

Evolución y Filogenia de Arthropoda

Sección II: Los artrópodos en el Árbol de la Vida

ECDYSOZOA VERSUS ARTICULATA, DOS HIPÓTESIS ALTERNATIVAS SOBRE LA POSICIÓN DE LOS ARTRÓPODOS EN EL REINO ANIMAL

Gonzalo Giribet

Division of Invertebrate Zoology, American Museum of Natural History,
Central Park West at 79th Street, New York, NY 10024, USA

Dirección actual: Department of Organismic and Evolutionary Biology
Harvard University, 16 Divinity Ave., Cambridge, MA 02138, USA
ggiribet@oeb.harvard.edu

Resumen

Se revisan distintas hipótesis sobre la relación de los artrópodos con otros filo animales. La hipótesis de los Ecdysozoa, que relaciona a los artrópodos con otros filo de animales que presentan una muda cuticular, es la más corroborada, y por tanto preferida sobre la hipótesis de los Articulata, que relaciona a los artrópodos con los anélidos por presentar ambos filo metamerismo. Los análisis aquí presentados están basados en el análisis de la secuencia de ADN del gen ribosómico nuclear 18S de 145 taxones, y de una matriz morfológica de 172 caracteres. Los datos se analizan en un marco cladista mediante el método de optimización directa de caracteres.

Palabras clave: Arthropoda, Ecdysozoa, Metazoa, Filogenia, ARNr 18S, Morfología, Filogenia molecular.

Ecdysozoa versus Articulata, two alternative hypotheses on the placement of Arthropoda in the Animal Kingdom

Abstract

Different hypotheses on the relationship among arthropods and other animal phyla are reviewed. The Ecdysozoa hypothesis, that groups arthropods with other molting animals, is more corroborated than the Articulata hypothesis. Articulata, which unites arthropods and annelids due the presence of metamerism, is thus refuted. The analyses use DNA sequences of the nuclear ribosomal gene 18S of 145 terminal taxa, and 172 morphological characters. The data are analyzed in a cladistic framework, using the direct character optimization method.

Keywords: Arthropoda, Ecdysozoa, Metazoa, Phylogeny, 18S rRNA, Morphology, Molecular Phylogeny.

INTRODUCCIÓN

Los artrópodos constituyen el filo de Metazoos con mayor número de especies descritas; se cree que los insectos superan el millón de especies vivientes, mientras que el resto de artrópodos comprende otras más de 100.000 especies (Nielsen, 1995). Los artrópodos actuales se dividen en cuatro grandes grupos: quelicerados, crustáceos, miriápodos y hexápodos. Algunos de estos grupos parecen ser monofiléticos (p. ej. quelicerados), mientras que otros han sido considerados como grupos parafiléticos por numerosos autores (p. ej. crustáceos). El número de especies fósiles es también muy elevado, y constituyeron quizás el grupo más diverso de animales del Cámbrico (Fortey et al., 1996, 1997), y probablemente ya estaban presentes en el Véndico como representantes de la fauna de Ediacara (Jenkins, 1992).

Los artrópodos (actuales y fósiles) están extraordinariamente bien estudiados desde un punto de vista morfológico y anatómico. Su conocimiento a nivel molecular y de genética del desarrollo es cada vez más profundo. Sin embargo, las relaciones filogenéticas entre los distintos

grupos de artrópodos, así como su relación con el resto de filos animales todavía son inciertas (Patterson et al., 1993), y muchas hipótesis basadas en datos morfológicos y moleculares son contradictorias (véase por ejemplo Edgecombe, 1998; Fortey y Thomas, 1998).

En el presente capítulo se ha intentado hacer una revisión exhaustiva de los trabajos basados en análisis de matrices de datos (ya sean morfológicas o moleculares) relacionando a los artrópodos con otros filos animales. Posteriormente se pasa a analizar una nueva matriz combinada de datos morfológicos y moleculares de los filos de animales triploblásticos. Esta matriz es la más extensa que se ha estudiado hasta el momento con el objeto de situar a los artrópodos en el reino animal, y por lo tanto la que incorpora un mayor poder explicativo. Para entender el contexto filogenético en el que se basa este estudio, he creído necesario el introducir una serie de conceptos sobre sistemática, y en especial sobre sistemática molecular.

ANTECEDENTES AL ESTUDIO FILOGENÉTICO

Desde que Charles Darwin y Alfred Russel Wallace propusieron la teoría de la evolución en julio de 1858 (véase Darwin y Wallace, 1858; Darwin, 1859), el concepto de evolución iría tomando fuerza hasta llegar a ser reconocido como el principio unificador de la biología moderna. En 1866, Ernst Haeckel acuñó el término "filogenia" para describir las relaciones de parentesco entre los distintos organismos y publicó una serie de árboles filogenéticos con el conocimiento que se tenía sobre el 'árbol de la vida'. Parte de los conocimientos sobre filogenia y evolución se debían a la definición de los conceptos de 'homología' y 'analogía' introducidos por Owen (1843), que fueron aplicados a partir de entonces en los estudios de anatomía comparada.

Sin embargo, aunque la idea de la evolución sólo podía provenir de una sólida base sistemática, con demasiada frecuencia la sistemática no tenía en cuenta a la evolución en sus formulaciones. La escuela de sistemática evolutiva, encabezada por Simpson (1961) y Mayr (1969) principalmente, planteó por primera vez de un modo formal la manera de reconstruir filogenias y de representarlas en forma de clasificaciones.

En 1950 el zoólogo alemán Willi Hennig propuso su teoría de la sistemática filogenética (posteriormente denominada cladística por Mayr y Sokal simultáneamente), que introducía explícitamente el concepto de evolución en sistemática, aunque esta teoría no tuvo demasiada repercusión hasta que su libro fue revisado y traducido al inglés en 1966, dieciséis años más tarde. Simultáneamente surgía la escuela fenetista (véase Sokal y Sneath, 1963; Sneath y Sokal, 1973; Sokal, 1986). El método fenetista se basa en la obtención de fenogramas mediante el reconocimiento de caracteres considerados homólogos *a priori*, aunque sin excluir a la homoplasia reconocida *a posteriori*, es decir que no diferencia entre homología y homoplasia. El método fue desarrollado para generar clasificaciones estables, pero no hipótesis de genealogía (Sokal y Sneath, 1963).

La cladística y la fenética constituyen, por lo tanto, dos metodologías empleadas en sistemática para elaborar clasificaciones de los organismos de un modo que trata de ser lo más objetivo posible. La escuela fenetista admite la existencia de categorías taxonómicas para grupos no monofiléticos, basadas en similitud. En cambio, las clasificaciones cladísticas se basan en el reconocimiento de grupos monofiléticos (que comparten caracteres apomórficos). Posteriormente se incorpora el principio de parsimonia para la reconstrucción de la historia evolutiva.

A la vez que los nuevos métodos de clasificación iban cobrando importancia en el mundo de la sistemática zoológica moderna, una nueva revolución tecnológica ocurría en otro campo muy distinto al de la sistemática, el de la biología molecular. En la década de los 60 se empezaron a desarrollar métodos para examinar la estructura molecular de las proteínas, y más tarde de los ácidos nucleicos. Con el desarrollo de estas nuevas técnicas, aparecieron las primeras hipótesis filogenéticas basadas en datos moleculares. Posteriormente, la tecnología de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Saiki et al., 1985; Mullis y Faloona, 1987; White et al., 1989) posibilitó la obtención de grandes cantidades de ADN. La técnica de la PCR requiere polimerasas termoestables (p. ej. la *Taq*) aisladas a partir de bacterias como *T. aquaticus* (Innis et al., 1988; Saiki et al., 1988) capaces de vivir a temperaturas superiores a los 100°C. La PCR permite amplificar fragmentos de ADN comprendidos entre dos regiones de secuencia conocida o '*primers*' (véase una revisión del método en Palumbi, 1996). Por último, la utilización de los secuenciado-

res automáticos de ADN en la década de los 90 ha permitido obtener una gran cantidad de secuencias de ADN de una forma mucho más eficiente.

El desarrollo de nuevos métodos más objetivos para la inferencia filogenética, junto con el crecimiento exponencial de la tecnología informática, ha posibilitado el manejo y análisis de gran cantidad de información. Concretamente, Internet y el *www* han sido de vital importancia para poner al alcance de la comunidad científica toda la información depositada en proyectos como el GenBank, que trata de recopilar, catalogar y ordenar las secuencias de ADN obtenidas en todos los laboratorios del mundo. Además, el desarrollo de nuevos algoritmos y programas para el manejo, alineación y análisis de secuencias de ADN ha determinado la consolidación de la filogenia molecular como una forma más de hacer sistemática. Como consecuencia, los análisis filogenéticos están presentes en muchos campos de la Biología para interpretar todo tipo de patrones y procesos biológicos. Tal y como Hillis (1997) ha comentado, la metodología filogenética ha ido aportando la base para el desarrollo de nuevas aplicaciones. Otra aplicación de la filogenia molecular es que constituye la ciencia que produce las principales herramientas interpretativas para entender la organización y evolución de los genes y genomas (véase una revisión en Li y Graur, 1991; Li, 1997). Pero lo más importante es que la filogenia se ha consolidado en su papel más tradicional: como un criterio para entender y clasificar la vida.

Sistemática molecular: aplicaciones, niveles de resolución y limitaciones

En la década de los 80 el análisis de secuencias de ADN fue considerado como una potencial 'Piedra Roseta' para la sistemática, permitiendo un acceso más objetivo a los patrones filogenéticos enmascarados por los procesos de adaptación, difícilmente reconocibles en ciertos caracteres morfológicos (p. ej. Gould, 1985). Patterson et al. (1993) presentaron una visión más pesimista, afirmando que los datos de secuencias no habían contribuido demasiado al conocimiento de las relaciones filogenéticas, excepto en ciertas áreas en las que los análisis morfológicos no son resolutivos. Uno de los problemas más importantes de los datos de secuencias de ADN es que son mucho más "ruidosos" (homoplásicos) de lo que nos gustaría, dando lugar a cladogramas con tanta o más homoplasia que los existentes en matrices de caracteres morfológicos de un tamaño comparable (Sanderson y Donoghue, 1989). Este hecho se debe a que el ADN tan sólo presenta cuatro estados nucleotídicos posibles (y los mismos cuatro para todas las posiciones) y porque no hay modo alguno de distinguir *a priori* qué caracteres son los más apropiados para resolver un problema filogenético determinado.

La homoplasia en caracteres moleculares se ha explicado por la existencia de tasas evolutivas intra e intergénicas muy diferentes (Kimura, 1983; Palumbi, 1989). En consecuencia, algunas posiciones no varían, otras son demasiado variables (potencialmente homoplásicas), y otras contienen la información que deseamos (Brower et al., 1996). Pero, como comentaba Farris (1983), "*if homoplasy is random with respect to the 'phylogenetic signal', then it doesn't make any difference how homoplasious the data are: The hierarchical pattern will emerge from the noise*" [Si la homoplasia está distribuida al azar respecto a la 'señal filogenética', entonces no importa cuan homoplásicos sean los datos: el patrón jerárquico emergerá a partir del ruido]. Evidentemente, la saturación de cambios nucleotídicos en regiones variables de las moléculas es un problema que afecta a la resolución

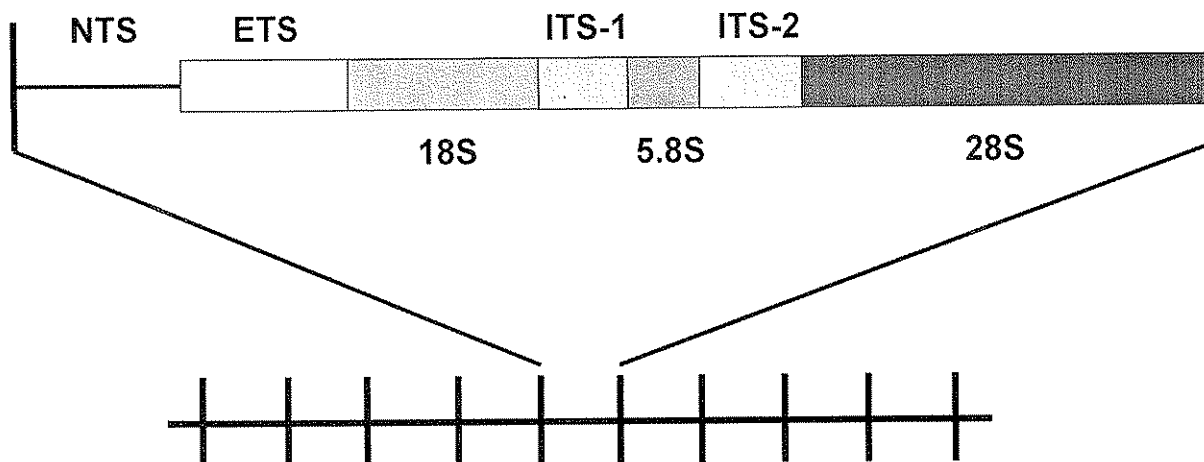


Fig. 1.- Esquema de la unidad de transcripción de las células eucariontes. NTS: Espaciador no transcrito (Non Transcribed Spacer); ETS: Espaciador externo transcrito (External Transcribed Spacer); ITS: Espaciador interno transcrito (Internal Transcribed Spacer); 18S: gen ARNr 18S; 5.8S: gen ARNr 5.8S; 28S: gen ARNr 28S.

filogenética entre taxones lejanos, pero este problema podría disminuir al combinar los datos con otros genes portadores de una señal filogenética a otro nivel de la escala evolutiva.

Aún teniendo en cuenta los potenciales problemas mencionados anteriormente, el análisis del ADN es una herramienta cada vez más utilizada en estudios de ecología evolutiva, genética de poblaciones, y sobretodo, sistemática.

Existen diferentes regiones de un genoma que pueden emplearse para inferir relaciones filogenéticas. Una primera división puede establecerse entre genes nucleares y genes mitocondriales. Una segunda división puede establecerse entre genes codificantes y genes (o regiones) no codificantes. Por último, se puede diferenciar entre los genes no codificantes y las regiones no codificantes (p. ej. intrones o espaciadores génicos), sometidos a presiones de selección totalmente distintas. Las diferencias entre cada una de las tres categorías de secuencias de ADN tendrá su propia implicación evolutiva y, por tanto, filogenética, permitiendo examinar diferentes niveles de resolución. Por ejemplo, los genes codificantes deben mantener una pauta de lectura por el hecho de que son traducidos a proteínas, y por ese motivo, las inserciones y deleciones (fenómenos "indel") son poco frecuentes. En cambio estos fenómenos indel pueden acumularse libremente en regiones no codificantes, y en algunas regiones específicas de genes no codificantes, como en los anillos de la estructura secundaria de los genes ribosómicos.

Así, por norma general, las regiones codificantes de los genes nucleares suelen ser más apropiadas para inferir relaciones filogenéticas entre organismos muy distantes en la escala filogenética, mientras que los genes mitocondriales son más adecuados para trabajar a niveles filogenéticos más bajos; de familia, de especie o a nivel poblacional. Las regiones de ADN no codificantes (p. ej. espaciadores génicos o intrones de genes nucleares), por acumular mutaciones al azar según un modelo neutralista (Kimura, 1968), resultan apropiadas para realizar inferencias filogenéticas a nivel específico. Por último, la utilización de algunos genes ribosómicos nucleares no codificantes, como la subunidad ribosómico pequeña (o ARNr 18S en el caso de los organismos eucariontes), ha sido de uso generalizado para inferir relaciones filogenéticas desde los grandes reinos de seres vivos (p.ej. Wainright et al., 1993; Cavalier-Smith et al., 1996) hasta nivel específico (p. ej. Fitch et al., 1995), debido a la alternancia de regiones conservadas con variables. Este gen juega actualmente un importante papel en la inferencia filogenética de grandes grupos de metazoos.

Los genes ribosómicos nucleares

Los genes ribosómicos (ARNr) juegan un papel importante en la maquinaria de síntesis proteica de las células eucariontes y procariontes. El conjunto de genes ribosómicos típico de las células eucariontes consiste en unos cuantos cientos de copias repetidas en tándem de una unidad de transcripción separada por espaciadores no transcritos (NTS). La unidad de transcripción típica de células eucariontes codifica para los genes 18S, 5.8S y 28S, y para los espaciadores transcritos externo (ETS) e internos (ITS-1 e ITS-2) (véase una revisión en Long y Dawid, 1980) (Fig. 1).

Las múltiples copias de esta unidad de transcripción parecen ser prácticamente idénticas para un organismo determinado (Lane et al., 1985; Hillis y Dixon, 1991), y la conservación de la secuencia parece reflejar unas constricciones funcionales de la molécula que son requeridas para una eficiencia transcripcional óptima. El proceso que se ha postulado como el encargado de mantener esta homogeneidad entre las diferentes copias repetidas se denomina evolución concertada (Dover, 1982; Hillis y Dixon, 1991), y dos son los mecanismos que han sido sugeridos para que se produzca este proceso, la conversión génica (Nagylaki, 1984; Lassner y Dvorak, 1986; Hillis et al., 1991), y el *crossing over* diferencial (Petes, 1980; Szostak y Wu, 1980; Arnheim, 1983; Cohen y Dover, 1983).

Entre los genes ribosómicos, el ARNr 18S (o subunidad ribosómica pequeña) es el más utilizado en sistemática porque (1) es una molécula ubicua; (2) su tamaño (aproximadamente 1.8 Kb en la mayoría de metazoos) parece suficientemente grande para contener la información adecuada para inferir relaciones filogenéticas; (3) presenta una tasa de evolución variable dentro de la molécula, con unas zonas que cambian muy lentamente adecuadas para resolver divergencias muy antiguas, y otras que evolucionan de forma rápida, adecuadas para resolver problemas filogenéticos a un nivel inferior (véase Sogin, 1991; Adoutte y Philippe, 1993). Además, hay múltiples copias del locus 18S ARNr por genoma que son homogeneizadas mediante el proceso de evolución concertada (que reduce drásticamente la variación intraindividual), y la variabilidad intraespecífica es prácticamente inexistente. Estas razones han favorecido la utilización generalizada del gen ARNr 18S en numerosos estudios filogenéticos de metazoos para categorías taxonómicas por encima de orden.

ANTECEDENTES AL ESTUDIO FILOGENÉTICO DE LOS ARTRÓPODOS

La posición de los artrópodos en el reino animal: *Articulata versus Ecdysozoa*

La posición de los artrópodos dentro del reino animal es incierta, aunque clásicamente se les ha considerado animales protóstomos estrechamente relacionados con el filo Annelida. Ambos grupos constituirían un clado que se ha denominado **Articulata** (Cuvier, 1812; término también aplicado a una de las dos clases del filo Brachiopoda), al que recientemente se han incorporado los moluscos. Sin embargo, diversos análisis morfológicos modernos basados en principios cladistas han llegado a resultados contradictorios respecto a las relaciones filogenéticas entre anélidos y artrópodos. Una serie de autores (Nielsen, 1985, 1995; Brusca y Brusca, 1990; Meglitsch y Schram, 1991; Schram, 1991; Schram y Ellis, 1994; Nielsen et al., 1996) han propuesto la existencia de un clado 'Articulata'. La hipótesis alternativa enuncia que los artrópodos (y grupos afines: Tardigrada y Onychophora) no están directamente relacionados con los anélidos, sino con una serie de grupos de pseudocelomados (Nematoda, Nematomorpha, Kinorhyncha, Priapulida), constituyendo un clado denominado **Ecdysozoa** (Aguinaldo et al., 1997; Giribet y Ribera, 1998; Littlewood et al., 1998; Zrzavý et al., 1998; véase también Aguinaldo y Lake, 1998; Garey y Schmidt-Rhaesa, 1998; Minelli, 1998; Schmidt-Rhaesa et al., 1998). Un esquema de ambas hipótesis se puede ver en la figura 2.

Históricamente, el primer desafío serio a la hipótesis de los Articulata fue propuesto por Ghiselin (1988) basándose en datos moleculares y por Eernisse et al. (1992) basándose en datos morfológicos. Estos autores enunciaron que los anélidos estaban relacionados con otros grupos que presentan una larva de tipo trocoforiano en los primeros estadios del desarrollo larvario, tales como anélidos, moluscos, sipuncúlidos, pogonóforos, equiúridos, y entoproctos, pero no estaban directamente relacionados con los artrópodos (y grupos afines). A este grupo de anélidos y otros 'gusanos protóstomos' se le denominó **Eutrochozoa**. Posteriormente Halanych et al. (1996) incluyó a los lofoforados junto a los eutrochozoos, definiendo el clado **Lophotrochozoa** (**Lophozoa sensu** Cavallier-Smith, 1998). Zrzavý et al. (1998) redefinieron el clado como **Trochozoa**, excluyendo Brachiopoda y Phoronida. Estas hipótesis coinciden en considerar la segmentación en anélidos y artrópodos como una convergencia. Otra evidencia en contra de la homología entre la segmentación de anélidos y artrópodos provienen de una serie de diferencias morfogenéticas fundamentales (Minelli y Bortoletto, 1988; Shankland, 1991; Lans et al., 1993; Zrzavý y Stys, 1995).

Kristensen (1991) consideró una posible relación filogenética entre los artrópodos y ciertos grupos de asquelminetos, soportada por la estructura de la capa de cutícula quitinosa, la existencia de un proceso de muda o ecdisis, órganos de los sentidos e inserciones musculares. Además, los Kinorhyncha presentan metamerismo en el sistema nervioso, en la musculatura y en las placas cuticulares (Kristensen y Higgins, 1991).

Las hipótesis de Eutrochozoa y Ecdysozoa han ganado credibilidad con los resultados obtenidos en algunos estudios filogenéticos basados en caracteres moleculares (Halanych et al., 1996; Winnepenninckx et al., 1995b, 1998b; Garey et al., 1996; Giribet et al., 1996; Aguinaldo et al., 1997; Balavoine, 1998; Giribet y Ribera, 1998; Eernisse, 1998; Littlewood et al., 1998; Zrzavý et al., 1998; véase también Aguinaldo y Lake, 1998; Garey y Schmidt-Rhaesa, 1998; Schmidt-Rhaesa et al., 1998).

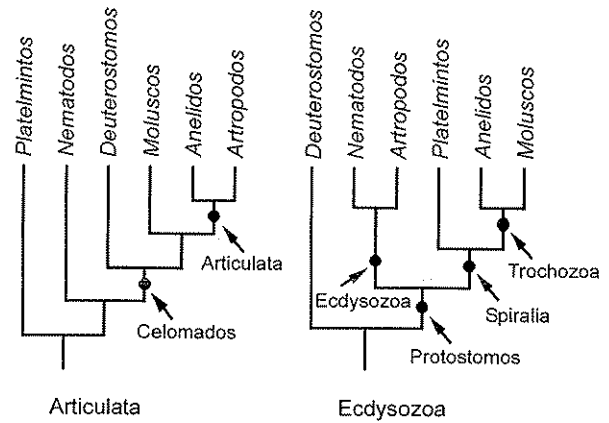


Fig. 2.- Hipótesis alternativas sobre la relación de los artrópodos con los otros grandes filos de animales triploblásticos.

Los 'Parartrópodos' y su relación con los artrópodos

Pentastómidos, onicóforos y tardígrados son tres grupos enigmáticos que de alguna manera parece que pueden estar relacionados con los artrópodos (véase Gould, 1995). Independientemente de si los 'parartrópodos' constituyen o no parte del filo Arthropoda, son sin duda los grupos animales más estrechamente relacionados con los artrópodos.

Los **pentastómidos** han sido considerados recientemente como un grupo derivado de crustáceos parásitos (posiblemente relacionados con los branquiuros) de acuerdo con la morfología espermática (Wingstrand, 1972; Jamieson y Storch, 1992; véase también Riley et al., 1978), y con secuencias del gen ribosómico 18S (Abele et al., 1989; Giribet et al., 1996; pero véase Walossek y Müller, 1990). La adición de nuevos datos de crustáceos sitúa al pentastómido *Porocephalus crotali* como grupo hermano de ciertos crustáceos maxilópodos, aunque no estrictamente con los braquiuros (Giribet y Ribera, 1998), o en otros casos su posición es dependiente de los taxones utilizados (Spears y Abele, 1998). Sin embargo, el descubrimiento de pentastómidos fósiles del Paleozoico inferior (Walossek y Müller, 1994; Walossek et al., 1994) contrasta con dicha hipótesis (véase Walossek y Müller, 1994).

Los **tardígrados** constituyen un pequeño grupo de animales con unas características muy particulares, que han hecho a algunos autores relacionarlos con ciertos grupos de pseudocelomados (Dewel y Clark, 1973a, 1973b; Kristensen, 1991). Datos morfológicos (Kinchin, 1994; Nielsen, 1995; Dewel y Dewel, 1996; Nielsen et al., 1996) y moleculares (Giribet et al., 1996; Garey et al., 1996; Aguinaldo et al., 1997; Giribet y Ribera, 1998; Eernisse, 1998; Littlewood et al., 1998; Wheeler 1998a, 1998b; Zrzavý et al., 1998) sugieren una estrecha relación entre artrópodos y tardígrados, probablemente constituyendo una relación de grupos hermanos, hipótesis que viene reforzada por el descubrimiento de tardígrados fósiles del Cámbrico (Walossek y Müller, comunicación personal a Gould, 1995; Müller et al., 1995). Otros autores han propuesto una relación de grupos hermanos entre tardígrados y onicóforos (incluyendo otros Lobopodia marinos; p. ej. *Xenusion*, *Hallucigenia*), constituyendo ambos el grupo hermano de artrópodos y otros fósiles cámbricos (Simonetta y Delle Cave, 1980; Waggoner, 1996).

Los **onicóforos** constituyen un grupo con una gran cantidad de especies fósiles del Cámbrico (véase Dzik y Krumbiegel, 1989; Ramsköld y Xianguang, 1991; Ramsköld, 1992; Hou y Bergstrom, 1995). Presuntamente considerados

como el 'eslabón perdido' entre anélidos y artrópodos (Fortey y Thomas, 1993), Dzik y Krumbiegel (1989) propusieron un origen a partir de un ancestro de tipo priapulido, que claramente contrasta con la hipótesis de los Articulata. Desde un punto de vista morfológico, los onicóforos han sido considerados como (1) el grupo-hermano de los Tracheata (= miriápodos + hexápodos) constituyendo los Uniramia (p.ej. Tieggs, 1947; Tieggs y Manton, 1958; Manton, 1964; Anderson, 1973, 1979); (2) como un grupo de posición incierta entre anélidos y artrópodos (Snodgrass, 1938) que podría representar un primer estadio de artropodización; o (3) como un grupo de artrópodos derivado (Meglitsch y Schram, 1991; Budd, 1993). Estudios de la ultraestructura espermática (Jamieson, 1986) han sido interpretados como una sugerencia sobre una posible relación entre onicóforos y anélidos clitelados. Usando datos moleculares de la secuencia del ARNr 12S, Ballard et al. (1992) concluyeron que los onicóforos son artrópodos modificados, aunque un reanálisis de dichos datos (Wägele y Stanjek, 1995) fue incapaz de rechazar la hipótesis sobre la monofilia de los artrópodos excluyendo a los onicóforos, contradiciendo así la tesis de Ballard et al. (1992). Wheeler et al. (1993), en un análisis simultáneo de secuencias parciales del ARNr 18S, del gen que codifica para la ubiquitina, y de datos morfológicos, concluyeron que los onicóforos constituyen el grupo hermano de los artrópodos. Posteriormente, Wheeler (1998a, 1998b) incluyó datos de tardígrados, sugiriendo una relación del tipo (Onychophora (Tardigrada + Arthropoda)). Aguinaldo et al. (1997) utilizando la primera secuencia completa de una especie de onicóforo lo situaron junto a los artrópodos, tardígrados y otros animales que presentan una cutícula que se muda (= Ecdysozoa). Otros autores (Giribet y Ribera, 1998; Zrzavý et al., 1998) han obtenido resultados similares, con los onicóforos relacionados con otros Ecdysozoa, poniendo en duda así la hipótesis sobre una posible relación entre onicóforos y anélidos.

Filogenias moleculares

El primer análisis molecular publicado incluyendo varios grupos de artrópodos fue el de Field et al. (1988) acerca de las relaciones filogenéticas entre diferentes grupos animales. En su estudio incluyeron secuencias parciales del ARNr 18S de los cuatro grupos principales de artrópodos: quelicerados (*Limulus*), miriápodos (*Spiroboles*), crustáceos (*Artemia*) e insectos (*Drosophila*), que aparecían como un grupo monofilético entre el resto de protóstomos. Este trabajo ya sugería la presencia de un clado de Trochozoa (incluyendo anélidos, moluscos, sipuncúlidos, poganóforos y braquiópodos) que excluía a los artrópodos. Los datos de Field et al. han sido posteriormente reanalizados por otros autores, obteniendo resultados contradictorios.

Lake (1989; 1990) es uno de los autores que reanalizó las secuencias de Field et al., llegando a conclusiones muy diferentes de las de los autores originales. En su artículo los artrópodos aparecen como un grupo parafilético entre protóstomos y deuteróstomos.

Turbeville et al. (1991) añadieron a su base de datos previa (Field et al., 1988) unas cuantas secuencias de quelicerados y concluyeron que los artrópodos y los quelicerados eran monofiléticos. Los únicos otros filos de animales protóstomos incluidos en sus análisis eran un molusco y un anélido, que se agrupaban juntos.

Wheeler et al. (1993), utilizaron por primera vez un análisis simultáneo (*total evidence*) de secuencias parciales del ARNr 18S, ubiquitina, y de 100 caracteres morfológicos de artrópodos y otros protóstomos. También por primera vez

utilizaron un amplio muestreo taxonómico, incluyendo 2 moluscos, 3 anélidos, 2 onicóforos, 1 picnogónido, 5 quelicerados, 2 crustáceos, 2 miriápodos y 8 hexápodos. Los resultados apoyaban un origen monofilético de los artrópodos, y su relación de grupo hermano con Onychophora (tardígrados no incluidos en los análisis). Estos resultados han sido posteriormente reanalizados y corroborados por Wheeler (1995). Posteriormente, la adición de tardígrados, de más grupos de artrópodos y de las secuencias del gen ARNr 28S, reafirmó la relación entre (Onychophora (Tardigrada + Arthropoda)) (Wheeler, 1998a, 1998b).

Friedrich y Tautz (1995) utilizaron secuencias parciales de los genes ribosómicos 18S y 28S con el objeto de analizar las relaciones internas de los artrópodos, concluyendo que son monofiléticos (respecto a un anélido, un nematodo y dos cordados). Además, obtuvieron evidencias para la monofilia de los 2 quelicerados, de los 3 miriápodos, y de los hexápodos + crustáceos. Sin embargo, el muestreo taxonómico de cada grupo era pobre, y no se incluyeron en este análisis otros grupos como onicóforos o picnogónidos.

En su análisis de 'asquelmintos' utilizando secuencias del gen ARNr 18S, Winnepenninckx et al. (1995a) utilizaron secuencias de varios grupos de metazoos, incluyendo tres artrópodos y varios grupos de pseudocelomados, acelomados, celomados y diplobásticos. Los artrópodos aparecían relacionados con los priapulidos. Su relación con nematomorfos dependía de la metodología de análisis, ya que en un caso aparecían junto a priapulidos y artrópodos (árbol construido bajo el criterio de parsimonia), y en otro caso aparecían junto a los nematodos en la base de los animales triploblásticos (árbol de *neighbor-joining*). Sin embargo, en ningún caso los artrópodos (ni ninguno de los otros ecdysozoos representados) aparecían relacionados con los trochozoos o con los otros pseudocelomados no ecdysozoos (Gastrotricha, Rotifera, Acanthocephala). En su análisis de 'gusanos protóstomos' utilizando el mismo gen, Winnepenninckx et al. (1995b) incluyeron 4 artrópodos y otros filos de animales protóstomos. Los protóstomos no artrópodos aparecían relacionados entre sí, excluyendo a los artrópodos. Posteriormente, Winnepenninckx et al. (1998a) analizaron las secuencias del gen 18S ADN de 35 metazoos protóstomos con el objeto de situar a los ciclióforos en los metazoos. En este análisis los artrópodos y un priapulido aparecían como grupos hermanos. Ningún otro grupo de Ecdysozoa fue incluido en estos análisis.

Giribet et al. (1996) utilizaron secuencias completas del gen ARNr 18S con el objeto de situar a los tardígrados dentro del reino animal, concluyendo que artrópodos y tardígrados forman un grupo monofilético, posiblemente con los tardígrados como grupo hermano del resto de artrópodos. Asimismo los protóstomos no artrópodos aparecían más relacionados entre sí que con los artrópodos.

Garey et al. (1996) llegaron a conclusiones similares utilizando también secuencias completas del gen ribosómico 18S, aunque su muestreo de artrópodos era más deficiente, por lo que no se discute sobre la filogenia interna del grupo.

Aguinaldo et al. (1997) estudiaron la relación filogenética de los artrópodos con otros filos de metazoos, relacionándolos con una serie de grupos de 'asquelmintos' que presentan muda cuticular. Sin embargo el número de taxones incluidos en el análisis es pobre y falla en reconstruir la monofilia de los artrópodos. Estos autores definieron el clado Ecdysozoa conteniendo a los filos Arthropoda, Tardigrada, Onychophora, Nematoda, Nematomorpha, Priapulida y Kinorhyncha.

En su estudio para situar a los artrópodos en el reino animal, Giribet y Ribera (1998) analizaron la secuencia del gen ARNr 18S de 133 especies pertenecientes a 31 filos de

metazoos. Incluyeron todos los filos de Ecdysozoa (*sensu* Aguinaldo et al., 1997) excepto Loricifera, y concluyeron que los Ecdysozoa constituyen un grupo natural. Un reanálisis de estos datos (Giribet y Wheeler, 1999) utilizando la novedosa técnica del '*parsimony ratchet*' (Nixon, en prep.) parece corroborar la monofilia de Ecdysozoa.

Con el objeto de situar a los Gnathostomulida en el reino animal, Littlewood et al. (1998) analizaron la secuencia del gen ARNr 18S de 60 especies pertenecientes a 30 filos de metazoos. También incluyeron todos los filos de Ecdysozoa (*sensu* Aguinaldo et al., 1997) excepto Onychophora y Loricifera, concluyendo con la monofilia de Ecdysozoa, aunque esta vez incluían en Ecdysozoa a los filos Gnathostomulida y Chaetognatha.

En su re-evaluación de las relaciones entre artrópodos y anélidos Eernisse (1998) analizó la secuencia del gen ARNr 18S de unas 100 especies pertenecientes a unos 30 filos de metazoos. Incluyó todos los filos de Ecdysozoa (*sensu* Aguinaldo et al., 1997) excepto Onychophora y Loricifera. Artrópodos, tardígrados, nematomorfos, priapulidos y quetognatos (y a veces incluyendo nematodos) constituían un grupo monofilético, soportando parcialmente la hipótesis de la monofilia de Ecdysozoa. Similares resultados han sido obtenidos por Halanych (1998).

Regier y Shultz (1998) analizaron secuencias del gen nuclear codificante factor de elongación 1 α (EF-1 α) de varios grupos de artrópodos, anélidos, sipuncúlidos y moluscos, siendo sus resultados congruentes con la hipótesis de los Trochozoa.

Filogenias morfológicas basadas en análisis cladistas

Meglitsch y Schram (1991) (véase también Schram, 1991) realizaron el primer intento de análisis cladista para casi todos los filos de metazoos utilizando una matriz explícita y analizada por ordenador, siendo así el primer trabajo en discutir sobre filogenia de metazoos en un contexto de sistemática filogenética. Hasta entonces los únicos trabajos publicados sobre metazoos habían sido tratados desde un punto de vista de sistemática evolutiva. Estos análisis situaban a los artrópodos junto a anélidos, moluscos y otros filos de gusanos protóstomos, siendo consistente con la hipótesis de los Articulata. Posteriormente Schram y Ellis (1994) reanalizaron estos datos usando análisis de parsimonia más estándar, llegando a una conclusión similar respecto a la posición de los artrópodos.

Eernisse et al. (1992) compilaron una nueva matriz de 130 caracteres morfológicos para analizar las relaciones entre ciertos grupos de metazoos. Un resultado sorprendente por aquella época era la relación de artrópodos (y onicóforos y tardígrados) con quinorrincos y nematodos, en vez de relacionarlos con anélidos y otros gusanos protóstomos. Este era el primer desafío a la hipótesis de los 'Articulata' basado en un análisis cladista de datos morfológicos.

Backeljau et al. (1993) reanalizaron los datos de Schram (1991) reinterpretando algunos de los caracteres originales concluyendo que los artrópodos están relacionados con anélidos, moluscos y otros grupos de vermes celomados, la hipótesis de los 'Articulata'.

Nielsen et al. (1996) hicieron explícita una matriz de los datos contenidos en Nielsen (1995), situando a los artrópodos junto a anélidos, moluscos y otros gusanos protóstomos, siendo consistente con la hipótesis de los 'Articulata'. Sin embargo, esta matriz contenía algunas asunciones no corroboradas por datos. Por ejemplo, para el carácter 'desarrollo espiral con mesodermo

4-d' a los artrópodos les asigna el estado 'presente', cuando no hay ningún artrópodo que presente un verdadero desarrollo espiral (ver Scholtz, 1998). Además, algunos caracteres larvarios (caracteres 22 y 23) son codificados como 'ausentes' en una serie de filos que no presentan larva, cuando deberían ser codificados como inaplicables.

'Total evidence'

En su análisis de *total evidence* de metazoos Zrzavý et al. (1998) utilizaron secuencias del gen ARNr 18S de 144 especies de metazoos pertenecientes a todos los filos excepto Loricifera y Cycliophora, y una matriz de 276 caracteres morfológicos para todos los filos (y algunos grupos menores). Este trabajo constituye el análisis más elaborado de los publicados hasta ahora, por tres razones fundamentales: (1) todos los filos animales y grupos problemáticos han sido codificados para la morfología, (2) incorpora la matriz molecular más extensa (en número de filos) publicada hasta la fecha, y (3) es el primer trabajo en incorporar un análisis simultáneo de datos moleculares y morfológicos para el estudio de las relaciones filogenéticas entre los distintos grupos de metazoos. Además el análisis incorpora un '*sensitivity analysis*' (*sensu* Wheeler, 1995) para evitar basar conclusiones en resultados poco estables. Sin embargo los datos moleculares fueron tratados de una forma no muy ortodoxa (se utilizaron secuencias consenso para cada categoría codificada para la morfología) y finalmente se establecen toda una serie de nuevos filos basados en datos poco soportados por el *sensitivity analysis*. El árbol preferido por los autores concluye con la monofilia de Ecdysozoa (incluyendo también Chaetognatha, al igual que Eernisse [1998] y Littlewood et al. [1998]).

Así, parece ser que los datos moleculares sugieren inequívocamente una relación entre los artrópodos y ciertos grupos de pseudocelomados (la hipótesis de los Ecdysozoa), mientras que los datos morfológicos (excepto la matriz de Eernisse et al., 1992 y de Zrzavý et al., 1998) mayoritariamente soportan una relación entre artrópodos-anélidos-moluscos (la hipótesis de los Articulata). El objeto del presente trabajo es responder a la pregunta sobre la posición filogenética de los artrópodos en el reino Animal, y escoger entre las teorías alternativas "Articulata *versus* Ecdysozoa" utilizando un análisis combinado de datos morfológicos y moleculares (*total evidence*) en un contexto de sistemática filogenética (cladista).

METODOLOGÍA

Los análisis aquí presentados consisten en el análisis de secuencias del gen ARNr 18S de 145 especies de animales triploblásticos (= Bilateria), y de 172 caracteres morfológicos codificados para 37 taxones supraespecíficos. La hipótesis a probar es si los artrópodos (y grupos afines) están relacionados con ciertos grupos de pseudocelomados (Ecdysozoa *sensu* Aguinaldo et al., 1997), o si están relacionados con anélidos y grupos afines (Articulata *sensu* Nielsen, 1995).

Muestreo taxonómico

En la matriz de datos se ha intentado incluir varios representantes de todos los filos de animales triploblásticos, siempre que ha sido posible. Así todos los filos están representados por más de una especie excepto para los filos Kinorhyncha, Cephalochordata, y obviamente Cycliophora (del que solamente se conoce una especie). El filo Loricifera y la clase

Pterobranchia (filo Hemichordata) no se han incluido por no disponer de caracteres moleculares. Se han utilizado secuencias completas del gen nuclear ARNr 18S de 145 especies de animales triploblásticos: Polychaeta (8 sp.), 'Archianelida' (1 sp.), Clitellata (4 sp.), Mollusca (10 sp.), Sipuncula (2 sp.), Echiura (2 sp.), Pogonophora (2 sp.), Nemertea (3 sp.), Brachiopoda (4 sp.), Phoronida (2 sp.), Bryozoa (4 sp.), Entoprocta (2 sp.), Cycliophora (1 sp.), Rotifera (2 sp.), Acanthocephala (2 sp.), Gastrotricha (2 sp.), Gnathostomulida (3 sp.), Acoela (2 sp.), Nemertodermatida (2 sp.), Catenulida (2 sp.), Rhabditiophora (15 sp.), Priapulida (2 sp.), Kinorhyncha (1 sp.), Nematomorpha (2 sp.), Nematoda (8 sp.), Onychophora (2 sp.), Tardigrada (2 sp.), Arthropoda (22 sp.), Enteropneusta (2 sp.), Echinodermata (10 sp.), Urochordata (3 sp.), Cephalochordata (1 sp.), Craniata (11 sp.), Chaetognatha (2 sp.) (véase Tabla 1).

La obtención de las secuencias de ADN se realizó siguiendo los protocolos descritos por Giribet et al. (1996, 1999a, 1999b). De las 145 secuencias utilizadas, 37 han sido obtenidas por el autor. Todas las secuencias nuevas han sido depositadas en el banco de secuencias de DNA (GenBank). La longitud de las secuencias (excluyendo los primers externos 1F y 9R) y los códigos de acceso al banco de datos se presentan en la Tabla 1.

Datos morfológicos

La matriz de datos morfológicos ha sido obtenida a partir de la matriz publicada por Zrzavý et al. (1998). A partir de esta matriz se han excluido todos los taxones de animales diploblásticos, así como ciertos triploblásticos para los cuales no había datos moleculares disponibles (Xenoturbellida, Pterobranchia, Loricifera, *Buddenbrockia*, Lobatocebreomorpha y Myzostomida). En total, 37 taxones terminales han sido codificados para la morfología, con un total de 276 caracteres (de los cuales 172 son informativos). Todos los caracteres han sido tratados como no ordenados, y no ha sido aplicado ningún tipo de ponderación diferencial. Los taxones terminales utilizados en la matriz morfológica son los siguientes: Echinodermata, Enteropneusta, Cephalochordata, Urochordata, Vertebrata, Phoronida, Inarticulata (Brachiopoda), Articulata (Brachiopoda), Bryozoa, Entoprocta, Cycliophora, Nemertea, Mollusca, Sipuncula, Echiura, Pogonophora, Polychaeta (Annelida), Clitellata (Annelida), Acanthocephala, Monogononta (Rotifera), Bdelloidea (Rotifera), Chaetognatha, Nematoda, Nematomorpha, Priapulida, Kinorhyncha, Tardigrada, Onychophora, Arthropoda, Gastrotricha, Gnathostomulida, Acoela (Platyhelminthes), Nemertodermatida (Platyhelminthes), Catenulida (Platyhelminthes), Macrostomida (Platyhelminthes), Polycladida (Platyhelminthes), Neophora (Platyhelminthes). Los filios más problemáticos (debido a posibles problemas de parafilia o polifilia) como Brachiopoda, Rotifera, Annelida y Platyhelminthes se han codificado en categorías por debajo del nivel de filo.

Análisis filogenético

Los datos moleculares han sido analizados utilizando el método de optimización directa de caracteres (*direct character optimization*) descrito por Wheeler (1996; ver también Wheeler y Hayashi, 1998) e implementado en el programa POY (Gladstein y Wheeler, 1997). El método

Tabla 1

Muestreo taxonómico utilizado en los análisis moleculares y códigos de acceso al GenBank. El asterisco indica los taxones secuenciados por el autor.

| | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|-----------|
| Annelida | | |
| (Polychaeta) (9 sp.) | | |
| Orden Phyllodocida | <i>Nereis virens</i> | Z83754 |
| | <i>Aphrodita aculeata</i> | Z83749 |
| | <i>Glycera americana</i> | U19519 |
| | <i>Chaetopterus variopedatus</i> | U67324 |
| Orden Spionida | <i>Capitella capitata</i> | U67323 |
| Orden Capitellida | <i>Lanice conchilega</i> | X79873 |
| Orden Terebellida | <i>Sabella pavonina</i> | U67144 |
| Orden Sabellida | <i>Protula</i> sp. | U67142 |
| Orden Dinophilida | <i>Dinophilus gyrocoliatius</i> | AF119074* |
| Annelida | | |
| (Clitellata) (4 sp.) | | |
| Orden Prosothecata | <i>Enchytraeus</i> sp. | Z83750 |
| Orden Opisthopora | <i>Lumbricus rubellus</i> | Z83753 |
| Orden Arhynchobdellida | <i>Hirudo medicinalis</i> | Z83752 |
| Orden Rhynchobdellida | <i>Glossiphonia</i> sp. | Z83751 |
| Mollusca (10 sp.) | | |
| Clase Caudoveata | <i>Scutopus ventrolineatus</i> | X91977 |
| Clase Polyplacophora | <i>Lepidopleurus cajetanus</i> | AF120502* |
| | <i>Acanthochitona</i> sp. | AF120503* |
| Clase Gastropoda | <i>Diodora graeca</i> | AF120513* |
| | <i>Littorina obtusata</i> | X94274 |
| | <i>Siphonaria pectinata</i> | X94274 |
| Clase Scaphopoda | <i>Dentalium pilsbryi</i> | AF120522* |
| | <i>Rhabdus relictus</i> | AF120523* |
| Clase Bivalvia | <i>Solemya velum</i> | AF120524* |
| | <i>Yoldia limatula</i> | AF120528* |
| Sipuncula (2 sp.) | | |
| Clase Phascolosomida | <i>Aspidosiphon misakiensis</i> | AF119090* |
| Clase Sipunculida | <i>Themiste alutacea</i> | AF119075* |
| Echiura (2 sp.) | | |
| Orden Echiuroinea | <i>Ochetostoma erythrogrammon</i> | X79875 |
| Orden Xenopneusta | <i>Urechis</i> sp. | AF119076* |
| Pogonophora (2 sp.) | | |
| Clase Perviatra | <i>Siboglinum fiordicum</i> | X79876 |
| Clase Obturata | <i>Ridgeia piscesae</i> | X79877 |
| Nemertea (3 sp.) | | |
| Clase Anopla | <i>Lineus</i> sp. | X79878 |
| Clase Enopla | <i>Prostoma eilhardi</i> | U29494* |
| | <i>Amphiporus</i> sp. | AF119077* |
| Brachiopoda (4 sp.) | | |
| Clase Inarticulata | <i>Glottidia pyramidata</i> | U12647 |
| | <i>Lingula lingua</i> | X81631 |
| Clase Articulata | <i>Terebratalia transversa</i> | U12650 |
| | <i>Argyrotheca cordata</i> | AF119078* |
| Phoronida (2 sp.) | | |
| | <i>Phoronis architecta</i> | U36271 |
| | <i>Phoronis australis</i> | AF119079* |
| Bryozoa (4 sp.) | | |
| Clase Stenolaemata | <i>Lichenopora</i> sp. | AF119080* |
| Clase Gymnolaemata | <i>Membranipora</i> sp. | AF119081* |
| | <i>Caberea boryi</i> | AF119082* |
| Clase Phylactolaemata | <i>Plumatella repens</i> | U12649 |
| Entoprocta (2 sp.) | | |
| | <i>Pedicellina cernua</i> | U36273 |
| | <i>Barentsia hildegardae</i> | AJ001734 |
| Cycliophora (1 sp.) | | |
| | <i>Symbion pandora</i> | Y14811 |
| Rotifera (2 sp.) | | |
| Clase Bdelloidea | <i>Philodina acuticornis</i> | U41281 |
| Clase Monogononta | <i>Brachionus plicatilis</i> | U29235 |

Tabla 1 (continuación)

Muestreo taxonómico utilizado en los análisis moleculares y códigos de acceso al GenBank.
El asterisco indica los taxones secuenciados por el autor.

| | | | | | |
|---------------------------------|--------------------------------------|-----------|------------------------------|-----------------------------------|-----------|
| Acanthocephala (4 sp.) | | | Tardigrada (2 sp.) | | |
| Clase | | | Clase Eutardigrada | <i>Macrobotus hufelandi</i> | X81442* |
| Palaeoacanthocephala | <i>Plagiorhynchus cylindraceus</i> | AF001839 | | <i>Milnesium tardigradum</i> | U49909 |
| | <i>Echinorhynchus gadi</i> | U88335 | Arthropoda (22 sp.) | | |
| Clase | | | Clase Pycnogonida | <i>Colossendeis</i> sp. | AF005440* |
| Archiacanthocephala | <i>Moniliformis moniliformis</i> | Z19562 | | <i>Callipallene</i> sp. | AF005439* |
| Clase Eoacanthocephala | <i>Neoechinorhynchus pseudemydis</i> | U41400 | Clase Xiphosura | <i>Limulus polyphemus</i> | U91490* |
| Gastrotricha (2 sp.) | | | Clase Arachnida | <i>Belisarius xambeui</i> | U91491* |
| Orden Chaetonotida | <i>Chaetonotus</i> sp. | AJ001735 | | <i>Liphistius bicoloripes</i> | AF007104* |
| | <i>Lepidodermella squammata</i> | U29198 | Clase Chilopoda | <i>Thereuopoda clunifera</i> | AF119088* |
| Gnathostomulida (3 sp.) | | | | <i>Lithobius variegatus</i> | AF000773* |
| Orden Filospermoidea | <i>Haplognathia</i> sp. | AF119084* | Clase Diplopoda | <i>Polydesmus coriaceus</i> | AF005449* |
| Orden Bursovaginoida | <i>Gnathostomula paradoxa</i> | Z81325 | | <i>Cylindroiulus punctatus</i> | AF005448* |
| | <i>Gnathostomula</i> sp. | AF119083* | Clase Branchiopoda | <i>Branchinecta packardi</i> | L26512 |
| Nemertodermatida (2 sp.) | | | | <i>Lepidurus packardi</i> | |
| | <i>Meara stichopi</i> | AF119085* | Clase Maxillopoda | <i>Argulus nobilis</i> | M27187 |
| | <i>Nemertinoidea elongatus</i> | U70084 | | <i>Ulophysema oeresundense</i> | L26521 |
| Platyhelminthes | | | | <i>Calanus pacificus</i> | L81939 |
| – Catenuílida (2 sp.) | <i>Stenostomum leucops</i> | U70085 | Clase Malacostraca | <i>Porocephalus crotali</i> | M29931 |
| | <i>Stenostomum</i> sp. | U95947 | | <i>Nebalia</i> sp. | L81945 |
| Platyhelminthes | | | Clase Hexapoda | <i>Squilla empusa</i> | L81946 |
| – Acoela (2 sp.) | | | | <i>Podura aquatica</i> | AF005452* |
| | <i>Convoluta naikaiensis</i> | D83381 | | <i>Ditta littoralis</i> | AF005457* |
| | <i>Amphiscolops</i> sp. | D85099 | | <i>Lepisma</i> sp. | AF005458* |
| Platyhelminthes | | | | <i>Aeschna cyanea</i> | X89481 |
| – Rhabditophora (15 sp.) | | | | <i>Ephemera</i> sp. | X89489 |
| Orden Macrostromida | <i>Macrostromum tuba</i> | U70081 | Enteropneusta (2 sp.) | | |
| | <i>Microstromum lineare</i> | U70083 | | <i>Glossobalanus minutus</i> | AF119089* |
| Orden Polycladida | <i>Discocelis tigrina</i> | U70079 | | <i>Saccoglossus kowalevskii</i> | L28054 |
| | <i>Planocera multitentaculata</i> | D17562 | Echinodermata | | |
| Orden Lecithoepitheliata | <i>Geocentrophora</i> sp. | U70080 | (10 sp.) | | |
| Orden Proseriata | <i>Archiloa rivularis</i> | U70077 | Clase Crinoidea | <i>Antedon serrata</i> | D14357 |
| | <i>Monocelis lineata</i> | U45961 | | <i>Endoxocrinus parrae</i> | Z80951 |
| Orden Rhabdocoela | <i>Bothromesostoma</i> sp. | D85098 | Clase Holothuroidea | <i>Stichopus japonicus</i> | D14364 |
| | <i>Mesocastrada</i> sp. | U70082 | | <i>Psychropotes longicauda</i> | Z80956 |
| Orden Prolecitophora | <i>Urostoma</i> sp. | U70086 | Clase Echinoidea | <i>Echinus esculentus</i> | Z37125 |
| Orden Tricladida | <i>Dendrocoelum lacteum</i> | M58346 | | <i>Brissoopsis lyrifera</i> | Z37119 |
| | <i>Ectoplana limuli</i> | D85088 | Clase Ophiuroidea | <i>Amphipholis squamata</i> | X97156 |
| Cestoda | <i>Echinococcus granulosus</i> | U27015 | | <i>Astrobrachion constrictum</i> | Z80948 |
| Trematoda | <i>Schistosoma mansoni</i> | M62652 | Clase Asteroidea | <i>Asterias amurensis</i> | D14358 |
| | <i>Lobatostoma manteri</i> | L16911 | | <i>Astropecten irregularis</i> | Z80949 |
| Priapulida (2 sp.) | | | Urochordata (3 sp.) | | |
| | <i>Priapulius caudatus</i> | D85088 | Clase Appendicularia | <i>Oikopleura</i> sp. | D14360 |
| | <i>Tubiluchus corallicola</i> | AF119086* | Clase Thaliacea | <i>Thalia democratica</i> | D14366 |
| | | | Clase Ascidiacea | <i>Styela plicata</i> | M97577 |
| Kinorhyncha (1 sp.) | | | Cephalochordata | | |
| Orden Homalorhagida | <i>Pycnophyes kielensis</i> | U67997 | (1 sp.) | | |
| | | | | <i>Branchiostoma floridae</i> | M97571 |
| Nematomorpha (2 sp.) | | | Craniata (11 sp.) | | |
| Clase Gordioida | <i>Chordotes morgani</i> | AF036639 | Cephalaspidomorphi | <i>Lampetra aepyptera</i> | M97573 |
| | <i>Gordius aquaticus</i> | X80233 | Chondrichthyes | <i>Echinorhinus cookei</i> | M91181 |
| Nematoda (8 sp.) | | | Actinopterygii | <i>Amia calva</i> | X98836 |
| Orden Araeolaimida | <i>Plectus aquatilis</i> | AF036602 | | <i>Polyodon spathula</i> | X98838 |
| Orden Desmodorida | <i>Desmodora ovigera</i> | Y16913 | | <i>Clupea harengus</i> | X98845 |
| Orden Chromadorida | <i>Metachromadora</i> sp. | AF036595 | Coelacanthiformes | <i>Latimeria chalumnae</i> | L11288 |
| Orden Enoplida | <i>Enoplus brevis</i> | U88336 | Amphibia | <i>Xenopus laevis</i> | X04025 |
| Orden Trichocephalida | <i>Trichinella spiralis</i> | U60231 | Testudines | <i>Trachemys scripta</i> | M59398 |
| Orden Rhabditida | <i>Dolichorhabditis</i> sp. | AF036591 | Lepidosauria | <i>Heterodon platyrhinos</i> | M59392 |
| Orden Tylenchida | <i>Globodera pallida</i> | AF036592 | Archosauria | <i>Alligator mississippiensis</i> | M59383 |
| Orden Spirurida | <i>Diofilaria immitis</i> | AF036638 | Eutheria | <i>Rattus norvegicus</i> | X01117 |
| Onychophora (2 sp.) | | | Chaetognatha | | |
| | <i>Peripatopsis capensis</i> | AF119087* | (2 sp.) | | |
| | <i>Euperipatoides leukarti</i> | U49910 | Orden Phragmophora | <i>Paraspadella gotoi</i> | D14362 |
| | | | Orden Aphanophora | <i>Sagitta elegans</i> | Z19551 |

calcula el número de transformaciones entre secuencias de ADN (eventos evolutivos) requerido por una topología filogenética determinada sin la utilización de alineamientos múltiples. Los resultados de este proceso son directamente compatibles con las longitudes de los árboles basadas en análisis de parsimonia. El método es además más eficiente (en términos de utilización de CPU), y genera explicaciones más congruentes que los alineamientos múltiples cuando se utiliza la congruencia entre las distintas particiones como criterio para juzgar a los métodos (Wheeler y Hayashi, 1998).

En los análisis se han utilizado diferentes valores para las transformaciones de caracteres, para ver como las diferentes asunciones afectan a las conclusiones filogenéticas. El objeto de este tipo de análisis es evitar basar conclusiones en resultados poco soportados por los datos, es decir, resultados que varían drásticamente al alterar los parámetros del análisis (Wheeler, 1995). Así se ha examinado un espacio de parámetros de dos variables (gap/cambio y transversiones/transiciones), con un total de 6 combinaciones de parámetros (gap = 1, 2; tv/ts = 1, 2, 4).

Las secuencias de ADN se han dividido en 47 fragmentos homólogos de acuerdo con los modelos de estructura secundaria de la molécula. Así la primera hipótesis de homología entre las secuencias de ADN no es una correspondencia de base a base (como en los alineamientos múltiples) sino en cadenas de ADN que constituyen un motivo particular de la estructura secundaria de la molécula. Cinco regiones hipervariables (regiones E10-1, E10-2, E21-1 a 2, 41 y 47; de acuerdo con el modelo de estructura secundaria de Hendriks et al., 1988) han sido excluidas de los análisis.

La matriz morfológica se ha analizado mediante el programa de ordenador NONA v. 1.9 (Goloboff, 1998).

Los datos morfológicos y moleculares han sido combinados directamente, definiendo el peso de la matriz morfológica de acuerdo con el peso de los gaps. Para cada uno de los nueve parámetros examinados, se ha calculado una medida de congruencia, el ILD de Mickevich y Farris (1981). Esta medida nos indica la homoplasia extra generada al combinar las dos particiones originales (morfológica y molecular). El parámetro que minimiza esta función (el que optimiza la congruencia entre las particiones) es el parámetro que se elige como la hipótesis mejor corroborada por los datos (Tabla 2). En este caso, la hipótesis mejor corroborada (de acuerdo con el criterio elegido) es aquella para la cual todos los parámetros reciben la misma ponderación (gaps = tv/ts = morfológica). El soporte de los nodos se ha medido utilizando el índice de soporte de Bremer (Bremer, 1988, 1994).

Las topologías han sido enraizadas en la rama que separa a los animales deuteróstomos de los protóstomos de acuerdo con diferentes análisis morfológicos (Nielsen et al., 1996; Zrzavý et al., 1998) y moleculares (Giribet y Ribera, 1998; Littlewood et al., 1998), aunque podría haber otras posibilidades. Sin embargo, ningún enraizamiento alternativo afectaría a la posición relativa entre artrópodos—pseudo-celomados—anélidos. Los metazoos diploblásticos han sido excluidos de los análisis debido a un posible problema de enraizamiento de los animales triploblásticos (véase Zrzavý et al., 1998; Giribet y Wheeler, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de parsimonia de la matriz morfológica ha resultado en 16 árboles de 455 pasos (CI = 0.466; RI = 0.701; RC = 0.327). El consenso estricto de estos 16 árboles se muestra en la figura 3. En este árbol los Artrópodos forman parte de un clado no resuelto que contiene también a onicóforos y tardígra-

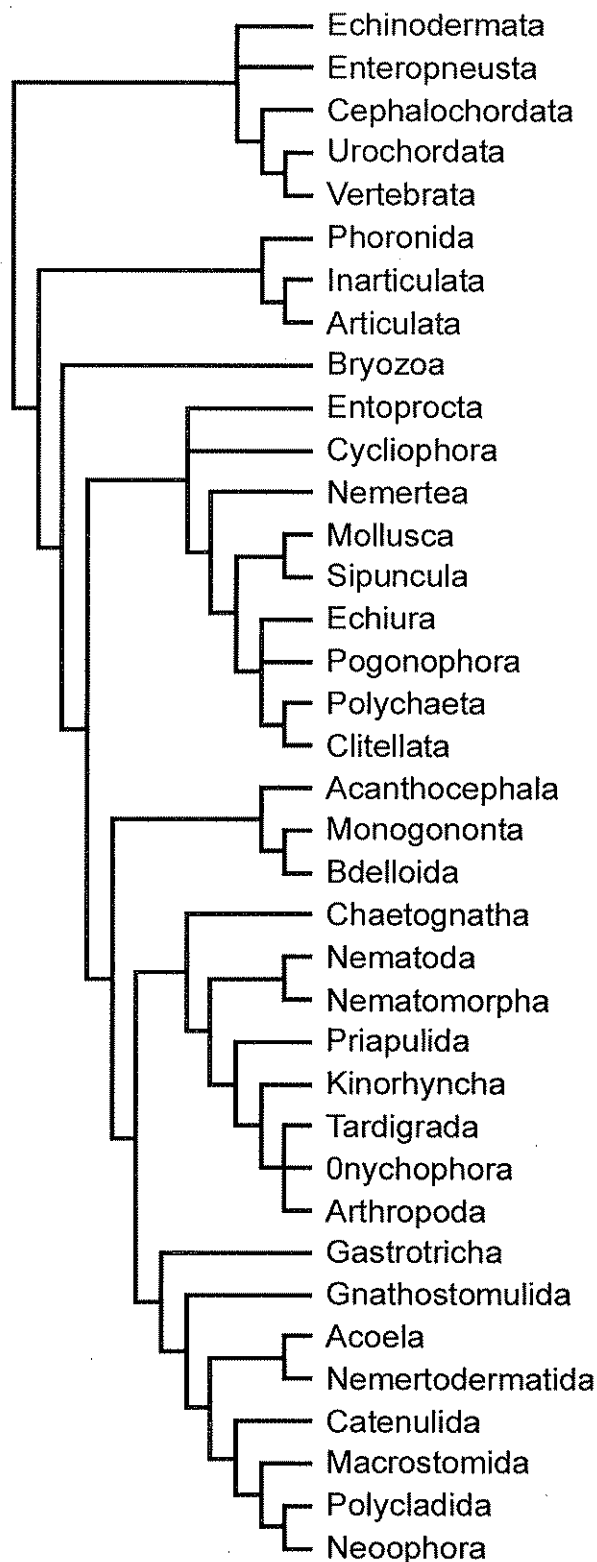


Fig. 3.- Consenso estricto de 16 árboles de 455 pasos (CI = 0.466; RI = 0.701) basado en una matriz modificada de los datos morfológicos de Zrzavý et al. (1998). (CI: índice de consistencia; RI: índice de retención).

dos. Este clado forma a su vez parte de un clado que incluye a Chaetognatha como grupo más basal: (Chaetognatha ((Nematoda + Nematomorpha) (Priapulida (Kinorhyncha (Tardigrada + Onychophora + Arthropoda))))). Este árbol es consistente por tanto con la hipótesis de Ecdysozoa (*sensu* Aguinaldo et al., 1997), y Chaetognatha sería grupo hermano de Ecdysozoa.

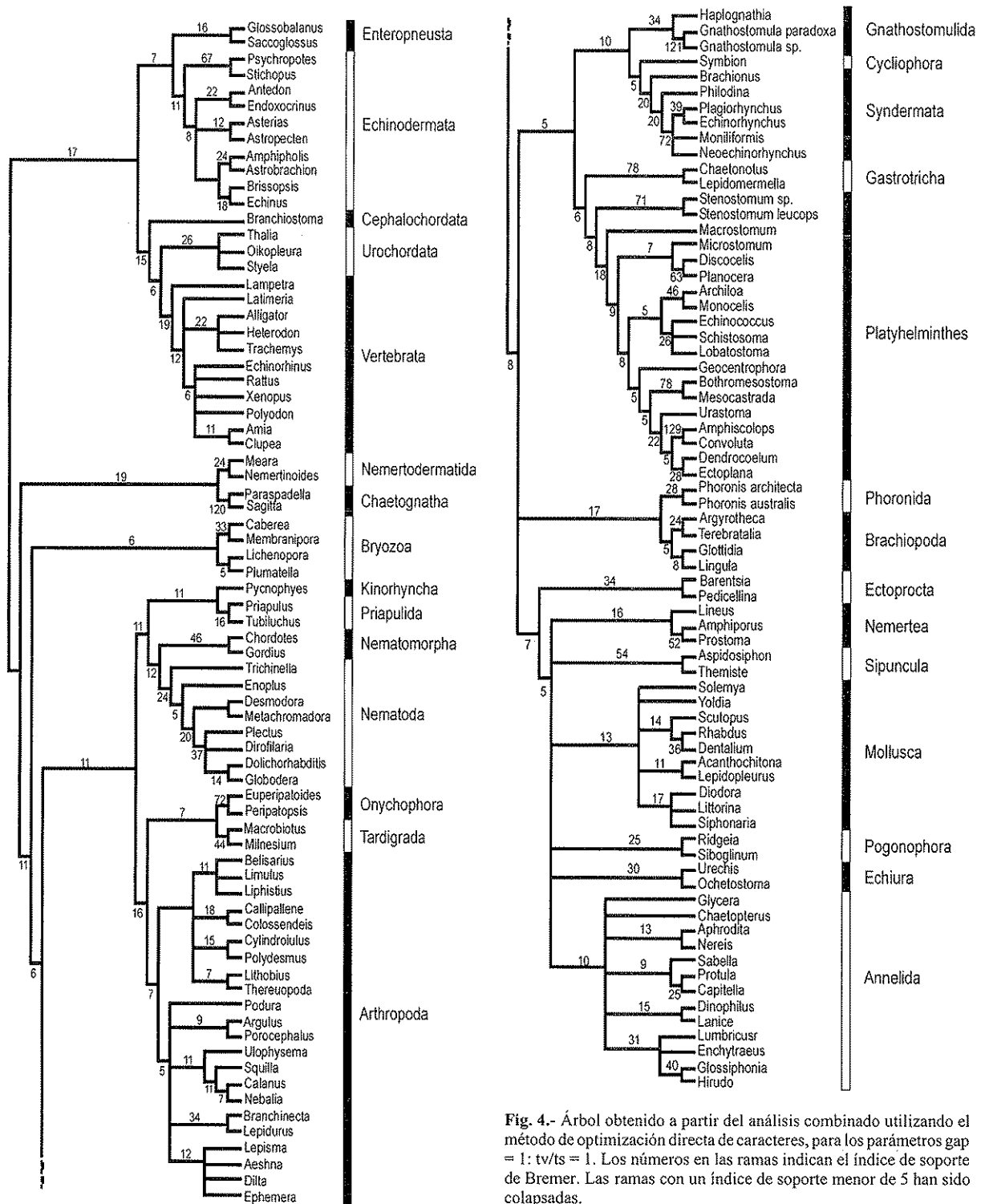


Fig. 4.- Árbol obtenido a partir del análisis combinado utilizando el método de optimización directa de caracteres, para los parámetros $gap = 1$; $tv/ts = 1$. Los números en las ramas indican el índice de soporte de Bremer. Las ramas con un índice de soporte menor de 5 han sido colapsadas.

El árbol molecular ($gap = tv/ts$; parámetros que maximizan la congruencia en el análisis conjunto de datos morfológicos y moleculares) muestra cuatro grupos principales: deuterostomos, ecdysozoos, platyzoos y trochozoos. Sin embargo *Capitella* (Annelida, Polychaeta); los bryozoos *Caberea* y *Membranipora*; los onicóforos *Euperipatoides* y *Peripatopsis*; los quetognatos *Paraspadella* y *Sagitta*; y el nemertodermátido (platelminto) *Meara*, aparecen en la base de los protóstomos, o en la base de los ecdysozoos. Estos taxones presentan secuencias del gen ARNr 18S con inserciones importantes que parecen afectar al estudio filogenético.

El árbol que maximiza la función de congruencia al combinar las dos matrices de datos (molecular y morfológica) corresponde a los parámetros ($gap = tv/ts = morfología$; *equal weighting = ponderación igual*) (Tabla 2; Figs. 4 y 5). Se observan cuatro grupos bien diferenciados: Deuterostomia, Ecdysozoa, Trochozoa y Platyzoa. Los taxones Chaetognatha, Nemertodermatida y Bryozoa no pueden asignarse a ninguno de los cuatro grupos mencionados anteriormente en el árbol que maximiza la congruencia (la mejor hipótesis de acuerdo con nuestro criterio de optimización), debido posiblemente a sus secuencias un tanto inusuales.

Tabla 2

Número de pasos para los datos moleculares (18S), morfología, y 'total evidence' (totev) para valores de gap = 1, 2; y valores de tv/ts = 1, 2, 4. Los parámetros que minimizan el ILD (los que maximizan la congruencia entre la matriz molecular y morfológica) son gap = 1; tv/ts = 1.

| gap | tv/ts | 18S | morfología | totev | ILD |
|-----|-------|-------|------------|-------|--------|
| 1 | 1 | 11336 | 2185 | 13628 | 0.0079 |
| 1 | 2 | 16892 | 4370 | 21563 | 0.0140 |
| 1 | 4 | 27848 | 8740 | 36952 | 0.0099 |
| 2 | 1 | 12799 | 4370 | 17329 | 0.0092 |
| 2 | 2 | 19691 | 8740 | 28769 | 0.0117 |
| 2 | 4 | 33013 | 17480 | 51312 | 0.0160 |

Los ecdysozoos aparecen como grupo hermano del resto de protóstomos (Spiralia), soportados con un valor de soporte de Bremer de 11. A su vez, los ecdysozoos se dividen en dos clados, uno denominado Panarthropoda conteniendo Arthropoda, Tardigrada y Onychophora; y otro clado denominado Introverta conteniendo a los filos Priapulida, Kinorhyncha, Nematoda y Nematomorpha (y posiblemente al filo Loricifera, no incluido en los análisis). La estructura de Introverta es como la presentada por Nielsen (1995) y Nielsen et al. (1996). Sin embargo, dentro de Panarthropoda, la hipótesis aquí obtenida (Onychophora y Tardigrada como grupos hermanos), aunque consistente con las hipótesis de Simonetta y Delle Cave (1980) y Waggoner (1996), difiere de las hipótesis planteadas por la mayoría de autores (Onychophora (Tardigrada + Arthropoda)) basados en datos morfológicos (p.ej. Nielsen, 1995; Nielsen et al., 1996) o moleculares + morfológicos (p.ej. Wheeler, 1998a, 1998b; Zrzavý et al., 1998).

Algunos autores han criticado la utilización del gen ribosómico 18S para la inferencia de filogenia de alto nivel basándose en el bajo soporte estadístico de ciertos nodos (p. ej. Halanych, 1998; Lipscomb et al., 1998). Esta realidad, sin embargo puede estar causada por ambigüedades en las alineaciones, deficiencia de los métodos utilizados, o un diseño del muestreo taxonómico deficiente para el problema a tratar. Aquí he intentado eliminar el problema de las alineaciones mediante la utilización del método de optimización directa de caracteres (Wheeler, 1996), evitando así situaciones como las de Lipscomb et al. (1998) en las que al utilizar taxones demasiado alejados filogenéticamente, obtienen alineaciones con 4037 posiciones para un gen que mide aproximadamente 1800 bases. El diseño taxonómico adoptado en el presente trabajo intenta representar la máxima diversidad en todos los filos incluidos, siempre que ha sido posible, por lo que se ha hecho un esfuerzo especial en secuenciar numerosos taxones de los que no había datos disponibles. En este sentido, este estudio es superior a otros estudios recientes basados en datos disponibles en el GenBank (p. ej. Halanych, 1998; Zrzavý et al. 1998). De este modo, se esperaba obtener resultados más consistentes. La importancia de un diseño taxonómico adecuado ha sido recientemente demostrada empíricamente (Giribet y Carranza, 1999), por lo que es un aspecto crucial obtener secuencias de los grupos poco representados.

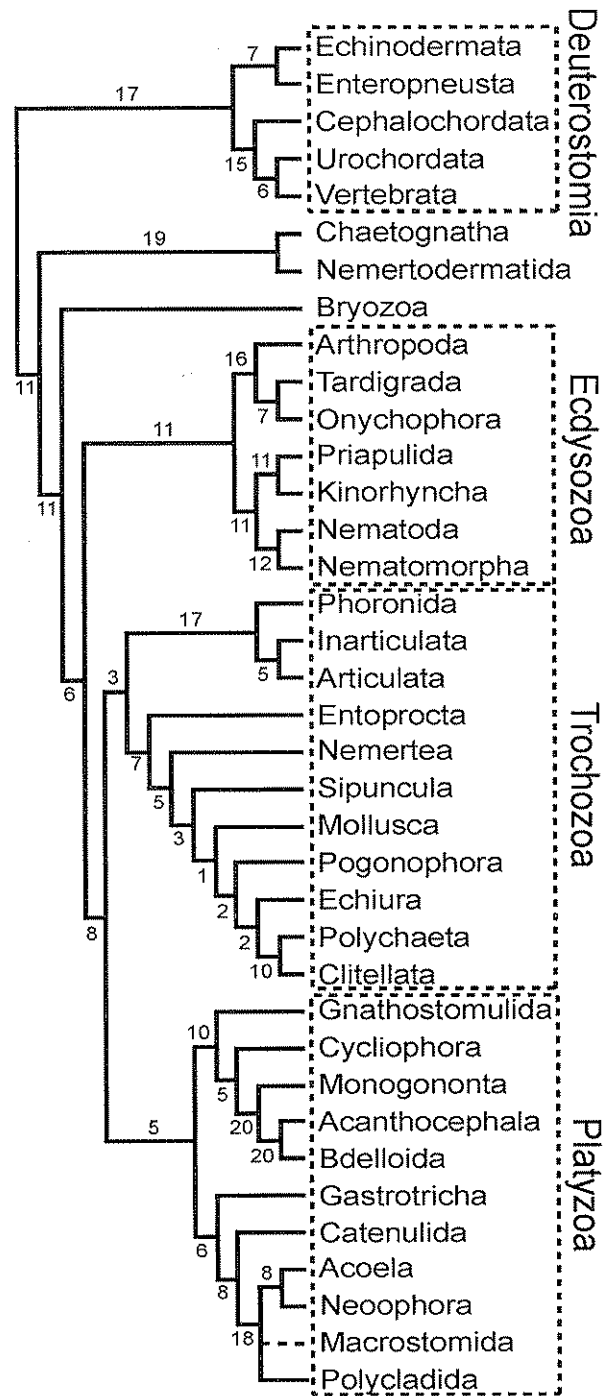


Fig. 5.- Árbol esquemático del análisis conjunto de los datos morfológicos y moleculares utilizando el método de optimización directa de caracteres, para los parámetros gap = 1; tv/ts = 1. La línea punteada en Macrostomida indica que el grupo no es monofilético. Los números en las ramas indican el índice de soporte de Bremer.

CONCLUSIONES

Los deuteróstomos agruparían a los filos Echinodermata, Enteropneusta (Pterobranquia no incluidos en los análisis), Cephalochordata, Urochordata y Vertebrata, pero excluirían a los filos de 'loforados'. Los protóstomos se dividirían así en dos clados: Ecdysozoa y Spiralia, este último conteniendo Trochozoa y Platyzoa.

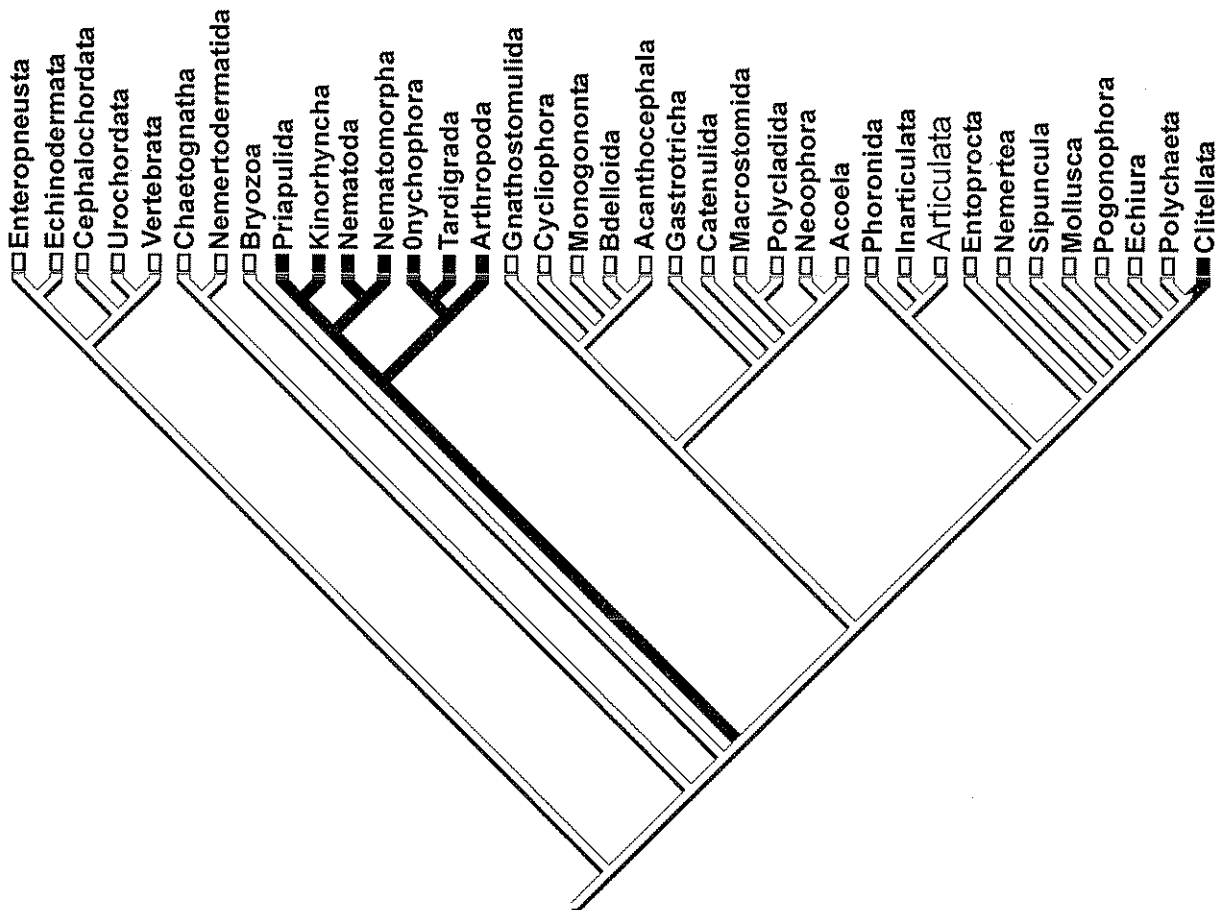


Fig. 6.- Árbol mostrando la evolución del carácter 'presencia de muda cuticular'.

Los ecdysozoos (*sensu* Aguinaldo et al., 1997) constituirían un grupo de animales protóstomos con una cutícula que mudan al menos una vez durante su ciclo vital; sin una superficie ciliada (ni larva ciliada); pseudocelomados o con celoma presente en algún estadio embrionario; y con un tipo de desarrollo embrionario asimétrico. Los ecdysozoos se pueden dividir en dos clados: Introverta (*sensu* Nielsen, 1995: Nematoda, Nematomorpha, Priapula, Kinorhyncha y Loricifera) y Panarthropoda (Onychophora, Tardigrada y Arthropoda). Este clado está soportado por los análisis de 'total evidence' aquí presentados, así como por los análisis del ARNr 18S y de la morfología independientemente. Resultados similares, aunque con algunas variaciones respecto a Chaetognatha y Gnathostomulida han sido propuestos por Aguinaldo et al. (1997), Giribet y Ribera (1998), Eernisse (1998), Littlewood et al., (1998) y Zrzavý et al. (1998) (véase también Aguinaldo y Lake, 1998; Garey y Schmidt-Rhaesa, 1998; Schmidt-Rhaesa et al., 1998).

Los dos clados de Spiralia (Trochozoa y Platyzoa) presentan un desarrollo embrionario de tipo espiral. Los trochozoos constituirían un grupo de 'gusanos' protóstomos celomados (exceptuando a los entoproctos, que son acelomados) con una larva de tipo trocoforiano. El grupo incluiría a los filos Phoronida y Brachiopoda como miembros más basales, y Entoprocta, Nemertea, Sipuncula, Mollusca, Pogonophora, Echiura y Annelida. Finalmente los platyzoos (*sensu* Cavalier-Smith, 1998) constituirían un grupo de 'gusanos' protóstomos ciliados, no segmentados, acelomados (o pseudocelomados) que carecen de sistema vascular; con o sin ano. El grupo incluiría a los filos Gnathostomulida, Cylclophora, Syndermata

(Rotifera—*Seison*—Acanthocephala), Gastrotricha y Platyhelminthes. En la mejor hipótesis, los Platyhelminthes incluyen a los grupos Catenulida, Acoela y Rhabditophora, pero no a Nemertodermatida.

La redefinición de los grandes grupos de metazoos requiere de una serie de caracteres diagnósticos para dichos grupos. En el caso de Ecdysozoa, hay una serie de posibles sinapomorfias resultantes del presente análisis:

- Ausencia de epidermis ciliada. Este estado está presente en todos los filos de Ecdysozoa, así como en Chaetognatha y en Acanthocephala (Nielsen, 1995). De acuerdo con la hipótesis sugerida por los datos, este carácter ha evolucionado independientemente tres veces, aunque de estar los quetognatos relacionados con los ecdysozoos (de acuerdo con Eernisse, 1998; Littlewood et al., 1998; Zrzavý et al., 1998) hubiera evolucionado únicamente dos veces.
- Cutícula en dos capas. Este estado está presente en Ecdysozoa, Gastrotricha, y en diversos filos de Trochozoa, por lo que hubiera evolucionado independientemente tres veces.
- Presencia de muda cuticular (Fig. 6). Este estado de carácter se ha utilizado para dar nombre al grupo Ecdysozoa (Aguinaldo et al., 1997). Todos los filos de Ecdysozoa presentan muda cuticular en algún estadio de su ciclo vital, aunque la composición bioquímica de la cutícula no es la misma en todos los grupos (Nielsen, 1995). La muda cuticular debe estar controlada por hormonas de algún tipo (¿ecdisona?), aunque sólo se conocen componentes de ese tipo en artrópodos, onicóforos y nematodos. Además de los ecdysozoos, se observa muda cuticular en los anélidos clitelados.

- d) Células intestinales no ciliadas. Este estado está presente en Ecdysozoa y Gnathostomulida (desconocido en Nematomorpha). En nuestro análisis, los gnathostomulidos se agrupan con otros protóstomos acelomados, y por tanto este estado de carácter habría evolucionado independientemente dos veces. Sin embargo, Littlewood et al. (1998) postularon la hipótesis de Gnathostomulida como integrante de Ecdysozoa.

Según los resultados aquí obtenidos, los Artrópodos (y Tardígrados y Onicóforos) estarían más estrechamente relacionados con los pseudocelomados que mudan su cutícula (=Introverta) que con los Anélidos—Moluscos (y otros gusanos protóstomos) (Fig. 7). Este hecho, planteado inicialmente por Eernisse et al. (1992) basándose en datos morfológicos, y posteriormente por Aguinaldo et al. (1997) basándose en datos moleculares parece tomar peso en la literatura más reciente sobre filogenia de metazoos.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de Ward Wheeler. Antonio Melic e Ignacio Ribera contribuyeron a la mejora del manuscrito original. Salvador Carranza, Daniel Distel, Jerry Harasewych, Steven Haddock, Cruz Palacín, Martín Polz, Wolfgang Sterrer y Xavier Turon ayudaron en la obtención de especímenes, de muestras de ADN, o de secuencias para el trabajo molecular. Este trabajo se ha realizado gracias a una beca postdoctoral para investigación (Lerner Gray Research Fellowship) del American Museum of Natural History (New York).

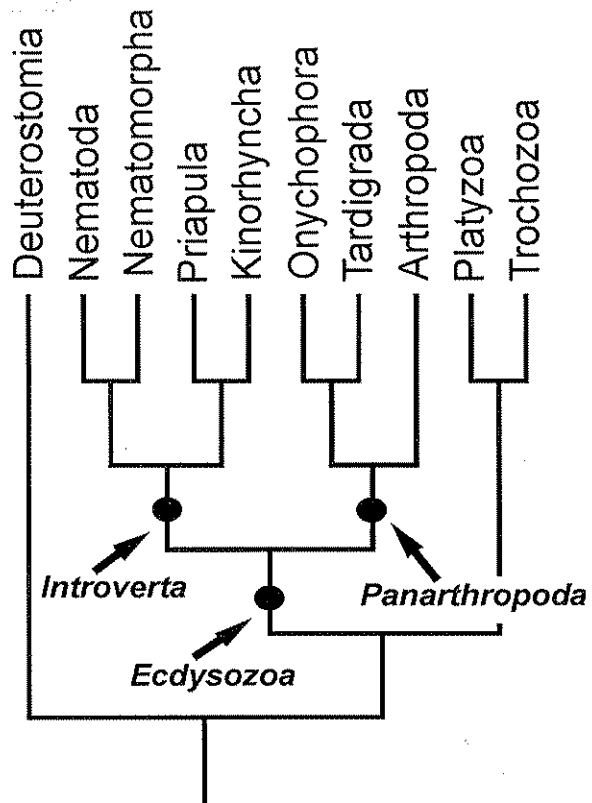


Fig. 7.- Hipótesis final sobre la relación de los artrópodos y grupos afines basado en el análisis conjunto de datos moleculares y morfológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- ABELE, L.G., KIM, W. & FELGENHAUER, B.E., 1989. Molecular evidence for inclusion of the phylum Pentastomida in the Crustacea. *Mol. Biol. Evol.*, **6**: 685-691.
- ADOUTTE, A. & PHILIPPE, H., 1993. The major lines of metazoan evolution: summary of traditional evidence and lessons from ribosomal RNA sequence analysis. En: Y. PICHON (ed.) *Comparative molecular neurobiology*. Birkhäuser Verlag, Basel: 1-30.
- AGUINALDO, A. M. A. & LAKE, J. A., 1998. Evolution of the multicellular animals. *Amer. Zool.*, **38**: 878-887.
- AGUINALDO, A. M. A., TURBEVILLE, J. M., LINDFORD, L. S., RIVERA, M. C., GAREY, J. R., RAFF, R. A. & LAKE, J. A., 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature*, **387**: 489-493.
- ANDERSON, D. T., 1973. *Embryology and phylogeny in annelids and arthropods*. Pergamon, Oxford.
- ANDERSON, D. T., 1979. Embryos, fate maps, and the phylogeny of arthropods. En: A. P. GUPTA (ed.) *Arthropod phylogeny*. Van Nostrand, New York: 59-106.
- ARNHEIM, N., 1983. Concerted evolution of multi-gene families. En: M. NEI & R. K. KOEHN (eds.) *Evolution of genes and proteins*. Sinauer Associates, Sunderland: 38-61.
- BACKELJAU, T., WINNENPENNINCKX, B. & DE BRUYN, L., 1993. Cladistic analysis of metazoan relationships: A reappraisal. *Cladistics*, **9**: 167-181.
- BALAVOINE, G., 1998. Are Platyhelminthes coelomates without a coelom? An argument based on the evolution of *Hox* genes. *Amer. Zool.*, **38**: 843-858.
- BALLARD, J. W. O., BALLARD, O., OLSEN, G. J., FAITH, D. P., ODGERS, W. A., ROWELL, D. M. & ATKINSON, P., 1992. Evidence from 12S ribosomal RNA sequences that onychophorans are modified arthropods. *Science*, **258**: 1345-1348.
- BREMER, K., 1988. The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution*, **42**: 795-803.
- BREMER, K., 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics*, **10**: 295-304.
- BROWER, A. V. Z., DESALLE, R. & VOGLER, A. P., 1996. Gene trees, species trees, and systematics: a cladistic perspective. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **27**: 423-450.
- BRUSCA, R. C. & BRUSCA, G. J., 1990. *Invertebrates*. Sinauer Associates, Sunderland, 922 pp.
- BUDD, G., 1993. A Cambrian gilled lobopod from Greenland. *Nature*, **364**: 709-711.
- CAVALIER-SMITH, T., 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev.*, **73**: 203-266.
- CAVALIER-SMITH, T., ALLSOPP, M. T. E. P., CHAO, E.E., BOURY ESNAULT, N. & VACELET, J., 1996. Sponge phylogeny, animal monophyly, and the origin of the nervous system: 18S rRNA evidence. *Can. J. Zool.*, **74**: 2031-2045.
- COHEN, E. S. & DOVER, G. A., 1983. Unequal exchanges and the coevolution of X and Y rDNA arrays in *Drosophila melanogaster*. *Cell*, **33**: 849-855.
- CUVIER, G., 1812. Sur un nouveau rapprochement à établir entre les classes qui composent le Règne Animal. *Ann. Mus. Hist.*, **19**: 73-84.
- DARWIN, C.R., 1859. *On the origin of species by means of Natural Selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. John Murray, London.
- DARWIN, C. R. & WALLACE, A.R., 1858. On the tendency of species to form varieties; and on the perpetuation of varieties and species by natural means of selection. *J. Proc. Linnean Soc. (Zool.)*, **3**: 46-62 y *Bol. SEA* (1999), **26**: 17-26. [Este volumen]
- DEWEL, R. A. & CLARK, W. H., 1973a. Studies on the tardigrades. II. Fine structure of the pharynx of *Milnesium tardigradum* Doyère. *Tissue and Cell*, **5**: 147-159.
- DEWEL, R. A. & CLARK, W. H., 1973b. Studies on the tardigrades. III. Fine structure of the esophagus of *Milnesium tardigradum* Doyère. *Tissue and Cell*, **5**: 161-169.
- DEWEL, R. A. & DEWEL, W. C., 1996. The brain of *Echiniscus viridissimus* Peterfi, 1956 (Heterotardigrada): A key to understanding the phylogenetic position of tardigrades and the evolution of the arthropod head. *Zool. J. Linnean Soc.*, **116**: 35-49.
- DOVER, G. A., 1982. Molecular drive: a cohesive model of species evolution. *Nature*, **299**: 111-117.
- DZIK, J. & KRUMBIEGEL, G., 1989. The oldest 'onychophora' *Xenusion*: a link connecting phyla? *Lethaia*, **22**: 169-181.
- EDGEcombe, G. D., 1998. *Arthropod fossils and phylogeny*. Columbia University Press, New York.
- EERNISSE, D. J., 1998. Arthropod and annelid relationships re-examined. En: R.A. FORTEY & R.H. THOMAS (eds.) *Arthropod Relationships*. Chapman & Hall, London: 43-56.
- EERNISSE, D. J., ALBERT, J.S. & ANDERSON, F.E., 1992. Annelida and Arthropoda are not sister taxa: A phylogenetic analysis of spiralian metazoan morphology. *Syst. Biol.*, **41**: 305-330.
- FARRIS, J. S., 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. En: N.I. PLATNICK & V.A. FUNK (eds.) *Advances in Cladistics*. Columbia University Press, New York: 277-302.
- FIELD, K. G., OLSEN, G. J., LANE, D. J., GIOVANNONI, S. J., GHISELIN, M. T., RAFF, E. C., PACE, N. R. & RAFF, R. A., 1988. Molecular phylogeny of the animal kingdom. *Science*, **239**: 748-753.
- FITCH, D. H., BUGAJ GAWEDA, B. & EMMONS, S. W., 1995. 18S ribosomal RNA gene phylogeny for some Rhabditidae related to *Caenorhabditis*. *Mol. Biol. Evol.*, **12**: 346-358.
- FORTEY, R. A., BRIGGS, D.E.G. & WILLS, M. A., 1996. The Cambrian evolutionary 'explosion': Decoupling cladogenesis from morphological disparity. *Biol. J. Linnean Soc.*, **57**: 13-33.
- FORTEY, R. A., BRIGGS, D. E. G. & WILLS, M. A., 1997. The Cambrian evolutionary 'explosion' recalibrated. *BioEssays*, **19**: 429-434.
- FORTEY, R. A. & THOMAS, R. H., 1993. The case of the velvet worm. *Nature*, **361**: 205-206.
- FORTEY, R. A. & THOMAS, R. H., 1998. *Arthropod Relationships*. Chapman & Hall, London, 383 pp.
- FRIEDRICH, M. & TAUTZ, D., 1995. Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods. *Nature*, **376**: 165-167.
- GAREY, J.R., KROTEC, M., NELSON, D.R. & BROOKS, J., 1996. Molecular analysis supports a tardigrade-arthropod association. *Invert. Biol.*, **115**: 79-88.
- GAREY, J. R. & SCHMIDT-RHAESA, A., 1998. The essential role of "minor" phyla in molecular studies of animal evolution. *Amer. Zool.*, **38**: 907-917.
- GHISELIN, M. T., 1988. The origin of molluscs in the light of molecular evidence. *Oxf. Surv. Evol. Biol.*, **5**: 66-95.
- GIRIBET, G. & CARRANZA, S., 1999. What can 18S rDNA do for bivalve phylogeny? *J. Mol. Evol.*, **48**: 256-258.
- GIRIBET, G., CARRANZA, S., BAGUÑA, J., RIUTORT, M. & RIBERA, C., 1996. First molecular evidence for the existence of a Tardigrada + Arthropoda clade. *Mol. Biol. Evol.*, **13**: 76-84.
- GIRIBET, G., CARRANZA, S., RIUTORT, M., BAGUÑA, J. & RIBERA, C., 1999a. Internal phylogeny of the Chilopoda (Arthropoda, 'Myriapoda'): a combined approach using complete 18S rDNA and partial 28S rDNA sequences. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **354**: 215-222.
- GIRIBET, G., RAMBLA, M., CARRANZA, S., BAGUÑA, J., RIUTORT, M. & RIBERA, C., 1999b. Phylogeny of the arachnid order Opiliones (Arthropoda) inferred from a combined approach of complete 18S and partial 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **11**: 296-307.
- GIRIBET, G. & RIBERA, C., 1998. The position of arthropods in the animal kingdom: A search for a reliable outgroup for internal arthropod phylogeny. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **9**: 481-488.
- GIRIBET, G. & WHEELER, W. C., 1999. The position of arthropods in the animal kingdom... Ecdysozoa, islands, trees and the 'parsimony ratchet'. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **13** (En prensa).
- GLADSTEIN, D. S. & WHEELER, W. C., 1997. *POY: the Optimization of Alignment Characters*. American Museum of Natural History, New York.
- GOLOBOFF, P. A., 1998. *Nona ver. 1.9*, American Museum of Natural History, New York.
- GOULD, S. J., 1985. A clock of evolution: we finally have a method for sorting out homologies from "subtle as subtle can be" analogies. *Nat. Hist.*, **94**: 12-25.
- GOULD, S. J., 1995. On tongue worms, velvet worms and water bears. *Nat. Hist.*, **104**: 6-15.
- HAECKEL, E., 1866. *Generelle Morphologie der Organismen*. Georg Reimer, Berlin.

- HALANYCH, K.M., 1998. Considerations for reconstructing metazoan history: Signal, resolution, and hypothesis testing. *Amer. Zool.*, **38**: 929-941.
- HALANYCH, K. M., BACHELLER, J. D., AGUINALDO, A. M., LIVA, S.M., HILLIS, D. M. & LAKE, J. A., 1996. Lophophorate phylogeny. *Science*, **272**: 283
- HENDRIKS, L., VAN BROECKHOVEN, C., VANDENBERGHE, A., VAN DE PEER, Y. & DE WACHTER, R., 1988. Primary and secondary structure of the 18S ribosomal RNA of the bird spider *Eurypelma californica* and evolutionary relationships among eukaryotic phyla. *Eur. J. Biochem.*, **177**: 15-20.
- HENNIG, W., 1950. *Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik*. Deutsche Zentralverlag, Berlin.
- HENNIG, W., 1966. *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press, Urbana-Chicago-London.
- HILLIS, D.M., MORITZ, C., PORTER, C.A. & BAKER, R.J., 1991. Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science*, **251**: 308-310.
- HILLIS, D. M., 1997. Biology recapitulates phylogeny. *Science*, **276**: 218-219.
- HILLIS, D. M. & DIXON, M. T., 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart. Rev. Biol.*, **66**: 411-453.
- HOU, X. & BERGSTROM, J., 1995. Cambrian lobopodians-ancestors of extant onychophorans? *Zool. J. Linnean Soc.*, **114**: 3-19.
- INNIS, M. A., MYAMBO, K. B., GELFAND, D. H. & BROW, M.A.D., 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 9436-9440.
- JAMIESON, B. G. M., 1986. Onychophoran-euclitellate relationships: evidence from spermatozoal ultrastructure. *Zool. Scripta*, **15**: 141-155.
- JAMIESON, B. G. M. & STORCH, V., 1992. Further spermatological evidence for including the Pentastomida in the Crustacea. *Int. J. Parasitol.*, **22**: 95-108.
- JENKINS, R. J. F., 1992. Functional and ecological aspects of the Ediacaran assemblages. En: J. H. LIPPS & P. W. SIGNOR (eds.) *Origin and early evolution of the Metazoa*. Plenum Press, New York: 181-223.
- KIMURA, M., 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, **217**: 624-626.
- KIMURA, M., 1983. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- KINCHIN, I. M., 1994. *The biology of tardigrades*. Portland Press, London.
- KRISTENSEN, R. M., 1991. Loricifera. En: F.W. HARRISON & E.E. RUPPERT (eds.) *Microscopic anatomy of invertebrates*, Volume 4: Aschelminthes. Wiley-Liss, New York: 351-375.
- KRISTENSEN, R. M. & HIGGINS, R. P., 1991. Kinorhyncha. En: F. W. HARRISON & E. E. RUPPERT (eds.) *Microscopic anatomy of invertebrates*, Volume 4: Aschelminthes. Wiley-Liss, New York: 377-404.
- LAKE, J. A., 1989. Origin of the multicellular animals. En: B. FERNHÖLM, K. BREMER & H. JÖRNVALL (eds.) *The Hierarchy of life. Molecules and morphology in phylogenetic analysis*. Excerpta Medica, Amsterdam: 273-278.
- LAKE, J. A., 1990. Origin of the Metazoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 763-766.
- LANE, D., PACE, B., OLSEN, G. J., STAHL, D. A., SOGIN, M. L. & PACE, N. R., 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 6955-6959.
- LANS, D., WEDEEN, C. J. & WEISBLAT, D. A., 1993. Cell lineage analysis of the expression of an engrailed homolog in leech embryos. *Development*, **117**: 857-871.
- LASSNER, M. & DVORAK, J., 1986. Preferential homogenization between adjacent and alternate subrepeats in wheat rDNA. *Nucleic Acids Res.*, **14**: 5499-5512.
- LI, W.H., 1997. *Molecular evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, 487 pp.
- LI, W.H. & GRAUR, D., 1991. *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, 284 pp.
- LIPSCOMB, D. L., FARRIS, J. S., KÄLLERSJÖ, M. & TEHLER, A., 1998. Support, ribosomal sequences and the phylogeny of the eukaryotes. *Cladistics*, **14**: 303-338.
- LITTLEWOOD, D. T., TELFORD, M. J., CLOUGH, K. A. & ROHDE, K., 1998. Gnathostomulida—an enigmatic metazoan phylum from both morphological and molecular perspectives. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **9**: 72-79.
- LONG, E. O. & DAWID, I. B., 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.*, **49**: 727-764.
- MANTON, S. M., 1964. Mandibular mechanisms and the evolution of Arthropods. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **247**: 1-183.
- MAYR, E., 1969. *Principles of systematic Zoology*. McGraw-Hill, New York.
- MEGLITSCH, P. A. & SCHRAM, F. R., 1991. *Invertebrate Zoology*. Oxford University Press, Oxford.
- MICKEVICH, M. F. & FARRIS, J. S., 1981. The implications of congruence in *Menidia*. *Syst. Zool.*, **27**: 143-158.
- MINELLI, A., 1998. Segmented animals: origins, relationships, and functions. An introduction to the Symposium on metamerism. *Ital. J. Zool.*, **65**: 1-4.
- MINELLI, A. & BORTOLETTO, S., 1988. Myriapod metamerism and arthropod segmentation. *Biol. J. Linnean Soc.*, **33**: 323-343.
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, **155**: 335-350.
- MÜLLER, K. J., WALOSSEK, D. & ZAKHAROV, A., 1995. 'Orsten' type phosphatized soft-integument preservation and a new record from the Middle Cambrian Kuonamka Formation in Siberia. *N. Jb. Geol. Palänt. Abh.*, **197**: 101-118.
- NAGYLAKEI, T., 1984. The evolution of multigene families under interchromosomal gene conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 3796-3800.
- NIELSEN, C., 1985. Animal phylogeny in the light of the trochaea theory. *Biol. J. Linnean Soc.*, **25**: 243-299.
- NIELSEN, C., 1995. *Animal evolution, interrelationships of the living phyla*. Oxford University Press, Oxford, 467 pp.
- NIELSEN, C., SCHARFF, N. & EIBYE-JACOBSEN, D., 1996. Cladistic analyses of the animal kingdom. *Biol. J. Linnean Soc.*, **57**: 385-410.
- OWEN, R., 1843. *Lectures on the comparative anatomy of invertebrates*. Longman, Brown, Green and Longman, London.
- PALUMBI, S. R., 1989. Rates of molecular evolution and the fraction of nucleotide positions free to vary. *J. Mol. Evol.*, **29**: 180-187.
- PALUMBI, S.R., 1996. Nucleic acids II: The Polymerase Chain Reaction. En: D.M. HILLIS, C. MORITZ & B.K. MABLE (eds.) *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Sunderland: 205-247.
- PATTERSON, C., WILLIAMS, D. M. & HUMPHRIES, C. J., 1993. Congruence between molecular and morphological phylogenies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **24**: 153-188.
- PETES, T. D., 1980. Unequal meiotic recombination within tandem arrays of yeast ribosomal DNA genes. *Cell*, **19**: 765-774.
- RAMSKÖLD, L., 1992. Homologies in Cambrian Onychophora. *Lethaia*, **25**: 443-460.
- RAMSKÖLD, L. & XIANGUANG, H., 1991. New early Cambrian animal and onychophoran affinities of enigmatic metazoans. *Nature*, **351**: 225-228.
- REGIER, J. C. & SHULTZ, J. W., 1998. Molecular phylogeny of arthropods and the significance of the Cambrian "explosion" for molecular systematics. *Amer. Zool.*, **38**: 918-928.
- RILEY, J., BANAJA, A. A. & JAMES, J. L., 1978. The phylogenetic relationships of the Pentastomida: The case for their inclusion within the Crustacea. *Int. J. Parasitol.*, **8**: 245-254.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F. A., MULLIS, K. B., HORU, G.T., ERLICH, H. A. & ARNHEIM, N., 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**: 1350-1354.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-491.
- SANDERSON, M. J. & DONOGHUE, M. J., 1989. Patterns of variation in levels of homoplasy. *Evolution*, **43**: 1781-1795.
- SCHMIDT-RHAESA, A. & GAREY, J. R., 1998. The position of the Arthropoda in the phylogenetic system. *J. Morphol.*, **238**: 263-285.
- SCHOLTZ, G., 1998. Cleavage, germ band formation and head segmentation: the ground pattern of the Euarthropoda. En: R. A. FORTEY & R.H. THOMAS (eds.) *Arthropod Relationships*. Chapman & Hall, London: 317-332.

- SCHRAM, F. R., 1991. Cladistic analysis of metazoan phyla and the placement of fossil problematica. En: A. M. SIMONETTA & S. CONWAY MORRIS (eds.) *The early evolution of Metazoa and the significance of problematic taxa*. Cambridge University Press, Cambridge: 35-46.
- SCHRAM, F. R. & ELLIS, W. N., 1994. Metazoan relationships: A rebuttal. *Cladistics*, **10**: 331-337.
- SHANKLAND, M., 1991. Leech segmentation: cell lineage and the formation of complex body pattern. *Dev. Biol.*, **144**: 221-231.
- SIMONETTA, A. & DELLE CAVE, L., 1980. The phylogeny of the palaeozoic arthropods. *Boll. Zool.*, **47**: 1-19.
- SIMPSON, G. G., 1961. *Principles of animal taxonomy*. Columbia University Press, New York.
- SNEATH, P. H. A. & SOKAL, R. R., 1973. *Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification*. W. H. Freeman, San Francisco.
- SNODGRASS, R. E., 1938. *Evolution of the Annelida, Onychophora and Arthropoda*. Smithsonian Misc. Collect., **97**: 1-159.
- SOGIN, M. L., 1991. Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **1**: 457-463.
- SOKAL, R. R., 1986. Phenetic taxonomy: theory and methods. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **17**: 423-442.
- SOKAL, R. R. & SNEATH, P. H. A., 1963. *Principles of numerical taxonomy*. W. H. Freeman, San Francisco.
- SPEARS, T. & ABELE, L. G., 1998. Crustacean phylogeny inferred from 18S rDNA. En: R. A. FORTEY & R. H. THOMAS (eds.) *Arthropod Relationships*. Chapman & Hall, London: 169-187.
- SZOSTAK, J. W. & WU, R., 1980. Unequal crossing over in the ribosomal DNA of *Sacharomyces cerevisiae*. *Nature*, **284**: 426-430.
- TIEGS, O. W., 1947. The development and affinities of the Pauropoda, based on a study of *Pauropus sylvaticus*. *Quart. J. micr. Sci.*, **88**: 275-336.
- TIEGS, O. W. & MANTON, S. M., 1958. The evolution of the Arthropoda. *Biol. Rev.*, **33**: 255-337.
- TURBEVILLE, J. M., PFEIFER, D. M., FIELD, K. G. & RAFF, R. A., 1991. The phylogenetic status of arthropods, as inferred from 18S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.*, **8**: 669-686.
- WAGGONER, B. M., 1996. Phylogenetic hypotheses of the relationships of arthropods to Precambrian and Cambrian problematic fossil taxa. *Syst. Biol.*, **45**: 190-222.
- WAINRIGHT, P. O., HINKLE, G., SOGIN, M. L. & STICKEL, S. K., 1993. Monophyletic origins of the Metazoa: An evolutionary link with fungi. *Science*, **260**: 340-342.
- WALOSSEK, D., REPETSKI, J. E. & MÜLLER, K. J., 1994. An exceptionally preserved parasitic arthropod, *Heymonsicambria taylori* n. sp. (Arthropoda *incertae sedis*: Pentastomida), from Cambrian-Ordovician boundary beds of Newfoundland, Canada. *Can. J. Earth Sci.*, **31**: 1664-1671.
- WALOSSEK, D. & MÜLLER, K. J., 1990. Upper Cambrian stem-lineage crustaceans and their bearing upon the monophyletic origin of Crustacea and the position of *Agnostus*. *Lethaia*, **23**: 408-427.
- WALOSSEK, D. & MÜLLER, K. J., 1994. Pentastomid parasites from the Lower Palaeozoic of Sweden. *Trans. Royal Soc. Edinburgh Earth Sci.*, **85**: 1-37.
- WÄGELE, J. W. & STANJEK, G., 1995. Arthropod phylogeny inferred from partial 12S rRNA revisited: Monophyly of the Tracheata depends on sequence alignment. *J. Zoo. Syst. Evol. Research*, **33**: 75-80.
- WHEELER, W. C., 1995. Sequence alignment, parameter sensitivity, and the phylogenetic analysis of molecular data. *Syst. Biol.*, **44**: 321-331.
- WHEELER, W. C., 1996. Optimization alignment: the end of multiple sequence alignment in phylogenetics? *Cladistics*, **12**: 1-9.
- WHEELER, W. C., 1998a. Molecular systematics and arthropods. En: G. D. EDGEcombe (ed.) *Arthropod Fossils and Phylogeny*. Columbia University Press, New York: 9-32.
- WHEELER, W. C., 1998b. Sampling, groundplans, total evidence and the systematics of arthropods. En: R. A. FORTEY & R. H. THOMAS (eds.) *Arthropod Relationships*. Chapman & Hall, London: 87-96.
- WHEELER, W. C., CARTWRIGHT, P. & HAYASHI, C. Y., 1993. Arthropod phylogeny: a combined approach. *Cladistics*, **9**: 1-39.
- WHEELER, W. C. & HAYASHI, C. Y., 1998. The phylogeny of extant chelicerate orders. *Cladistics*, **14**: 173-192.
- WHITE, T. J., ARNHEIM, N. & ERLICH, H. A., 1989. The polymerase chain reaction. *Trends Genet.*, **5**: 185-189.
- WINGSTRAND, K. G., 1972. Comparative spermatology of a pentastomid, *Raillietiella hemidactyli* and a branchiuran crustacean, *Argulus foliaceus*, with a discussion of pentastomid relationships. *K. Dan. Vidensk. Selsk. Biol. Skr.*, **19**: 1-72.
- WINNEPENNINCKX, B., BACKELJAU, T. & DE WACHTER, R., 1995a. Phylogeny of protostome worms derived from 18S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.*, **12**: 641-649.
- WINNEPENNINCKX, B., BACKELJAU, T., MACKAY, L. Y., BROOKS, J. M., DE WACHTER, R., KUMAR, S. & GAREY, J. R., 1995b. 18S rRNA data indicate that Aschelminthes are polyphyletic in origin and consist of at least three distinct clades. *Mol. Biol. Evol.*, **12**: 1132-1137.
- WINNEPENNINCKX, B., BACKELJAU, T. & KRISTENSEN, R. M., 1998a. Relations of the new phylum Cyclophora. *Nature*, **393**: 636-638.
- WINNEPENNINCKX, B., VAN DE PEER, Y. & BACKELJAU, T., 1998b. Metazoan relationships on the basis of 18S rRNA sequences: A few years later... *Amer. Zool.*, **38**: 888-906.
- ZRZAVÝ, J., MIHULKA, S., KEPKA, P., BEZDĚK, A. & TIETZ, D., 1998. Phylogeny of the Metazoa based on morphological and 18S ribosomal DNA evidence. *Cladistics*, **14**: 249-285.
- ZRZAVÝ, J. & STYS, P., 1995. Evolution of metamerism in arthropoda: developmental and morphological perspectives. *Quart. Rev. Biol.*, **70**: 279-295.