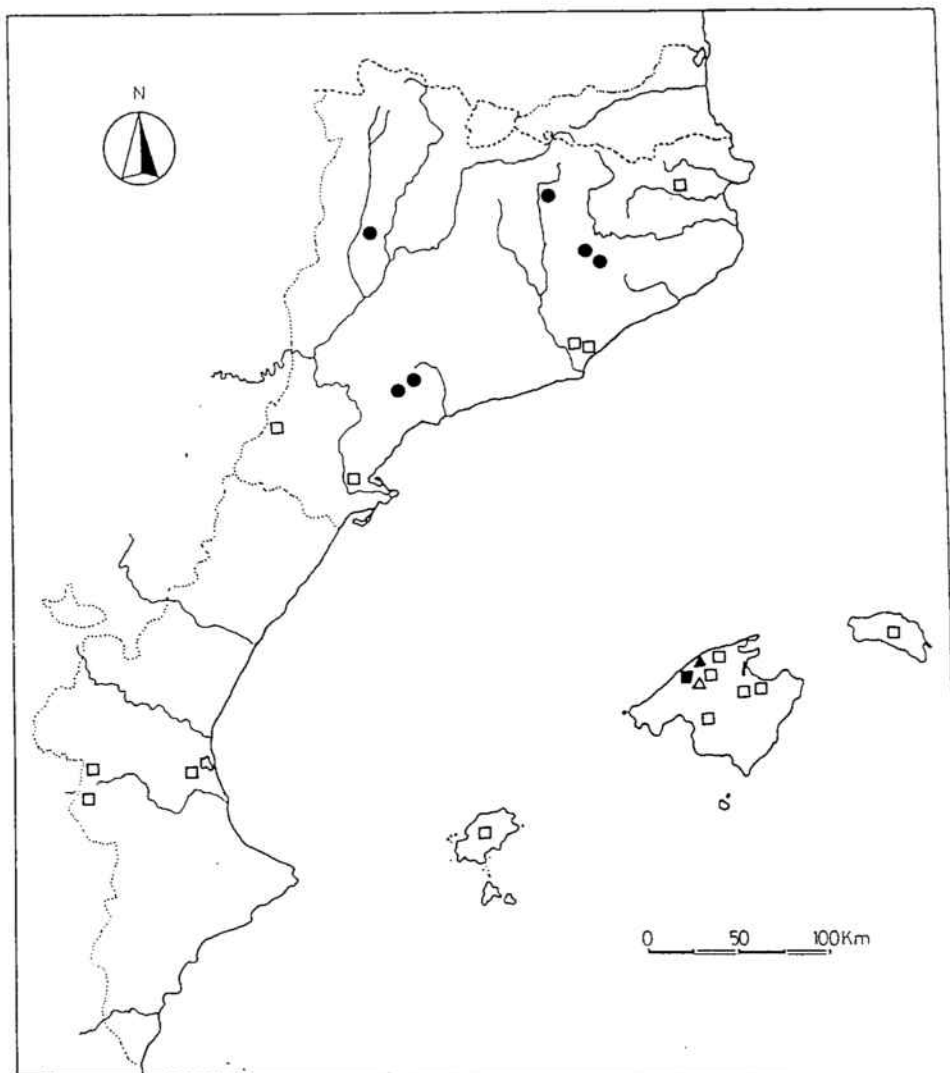


Fig. 7. Mapa de distribució de les dues espècies del subgènere *Dugesia* presents als PP. CC.: *Dugesia (D) iberica* biotip A1 (▲), biotip A2 (■), biotip B (●), *Dugesia (D) sicula* biotip A (Δ), biotip B (□).

* La paraula biotip ha estat emprada a la taxonomia de planàries, des de Benazzi (1957), com aquell grup d'organismes que presenten una cariólogia o/i una modalitat de reproducció diferents dins d'una espècie o grup d'espècies. Cada biotip era representat per una lletra de l'alfabet. Malgrat les seves avantatges, això ha dut a no poques confusions (veure Ribas, 1990 per a una discussió general). Per evitar això considerarem, provisionalment en aquest treball, com a biotip al grup d'organismes que difereix del cariotip diploid bàsic (al que anomenem sempre biotip A) per variacions en la seva ploidia ($3n=B$; $4n=C$; i així successivament). Totes les variacions cariològiques, així com variacions morfològiques importants o del tipus de reproducció dins d'una ploidia idèntica es consideraran com a sub-biotips, representats correlativament per un número (p. ex. B1, B2, ...).

5.1.2 Subgènere *Girardia* (Ball 1974)

Aquest subgènere, nadiu de Nord Amèrica, té com a espècie més representativa *Dugesia (G) tigrina* (Girard, 1850) (Fig. 5B). A Nord Amèrica aquesta espècie sembla ésser politípica (Kenk, 1976). A Europa va ésser introduïda (a Alemanya i probablement a Anglaterra) cap als anys 1920, expandint-se cap al Sud i l'Est durant les següents dècades, per arribar al Sud de França i la Península Ibèrica a finals dels seixantes o inicis dels setantes (Gourbault, 1969; Baguñà *et al.*, 1980; 1982; Gamo i Gourbault, 1981). La hipòtesi més estesa suposa que això es deuria a una única introducció seguida d'una ràpida expansió a tot el continent, la qual cosa ha dut a diversos autors a considerar-la com un típic exemple d'espècie invasora. Aquesta hipòtesi estaria avalada per la gran homogeneïtat que presenten els individus de totes les poblacions descrites fins ara; totes fissípares de pigmentació marronosa, clapejades i faringe pigmentada (figura 5B). Aquesta homogeneïtat contrasta amb la gran variabilitat descrita a l'àrea d'origen (Kenk, 1976).

La distribució tan ampla d'aquesta espècie (també s'ha trobat a Brasil, Japó, Israel i Austràlia, Marcus, 1946; Benazzi, Giannini-Forlì i Puccinelli, 1971, Hirao, Kawakatsu i Teshirogi, 1970; Hay i Ball, 1979) planteja el problema biogeogràfic de descobrir a una escala mundial o en àrees més restringides (p. ex. Europa) si la seva presència és el resultat d'una única o de múltiples introduccions a partir de l'àrea d'origen. Malgrat que l'evidència de que la distribució mundial actual sigui conseqüència d'una introducció recent és molt forta, també pot argumentar-se que aquesta distribució pot ésser la resta d'una àrea de distribució antiga més ampla, tal com ha suggerit Ball (comunicació personal) per explicar la seva presència a Austràlia.

Als PP.CC., on aquesta espècie és molt freqüent, la majoria de poblacions pertanyen a la forma descrita per tot Europa, si bé s'han trobat també tres poblacions amb característiques diferents a la majoritària (Ribas, 1990) (fig. 8). Per la seva aparença externa i cariologia podem distingir-ne tres classes diferents:

Biotip A/B 1. Organismes fissípars amb un patró de pigmentació clapejat sobre fons marronós i faringe clarament pigmentada (pigmentació típica de les planàries europees). Organismes mixoploides $2n$ i $3n$ amb $n=8$. Presenta 14 localitats al principat.

Biotip A/B 2. Organismes fissípars. Presenten externament un patró de pigmentació clapejat sobre un fons grisós i faringe gairebé sense pigmentació. Cariològicament idèntica a A/B. Presenta 2 poblacions (1 menorquina i 1 valenciana).

Biotip A. Organismes sexuals. El seu patró de pigmentació extern és igualment clapejat sobre fons grisós i sovint presenten dues ratlles longitudinals més fosques. La faringe és gairebé despigmentada. Cariològicament són organismes exclusivament diploides ($2n=16$) amb una similitud total a nivell cromosòmic amb les dues classes anteriors. Present en una localitat de l'illa de Menorca.

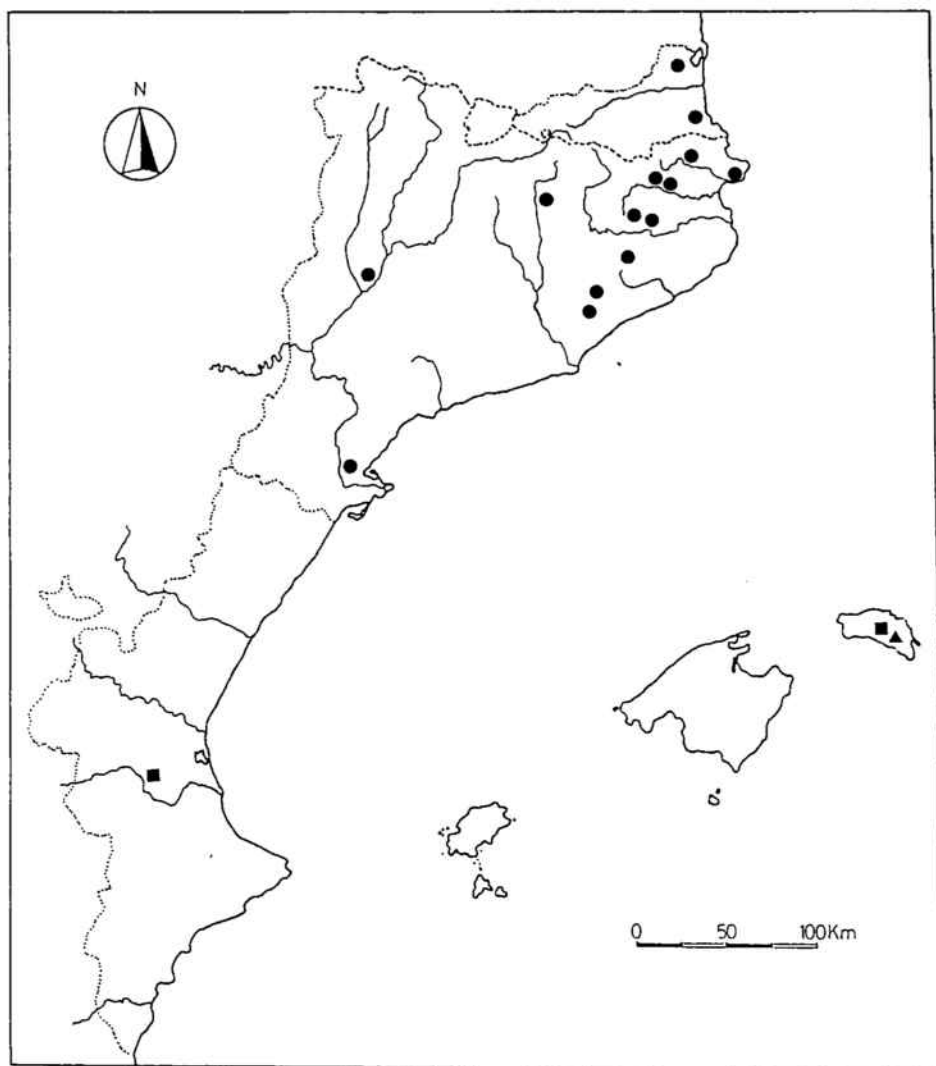


Fig. 8. Mapa de distribució dels tres biotips A/B 1 (●), A/B 2 (■) i A (▲) de l'espècie *Dugesia (G) tigrina* als PP. CC.

5.1.3 Subgènere *Schmidtea* (Ball 1974)

Inclou les espècies de l'antic grup *Dugesia lugubris-polychroa* (Benazzi, 1957; Reynoldson and Bellamy, 1970), la seva distribució és restringida al Palearctic (Europa), i compren 4 espècies molt similars en morfologia externa (fig. 5C) però diferenciabls a nivell cariològic i en detalls de la seva anatomia interna (complex copulador). La classificació actual es deu a l'extens treball del Professor M. Benazzi i la seva escola a Pisa (veura Benazzi i Benazzi-Lentati, 1976 per referències generals). Estudis morfològics i cariològics detallats van revelar la presència de molts biotips cariològics i reproductius (anomenats A a G), alguns dels quals formaven series poliploids, posteriorment assignades a les 4 espècies presents (Taula 1), que es diferencien també en la seva modalitat reproductiva.

Biotip	Espècie	Cromosomes	Estrategia reproductiva
A	<i>Dugesia (S) polychroa</i>	2n= 8	míctica
B	<i>Dugesia (S) polychroa</i>	3n=12	amfimíctica
C	<i>Dugesia (S) polychroa</i>	3n=12	pseudomíctica
D	<i>Dugesia (S) polychroa</i>	4n=16	pseudomíctica
E	<i>Dugesia (S) lugubris</i>	2n=8	míctica
F	<i>Dugesia (S) nova</i>	2n=6	míctica
G	<i>Dugesia (S) mediterranea</i>	2n=8	míctica

Taula 1. Biotips del grup *Dugesia lugubris-polychroa* segons Benazzi (1957) i la seva correspondència amb les actuals espècies del Subgènere *Schmidtea*.

Als PP.CC. s'han trobat poblacions de *Dugesia (S) polychroa* biotip B/C (que nosaltres anomenarem B1/B2, veura nota al peu de la pàgina 22) i biotip A convisquen en poblacions de València i el Roselló (fig. 9) (Ribas, 1990).

Dugesia (S) mediterranea presenta una distribució limitada a la Mediterrània occidental (Catalunya, Balears, Còrsega, Sardenya i Sicília). Existeixen dues races diferents en funció del tipus de reproducció: la sexuada i la fissípara, aquesta darrera present sols a Barcelona, l'Empordà i Menorca. La raça fissípara es distingeix de la sexuada per la presència d'una heteromorfoisi cromosòmica (Baguña, 1973) deguda a una translocació (Ribas, 1990) i pot ésser tant diploid (biotip A2) com triploid (biotip B2)(fig. 9).

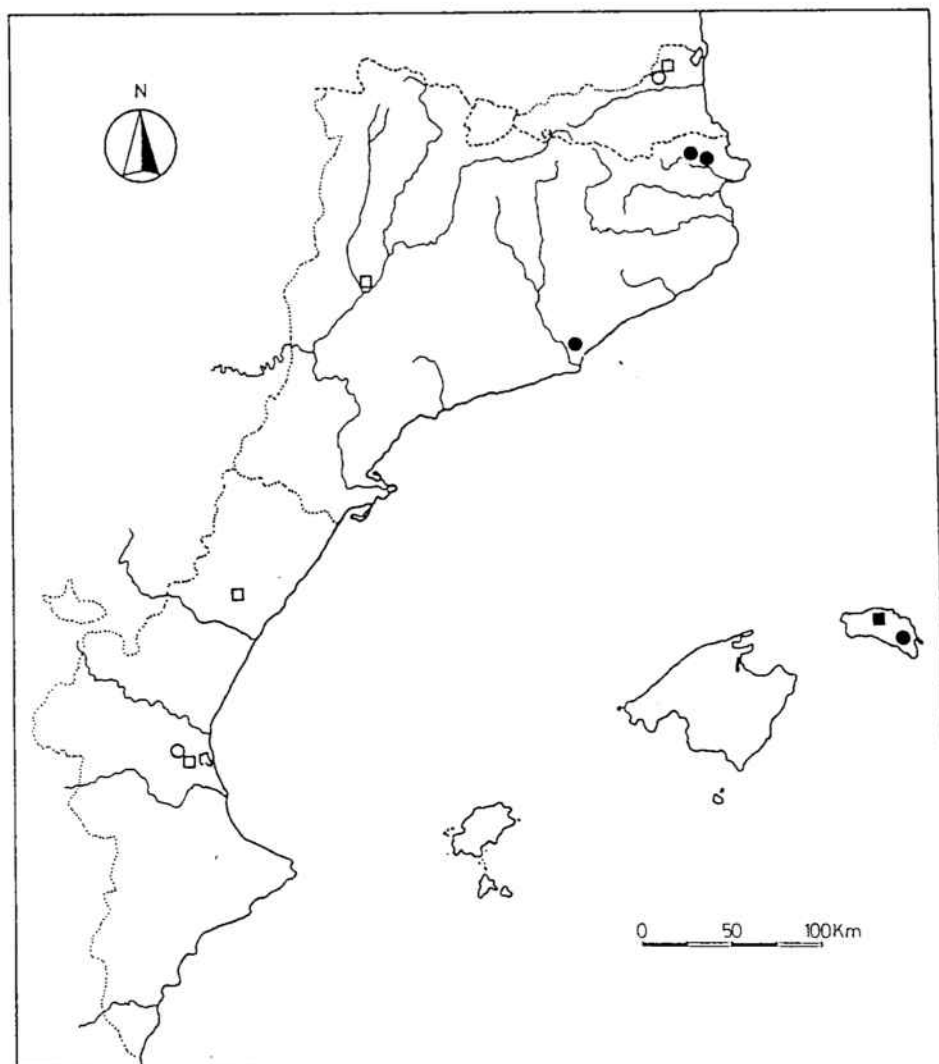


Fig. 9. Mapa de distribució de les dues espècies del subgènere *Schmidtea* als PP. CC.: *Dugesia (S) polychroa* biotip A (○), biotip B1/B2 (□); i *Dugesia (S) mediterranea* biotip A2 (●), biotip B2 (■).

5.2 FAMILIA PLANARIIDAE

La família Planariidae va agrupar inicialment tots els paludícoles (Stimpson, 1857). Estudis posteriors (Hallez, 1894; Ball, 1974a) van treure diversos gèneres constituint les famílies Dendrocoelidae i Dugesiidae, romanent dins de la família original una gran varietat de gèneres i espècies de difícil agrupació. Per aquest motiu aquesta família no presenta caràcters sinapomòrfics que la defineixin.

Actualment inclou 8 gèneres: *Planaria* (Müller 1776), *Atrioplanaria* (Beauchamp 1932), *Paraplanaria* (Ball i Gourbault 1978), *Hymanella* (Castle 1941), *Plagnolia* (Beauchamp i Gourbault 1964), *Polycelis* (Ehrenberg 1831), *Phagocata* (Leidy 1847) i *Crenobia* (Kenk 1930).

Als PP.CC. es troben tres d'aquests gèneres: *Polycelis*, *Phagocata* i *Crenobia* (fig. 10), i molt probablement un quart, *Planaria* (Baguñà, comunicació personal).

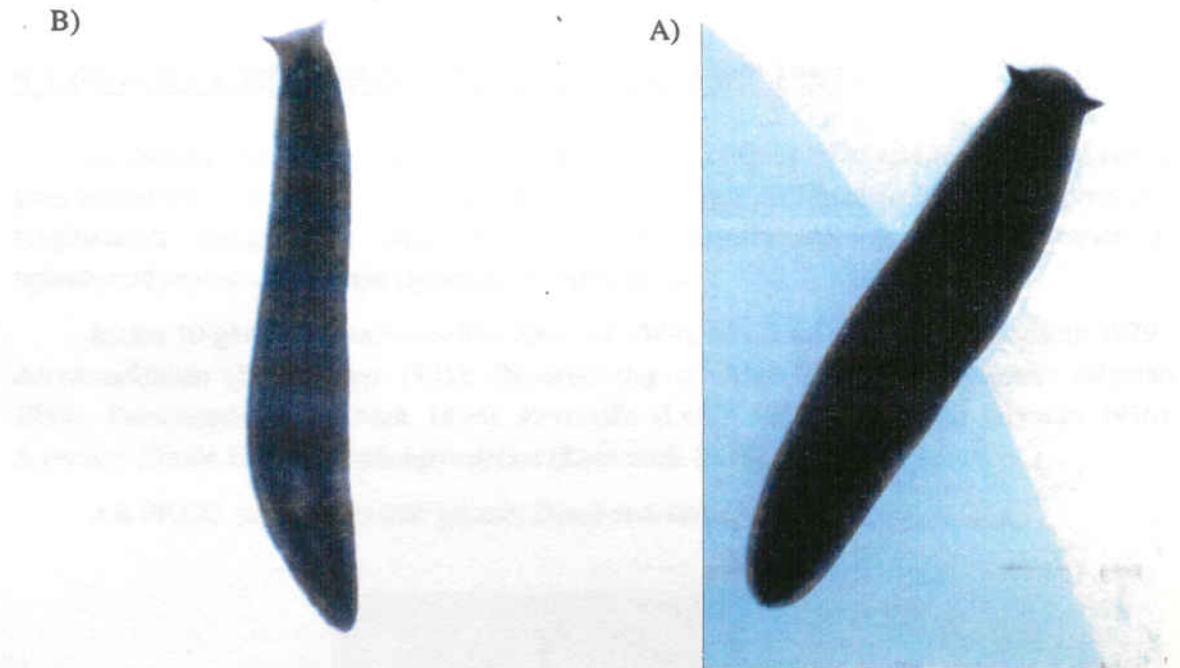


Fig. 10. Espècies pertanyents als dos gèneres de la família Planariidae presents als PP.CC. A: *Polycelis felina*; i B: *Crenobia alpina*.

5.2.1 Gènere *Polycelis* (Ehrenberg 1831)

La característica més sobresortint del gènere, i que li dona nom, és la possessió de nombrosos ulls distribuïts dorsalment, a la part més perifèrica del cap. Aquest darrer és truncat presentant dos tentacles més o menys prominents (fig. 10A). Aquest gènere presenta una ampla distribució a l'hemisferi nord.

Als PP.CC. es troben dues espècies pertanyents a aquest gènere: *Polycelis felina* i *Polycelis nigra* (fig. 12) i molt probablement una tercera: *Polycelis tenuis* (Prats i Baguñà, dades no publicades). Mentre que la primera és una espècie alpina, localitzada en rierols freds d'alta muntanya, l'altra es troba en aigües temperades i quietes a poca altitud.

5.2.2 Gènere *Crenobia* (Kenk 1930)

El gènere *Crenobia*, de distribució europea, compren unes poques espècies d'hàbitats alpins (aigües fredes amb molta corrent), no gaire ben caracteritzades (fig. 10B).

L'única espècie que es troba als PP.CC. és *Crenobia alpina* (fig. 10B) localitzada al Pirineu i pre-Pirineu (fig. 12).

5.3 FAMILIA DENDROCOELIDAE (HALLEZ 1894)

La família Dendrocoelidae presenta dos caràcters sinapomòrfics que la defineixen com a grup monofilètic: presència a la zona interna de la faringe de fibres musculars transversals i longitudinals barrejades, i presència d'un òrgan adhesiu anterior. Són organismes de reproducció sexual amb escassa capacitat de regeneració.

Inclou 10 gèneres: *Dendrocoelum* (Oersted 1844), *Miodendrocoelum* (Beauchamp 1929), *Acromyadenium* (Beauchamp 1931), *Dendrocoelopsis* (Kenk 1930), *Rectocephala* (Hyman 1953), *Bdellocephala* (de Man 1874), *Procotyla* (Leidy 1857), *Macrotyla* (Hyman 1956), *Sorocelis* (Grube 1872) i *Neodendrocoelum* (Komarek 1926).

Als PP.CC. es troba un únic gènere: *Dendrocoelum* (fig. 11).



Fig. 11. Espècie pertanyent al gènere *Dendrocoelum*: *Dendrocoelum lacteum*.

5.3.1 Gènere *Dendrocoelum* (Oersted 1844)

Són organismes despigmentats, sovint anoftàlmics que viuen en hàbitats subterranis o en llacs o rierols propers a aquests.

Presenta varis subgèneres dels que solament 2 s'han localitzat als PP.CC.: *Dendrocoelum* i *Dendrocoelides*. El primer representat per l'espècie *Dendrocoelum lacteum* es localitza al Roselló i no s'ha trobat (encara?) al sud dels Pirineus. L'altre subgènere, trobat recentment per Ribas (1989) a Menorca, no s'ha pogut determinar a nivell d'espècie.

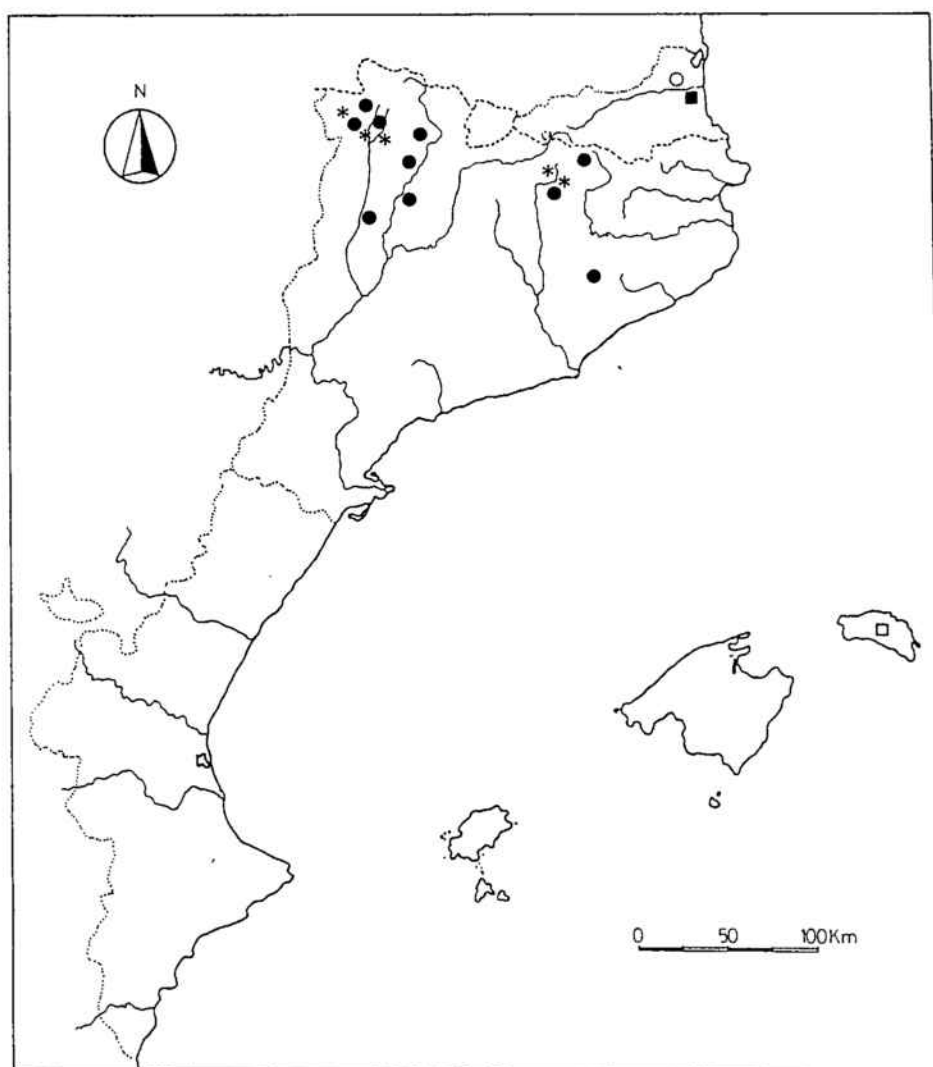


Fig. 12. Mapa de distribució de les espècies de les famílies Planariidae i famílies Dendrocoelidae als PP.CC.: *Polycelis felina* (●), *Polycelis nigra* (■), *Crenobia alpina* (*), *Dendrocoelum lacteum* (○) i *Dendrocoelum* (*Dendrocoelides*) sp. (□).

Objectius

PROBLEMATICA PLANTEJADA I OBJECTIUS

El posicionament filogenètic (i en conseqüència taxonòmic) de les planàries d'aigües dolces dins dels Turbellaris i el d'aquests dins dels Metazous en general és molt incert, i les tècniques i caràcters clàssics no semblen capaces de resoldre els problemes bàsics plantejats. Es fa necessari, doncs, aplicar noves metodologies i pensar en nous caràcters (bàsicament, proteïnes i àcids nucleics) que ofereixen les avantatges de subministrar un gran nombre de dades i permetre quantificar els canvis acumulats.

Del ventall de metodologies existents per analitzar aquests caràcters n'hem seleccionat tres en funció de la seva capacitat teòrica de resolució:

- el IEE de proteïnes totals, utilitzat de forma habitual per comparar races o poblacions pertanyents a una mateixa espècie o per comparar espècies molt properes;
- les tincions específiques per enzims, utilitzades tant com a tècnica diagnòstica per a races (Ayala, 1963) o espècies, com per a estudis de poblacions o estudis filogenètics a nivell d'espècie i de gènere;
- la seqüenciació del rRNA 18S, que ha donat resultats satisfactoris a nivells taxonòmics superiors: família, ordre, classe i filum.

L'aplicació d'aquests tres mètodes als platihelminths ha estat fins ara molt puntual i als Turbellaris, gaire bé nula. El que cal primer a planàries és veure a quins tàxons poden aplicar-se cadascun d'ells. Això es durà a terme fent estudis concrets sobre problemes que es plantegen en aquest grup des del nivell de poblacions fins al de classe i inclús el de filum, utilitzant les espècies de les que disposem a l'àrea corresponent als PP.CC. o a la Mediterrània Occidental.

Hem seleccionat així una sèrie de problemàtiques taxonòmiques i filogenètiques dels platihelminths que abasten aquest ventall taxonòmic:

1.- A nivell de la família Dugesidae, estudiar:

- a) el grau de diferenciació entre les classes morfològiques de *Dugesia (G) tigrina* definits per Ribas *et al.* (1989) i comprovar les hipòtesis d'una o de múltiples introduccions a Europa a partir de formes nadiues nord-americanes;
- b) el grau de diferenciació entre els biotips de les diferents espècies del grup *gonocephala*, assignar les formes asexuals a alguna de les espècies sexuals existents, i comparar l'existència de dos grans subgrups (De Vries, 1987);
- c) el grau de diferenciació entre els biotips de cadascuna de les dues espècies pertanyents al subgènere *Schmidtea* presents a la Mediterrània Occidental i comprovar la validesa de la hipòtesi biogeogràfica proposada per Baguña i col. sobre la distribució de *Dugesia (S) mediterranea* en aquesta àrea;

- d) les relacions filogenètiques entre les espècies dels tres subgèneres per discernir entre les hipòtesis contraposades de Ball (1977a) i de De Vries i Sluys (1991), i la possible necessitat d'assignar-los un rang taxonòmic superior.
- 2.- A nivell de la família Planariidae, comparar els gèneres confamiliars *Polycelis* i *Crenobia*.
- 3.- A nivell dels Tricladides paludícoles, determinar les relacions filogenètiques entre les 3 famílies existents, i comprovar la validesa de la divisió taxonòmica actual.
- 4.- Comparar els paludícoles amb altres platihelminths a nivell de seqüències del rRNA 18S per finalment, aprofitant la disponibilitat de dades de seqüències de rRNA 18S d'un gran nombre d'organismes, esbrinar l'origen primitiu o derivat dels platihelminths.

En resum, els objectius d'aquest treball són:

- 1.- Aplicar les tres metodologies escollides a l'anàlisi dels diversos problemes seleccionats, i quantificar el grau de diferenciació genètica dels diversos grups.
- 2.- De totes aquestes dades derivar-ne esquemes filogenètics per a ésser comparats amb els ja proposats a partir de dades morfològiques i cariològiques.
- 3.- Evaluar les conseqüències evolutives i taxonòmiques derivades dels punts anteriors.
- 4.- Fer una comparació de la capacitat resolutiva de les tres tècniques en el cas de les planàries d'aigües dolces (i dels platihelminths en general) i de la seva utilitat en l'establiment de taxonomies i filogènies.

Material i Mètodes

1. ESPECIES I POBLACIONS ESTUDIADES

Les espècies i poblacions estudiades es detallen a la taula 2.

Tàxons	Espècie	Localitat	Situació	Biotip	Cariotip	Reproducció	Anàlisi
							1 2 3
Cl. Turbellaria O. Seriata SubO. Tricladida							
Família Dugesiidae Gen. <i>Dugesia</i>							
<u>Subgen. <i>Dugesia</i></u>							
<i>Dugesia (D) ibérica</i> ⁺	Font Ullera	Berguedà	B	3n=24	fissipara	*	
	Emb. St Fé	Montseny	B	3n=24	fissipara	*	*
	Soller	Mallorca	A2	2n=16	sexuada	*	
	Sa Calobra	Mallorca	A1	2n=16	sexuada	*	
<i>Dugesia (D) sicula</i>	Tunel Vallvidrera	Barcelona	B	3n=27	fissipara	*	*
	R. Fluvià, Orfens	Girona	B	3n=27	fissipara	*	
	Tavolara	Itàlia	B	3n=27	fissipara	*	
	Linguidezza	Itàlia	B	3n=27	fissipara	*	
<i>Dugesia (D) benazzi</i>		Itàlia		2n=16		*	
		Itàlia		3n=24		*	
<i>Dugesia (D) biblica</i>		Israel		3n=27		*	
<u>Subgen. <i>Schmidtea</i></u>							
<i>Dugesia (S) polychroa</i>				n=4			
	Canals	València	A,B1i2	2n,3n	sexuada	*	*
	Vilanova de la Rao	Roselló	A,B1i2	2n,3n	sexuada	*	
	Sardenya	Itàlia	D	4n	sexuada	*	
<i>Dugesia (S) mediterranea</i>	Font fundació Miró	Barcelona	A2	2n=8	fissipara	*	*
	Bases de Lluriach	Menorca	B2	3n=12	fissipara	*	
	Sardenya	Itàlia	A1	2n=8	sexuada	*	
<u>Subgen. <i>Girardia</i></u>							
<i>Dugesia (G) tigrina</i>				n=8			
	Vilanova de la Rao	Roselló	A/B1	2n,3n	fissipara	*	
	R. Calders	Barcelona	A/B1	2n,3n	fissipara	*	*
	R. Magre	València	A/B2	2n,3n	fissipara	*	
	Torrent des barranc	Menorca	A/B2	2n,3n	fissipara	*	
	Torrent Benimel.la	Menorca	A	2n	sexuada	*	
Família Planariidae							
<u>Gènere <i>polycelis</i></u>							
<i>Polycelis felina</i>	Riera de Coforb	Berguedà		2n=18	sex/fis.	*	
<i>Polycelis nigra</i>	Closes T. Mornau	Empordà		2n=16	sexuada	*	
<u>Gènere <i>Crenobia</i></u>							
<i>Crenobia alpina</i>	Font Coll de Pal	Berguedà		2n=42	sex/fis.		*
Família Dendrocoelidae							
<i>Dendrocoelum lacteum</i>	Vilanova de la Rao	Roselló		2n=14	sexuades	*	*
<i>D. (Dendrocoelides) sp.</i>	Torrent Mesquida			2n=32	sexuada	*	
Cl. Turbellaria O. Rabdocoela							
Família Thyphloplanidae Subf. Mesostominae							
<i>Bothromesostoma personatum</i>							*
Cl. Trematoda O. Digenea							
Família Fasciolidae							
<i>Fasciola hepatica</i>							*

Taula 2. Espècies i poblacions estudiades. Anàlisis realitzades: 1 proteïnes total per isoelectroenfocament; 2 proteïnes per activitat enzimàtica i 3 seqüències de rRNA 18 S. Biotips, veure nota al peu de la pàgina 22.
+ *Dugesia (D) ibérica* es coneix també a la bibliografia com *Dugesia (D) subtentaculata*.

2. ISOELECTROENFOCAMENT DE PROTEINES TOTALS

2.1. PREPARACIO DE LA MOSTRA.

Abans de preparar la mostra, els organismes es mantenen en dejú durant una setmana per evitar la contaminació amb proteïnes alienes. Almenys 10 animals eren homogeneïtzats per sonicació (3x5'' a 35 w) en el doble del seu volum de tampó fosfat (10 mM, pH 7.2). L'homogenat es centrifugà 5 minuts a 12500 rpm. El sobrenadant es guardà congelat a -20° C o s'utilitzà immediatament.

La concentració proteica es determinà mitjançant el mètode de blau de Coomassie G-250 (CBB G-250), emprant l'albumina de sèrum de bou (BSA; Sigma) com a estàndard (Bradford 1976, modificat per Peterson, 1983). La concentració de proteïnes del sobrenadant oscil·lava entre 1,5-2 mg/ml.

2.2. ISOELECTROENFOCAMENT

S'utilitzà un aparell comercial Multiphor (LKB) i es feu en gels d'acrilamida (Fluka cristal·litzada x2) bisacrilamida (Fluka) (T: 4%, C: 3%) de 210 mm x 110 mm x 0.8 mm. S'emprà la següent barreja d'amfolines (2.4 % final, LKB):

pH 3.5-10	87,5 %
pH 4-6	6,25 %
pH 5-7	6,25 %

per a aconseguir un gradient de pH de 3 a 10. El pre-enfocament i enfocament es feren segons les directrius del fabricant (Karlson *et al.*, 1973).

2.3. TINCIO, SECAT I DENSITOMETRIA.

Els gels es tenyiren amb CBB R-250 (Serva Heidelberg) segons Karlsson *et al.* (1973) amb petites modificacions. A continuació es secaren entre paper celofan a temperatura ambient durant una nit i s'analitzaren per absorbència en un densitòmetre (Chromoscan).

2.4. ANALISI DE LES DADES.

Els patrons de bandes proteiques de les diferents poblacions es compararen en base a la presència-absència de cada banda. Aquest mètode té la desavantatge de que, al fer-se una comparació general de bandes proteiques, ens podem trobar amb que proteïnes de mobilitat similar o coincident en dues espècies puguin representar proteïnes diferents o bé que dues o més proteïnes polimòrfiques "superposades" donin una similitud en el patró general de proteïnes.

Evidentment, la manera d'evitar aquests problemes seria fer un examen específic per a cada proteïna (p.ex. per activitat enzimàtica). Malgrat això, aquesta metodologia pot ésser considerada vàlida ja que, si, d'una banda, en una comparació d'espècies congenèriques, d'entre les 30 a 50 bandes proteiques detectades per espècie moltes fossin grups de proteïnes, aquest efecte seria comú a ambdues i per tant no afectaria al resultat final. Per altre banda, si dues espècies comparades comparteixen un polimorfisme, llavors dos individus poden presentar diferents estats d'homozigosi i donar una diferència errònia. Segons Sarich (1977) la màxima probabilitat de que es doni aquest cas en un locus polimòrfic amb 2 al·lels a una freqüència de 0.5 és 1/8. En un patró complex de 30-50 bandes, i assumint que aproximadament 1/3 dels loci són polimòrfics, llavors, com a màxim 1 ó 2 bandes poden ésser interpretades incorrectament com a diferents. Aquest error encara es redueix més comparant com a mínim 2 individus per espècie, la probabilitat de 1/8 per locus es redueix llavors a 1/128. Donat que en el nostre estudi hem analitzat com a mínim 10 animals per població pensem que la probabilitat d'aquests errors és nul·la.

Per calcular la similitud entre els patrons proteics de les diferents poblacions es va utilitzar l'índex de Jaccard (Sneath, 1957),

$$S = \frac{a}{a + b} \quad (1)$$

on a = nº bandes comunes, i b = nº de bandes no coincidents. En aquest càlcul no s'inclouen aquelles bandes absents a les dues espècies comparades, ja que la no possessió comuna d'un tret no pot considerar-se indicativa d'una descendència comuna.

A partir de l'índex de similitud (S) es va calcular la distància genètica (D) per a cada combinació de poblacions utilitzant la fórmula de Nei (1971),

$$D = -\ln(S) \quad (2)$$

amb error standard,

$$ES(D) = \sqrt{\frac{1 - S}{S n}} \quad (3)$$

on n és el nombre total de bandes comparada en cada cas ($a + b$) i S la similitud (1).

D'aquestes distàncies i de les dades discretes es construïren arbres fenètics utilitzant els mètodes Unweighted Pair Group Method Average (UPGMA), additiu i de màxima parsimonia. A l'apartat 5 es fa una descripció de les diverses metodologies per a construir arbres utilitzades i de les seves característiques i propietats.

3. ELECTROFORESI PER A LA DETECCIO D'ENZIMS

3.1. LOCI ENZIMÀTICS ESTUDIATS.

Es van estudiar 24 activitats enzimàtiques de les quals 9 (taula 3) van donar resultats positius per a totes les espècies amb bandes ben definides i reproduïbles.

Oxidorreductases		
α -Glicerol-3-fosfat deshidrogenasa	1.1.1.8	DH
Malic deshidrogenasa	1.1.1.37	MDH
Isocitrat deshidrogenasa	1.1.1.42	ICD
Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa	1.1.1.49	Gd
Transferases		
Nucleosid fosforilasa	2.4.2.1	NP
Hidrolases		
Esterases	3.1.1.1	ES
Peptidases	3.4.11	PEP
Isomerases		
Manosa-fosfat isomerasa	5.3.1.8	MPI
Glucosa-fosfat isomerasa	5.3.1.9	GPI

Taula 3. Activitats enzimàtiques analitzades, amb el número del IUPAC i l'abreviatura del gen.

Aquests locus enzimàtics inclouen enzims de manteniment cel·lular molt generals i enzims implicats en vies metabòliques complexes. Pels segons esperarem un alt grau de conservació entre espècies, donat el seu caràcter vital per a les cèl·lules, mentre que els primers presentaran una variabilitat que pot arribar a ésser deu vegades més gran (Sarich, 1977). Aquests diferents graus de conservació els fan adequats per a la comparació filogenètica a nivells intermedis (de poblacions o espècies allunyades).

3.2. PREPARACIO DE LA MOSTRA.

Els animals es mantenien almenys dues setmanes sense menjar per evitar la detecció d'enzims procedents dels organismes dels que es podesin haver alimentat. Passat aquest període, es procedia a alimentar-les regularment amb fetge de bou, alimentant-les per últim cop un o dos dies abans de preparar la mostra ja que això resultava en un increment de l'activitat d'alguns enzims. El fetge era previament bullit per inactivar els seus enzims. Tot i això, s'utilitzava sempre una mostra de fetge com a control en les electroforesis per assegurar-nos que les bandes detectades a planàries no corresponien a cap de les del fetge.

Els extractes proteics es prepararen per homogeneïtzació en tubs eppendorf amb ajut d'una bareta de vidre (o bé d'una punta blava de micropipeta) en tampó fosfat (10 mM, pH 7.2). Es realitzà l'homogeneïtzació individual de cada organisme amb un volum de tampó aproximadament igual al seu. Quan els organismes eren molt petits (cas de *Polycelis nigra* p. ex.), s'homogeneïtzaven conjuntament 2 o 3 animals. A continuació, es centrifugava a 12.500 rpm en una microfuga durant 5 minuts i s'utilitzava el sobrenadant (aproximadament 15 µl) per carregar en el gel. Les mostres es preparaven sempre el mateix dia ja que la conservació per llargs períodes de temps, tot i estant congelats, altera la mobilitat d'alguns electromorfs (veure Harris & Hopkinson, 1976).

El nombre d'organismes analitzat per població i per enzim varià entre 10 i 40 depenent del nombre d'animals disponibles. En totes les electroforesis s'utilitzà com a patró fetge de bou.

3.3. ELECTROFORESI.

S'empraren gels de midó (Sigma) a una concentració del 10% en pes/volum. La composició dels tampons utilitzats per a cada enzim es resumeix a la taula 4.

Simbol del gen	Sistema de tampons	pH
DH	TC	8
MDH	TCL	8.6
ICD	TEM	7.5
Gd	TEB	9
NP	PH	7
ES	TC2	8.6
PEP	TBE	8.6
MPI	TC	8
GPI	PH	7

Taula 4. Composició dels tampons utilitzats per a cada enzim:

TC = 0.25 M Tris, 0.06 M àcid cítric; gel = 1/25 electrodes

TCL = 0.25 M Tris-HCl; gel = 1/5 electrodes

TEM = 0.1 M Tris, 0.01 M Edta, 1 mM MgCl₂, 0.1 M àcid malèic; gel = 1/10 electrodes

TEB = 0.08 M Tris, 1 mM Edta, 8.6 mM bòric; gel = electrodes

PH = 0.05 M K₂HPO₄, 0.033 M Na H₂PO₄; gel = 1/17 electrodes

TBE = 0.18 M Tris, 0.1 M àcid bòric, 4mM Edta; gel = 1/4 electrodes

TC2 = A = 0.05 M Tris, 7 mM cítric B = 0.76 M bòric, 0.2 M LiOH; elect. = 1B:3H₂O; gel = 9A:1B

3.4. REVELAT ENZIMATIC.

Els revelats enzimàtics es van fer segons mètodes clàssics (Harris & Hopkinson, 1976; Shaw & Prasad, 1970) amb lleugeres modificacions.

3.5. ANALISI DELS RESULTATS.

Per a cadascuna de les espècies o poblacions es prengué nota de la mobilitat de totes les bandes detectades, emprant sempre com a referència una de les bandes del estàndard utilitzat (fetge de bou). Els electromorfs corresponents a cada enzim s'han denominat amb les lletres del abecedari assignant l'A a la banda més ràpida i successivament amb les següents lletres. Per als electromorfs amb mobilitat negativa s'ha utilitzat la mateixa nomenclatura afegint un signe menys davant la lletra corresponent.

No s'han assignat els electromorfs a isoenzims o al·lels donada la complexitat que això representaria pel fet d'estar treballant amb espècies sexuades i asexuades amb diversos graus de poliploidia de les que no existeixen masses estudis previs. L'asexualitat i la poliploidia dificulten molt la interpretació dels patrons de bandes obtinguts, essent a més, en molts casos impossible el creuament per a la comprovació dels al·lelismes. Aquest motiu, sumat a la manca de polimorfisme intra-poblacional trobada en general, ens va dur a fer una anàlisi del patró total de bandes per presència-absència sense tenir en compte freqüències al·lèliques. Richardson, Baberstock i Adams (1986) consideren que per a la utilització de dades enzimàtiques en sistemàtica és justificat aquest tipus d'anàlisi per diverses raons. En primer lloc, perquè la contribució a la distància genètica entre dos OTUs feta per les diferències en les freqüències al·lèliques és insignificant en front a la contribució de les diferències fixades; per tant, excepte en el cas d'organismes molt polimòrfics (que no és el nostre cas), les diferències fixades per si soles reflexaran d'una forma raonablement acurada el grau de divergència genètica entre OTUs. Per altre banda, hi ha molt pocs loci que contribueixin a la diferenciació genètica entre OTUs degut a diferències en les freqüències al·lèliques que no siguin diferències fixades.

La comparació per presència-absència dels electromorfs es va realitzar pels mateixos mètodes descrits en el cas de l'isoelectroenfocament. La construcció d'arbres filogenètics es va dur a terme pels mètodes: UPGMA, màxima parsimonia i additiu. Les característiques i propietats dels diferents mètodes es discuteixen a l'apartat 5.

4. SEQUENCIACIO DEL RNA RIBOSOMIC 18 S

4.1. PRINCIPI DEL METODE

El protocol de seqüenciació és una variant del mètode de terminació de l'elongació de les cadenes per addició de dideoxis específics per a cada nucleòtid (Sanger *et al.*, 1977; Biggin *et al.*, 1983). Va ésser modificat per a l'ús de la transcriptasa inversa (Lane *et al.*, 1985) i de rRNA com a model. El mètode es basa en el fet de que certes regions de la seqüència del rRNA 18S varien poc o gens entre els diferents organismes. Això permet dissenyar uns oligonucleòtids curts, complementaris a aquestes regions universalment conservades, que s'hibridaran de forma específica a la seva seqüència diana en el rRNA 18S, fins i tot en presència d'altres RNAs

cel·lulars. L'oligonucleòtid serveix com a encebador per a la síntesi d'una cadena de DNA còpia que s'estén a partir de l'extrem 3' de l'encebador. La inclusió de petites quantitats de dideoxinucleòtids anàlegs del deoxinucleòtid en les reaccions de transcripció inversa resulta en la producció de DNAs còpia de longituds variables a l'atzar que estan específicament detingudes en un residu adenosina, guanosina, citidina o timidina, depenent de l'anàleg de deoxinucleòtid utilitzat. Les cadenes d'ADN còpia són marcades radioactivament mitjançant la incorporació de $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ durant la transcripció inversa. Quan un joc de reaccions deturades específicament a cada un dels quatre nucleòtids es corra en un gel d'electroforesi d'alta resolució s'obté un patró de bandes en un autoradiograma del gel, del que es pot llegir directament la seqüència de nucleòtids del DNA còpia.

4.2. EXTRACCIO DE RNA TOTAL.

El RNA total es va extreure pel mètode descrit per Chirgwin *et al.* (1979). S'utilitzaren uns 100 animals per extracció. Acabada la purificació, i després de l'última precipitació en fred, es netejà el RNA amb etanol absolut i es resuspengué en TRIS 10mM (pH: 7.6). Es mesurà les OD a 260 nm per calcular la concentració ($\text{OD}_{260} \times 50 \times 200 = \mu\text{g/ml}$) i finalment es guardà congelada a -20°C a una concentració de 2 mg/ml.

4.3. REACCIONS DE TRANSCRIPCIO INVERSA.

S'han utilitzat 5 encebadors (taula 5) que ens donen accés a varis dels dominis estructurals més interessants del rRNA 18S i que han permés en conjunt obtenir entre 1170-1424 nucleòtids de seqüència de cada rRNA 18S.

Nom			Seqüència			
1400	5'	1392	GUACACACCGCCCGU	1406	3'	
920	5'	906	AAACUUAAGGAU	920	3'	
740	5'	726	CGAAAGCAUUGCCAA	741	3'	
519	5'	519	CAGCAGCCGCGUAAUUC	536	3'	
325	5'	309	CCGGAGAGGGAGCCUG	324	3'	

Taula 5. Seqüències dels encebadors utilitzats per a la transcripció inversa, el nom fa referència a la posició dels nucleòtids a la seqüència del ratolí.

Per a cada RNA mostra i amb cadascun dels 5 encebadors utilitzats es feren 5 reaccions de seqüenciació, 4 contenint cadascun dels 4 inhibidors de l'elongació (ddCTP, ddATP, ddTTP o ddGTP) i una reacció control que contenia només els quatre dNTP's i cap ddNTP (Lane *et al.*, 1988).

4.4. ELECTROFORESI

S'empraven dos gels, un de 0.4 mm de gruix, 40 cm de longitud i 18 cm d'amplada, en gradient de tampó fet segons Biggin *et al.* 1983; tampó superior: 8% acrilamida, 0.04% bisacrilamida, 8 M urea i 0.5 x NNB; tampó inferior: 8% acrilamida, 0.04% bisacrilamida, 8 M urea, 2.5% NNB i 10% sucrosa. L'altre, de 0.4 mm de gruix a la part superior i 0.8 mm a la inferior, 60 cm de longitud i 18 cm d'amplada (tampó superior).

Els gels en gradient de tampó es feren correr a 35 watts (potència constant) fins que el blau de bromofenol arriba al final del gel (aprox. 2 h.). Els gels llargs, a 30 watts, el temps necessari per a que el xilen cianol arribi a l'extrem del gel (aprox. 7 h.). Després de l'electroforesi, els gels es sumergiren en solució fixadora (10% metanol, 10% acid acètic, 2% glicerol, vol:vol:pes en aigua) almenys una hora i es transferiren a paper Whatman 3MM. Després d'assecar-los (en un assecador de gels), s'exposaren a una pel·lícula sensible als raigs X (Kodak) durant 5 ó 6 dies, o tant com fos necessari.

4.5. ALINEACIO DE LES SEQÜENCIES.

Les seqüències es van alinear amb altres ja conegudes. L'alineació consisteix en la definició de la correspondència una a una de cada posició de les seqüències per a totes les molècules. Aquest procés és necessari ja que per a fer anàlisis filogenètiques cal comparar característiques homòlogues, és a dir, característiques derivades a partir del mateix caràcter de l'organisme ancestral comú.

L'alineament és du a terme buscant primer similituds obvies entre les dues seqüències i llavors juxtaposant aquestes regions similars. On és necessari, s'introdueixen "gaps" (buits) d'alineament (indicats per guions) que corresponen a nucleòtids d'una seqüència que falten a l'altra.

Com a ajut a l'alineació, especialment en aquelles regions de la seqüència que poseeixen poca similitud en la seva estructura primària, és de gran utilitat emmotllurar-les a la seva estructura secundària comú (Gutell *et al.*, 1985) i llavors alinear-les. Finalment, si l'alineament d'una regió no es pot definir clarament s'exclou de l'anàlisi.

4.6. QUANTIFICACIO DE LA SIMILITUD ENTRE SEQÜENCIES.

La similitud de dues seqüències es defineix generalment com la fracció de posicions de la seqüència que contenen nucleòtids idèntics. Es calcula:

$$S = M / L, \quad (4)$$

$$L = M + U + w_G G \quad (5)$$

on S és la similitud entre seqüències, L és la longitud efectiva de la seqüència, M és el nombre de posicions de la seqüència amb nucleòtids idèntics, U és el nombre de posicions de les

seqüències amb nucleòtids no idèntics, w_G és el pes donat a les posicions de la seqüència amb un gap juxtaposat amb un nucleòtid a l'altre seqüència (en el nostre cas utilitzem el valor de 0.5), G és el nombre de posicions en que es dona aquest cas.

A partir de les similituds es calculen les distàncies evolutives per a construir els arbres additius i UPGMA. Les distàncies evolutives entre dues espècies es defineixen com la mitjana de mutacions puntuals fixades per posició de la seqüència en el llinatge que les uneix. Ara bé, el nombre de diferències entre seqüències observat és de fet inferior al nombre de mutacions fixades (com a conseqüència principalment de la ocurrència de mutacions múltiples a una mateixa posició de la seqüència). Jukes i Cantor (1969) van derivar una equació per estimar distàncies evolutives a partir de la similitud de seqüències observada:

$$D = -3/4 \ln[4/3(S - 1/4)], \quad (6)$$

on D és la distància evolutiva estimada, S és la similitud entre seqüències observada i $\ln$ és el logaritme natural. La derivació d'aquesta fórmula assumeix que: 1) totes les posicions tenen una probabilitat igual i independent de mutar, 2) les mutacions de qualsevol nucleòtid a qualsevol dels nucleòtids alternatius són igualment probables i 3) no hi ha ni insercions ni deleccions. Degut a les simplificacions introduïdes per aquestes assumpcions, la correcció per mutacions sobreposades és conservativa.

Les distàncies evolutives s'han utilitzat en la realització d'arbres additius i UPGMA. A partir de les seqüències directament s'han derivat també arbres de màxima parsimonia.

5. ARBRES FILOGENETICS

En aquest estudi hem utilitzat diversos mètodes per a la construcció d'arbres filogenètics. Ajustarem la seva descripció a la classificació dels mètodes filogenètics que hem fet a la introducció.

5.1. ARBRES BASATS EN UNA MATRIU DE DISTANCIES

5.1.1. Mètode UPGMA.

El "Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages" (UPGMA) va esser desenvolupat per Michener i Sokal (1957) i, malgrat que originalment va esser dissenyat per a la construcció de fenogrames, també pot utilitzar-se per elaborar arbres filogenètics, en especial si els valors esperats de la distància amb la que es treballa són proporcionals al temps. Per aquest motiu l'UPGMA assumeix que el ritme de substitucions és aproximadament constant en totes les branques de l'arbre. Una descripció de l'algoritme pot trobar-se a Nei (1987).

Per a la realització dels càlculs i dels gràfics es va utilitzar el paquet de programes CLUSTAN 3 (Copyright CLUSTAN Ltd., Edinburgh University, 1986). Les desviacions de cada nus (bifurcació) de l'arbre es van calcular segons Nei *et al.* (1985). Com a mesura d'ajust entre les distàncies originals i les obtingudes en l'arbre es va utilitzar el coeficient de correlació cofenètica.

5.1.2. Mètode dels Mínims Quadrats.

El mètode dels Mínims Quadrats (MQ) és un mètode additiu descrit originalment per Cavalli-Sforza i Edwards (1967). S'ha realitzat a partir del programa FITCH del paquet PHYLIP 3.1 (Felsenstein, University of Washington).

Les suposicions d'aquest mètode poden resumir-se en:

1. Les distàncies estimades són independents entre elles.
2. La distància entre les parelles d'OTUs de l'arbre es dibuixa segons un valor esperat, que és la suma dels valors al llarg de les branques de l'arbre que uneixen cada parella d'OTUs. La variança de l'error de les distàncies esperades és proporcional al quadrat de les mateixes.

El seu algoritme es basa en minimitzar la suma de quadrats (SQ) calculada segons:

$$SQ = \sum (d_{ij}(\text{obser}) - d_{ij}(\text{arbre}))^2 \quad (7)$$

El resultat és un arbre sense arrel. Com a mesura de la bondat de l'arbre obtingut es dona el valor del percentatge de la desviació típica (σ):

$$\sigma = \frac{2 SQ}{N(N-1)} \quad 100 \quad (8)$$

on N és el nombre d'espècies.

D'aquest algoritme poden resultar branques de l'arbre amb valors negatius que són matemàticament admissibles, però amb difícil interpretació des del punt de vista biològic. El programa FITCH permet treballar restringint-nos només a valors positius.

Aquest mètode és molt similar al de Fitch i Margoliash (1967) diferenciant-se d'aquest per la forma en que sospesen la desviació entre les distàncies observades i les esperades. El mètode dels mínims quadrats resol més bé aquells casos en que l'error en la estimació de les distàncies és pràcticament constant tan si aquestes són grans com si són petites; en canvi, el mètode de Fitch i Margoliash és més adequat quan és el percentatge (error relatiu) el que es manté constant (és a dir l'error per a distàncies grans és més gran que l'error per a distàncies petites).

5.2. ARBRES BASATS EN DADES DISCRETES

5.2.1. Mètode de Màxima Parsimonia.

La base del mètode de Màxima Parsimonia (MP) consisteix en intentar inferir les seqüències (ja sigui nucleotídica o binària) de les espècies ancestrals i escollir l'arbre que necessiti un nombre de canvis mínim. El resultat és una topologia (ordre d'embranchament) en que no queden ben determinades les longituds de les branques.

Per la seva elaboració s'ha utilitzat el programa PENNY del paquet PHYLIP abans esmentat. Per trobar els arbres més parsimoniosos aquest programa no examina tots els arbres possibles, sino que utilitza l'algoritme denominat "branch and bound", que és una estratègia estandard de recerca en la ciència d'ordinadors aplicada per primer cop a l'inferència filogenètica per Hendy i Penny (1982).

L'algoritme treballa agrupant primer les dues primeres espècies i a continuació la tercera en totes les possibles posicions, per a cadascuna d'aquestes possibilitats situa la quarta en totes les possibles posicions i així successivament. D'aquesta manera analitzaria tots els possibles arbres. Incorpora però un petit canvi: a mesura que es construeix cada arbre, incloent els arbres parcials, s'evalua el seu nombre de pasos. A més, es fa una predicció del nombre de pasos que s'afegirien, com a mínim, a mesura que s'afegeixen espècies. Aquesta predicció permet eliminar línies senceres d'anàlisi i construcció d'arbres perquè ja es pot preveure per endavant que el nombre final de pasos serà superior al de l'arbre més parsimoniós que es té fins al moment. Així aquest mètode permet trobar tots els arbres més parsimoniosos sense que calgui analitzar tots els arbres possibles.

Aquest mètode fa les següents suposicions:

1. No coneixem l'estat ancestral de cap caràcter.
2. Els canvis en posicions diferents són independents.
3. Els canvis en llinatges diferents són independents.
4. Les substitucions són improbables en el període de temps donat per la divergència del grup.
5. Les taxes d'evolució en els llinatges no són tan diferents com per que dos canvis en un segment llarg de l'arbre siguin més probables que un canvi en un segment curt.

En el cas de treballar amb seqüències el canvi d'una posició ocupada a una delecció es compta com una substitució. La reversió d'una delecció a una posició ocupada no es permet.

Per a les variables discretes de tipus binari existeixen dues assumpcions més:

6. Els canvis $0 \rightarrow 1$ tenen igual probabilitat que els $1 \rightarrow 0$.
7. Altres tipus d'esdeveniments evolutius com la retenció de polimorfismes són molt menys probables que els canvis $0 \rightarrow 1$.

5.2.2. "Bootstrap".

El problema de qualsevol mètode per inferir filogènies és trobar els límits de confiança per a les topologies trobades. En el cas de la parsimonia, per exemple, podem obtenir un arbre que requereixi 50 passos com a millor, però tenir-ne 3 que en requereixen 48. Fins a quin punt és millor el primer que qualsevol dels altres? Per resoldre aquest problema s'han suggerit diverses solucions (Cavender, 1981; Templeton, 1983). Un mètode estadísticament ben basat i que dona resultats ben interpretables és el "bootstrap" (Efron, 1979).

El mètode, purament estadístic, va esser adaptat a la inferència de filogènies per Felsenstein (1985). El que ens permet aquest mètode és obtenir els grups monofilètics que ens venen donats per les dades amb un cert interval de confiança. Consisteix en anar fent mostreigs repetits de subgrups de les dades amb reemplaçament. En el cas de les filogènies això implica agafar subgrups dels caràcters per a totes les espècies, en els que pot haver caràcters repetits, i cada cop inferir la topologia (pel mètode de parsimonia). Aquest procés repetit n vegades ens dona lloc a una serie de grups d'espècies que s'hauran repetit en un nombre x d'aquestes n probes. Si aquest nombre és superior al 95% es pot considerar el grup donat com a monofilètic.

Resultats

1. ISOELECTROENFOCAMENT

Aquesta tècnica s'ha emprat per comparar espècies properes i poblacions de la mateixa espècie (taula 2). En cada gel es varen detectar un total d'entre 72 i 92 bandes. Per a cada espècie, el nombre de bandes detectades oscil·la entre 20 i 47. Les matrius de distàncies obtingudes es troben en els resultats corresponents a cadascun dels grups analitzats per aquest mètode (veure apartats 4.1.1.-4.1.3. i 5-6).

Malgrat observar una manca de reproduïbilitat entre gels, hem pogut comprobar que la distància genètica final obtinguda per a la majoria de parelles de poblacions en gels diferents es mou dins de valors molt propers i per tant comparables. Aquesta manca de reproduïbilitat fa que la tècnica no tingui valor diagnòstic per poblacions o espècies (cosa que hagues estat desitjable). Malgrat això, hi ha en alguns casos bandes prominents que permetrien aquesta diagnosi (fig. 13A). Es de destacar també l'absència de polimorfisme entre individus (fig. 13A-C), per a diverses poblacions, tant sexuades com fissípares, de diverses espècies.

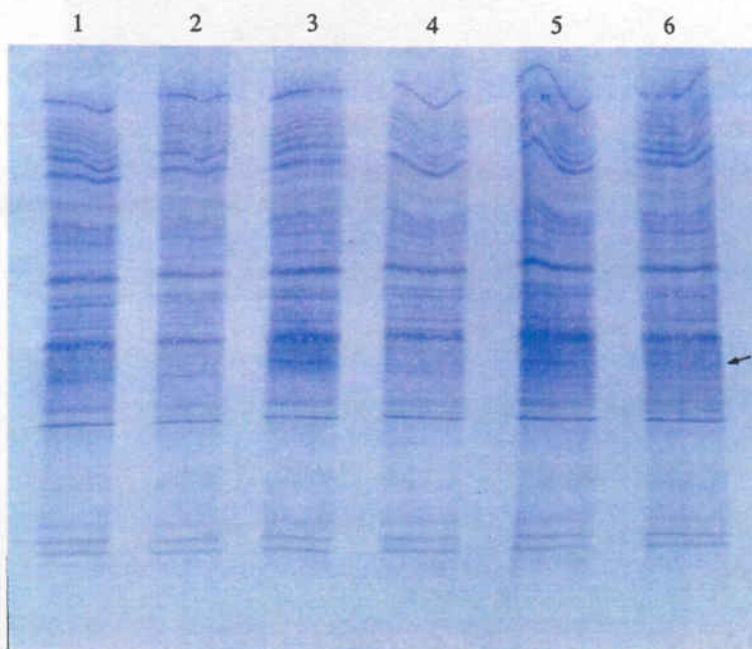


Fig. 13. A. *Dugesia (S) polychroa*. Cada pista correspon a un individu. 1, 2 i 4, triploids de 12 cromosomes; 3, 5 i 6, diploids de 8 cromosomes. En aquests darrers s'observa una banda prominent (sageta) absent a les triploids. La resta del patró és idèntica a tots els individus.

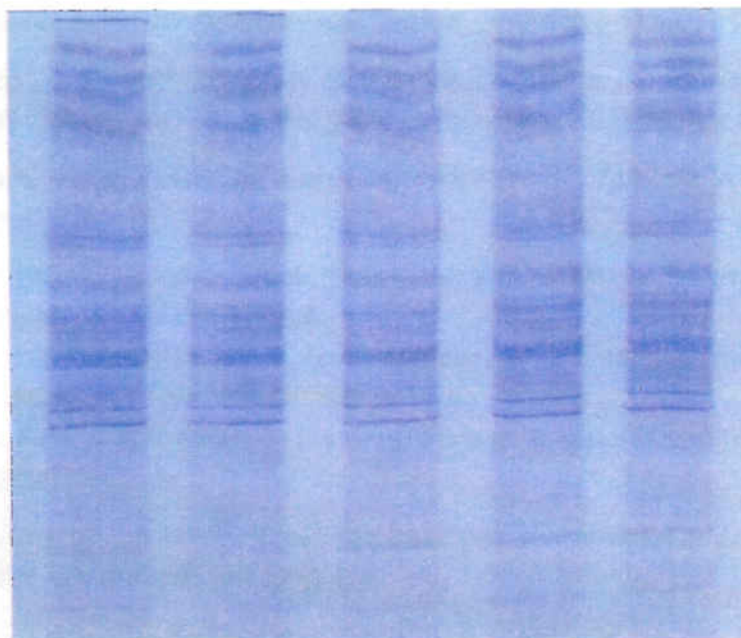


Fig. 13. *B. Dugesia (D) sicula* (València) $3n=27$, fissípara. Cada pista correspon a un individu. S'observa la manca total de polimorfisme a aquest nivell d'anàlisi.

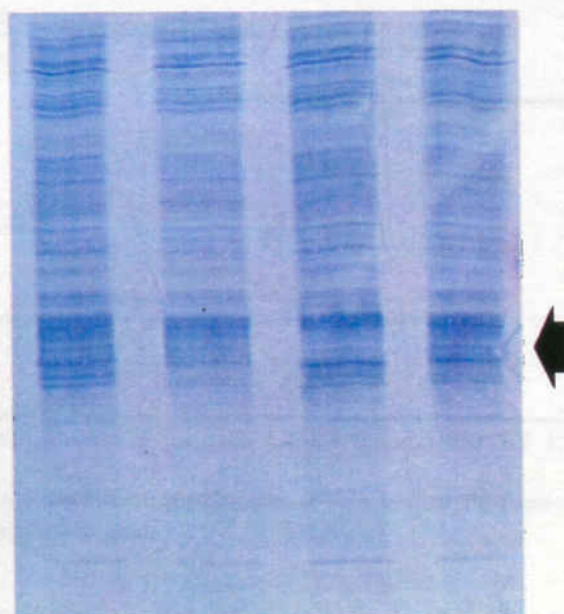


Fig. 13. *C. Crenobia alpina* ($2n=42$). Espècie amb alternància sexual/fissípara. La regió central del gel (sageta) presenta una petita zona de polimorfisme.

A nivell filogenètic, aquest mètode permet una bona resolució a nivell de biotips (cariotípicament diferents) d'una mateixa espècie i ha permès fins i tot arribar a quantificar distàncies genètiques entre espècies d'un mateix subgènere (gènere).

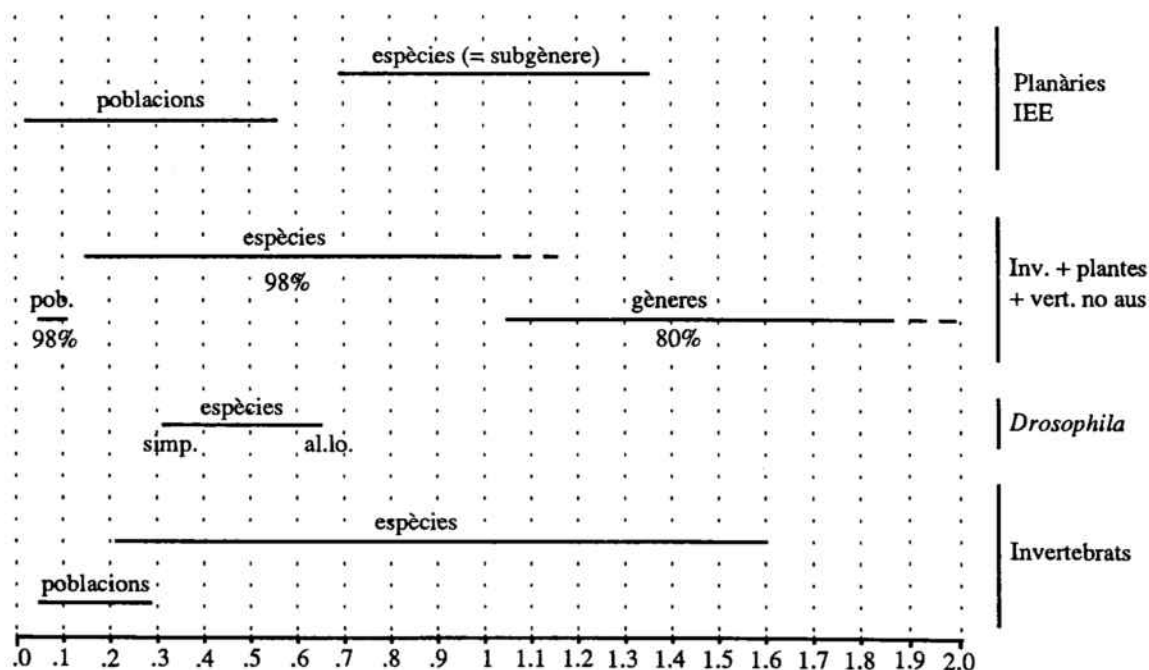
Es interessant comparar les distàncies trobades amb les publicades per altres autors (Thorpe, 1983; Avise, 1983). Per a invertebrats, Thorpe troba (taula 6) que:

- a) per a poblacions conespècífiques els valors de D varien entre 0.05 i 0.29,
- b) per espècies del mateix gènere els valors oscilen entre 0.22 i 1.61.

En un estudi probabilístic, més ampli, incloent vertebrats (excepte Aus), invertebrats i plantes trobà que:

- a) entre poblacions con-espècífiques tant sols el 2% de les estimes de D queden per damunt de 0.11,
- b) entre espècies congenèriques aproximadament la mateixa proporció d'estimes (2%) queden per sota de 0.16,
- c) un 80% de les estimes de D entre gèneres de la mateixa família cauen per damunt de 1.05.

Finalment, Coyne i Orr (1989) troben per a espècies simpàtriques de *Drosophila* una $D=0.31$ i per a espècies al·lopàtriques una $D=0.66$.



Taula 6. Comparació dels marges de les distàncies obtingudes en diferents treballs (veure text) i l'obtingut en aquest per isoelectroenfocament per a planàries.

Les nostres dades donen per a poblacions interespecífiques valors que oscil·len entre 0.021 de *Dugesia (S) mediterranea* (taula 17) i els 0.56 de *Dugesia (D) iberica* (taula 16). Aquest darrer valor és molt alt per a poblacions interespecífiques.

Per a les espècies pertanyents a un mateix subgènere els valors oscil·len des de 0.69 (*Dugesia (D) iberica* / *Dugesia (D) benazzi*, taula 14) fins a 1.36 (*Dugesia (S) mediterranea* / *Dugesia (S) polychroa*, taula 17) quedant dins dels marges donats per a espècies congenèriques.

A nivell d'electroenfocament no ha estat possible establir comparacions entre els tres subgèneres de *Dugesia*, i menys encara, entre les tres famílies.

2. ANALISI ENZIMATICA

Emprant aquest mètode s'han comparat un total de nou espècies: cinc espècies pertanyents als tres subgèneres del gènere *Dugesia*, família Dugesiiidae (*Dugesia (S) polychroa*, *Dugesia (S) mediterranea*, *Dugesia (D) sicula*, *Dugesia (D) iberica* i *Dugesia (G) tigrina*), tres espècies pertanyents a la família Planariidae (*Crenobia alpina*, *Polycelis felina* i *Polycelis nigra*) i una pertanyent a la família Dendrocoelidae (*Dendrocoelum lacteum*) (taula 2). A la fig. 14 es troba una representació del patró de bandes per a cada espècie i enzim. En total, pels 9 enzims es van contabilitzar 107 electromorfs.

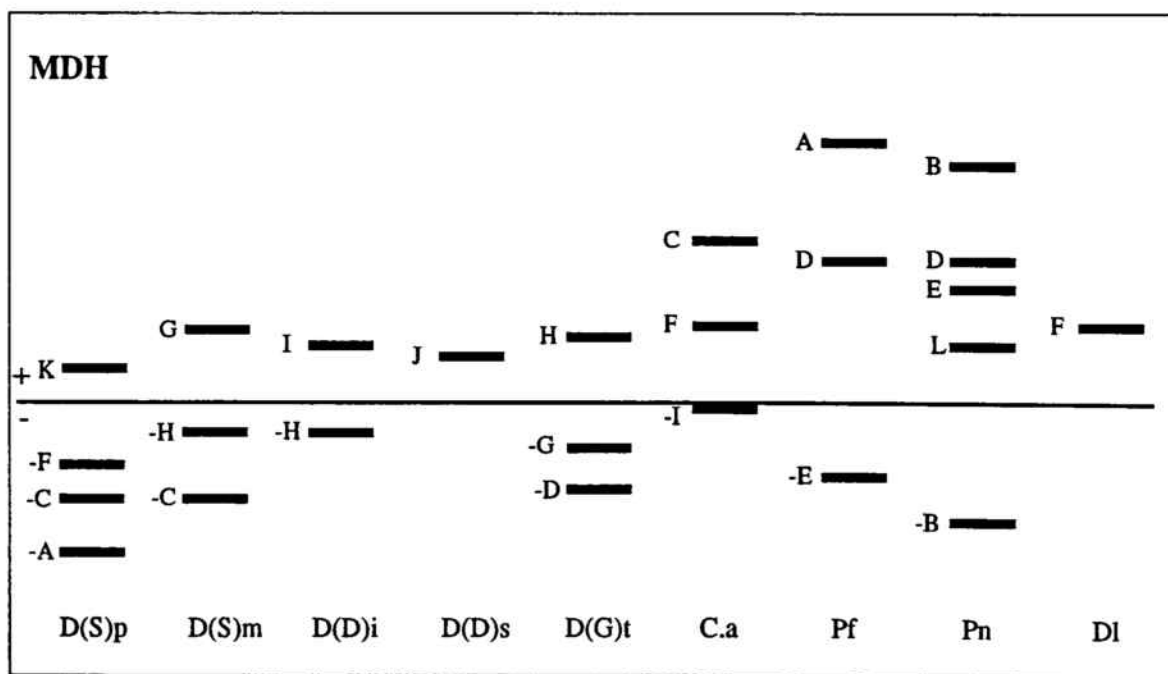


Fig. 14. Esquema dels electromorfs obtinguts per a cadascuna de les activitats enzimàtiques analitzades. Continua a la pàgina següent.

Fig. 14. Continuació

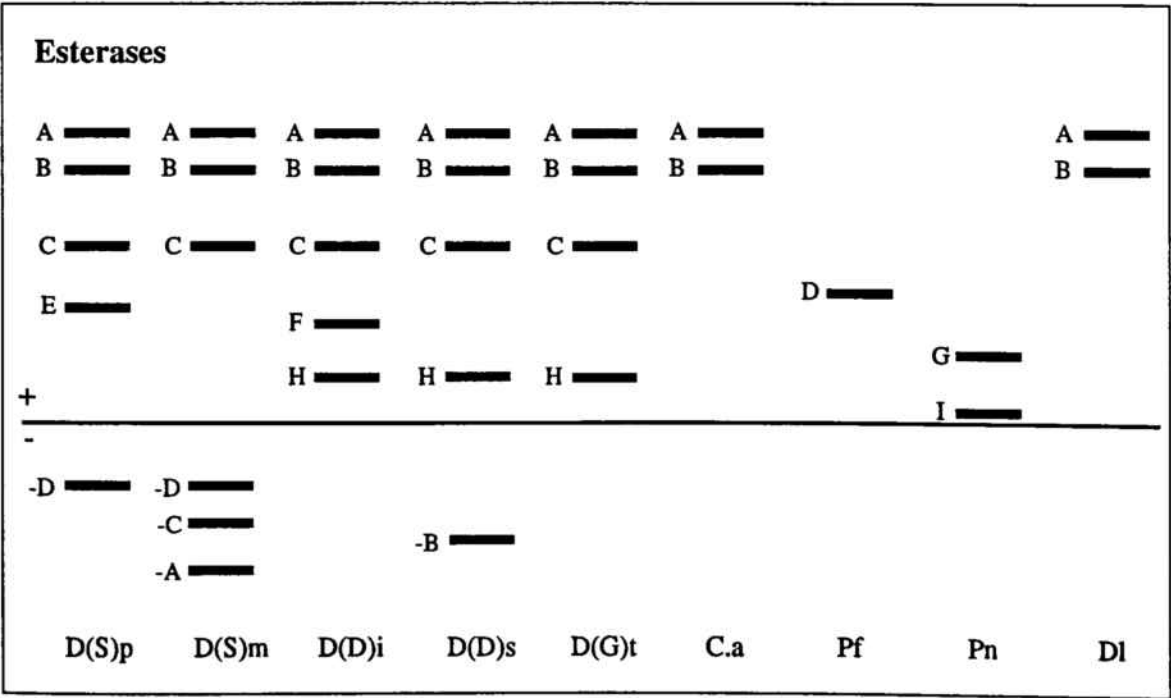
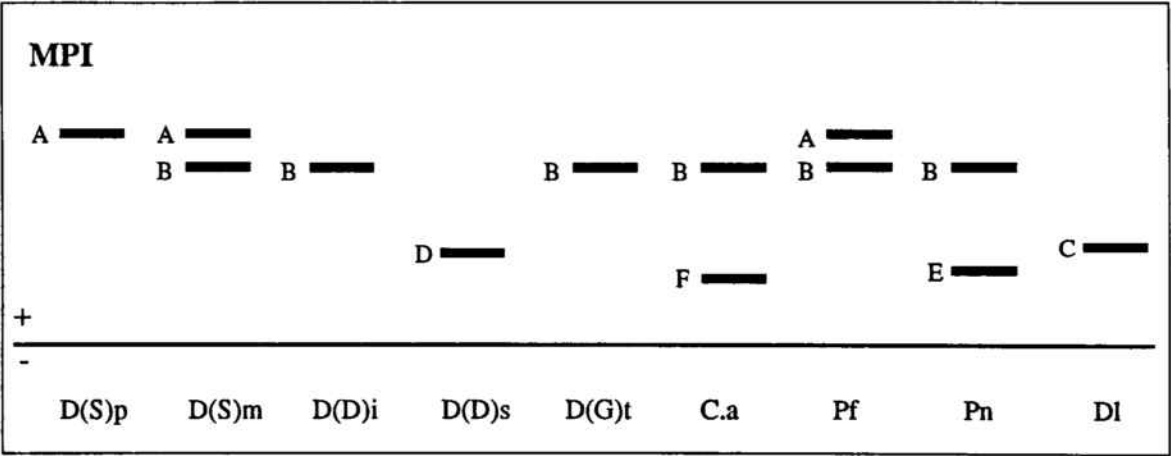
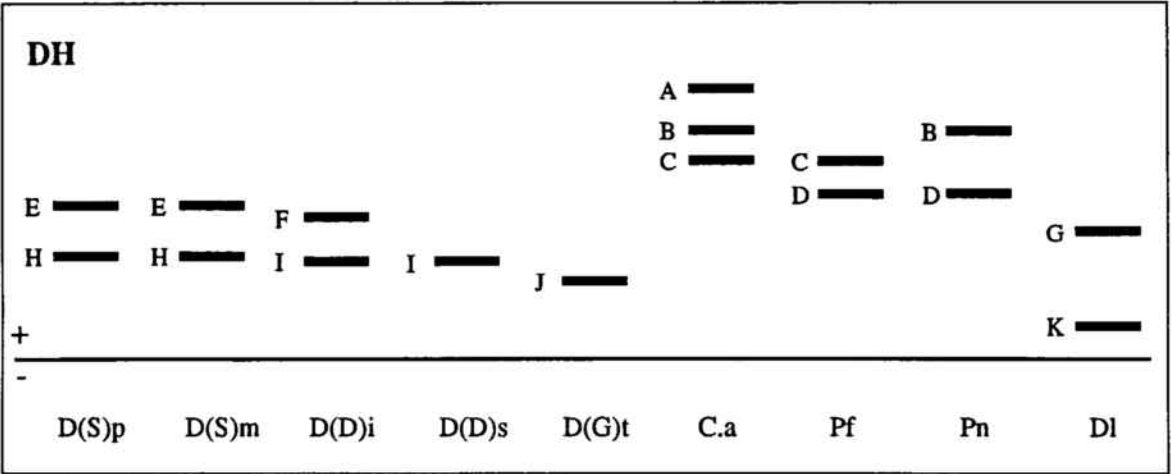


Fig. 14. Continuació

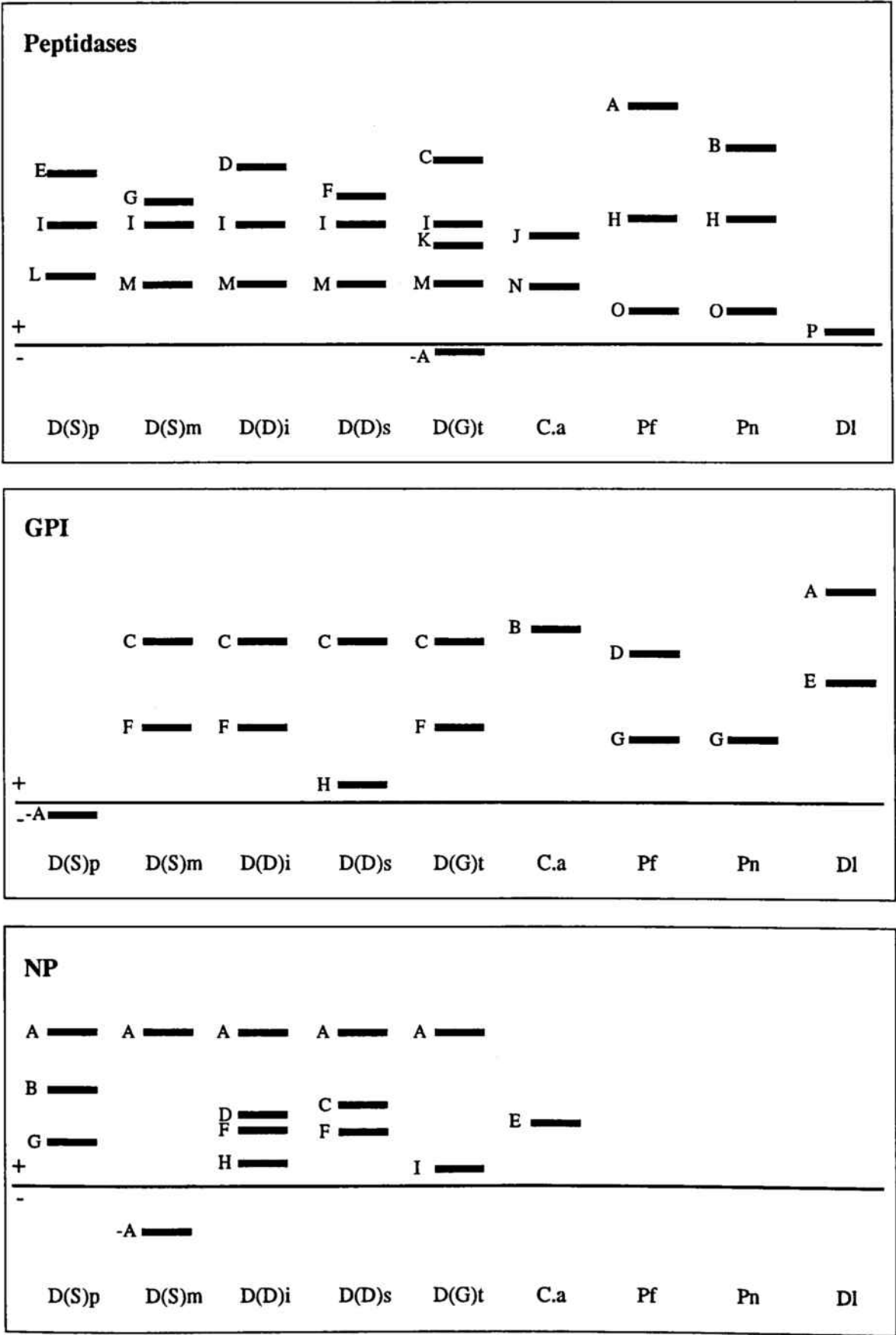
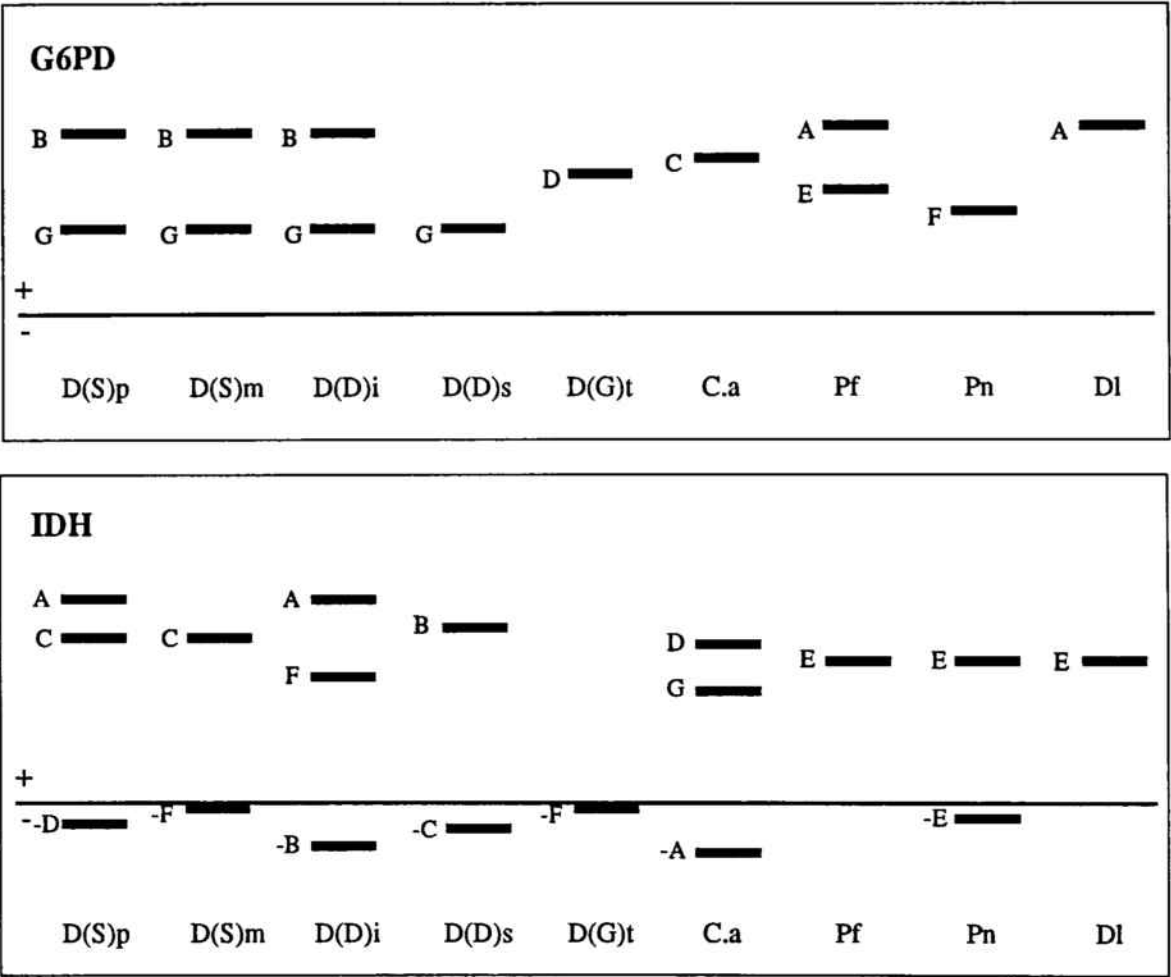


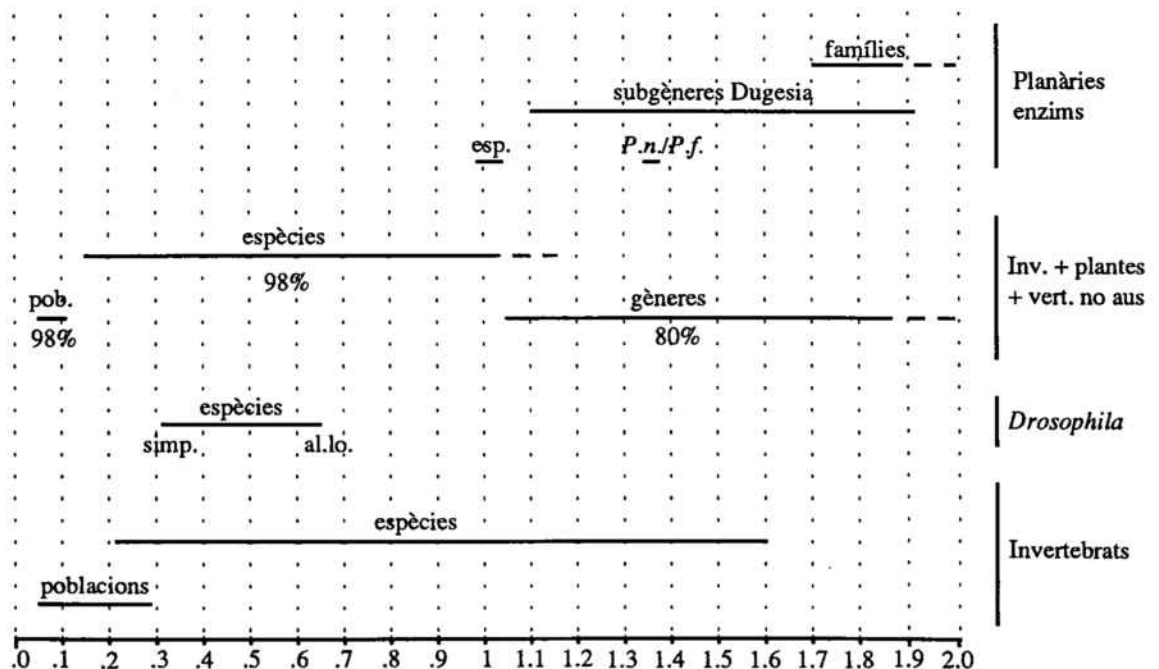
Fig. 14. Continuació



Per a cap dels enzims assajats no s'ha observat polimorfisme entre els individus d'una mateixa població amb l'excepció de *Polycelis nigra* per a la Mdh, *Polycelis felina* per a MPI i *Crenobia alpina* per a la NP. En els tres casos, un individu del total analitzat (12 per *Polycelis nigra*, 15 per *Polycelis felina* i 20 per *Crenobia alpina*) presentava una banda amb una movilitat lleugerament diferent. A l'establir les comparacions aquesta variant es va ignorar. La matriu de distàncies obtinguda es presenta a la taula 7.

	D					P			Dd D.L.
	D(S)p.	D(S)m.	D(D)i.	D(D)s.	D(G)t.	C.a.	P.f.	P.n.	
D(S)p.	-								
D(S)m.	0.99±0.22 35	-							
D(D)i.	1.61±0.31 41	1.10±0.24 36	-						
D(D)s.	1.74±0.37 35	1.42±0.29 37	1.04±0.24 31	-					
D(G)t.	2.00±0.42 37	1.19±0.26 33	1.16±0.26 33	1.23±0.20 58	-				
C.a.	2.94±0.68 39	2.49±0.55 36	2.51±0.55 37	2.76±0.68 32	2.36±0.55 32	-			
P.f.	3.51±0.99 33	2.80±0.68 33	3.47±0.99 32	* 28	3.38±0.99 29	2.65±0.68 28	-		
P.n.	* 35	3.57±0.98 36	3.54±0.99 34	* 29	3.44±0.99 31	3.41±1.00 29	1.35±0.33 27	-	
D.L.	2.40±0.67 22	2.44±0.68 23	2.44±0.68 23	2.20±0.63 20	1.70±0.49 19	1.81±0.48 22	2.25±0.67 19	2.99±1 19	-

Taula 7. Distàncies genètiques calculades a partir de les dades enzimàtiques. Les xifres representen la distancia genètica ± error estandard i el nombre total de bandes proteiques comparades per a cada parella d'espècies.
* S=0.



Taula 8. Comparació dels marges de les distàncies obtingudes en diferents treballs (veure text) i l'obtingut en aquest amb l'anàlisi per activitats enzimàtiques per a planàries. No s'ha pogut incloure en la taula la comparació entre els gèneres *Crenobia* i *Polycelis* que tenen una D promig de 3.

Hi ha tres parells d'OTUs que no comparteixen cap banda (*Dugesia (S) polychroa*-*Polycelis nigra*, *Dugesia (D) sicula*-*Polycelis felina* i *Dugesia (D) sicula*-*Polycelis nigra*). Al construir els arbres filogenètics es van eliminar de l'anàlisi almenys una espècie de cadascuna d'aquestes parelles. Així, s'eviten els artefactes que generaria introduir un parell d'OTUs amb distància infinita o excessivament gran.

A l'igual que en el cas de les proteïnes totals, s'han comparat les distàncies obtingudes amb les recopilades per Thorpe (1983)(veure apartat anterior)(taula 8). Per a espècies d'un mateix subgènere trobem els valors de 0.99 (*Dugesia (S) mediterranea*/*Dugesia (S) polychroa*) i 1.04 (*Dugesia (D) iberica*/*Dugesia (D) sicula*), amb valor promig de 1.015. Aquests valors són comparables als trobats per IEE, malgrat que per les dues espècies del subgènere *Schmidtea* el valor trobat amb enzims és bastant més baix que el de IEE.

Entre subgèneres congenèrics trobem valors de D entre 1.1 (*Dugesia (D) iberica*/*Dugesia (S) mediterranea*) i 2.0 (*Dugesia (S) polychroa*/*Dugesia (G) tigrina*) amb valor promig de 1.42. En aquest cas els valors són clarament comparables amb els trobats per a gèneres d'una mateixa família (Thorpe, 1983). Entre gèneres d'una mateixa família sols hi ha una comparació: *Polycelis*/*Crenobia*, amb valors de D de 2.65 i 3.41.

Les distàncies trobades entre espècies pertanyents a diferents famílies varien entre 1.7 (*D. lacteum* / *Dugesia (G) tigrina*) i 3.57 (*Polycelis nigra* / *Dugesia (S) mediterranea*), amb un valor promig de 2.75. No hi ha dades de referència per aquest nivell taxonòmic, si bé és evident que els valors són molt alts, essent, en promig, molt per damunt de l'esperat per a gèneres con-familials.

3. SEQUÈNCIES DE rRNA 18S

Amb aquest mètode s'han comparat cinc espècies de planàries, tres pertanyents a cadascun dels subgèneres del gènere *Dugesia* (*Dugesia (S) mediterranea*, *Dugesia (D) iberica* i *Dugesia (G) tigrina*), una pertanyent a la família Planariidae (*Crenobia alpina*) i una pertanyent a la família Dendrocoelidae (*Dendrocoelum lacteum*). A més s'han seqüenciat també dos platihelminths no triclads: un neorabdocel (*Bothromesostoma personatum*) i un trematoda (*Fasciola hepatica*) (Taula 2). De totes aquestes espècies exceptuant *Dugesia (G) tigrina* (Field *et al.*, 1988) es va seqüenciar el rRNA 18S.

A la taula 9 (pàgines 56-62) es detallen les seqüències del rRNA 18S de totes les espècies estudiades, alineades i amb les màscares utilitzades per a la comparació. Aquestes màscares presenten 1s en les posicions utilitzades i 0s per les posicions que no han entrat en la comparació degut a la incertesa de l'alineament. Per a la comparació entre platihelminths, s'han considerat en total 1017 posicions. A la figura 15 (pàgines 63-69) es detallen les estructures secundàries d'aquestes seqüències utilitzades per dur a terme un alineament correcte.

- 56 -

Taula 9. Continuació.

[illegible][illegible][illegible][illegible][illegible]

Taula 9. Continuació.

[illegible][illegible][illegible][illegible][illegible]

[illegible][illegible][illegible]

[illegible]

[illegible]

			1.....2.....+..	
1	1651	F.h.	CAUGUGCGCUGAUUACGUCCCUGCCCU	F.h.
2	1651	B.p.	CACUUGCGNNGAUUACGUCCCUG	B.p.
3	1651	D.t.		D.t.
4	1651	D.i.	UAUGUGCGCUGAUUACGUCCCUGCCCU	D.i.
5	1651	D.m.	CUCUUGCGCUGAUUACGUCCCUGCCC	D.m.
6	1651	C.a.		C.a.
7	1651	D.l.	NAK-UGCGCUGAUUACGUCCC	D.l.
8	1651	masc	000000000000000000000000000000	masc

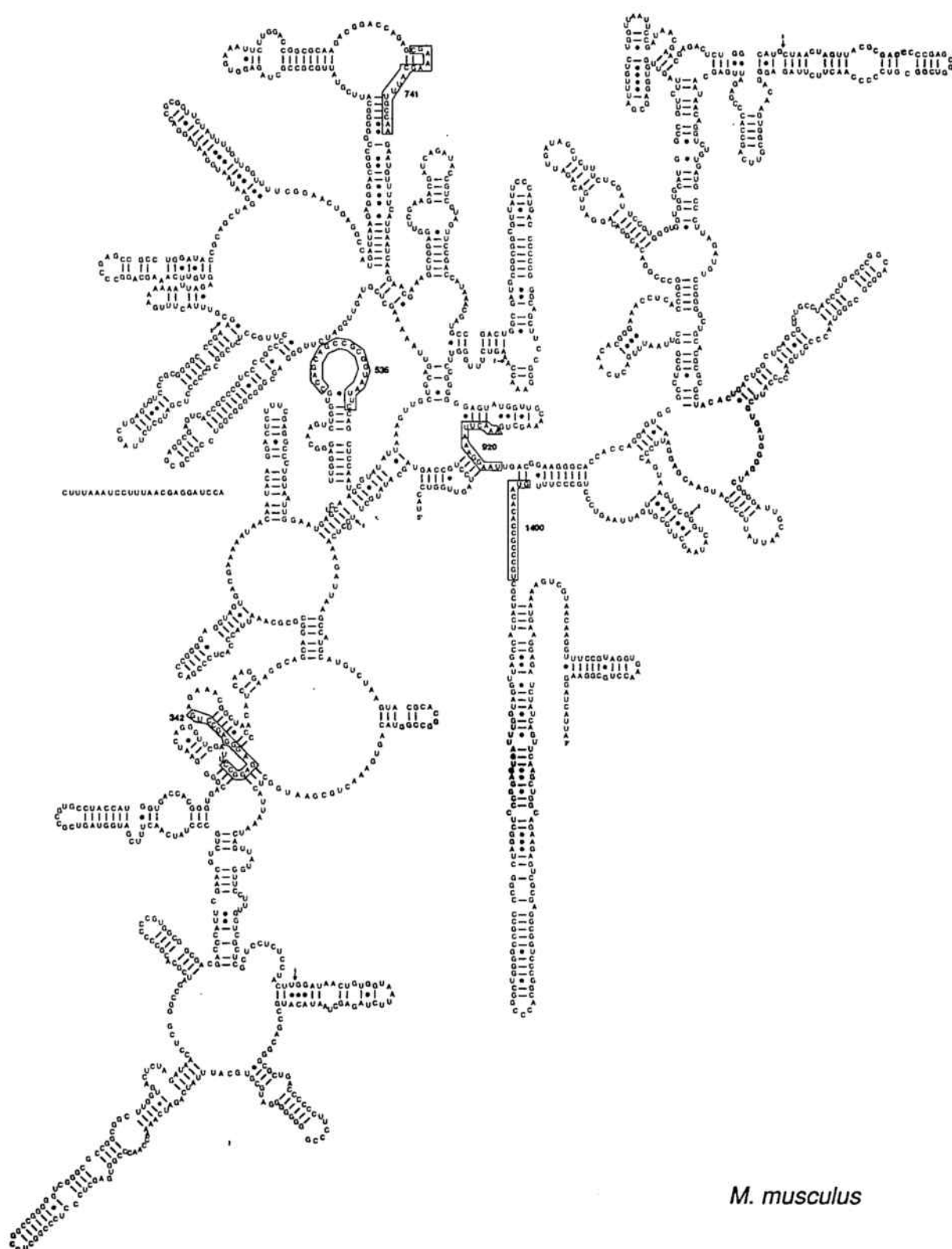


Fig. 15 A) Estructura secundària del rRNA 18S de *Mus musculus* (Raynal *et al.*, 1984) en la que s'ha basat l'alineació de la resta de seqüències. Sobre aquesta estructura s'ha representat les posicions dels encebadors utilitzats i els punts d'inici i final de la màscara utilitzada.

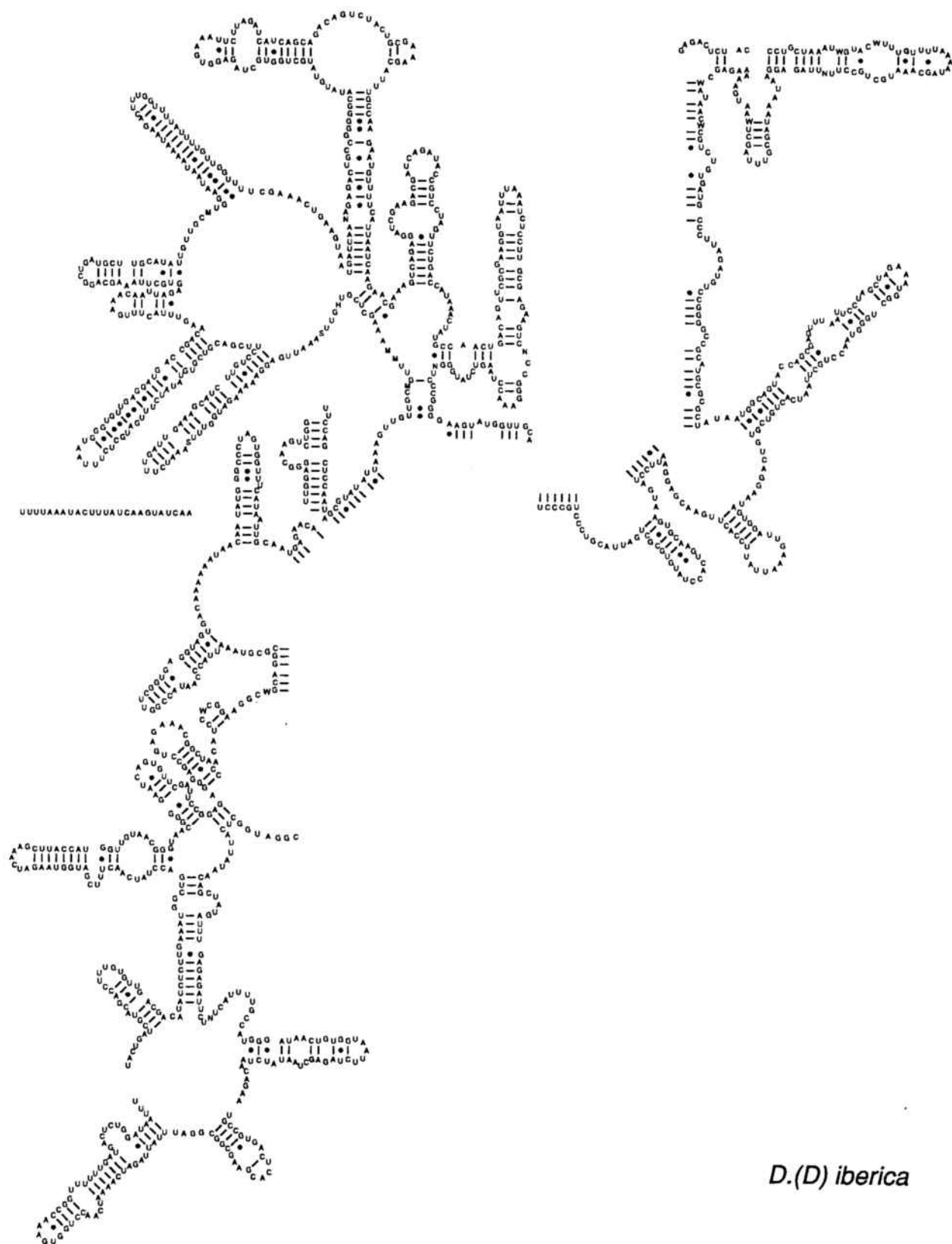


Fig. 15 B. Estructura secundària del rRNA de *Dugesia (D) iberica*.

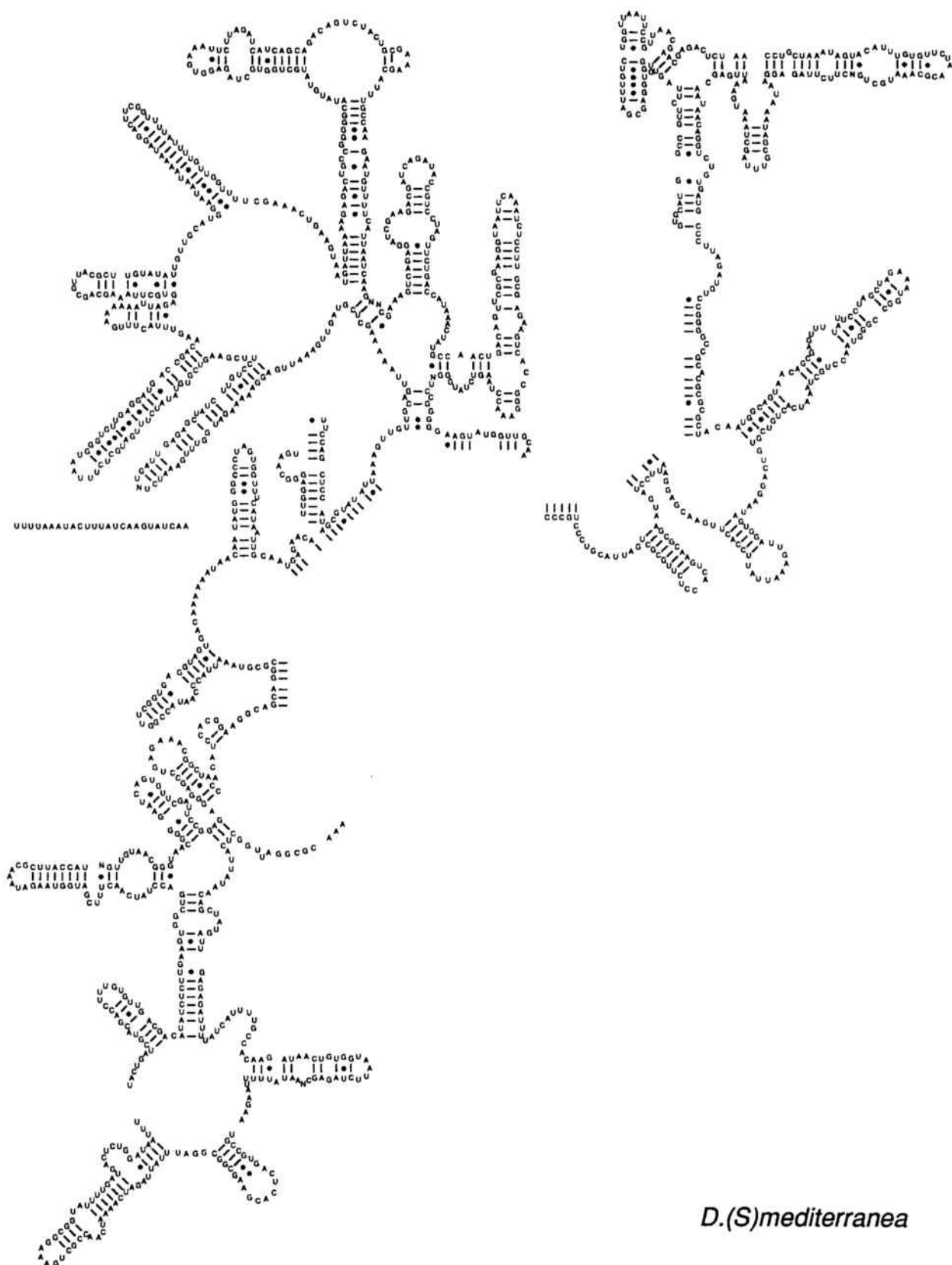


Fig. 15 C. Estructura secundària del rRNA de *Dugesia (S) mediterranea*.

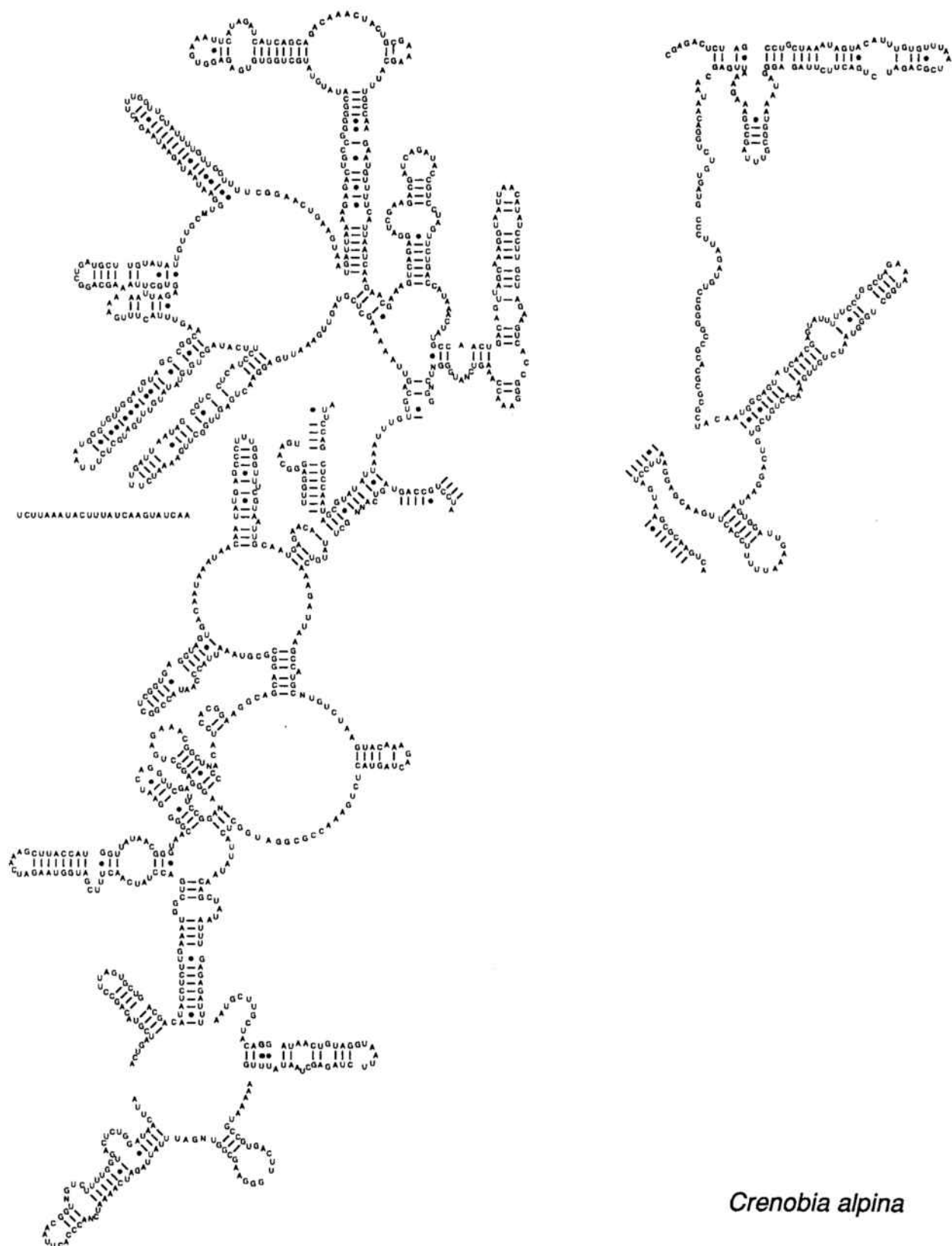


Fig. 15 D. Estructura secundària del rRNA de *Crenobia alpina*.

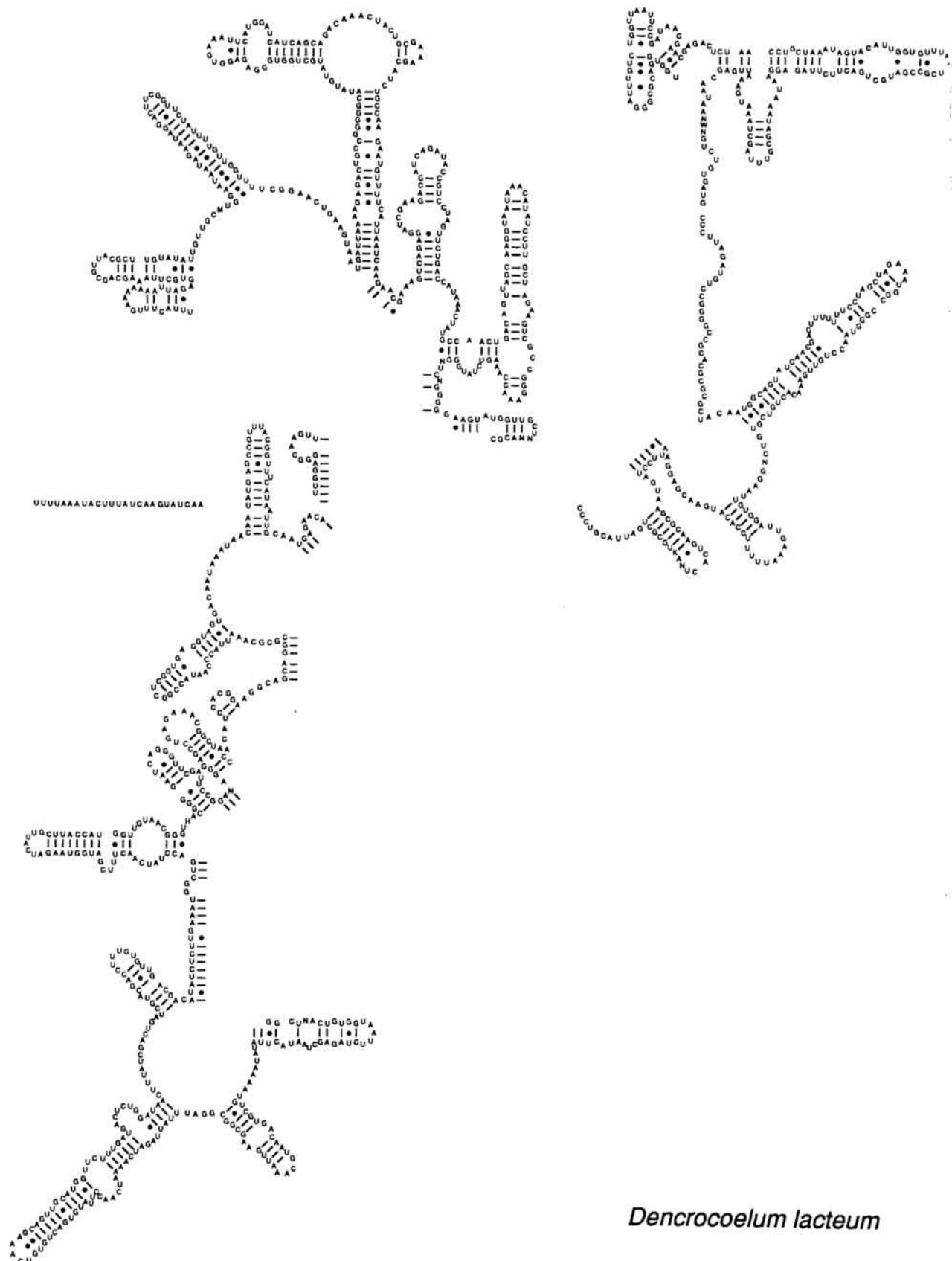


Fig. 15 E. Estructura secundària del rRNA de *Dendrocoelum lacteum*.

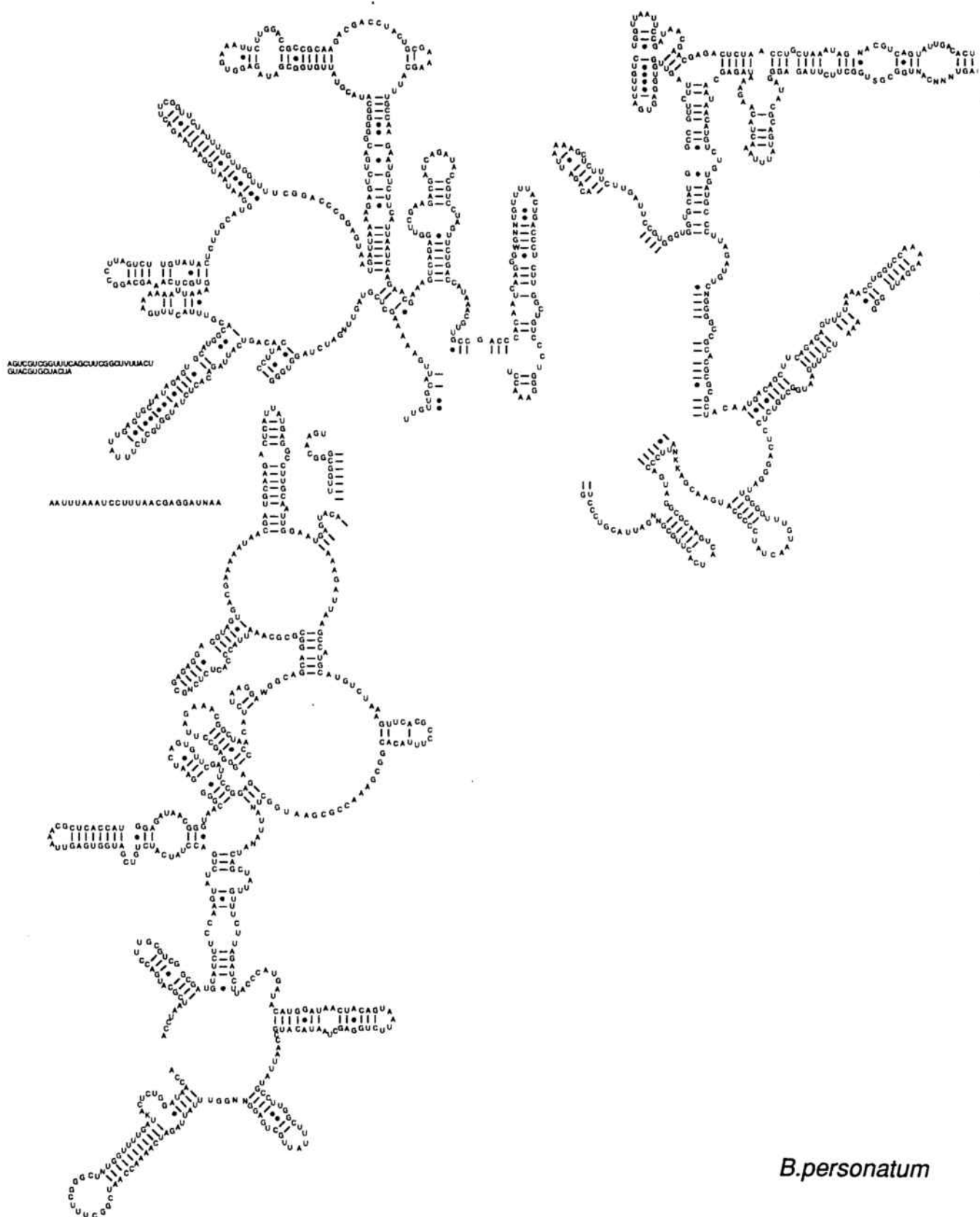


Fig. 15 F. Estructura secundària del rRNA de *Bothriomesostoma personatum*.

- 69 -

A la taula 10 s'ha representat el percentatge dels 4 nucleòtids en les seqüències de cadascuna de les espècies estudiades, i la proporció d'aparellaments GC a AU en les zones en que l'estructura secundària preveu l'existència d'aquest.

	A	U	C	G	GC	GC/AU
D.l.	30.5	27.5	18.5	23.5	42.0	1.14
D.i.	30.4	28.1	18.2	23.2	41.4	1.15
D.m.	30.6	27.7	18.2	23.5	41.7	1.08
D.t.	30.3	26.5	19.2	24.0	43.2	1.14
C.a.	30.7	27.5	17.9	23.8	41.7	1.15
B.p.	28.6	26.2	20.7	24.5	45.2	1.30
F.h.	25.5	25.6	21.7	27.2	48.9	1.79
ratolí	26.1	21.6	23.4	28.8	52.2	1.79

Taula 10. Percentatges dels nucleòtids en les seqüències del rRNA 18S. GC és la proporció de G i C a les seqüències, GC/AU és la proporció d'aparellaments GC respecte als AU comptats en l'estructura secundària hipotetitzada (figura 15).

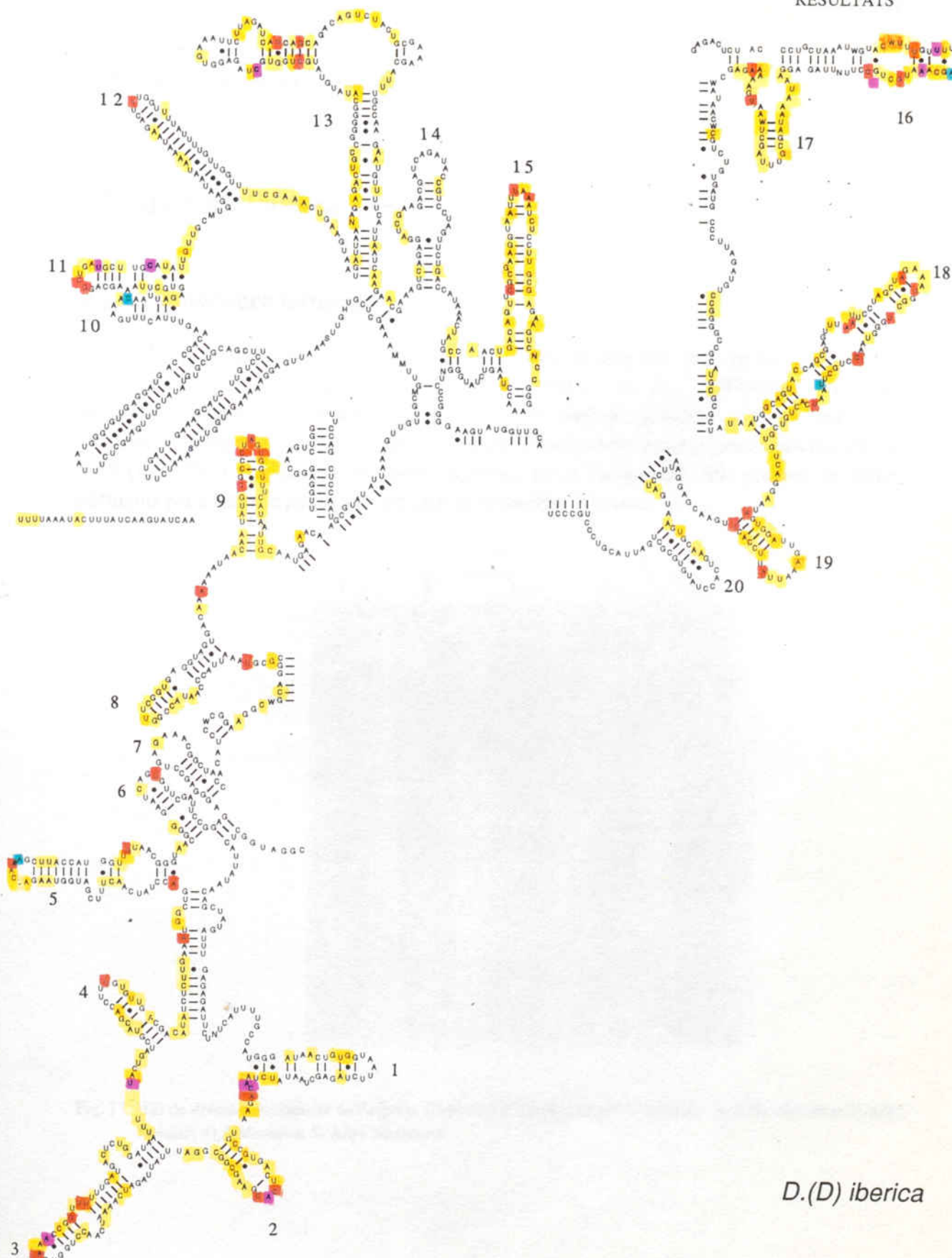
A tots els platihelminths s'observa una alta proporció de As i Us, exceptuant *Fasciola hepatica* que presenta proporcions més similars a les del ratolí, especialment pel que fa a la proporció d'aparellaments.

A la figura 16 es representa, sobre una estructura secundària, el nombre de canvis que ha sofert cada posició entre els platihelminths. Hi ha algunes posicions amb gran tendència a sofrir canvis (4 o 5), envoltades generalment de posicions amb menys canvis en ordre decreixent a mesura que ens allunyem. Es també bastant freqüent que en els braços, on es dona aparellament, les dues posicions enfrontades presentin el mateix nombre de canvis. Això reflexa probablement la incidència de canvis compensatoris (o afavorits).

De la comparació de les seqüències s'han obtingut unes distàncies representades a la taula 11. S'aprecien tres rangs creixents de distàncies: entre 0.027 i 0.039 pels tres subgèneres; entre 0.066 i 0.089 entre les tres famílies de planàries; i de 0.228 a 0.275 entre les planàries i els altres 2 platihelminths o entre aquests darrers.

	D(S)m.	D(D)i.	D(G)t.	C.a.	D.l.	B.p.	F.h.
D(S)m.	-						
D(D)i.	0.033	-					
D(G)t.	0.027	0.039	-				
C.a.	0.072	0.083	0.066	-			
D.l.	0.075	0.089	0.081	0.067	-		
B.p.	0.264	0.275	0.256	0.260	0.266	-	
F.h.	0.253	0.252	0.235	0.239	0.252	0.228	-

Taula 11. Distàncies evolutives calculades segons Jukes i Cantor (1969) a partir de les seqüències del rRNA 18S, valors en knucs.



D.(D) iberica

Fig. 16. Sobre l'estructura secundària del rRNA 18S de *Dugesia (D) iberica* hem representat el nombre de canvis que ha sofert cada posició en la comparació entre platihelminths.

4. FAMÍLIA DUGESIIDAE

4.1. GÈNERE *Dugesia*

4.1.1. Subgènere *Girardia*

S'han comparat diverses poblacions de l'espècie *Dugesia (G) tigrina* dels PP.CC., morfològicament agrupades en tres classes (Ribas *et al.*, 1989)(taula 2). Amb isoelectroenfocament els resultats obtinguts mostren patrons de bandes amb un total de 72 proteïnes separades; d'aquestes bandes el nombre identificat per a una població variava entre 20 i 55 (fig. 17). La matriu de distàncies derivada de la comparació dels patrons de bandes obtinguts per a les cinc poblacions estudiades es mostren a la taula 12.

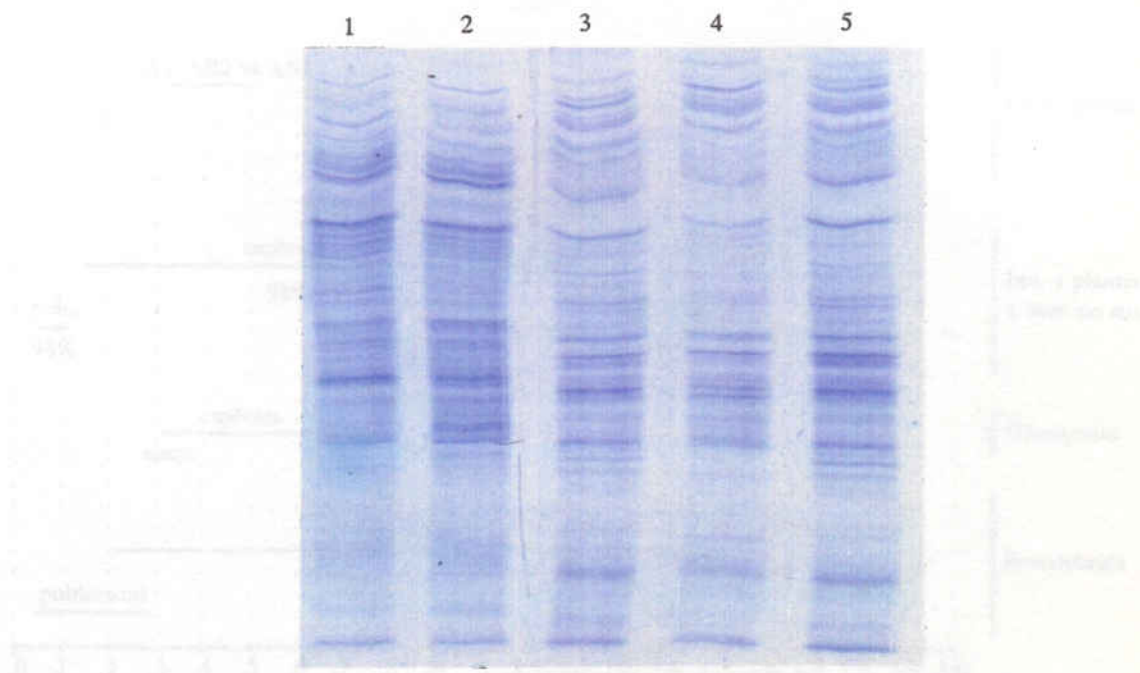
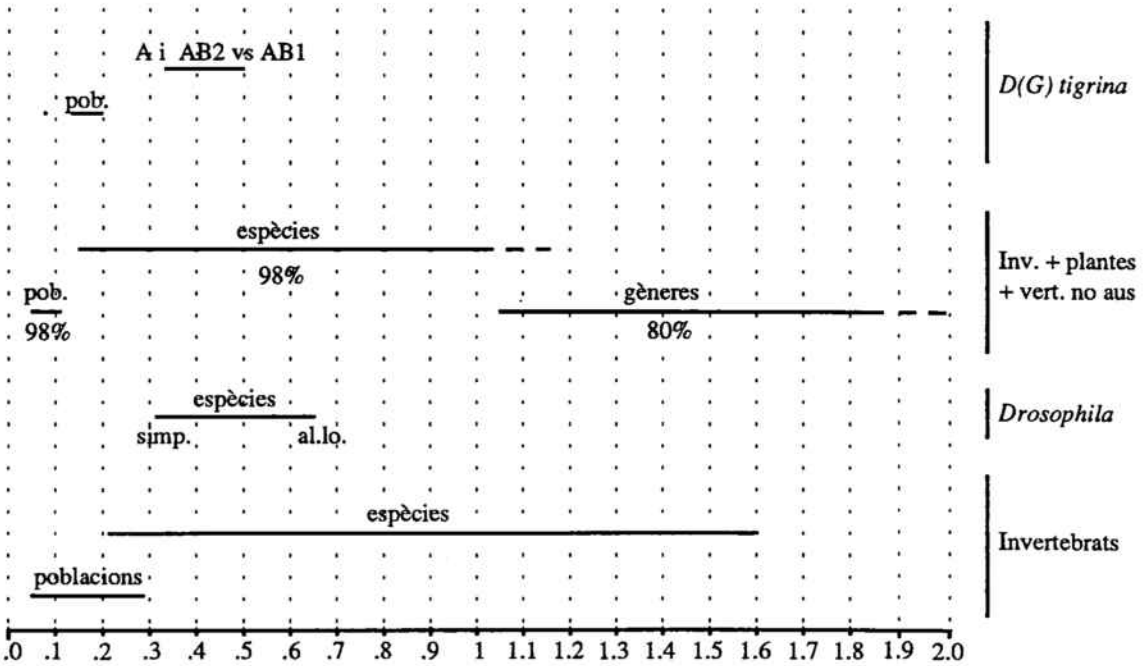


Fig. 17. IEE de diverses poblacions de l'espècie *Dugesia (G) tigrina*: 1) A/B2 València; 2) A/B2 Menorca; 3) A/B1 Roselló; 4) A Menorca; 5) A/B1 Barcelona.

		A/B 1		A/B 2		A
		1	2	3	4	5
A/B1	1	-				
	2	0.09±0.002 61	-			
A/B2	3	0.48±0.010 63	0.30±0.007 50	-		
	4	0.35±0.007 58	0.50±0.012 53	0.13±0.003 50	-	
A	5	0.32±0.007 51	0.35±0.016 27	0.19±0.006 36	0.17±0.006 30	-

Taula 12: Distàncies genètiques per a poblacions de l'espècie *Dugesia (G) tigrina*. Les xifres representen la distància genètica ± error estandard i el nombre de bandes proteiques per cada comparació. 1, 2: poblacions de la classe A/B1 del Rosselló i Barcelona respectivament; 3, 4: poblacions de la classe A/B2 de València i Menorca; 5 població de la classe A de Menorca.



Taula 13. Comparació dels marges de les distàncies genètiques obtingudes a diferents treballs (veure apartat 1) i l'obtingut en aquest treball per IEE per a *Dugesia (G) tigrina*.

Donat que les distàncies entre poblacions de la classe A/B1 eren molt similars sols s'han representat dues d'elles, les del Roselló i Calders. La distància genètica entre poblacions de la classe A/B1 (taula 12: 1 i 2, fissípares amb faringe pigmentada: $D=0.09$) són equivalents a les que es troben entre poblacions conespècífiques. Similarment, les diferents poblacions de les classes A/B2 i A (taula 12: 3, 4 i 5, fissípares o sexual amb la faringe uniformement pigmentada), malgrat esser més diferenciades ($D=0.13-0.19$), poden considerar-se també com a poblacions locals conespècífiques. En canvi, els valors obtinguts en les comparacions entre les poblacions de les classes A/B1 i A/B2-A ($D=0.32-0.50$) corresponen a les trobades entre subespècies o espècies besones en diferents grups d'animals (Ferguson, 1980; Thorpe, 1983)(taula 13), suggerint que les classes A/B1 i A/B2-A formen dos grups taxonòmics naturals ben diferenciats.

4.1.2. Subgènere *Dugesia*

S'han realitzat dues comparacions per electroenfocament:

- a) La comparació entre diferents poblacions pertanyents a les espècies del grup "gonocephala": *Dugesia (D) iberica* ($2n=16$, biotip A2), *Dugesia (D) benazzi* ($2n=16$, $4n=32$), *Dugesia biblica* ($3n=27$) i poblacions de nombres cromosòmics 24 o 27 que, per estudis cariològics, havien estat adscrites com a formes triploids de *Dugesia (D) iberica* (biotip B) i *Dugesia (D) sicula* (biotip B) respectivament (Ribas, 1990).
- b) Una comparació entre els tres biotips coneguts del grup *Dugesia (D) iberica*: biotip A1 ($2n=16$, metacèntrics), biotip A2 ($2n=16$, metacèntrics i submetacèntrics) i biotip B ($3n=24$, metacèntrics), utilitzant dues poblacions de *Dugesia (D) benazzi* com a grups externs.

4.1.2.1 Comparació espècies grup "gonocephala"

Els resultats obtinguts mostren un patró total de 93 bandes separades; d'aquestes bandes el nombre identificat per a una població variava entre 43 i 47 (fig. 18A i B). La comparació d'aquests patrons ha donat les distàncies genètiques que es troben a la taula 14.

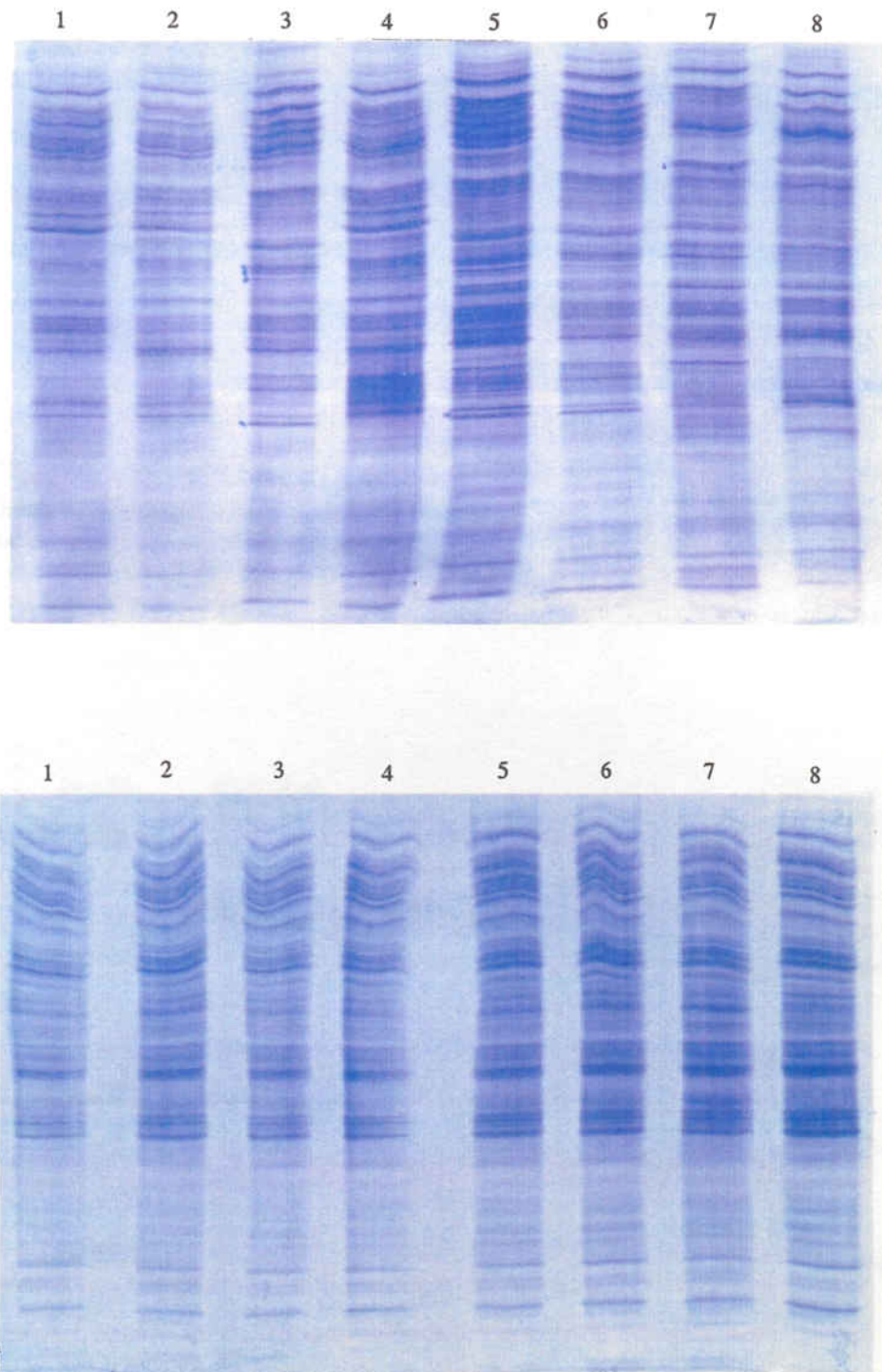
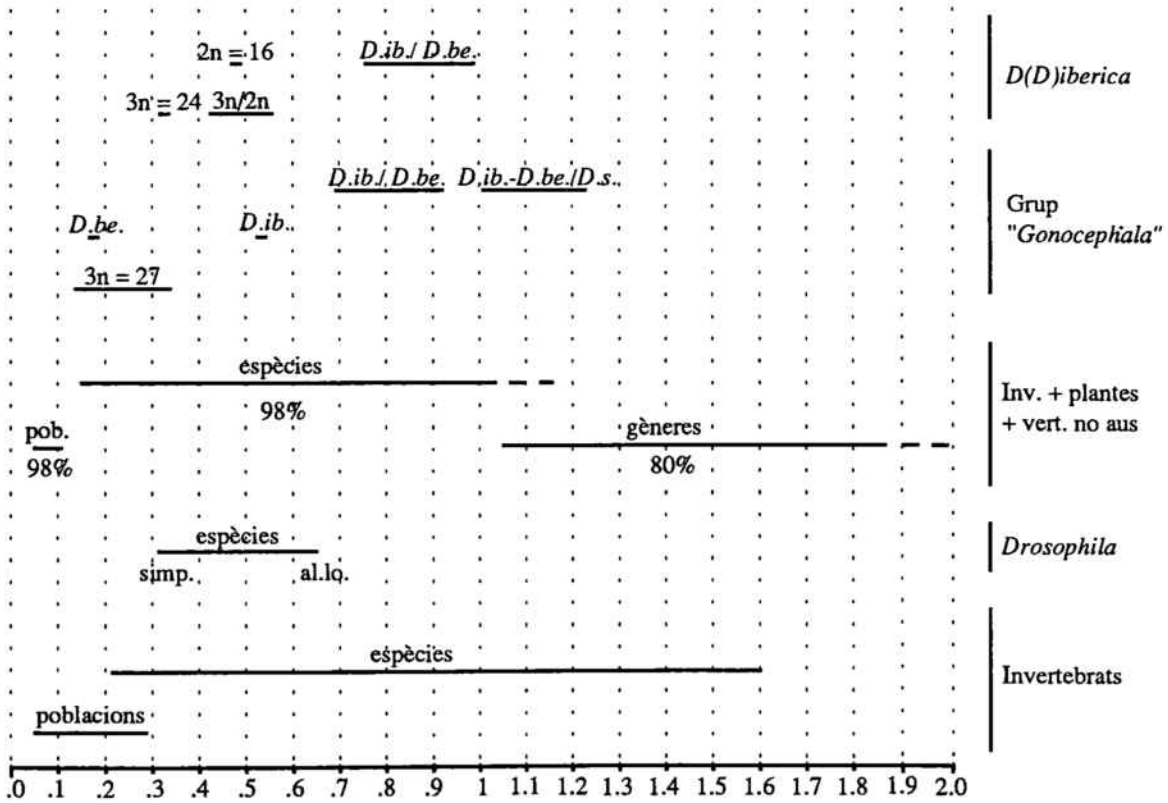


Fig. 18. A) IEE del grup "gonocephala": 1 i 2 poblacions de $3n=27$; 3) *Dugesia (D) benazzi* ($4n=32$); 4) *Dugesia biblica* ($3n=27$); 5) *Dugesia (D) benazzi* ($2n=16$); 6) *Dugesia (D) benazzi* ($4n=32$); 7) *Dugesia (D) iberica* ($2n=16$) i 8) *Dugesia (D) iberica* ($3n=24$).

B) IEE de diverses poblacions de $3n=27$: 1 i 2) P. di Monte Chiaro (Sardenya); 3 i 4) R. Furiano (Sardenya), 5 i 6) R. Buzza (Sardenya); 7) tunel Vallvidrera (Barcelona); i 8) R. Fluvial (Girona)..

		27 cro.				D.(D)iberica		D.(D)benazzi	
		1	2	3	4	5	6	7	8
27	1	-							
	2	0.13±0.05 48	-						
	3	0.33±0.09 53	0.25±0.08 49	-					
	4	0.15±0.06 49	0.16±0.06 47	0.23±0.07 49	-				
Di	5	1.07±0.17 67	1.07±0.17 64	1.02±0.17 64	1.08±0.17 65	-			
	6	1.01±0.16 66	1.01±0.17 63	1.08±0.17 65	1.14±0.18 66	0.52±0.11 54	-		
Db	7	1.14±0.17 72	1.08±0.17 68	1.16±0.18 70	1.22±0.18 71	0.92±0.15 65	0.71±0.13 61	-	
	8	1.07±0.17 70	1.01±0.16 66	1.03±0.16 68	1.08±0.17 67	0.79±0.14 62	0.69±0.13 60	0.19±0.06 52	-

Taula 14: Distàncies genètiques ± error estandard i nombre de bandes proteiques per cada comparació. 1-4: poblacions de 27 cromosomes, 1 Menorca, 2 Mallorca, 3 Sardenya i 4 *Dugesia biblica*; 5, 6: poblacions de *Dugesia (D) iberica*, 5, 2n=16 i 6, 3n= 24 respectivament; 7 i 8: poblacions de *Dugesia (D) benazzii*, 7, 2n=16 i 8, 4n=32 respectivament.



Taula 15: Comparació dels marges de les distàncies genètiques obtingudes a diferents treballs (veure apartat 1) i l'obtingut en aquest treball per IEE per a les espècies del subgènere *Dugesia*.

La distància entre totes les poblacions de 27 cromosomes (incloent l'anomenada *Dugesia biblica*) és petita ($D=0.133-0.332$) i queda pràcticament dins dels marges de l'esperat per a poblacions d'una mateixa espècie. En el mateix rang es troba la distància entre les dues poblacions de *Dugesia (D) benazzi* ($D=0.189$), però no així les dues poblacions cromosòmicament adscrites a *Dugesia (D) iberica* ($2n$ i $3n$) que presenten una distància $D=0.522$ (més propera a la trobada entre espècies besones (Ayala, 1975), o entre espècies del mateix gènere, Thorpe, 1983). Entre els tres grups (poblacions de $3n=27$, *Dugesia (D) iberica* biotips A2 i B i *Dugesia (D) benazzi* $2n$ i $4n$) trobem distàncies bastant més grans amb valors de $D=0.693-0.916$ per la comparació iberica-benazzi i $D=1.007-1.217$ en la comparació iberica o benazzi vs. $3n=27$ (*Dugesia (D) sicula*)(taula 15).

A la figura 19A es presenta la topologia filogenètica obtinguda amb el mètode UPGMA i en la 19B la obtinguda amb els mètodes MP i dels MQ (al coincidir ambdues s'ha representat un sol arbre, on la longitud de les branques és proporcional a la distància calculada segons el mètode dels MQ).

Per als grans grups la topologia coincideix destacant la existència de tres grups ben definits: 1) el constituït per les poblacions de l'espècie *Dugesia (D) iberica*; 2) el de l'espècie *Dugesia (D) benazzi*, i 3) el de totes les poblacions de 27 cromosomes, incloent la població de *Dugesia biblica*. S'observa, però, una relació més estreta entre les dues espècies de nombre cromosòmic bàsic $n=8$ que amb la de nombre $n=9$, malgrat que al faltar la forma diploid ($2n=18$) manquen elements claus de judici per a aquesta darrera comparació.

Dins del grup de 27 cromosomes es destaca la presència d'una població atribuïda a una altra espècie, *Dugesia biblica*. Les relacions entre les poblacions dins d'aquest grup no queden ben definides degut a la poca diferència existent entre elles a nivell proteic, com es pot comprovar tant per les barres d'error dels embrancaments observades a l'arbre UPGMA com per la poca significació obtinguda per "bootstrapping" pels embrancaments (47 i 65%).

Les altres dues espècies (*Dugesia (D) iberica* i *Dugesia (D) benazzi*) presenten una diferenciació clara entre les formes diploids i les poliploids. En ambdós casos, les diploids (sexuades) han acumulat més canvis (fig. 19B).

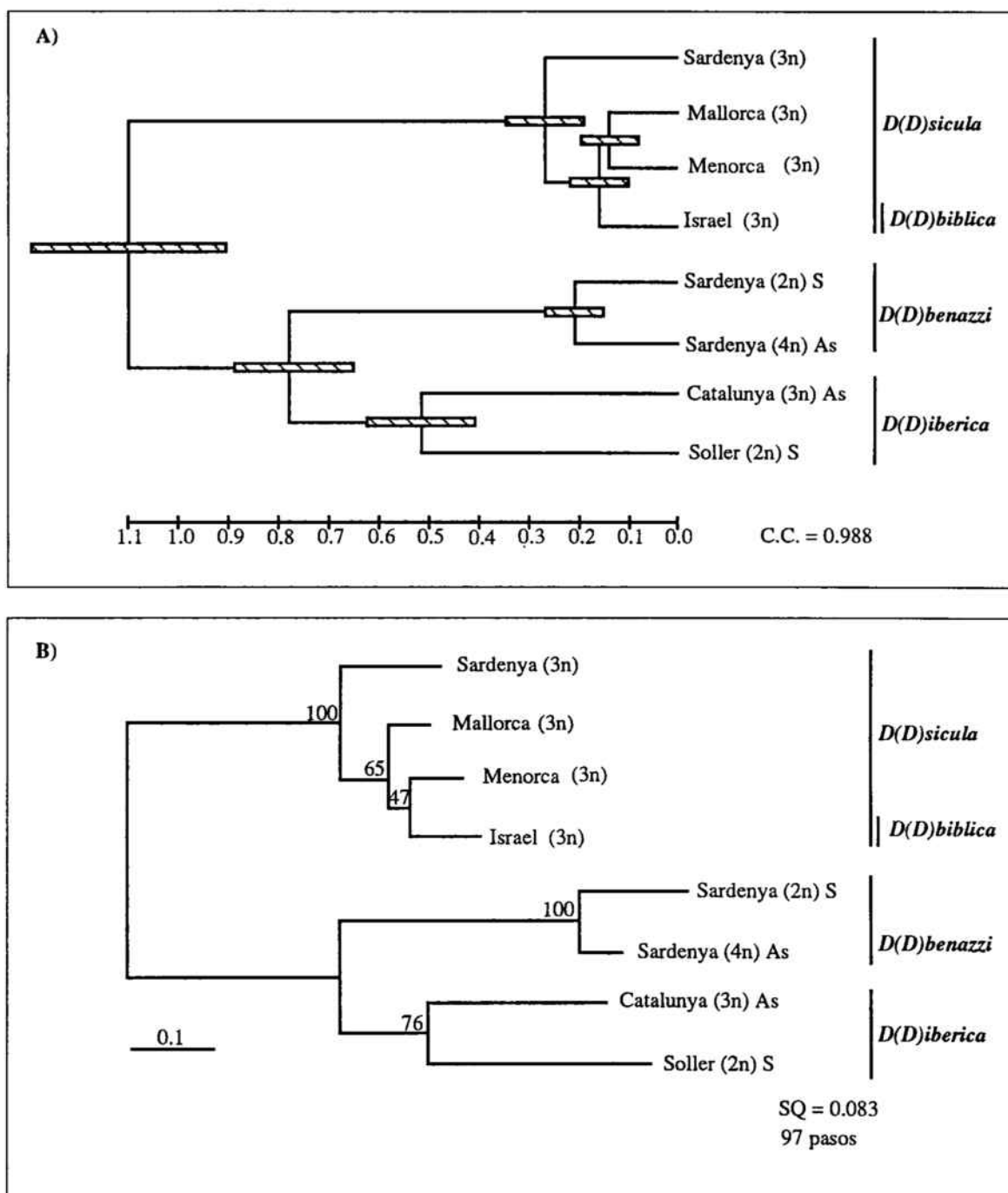


Fig. 19. Relacions filogenètiques entre les espècies del grup "gonocephala": A) Arbre UPGMA les barres a les bifurcacions indiquen l'error segons Nei (1985); B) Arbres MP i MQ, la longitud dels braços horitzontals és proporcional a la distància. Els números a les bifurcacions corresponen al resultat del bootstrapping (100 repliques).

4.1.2.2 Biotips de *Dugesia (D) iberica*

La comparació dels tres biotips de l'espècie *Dugesia (D) iberica* presents als PPCC mostra uns patrons de bandes amb 77 proteïnes separades en total; d'aquestes bandes el nombre identificat per a una població variava entre 38 i 40 (fig. 20). La matriu de distàncies calculada a partir d'aquestes dades es troba a la taula 16.

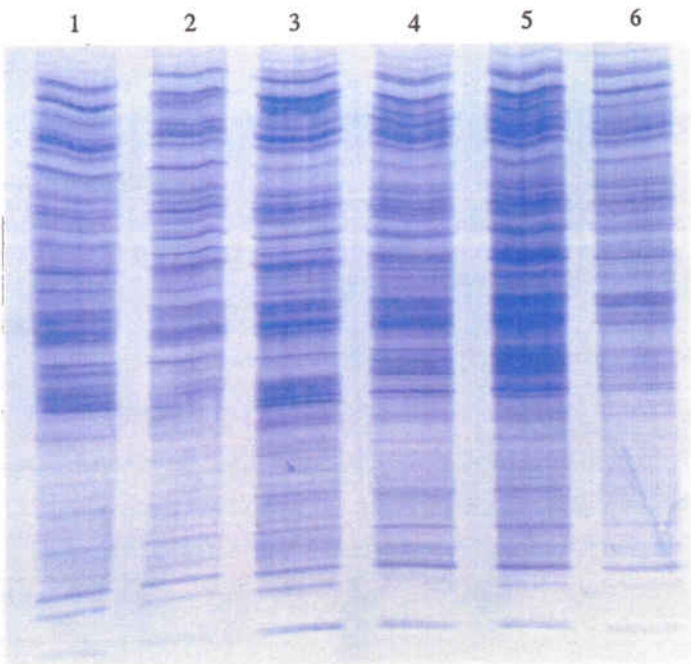


Fig. 20. IEE de varies poblacions de *Dugesia (D) iberica* (1: B Montseny; 2: A2 Soller; 3: A1 Sa Calobra i 6 B Berguedà) i *Dugesia (D) benazzii* (4: 3n sex.; 5: 3n asex.).

		D(D)iberica				D(D)benazzi	
		1	2	3	4	5	6
D.i.	1	-					
	2	0.31±0.09 45	-				
	3	0.56±0.12 49	0.54±0.12 50	-			
	4	0.478±0.111 50	0.415±0.102 50	0.497±0.113 51	-		
D.b.	5	0.770±0.147 54	0.807±0.149 56	0.970±0.168 58	0.802±0.146 58	-	
	6	0.750±0.146 53	0.787±0.148 55	0.951±0.167 57	0.785±0.145 57	0.024±0.25 41	-

Taula 16: Distàncies genètiques ± error estandard i nombre de bandes proteiques per cada comparació. 1 i 2: poblacions de 3n=24 biotip B, 1 Berga, 2 Montseny; 3: poblacio de *Dugesia (D) iberica* 2n=16 (metacèntrics i submetacèntrics) biotip A2 de Soller; 4: *Dugesia (D) iberica* 2n=16 biotip A1 de Sa Calobra (metacèntrics); 5 i 6: poblacions de *Dugesia (D) benazzii* Sardenya, 5 3n=24 sexuada i 6 3n=24 asexuada.

Les distàncies obtingudes són comparables, quedant dins dels mateixos marges de l'anàlisi anterior (taula 15). Les filogènies derivades (fig 21A i 21B) mostren una discrepància entre el resultat de l'anàlisi pel mètode UPGMA i els dels MP i MQ. En el primer veiem com el biotip A1 (Sa Calobra) s'agrupa amb el biotip B, malgrat que, com ens indiquen les barres d'error, l'ordre d'embranchament no ens queda ben definit. En l'arbre MP, MQ els embrancaments ens agrupen els dos biotips A1 i A2 per una banda i els triploides B (Berga i Montseny) per l'altre.

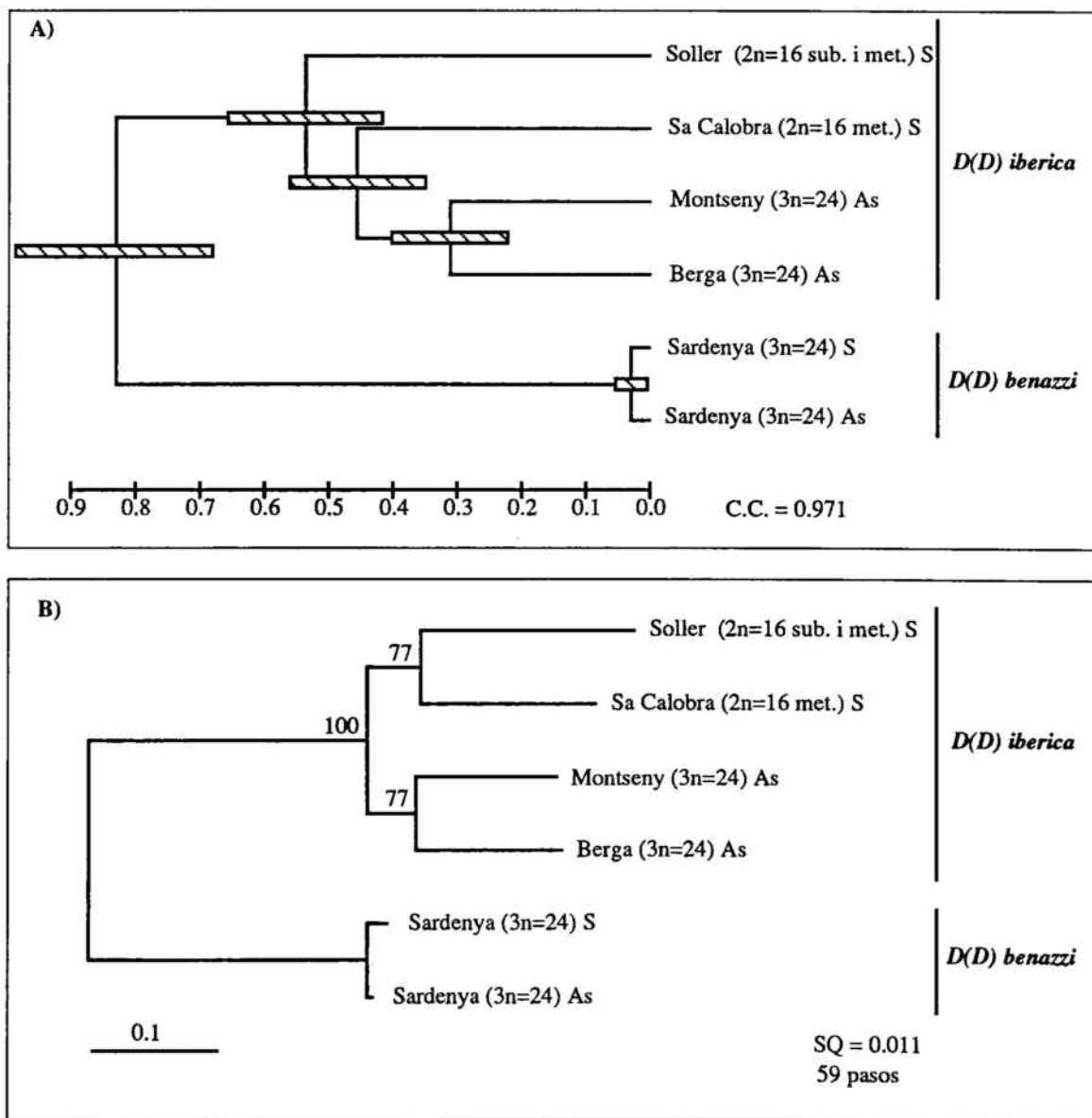


Fig. 21. Filogènies obtingudes a partir de les dades de IEE per als diferents biotips de l'espècie *Dugesia (D) iberica*: A) UPGMA, les barres a les bifurcacions representen l'error calculat segons Nei (1985); B) MP i MQ, la longitud dels braços horitzontals és proporcional a la distància, els números a les bifurcacions són el resultat de bootstrapping (100 repliques).

4.1.3. Subgènere *Schmidtea*

S'han analitzat poblacions de les dues espècies pertanyents a aquest subgènere que es troben als PP.CC.: tres per *Dugesia (S) mediterranea* i tres per *Dugesia (S) polychroa* (taula 2). A dues de les poblacions de *Dugesia (S) polychroa* (Roselló i València) conviuen dos biotips diferents (A i B/C), identificats (mitjançant cariotipatge dels individus) i anàlitzats separatament.

En l'estudi per IEE, el nombre total de bandes observades va ésser de 77. El nombre identificat en una sola població variava entre 45 i 47 (Fig. 22). La corresponent matriu de distàncies (D) obtinguda per a les 8 poblacions comparades es troba a la taula 17.

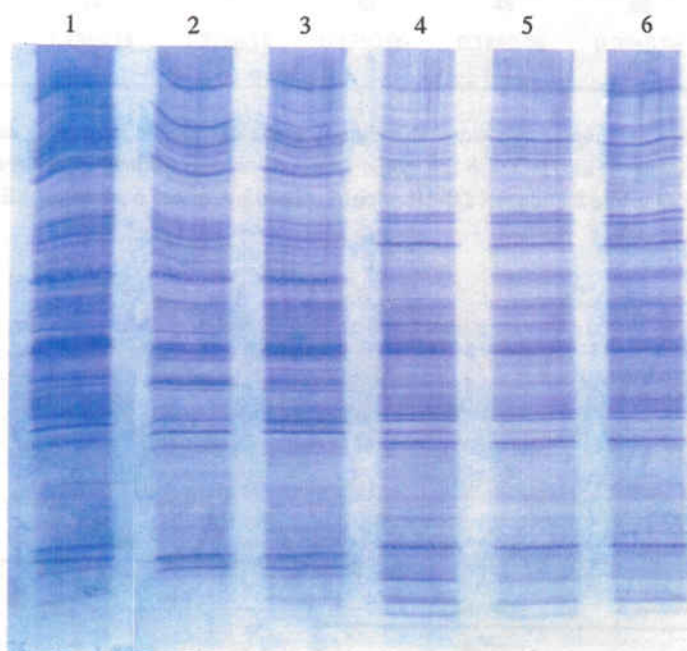
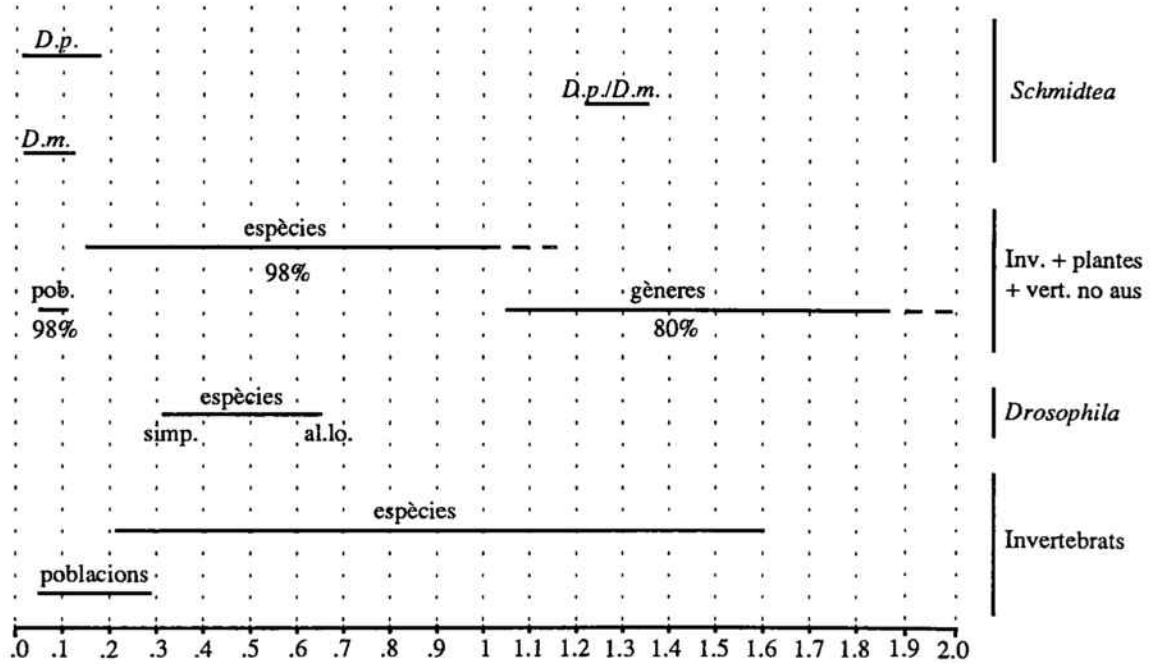


Fig. 22. IEE de varies poblacions de *Dugesia (S) polychroa* (1: A França; 2: D Itàlia; 3: A València) i *Dugesia (S) mediterranea* (4: A2 Barcelona; 5: B2 Menorca; 6: A1 Itàlia).

<i>D(S)mediterranea</i>				<i>D(S)polychroa</i>				
	1	2	3	4	5	6	7	8
Dm	1	-						
	2	0.11±0.05 49	-					
	3	0.13±0.05 49	0.02±0.02 47	-				
Dp	4	1.28±0.19 72	1.36±0.20 74	1.35±0.20 73	-			
	5	1.25±0.19 70	1.33±0.20 72	1.32±0.19 72	0.04±0.03 46	-		
	6	1.26±0.19 72	1.35±0.20 73	1.33±0.20 72	0.11±0.05 48	0.11±0.05 47	-	
	7	1.28±0.19 72	1.36±0.20 74	1.35±0.20 73	0.13±0.05 48	0.13±0.05 48	0.02±0.02 46	-
	8	1.35±0.20 73	1.23±0.18 72	1.22±0.18 71	0.17±0.06 50	0.18±0.06 49	0.07±0.04 48	0.09±0.02 48
								-

Taula 17: Distàncies genètiques ± error estandard i nombre de bandes proteiques per cada comparació. 1-3: *Dugesia (S) mediterranea*, 1 biotip A2, 2 biotip A1 i 3 biotip B2; 4-8: *Dugesia (S) polychroa*, 4 biotip A València, 5 biotip B1-B2 València, 6 biotip A Roselló, 7 biotip B1-B2 Roselló i 8 biotip D Sardenya.



Taula 18. Comparació dels marges de les distàncies genètiques obtingudes a diferents treballs (veure apartat 1) i l'obtingut en aquest treball per IEE per a les espècies del subgènere *Schmidtea*.

Les distàncies genètiques entre les poblacions de *Dugesia (S) mediterranea* ($D=0.021-0.130$) i entre les de *Dugesia (S) polychroa* ($D=0.022-0.177$) queden dins dels marges esperats per a poblacions geogràfiques coespecífiques d'altres invertebrats (taula 18). Malgrat això, els valors alts resulten grans si tenim en compte que sols un 2% dels D entre poblacions sol superar 0.11. En la comparació entre les dues espècies també trobem valors ($D=1.217-1.358$) alts respecte als trobats entre espècies con-genèriques d'altres invertebrats, o fins i tot amb les que es troben entre espècies pertanyents a altres subgèneres (*Dugesia*) de planàries.

L'arbre UPGMA, el MP i el MQ derivats d'aquestes dades es mostren a la fig. 23 A, B i C respectivament. La topologia d'aquests arbres mostra a les dues espècies perfectament separades. Per a *Dugesia (S) mediterranea* s'observa una major proximitat entre la població triploid amb l'heteromorfosi (Menorca) i el biotip A (diploid normal (Sardenya)) en comparació a la població diploid amb l'heteromorfosi (Barcelona). Per *Dugesia (S) polychroa* la topologia dels tres mètodes no coincideix. Mentre que els UPGMA i MP no aconsegueixen resoldre les dicotomies entre els dos biotips del Roselló i la població de Sardenya, el mètode MQ ens mostra a aquesta totalment independent de les altres quatre poblacions.

En les poblacions on s'ha trobat simultàniament el biotip A (sexual diploid) i el biotip B1B2 (partenogenètic) la distància entre els dos biotips és molt petita, essent el nombre de canvis pel biotip A més gran que per l'altre biotip (Fig. 23C).

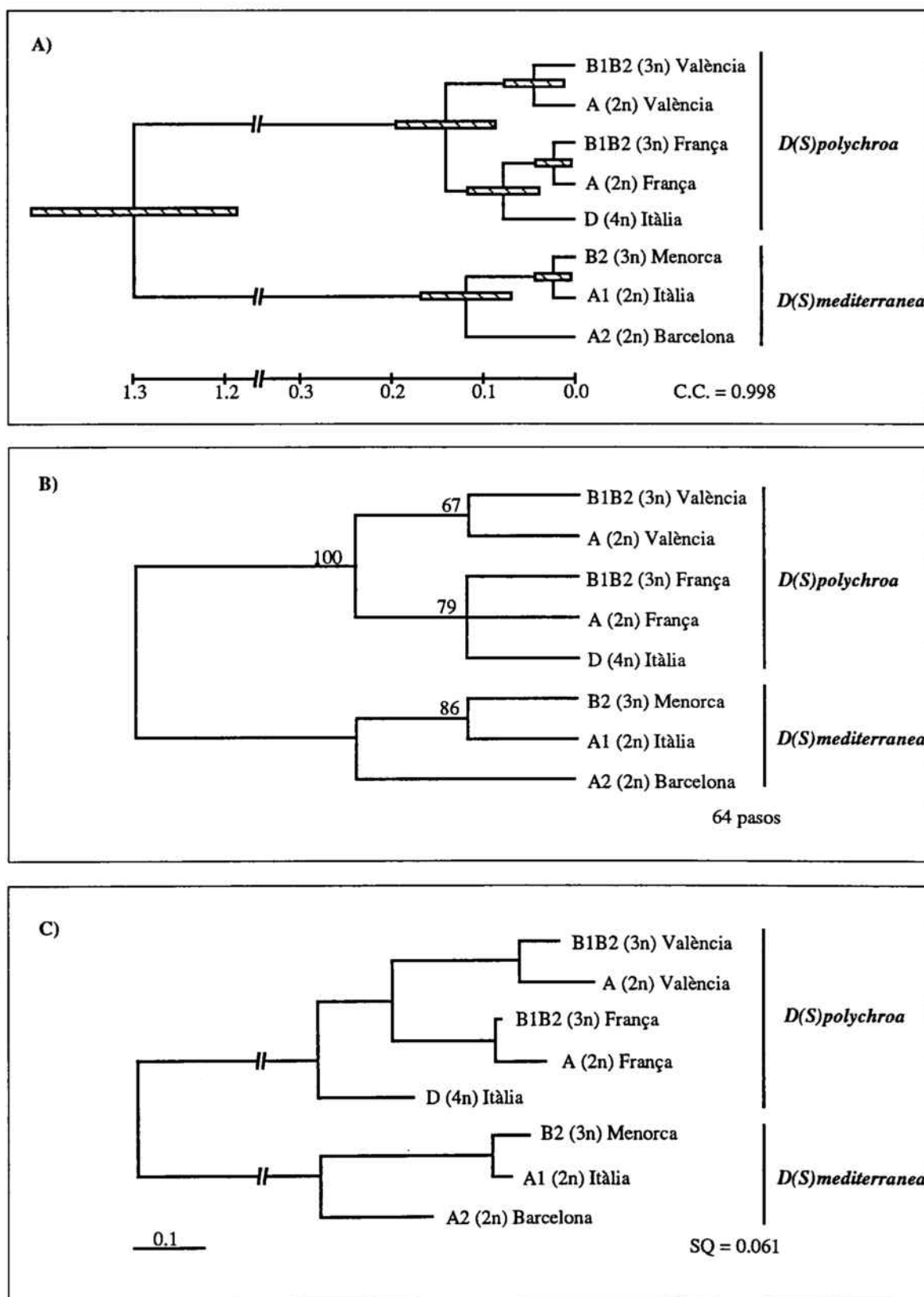


Fig. 23. Filogènies obtingudes a partir de les dades d'IEE per a les espècies del subgènere *Schmidtea*. A) UPGMA, les barres a les bifurcacions representen l'error calculat segons Nei (1985); B) Màxima parsimonia, consens de tres arbres, els números a les bifurcacions són el resultat del bootstrapping (100 rèpliques); C) Mètode dels mínims quadrats, la longitud dels braços horitzontals és proporcional al nombre de canvis.

4.1.4. Relacions entre els tres subgèneres

Les relacions entre els tres subgèneres s'han estudiat a nivell proteic comparant els electromorfs obtinguts en l'anàlisi enzimàtica realitzada. També es van comparar a nivell de seqüències del rRNA 18S.

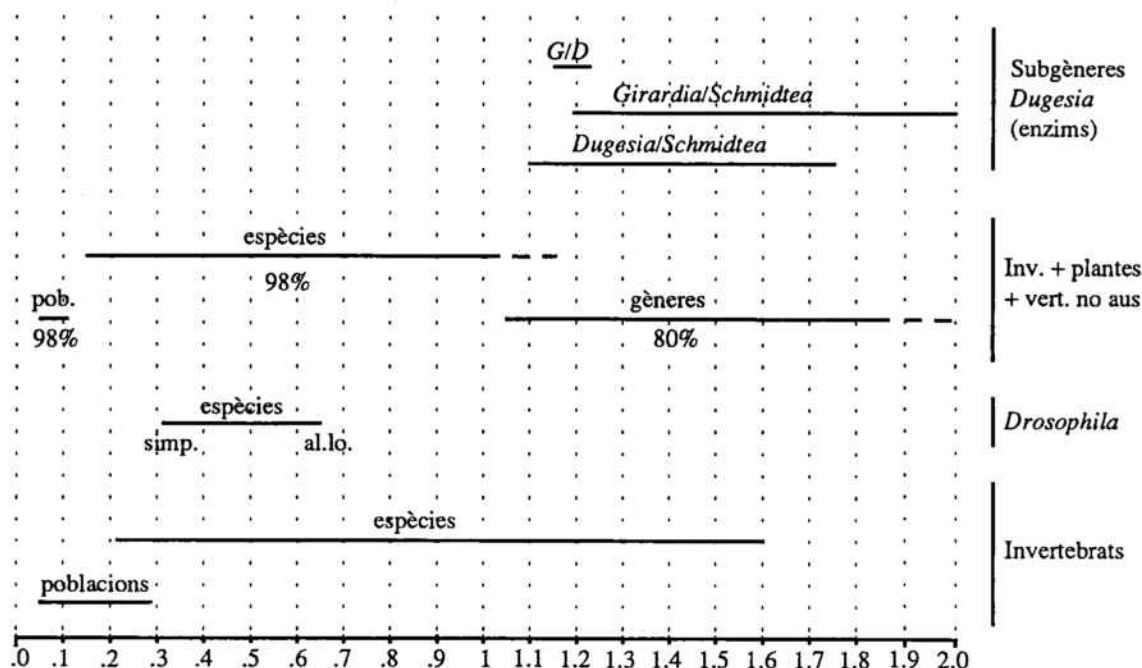
4.1.4.1 Dades enzimàtiques

S'han utilitzat les espècies: *Dugesia (S) mediterranea* i *Dugesia (S) polychroa* com a representants del subgènere *Schmidtea*; *Dugesia (D) iberica* i *Dugesia (D) sicula* del subgènere *Dugesia* i *Dugesia (G) tigrina* del subgènere *Girardia* (taula 2).

Per a les espècies d'aquesta família la matriu de distàncies és la següent (de la taula 7):

	D(S)p	D(S)m	D(D)i	D(D)s	D(G)t
D(S)p	-				
D(S)m	0.99±0.22 35	-			
D(D)i	1.61±0.31 41	1.10±0.24 36	-		
D(D)s	1.74±0.37 35	1.42±0.29 37	1.04±0.24 31	-	
D(G)t	2.00±0.42 37	1.19±0.26 33	1.16±0.26 33	1.23±0.20 58	-

Taula 19: Distàncies genètiques calculades a partir de les dades enzimàtiques. Les xifres representen la distància genètica ± error estandard i el nombre total de bandes proteiques comparades per a cada parella d'espècies. Dades tretes de la taula 7.



Taula 20. Comparació dels marges de les distàncies genètiques obtingudes a diferents treballs (veure apartat 1) i l'obtingut en aquest treball amb les dades enzimàtiques per als tres subgèneres del gènere *Dugesia*.

Les distàncies estimades entre els tres subgèneres (valor promig: 1.46 *Dugesia-Schmidtea*; 1.60 *Schmidtea- Girardia* i 1.2 *Girardia- Dugesia*) es troben dins dels marges per generes de la mateixa família i espècies congenèriques. L'arbre UPGMA per a aquestes dades es troba a la Fig 24A i els arbres MP i MQ a la 24B. El subgènere *Schmidtea* (*Dugesia* (*S*) *polychroa* i *Dugesia* (*S*) *mediterranea*) forma un grup ben definit com demostren la barra d'error estandard en l'arbre UPGMA i el resultat del "bootstraping" (81 %). En canvi, les barres d'error per a les altres tres espècies (*Dugesia* (*D*) *iberica*, *Dugesia* (*D*) *sicula* i *Dugesia* (*G*) *tigrina*) es superposen. Aquest fet deja aquest embrancament sense resoldre i podria indicar una trifurcació entre els tres subgèneres.

En l'arbre MQ veiem que algunes espècies han acumulat més canvis que les altres (major longitud dels braços). Aquest és el cas de *Dugesia* (*S*) *polychroa* (més acusat) i de les dues espècies pertanyents al subgènere *Dugesia*.

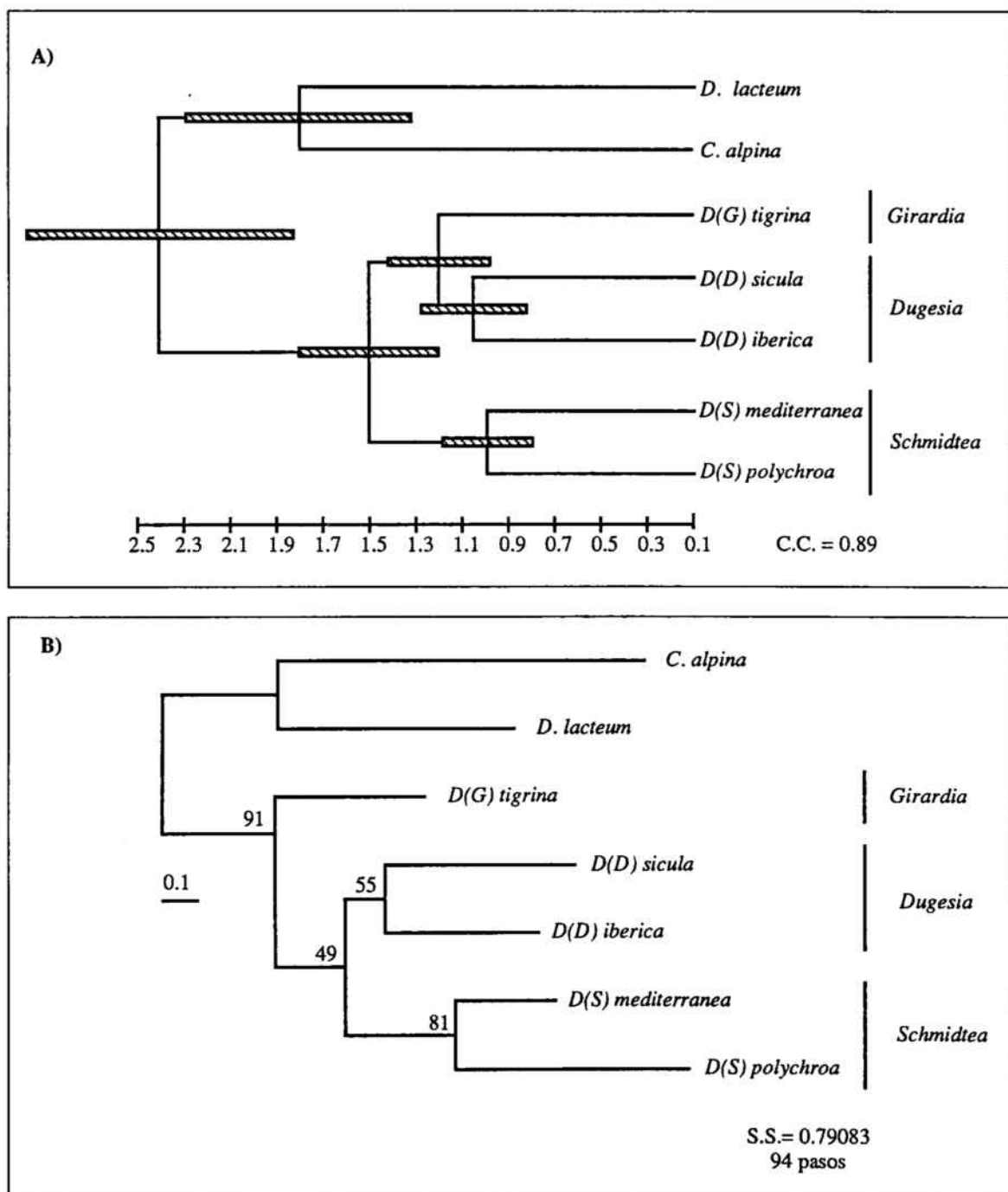


Fig. 24. Relació entre els tres subgèneres del gènere *Dugesia*, dades d'enzims. A) UPGMA, les barres a les bifurcacions representen l'error calculat segons Nei (1985); B) MP i MQ, la longitud dels braços horitzontals és proporcional a la distància, els números a les bifurcacions són el resultat de bootstrapping (100 repliques).

4.1.4.2. Dades del rRNA 18S

A la taula 21 s'exposen les distàncies obtingudes entre els representants dels tres subgèneres (un de cada subgènere: *Dugesia (D) iberica*, *Dugesia (S) mediterranea* i *Dugesia (G) tigrina*) escollits:

	D(S)m	D(D)i	D(G)t
D(S)m	-		
D(D)i	0.033	-	
D(G)t	0.027	0.039	-

Taula 21. Distàncies evolutives calculades segons Jukes i Cantor (1969) a partir de les seqüències del rRNA 18S, valors en knucs. Extreta de la taula 11.

Els arbres UPGMA i MP/MQ es troben a la figura 25A i 25B respectivament. L'arbre MP/MQ coincideix en topologia amb els obtinguts per proteïnes, mentre que l'UPGMA no ho fa, si bé la barra d'error estandard ens indica que aquest embrancament és incert. El "bootstraping" reproduceix l'agrupament *Dugesia (S) mediterranea*- *Dugesia (D) iberica* un 77% de les vegades. En l'arbre MQ observem que el subgènere *Dugesia* presenta un major nombre de canvis que els altres dos subgèneres.

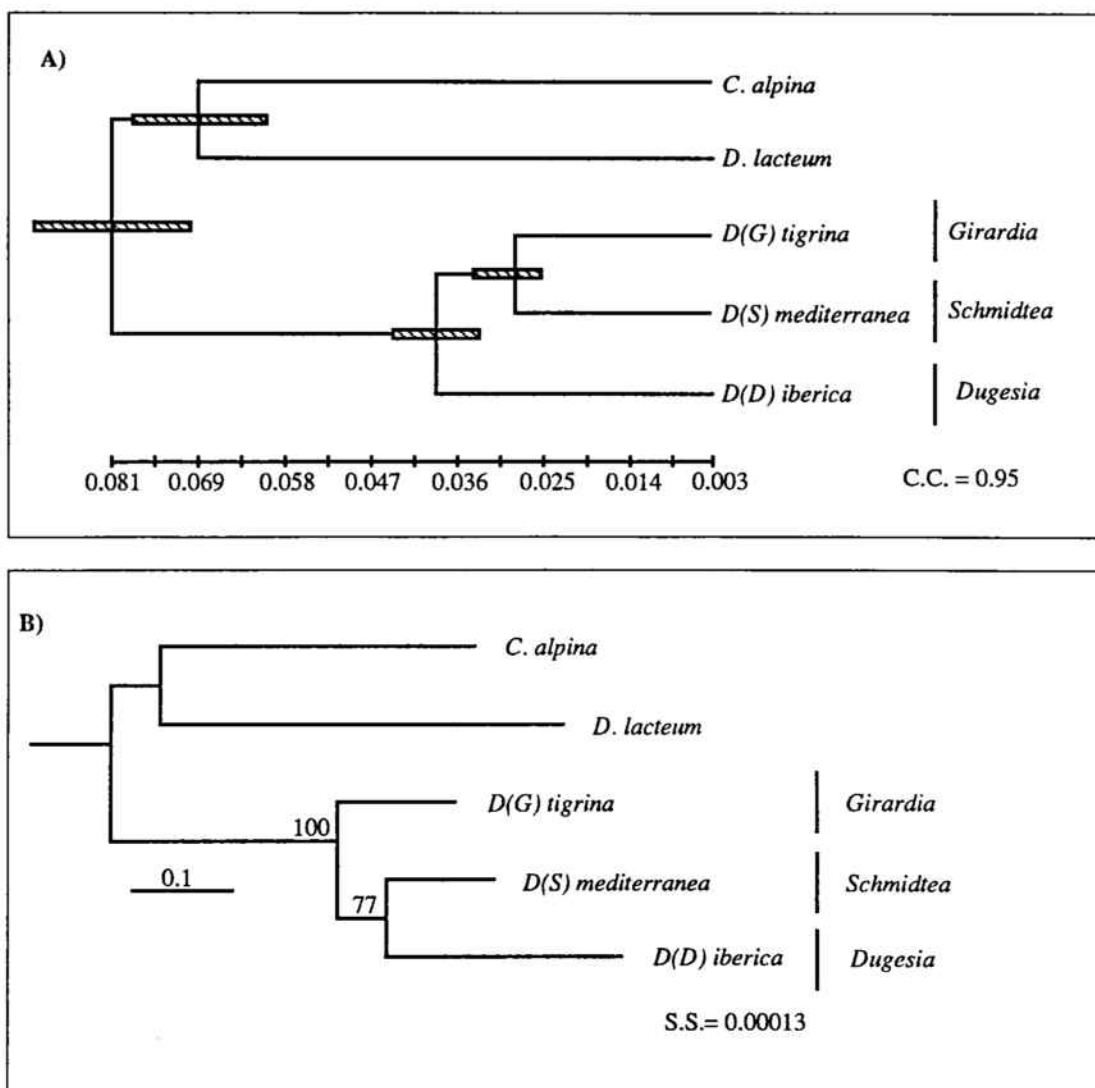


Fig. 25. Relació entre els tres subgèneres del gènere *Dugesia*, dades de les seqüències del rRNA 18S. A) UPGMA, les barres a les bifurcacions representen l'error calculat segons Nei (1985); B) MP i MQ, la longitud dels braços horitzontals és proporcional a la distància, els números a les bifurcacions són el resultat de bootstrapping (100 repliques).

5. FAMILIA PLANARIIDAE

D'aquesta família s'han estudiat tres espècies: *Crenobia alpina*, *Polycelis felina* i *Polycelis nigra* (taula 2).

5.1. GENERES *Crenobia* i *Polycelis*

Les comparacions fetes per IEE entre les dues espècies pertanyents al gènere *Polycelis* (*Polycelis felina* i *Polycelis nigra*) van donar un patró de bandes tant diferenciat (Fig. 26) que feu impossible quantificar la distància genètica per aquest mètode. A nivell enzimàtic la comparació va donar una distància (Taula 7, apartat 2) de 1.35. Aquesta és molt alta (similar a la trobada entre els subgèneres del gènere *Dugesia*; taules 8 i 19, apartat 4.1.4.1), fet que explicaria el que per IEE no fos possible fer una comparació.

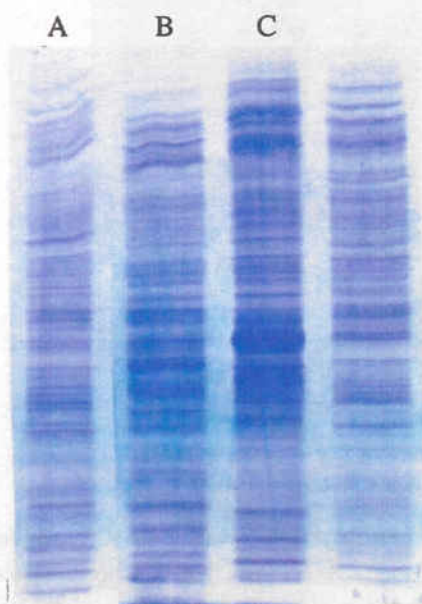


Fig. 26. IEE de les espècies de la família Planariidae: A) *Crenobia alpina*; B) *Polycelis nigra*; i C) *Polycelis felina*.

Les distàncies entre *Crenobia alpina* i les dues *Polycelis* (2.65 *Polycelis felina* i 3.41 *Polycelis nigra*, taula 7, apartat 2) són extremadament altes, aproximant-se al que esperariem entre famílies diferents.

6. FAMÍLIA DENDROCOELIDAE

6.1. GÈNERE *Dendrocoelum*

D'aquesta família s'han analitzat dues úniques espècies: una coneguda, *Dendrocoelum* (*Dendrocoelum*) *lacteum*, i un altre, encara innominada, trobada recentment a Menorca (Ribas *et al.*, 1988), que pels estudis morfològics, histològics i cromosòmics s'ha pogut adscriure al gènere *Dendrocoelum*, subgènere *Dendrocoelides* sp. (Ribas, 1990).

L'anàlisi per IEE (fig. 27) va donar un patró comparable per a les dues espècies essent la distància genètica $D= 0.78$. Aquest valor queda dins del que esperariem per espècies congenèriques, si bé cal notar que és més petit que el que trobem entre els subgèneres de la família Dugesiidae (que no s'han pogut comparar a nivell d'IEE però sí a nivell d'enzims).

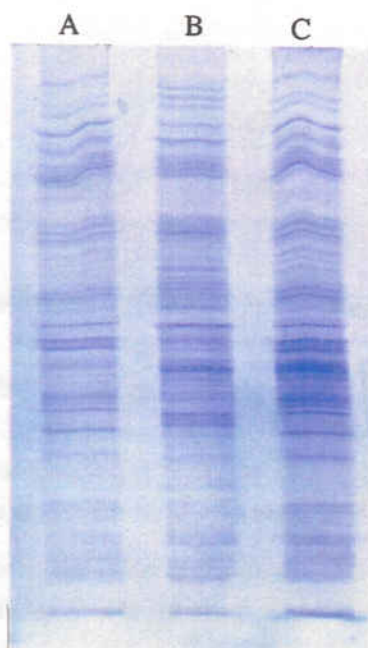


Fig. 27. IEE de les dues espècies del gènere *Dendrocoelum* localitzades als PP.CC.: A i C) *Dendrocoelum lacteum*; B) *Dendrocoelum* (*Dendrocoelides*) sp..

7. RELACIONS ENTRE LES TRES FAMÍLIES

La comparació entre famílies s'ha dut a terme a dos nivells, per anàlisi enzimàtica i per seqüenciació del rRNA 18S.

7.1.1.1 Dades enzimàtiques

Els resultats obtinguts de l'anàlisi enzimàtica es troben a la taula 7. A la taula 22 resumim les distàncies entre famílies (calculades com promig de les distàncies entre les espècies de cada família). S'han considerat per separat les espècies *Crenobia alpina* i *Polycelis felina* malgrat pertanyer ambdues a la família Planariidae.

		Dugesiiidae	Planariidae		Dendrocoelidae
			C.a.	P.f.	
Dugesiiidae		-			
Planariidae	C.a.	2.57	-		
	P.f.	3.40	2.65	-	
Dendrocoelidae		2.14	1.80	2.62	-

Taula 22. distàncies genètiques entre famílies calculades a partir de dades enzimàtiques (de la taula 7).

Els arbres UPGMA i MQ/MP es troben a les fig. 28A i B respectivament. S'observa que *Crenobia* i *Polycelis*, ambdues pertanyents a la família Planariidae, no formen una branca comuna. En l'arbre MQ s'observa que *Polycelis* constitueix una branca molt llarga indicant-nos que ha sofert un gran nombre de canvis des de la seva separació de la resta.

La família Dugesiiidae forma un grup monofilètic, com queda expresat per les barres d'error estandard de l'arbre UPGMA. No obstant això, l'ordre d'embranchament entre les famílies no queda resolt.

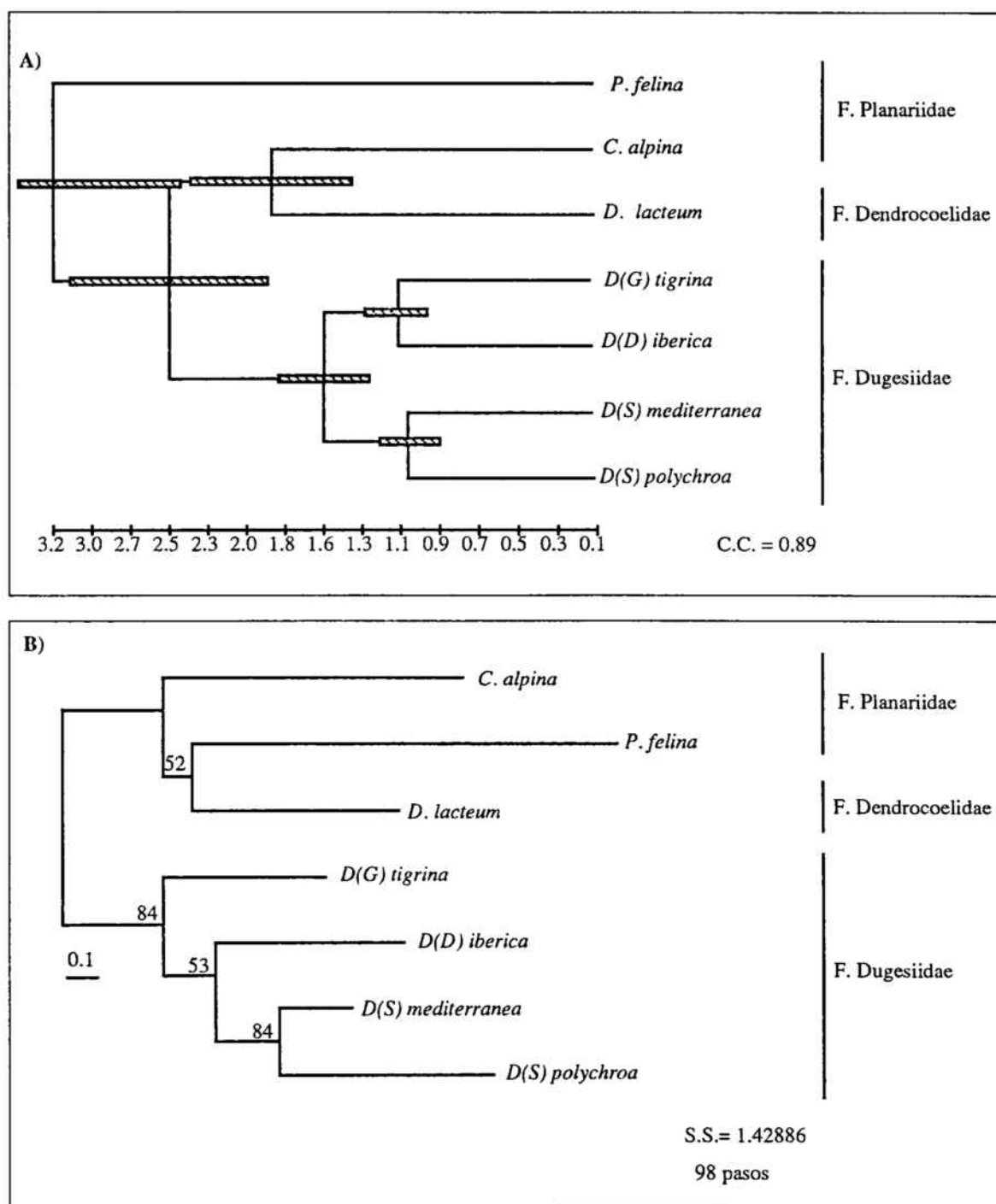


Fig. 28. Relacions entre les tres famílies de paludícoles, segons les dades enzimàtiques. A) UPGMA, les barres a les bifurcacions representen l'error calculat segons Nei (1985); B) MP i MQ, la longitud dels braços horitzontals és proporcional a la distància, els números a les bifurcacions és el percentatge de bootstrapping.

7.1.1.2 Dades del rRNA 18S

A la taula 11 (apartat 3) es troben les distàncies entre totes les espècies de planàries pertanyents a les tres famílies. Els arbres UPGMA i MP/MQ es representen a la figura 29A i 29B. Els dos arbres apoen la monofília de la família Dugesiiidae (100% de les proves de bootstrapping i barres d'error estandard). A l'igual que en els arbres derivats de dades de proteïnes, aquests agrupen *Crenobia* i *Dendrocoelum*, però aquest resultat no representa una monofília del grup ja que és apoiat molt feblement pel "bootstrapping" (66%).

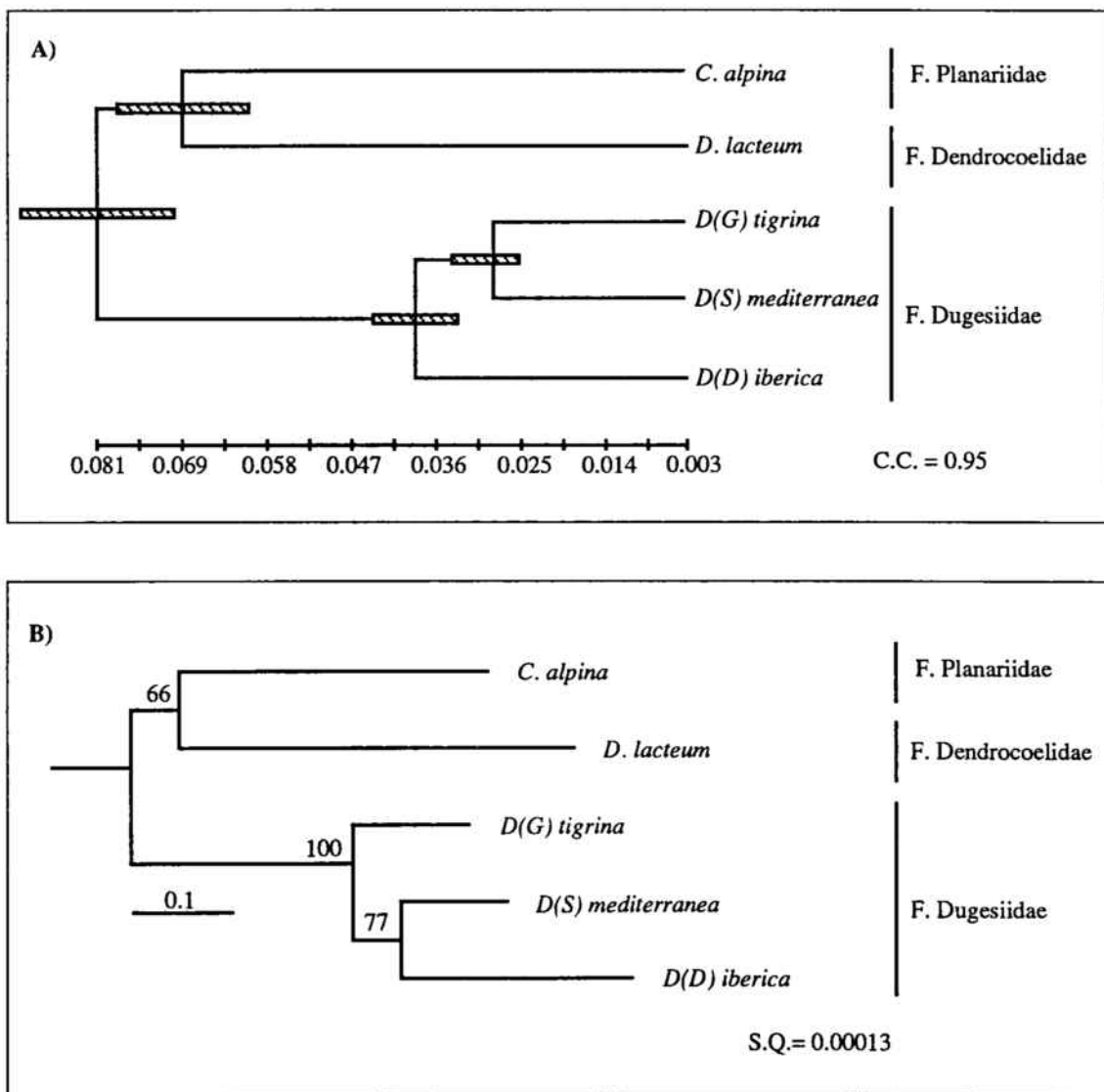


Fig. 29. Relacions entre les tres famílies de paludícoles, segons les dades del rRNA 18S. A) UPGMA, les barres a les bifurcacions representen l'error calculat segons Nei (1985); B) MP i MQ, la longitud dels braços horitzontals és proporcional a la distància, els números a les bifurcacions és el percentatge de bootstrapping; s'ha utilitzat *Bothromesostoma personatum* (rabdocel) com a grup extern per situar la rel de l'arbre.

8. RELACIONS DELS TURBELLARIS AMB ALTRES PLATHELMINTS I METAZOUS

S'han comparat les seqüències de les planàries amb les de dos Plathelminths: un neorabdocel (*Bothrosoma personatum*) de vida lliure, i un trematode (*Fasciola hepatica*) paràsit (taula 2); alhora que amb un ampli grup de seqüències de metazous que incloïen: un cordat (*Mus musculus*, Raynal *et al.*, 1984), un equinoderm (*Asterias forbesii*, Field *et al.*, 1988), un mol·lusc (*Cryptochiton stelleri*, Field *et al.*, 1988), un anèl·lid (*Lumbricus sp.*, Field *et al.*, 1988), dos artròpodes (*Eurypelma californica* i *Tenebrio molitor*, Hendriks *et al.*, 1988), un nematode (*Ascaris sp.*, Field *et al.*, 1988), un cnidari (*Hydra sp.*, Field *et al.*, 1988) i, com a grup extern, un protozou (*Dyctiostelium doscoideum*, McCarroll *et al.*, 1983).

Els arbres resultants de l'aplicació dels mètodes MP i MQ es troben a les figures 30A i B.

D'aquests arbres cal destacar-ne varies característiques:

- a) el trematode no s'agrupa amb el neorabdocel, com caldria esperar de ser certa la taxonomia proposada per Ehlers (1985a i b) (veure Introducció);
- b) els Triclàdides paludícoles constitueixen un grup monofilètic en front als altres dos plathelminths (100% de "bootstrapping");
- c) es confirma plenament la monofília dels plathelminths en front a la resta de metazous (97% de "bootstrapping"), i
- d) es referma la hipòtesi de la posició basal dels plathelminths en la radiació dels organismes bilaterals i es rebutja la hipòtesi d'una derivació secundària dels plathelminths a partir dels eucelomats.

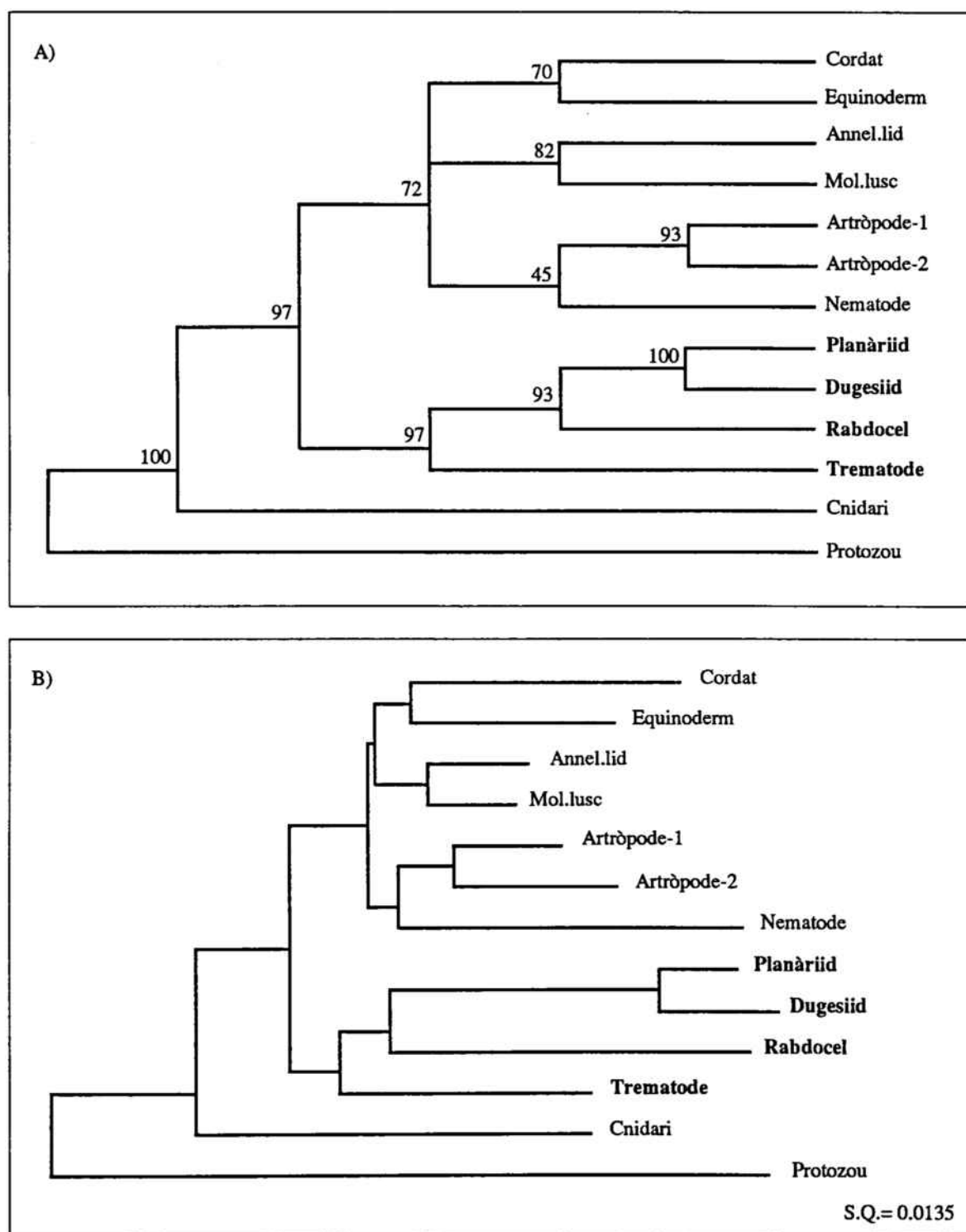


Fig. 30. Relacions entre els platihelminths i d'aquests amb d'altres metazoos, s'ha utilitzat com a grup extern un protozou. A) 50% consensus dels arbres més parsimoniosos (942-951 pasos), els nombres als embrancaments son el resultat de bootstrapping (100 repliques). B) arbre MQ, la longitud dels braços horitzontals és proporcional a la distància.

Discussió

1. FAMÍLIA DUGESIIDAE

1.1. GÈNERE *Dugesia*

1.1.1. Subgènere *Girardia*

Els resultats demostren que la variabilitat morfològica trobada (Ribas *et al.*, 1989) es correspon amb una variabilitat existent a nivell bioquímic. Així, hi ha una diferenciació pràcticament irrelevant entre les poblacions morfològicament i reproductiva homogènies ($D=0.09$ per a les poblacions fissípares), i en canvi unes distàncies pel damunt de les obtingudes per a moltes poblacions conespècifiques de vertebrats i invertebrats (taula 13) entre les poblacions de morfologia diferent (0.32-0.5 entre les classes AB1 i A/B2-A). Això sembla suggerir que les classes A/B1 i A/B2-A formen dos grups taxonòmics diferents que podrien catalogar-se com a diferents subespècies o inclús espècies. Cal, però, ésser caut a l'interpretar aquestes dades, ja que en les estimes de la diferenciació entre poblacions poden influir factors importants com la deriva genètica que pot estar molt accentuada quan el tamany efectiu de la població és petit, tal com assenyalen Nixon i Taylor (1977) en el seu estudi de la variabilitat genètica entre poblacions de *Polycelis coronata*. Tanmateix, la clara correlació trobada entre la variació morfològica i la genètica dins de les poblacions europees estudiades apoya clarament la nostra suggerència i demana una anàlisi profunda d'aquesta espècie tant en la seva àrea de distribució original (Nord Amèrica) com a les introduïdes.

La presència a Europa de les poblacions trobades a Menorca i València, que difereixen tant en els patrons de pigmentació com en la biologia de la reproducció de les poblacions fissípares descrites habitualment, i que a més presenten un grau de divergència genètica tan elevat, indica clarament que s'han donat varies introduccions a Europa de diferents stocks, races o subespècies presents en l'àrea d'origen. En particular, la presència d'una única població no fissípara a l'illa de Menorca pot entendre's millor com a resultat d'una introducció específica, probablement a través de les activitats humanes, d'aquesta forma particular a partir de l'àrea d'origen. Hyman (1939) i Kenk (1944, 1976) han descrit poblacions nordamericanes morfològicament molt similars a la trobada a l'illa de Menorca. Nogensmenys, les similituds entre les poblacions sexuades ratllades presents a Nord Amèrica i Europa tan sols pot ésser confirmada mitjançant una detallada anàlisi comparativa, morfològica i genètica, que no ha estat possible realitzar pel moment.

Així, la hipòtesi més parsimoniosa suggerida per aquests resultats veuria la distribució actual de *Dugesia* (*G*) *tigrina* a la Mediterrània occidental com el resultat de varies introduccions independents ja sigui directament de stocks nadius des d'Amèrica o indirectament des de localitats europees previament colonitzades.

1.1.2. Subgènere *Dugesia*

Els resultats de les comparacions realitzades (taula 14) indiquen la existència de tres grups ben definits que serien: *Dugesia (D) iberica*, *Dugesia (D) benazzi* i les poblacions de 27 cromosomes.

L'existència d'un grup constituït per les poblacions de 27 cromosomes (de tan diversa procedència), ben definit i diferenciat respecte a les altres dues espècies, apoia els resultats obtinguts a nivell cromosòmic (Ribas *et al.*, 1988; Ribas, 1990) que assignaven aquestes poblacions com a formes triploids de l'espècie *Dugesia (D) sicula*. No hem disposat de material pertanyent a la forma diploid d'aquesta espècie, pel que no és possible assegurar de forma definitiva, a nivell proteic, aquesta assignació. Tanmateix, la seva distància envers qualsevol de les altres dues espècies pertanyents al mateix subgènere i les dades cromosòmiques reforcen aquest supòsit.

La presència de *Dugesia biblica* dins d'aquest grup tan homogeni, constituït per les poblacions de 27 cromosomes, ens indica la seva pertanyença a *Dugesia (D) sicula*. Aquest fet ja havia estat predit per Ribas en el seu estudi cariològic (dades no publicades), i també per DeVries (1985) al dubtar de la seva identitat com a espècie diferent de *Dugesia (D) sicula*, tan pels caràcters morfològics com pels cariològics. Per altre banda, queda clar que les poblacions de 24 cromosomes (Berga i Montseny) pertanyen a *Dugesia (D) iberica* (figs. 19 i 21) tal i com s'havia definit ja a nivell cromosòmic (Ribas *et al.*, 1988).

Els arbres filogenètics deduits (fig. 19) indiquen la existència d'una major relació entre les dues espècies de nombre cromosòmic $n=8$ (*Dugesia (D) iberica* i *Dugesia (D) benazzi*) que amb la de $n=9$ (*Dugesia (D) sicula*). Manca, però, un grup extern que permetés determinar l'arrel d'aquest arbre. L'origen de les espècies d'aquest subgènere amb nombre haploid senar no és clar, ja que la hipòtesi més acceptada de l'aparició de les espècies del subgènere *Dugesia* suposa la seva derivació a partir d'algun dels subgèneres amb $n=4$ (probablement *Neppia*, DeVries i Sluys, 1991) per duplicació del nombre cromosòmic bàsic ($n=4$ a $n=8$). Així, les formes de $n=9$ haurien d'ésser el resultat d'alguna reorganització cromosòmica posterior a la duplicació. Al no ésser possible una anàlisi amb bandes G dels cromosomes de planàries, no s'ha pogut validar aquesta teoria.

En certa contradicció amb les teories anteriors, DeVries (1985), va hipotetitzar un origen més antic per a *Dugesia (D) sicula* que per a *Dugesia (D) iberica* i *Dugesia (D) benazzi*. Es va basar en les hipòtesis de la fragmentació i migració de microplaques enunciades per Baguñà (1973) i Benazzi *et al.* (1975) per a explicar la distribució de *Dugesia (S) mediterranea*, hipòtesis basades al seu torn en les teories de la història geològica de la Mediterrània Occidental (Alvarez *et al.*, 1974; Alvarez, 1976; Cardona i Contandriopoulos, 1979). Segons aquestes, l'estructura actual de la Mediterrània Occidental s'hauria originat a partir d'un gran massís (el Proto-Ligurià) que s'hauria anat fragmentant des de l'Oligocè per donar lloc successivament a les illes de Sicília, Còrsega i Sardenya, Menorca, i posteriorment al reste de les Balears per l'esfondrament de la escorça continental que les unia a la costa peninsular (Santanach *et al.*, 1986). Aquesta successió de fragmentacions i la distribució de les diferents espècies del subgènere *Dugesia* (fig. 31) van suggerir a DeVries la possibilitat de que *Dugesia (D) benazzi* s'hagués especiat en la microplaca que posteriorment va formar Còrsega i

Sardenya, mentres que *Dugesia (D) iberica* hauria evolucionat durant el període en que la península Ibèrica, el Sud de França i les Illes Balears encara eren connectades. En canvi, l'amplia distribució de *Dugesia (D) sicula*, incloent tota la Mediterrània, i especialment les formes diploids presents a Sicília, requeriria una aparició anterior.

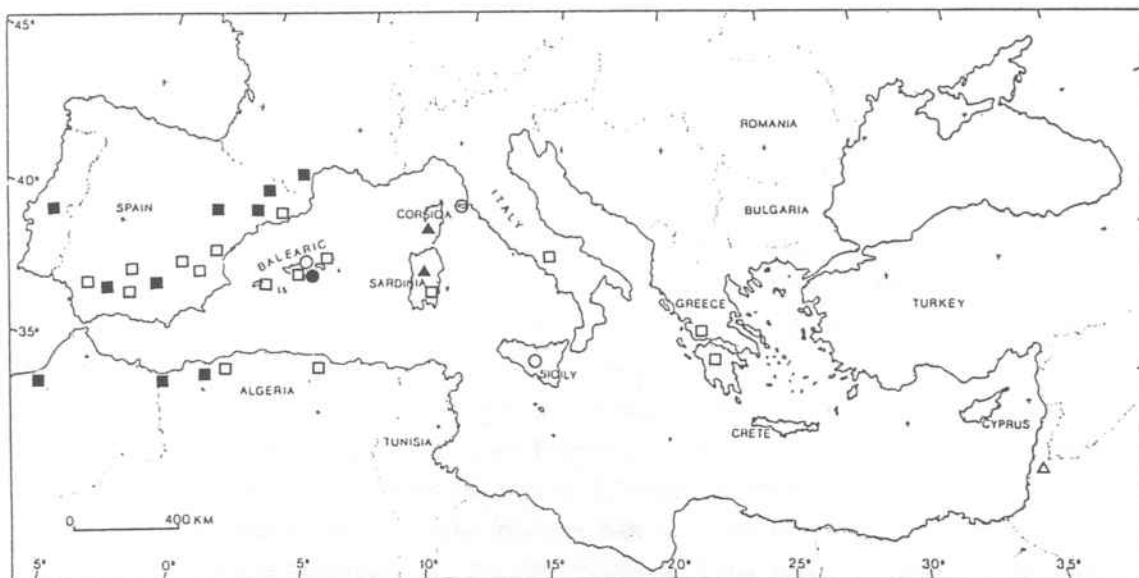


Figura 31. Mapa de distribució de *Dugesia (D) iberica* 3n (■) i 2n (●), *Dugesia (D) sicula* 3n (□) i 2n (○), *Dugesia biblica* (Δ) i *Dugesia (D) benazzi* (▲) a la Mediterrània.

Els coneixements posteriors acumulats sobre la distribució de *Dugesia (D) iberica* i *Dugesia (D) sicula* fan molt improbable la hipòtesi emesa per De Vries. En primer lloc, *Dugesia (D) iberica* es troba al Sud de la Península Ibèrica, al Marroc i a Algèria, i espècies afins a ella estan distribuïdes per tota la Mediterrània Central i Oriental, Asia Menor i Àfrica. D'altra banda, *Dugesia (D) sicula* sembla emparentada amb formes africanes i orientals (grup *japonica*) malgrat tenir $n=8$ ($2n=16$) cromosomes. El parentiu deriva de la possessió d'un caràcter apomorf (posició ventral del canal ejaculador) en front del plesiomorf (posició central) present a *Dugesia (D) iberica* i afins. si suposem un origen del subgènere *Dugesia* ($n=8$) per poliploidització de formes $n=4$ amb el caràcter plesiomorf "posició central del conducte ejaculador", el grup on s'inclou *Dugesia (D) iberica* hauria retingut el caràcter primitiu i $n=8$, mentre que el grup al que pertany *Dugesia (D) sicula* hauria adoptat el caràcter apomorf de posició de posició ventral del conducte per, posteriorment, tenir un reordenament cromosòmic que el fes passar de $n=8$ a $n=9$. Sembla doncs clar que no podem extrapolar, només per la distribució, un origen més antic per a *Dugesia (D) sicula*.

D'altra banda, l'escassa diferenciació proteica trobada entre les poblacions de *Dugesia (D) sicula*, inferior al que caldria esperar per a poblacions tan allunyades geogràficament entre les que no existeix fluxe genètic, i donat el temps de separació tan gran que s'està hipotetitzant (comparar amb el cas de les triploids de *Dugesia (D) iberica*), fa sospitar que aquesta distribució tan àmplia pot deures a una invasió pasiva de nous hàbitats, molt posterior a la

migració de microplaques. La capacitat migratoria dels triclads d'aigües dolces ha estat considerada tradicionalment com a gairebé nul·la donada la fragilitat dels organismes i manca de formes resistents (conegudes). No obstant això, es coneixen casos de dispersió de triclads per l'home (els casos de *Dugesia (G) tigrina* o de *Dugesia (S) polychroa*, recentment introduïda a Nord Amèrica). A més cal tenir en compte que la regió mediterrània ha estat centre de l'activitat humana des de molt antic: fa 7000 anys l'home era ja capaç de creuar estrets d'una amplada superior als 50 Km (Cherry, 1981) i sembla que el comerç regular en vaixell ha tingut lloc des del 3000 a.C. (Casson, 1974). El transport de triclads en l'aigua potable dels vaixells no es pot, pertant, descartar totalment. En el cas de *Dugesia (D) sicula*, la seva presència en fonts, pous i rierols de la costa hauria facilitat el seu transport de costa a costa i a les nombroses illes. Cal destacar que la forma que hauria tingut aquesta expansió és la triploid fissípara, ja que a partir d'un sol individu es pot refer tota una població en una nova localitat. Si, posteriorment, algú dels descendents és traslladat a un nova localització mantindria una gran similitud amb l'original degut a la seva natura clonal. Això doncs, podria explicar la manca de diferenciació observada i alhora, el que una forma poliploid asexual, que segons Dobzhansky *et al.* (1980) representen culs de sac evolutius amb períodes curts d'existència degut a la seva escassa capacitat d'adaptació a grans canvis en el medi, estigui tan extesa, sense caldre hipotetitzar-li un temps molt antic d'aparició. En una hipòtesi alternativa, si el fenomen de la triploidització és recurrent, podríem suposar per a aquestes poblacions triploids un origen a partir de més d'una població diploid i la seva posterior distribució. L'origen de les diferents poblacions triploids a partir de diferents poblacions o stocks diploids més o menys relacionades explicaria els petits graus de divergència observats, ja que de tractar-se d'una relació clonal absoluta hauríem d'ésser totes les formes exactament idèntiques.

Així, l'escenari més probable per a l'evolució d'aquestes espècies a la Mediterrània Occidental, tenint en compte les dades de distribució i diferenciació bioquímiques, situaria en el masís Proto-Ligurià l'ancestre dels grups *sicula* i *iberica*. Quan es produí la primera fragmentació d'aquestes espècies *Dugesia (D) sicula* i *Dugesia (D) iberica* probablement ja haurien aparegut, el que explicaria la presència de formes diploids de *Dugesia (D) sicula* a Sicília, ja que aquesta illa es va separar molt inicialment de la resta, sense que poguem determinar en quin ordre es va donar la diferenciació. Una nova fragmentació hauria donat lloc a la placa que posteriorment formaria les illes de Còrsega i Sardenya. En aquesta s'hauria especiat *Dugesia (D) benazzi* a partir de representants del grup *iberica*, abans de que es separessin les dues illes, però en una època relativament recent si tenim en compte la seva poca diferenciació (figs. 19 i 21 B). *Dugesia (D) iberica* hauria romangut en la resta de la placa, no estan present a cap de les illes fragmentades anteriorment ja sigui perquè no hi estés present en el moment de la fragmentació, ja sigui perquè n'hagi desaparegut posteriorment. Les poblacions triploids d'aquesta espècie haurien aparegut amb posterioritat a la formació de Mallorca, ja que en aquesta illa tan sols trobem les formes diploids. Finalment, i després de sofrir una triploidització, en una o varies de les poblacions originals, l'espècie *Dugesia (D) sicula* hauria sofert una migració pasiva que hauria ampliat molt la seva àrea de distribució original.

En les comparacions intra-específiques de *Dugesia (D) iberica* trobem una situació semblant al que passava a *Dugesia (G) tigrina*. Així, hi ha una certa homogeneïtat entre les poblacions fissípares amb una diferenciació bioquímica (encara que més alta que la trobada per aquella espècie) relativament baixa, en front a unes distàncies més altes entre les formes

diploids o entre aquestes i les poblacions fissípares triploids. Quan comparem les distàncies existents entre les poblacions triploids de *Dugesia (D) iberica* amb les existents entre les de *Dugesia (D) sicula* en proporció a la distància geogràfica existent entre elles, trobem que les de *Dugesia (D) iberica* són més grans. A diferència de l'anterior, aquestes darreres poden probablement explicar-se com a conseqüència del temps de separació degut a la història geològica.

La topologia dels arbres filogenètics obtinguda pels dos mètodes d'obtenció d'arbres mostra una discrepància (fig. 21A i B) que es podria explicar tenint en compte les diferents suposicions fetes pels dos tipus de mètodes. L'UPGMA assumeix una constància en la taxa d'evolució; pertant, tendeix a donar resultats erronis si aquesta condició no es compleix. El mètode MP no és sensible a les diferències en les taxes evolutives entre llinatges a no ser que aquestes siguin molt grans. Finalment, l'additiu no assumeix la constància de la taxa evolutiva (Felsenstein, 1982). Mentre que en l'UPGMA la població de Soler queda com la més diferenciada de les poblacions de *Dugesia (D) iberica*, en els arbres MP i MQ, aquesta s'agrupa amb l'altre forma diploid (Sa Calobra) malgrat que presenta un major nombre de canvis des de la seva especiació (major longitud de la branca, fig. 21B). Aquest increment del nombre de canvis a nivell proteic del biotip A2 coincideix amb la seva morfologia cromosòmica diferent respecte als altres dos biotips. L'arbre MP i MQ, si és cert, ens indicaria que la morfologia cromosòmica ancestral seria amb tots els cromosomes metacèntrics i que la població de Soler va sofrir en un moment donat una reorganització acompanyada d'un increment en l'acumulació de canvis.

Finalment, al comparar, tan a *Dugesia (D) benazzi* com a *Dugesia (D) iberica*, les formes fissípares triploids amb les formes sexuals diploids, aquestes últimes semblen haver sofert i acumulat un nombre més gran de canvis (arbres 19B i 20B). En el cas de *Dugesia (D) sicula*, no hem pogut comparar-les amb la forma diploid, si bé és d'esperar que també fos així, donada la poca diferenciació observada entre les poblacions triploids. Aquest fenomen podria explicar-se tenint en compte la naturalesa clonal de les poblacions triploids, i per tant la seva limitada capacitat d'acumular canvis.

1.1.3. Subgènere *Schmidtea*

Els resultats demostren un grau de diferenciació baix entre poblacions intraespecífiques. Aquestes contrasten amb les grans distàncies existents entre les dues espècies del subgènere que es situen quasi al nivell de gèneres (taula 18). Quan comparem amb les dades resultants de l'anàlisi d'enzims (Taula 7) veiem que, malgrat ésser la distància entre les dues espècies molt gran, està per sota de les distàncies amb altres espècies dels altres dos subgèneres del gènere *Dugesia*.

Per a *Dugesia (S) mediterranea* les tres metodologies emprades generen una única topologia filogenètica (fig. 23). Aquesta ens mostra a la població triploid amb l'heteromorfosi cromosòmica (Menorca) com a més propera de la forma diploid normal de Sardenya, quedant la població diploid amb l'heteromorfosi de Barcelona com a menys relacionada.

De *Dugesia (S) mediterranea* (inicialment biotip G del grup *Dugesia lugubris s.l.*) s'en coneixien originalment tan sols poblacions diploids sexuals (Corsega, Sardenya i Sicília)(Benazzi, 1957; 1963). Posteriorment, van ésser descrites varies poblacions diploids fissípares amb l'heteromorfosi cromosòmica (Barcelona, Mallorca, Empordà i Menorca)(Benazzi *et al.*, 1970; DeVries *et al.*, 1984; Ribas, 1990). Més tard, es va descriure una forma triploid sexuada a Sardenya (Casu *et al.*, 1982) i, finalment, una forma triploid fissípara amb l'heteromorfosi a Menorca (Ribas, 1990). Tenint en compte aquesta distribució i l'hipòtesi biogeogràfica de Baguñà *et al.* (1981) basada en la teoria de microplaques de la formació de la Mediterrànea, hauria estat lògic hipotetitzar que l'aparició de l'heteromorfosi hagues tingut lloc quan la placa que havia de donar lloc a Còrsega i Sardenya ja s'havia separat de la resta, i que, posteriorment, ambdues races (sense i amb heteromorfosi) haurien triploiditzat (Fig. 32).

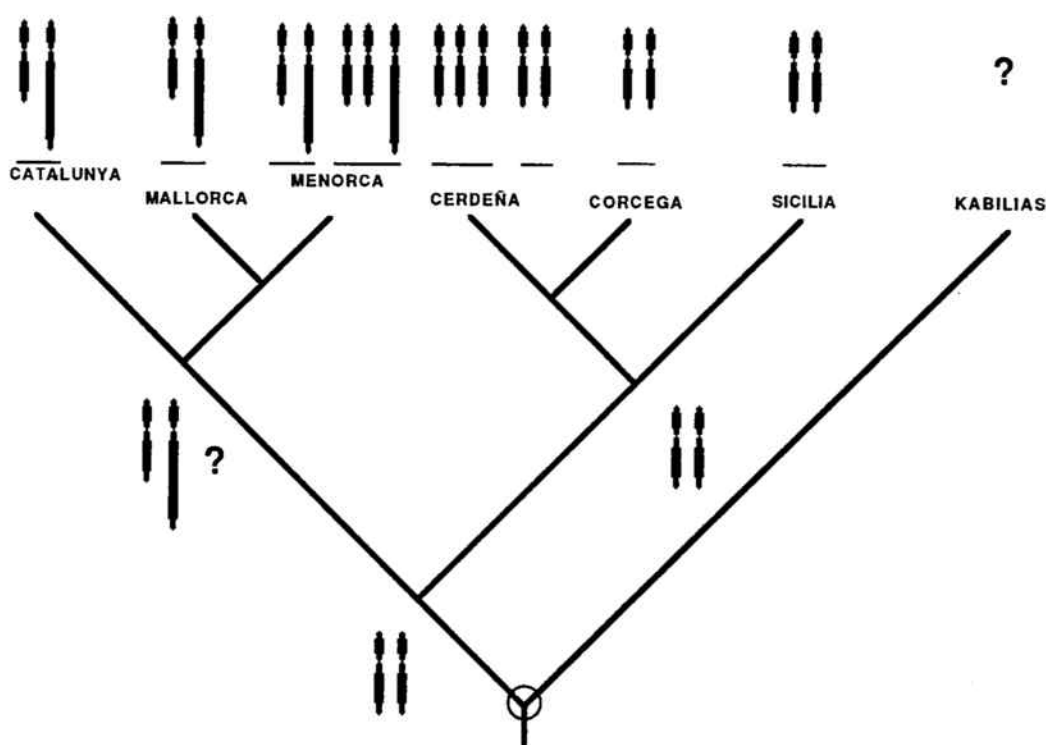


Fig. 32. Distribució dels diferents cariotips de *Dugesia (S) mediterranea* a la Mediterrània Occidental i relacions entre el cladograma d'àrees del massís Proto-Ligurià (Alvarez, 1976), i el possible cladograma cromosòmic d'aquests cariotips.

Els nostres resultats contradiuen aquesta possibilitat, donat que la forma triploid amb l'heteromorfosi de Menorca apareix com a més propera de la diploid de Sardenya que no de la de Barcelona que té l'heteromorfosi. Així, una segona hipòtesi seria que tant la forma triploid de Menorca com probablement la de Sardenya derivarien de formes diploids normals i que l'heteromorfosi hauria aparegut posteriorment, el que implica la necessitat de que hagi aparegut, almenys, dues vegades de forma independent (a Menorca i a la costa catalana). Aquesta recurrència d'una translocació cromosòmica no és un fenomen estrany, ja que amb el descobriment dels punts fràgils als cromosomes es sap que existeixen certs punts en que és molt més probable el que es produeixin trencaments. La proximitat entre les formes de Menorca i Sardenya podria ésser un reflexe del propi origen de l'illa de Menorca. Aquesta illa té una

geologia i tectònica complexes, considerant-se en l'actualitat que està composta d'una part nord-oriental d'origen més antic, reste probablement de la microplaca corso-sarda (o sigui amb clares connexions amb les illes de Còrsega i Sardenya), i una part sud-occidental, més recent amb connexions més clares amb la resta de les Balears. L'illa de Menorca és, de les Balears, la que té una flora més semblant a les de les illes tirrèniques (Cardona i Contandriopoulos, 1979). Tal vegada, doncs, es podria hipotetitzar que la proximitat entre ambdues poblacions indicaria l'origen de la forma triploid amb l'heteromorfosi menorquina a partir de formes diploids o triploids dins la placa corso-sarda abans de la separació entre Menorca i Còrsega/Sardenya (fig. 33).

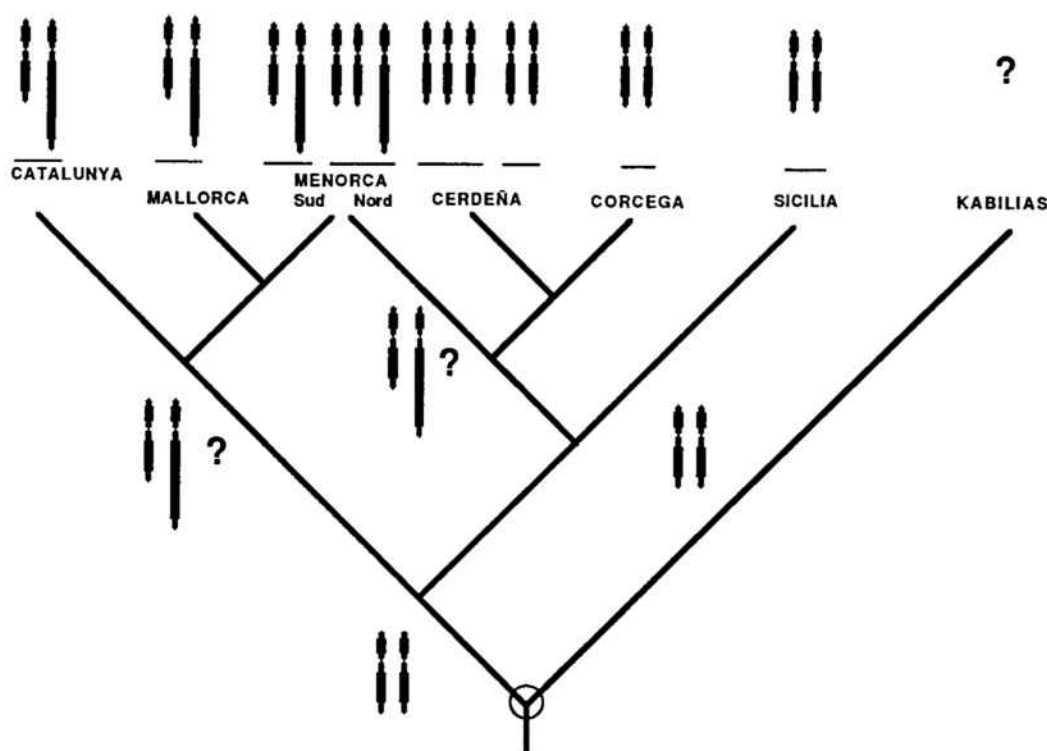


Fig. 33. Variació proposada a la figura 32 en base a les dades protèiques, en la que es té en compte l'origen dual de Menorca (Cardona i Contrandriopoulos, 1979).

Una tercera i darrera hipòtesis per explicar aquest fet paradoxal podria estar en un transport històricament recent de poblacions de Sardenya a Menorca, seguida de l'aparició de l'heteromorfosi a Menorca. En qualsevol cas, sembla inescapable el pensar en una gènesi recurrent d'aquest tipus d'heteromorfosi.

Per la seva banda, *Dugesia (S) polychroa* presenta una problemàtica diferent. En primer lloc, trobem una discrepància entre els arbres UPGMA i MP i el MQ (fig. 23). Mentre que en els 2 primers la població d'Itàlia (4n) s'agrupa amb els 2 biotips francesos (fig. 23A i B), en el MQ (fig. 23C), les poblacions de València i França són més properes, essent la de Itàlia la més allunyada. Aquesta diferència es pot explicar tenint en compte novament, com ja hem explicat amb anterioritat, les diferents suposicions fetes pels dos tipus de mètodes. A l'arbre MQ, les poblacions de València presenten una distància més gran respecte a totes les demés el que fa que s'hagi diferenciat de la francesa. En el cas de les metodologies d'agrupament i màxima

parsimonia això dona lloc a una topologia diferent. Malgrat que la màxima parsimonia no és molt sensible a les diferències en les taxes evolutives, si aquestes fan que dues espècies convergeixin per atzar donarà lloc a topologies errònies. Intentar explicar aquest increment de la taxa de canvi en la població de València es fa difícil. Una hipòtesi factible es basaria en que tractant-se d'una població molt fluctuant (es troba a les sèquies de rec dels tarongers que són totalment buides quan acaba el període de rec) per deriva genètica podria haver anat divergint força de la població francesa que presenta una població més estable.

Un altre fenomen que observem a *Dugesia (S) polychroa* és que en les dues poblacions en que conviuen dos biotips diferents (un sexual anfigmíctic i un sexual partenogenètic) el de reproducció sexual normal és, en ambdós casos, el que presenta un nombre més gran de canvis acumulats (fig. 23C). Aquest fenomen és semblant al que observàvem per a les espècies del subgènere *Dugesia* (fig. 19 i 21B). Caldria pensar, doncs, que el tipus de reproducció (sexual *s. st.* vs. sexual *s. l.*, partenogènesi, o vs. asexual, fissiparitat) ha d'estar relacionat amb l'acumulació de diferències genètiques. La sexualitat *s. st.*, amb els seus fenòmens de segregació i recombinació, assoleix la barreja de novetats genètiques i la seva acumulació, mentre que la falta de meiosi (fissiparitat o partenogènesi ameiotica) o la meiosi amb recombinació sobre un genoma previamente duplicat (partenogènesi meiòtica) no permeten l'acumulació en un mateix genoma de les novetats aparegudes en diferents individus. Així, tan per *Dugesia (S) polychroa* com pel subgènere *Dugesia* les formes sexuades normals presenten l'avantatge de tenir una major plasticitat genètica i per tant tenir més possibilitats d'adaptar-se a nous hàbitats.

Com explicar llavors que per *Dugesia (S) polychroa* aquesta avantatge hagi dut a una major expansió de la forma diploid mentre que per les espècies del subgènere *Dugesia* (*Dugesia (D) iberica* i *Dugesia (D) sicula*) no hagi estat així? La diferent modalitat de reproducció no-recombinant podria explicar aquest fet. La partenogènesi, tan meiòtica com ameiotica (cas de *Dugesia (S) polychroa*) presenta, a més de la desavantatge de no poder acumular ni reordenar amb facilitat les novetats genètiques, la de la càrrega energètica que representa una reproducció sexual, el que implica la formació de gònades i aparell reproductor en els individus, la formació de capolls, la necessitat d'un mínim de dos individus. Per altra banda, cal esperar que els nous individus atanyin la maduresa sexual per reproduir-se novament, i donar lloc a més individus, el que allarga el temps entre generacions i per tant la velocitat de duplicació de la població. En canvi, en el cas de l'asexualitat per fissiparitat (*Dugesia (D) sicula* i *Dugesia (D) iberica*) s'evita aquesta despesa energètica extra i, a més, presenta l'avantatge de que un sol individu pot donar lloc a tota una població sense que calgui un període de temps massa llarg, ja que per divisions successives es produeix una duplicació del nombre d'individus a cada generació el que dona un creixement exponencial. Aquesta característica explica l'èxit colonitzador de les espècies fissípares. Ara bé, en els dos casos (fissiparitat i partenogènesi) la manca de variabilitat genètica l'hauran de pagar en forma de poca capacitat d'adaptació a noves situacions ambientals el que les farà, en principi, formes poc longeves tendents a la desaparició, per a reapareixer novament en algun moment a partir d'individus diploids. Malgrat aquestes observacions són certes per a la Península Ibèrica, a la resta d'Europa *Dugesia (S) polychroa* presenta, inversament, una major distribució del biotip triploid. Una possible explicació d'aquest fet seria suposar que la triploidia tingues un efecte en una major resistència a climes més freds, p. ex.. També existeix la possibilitat que un estudi més ampli de la distribució

d'aquests organismes a Europa (similar al fet pels PP.CC. per Ribas, 1990) revelés que en realitat la forma diploid fós la més estesa.

1.2. RELACIO ENTRE SUBGENERES

Les dades de variabilitat enzimàtica apoen l'agrupament de les 5 espècies de dugèsids en tres subgèneres: *Schmidtea*, *Dugesia* i *Girardia*. El seu ordre d'embranchament, però, queda sense resoldre degut als valors dels errors estandard dels embrancaments (fig. 24). Això podria indicar que aquests subgèneres van divergir fa molt de temps, donat que els canvis genètics han reduït el nombre de bandes comunes. En efecte, les distàncies genètiques entre aquests subgèneres ($D=1.2-1.6$, taula 19) estan dins dels marges de les trobades per gèneres confamiliars en altres grups (taula 20). El subgènere *Girardia*, nadiu de Nord Amèrica i sols recentment introduït a Europa, Asia i probablement Austràlia ha estat isolat dels subgèneres europeus *Schmidtea* i *Dugesia* al menys durant 70 millions d'anys, des de que Europa i Nord Amèrica van separar-se per deriva continental.

Malgrat que el patró d'embranchaments entre aquests subgèneres roman sense resoldre, és important destacar que el "bootstrapping" ha reproduït, amb les dades del rRNA 18S, l'agrupament de *Schmidtea* i *Dugesia* un 77% de les vegades. Hem de destacar també que les discrepàncies trobades a aquest nivell entre els arbres UPGMA (tant de dades proteiques com de seqüències del rRNA 18 S) i els arbres MP i MQ (figs. 24 i 25), poden explicar-se novament per les diferències en les suposicions fetes per aquests mètodes. En els arbres derivats de les seqüències del rRNA 18S, *Dugesia (D) ibérica* mostra un nombre de canvis superiors a l'esperat quan es compara als subgèneres i espècies de la família Dugesiidae (figura 25B). Similarmet, en els arbres derivats de dades enzimàtiques, *Dugesia (S) polychroa* mostra aquesta característica (figura 24B). En els arbres UPGMA, la seva major dissimilitud fa que aquestes espècies es separin independentment de les espècies dels altres dos subgèneres corresponents. Es sap que les taxes d'evolució poden ésser diferents per a diferents llinatges (veura discussió més endavant); on existeixen diferències en les taxes d'evolució, els arbres additius són més fiables que els arbres UPGMA (Felsenstein, 1982), el que dona més força a l'agrupament postulat de *Dugesia* amb *Schmidtea*.

Aquest ordre d'embranchament difereix del proposat per De Vries basant-se en una anàlisi cladística de les característiques morfològiques del grup (De Vries, 1987; DeVries i Sluys, 1991). Malgrat que la qüestió roman encara oberta, un factor que pot explicar aquesta discrepància pot ésser la única sinapomorfia utilitzada per De Vries per agrupar *Girardia* i *Schmidtea* (la "angled bursal canal") al nostre entendre completament errònia. Malgrat que aquest caràcter és molt clar en el subgènere *Girardia*, no el presenta cap espècie del subgènere *Schmidtea*.

2. FAMÍLIA PLANARIIDAE

La comparació a nivell de IEE i d'enzims de les dues espècies pertanyents al gènere *Polycelis* descobreix l'existència d'una gran diferenciació genètica entre ambdues, fins al nivell de que presentin distàncies genètiques similars a les que trobem entre els 3 subgèneres del gènere *Dugesia*, que alhora són equivalents als trobats entre gèneres confamiliars per a altres grups d'organismes. Biersna i Wijsman (1981) ja havien trobat per a aquestes espècies un patró de bandes molt diferent en comparar el patró de proteïnes totals per electroforesi, malgrat no fer cap quantificació de les distàncies genètiques. Les inter-relacions d'aquestes espècies no estan ben enteses i sembla que el gènere podria ésser dividit en varis gèneres i subgèneres vàlids tal i com han intentat investigadors rusos (citats a Ball i Reynoldson, 1981). Aquestes diferències no són d'extranyar si tenim en compte que *Polycelis felina* i *Polycelis nigra* mostren un grau similar de diferències en la morfologia del cap, l'estructura del complex copulador i la cariologia als que presenten els subgèneres de dugèsids.

Les distàncies entre els dos gèneres d'aquesta família (*Crenobia* i *Polycelis*) són molt grans, de l'ordre de l'esperat per a espècies pertanyents a diferents famílies tal i com caldria esperar tenint en compte els resultats anteriors. Aquest fet, si cal més important encara, indica l'extrema necessitat de fer una revisió en profunditat de la taxonomia d'aquesta família.

3. FAMÍLIA DENDROCOELIDAE

La comparació entre els dos membres d'aquesta família trobats als PP.CC., revela una distància esperable per a subgèneres, a diferència del que trobavem per als subgèneres del gènere *Dugesia*. Cal destacar que aquesta distància és fins i tot, més petita que la trobada entre les dues espècies del gènere *Polycelis*, el que apoiaria la suggerència feta anteriorment de la necessitat de dividir el gènere *Polycelis* en varis gèneres i subgèneres.

4. COMPARACIO ENTRE FAMÍLIES

Les distàncies entre famílies, calculades a partir de les dades enzimàtiques (taula 22), trobem que les parelles *Crenobia*-Dugesiidae, *Dendrocoelum*-Dugesiidae i *Crenobia*-*Dendrocoelum* donen valors similars, mentre que les comparacions entre *Polycelis* i les altres famílies dona valors molt més alts. A més, *Crenobia* i *Polycelis*, que convencionalment estan situades a la mateixa família, mai formen un grup monofilètic, mentres que *Polycelis felina* tendeix a agrupar-se amb *Dendrocoelum lacteum* (fig. 28), quedant els tres gèneres (*Crenobia*, *Polycelis* i *Dendrocoelum*) agrupats quan es comparen amb la monofilètica família Dugesiidae (figs. 28). L'ordre d'embranchament de les tres famílies queda sense resoldre a aquest nivell.

Aquests resultats, i també la gran distància trobada entre les dues espècies de *Polycelis* (*Polycelis felina* i *Polycelis nigra*: veura apartat 2) semblen indicar que la família Planariidae, taxonòmicament la més antiga dels Paludícola, i de la que s'han extret les altres dues famílies actuals, necessita una profunda revisió taxonòmica que pot conduir a dividir-la en diferents unitats taxonòmiques (famílies?, subfamílies?).

A l'estudiar les distàncies resultants de les comparacions del rRNA 18S entre famílies de Paludícoles trobem que malgrat ésser relativament petites (0.065-0.089, taula 11), són molt properes a les que separen classes de vertebrats (mamífers: rata, ratolí i humà, i amfibis: *Xenopus*, $d=0.05$). Les topologies dels arbres inferits a partir d'aquestes distàncies i de les seqüències (fig. 29), tot i estar sovint feblement apoiades, suggereixen que: 1) la família Dugesidae forma un grup monofilètic (100 % de bootstrapping, fig. 29B); 2) *Crenobia* i *Dendrocoelum* formen un grup germà (Planarioidea) dels Dugesidae (Dugesioidea, veura fig. 4A). Aquests dos punts apoiarien la tesi d'una major antiguetat dels dugèsids, encara que caldria comptar amb algun representant dels proseriats com a grup extern que permetés posar a prova les teories de Ball (1981) sobre el possible origen polifilètic de les dues superfamílies (fig. 4B).

5. COMPARACIO AMB ALTRES PLATHELMINTS I METAZOOS

Quan es comparen les dades del rRNA 18S obtingudes dels grups de platihelminths paràsits no s'obté, tal com esperaríem segons la taxonomia proposada per Ehlers (fig. 2), un agrupament dels paràsits amb el neorhabdocel sino que aquest últim forma un grup amb els paludícoles. El fet de disposar només d'una seqüència per cada grup no permet extreure'n una conclusió definitiva. Cal tenir en compte però, que *Fasciola hepatica* presenta una proporció de GC's més alta que la resta de platihelminths comparats, el que fa que per atzar tindrà tendència a semblar-se en moltes posicions a seqüències externes. Aquest fet podria fer-la sortir de la seva posició correcta a l'arbre per anar cap a la base dels platihelminths. Caldria, doncs, seqüenciar més paràsits, a ser possible no d'animals de sang calenta, i veure si aquests també presenten o no un increment de la proporció de GCs. D'ésser així pensariem que es tracta d'un fenomen general d'aquest grup, independentment de l'observat en els vertebrats de sang calenta, i en tot cas hauriem de suposar lògica la seva derivació molt inicial dels platihelminths. Per contra, si altres grups de paràsits presentessin una proporció baixa de GCs equivalent a la de la resta de platihelminths seria possible que aquests ocupessin la seva posició correcta a l'arbre (ja sigui junt al rhabdocel o qualsevol altre) i en tot cas, possiblement arrosegarien a *Fasciola hepatica* amb elles.

Les comparacions dels Paludicola i els altres platihelminths (*Bothriosomastoma*: ordre Neorhabdocoela; i *Fasciola*: classe Trematoda) a altres seqüències de metazoos apoen clarament la monofília dels platihelminths (97% de bootstrapping, fig. 30). D'acord amb dades anteriors (Field et al., 1988; Valentine, 1989, fig. 30) els platihelminths semblen formar un veritable grup germà respecte a la resta dels Eubilateria (Ax, 1987), i no poden ésser considerats una versió simplificada de cap ancestre celomat com suggerien les diverses versions de la teoria

arquicelomada (veura introducció, Ax, 1987 i Willmer, 1990, per a una discussió en profunditat). Dels resultats moleculars obtinguts fins ara sembla que són l'únic grup sense un veritable celoma que no s'agrupa dins de la gran radiació de metazoos bilaterals, ja que tan els nemàtodes (pseudocelomats) com els nemertins (acelomats) (Turbeville, comunicació personal) sembla formar part d'aquesta radicació dels eucelomats, el que deixaria a les planàries com l'únic grup realment acelomat.

Cal, però, ésser molt caut amb aquestes conclusions donada la preliminaritat de les dades i les encara escasses anàlisis realitzades. Estudis més profunds, o un major nombre d'organismes analitzats podrien desvelar noves relacions.

6. CONSIDERACIONS TAXONOMIQUES

Al llarg de tot aquest treball hem constatat el fet que les distàncies evolutives separant famílies, gèneres, subgèneres, espècies i poblacions als turbel·laris, procedents tant de les dades de proteïnes com de seqüències del rRNA 18S, són altes quan es comparen amb altres grups animals. Malgrat que no hi ha distàncies genètiques estàndards que defineixin espècies, gèneres i taxons superiors, els alts valors trobats comparats amb altres grups animals, indica la conveniència de fer una revisió taxonòmica de tots aquests grups.

A nivell intraespecífic trobem els casos de la gran diferenciació entre les races de *Dugesia* (*G.*) *tigrina* o entre els biotips de les espècies del subgènere *Dugesia*. Aquests casos, però, són altament complexos donat que posen de relleu un tema ja molt debatut: quin rang taxonòmic cal donar a grups d'organismes amb una clara relació de poliploidia en que l'intercanvi genètic és, a més, impossible degut a l'asexualitat de les formes poliploids? (Selander i Kauffman, 1975; Vrijenhoek, 1979; Cole, 1985). Se las ha de considerar com a espècies diferents o bé senzillament com a races, biotips o subespècies de la mateixa espècie? caldria potser posar uns límits en la divergència genètica a partir del qual passessin a ésser espècies diferents?. Un gran nombre d'autors especialistes en aquests temes han dedicat pàgines i llibres a aquestes qüestions (Mayr, 1969; Dubois i Gunther, 1982; Frost i Wright, 1988; Echelle, 1990) a les que adrecem als lectors que hi puguin estar interessats.

Les elevades distàncies genètiques trobades entre els 3 subgèneres del gènere *Dugesia* indiquen la conveniència d'eleva-los al rang de gènere, proposta feta ja per DeVries i Sluys (1991) en base a dades morfològiques. A més de les distàncies genètiques, existeixen unes sòlides bases biològiques per apoiar aquest canvi. Primer, tal com va establir Ball (1974a,b 1977b) en la seva revisió dels gèneres *Cura*, *Neppia* i *Spathula* i per DeVries (1987) en la seva revisió del subgènere *Dugesia*, l'aparell reproductor i els òrgans dels sentits d'aquests taxons, així com els de *Girardia* i *Schmidtea*, presenten forces autapomorfies. Segon, malgrat que *Dugesia* i *Schmidtea* coexisteixen a Europa, el subgènere *Girardia*, nadiu de Nord i Sud Amèrica, mostra una distribució totalment disjunta de les primeres. Com ja s'ha mencionat, la separació entre *Girardia* i *Dugesia/Schmidtea* deu haver-se donat al menys fa 70 milions d'anys. Per altre banda, els gèneres *Cura*, *Neppia* i *Spathula* estan restringits a l'hemisferi sud,

concretament Australàsia, solament superposant-se amb *Girardia* a Sud Amèrica (gènere *Cura*). Finalment, el gènere *Dugesia*, abastant els subgèneres *Dugesia*, *Girardia* i *Schmidtea*, conté al voltant de 100 espècies (50 per *Dugesia*, 45 per *Girardia* i 4 per *Schmidtea*). En contrast, el nombre d'espècies en els altres gèneres és molt més petit: 5 per *Cura*, 7 per *Spathula* i 4 per *Neppia*. Encara que es pot pensar que la desigualtat en la grandària d'aquests gèneres és deguda a la independència de l'especiació i la divergència morfològica (Mayr, 1969), amb el gènere *Dugesia* havent sofert una especiació més amplia amb menor divergència morfològica que els altres gèneres, les clares diferències en morfologia, distribució geogràfica i suposat temps d'origen entre *Dugesia*, *Girardia* i *Schmidtea* parlen en contra d'aquesta interpretació i apoen la necessitat d'eleva-los al rang de gèneres. Tanmateix, abans d'aquesta elevació caldria una àmplia revisió de cadascun dels subgèneres.

Les grans distàncies genètiques trobades entre els planàriids *Polycelis felina* i *Polycelis nigra* plantejen un problema similar. El gènere *Polycelis* comprén unes 30 espècies distribuïdes a la major part de l'hemisferi nord. Aquest fet, sumat a les grans distàncies genètiques trobades, suggereixen que les espècies actuals podrien agrupar-se en tàxons nous (gèneres, subgèneres) que reflectissin millor que ara la realitat taxonòmica del grup. D'altra banda, el no agrupament de *Polycelis* i *Crenobia*, situades a la mateixa família, i la freqüent agrupació de *Polycelis* amb *Dendrocoelum*, que pertanyen a diferents famílies (fig. 28), demostren la necessitat d'una profunda revisió taxonòmica de la família Planariidae.

Si les distàncies genètiques es prenguessin pel seu valor nominal, es podrien aplicar uns arguments similars als ordres de turbellaris i a les classes de platihelminths. En efecte, els valors trobats entre el rabdocel (*Bothriomesostoma*) i els triclads, i entre els turbellaris i el trematoda (*Fasciola*), són més elevats que els que es troben per taxons equivalents d'altres filums, i inclús entre filums (fig. 30). Tanmateix, les grans variacions descobertes en les taxes de canvi de les seqüències de rRNA 18S entre diferents grups d'organismes (veura més endavant) obliga a una interpretació molt cauta i conservadora dels resultats fins que estigui disponible una més àmplia col·lecció de dades dels rRNA 18 i 28S dels platihelminths i d'altres filums.

7. CONSIDERACIONS EVOLUTIVES

7.1. LA MANCA DE POLIMORFISME

Tan a nivell d'IEE com de l'anàlisi enzimàtica hem trobat una manca quasi absoluta de polimorfisme entre els organismes d'una mateixa població. Les úniques dades existents de polimorfismes enzimàtics a planàries o altres platihelminths donen resultats similars. Biersma i Wijsman (1981) en un estudi de *Polycelis nigra* i *Polycelis tenuis* troben que aquestes dues espècies presenten dos patrons de bandes diferents per la Mdh, dels quals un és molt majoritari, però són monomòrfiques per la TO. Es de destacar que un dels patrons de bandes trobats per la Mdh per aquests autors coincideix amb el que trobem nosaltres per *Polycelis nigra* en aquest

estudi. Endemés, el patró trobat és totalment diferent entre les espècies *Polycelis nigra*, *Polycelis felina*, *Crenobia alpina*, *Dendrocoelum lacteum* i *Dugesia (D) gonocephala*, malgrat que en no donar els patrons de bandes es fa impossible comparar-los als trobats en el nostre estudi. En un estudi de la variació genètica entre poblacions d'un rabdocel Herbert i Payne (1985), troben que, de 10 loci estudiats, sols dos presenten polimorfisme en les poblacions analitzades. Finalment, Nascetti *et al.* (1990) en un estudi de varies poblacions de *Dugesia (D) dorocephala* de Nord Amèrica troben també una manca de polimorfisme junt amb la presència d'heterozigosis fixades per a les poblacions asexuals. A més, troben una diferenciació pràcticament absoluta entre les diferents espècies el que resulta en unes distàncies molt elevades.

Aquesta manca de polimorfisme es podria explicar com a conseqüència de la reproducció asexual per fissiparitat a la majoria de les poblacions analitzades: *Dugesia (G) tigrina*, *Dugesia (D) sicula*, *Dugesia (D) iberica* i *Dugesia (S) mediterranea* presenten reproducció fissipara i *Dugesia (S) polychroa* partenogenètica, pel que és fàcil que siguin poblacions clòniques on és poc probable que s'extengui cap nova mutació. Les úniques espècies sexuals estudiades (*Polycelis felina*, *Polycelis nigra*, *Crenobia alpina* i *Dendrocoelum lacteum*) són també les que han presentat algun cas de polimorfisme (excepte *Dendrocoelum lacteum*). Cal tenir en compte també que essent aquesta darrera espècie poc abundant, són per les que s'ha estudiat un nombre menor d'individus ($n=10$ en molts casos), disminuint la probabilitat de detectar polimorfismes si aquests són estranys. Per altra banda, en aquestes poblacions cap la possibilitat que la manca de polimorfisme es degui a un efecte de tamany de població efectives petites, cas molt probable, que duria a una gran influència de la deriva genètica en la composició del genoma de les poblacions.

Situacions similars de manca de polimorfisme s'han descrit en grups de protozous paràsits. Un estudi recent de Tybairenc *et al.* (1990) on analitzen en profunditat varies poblacions de cadascuna de diverses espècies d'aquests protozous, ha permès caracteritzar aquesta manca de polimorfisme i enunciar uns criteris que permeten determinar quan la clonalitat deguda a la reproducció asexual pot explicar els fenòmens observats. Aquests criteris inclouen: la manca de polimorfisme, la presència d'heterozigosi fixada, la manca de determinats genotips, etc.. Aquests fenòmens s'han observat parcialment a planàries (tant en el nostre treball com en el de Nascetti *et al.*, 1991) malgrat caldria un estudi més ampli en diferents poblacions d'una mateixa espècie (properes i llunyanes) que permetés demostrar de forma inequívoca la natura clonal o no de les poblacions (cas especialment interessant per aquelles poblacions en que es suposa l'alternància de cicles de reproducció sexual amb fissipara on el caràcter clonal o no dels individus és incert). De particular interès és la proposta feta per aquests autors de crear una unitat taxonòmica nova: el clon natural. Aquest permetria classificar, en base a criteris com poden ésser marcadors genètics, les formes asexuals que, com ja hem exposat anteriorment, són sovint de difícil assignació taxonòmica.

7.2. LA DIFERENCIACIO MOLECULAR

Les distàncies genètiques tan grans trobades en aquest estudi entre poblacions, espècies, gèneres, famílies, ordres, classes i filum de Plathelminthes, tenen implicacions evolutives d'interès ja que poden indicar-nos que ens trobem en front a un grup molt antic, dins del que les espècies han estat evolucionant independentment per un període llarg de temps. Si suposem que les taxes d'evolució són, a grans trets, equivalents entre els mamífers i les planàries, els tres subgèneres de la família Dugesidae haurien estat evolucionant separatament des d'abans de l'origen de la major part dels ordres de mamífers actuals (D entre subgèneres de planàries = 0.027-0.039; D entre O. primats i O. rosegadors = 0.01); és a dir, al voltant d'uns 50-60 milions d'anys.

Una interpretació alterna a les grans distàncies evolutives que separen les famílies i gèneres de planàries és que aquests organismes acumulin mutacions més rapidament que altres grups com els mamífers. Estudis duts a terme utilitzant seqüències del rRNA 18S han demostrat l'existència de grans variacions entre diferents llinatges animals pel que fa al nombre de substitucions acumulades des de la seva divergència. Així, als equinoderms, les holotúries han acumulat un gran nombre de substitucions en comparació amb les altres quatre classes (Raff *et al.*, 1988; Field *et al.*, 1988). Es troben variacions similars en el nombre de substitucions entre llinatges d'artròpodes (Field *et al.*, 1988; Pfeifer *et al.*, comunicació personal), en el filum Sipuncula (Field *et al.*, 1988) i entre alguns nematodes (Turbeville, comunicació personal). Els motius d'aquestes variacions no són coneguts.

S'han observat també variacions en el nombre de substitucions entre les seqüències del rRNA de la subunitat petita de procariotes (ex. veura Woese, Maniloff i Zablen, 1980; Woese, 1987; Yang i Woese, 1989). Woese ha identificat dues característiques als procariotes que "evolucionen ràpidament": 1) aquests organismes mostren una tendència més gran que la normal a variar posicions en troços de la seqüència altament conservats; i 2) aquests organismes presenten fenotips atípics o estranys. El fenotip de les planàries és generalment considerat com evolutivament conservatiu (Ax, 1987; Willmer, 1990); així aquests organismes no s'adeqüen al model de Woese d'organismes "d'evolució ràpida".

De fet, la reduïda evolució morfològica que han sofert aquests animals apareix en un contrast sorprenent front al nombre relativament alt de canvis moleculars. El patró de divergències antigues que mostren (fig. 30B, comparar la profunditat de les bifurcacions entre platihelminths amb les dels altres grups de metazoos) suggereix que aquests organismes presenten una taxa baixa de cladogènesi, de canvi morfològic i d'extinció. Aquest contrast sembla implicar que aquests animals es troben morfològicament en una situació estacionària.

La manca d'una cavitat del cos reomplerta de fluids podria explicar aquesta estasi morfològica. Una de les funcions bàsiques de qualsevol cavitat del cos (sigui celoma, hemocel, ...) és la d'esdevenir un sistema, inicialment senzill, de distribució de nutrients i de gasos respiratoris als teixits, gràcies a la circulació dels fluids interns (Willmer, 1990). L'aparició d'un sistema circulatori permet un increment de la mida de l'organisme, ja que la nutrició i l'arribada de gasos a totes les cèl·lules ja no depen exclusivament de la difusió des del tub digestiu i des de l'exterior. L'increment de mida, junt amb la presència del sistema circulatori permetrà o durà a l'organisme a desenvolupar òrgans unitaris o parells que substituïran les cèl·lules

especialitzades repartides per tot el còs (per exemple, les cèl·lules flamígeres dels platihelminths, necessaries per l'excreció dels productes de desfet de les cèl·lules, podran agrupar-se en uns òrgans que, gràcies al sistema circulatori, rebran aquest productes de totes les cèl·lules), i a més li permetrà un més alt grau de coordinació gràcies a la utilització de la circulació d'hormones, el que implica un increment en la complexitat de tipus cel·lulars, de teixits i d'òrgans. En canvi, un organisme sense sistema circulatori es veu obligat a mantenir una morfologia plana o una mida molt petita, no superior a 1 mm en l'eix dorso-ventral (Barnes et al., 1988, pp. 349-350), per tal que totes les seves cèl·lules puguin accedir als gasos i als nutrients, el que no permet una evolució ulterior en tres dimensions, altament limitant.

Si acceptem l'antiguetat del grup platihelminths, podríem hipotetitzar que uns organismes planuroids acelomats haurien, per una banda, adoptat alguna forma de cavitat del cos que els hi va obrir tot un nou món de possibilitats de variacions i d'evolució morfològica (augment de mida, desenvolupament d'òrgans, etc.) donant lloc a l'àmplia radicació observada, mentre que altres haurien mantingut l'estructura original sense cavitats del cos, donant lloc al grup dels platihelminths que coneixem avui. Aquests darrers haurien mantingut, però, un ritme equivalent de canvis moleculars que explicaria la diferenciació observada.

Es evident que el manteniment de l'estructura de "cuc plà" no és de fet gens desavantatjosa tenint en compte l'èxit de supervivència i diversificació dels platihelminths (unes 25.000 espècies). A més, el grau baix de complexitat que presenten els hi conferirà d'altres avantatges, com pot ésser el manteniment de la capacitat de regeneració que presenten alguns grups de platihelminths. Malgrat tot, aquells organismes que han adoptat la forma de "cuc" amb la innovació del celoma han estat encara més exitosos. Així, cucs i artròpodes són els dos "baüplan", o esquema corporal bàsic, més exitosos del planeta, superant de molt a les altres formes, tan en nombre d'espècies com en biomassa (Willmer, 1990).

8. PROTEINES I ACIDS NUCLEICS COM A CARACTERS TAXONOMICS I FILOGENETICS EN LES PLANARIES D'AIGUES DOLCES

8.1. PROTEINES

Una de les dades que esperavem obtenir de l'estudi electroforètic de diverses espècies o poblacions és l'establiment d'uns patrons estàndards de bandes proteiques per a cada tàxon, que permetessin reconèixer-los de forma inequívoca, a l'igual que passa amb un cariotip. Els resultats obtinguts a nivell d'IEE mostren la dificultat d'assolir aquest objectiu degut bàsicament a la falta de reproduïbilitat del patró de bandes total. Aquest fenomen seria degut, als menys en part, a les dificultats de separar una gran quantitat de bandes (40-50) en un espai relativament petit (9-10 cm). Així, petites variacions del gradient de pH obtingut provoquen superposició de bandes que en altre ocasió estarien separades. En els estudis enzimàtics, a l'estar estudiant

independenment cada loci, sí és possible establir un patró de cada enzim per a cada una de les espècies, cosa especialment interessant per a les espècies asexuals en que (seguint la nomenclatura proposada per Tybairnc *et al.*, 1991) es podrien definir clons naturals en base a aquests marcadors genètics. Per aquest motiu, l'ús de l'IEE com a tècnica diagnòstica, encara que possible, queda molt limitada degut a la dificultat de l'estandarització d'un patró senzill, reproducible i fàcil de reconèixer. Amb l'anàlisi enzimàtica per contra això és possible, si escollim en cada cas els enzims adients per al grup que es vol reconèixer.

No s'ens escapa que la manca de reproduïbilitat esmentada per a l'IEE pot qüestionar les comparacions filogenètiques realitzades amb aquesta tècnica, al no ésser possible comparar els patrons obtinguts en gels diferents. Aquesta dificultat es supera analitzant conjuntament tots els tàxons que volem comparar cada cop que tinguem una nova espècie o població.

Els resultats demostren que l'IEE és d'aplicació limitada a la filogènia de planàries donat que la majoria de bandes detectades presenta un patró pràcticament idèntic a poblacions properes (ex.: *Dugesia (D) sicula*), mentre que al comparar espècies d'un mateix gènere aquest patró de bandes proteiques difereix ràpidament fent pràcticament impossible una quantificació objectiva de les diferències (ex.: *Polycelis*). Biersma i Wijsman (1981) trobaren també que en la comparació de patrons de proteïnes solubles de diverses espècies de paludícoles (*Polycelis felina*, *Polycelis nigra*, *Dendrocoelum lacteum*, *Crenobia alpina*, *Dugesia (D) gonocephala* i *Planaria torva*) no hi havien pràcticament bandes comunes. Malgrat això, aquesta tècnica té un bon grau de resolució a nivells que van des de la comparació de poblacions (*Dugesia (G) tigrina*, p.ex.) fins a la d'espècies con-subgenèriques (subgènere *Dugesia*). A més, pot ésser útil per tenir una primera idea del grau de diferenciació existent entre dues poblacions o espècies suposadament properes per tal d'evaluar quina metodologia pot ésser més adient d'aplicar.

L'anàlisi enzimàtica ha inclòs enzims conservats (involucrats en vies metabòliques complexes) i d'altres més variables (esterases generals, etc.). Segons Sarich (1977), les segones acumulen en idèntic període de temps un nombre de canvis, detectables per electroforesi, d'un ordre de magnitud més gran que les primeres. D'aquesta manera, tenim proteïnes que permeten mesurar distàncies diferents: en el procés inicial de diferenciació genètica entre dos llinatges en divergència els loci d'evolució ràpida seran els que mostraran més canvis, fins que arribarà un moment en que tots tindran mobilitats electroforètiques diferents i, a partir de llavors, les acumulacions suplementàries de distància genètica sols es detectaran en els loci d'evolució lenta. Conseqüentment, esperarem poder cobrir un ampli marge de distàncies. En promig observem que en els dos casos en que tenim dades tant per IEE com per anàlisi enzimàtica les distàncies calculades són comparables ($D = 0.99$ front a 1.28 *Dugesia (S) mediterranea* vs. *Dugesia (S) polychroa*, i 1.04 front a un promig de 1.06 *Dugesia (D) sicula* vs. *Dugesia (D) iberica*), cosa esperable ja que a les proteïnes totals també trobem els dos tipus de proteïnes (variables i conservades). En el cas de l'anàlisi enzimàtica tenim l'avantatge que a l'evaluar els canvis per loci és més fàcil establir les homologies i diferències i per tant podem arribar a un nivell més elevat de resolució. Això, explicaria l'haver realitzat amb enzims una anàlisi a nivells taxonòmics superiors que amb IEE (comparació entre "subgèneres", gèneres i famílies). A nivell de famílies la tècnica arriba al seu límit de resolució, com queda evidenciat pel fet de no trobar bandes comunes entre alguns parells d'espècies pertanyents a diferents famílies (taula 7).

8.2. SEQUÈNCIES DE rRNA 18S

L'estudi a nivell de seqüència dels àcids nucleics permet, a més de l'anàlisi filogenètica basat en la comparació de les seqüències, altres tipus d'estudis que poden presentar un interès, tant per ajudar a entendre les filogènies derivades de la molècula, com aspectes estructurals de la mateixa que permetin millorar les comparacions fetes.

De l'estudi de les freqüències de nucleòtids (taula 10) es desprèn que la proporció de GC per als platihelminths és baixa, fins i tot quan la comparem amb la d'altres invertebrats (entre un 49 i un 55% per mol.lucs, cnidaris i artròpodes), encara que no tant com per altres gens de planària estudiats (37%, per al Dth 1 un gen amb homeobox, J. García-Fernández i E. Saló, comunicació personal). Els dos índex emprats (GC i GC/AU) permeten evaluar dues característiques. El primer fa referència a la proporció d'aparellament GC (més forts) al DNA mentre que el segon indica la proporció d'aquests aparellaments en l'estructura secundària del rRNA. Totes les planàries presenten una gran uniformitat per a aquests valors amb l'excepció de *Fasciola hepatica*. Aquesta darrera presenta un gran increment de GCs que la situen al mateix nivell que el ratolí, animal de sang calenta que presenta l'estructura del DNA en isocors amb diferent riquesa de GC (Thiery *et al.*, 1976; Bernardi *et al.*, 1985) i amb un augment global de la presència d'aquestes bases en el genoma. Diversos autors (Thiery *et al.*, 1976) consideren que això pot ser el resultat d'una adaptació que permet mantenir l'estabilitat del seu genoma a temperatura constant alta. La similitud de *Fasciola* es podria explicar com una convergència deguda a que aquest organisme és un paràsit que passa part del seu cicle vital en l'interior d'un animal de sang calenta o bé com a simple atzar. En el primer cas, cal suposar que, similarment amb el que va passar amb els animals de sang calenta, *Fasciola* ha sofert un afavoriment dels canvis d'AT a GC. Aquest fenomen té clares implicacions a l'hora d'establir la filogènia a partir de les seqüències: al presentar paral·lelament una pressió selectiva equivalent augmenta la probabilitat que en una mateixa posició trobem el mateix nucleòtid, i per tant, malgrat ésser esdeveniments independents, faran que s'assemblin les dues seqüències. Això pot dur a que l'espècie que ha sofert el desviament respecte al seu grup (en aquest cas *Fasciola*) tingui tendència a sortir-se d'aquest o a presentar-se com a una bifurcació molt inicial (fig. 30).

Alguns autors han utilitzat aquest paràmetre (proporció de GCs) com a caràcter filogenètic. L'exemple anterior demostra abastament que es tracta d'un caràcter de poca utilitat donat que està molt influït per l'ambient i és poc informatiu per tant a nivell filogenètic, malgrat que conèixer-lo pot ésser de gran interès, o imprescindible, per explicar distorsions en les filogènies, com pot ésser el cas de *Fasciola*.

La distribució a l'estructura secundària dels canvis esdevinguts entre platihelminths és bastant uniforme (fig. 16). Algunes zones, però, mantenen una gran estabilitat, com per exemple els braços 6 i 7. Podem per tant distingir dos tipus de zones en la molècula pel que fa als canvis soferts: a) braços on es donen canvis, que són sempre estabilitzats per un canvi en la cadena contrària, i b) braços en que els canvis tenen una probabilitat molt baixa de fixar-se. Aquestes dues classes reflexen, probablement, una diferència en la funció d'ambdós. Els primers tindrien una funció purament estructural, de manera que l'únic que importa és que es mantingui una forma determinada. Els segons, haurien de tenir una funció en la interacció amb altres molècules, el que fa de gran importància la seva seqüència. Aquestes observacions són

importants ja que, per una banda, l'observació dels canvis estabilitzats ens indica que l'estructura secundària és correcta i, consegüentment, que les alineacions estaran ben fetes (cosa molt important). D'altra banda, trobar zones molt conservades entre els nostres organismes permet utilitzar-les com a diagnòstiques per al grup.

L'espectre de resolució taxonòmica a platihelminths que abasta aquest grup de caràcters va des de la comparació de subgèneres fins a la de filums, resultant en una superposició parcial (en els rangs taxonòmics baixos: subgènere, gènere i família) amb les dades subministrades per l'anàlisi enzimàtica. Aquesta superposició ha permès una comparació dels dos mètodes, i ha enfortit les relacions filogenètiques inferides. La comparació de subgèneres mostra una diferenciació molt petita (3 %) el que dona uns errors molt grans i per tant una manca de bona resolució. Això fa pensar que a aquest nivell, caldria comparar seqüències més llargues o més variables que permetessin una millor resolució i que potser obviarien la utilització de la tècnica d'enzims, tècnica en alguns casos difícil d'aplicar a planàries, degut a l'escassetat d'exemplars d'algunes espècies. Una molècula candidata per aquesta funció podria ésser el rRNA 28 S, que presenta les mateixes avantatges del 18S (universalitat de presència i funció, etc.) amb el merit afegit d'ésser més llarga i presentar zones més variables junt amb zones igualment conservades.

9. CONSIDERACIONS METODOLOGIQUES

De l'estudi molecular realitzat es desprèn que les dades moleculars són de gran utilitat per resoldre problemes no aclarits per altres tipus de caràcters, generalment morfològics o cariològics. D'això no cal deduir però que les dades moleculars hagin de substituir a les altres. Molt al contrari, les dades moleculars aïllades no diuen res. Un arbre filogenètic amb uns noms d'espècies de les que no en sabem ni la morfologia, ni la cariologia ni altres dades, no permetria fer cap mena d'inferència respecte a la seva aparició i evolució. Es, per tant, més que evident la necessitat de combinar les dades procedents de tots aquests tipus de caràcters per tal d'arribar a comprendre bé la història evolutiva de qualsevol grup.

Els diferents mètodes d'inferència filogenètica mereixen també una breu consideració. Tal i com expliquem a la introducció i a material i mètodes cadascun d'ells presenta unes avantatges i unes desavantatges que cal tenir molt en compte a l'hora d'interpretar els resultats. La utilització simultània de diversos mètodes, amb diferents supòsits i propietats, té l'avantatge que la detecció de discrepàncies entre ells indica de forma clara punts conflictius de les filogènies. Els mètodes no ens diuen quina és la problemàtica subjacent a aquella discrepància, malgrat que una anàlisi amb cura de les diferències ens pot donar una idea, com són per exemple aquells casos en que les diferències es deuen a les distàncies anòmales que presenten alguns grups d'organismes. El mecanisme inherent d'aquest fet no ens el diuen els mètodes filogenètics, si bé aquests indicaran la necessitat d'aprofundir aquests punts, ja sigui ampliant el nombre d'organismes estudiats per veure si tots presenten la mateixa característica, o bé reconsiderar les dades d'aquells organismes que presenten l'anomalia. Tanmateix, hem pogut constatar que, demostrada l'existència de diferències en les taxes de canvi en diferents grups

d'organismes (per tots els tipus de caràcters analitzats), els mètodes MP i MQ generen millors resultats.

10. CONSIDERACIO FINAL

En resum, hem explorat les possibilitats i les limitacions d'utilitzar les dades de proteïnes i de seqüències del rRNA per resoldre les relacions entre planàries d'aigües dolces i d'aquestes amb altres organismes. Tan pels resultats generals com pels que fan referència a les relacions internes dels paludícoles (fig. 34), els resultats exposats aquí són més o menys compatibles amb els esquemes filogenètics proposats pels pocs autors que s'han preocupat d'aquests temes (veure introducció). Tanmateix, els mètodes utilitzats aquí difereixen dels estudis previs en que han subministrat dades rigoroses i quantitatives per testar les hipòtesis filogenètiques, han proporcionat suport a monofilies de grups pobrement definits previament, i han suggerit la necessitat d'analitzar en profunditat grups abans considerats monofilètics. Aquests resultats difícilment seran l'última paraula; si bé han permès reformular amb més concreció velles qüestions, plantejant-ne de noves i inicien una nova aproximació a la sistemàtica d'aquest grup.

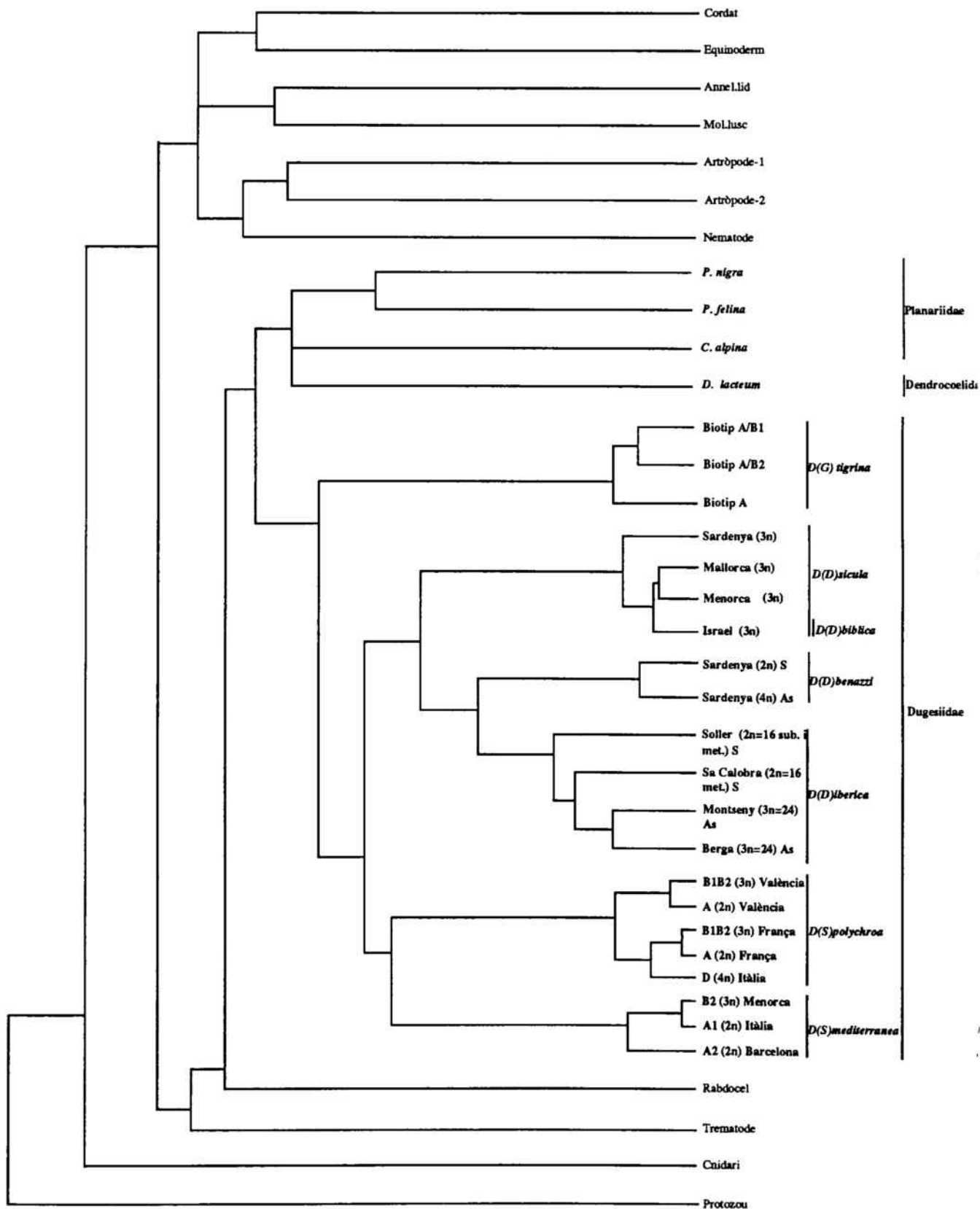


Fig. 34. Arbre resum de totes les filogènies obtingudes en aquest treball. Les longituds dels braços respecten les proporcions obtingudes en cada filogènia parcial.

Conclusions

CONCLUSIONS

S'han estudiat 27 poblacions de Tricladis Paludícoles (F. Plathelminthes, Cl. Turbellaria), a més d'una espècie de l'ordre Rhabdocoela (F. Plathelminthes, Cl. Turbellaria) i una de l'Ordre Digenea (F. Plathelminthes, Cl. Trematoda), a nivell proteic (comparació de patrons proteics totals i per activitats enzimàtiques) i de seqüències del rRNA 18S, per tal de fer-ne una anàlisi filogenètica i sistemàtica. Alhora, es volia evaluar el valor taxonòmic i filogenètic d'aquests nous caràcters emprats. D'aquests estudis en podem extreure tres grups de conclusions:

1. Conclusions sistemàtiques i filogenètiques.

- a) L'estudi de diferents poblacions, biotips i espècies del subgènere *Dugesia* indica: 1) que totes les poblacions de 27 cromosomes són formes triploids de *Dugesia* (*D. sicula*); 2) que l'espècie *Dugesia biblica* (Benazzi i Banchetti, 1972) és de fet sinònima de *Dugesia* (*D. sicula*); i 3) que les quatre espècies presents a la Mediterrània occidental es separen filèticament, d'acord amb la proposta de De Vries i Sluys (1991) basada en criteris cladistes, en dos grups molt diferenciats.
- b) Les distàncies genètiques trobades entre les formes morfològiques de *Dugesia* (*G. tigrina*) descrits per Ribas *et al.* (1989) demostra que aquesta espècie és clarament polítipica, estant constituïda a la Mediterrània occidental, i més encara a l'àrea d'origen (Nord Amèrica), per diferents subespècies o fins i tot espècies.
- c) La filogènia deduida entre els tres subgèneres (*Dugesia*, *Schmidtea* i *Girardia*) de la família Dugesidae, mostra una més gran afinitat entre *Dugesia* i *Schmidtea* que entre cada un d'aquests amb *Girardia*. Això és contrari a la proposta de De Vries i Sluys (1991) basada, al nostre entendre, en una sinapomorfia incorrecta entre *Girardia* i *Schmidtea*.
- d) Mentre que la família Dugesidae és clarament homogènia, formant un grup germà (Dugesioidea) de la superfamília Planarioidea, la família Planariidae és clarament un grup parafilètic que demana un estudi urgent en profunditat. Aquest estudi hauria de contemplar endemés l'exàmen de grups externs com els Marícola, Terrícola i els Proseriats.
- e) La comparació de les seqüències del rRNA 18S entre diferents espècies de platihelminths i altres filums de metazous, demostra amb claredat que aquest grup és monofilètic i primitiu, constituint el grup germà de tots el celomats. Això és contrari a les hipòtesis que suposen als platihelminths com a grup derivat secundàriament dels eucelomats per neotènia o progènesi.

- f) Les grans distàncies genètiques trobades entre la majoria de tàxons dels platihelminths indiquen la conveniència d'eleva el rang taxonòmic d'alguns dels tàxons. En particular, caldria eleva a subespècie varies de les poblacions examinades, eleva a gènere els subgèneres del gènere *Dugesia*, i determinar amb claredat el estatus i rang de la família Planariidae.

2. Conclusions biogeogràfiques.

- a) Les dades de diferenciació genètica i distribució tant de *Dugesia* (*G*) *tigrina* com de *Dugesia* (*D*) *sicula* permeten conclure que, contrariament al que s'ha postulat fins ara (Ball, 1974; Ball i Reynoldson, 1981) han sofert múltiples introduccions a nous hàbitats probablement com a conseqüència de l'activitat humana. D'aquest fet se n'infereix que la capacitat migratoria de les planàries d'aigües dolces és superior a la atribuïda clàssicament.
- b) Les dades de distribució i divergència genètica de les espècies del subgènere *Dugesia* (excloent *Dugesia* (*D*) *sicula*) i del subgènere *Schmidtea* poden explicar-se com a conseqüència de la història geològica de la Mediterrània. Aquest fet implica que l'aparició de l'heteromorfosi cromosòmica present a algunes poblacions de *Dugesia* (*S*) *mediterranea* ha d'ésser un fenomen recurrent.

3. Conclusions metodològiques.

- a) Les tres metodologies emprades per analitzar els caràcters moleculars han demostrat ésser eficients i de bona resolució en la inferència filogenètica dels platihelminths a diferents nivells taxonòmics: l'IEE per a nivells taxonòmics baixos, l'anàlisi electroforètica per activitats enzimàtiques a nivells taxonòmics superiors fins al de família i, finalment, la seqüenciació del rRNA 18S a nivells taxonòmics de rang superior (ordre, classe, filum) abastant alhora els nivells de família i inclús el de gènere i subgènere.
- b) De les tres metodologies utilitzades en la inferència de filogènies la màxima parsimònia i els mínims quadrats, i especialment aquesta última, resulten en inferències més fiables, donada l'observació de l'existència de variacions en les taxes de canvi per als diferents llinatges tant per a dades proteiques com dels àcids nucleics en els platihelminths.

Bibliografia

- ALVAREZ W. (1976). A former continuation of the Alps. Bull. geol. Soc. Am., **87**:891-896.
- ALVAREZ W., COCCOZA T. i WEZEL F.F. (1974). Fragmentation of the Alpine orogenic belt by microplate dispersal. Nature, **248**:309-314.
- AQUADRO C.F. i AVISE J.C. (1981). Genetic divergence between rodent species assessed by using two-dimensional electrophoresis. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, **78**:3784-3788.
- AQUADRO C.F. i AVISE J.C. (1982). Evolutionary genetics of birds. VI. A reexamination of protein divergence using varied electrophoretic conditions. Evolution, **36**(5):1003-1019.
- AVISE J.C. (1983). Protein variation and phylogenetic reconstruction. A: Protein polymorphism: adaptative and taxonomic significance (G.S. Oxford i D. Rollinson, eds.). Academic Press, London.
- AX P. (1985). The position of the Gnathostomulida and Platyhelminthes in the phylogenetic system of the bilateria. Pp. 168-180 a: The origin and relationships of lower invertebrates (Conway S., Morris, George J.D., Gibson R. i Platt H.M., eds.). Claredon Press, Oxford.
- AX P. (1987). The Phylogenetic system. John Wiley & Sons, Chichester.
- AYALA F.J. (1975). Genetic differentiation during the speciation process. A: Evolutionary biology (Dobzhansky T., Hecht M. i Steeve W.C., eds.). Plenum Press, New York.
- AYALA F.J. (1983). Enzymes as taxonomic characters. A: Protein polymorphism: adaptative and taxonomic significance (Oxford G.S. i Rollinson D., eds.). Academic Press, London New York.
- BACHELLERIE J.P. i MICHOT B. (1989). Evolution of large subunit rRNA structure. The 3' terminal domain contains elements of secondary structure specific to major phylogenetic groups. Biochimie, **71**:701-709.
- BAGUÑA J. (1973). Estudios citotaxonómicos, ecológicos e histofisiología de la regulación morfogénica durante el crecimiento y la regeneración de la raza asexual de la planaria *Dugesia (S) mediterranea n.sp.*. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona, Barcelona.
- BAGUÑA J., SALÓ E. i ROMERO R. (1980). Les planaries d'aigües dolces a Catalunya i a les Illes Balears. Butll. Inst. Cat. Hist. Nat., **45**:15-30.
- BAGUÑA J., SALÓ E. i ROMERO R. (1981). Microdispersió i especiació de planàries d'aigües dolces a la Mediterrània Occidental: el paper de la fragmentació i la migració de microplaques. Treb. Inst. Catal. Hist. Natl., **9**:23-38.
- BAGUÑA J., SALÓ E. i ROMERO R. (1982). Biogeografía de las planarias de aguas dulces (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida, Paludicola) en España. Datos preliminares. Pp. 265-280 a: Actas del I Congreso español de Limnología (N. Prat, ed.). Universitat de Barcelona, Barcelona.
- BALL I.R. (1974a). A contribution to the phylogeny and biogeography of the freshwater triclads (Platyhelminthes: Turbellaria). A: Biology of the Turbellaria (N.W. Riser i M.P. Morse, eds.). McGraw-Hill, New York.
- BALL I.R. (1974b). A new genus and species of freshwater planarian from Australia (Platyhelminthes, Turbellaria). J. Zool., Lond., **174**:149-158.

- BALL I.R. (1977a). On the phylogenetic classification of aquatic planarians. Acta zool. fenn., **154**:21-35.
- BALL I.R. (1977b). A new and primitive retrobursal planarian from Australian freshwaters (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida). Bijdr. Dierkunde, **47**:149-155.
- BALL I.R. (1981). The phyletic status of the Paludicola. Hydrobiologia, **84**:7-12.
- BALL I.R. i REYNOLDSON T.B. (1981). British planarians. Synopses Br. Fauna (N.S.), **19**:1-141.
- BARNES R.S.K., CALOW P. i OLIVE P.J.W. (1988). The invertebrates: a new synthesis. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- BATESON W. (1913). Problems of genetics. Oxford Univ. Press, London.
- BENAZZI M. (1947). Appunti corologici su *Dugesia subtentaculata* (Drap). Atti Soc. tosc. Sci. nat. Memorie, **54**(2):1-7.
- BENAZZI M. (1955). Appunti sulla distribuzione del Tricladi in Italia. Boll. Zool., **22**:149-164.
- BENAZZI M. (1957). Cariologia de *Dugesia lugubris* (O. Schmidt) (Tricladida Paludicola). Caryologia, **10**:276-303.
- BENAZZI M. (1961). Les planaires des îles Tyrrhéniennes et leur différenciation raciale, cytologique et génétique. Pp. 103-112 a: Le peuplement des îles méditerranéennes et le problème de l'insularité. CNRS, Paris.
- BENAZZI M. (1963). Genetics of reproductive mechanisms and chromosome behaviour in some fresh-water Triclads. A: The lower metazoa. Univ. California Press, Berkeley i Los Angeles.
- BENAZZI M., BAGUÑA J. i BALLESTER R. (1970). First report of an asexual form of the planarian *Dugesia lugubris* s.l.. Rend. Acc. Naz. Lincei Ser. VIII, **48**:282-284.
- BENAZZI M., BAGUÑA J., BALLESTER R., PUCCINELLI I. i DEL PAPA R. (1975). Further contribution to the taxonomy of the "*Dugesia lugubris-polychroa*" with description of *Dugesia mediterranea* n.sp. (Tricladida, Paludicola). Boll. Zool., **42**:81-89.
- BENAZZI M. i BANCHETTI R. (1972). descrizione de *Dugesia biblica*, nuova microspecie del 'gruppo *Dugesia gonocephala*', trovata nel fiume Giordano (Israele). Memorie Soc. tosc. Sci. nat. (B), **79**:83-91.
- BENAZZI M. i BENAZZI-LENTATTI G. (1976). Animal cytogenetics. I. Platyhelminthes. Gebrüder Borntraeger, Berlin i Stuttgart.
- BENAZZI M., GIANNINI-FORLI E. i PUCCINELLI I. (1971). Cariologia della planaria americana *Dugesia tigrina*. Boll. Zool., **38**:493-494.
- BENAZZI-LENTATTI G. i DERI P. (1977). Insorgenza di B-cromosomi in individui poliploidi di *Dugesia benazzi* (triclade paludicola) allevati in laboratorio. Rc. Accad. naz. Lincei, ser. VIII, **62**:847-851.
- BENEVISTE R.E. i TODARO G.J. (1976). Evolution of type C viral genes: Evidence for an Asian origin of man. Nature, **261**:101-108.

- BENVENISTE R.E. (1985). The contribution of retroviruses to the study of mammalian evolution. Pp. 359-417 a: Molecular evolutionary genetics (MacIntyre R.J., eds.). Plenum, New York.
- BERNARDI F., OLOFSSON B., FILIPSKI J., ZERIAL M., SALINAS J., CUNY G., MEUNIER-ROTIVAL M. i RODIER F. (1985). The mosaic genome of warm-blooded vertebrates. Science, **228**:953-957.
- BIERSMA R. i WIJSMAN H.J.W. (1981). Studies on the speciation of the European freshwater planarians *Polycelis nigra* and *Polycelis tenuis* based on the analysis of enzyme variations by means of iso-electricfocusing. Hydrobiologia, **84**:79-86.
- BIGGIN M.D., GIBSON T.J. i HONG G.F. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**:3963.
- BRADFORD M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., **72**:248-254.
- BRESSLAU E. (1933). Turbellaria. A: Kükenthal & krumbach. W. de Gruyter & Co., Berlin, Leipzig.
- BROMLEY H. (1974). Morpho-karyological types of *Dugesia* (Turbellaria, Tricladida) in Israel and their distribution patterns. Zoologica Scr., **3**:239-242.
- BUNEMAN P. (1971). The recovery of trees from measurements of dissimilarity. A: Mathematics in the archeological and historical sciences (Hodson F.R., Kendall D.G. i Tautu P., eds.). Edinburgh University Press, Edinburgh.
- CACCONI A. i POWELL J.R. (1989). DNA divergence among hominoids. Evolution, **43**(5):925-942.
- CARDONA M.A. i CONTANDRIOPOULOS J. (1979). Endemism and evolution in the islands of the western Mediterranean. Pp. 133-169 a: Plants and Islands (Bramwell D., eds.) . Academic Press, London.
- CASSON L. (1974). Travel in the ancient world. Allen & Unwin, London.
- CASU S., PALA M. i VACCA R.A. (1982). Distribuzione geografica in Sardegna di planarie d'acqua dolce appartenenti alle specie *Dugesia (S) polychroa* e *Dugesia (S) mediterranea* (Turbellaria, Tricladida). Boll. Soc. Sarda Sci. Nat., **21**:177-184.
- CAVALLI-SFORZA L.L. i EDWARDS A.W.F. (1967). Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. Evolution, **21**:550-570.
- CAVENDER J.A. (1981). Tests of phylogenetic hypotheses under generalized models. Math. Biosci., **54**:217-229.
- CHERRY J.F. (1981). Pattern and process in the earliest colonizations of the Mediterranean islands. Proc. Prehist. Soc., **47**:41-68.
- CHIRGWIN J.M., PRZYBYLA A.E., MCDONALD R.J. i RUTER W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry, **18**:5294-99.

- CODREANU R. (1961). Sur le peuplement en Triclaes et Asellides d'eau douce de quelques îles méditerranéennes. Pp. 163-179 a: Le peuplement des îles méditerranéennes et le problème de l'insularité. CNRS, Paris.
- COLE C.J. (1985). Taxonomy of parthenogenetic species of hybrid origin. Syst. Zool., **34**:359-363.
- COLLESS D.H. (1970). The phenogram as an estimate of phylogeny. Syst. Zool., **19**:352-362.
- COYNE J.A. i ORR H.A. (1989). Patterns of speciation in *Drosophila*. Evolution, **43**(2):362-381.
- CUNY G., SORIANO P., MACAYA G. i BERNARDI G. (1981). Eur. J. Biochem., **115**:227.
- DE CANDOLLE A.P. (1813). Théorie élémentaire de la botanique. Chez Deterville, Paris.
- DE VRIES E.J. (1984). On the species of the *Dugesia gonocephala* group (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida) from Greece. Bijdr. Dierk., **54**(1):101-126.
- DE VRIES E.J. (1985). The biogeography of the genus *Dugesia* (Turbellaria, Tricladida, Paludicola) in the Mediterranean region. Journal of Biogeography, **12**:509-518.
- DE VRIES E.J. (1986a). On the karyology of *Dugesia gonocephala* s.l. (Turbellaria, Tricladida) from Montpellier, France. Hydrobiologia, **132**:251-256.
- DE VRIES E.J. (1986b). On the taxonomic status of *Dugesia gonocephala* and *Dugesia subtentaculata* (Turbellaria, Tricladida, Paludicola). J. Zool., London, **209**:43-59.
- DE VRIES E.J. (1987). A phylogenetic analysis of the genus *Dugesia* (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola) with an emphasis on the *Gonocephala* group. University of Amsterdam, PhD.
- DE VRIES E.J., BAGUÑÀ J. i BALL I.R. (1984). Chromosomal polymorphism in planarians (Turbellaria, Tricladida) and the plate tectonics of the western Mediterranean. Genetica, **62**:187-191.
- DE VRIES E.J. i SLUYS R. (1991). Phylogenetic relationships of the genus *Dugesia* (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola). J. Zool., Lond., **223**:103-116.
- DOBZHANSKY T., AYALA F.J., STEBBINS G.L. i VALENTINE J.W. (1980). Evolución. Omega, Barcelona.
- DOWLING T.E. i BROWN W.M. (1989). Allozymes, mitochondrial DNA, and levels of phylogenetic resolution among four minnow species (*Notropis*: Cyprinidae). Syst. Zool., **38**(2):126-143.
- DUBOIS A. i GUNTHER R. (1982). Klepton and synklepton: two new evolutionary systematics categories in zoology. Zool. Jahrb. Abt. Syst., **109**:290-305.
- ECHELLE A.A. (1990). Nomenclature and non-mendelian ("clonal") vertebrates. Syst. Zool., **39**(1):70-78.
- ECK R.V. i DAYHOFF M.O. (1966). Atlas of protein sequence and structure 1966. National Biomedical Research Foundation, Silver Spring.

- EFRON B. (1979). Bootstrap methods: Another look at the jackknife. Ann. Statist., 7:1-26.
- EHLERS U. (1985a). Phylogenetic relationships within the Platyhelminthes. A: The origins and relationships of lower invertebrates (Conway S., Morris, George J.D., Gibson R. i Platt H.M., eds.). Clarendon Press, Oxford.
- EHLERS U. (1985b). Das phylogenetische System der Plathelminthes. Gustav Fischer, Stuttgart, New York.
- FARRIS J.S. (1972). Estimating phylogenetic trees from distance matrices. The Amer. Nat., 106, 951:645-667.
- FARRIS J.S., KLUGE A.G. i ECKARDT M.J. (1970). A numerical approach to phylogenetic systematics. Syst. Zool., 19:172-191.
- FELSENSTEIN J. (1978). Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. Syst. Zool., 27:401-410.
- FELSENSTEIN J. (1982). Numerical methods for inferring evolutionary trees. The Quarterly Review of Biology, 57(4):379-404.
- FELSENSTEIN J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39:783-791.
- FERGUSON A. (1980). Biochemical systematics and evolution. Blackie & Son li., Glasgow and London.
- FERGUSON A. i FLEMING C.C. (1983). Evolutionary and taxonomic significance of protein variation in the brown trout (*Salmo trutta* L.) and other salmonid fishes. A: Protein polymorphism: adaptative and taxonomic significance (Oxford G.S. i Rollinson D., eds.). Systematic Association, Academic Press, London.
- FIELD K.G., OLSEN G.J., LANE D.J., GIOVANNONI J., GHISELIN M.T., RAFF E.C., PACE N.R. i RAFF R.A. (1988). Molecular phylogeny of the animal kingdom. Science, 239:748-753.
- FITCH W.H. i MARGOLIASH E. (1967). Construction of phylogenetic trees. Science, 155:279-284.
- FOX G.E., LUEHRSEN K.R. i WOESE C.R. (1982). Archaeobacterial 5S rRNA. Zentralbl. Bakteriol., Hyg. I Abt. Orig., C3:330-345.
- FROST D.R. i WRIGHT J.W. (1988). The taxonomy of uniparental species, with special reference to parthenogenetic *Cnemidophorus* (Squamata: Teiidae). Syst. Zool., 37:200-209.
- GAMO J. i GOURBAULT N. (1981). Présence du turbellarié néarctique *Dugesia tigrina* (Girard) en Espagne. Bull. Mus. natn. Hist. nat. Paris (Zool.), 3(4):147-150.
- GARRELS J.I. (1979). Two dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines. J. Biol. Chem., 254:7961-77.
- GILL L.L., HARDMAN N., CHAPPELL L., QU L.H., NICOLOSO M. i BACHELLERIE J.P. (1988). Phylogeny of *Onchocerca volvulus* and related species deduced from rRNA sequence comparisons. Molecular and Biochemical Parasitology, 28:69-76.

- GIRARD C. (1850). A brief account of the freshwater planariae of the United States. Proc. Boston Soc. Nat. Hist., 3:264-265.
- GOURBAULT N. (1969). Expansion de *Dugesia tigrina* (Girard), planarie américaine introduite en Europe. Annls Limnol., 5:3-7.
- GOURBAULT N. (1981). The karyotypes of *Dugesia* species from Spain. Pp. 45-52 a: The biology of the Turbellaria (Schockaert E.R. i Ball I.R., eds.). Junk, The Hague.
- GOURBAULT N. i BENAZZI M. (1979). Une nouvelle espèce ibérique du 'groupe *Dugesia gonocephala*' (Turbellariés, Triclades). Bull. Mus. natn. Hist. nat. Paris (Zool.), 2:329-337.
- GUTELL R.R., WEISER B., WOESE C.R. i NOLLER H.F. (1985). Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 32:155-216.
- HADZI J. (1963). The evolution of the metazoa. Pergamon Press, Oxford.
- HALLEZ P. (1894). Catalogue des Rhabdocoelides, Triclades et Polyclades du Nord de la France. L.Danel., Lille.
- HANSON E.D. (1963). Homologies and the ciliate origin of the eumetazoa. Pp. 7-22 a: The lower metazoa (Dougherty E.C., eds.). University of California Press, Berkely.
- HARRIS H. i HOPKINSON D.A. (1976). Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland Publishing Co., Oxford.
- HARTIGAN J.A. (1967). Representation of similarity matrices by trees. J. Am. Stat. Assoc., 62:1140-1158.
- HAY D.A. i BALL I.R. (1979). Contributions to the biology of freshwater planarians (Turbellaria) from the Victorian Alps, Australia. Hydrobiologia, 62:137-164.
- HENDRIKS L., De BAERE R., BROOKHOVEN C. VAN i De WACHTER R. (1988). Primary and secondary structure of the 18S rRNA of the insect species *Tenebrio molitor*. FEBS Letters 232:115-120.
- HENDRIKS L., BROOKHOVEN C. VAN, VANDENBERGHE A., VANDE PEER Y. i De WACHTER R. (1988). Primary and secondary structure of the 18S rRNA of the bird spider *Euripelma californica* and evolutionary relationships among eukaryotic phyla. Eur. J. Biochem. 177:15-20.
- HENDY M.D. i PENNY D. (1982). Branch and bound algorithms to determine minimal evolutionary trees. Math. Biosci., 59:277-290.
- HENNIG W. (1950). Grundzüge einer theorie der phylogenetischen sytematik. Deutscher Zentral-Verlag, Berlin.
- HENNIG W. (1965). Phylogenetic systematics. Annu. Rev. Entomol., 10:97-116.
- HENNIG W. (1966). Phylogenetic Systematics. University of Illinois Press, Urbana.
- HERBERT P.D.N. i PAYNE W.J. (1985). Genetic variation in populations of the hermaphroditic flatworm *Mesostoma lingua* (Turbellaria, Rhabdocoela). Biol. Bull., 169:143-151.

- HIRAO Y., KAWAKATSU M. i TESHIROGI W. (1970). Records of an exotic freshwater planarian species, *Dugesia tigrina* (Girard) found in tanks of tropical fishes in Japan. J. Jap. Ass. Zool. Gard. Aquar., 11(2):25-27.
- HORI H. i OSAWA S. (1979). Evolutionary change in 5S RNA secondary structure and a phylogenetic tree of 54 5S RNA species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:381-385.
- HORI H., LIM B.L., OHAMA T., KUMAZAKI T., I and OSAWA S. (1985). Evolution of organisms deduced from 5S rRNA sequences. Pp. 369-384 a: Population Genetics and Molecular Evolution (Ohta T. i Aoki K., eds.). Springer, Berlin.
- HORI H., MUTO A., OSAWA S., TAKAI M., LUE K.Y. i KAWAKATSU M. (1988). Evolution of Turbellaria as deduced from 5S ribosomal RNA sequences. Progress in Zoology, 36:163-167.
- HYMAN L.H. (1939). New species of flatworms from North, Central and South America. Proc. U.S. natn. Mus., 86:419-439.
- HYMAN L.H. (1951). The Invertebrates; Platyhelminthes and Rhynchocoela. McGraw-Hill, New York.
- JÄGERSTEN G. (1955). On the early phylogeny of the metazoa. The bilaterogastrea theory. Zool. Bidr. Uppsala, 30:321-354.
- JÄGERSTEN G. (1972). Evolution of the Metazoan life Cycle. Academic Press, London.
- JUKES T.H. i CANTOR C.R. (1969). Evolution of protein molecules. Pp. 21 a: Mammalian protein metabolism (Munro H.N., eds.). Academic Press, New York.
- KARLING T. (1974). On the anatomy and affinities of the turbellarian orders. Pp. 1-16 a: Biology of the Turbellaria (Riser N.W. i Morse M.P., eds.). McGraw-Hill, New York.
- KARLSSON CH., DAVIES H., OHMAN J. i ANDERSSON U. (1973). LKB 2117, multiphor I. Analytical thin layer gel electrofocusing in polyacrilamide gel. LKB Application Note, 75.
- KENK R. (1930). Beiträge zum System der Probursalier. Zool. Anz., 89:145-162.
- KENK R. (1944). The fresh-water triclads of Michigan. Misc. Publs Mus. Zool. Univ. Mich., 60:1-44.
- KENK R. (1976). Freshwater planarians (Turbellaria) of North America. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.
- KLUGE A.G. i FARRIS J.S. (1969). Quantitative phyletics and the evolution of anurans. Syst. Zool., 18:1-32.
- LANE D.J., FIELD K.G., OLSEN G.J. i PACE N.R. (1988). Reverse transcriptase sequencing of rRNA for phylogenetic analysis. Methods in Enzymology, 167:138-144.
- LANE D.J., PACE B., OLSEN G.J., STAHL D.A., SOGIN M.L. i PACE N.R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:6955.

- LANG A. (1884). "Policladiden". Fauna und Flora des Golfes von Neapel. W. Engelmann, Leipzig.
- LENAERS G., NIELSEN H., ENGBERG J. i HERZOG M. (1988). The secondary structure of large-subunit rRNA divergent domains, a marker for protist evolution. BioSystems, **21**:215-222.
- LEPORI N.G. (1951). Sulla caratteristiche morfologiche e sulla posizione sistematica della planaria di Sardegna e Corsica già ascritta a *Dugesia* (Euplanaria) *gonocephala* (Dugès). Atti. Soc. tosc. Sci. nat., **58**(B):28-47.
- LEPORI N.G. i PALA M. (1982). Fissioning in Planarians. 1. Karyological analysis of fissiparous strains of *Dugesia gonocephala* s.l. (Turbellaria Tricladida) collected in Sardinia, in order to determine the factors responsible for fissioning. Monitore zool ital., **16**:105-131.
- LEWONTIN R.C. (1974). The genetic basis of evolutionary change. Columbia University Press, New York.
- LI W.H. (1981). Simple methods for constructing phylogenetic trees from distance matrices. Proc. Natl. Acad. USA, **78**(2):1085-1089.
- MARCUS E. (1946). Sobre Turbellaria brasileiros. Bolm. Fac. Filos. Ciênc. Univ. S. Paulo (Zool.), **11**:5-254.
- MAYR E. (1969). Principles of systematic zoology. McGraw-Hill, London.
- MAYR E., LINSLEY E.G. i USINGER R.L. (1953). Methods and principles of systematic zoology. McGraw-Hill, New York.
- MCCARROL R., OLSEN G.J., STAHL Y.D., WOESE C.R. i SOGIN M.L. (1983). Nucleotide sequence of the *Dictyostelium discoideum* small-subunit ribosomal ribonucleic acid inferred from the gene sequence: evolutionary implications. Biochemistry, **22**:5858-5868.
- McLAIN D.K. i COLLINS F.H. (1989). Structure of rDNA in the mosquito *Anopheles gambiae* and rDNA sequence variation within and between species of the *A. gambiae* complex. Heredity, **62**:233-242.
- MEIXNER J. (1928). Der genitalapparat der Tricladen und seine beziehungen zu ihrer allgemeinen morphologie, phylogenie, ökologie und verbreitung. Z. Morphol. ökol. Tiere, **11**:570-612.
- MICHENER C.D. i SOKAL R.R. (1957). A quantitative approach to a problem in classification. Evolution, **11**:130-162.
- MOORE G.W. (1971). A mathematical model for the construction of cladograms. Ph.D. thesis. North Caroline State University, Raleigh.
- NASCETTI G., BULLINI L. i BENAZZI M. (1990). Genetic divergence in Northamerican freshwater planarians of the *Dugesia dorotocephala* group (Tricladida, Turbellaria, Plathelminthes). Z. Zool. Syst. Evolut.-forsch., **28**:261-268.
- NEI M. (1971). Interspecific gene differences and evolutionary time estimated from electrophoretic data on protein identity. The Amer. Nat., **105**:385-398.
- NEI M. (1972). Genetic distance between populations. The Amer. Nat., **106**:283-292.

- NEI M. (1981). Genetic distance and molecular taxonomy. Pp. 7-22 a: Problems in gneral genetics (Proc. XIV Int. Cong. Genet., Vol. 2) (Altukhov Y.P., ed.). MIR Publishers, Moscow.
- NEI M. (1987). Molecular evolutionary genetics. Columbia Univ. Press, New York.
- NEI M., STEPHENS J.C. i SAITOU N. (1985). Methods for computing the standart errors of branching points in an evolutionary tree and their application to molecular data from humans and apes. Mol. Biol. Evol., 2(1):66-85.
- NIXON S.E. i TAYLOR R.J. (1977). Large genetic distances associated with little morphological variation in *Polycelis coronata* and *Dugesia tigrina* (planaria). Syst. Zool., 26:152-164.
- NUTTALL G.H.F. (1901). The new biological test for blood in relation to zoological classification. Proc. Roy. Soc. Lond., 69:150-153.
- O'BRIEN R.E., NASH S.J., WILDT W.G., BUSH E. i BENEVISTE M.E. (1985). A molecular solution to the riddle of the giant panda's phylogeny. Nature, 317 (12):140-144.
- O'FARRELL P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem., 250:4007-4021.
- OHAMA T., KUMAZAKI T., HORI H., OSAWA S. i TAKAI M. (1983). Fresh-water planarians and a marine planaria are relatively dissimilar in the 5S rRNA sequences. Nucleic Acid Res., 11(2):473-476.
- OKI I., TAMURA S., YAMAYOSHI T. i KAWAKATSU M. (1981). Karyological and taxonomic studies of *Dugesia japonica* Ichikawa et Kawakatsu in the far east. Hydrobiologia, 84:53-68.
- PALA M., CASU S. i LEPORI N.G. (1985). Cytokaryological research on the origin of fissiparous aneutriploid strain from a diploid non-fissiparous one (*Dugesia gonocephala* s.l. Turbellaria Tricladida). Monitore zool. ital., 19:25-37.
- PALMER J.D. (1987). Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. Am. Natur., 130:S6-S29.
- PALMER J.D., JANSEN R.K., MICHAELS H.J., CHASE M.W. i MANHART J.R. (1988). Chloroplasts DNA and plant phylogeny. Ann. Missouri Bot. Gard., 75:1180-1206.
- PETERSON G.L. (1983). Determination of total protein. Methods in Enzymology, 91:95-119.
- QU L.H., PERASSO R., BAROIN A., BRUGEROLLE G., BACHELLERIE J.P. i ADOUTTE A. (1988). Molecular evolution of the 5'-terminal domain of large-subunit rRNA from lower eukaryotes. A broad phylogeny covering photosynthetic and non-photosynthetic protists. BioSystems, 21:203-208.
- QU L., NICOLOSO M. i BACHELLERIE J.P. (1988). Phylogenetic calibration of the 5' terminal domain of large rRNA achieved by determining twenty eucariotic sequences. J. Mol. Evol., 27(4).

- RAFF R.A., FIELD K.G., GHISELIN M.T., LANE D.J., OLSEN G., PARKS A.L., PACE N.R. i RAFF E.R. (1988). Molecular analysis of distant phylogenetic relationships in echinoderms. A: Echinoderm phylogeny and evolutionary biology (Smith C.R.C.A.B., eds.). Oxford Univ. Press, Oxford.
- RAYNAL F., MICHOT B. i BACHELLERIE J.P. (1984). complete nucleotide sequence of mouse 18S rRNA: comparison with other available homologs. FEBS lett., **167**:263-268.
- REMANE A. (1963). The evolution of the Metazoa from colonial flagellates vs. plasmodial ciliates. Pp. 23-32 a: The lower metazoa (Dougherty E.C., eds.). University of California Press, Berkeley.
- REMANE A. (1967). Die Geschichte der Tiere. Pp. 589-677 a: Die Evolution der Organismen (Herberer G., eds.). G. Fischer, Stuttgart.
- REYNOLDSON T.B. i BELLAMY L.S. (1970). The status of *Dugesia lugubris* and *D. polychroa* (Turbellaria, Tricladida) in Britain. J. Zool., Lond., **162**:157-177.
- RIBAS M. (1990). Cariologia, sistemàtica i biogeografia de les planàries d'aigües dolces als Països Catalans. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona, Barcelona.
- RIBAS M., PALA M., VACCA R.A., RIUTORT M. i BAGUÑÀ J. (1988). Taxonomic status of the western Mediterranean asexual populations of the *Dugesia* (*G*) *gonocephala* group. Morphological, karyological and biochemical data. Fortschritte der Zoologie, **36**:129-137.
- RIBAS M., RIUTORT M. i BAGUÑÀ J. (1989). Morphological and biochemical variation in populations of *Dugesia* (*G*) *tigrina* (Turbellaria, Tricladida, Paludicola) from the western Mediterranean: biogeographical and taxonomical implications. J. Zool., Lond., **218**:609-626.
- RICHARDSON B.J., BABERSTOCK P.R. i ADAMS M. (1986). Allozyme electrophoresis. A handbook for animal systematics and population studies. Academic Press, Sidney.
- RIDLEY M. (1986). Evolution and Classification. The reformation of cladism. Longman, London and New York.
- RIEDL R. (1978). Order in living organisms. John Wiley & Sons, Chichester.
- RIEGER R.M. (1980). A new group of interstitial worms, Lobatoceridae *nov. fam.* (Annelida) and its significance for metazoan phylogeny. Zoomorphologie, **95**:41-84.
- RIEGER R.M. (1985). The phylogenetic status of the acoelomate organisation within the Bilateria; a histological perspective. Pp. 101-122 a: The origins and relationships of lower invertebrates (Conway S., Morris, George J.D., Gibson R. i Platt H.M., eds.). Clarendon Press, Oxford.
- RIEGER R.M. (1986). Asexual reproduction and the turbellarian archetype. Hydrobiologia, **132**:35-45.
- SALVINI-PLAWEN L. VON (1978). On the origin and evolution of the lower metazoa. Z. Zool. Syst. Evol., **16**:40-88.
- SANGER F., NICKLEN S. i COULSON A.R. (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**:5463-67.

- SANTANACH P., BANDA E., CALVET F. i CARRERAS J. (1986). Geologia (I). Enciclopèdia Catalana S.A., Barcelona.
- SARICH V.M. (1977). Rates, sample sizes, and the neutrality hypothesis for electrophoresis in evolutionary studies. Nature, 265:24-28.
- SELANDER R.K. (1976). Genic variation in natural populations. Pp. 32-59 a: Molecular evolution (Ayala F.J., ed.). Sinauer, Sunderland, Mass..
- SELANDER R.K. i KAUFMAN D.W. (1975). Genetic population structure and breeding systems. A: Isozymes, Vol. IV (Markert C.L., eds.). Academic Press, London.
- SHAW C.R. i PRASAD R. (1970). Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. Biochem. Gen., 4:297-320.
- SIBLEY C.G. i AHLQUIST J.E. (1981). The phylogeny and relationships of the ratite birds as indicated by DNA-DNA hybridization. Pp. 301-335 a: Evolution today (Scudder G.G.E. i Reveal J.L., eds.). Carnegie-Mellon Univ., Pittsburgh, PA.
- SIEWING R. (1980). Das Archicoelomatenkonzept. Zool. Jb. Syst., 103:439-482.
- SIMPSON G.G. (1961). Principles of animal taxonomy. Columbia University Press, New York.
- SLUYS R. (1989). Phylogenetic relationships of the triclads (Platyhelminthes, Seriata, Tricladida). Bijdragen tot de Dierkunde, 59(1):3-25.
- SLUYS R. (1990). Rampant parallelism: an appraisal of the use of nonuniversal derived character states in phylogenetic reconstruction. Syst. Zool., 38:4.
- SMITH J.P.S., TYLER S. i RIEGER R.M. (1986). Is the Turbellaria polyphyletic?. Hydrobiologia, 132:13-21.
- SNEATH P.H.A. (1957). Some thoughts on bacterial classification. J. Gen. Micro., 17:184-200.
- SOKAL R.R. i SNEATH P.H.A. (1963). Principles of Numerical Taxonomy. W. H. Freeman, San Francisco.
- STIMPSON W. (1875). Prodomus descriptionis animalium evertibratorum quae in expeditione ad Oceanum Pacificum septentrionalem a Republica Federata missa, Johanne Rodgers duce, observavit et descripsit, I: Turbellaria Dendrocoela. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 9:19-31.
- TAMURA S., IWASHIRO O. i KAWAKATSU M. (1988). Karyological and taxonomic studies of *Dugesia japonica* from the Southwest Islands of Japan. Fortschritte der Zoologie, 36:123-128.
- TEMPLETON A.R. (1983). Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and the apes. Evolution, 37:221-224.
- TESHIROGI W. i ISHIDA S. (1981). Studies on the speciation of Japanese freshwater planarian *Polycelis auriculata* based on the analysis of its karyotypes and constitutive proteins. Hydrobiologia, 84:69-77.

- THIERY J.P., MACAYA G. i BERNARDI G. (1976). An analysis of eucaryotic genomes by density gradient centrifugation. J. Mol. Biol., **108**:219-235.
- THORPE J.P. (1983). Enzyme variation, genetic distance and evolutionary divergence in relation to levels of taxonomic separation. Pp. 131-152 a: Protein polymorphism: adaptative and taxonomic significance (Oxford G.S. i Rollinson D., eds.). Academic Press, London.
- TYBAYRENC M., KJELLBERG F. i AYALA F.J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**:2414-2418.
- VALENTINE J.W. (1989). Bilaterians of the Precambrian-Cambrian transition and the annelid-arthropod relationship. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**:2272-2275.
- VANDEL A. (1925). *Planaria subtentaculata* Drap. n'est qu'une race asexuee de *Planaria gonocephala* Duges. Bull. biol. Fr. Belg., **59**:498-507.
- VRIJENHOEK R.C. (1979). Factors affecting clonal diversity and coexistence. Amer. Zool., **19**:787-797.
- WARD R.D., BILLINGTON N. i HEBERT P.D.N. (1989). Comparison of allozyme and mitochondrial DNA variation in populations of walleye, *Stizostedion vitreus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., **46**:2074-2084.
- WATSON J.D. i CRICK F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids. Nature, April 25:737.
- WILLMER P. (1990). Invertebrate relationships. Patterns in animal evolution. Cambridge University Press, Cambridge.
- WOESE C.R. (1987). Bacterial evolution. Microbiol. Rev., **51**:221-271.
- WOESE C.R. i OLSEN G.J. (1986). Archaeobacterial phylogeny: perspectives on the urkingdoms. Systematic and Applied Microbiology, **8**.
- WOESE C.R., MANIHOFF J. i ZABLEN L.B. (1980). Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**:494-498.
- WOOD A.E. (1950). Porcupines, paleogeography, and parallelism. Evolution, **4**:87-98.
- YANG F. i WOESE C.R. (1989). Phylogenetic structure of the "leuconostocs": an interesting case of a rapidly-evolving organism. System. Appl. Microbiol., **12**:145-149.