

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**SISTEMÁTICA MOLECULAR DE LOS
EUTHYNEURA (MOLLUSCA: GASTROPODA)**

**CRISTINA GRANDE PARDO
MARZO, 2004**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Consejo Superior de
Investigaciones Científicas
CSIC

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIODIVERSIDAD Y BIOLOGÍA EVOLUTIVA
MUSEO NACIONAL DE CIENCIAS NATURALES

SISTEMÁTICA MOLECULAR DE LOS EUTHYNEURA (MOLLUSCA: GASTROPODA)

*Memoria presentada por CRISTINA GRANDE PARDO para optar al
Grado de Doctor en Ciencias Biológicas*

Cristina Grande Pardo

Vº Bº Director de Tesis

Vº Bº Director de Tesis

Dr. José Templado González

Dr. Rafael Zardoya San Sebastián

Vº Bº Tutor de Tesis

Dr. Guillermo San Martín Peral

Madrid, Marzo 2004

"Nothing in biology makes sense except in the light of Evolution"
(T. Dobzhansky, 1973)

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial quiero dar las gracias a mis dos directores de tesis. Rafa y Pepe han demostrado ser muy pacientes y unos magníficos directores. Gracias a su dedicación he podido aprender multitud de aspectos acerca de la sistemática molecular y de la biología de los gasterópodos. Ambos se han complementado perfectamente y me han aportado siempre mucho ánimo y seguridad. Gracias a los dos por vuestra entrega y esfuerzo en esta tesis.

Varias personas han contribuido a este estudio mediante la recogida y cesión de muestras: G. San Martín, C. Megina, X. Turón, L. Cervera, E. Rolán, A. Luque, G. Calado, A. Malaquias, A. Ocaña, R. Cattaneo-Vietti, I. Martínez-Solano, A. Sánchez, P. Mikkelsen, G. Villani y L. Sánchez. A todos vosotros, muchas gracias por una ayuda tan básica para la realización de este trabajo. ¡Gracias César por ser el compañero de buceo perfecto!

El Dr. Valdés hizo posible mi estancia en el Museo de Historia Natural de Los Ángeles. Él me enseñó a mirar un opistobranquio bajo la perspectiva de una lupa y tuvo una paciencia infinita para explicarme la “complicada” terminología malacológica. Gracias por tu apoyo y por tu amistad probada.

El Dr. Cervera ha pasado interminables horas hablando conmigo acerca de la taxonomía de los opistobranquios. Gracias por estar siempre disponible y por la información trasmitida.

Uno de los valores más importantes con los que cuenta actualmente el Museo de Ciencias Naturales de Madrid es la presencia del Dr. Rüber. Gracias Lukas por tener siempre tiempo para hablar, enseñar, discutir y animar. Ha sido una suerte tenerte cerca durante este tiempo. También quiero dar las gracias al resto de compañeros del museo (en especial Soraya, Regina, Elena y Diego) por el buen ambiente de trabajo que proporcionan. He estado muy a gusto trabajando con vosotros.

Desde un plano personal, quisiera dar las gracias a mis padres, hermanos y hermanas. Todo han sido palabras de ánimo y apoyo por su parte y un esfuerzo infinito por entender algo de lo que he hecho durante estos años. Finalmente, gracias a ti por ser millonario.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

I.- INTRODUCCIÓN	1
I.1.- GASTROPODA	3
I.1.1.- Gastropoda: características generales	3
I.1.1.1.- Origen	6
I.1.1.2.- Clasificación	7
I.1.1.3.- Relaciones evolutivas internas	10
I.1.2.- Opisthobranchia: características generales	15
I.1.2.1.- Origen	16
I.1.2.2.- Clasificación	18
I.1.2.3.- Relaciones evolutivas internas	23
I.1.3.- Pulmonata: características generales	29
I.1.3.1.- Origen	30
I.1.3.2.- Clasificación	31
I.1.3.3.- Relaciones evolutivas internas	33
I.2.- INFERENCIA FILOGENÉTICA	36
I.2.1.- Sistemática molecular: ventajas y desventajas	36
I.2.2.- Alineamiento de las secuencias	37
I.2.3.- Métodos para la construcción de árboles	38
I.2.3.1.- Métodos de distancias	39
I.2.3.2.- Métodos discretos	40
I.2.3.2.1.- Máxima parsimonia	40
I.2.3.2.2.- Máxima verosimilitud	42
I.2.3.2.3.- Inferencia bayesiana	44
I.2.4.- Métodos de validación de árboles	46
II.- OBJETIVOS	49
III.- RESULTADOS	53
III.1.- The complete mitochondrial genome of the nudibranch <i>Roboastra europaea</i> (Mollusca: Gastropoda) supports the monophyly of opisthobranchs. <i>Molecular Biology and Evolution</i> 19: 1672-1685. (2002)	59
III.2.- Molecular phylogeny of Euthyneura (Mollusca: Gastropoda). <i>Molecular Biology and Evolution</i> 21: 303-313. (2004)	75

ÍNDICE

III.3.- Phylogenetic relationships among Opisthobranchia (Mollusca: Gastropoda) based on mitochondrial <i>cox 1</i> and <i>rrnL</i> genes. <i>Molecular Phylogenetics and Evolution</i> . Enviado. (2004)	89
IV.- DISCUSIÓN	105
IV.1.- EL GENOMA MITOCONDRIAL DE <i>R. EUROPAEA</i>	108
IV.2.- ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	113
IV.2.1.- Comparación de las metodologías empleadas y los resultados obtenidos en los diferentes análisis filogenéticos	113
IV.2.2.- Valor de los RGCs en la inferencia filogenética de Heterobranchia	115
IV.2.3.- Posición filogenética de Pyramidellidae	116
IV.2.4.- Posición filogenética de Onchidiidae	118
IV.2.5.- Posición filogenética de Siphonariidae	119
IV.2.6.- Posición filogenética de Stylommatophora	121
IV.2.7.- Posición filogenética de Opisthobranchia	122
IV.3.- TAREAS PENDIENTES PARA FUTUROS ANÁLISIS	129
V.- CONCLUSIONES	131
VI.- BIBLIOGRAFÍA	137
VII.- GLOSARIO	153
VIII.- APÉNDICE	159
IX.- ABREVIATURAS	165

I.- INTRODUCCIÓN

Durante los últimos dos siglos de continua investigación científica de los gasterópodos se han realizado multitud de estudios morfológicos, ecológicos y taxonómicos. Todos ellos han contribuido al conocimiento y a la descripción de los gasterópodos como uno de los grupos con mayor diversidad dentro de los metazoos. Tratar de entender los procesos evolutivos que han dado lugar a esta diversidad supone un reto científico interesante. La existencia de un marco filogenético robusto es el punto de partida imprescindible para poder entender cualquier proceso o tendencia ocurrida a lo largo de la historia evolutiva de un grupo, así como la aparición de novedades morfológicas y ecológicas. Sin embargo, gran parte de las relaciones evolutivas entre los diferentes grupos de gasterópodos permanecen aún sin resolver.

En la presente tesis se han analizado en concreto las relaciones filogenéticas (mediante una aproximación molecular) entre diversos representantes de un grupo derivado de gasterópodos (*Euthyneura*) cuyas relaciones evolutivas han sido tema de discusión durante el último siglo y continúan aún abiertas. El avance de las técnicas de la biología molecular ha impulsado recientemente el estudio de las relaciones filogenéticas a diferentes niveles taxonómicos dentro de los metazoos. Sin embargo, hasta este momento, los escasos estudios filogenéticos de *Euthyneura* realizados con datos moleculares, están basados en fragmentos pequeños y no son ni concluyentes ni resolutivos.

A continuación, se comenta la posición de *Euthyneura* dentro de *Gastropoda*, se describen los miembros que lo componen y se exponen los problemas que han surgido en los estudios previos sobre su historia evolutiva.

I.1.- GASTROPODA

I.1.1.- Gastropoda: características generales

Los moluscos gasterópodos constituyen uno de los grupos animales más diversos tanto en número de especies como en formas de vida, y uno de los pocos que se han adaptado con éxito tanto al medio marino, como al terrestre y a las aguas continentales. Se han descrito unas 150.000 especies, tanto fósiles como actuales, y unos 14.000 géneros (Bieler, 1992). Dentro del grupo pueden encontrarse diferentes modos de vida (sedentario, nadador, excavador,...) y diferentes dietas (carnívora, suspensívora, herbívora y parásita) (Figura I.1). El amplísimo registro fósil dejado por los gasterópodos, debido a que la mayor parte de ellos tiene concha, mues-

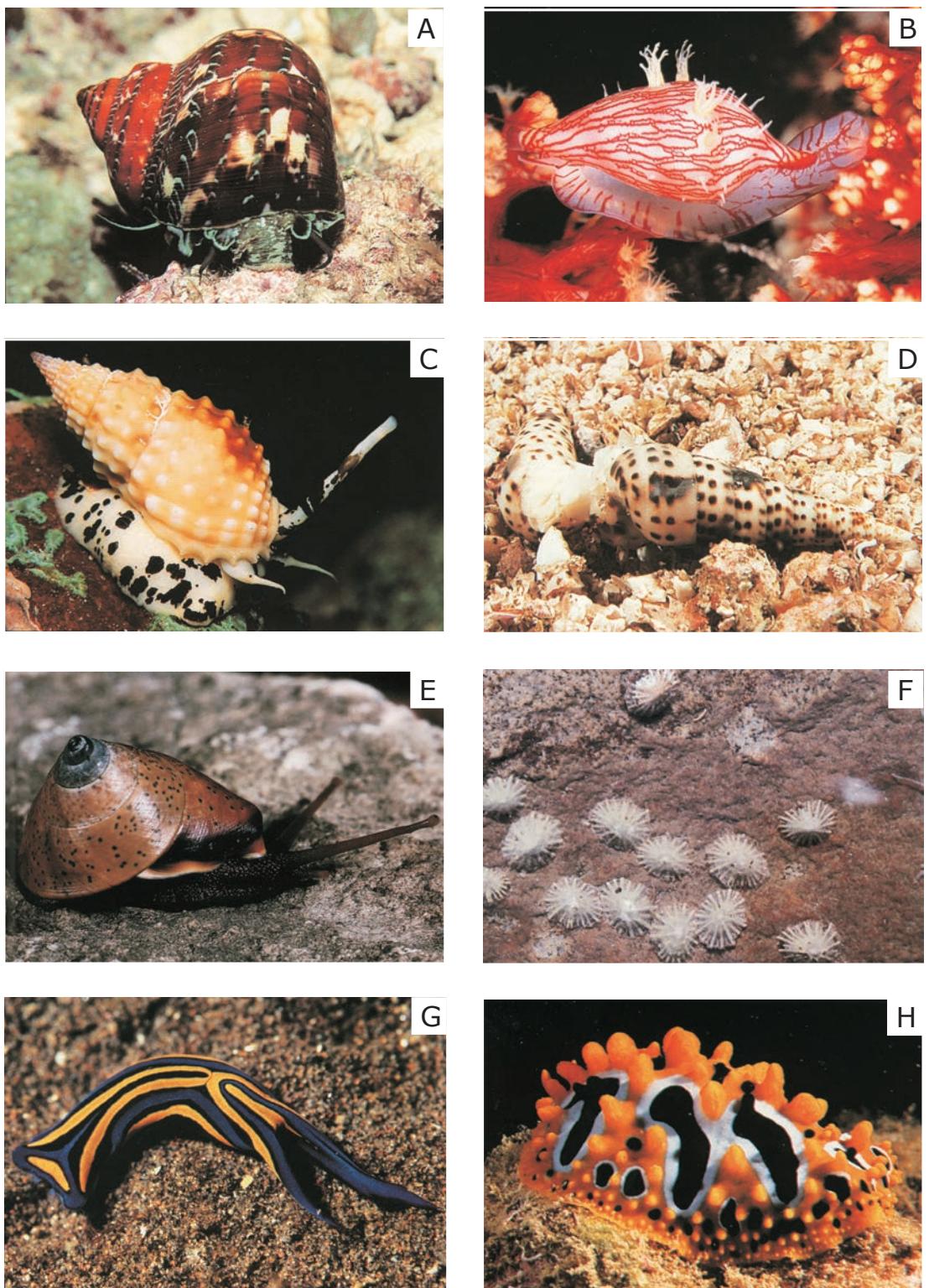


Fig. I.1. Diversidad morfológica dentro de Gastropoda. A, T urbinidae: *Turbo petholatus*. B, Ovulidae: *Serratovolva dondani*. C, Nassariidae: *Nassarius papillosus*. D, Pyramidellidae: *Pyramidella acus*. E, Camaenidae: *Rhynchotrochus macgillivrayi*. F, Siphonariidae: *Siphonaria diemenensis*. G, Aglajidae: *Chelidonura hirundinina* H, Phyllidiidae: *Phyllidia ocellata*. E y F reproducido de Rudman y Willan, 1998; resto reproducido de Debelius, 1997.

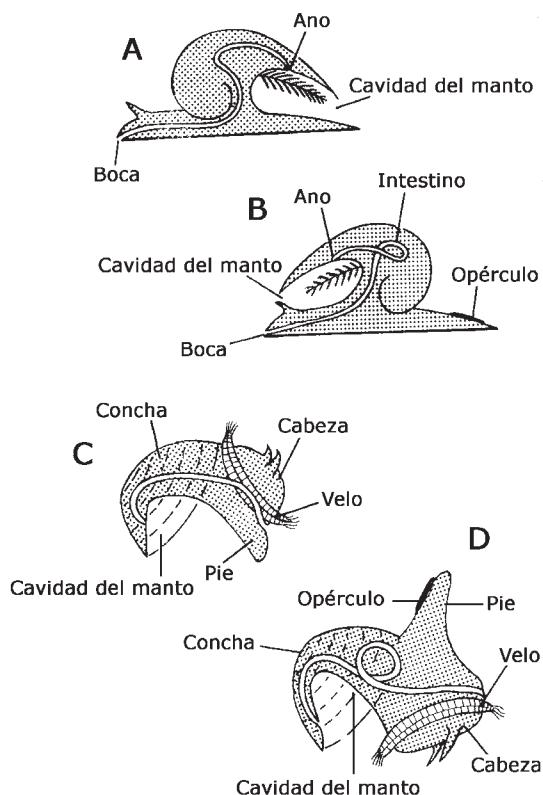


Fig. I.2. Esquema simplificado del fenómeno de la torsión en gasterópodos. A, B ancestro hipotético de los gasterópodos antes y después de la torsión respectivamente. C, D larva veliger antes y después de la torsión (modificado de Beesley , Ross y Wells, 1998).

la masa visceral. La concha, que es segregada por el epitelio de la masa visceral (denominado manto), envuelve a ésta y la protege. El espacio que queda entre el manto y la concha se denomina cavidad del manto o paleal y tiene un papel relevante en varios aspectos de la vida de los gasterópodos (Figura I.2. A). Aunque puedan quedar englobadas dentro de la cavidad del manto, la cabeza y el pie son las zonas que se relacionan con el medio externo y por lo tanto desempeñan funciones locomotoras, sensoriales y alimenticias. En la masa visceral es donde se encuentran los órganos vitales para la digestión, reproducción, circulación y excreción.

Los gasterópodos no tienen ningún tipo de simetría corporal en estado adulto debido al fenómeno denominado torsión (Figura I.2). Se trata de una rotación de 180° de la masa visceral con respecto al eje antero-posterior (permaneciendo fijos el pie y la región cefálica). Las larvas de los gasterópodos poseen una sime-

tra la ocurrencia de extinciones periódicas seguidas de periodos de gran diversificación de otros (Bieler, 1992). Dada la enorme diversidad morfológica y de formas de vida de este grupo y de su extenso registro fósil, los gasterópodos constituyen un grupo idóneo para los estudios filogenéticos y evolutivos.

La evolución de los gasterópodos ha implicado cambios con respecto a la morfología de un molusco antecesor hipotético. Eventos como lacefalización, el alargamiento del cuerpo en sentido dorso ventral y la modificación de la concha, diferencian a los gasterópodos de otros moluscos como los poliplacóforos o los bivalvos.

La organización corporal de los gasterópodos presenta dos regiones funcionales bien diferenciadas (Figura I.2 A). Por un lado se encuentran la cabeza (que incluye los ojos, tentáculos y una boca terminal) y el pie, y por otro

tría bilateral y es durante el desarrollo larvario cuando se produce la rotación de la masa visceral (Figura I.2. C y D). La torsión larvaria consta de dos fases bien diferenciadas, ocasionadas por diferentes factores. La primera fase es el resultado de un crecimiento diferencial de las células viscerales de la larva y la segunda es el resultado de un crecimiento diferencial del cuerpo (Bandel, 1982). El significado evolutivo de la torsión es un tema controvertido y varios autores han discutido acerca de sus ventajas evolutivas (Morton, 1958b; Thompson, 1967; Salvini-Plawen, 1980). Se ha sugerido que la primera fase de la torsión proporciona protección, estabilidad y equilibrio a la larva, mientras que la segunda fase, está más relacionada con la adaptación en el estado adulto (Haszprunar, 1988b). En algunos grupos de gasterópodos, como los opistobranquios, se produce una detorsión durante el desarrollo larvario que vuelve a situar la cavidad del manto y el ano en la parte posterior del cuerpo, con lo que se recupera de nuevo la simetría bilateral (Kandel, 1979). Esta detorsión es, según Brace (1977), el resultado de la reversión de la segunda fase de la torsión descrita anteriormente. La torsión lleva asociada una gran cantidad de modificaciones anatómicas, como son la condición estreptoneura del sistema nervioso (ver más adelante), la adquisición de un esófago enrollado y la asimetría de los órganos en la cavidad paleal: ctenidio (estructura respiratoria), osfradio (órgano quimiorreceptor) y la glándula hipobranchial. Además, como resultado de la torsión, la cavidad del manto se localiza en la zona anterior y la concha envuelve la regióncefálica con lo que se favorece el intercambio gaseoso en la cavidad del manto (Yonge, 1947; Linsley, 1978).

La torsión, junto con la forma de la concha y el opérculo larvarios constituyen las únicas sinapomorfías de los gasterópodos generalmente aceptadas (Ponder y Lindberg, 1997).

I.1.1.1.- Gastropoda: origen

Los primeros registros fósiles de los gasterópodos datan del Cámbrico (Runnegar, 1983; Tracey *et al.*, 1993). A pesar de la existencia de un abundante registro fósil, éste no permite resolver el origen de los gasterópodos ya que los únicos datos morfológicos que pueden obtenerse se refieren a las partes duras, es decir, a la forma de la concha y a su escultura. El rastro en el registro fósil de eventos evolutivos, como el de la torsión, es difícil de seguir y se deduce de evidencias circunstanciales, como son las marcas musculares y las hendiduras en la concha.

Se han propuesto distintos escenarios posibles para explicar las relaciones evolutivas dentro de los moluscos, y, por lo tanto, el origen de los gasterópodos, basados en el estudio de la anatomía comparada y en la ontogenia. Algunos autores apoyan una estrecha relación entre gasterópodos y bivalvos debido a la existencia de gasterópodos con dos valvas (Gutmann, 1974). Otros autores han apoyado la hipótesis de que gasterópodos y monoplacóforos son grupos hermanos, principalmente debido a que la primera larva estudiada de un monoplacóforo fue descrita como espiral (Lemche y Wingstrand, 1959; Götting, 1980). Sin embargo, una reinterpretación invalidó dicha hipótesis (Wingstrand, 1985). Actualmente la mayoría de los autores consideran que el grupo hermano de los gasterópodos son los cefalópodos y que ambos grupos tendrían varios caracteres derivados compartidos, como son los tentáculos epipodiales, los ojos inervados cerebralmente, el alargamiento dorsal del cuerpo, la restricción de la cavidad del manto a la parte posterior del cuerpo (antes de la torsión), la cabeza bien definida y separada del resto del cuerpo, la restricción de la concha a la parte visceral del organismo y un sistema muscular que sustenta varios apéndices corporales (Wingstrand, 1985; Haszprunar, 1988b).

I.1.1.2.- Gastropoda: clasificación

Las primeras clasificaciones de los gasterópodos se basaron en caracteres tales como la forma y la coloración de la concha. A finales del siglo XIX, con la información aportada por los estudios de anatomía comparada, las clasificaciones se basaron en otro tipo de caracteres morfológicos, como la localización de las branquias, el

Tabla I.1. Sistema de clasificación de los gasterópodos propuesto por Thiele (1931).

Gastropoda
Prosobranchia
Archaeogastropoda
Mesogastropoda
Stenoglossa
Opisthobranchia
Pleurocoela
Pteropoda
Sacoglossa
Acoela
Pulmonata
Basommatophora
Stylommatophora

corazón o la cavidad del manto. La clasificación más elaborada fue la propuesta por Thiele (1931), que integró la información existente hasta ese momento con datos del sistema nervioso, respiratorio y de la rádula (Tabla I.1). Esta clasificación reconocía tres subclases dentro de los gasterópodos: Prosobranchia, Opisthobranchia y Pulmonata. A su vez, los prosobranquios se dividían en tres subórdenes que representaban cada uno un grado evolutivo: Archaeogastropoda,

Tabla I.2. Sistema de clasificación de los gasterópodos propuesto por Golikov y Starobogatov (1975).

Gastropoda
Cyclobranchia = Patellogastropoda
Scutibranchia
Pectinibranchia
Sinistrobranchia=Pyramidelliones
Opisthobranchia=Bulliones
Dextrobranchia=Peracliones
Pulmonata=Limaciones

su aceptación generalizada, este esquema de tipo gradual presenta el problema de la existencia de ciertos taxones cuyos caracteres corresponden a estados intermedios entre grupos. Así, por ejemplo, Cox (1960) sugirió que había tal continuidad de caracteres entre Mesogastropoda y Neogastropoda, que su separación en dos grupos era injustificable, y propuso su unificación en uno solo: Caenogastropoda, grupo que se mantiene en la actualidad (ver más adelante).

No obstante, no se propuso una clasificación alternativa que supusiera modificaciones sustanciales hasta la planteada por Golikov y Starobogatov (1975). La clasificación de estos autores suponía cambios tan drásticos con respecto al modelo tradicional, que no tuvieron mucha aceptación fuera del ámbito soviético. Estos auto-

Mesogastropoda y Stenoglossa, posteriormente denominado Neogastropoda (Wenz, 1938-1944). Esta clasificación fue aceptada por la práctica totalidad de los malacólogos de la época y ha sido la más estable. Incluso se sigue utilizando en la actualidad en algunos libros de texto y obras de tipo general. A pesar de

res reconocían la validez de opistobranquios y pulmonados, pero no así la de prosobranquios, los cuales fueron divididos en diversos grupos. Cabe señalar que fueron los primeros autores en reconocer a Patellogastropoda como el grupo de gasterópodos actuales más primitivo (Tabla I.2).

La aplicación de nuevos instrumentos, como el microscópico electrónico, y la incorporación de nuevos caracteres del osfradio, del ctenidio, del sistema excretor y de la ultraestructura de los espermatozoides dio un nuevo impulso a la sistemática del grupo (Andrews, 1985; Haszprunar, 1985a; Haszprunar, 1985b;

Tabla I.3. Sistema de clasificación de los gasterópodos propuesto por Haszprunar (1988b).

Gastropoda
Prosobranchia
Docoglossa
Hot-Vent Group-C
Cocculiniformia
Neritimorpha
Vetigastropoda
Seguenziina
Architaenioglossa
Caenogastropoda
Campanilimorpha
Heterobranchia
Ectobranchia
Allogastropoda
Euthyneura
Opisthobranchia
Pulmonata

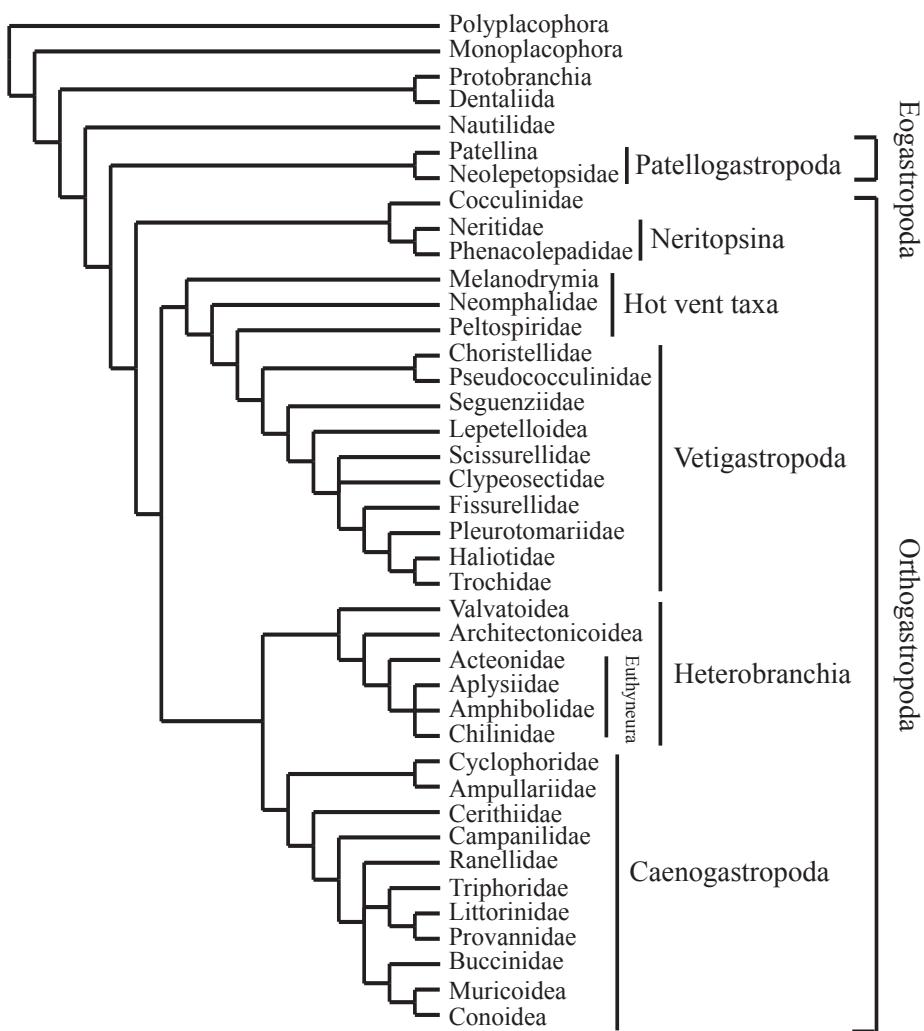


Fig.I.3. Hipótesis sobre las relaciones filogenéticas entre diferentes grupos de gasterópodos propuesta por Ponder y Lindberg (1997).

Koike, 1985; Haszprunar, 1987; Healy, 1988). De las diversas clasificaciones propuestas destaca la de Haszprunar (1988b). Este autor fue el principal promotor de una revisión global de la filogenia y la clasificación de los gasterópodos. Su propuesta fue objeto de un amplio debate en el IX Congreso Internacional de Malacología (Edimburgo, 1986), que continuó en años posteriores y que abrió un fructífero periodo para malacología. La clasificación de Haszprunar (1988b) incluía dos grupos dentro de los gasterópodos: Prosobranchia y Heterobranchia (Tabla I.3). Este último incluía algunos grupos previamente considerados como prosobranquios, junto con opistobranquios y pulmonados. Aunque la metodología seguida por Haszprunar fue criticada (Bieler, 1990; ver réplica de Haszprunar, 1990), es indudable que el trabajo de este autor sentó las bases de la clasificación moderna de los gasterópodos.

Los resultados presentados por Haszprunar (1988b) fueron evaluados con métodos cladísticos por Ponder y Lindberg (1996; 1997), lo que les permitió reconstruir el primer árbol filogenético del grupo (Figura I.3) y establecer una nueva clasificación que es aceptada de manera general. En la figura I.4 pueden observarse las diferencias en cuanto a nomenclatura y agrupación de taxones entre la clasificación tradicional (Thiele, 1931) y la actual (Ponder y Lindberg, 1997). Sin embargo, cabe destacar que estos trabajos filogenéticos y de clasificación están centrados en los gasterópodos primitivos (antiguos prosobranquios) y que aportan muy poca información acerca de otros grupos más derivados, como los opistobranquios y los pulmonados. La clasificación actual y la historia evolutiva de los gasterópodos son comentadas con detalle en el siguiente apartado.

I.1.1.3.- Gastropoda: relaciones evolutivas internas

Según la clasificación de Ponder y Lindberg (1997), los gasterópodos pueden dividirse en dos grupos bien diferenciados: Eogastropoda (Patellogastropoda) y Orthogastropoda (que incluye el resto de gasterópodos) (Figura I.4). Patellogastropoda es considerado como una línea evolutiva independiente y se sitúan como grupo hermano del resto de gasterópodos (Glikov y Starobogatov, 1975; Shileyko, 1977; Graham, 1985; Haszprunar, 1988b; Lindberg, 1988; Ponder y Lindberg, 1997) (Figura I.3). Patellogastropoda retiene varios caracteres primitivos compartidos con otras clases de moluscos (en caracteres de la concha, del sistema nervioso, de la morfología de la branquia y de la rádula) y cuenta, además, con varias sinapomorfías (en caracteres de la estructura de la concha, del sistema digestivo, de la rádula, de los espermatozoides y la presencia del órgano verrugoso) (Andrews, 1985; Koike, 1985; Haszprunar, 1988b; Lindberg, 1988; Bieler, 1992) que apoyan la monofilia del grupo.

Los ortogasterópodos se distinguen porque poseen glándulas hipobranquiales, una rádula flexoglosa (rádula flexible longitudinalmente), propodio (parte anterior del pie claramente diferenciada), una glándula pedal anterior, un par de mandíbulas, estatocisto anterior o dorsal al ganglio pedal y una significativa reducción en la extensión de los nervios paleales (Ponder y Lindberg, 1997). La rádula flexoglosa en contraposición a la rádula estereoglosa, que actúa como un simple raspador sin capacidad de flexión longitudinal, supone la innovación más decisiva dentro de la evolución de los gasterópodos. La adquisición de este tipo de rádula proporciona una

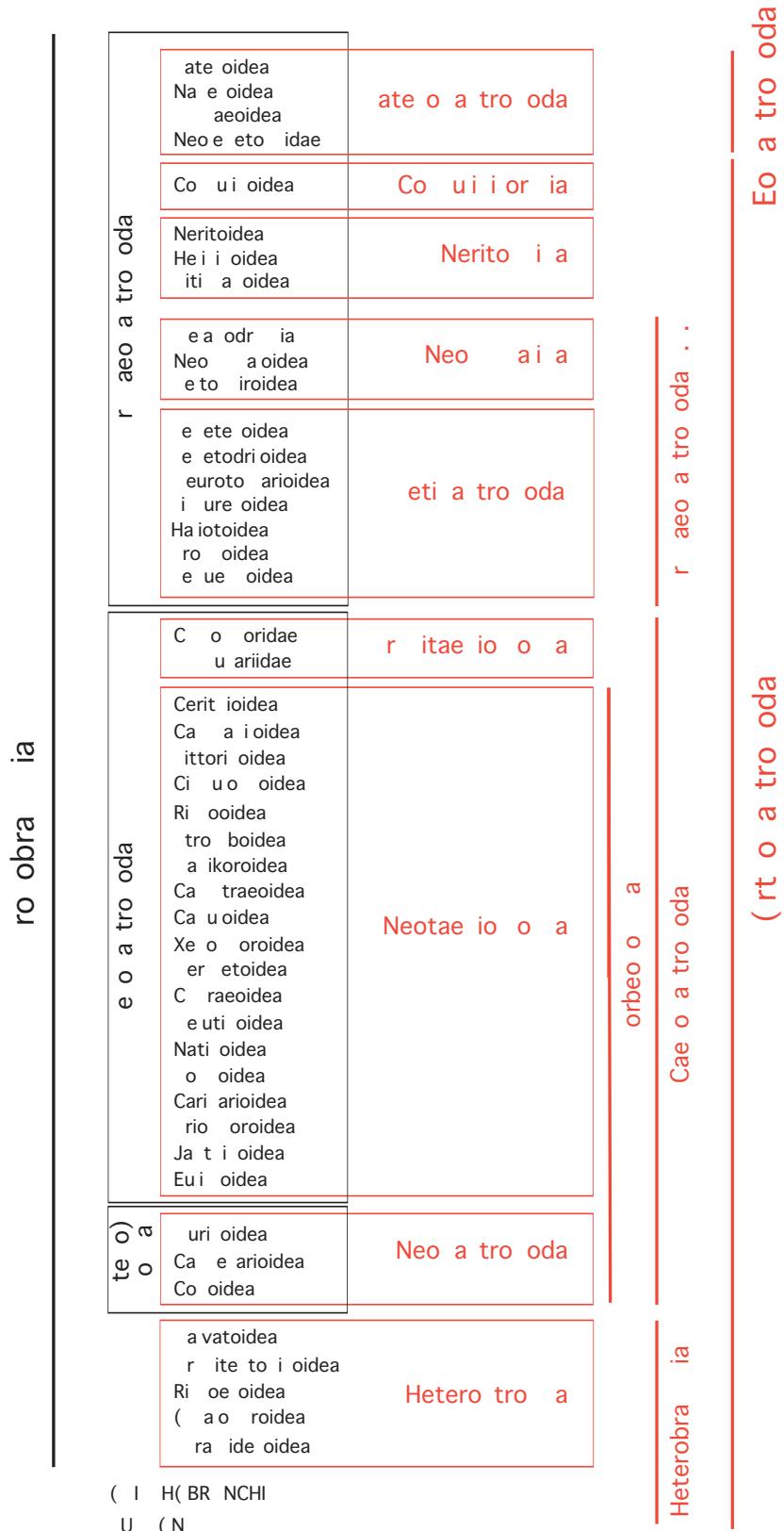


Fig. I.4. Comparación de la clasificación tr adicional (Thiele, 1931) con la moderna (en rojo) (Pönder y Lindberg, 1997) de los gasterópodos.

gran versatilidad a la hora de alimentarse y, por lo tanto, la posibilidad de colonizar distintos hábitats. Dentro de los ortogasterópodos Ponder y Lindberg (1997) diferencian los grupos que se describen a continuación.

Neritopsina y Coccilinoidea son los grupos más basales. Aunque estos autores describieron posibles sinapomorfías para ambos grupos, como la ausencia de glándulas salivares y la presencia de una mandíbula dorsal y compacta (Ponder y Lindberg, 1997), no hay estudios que comprueben la homología de estos caracteres. Por lo tanto, la posición filogenética de estos dos grupos está aún sin esclarecer y es necesario un análisis más exhaustivo para determinarla.

Otro grupo, previamente definido como Neomphalina (McLean, 1990), es el formado por especies exclusivas de surgencias hidrotermales submarinas que no han podido englobarse en otros grupos de ortogasterópodos y, por definición, es parafilético. Los pocos datos que existen dejan abierto el planteamiento de varias hipótesis acerca de su origen. Por ejemplo, se ha propuesto que este grupo ha ya sufrido una radiación adaptativa en este peculiar hábitat (Ponder y Lindberg, 1997). Otra posibilidad planteada es que estos taxones sean en realidad relictos de grupos mayores ya extintos (McLean, 1981; Newnam, 1985; McLean, 1988). Estas dos posibilidades no son excluyentes y se necesitan más datos acerca de su anatomía y ultraestructura para aclarar su situación. El descubrimiento de nuevos taxones de moluscos asociados en estas surgencias profundas puede ayudar también a esclarecer el origen de estos grupos (Ponder y Lindberg, 1997).

Vetigastropoda constituye un grupo monofilético apoyado por varias sinapomorfías entre las que destacan las bolsas sensoriales en las branquias (Szal, 1971; Haszprunar, 1987; Salvini-Plawen y Haszprunar, 1987). Otros caracteres, como son los órganos sensoriales epipodiales, los tentáculos con papilas y las glándulas digestivas con papilas, también pueden considerarse sinapomorfías, ya que su ausencia en algunos taxones se interpreta como el resultado de procesos heterocrónicos (Ponder y Lindberg, 1997).

Caenogastropoda que, como se ha indicado con anterioridad, incluye a los antiguos mesogasterópodos y neogasterópodos (Figura I.4), constituye un clado monofilético que engloba la mayor diversidad en número de especies dentro de los gasterópodos. Se han descrito varias sinapomorfías en caracteres del osfradio y de la anatomía de los espermatozoides (Haszprunar, 1988b). Este clado incluye dos grupos: Architaenioglossa y Sorbeoconcha (Haszprunar, 1985a; Haszprunar, 1988b; Ponder y Lindberg, 1997).

Finalmente, Heterobranchia incluye *Heterostropha* (Architectonicoidae, Pyramidelloidea, Nerineoidea, V alvatoidea, Omalogyroidea y Rissoelloidea) y *Euthyneura* (Opisthobranchia y Pulmonata). La monofilia de Heterobranchia está apoyada por varios caracteres morfológicos como son la presencia de órganos pigmentados en la pared de la cavidad del manto de las larvas, de filas de cilios longitudinales en la cavidad del manto y de chalaza para conectar los cordones de huevos (Robertson, 1985). Sin embargo, el más importante hace referencia al fenómeno denominado heterostrofia, es decir, el cambio de dirección en el enrollamiento de la concha entre el estado larvario y el adulto. Si bien la monofilia de Heterobranchia está aceptada de manera generalizada, el origen del grupo es controvertido (Boettger, 1954; Fretter y Graham, 1954; Morton, 1955; Gosliner, 1981; Haszprunar, 1985c). Ponder y Lindberg (1997) propusieron a Caenogastropoda como grupo hermano de Heterobranchia. Sin embargo, con anterioridad, Gosliner (1981) sugirió a Littorinoidea como posible antecesor de Heterobranchia y propuso la parafilia de Caenogastropoda.

La taxonomía y la posición filogenética de *Heterostropha* han sido tema de debate durante muchos años (Golikov y Starobogatov, 1975; Haszprunar, 1985c; Haszprunar, 1988b; Ponder y Warén, 1988; Ponder, 1991). *Heterostropha* es un grupo parafilético (Haszprunar, 1988b; Bieler, 1992; Ponder y Lindberg, 1997) compuesto por un mosaico de formas que comparten caracteres típicos tanto de gasterópodos primitivos (prosobranquios en sentido clásico) como de grupos más derivados (*Euthyneura*), por lo que su delimitación y diagnosis no están bien definidas. Dentro de este grupo se incluye Pyramidelloidea, que comprende gasterópodos ectoparásitos que se alimentan de diversos invertebrados (principalmente de otros moluscos y de poliquetos sedentarios). Estos organismos han perdido la rádula completamente, o la han sustituido por un estilete punzante. El ctenidio también se ha perdido y, en algunos casos, se han desarrollado branquias secundarias. La concha de los piramideloides varía desde formas turriculadas muy delgadas hasta conchas con espira baja o apenas sin espira tipo pateliforme (familia Amathinidae). La posición filogenética de Pyramidelloidea, al igual que la del resto de grupos de *Heterostropha*, es muy discutida y se les ha incluido tanto en los antiguos prosobranquios (Thiele, 1931; Franc, 1968; Golikov y Starobogatov, 1975) como en los opistobranquios (Pelseneer, 1899; Fretter y Graham, 1949; Taylor y Sohl, 1962; Hyman, 1967; Thompson, 1976).

Por último, *Euthyneura* Spengel, 1881 es un término empleado para agrupar

a los gasterópodos más derivados: Opistobranchia y Pulmonata. Ambos comparten una modificación de la torsión, lo que tiene importantes implicaciones anatómicas, principalmente en el sistema nervioso, pero también en otros órganos. En concreto, con la detorsión, los cordones nerviosos que conectan el anillo circumesofágico con el ganglio visceral (cordones viscerales) no se cruzan (condición eutíneura), en contraste con los gasterópodos primitivos, en los que hay un cruzamiento debido a la torsión (condición estreptoneura) (Figura I.5). Sin embargo, esta diferenciación no tiene carácter diagnóstico, ya que algunos opistobranquios primitivos tienen sistemas nerviosos de tipo estreptoneuro (Haszprunar, 1988b). Se han definido otras sinapomorfías morfológicas para Euthyneura, entre las que destacan la presencia de dos ganglios adicionales llamados parietales, el hermafroditismo simultáneo, un sistema reproductor monoáulico (modalidad de sistema reproductor en el que el vaso deferente, la vagina y el oviducto comparten un único conducto) en las formas más basales, la presencia de un ciego paleal en el manto y de glándulas que producen sustancias repelentes, entre otros caracteres (Gosliner, 1981; Haszprunar, 1985c; Haszprunar, 1988b).

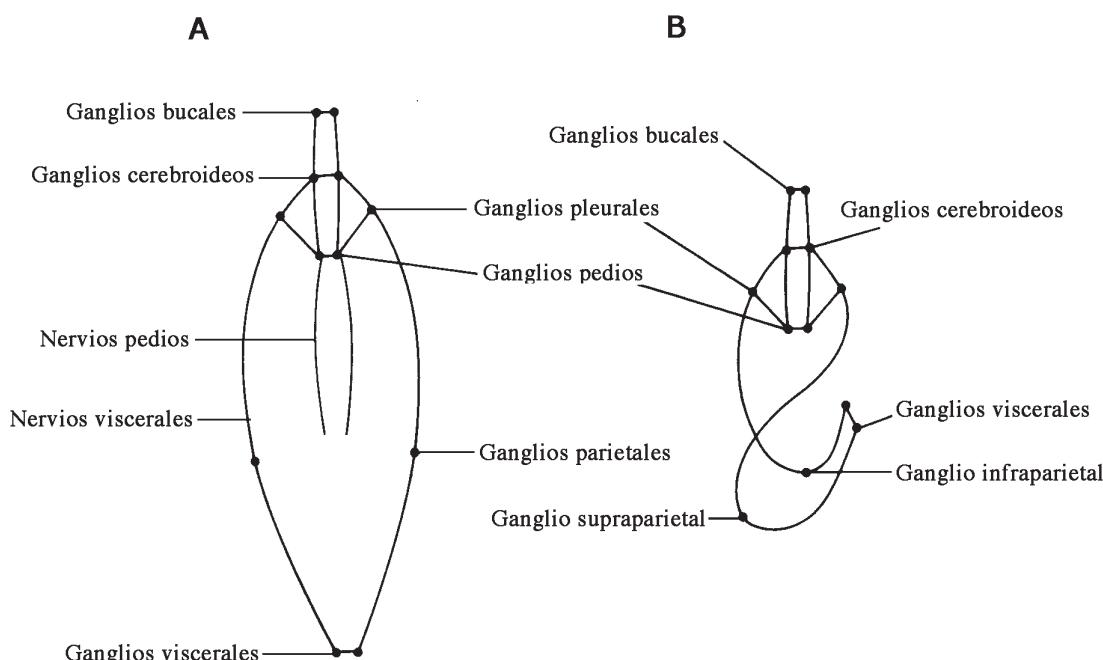


Fig. I.5. Diagrama esquemático del sistema nervioso en gasterópodos. A, configuración hipotética del sistema nervioso ancestral (antes de la torsión). B, configuración del sistema nervioso después de la torsión. Como consecuencia de la torsión, se produce un cruzamiento de los cordones laterales nerviosos (condición estreptoneura).

I.1.2.- Opistobranchia: características generales

Los opistobranquios son un grupo con un número relativamente reducido de especies (más de 5.000) en comparación con los otros grandes grupos de gasterópodos como los pulmonados o los caenogasterópodos, pero con una gran diversidad morfológica. Este grupo ha experimentado una radiación adaptativa, acompañada de una extraordinaria diversificación y especialización alimentaria, que les ha permitido colonizar una gran diversidad de hábitats en el medio marino (con la excepción de algunas especies de *Acochlidia* que viven en agua dulce). Existen formas pelágicas y bentónicas. Se encuentran distribuidos por todos los océanos, desde la zona tropical (donde se concentran el mayor número de especies) hasta la Antártida, y desde aguas superficiales a grandes profundidades.

La tendencia evolutiva que caracteriza mejor al grupo es la pérdida de la concha. Este hecho, que se ha producido de manera independiente en los diferentes grupos principales dentro de los opistobranquios (Gosliner, 1981; Gosliner y Ghiselin, 1984; Gosliner, 1991), ha condicionado profundamente su historia evolutiva. Dentro de los opistobranquios podemos encontrar desde especies con una concha bien desarrollada hasta especies completamente desnudas, pasando por formas intermedias con la concha reducida a una delgada estructura interna. La progresiva pérdida de la concha ha forzado una intensa reorganización corporal al occasionando, entre otras cosas, el desplazamiento de la cavidad del manto a una zona posterior, o incluso su pérdida total (Brace, 1977). La pérdida de la cavidad del manto (estructura de gran importancia para la respiración en los gasterópodos primitivos) va acompañada también de la pérdida del osfradio y de las glándulas hipobranquiales.

Acompañando a la pérdida de la concha, se ha producido también una detorsión de la masa visceral (recuperándose de nuevo la simetría bilateral corporal), un aumento de lacefalización, así como la adquisición de estructuras respiratorias novedosas (como los cerata, plicatidium, ...) (Minichev, 1970; Rudman y Willan, 1998).

En contraposición a estas pérdidas, los opistobranquios han desarrollado nuevas estructuras y han diversificado su anatomía, lo que ha implicado profundos cambios con respecto a las formas ancestrales de gasterópodos. Entre estas novedades evolutivas destacan las relacionadas con los sistemas defensivos. El desarrollo de defensas químicas (sustancias repelentes, ácidas, venenosas, etc.), de coloraciones aposemáticas, miméticas o crípticas, así como la adquisición de

la capacidad de incorporar elementos extraños (como cnidocistos) al propio organismo (cleptodefensas), son algunos ejemplos (Ros, 1976).

I.1.2.1.- Opistobranchia: origen

El primer registro fósil atribuible claramente a un opistobranquio corresponde a ejemplares de *Acteonina carbonaria*, que datan del Carbonífero Inferior (Gosliner, 1981). Los opistobranquios tienen un registro fósil muy pobre en comparación con otros grupos de moluscos, debido precisamente a la reducción de la concha. En los pocos casos en los que se recuperan conchas fósiles, la información que se obtiene es mínima debido a que la taxonomía y el estudio de las relaciones evolutivas entre los diferentes grupos de opistobranquios están basados principalmente en caracteres de la anatomía interna. Por lo tanto, el registro fósil no ha resultado útil a la hora de estudiar las relaciones filogenéticas entre los distintos grupos de opistobranquios (Gosliner y Ghiselin, 1984).

La búsqueda del opistobranquio que reúna los caracteres menos derivados dentro del grupo, ha llevado a proponer al género *Acteon* como el más basal y, por lo tanto, como el modelo típico del opistobranquio ancestral (Fretter y Graham, 1954; Morton, 1968). Diferentes caracteres apoyan esta hipótesis, como son la presencia de una concha bien calcificada, opérculo, cavidad paleal, un sistema nervioso de tipo estreptoneuro y una molleja esofágica sin placas quitinosas. Sin embargo, Mikkelsen (2002) no considera al género *Acteon* como un opistobranquio, sino como un heterobranquio primitivo. Los fósiles de especímenes asignables a Acteonidae aparecen en el Cretácico Medio (Zilch, 1959-60).

Alternativamente, Gosliner (1981) ha propuesto a miembros de la familia Ringiculidae como los opistobranquios más primitivos, basándose en su morfología externa (con la cavidad del manto situada en la parte anterior y el ano y el gonoporo situados en el lado al derecho de la cavidad), en el sistema nervioso estreptoneuro, y sobre todo, en el sistema reproductor de tipo monoáulico (Gosliner, 1981). Los primeros fósiles asignados a esta familia aparecen ya en el Cretácico (Zilch, 1959-60).

Sin embargo, ningún opistobranquio actual reúne todas las características primitivas que pueden encontrarse dentro del grupo. Gosliner (1981) propuso un ancestro hipotético, mosaico de todos los caracteres primitivos (Figura I.6). Este opistobranquio tendría una concha bien calcificada heterostrófica, con una espira

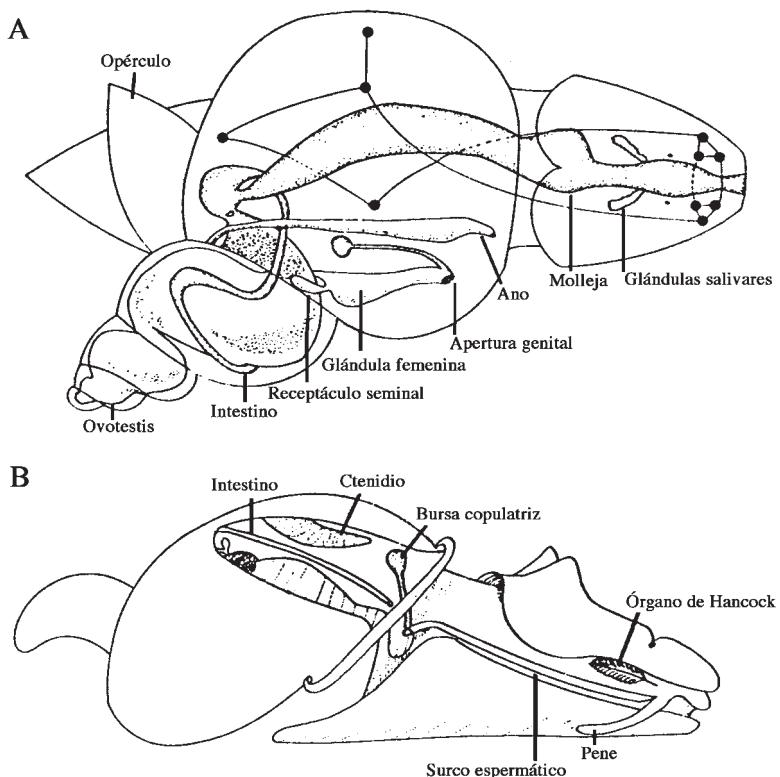


Fig. I.6. Hipotético opistobranquio ancestral. A, vista dorsal. B, vista lateral (modificado de Gosliner, 1981).

alargada y opérculo. La cavidad del manto se situaría en la parte anterior y albergaría al ctenidio y al osfradio. El ano y el gonoporo se situarían en el lateral derecho, el ventrículo sería posterior a la aurícula, el sistema digestivo tendría mandíbulas bien desarrolladas, una rádula ancha y glándulas salivares tubulares. El esófago se expandiría en una molleja y, posteriormente, desembocaría en un estómago con una cubierta quitinosa. En cuanto al sistema nervioso, sería de tipo estreptoneuro con los ganglios bien separados y un bucle visceral alargado. Finalmente, el sistema reproductor sería hermafrodita sin aislamiento de gametos femeninos y masculinos en el ovotestis. Los gametos serían conducidos anteriormente por un conducto preampular que se expandiría en una "ampolla" que almacenaría el esperma endógeno. El conducto hermafrodita se conectaría con la glándula femenina, aunque antes se uniría a él el conducto procedente del receptáculo seminal (donde se acumularía el esperma exógeno durante largos períodos de tiempo). La glándula femenina se compondría de glándula mucosa, de membrana y del albumen. En el gonoporo hermafrodita se juntaría el conducto de la bursa copulatriz (que recibe el esperma inmediatamente después de la copula y que también tiene una función gametolítica).

Desde el gonoporo saldría un surco ciliado abierto que conduciría el esperma hasta un pene céfálico no protusible. Las secreciones prostáticas se segregarían por las células glandulares epiteliales en el surco espermático. Este opistobranquio hipotético viviría probablemente en aguas superficiales y sería omnívoro.

I.1.2.2.- Opistobranchia: clasificación

Las estrechas similitudes morfológicas existentes entre los opistobranquios y los pulmonados menos derivados han complicado siempre la delimitación entre ellos. Determinados grupos de gasterópodos como Siphonariidae (Köhler, 1893; Tillier, 1984; Haszprunar y Huber, 1990), Succineidae (Rigby, 1965), Gymnomorpha (Fretter, 1943; Boettger, 1954; Ghiselin, 1966; Salvini-Plawen, 1970; Climo, 1980; Salvini-Plawen, 1980; Tillier, 1984; Haszprunar, 1985c; Salvini-Plawen, 1990) y Pyramidellidae (Thiele, 1931; Fretter y Graham, 1949; Taylor y Sohl, 1962; Franc, 1968; Golikov y Starobogatov, 1975; Thompson, 1976; Gosliner, 1981; Haszprunar, 1988b) han sido considerados como opistobranquios, como pulmonados o como gasterópodos primitivos (antiguos prosobranquios) por diferentes autores. Esta dispari-

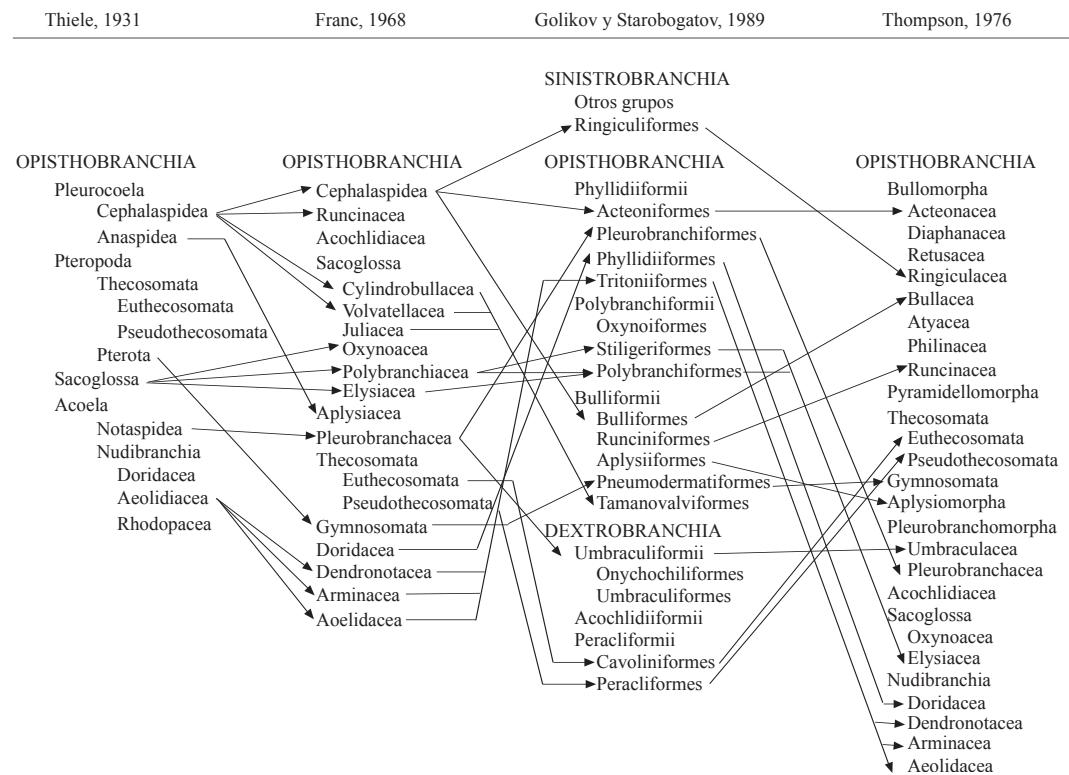


Fig. I.7. Algunas clasificaciones propuestas para Opistobranchia. Diferentes grupos pueden englobarse en otros más inclusivos según diferentes autores (ver flechas) (modificado de Bieler, 1992).

dad de criterios ha dado lugar a diversas clasificaciones y propuestas evolutivas dentro de los opistobranquios. Algunos ejemplos de clasificaciones alternativas propuestas se muestran en la figura I.7. De entre todas estas clasificaciones la de Thompson (1976) ha sido la más aceptada en épocas recientes. En esta clasificación, en la que Opistobranchia queda dividido en 9 órdenes, cabe destacar lo siguiente: 1) Pyramidellomorpha es reconocido como un orden de Opistobranchia, 2) Bullomorpha incluye todos los opistobranquios primitivos y 3) Pleurobranchomorpha incluye dos grupos bien diferenciados, Umbraculacea y Pleurobranchacea (Figura I.7). Sin embargo, las últimas revisiones han modificado sustancialmente esta clasificación de manera que Pyramidellomorpha no se considera actualmente un grupo de opistobranquios (Gosliner, 1981; Haszprunar, 1985c), Bullomorpha ha quedado dividido en Architectibranchia y Cephalaspidea *s.s.* (Mikkelsen, 1996; Mikkelsen, 2002) y finalmente, se considera que los dos integrantes de Pleurobranchomorpha no están relacionados entre sí, por lo que actualmente constituyen grupos independientes (Schmekel, 1985). Así mismo, Rhodopemorpha queda incluido dentro de Opistobranchia (Haszprunar y Huber, 1990; Salvini-Plawen, 1991).

Tabla I.4. Clasificación actual de Opistobranchia (Schmekel, 1985; Salvini-Plawen, 1991; Rudman y Willan, 1998; Schrödl et al., 2001; Mikkelsen 2002).

<u>Opistobranchia</u>
Architectibranchia
Cephalaspidea
Bulloidea
Philinoidea
Runcinoidea
Acochlidiomorpha
Acochlidioidae
Microhedyloidea
Rhodopemorpha
Anaspidea
Akeroidea
Aplysioidea
Sacoglossa
Oxynoidea
Elysioidea
Lymapontioidea
Thecosomata
Gymnosomata
Tylodinoidea
Pleurobranchoidea
Nudibranchia
Dexiarchia
Cladobranchia
Arminacea
Aeolidacea
Dendronotacea
Doridoxa
Anthobranchia

Por lo tanto, las clasificaciones más recientes proponen la existencia de 11 grupos principales dentro de Opistobranchia: Architectibranchia, Cephalaspidea, Acochlidiomorpha, Rhodopemorpha, Anaspidea, Sacoglossa, Thecosomata, Gymnosomata, Tylodinoidea, Pleurobranchoidea y Nudibranchia (Schmekel, 1985; Mikkelsen, 1996; Rudman y Willan, 1998; Mikkelsen, 2002) (Tabla I.4).

Architectibranchia es un grupo sin una diagnosis clara, que incluye a varias especies de opistobranquios basales cuya posición filogenética aún no está claramente definida (Mikkelsen, 2002). Como se ha indicado con anterioridad, este grupo se ha relacionado tradicionalmente con los cefalaspideos, aunque trabajos recientes han sugerido orígenes diferentes para ambos grupos (Mikkelsen, 1996; Mikkelsen, 2002). Architectibranchia está formado por formas primitivas que poseen una concha bien desarrollada, sistema nervioso esteptoneuro, gonoducto situado dentro de la cavidad del manto y en los que esta cavidad ha pasado de ser anterior a ser lateral (Haszprunar, 1985c; Mikkelsen, 1996). Carecen de molleja en el sistema digestivo y del surco ciliado externo para el transporte del esperma (Mikkelsen, 2002) (Figura I.8.A). Este grupo incluye Bullinidae, Aplustridae (+Hydatinidae) y Ringiculidae. Cabe destacar que el género *Acteon*, tradicionalmente relacionado con estos grupos, se excluye en la actualidad de los opistobranquios y se sitúa entre los heterobranchios basales o heterostrofos (Mikkelsen, 1996; Mikkelsen, 2002).

Cephalaspidea es un grupo numeroso de opistobranquios que en su mayoría poseen una concha bien desarrollada, aunque en algunas ocasiones la han perdido. Son principalmente carnívoros, si bien algunos grupos son herbívoros. La mayoría vive en ambientes arenosos o fangosos, por lo que han desarrollado un modo de vida excavador. Su sistema nervioso es típico de Euthyneura y poseen un par de órganos quimiorreceptores (órgano de Hancock) en los laterales de la regióncefálica (Schmekel, 1985; Rudman y Willan, 1998) (Figura I.8.B). Bulloidea, Philinoidea y Runcinoidea están incluidos en este grupo.

Acochlidiomorpha es un grupo intersticial poco conocido. Estos organismos viven entre el fango y la arena, principalmente en ambientes marinos, aunque también hay especies de agua dulce. Son de pequeño tamaño y han perdido totalmente la concha y el opérculo. Se alimentan de los microorganismos existentes entre el fango y la arena (Rudman y Willan, 1998) (Figura I.8.C). Algunos géneros incluidos en este grupo son: *Acochlidium*, *Strubellia*, *Hedylopsis* y *Microhedyle*.

Rhodopemorpha es un grupo intersticial cuyas afinidades con los opistobranquios han sido discutidas durante mucho tiempo (Haszprunar y Huber, 1990; Salvini-Plawen, 1991). Son organismos de pequeño tamaño que han perdido la concha, la rádula, las mandíbulas y el corazón (Rudman y Willan, 1998) (Figura I.8.D). Hasta el momento, tan sólo se han descrito seis especies, englobadas en los géneros *Rhodope* y *Helminthope*.

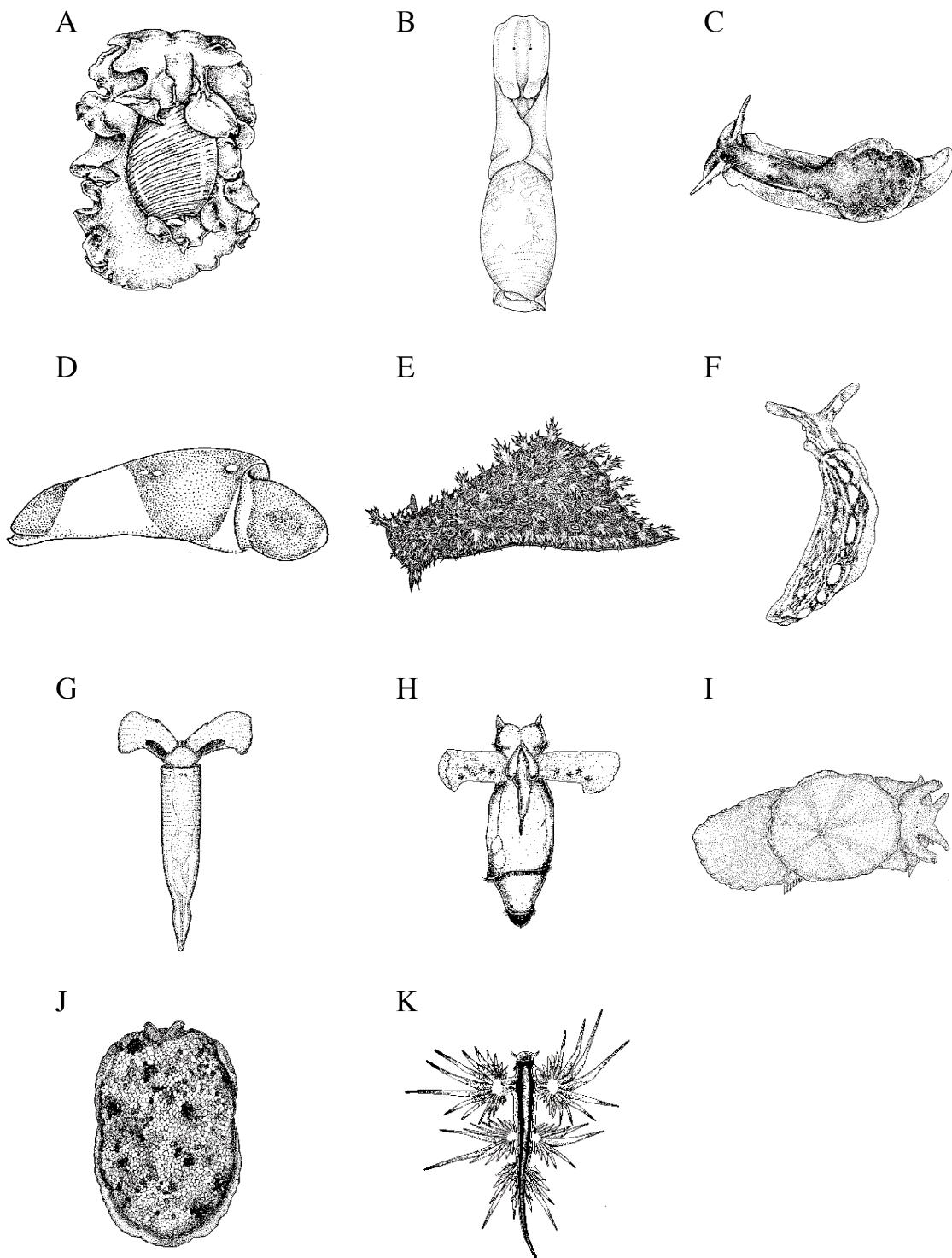


Fig. I.8. Representantes de los 11 grupos considerados actualmente dentro de Opisthobranchia: A, Architectibranchia: *Hydatina physis*. B, Cephalaspidea: *Liloa* sp. C, Acochlidideomorpha: *Acochlidium fijense*. D, Rhodopemorpha: *Rhodope* sp. E, Anaspidea: *Bursatella leachii*. F, Sacoglossa: *Thuridilla* sp. G, Thecosomata: *Creseis chierchiae*. H, Gymnosomata: *Pneumodermopsis paucidens*. I, Tylodinoidea: *Tylodina corticalis*. J, Pleurobranchoidea: *Pleurobranchus peronii*. K, Nudibranchia: *Glaucus atlanticus*. (reproducido de Rudman y Willan, 1998).

Anaspidea está constituido por especies generalmente de tamaño grande, en los que la concha ha quedado reducida a una placa interna o se ha perdido completamente. La mayoría de las especies cuenta con unos par apodios (expansiones del manto) de gran tamaño que pueden ser usados para la natación. Los anaspídeos cuentan con novedades evolutivas, como son diferentes glándulas (opalina y púrpura) que proyectan sustancias de color oscuro que les sirven para aturdir a sus depredadores (Rudman y Willan, 1998) (Figura I.8.E). Este grupo incluye Akeridae, Aplysiidae, Dolabriferidae y Notarchidae.

Sacoglossa es un grupo de opistobranquios muy homogéneo desde el punto de vista ecológico y anatómico (con un tipo de rádula uniseriado muy particular), puesto que casi todas las especies son herbívoras especialistas que se alimentan del citoplasma de las algas marinas. Los cloroplastos procedentes de las algas de las que se alimentan pueden quedar almacenados en las células de la glándula digestiva y persistir funcionales durante varias semanas (Clark *et al.*, 1990). Las especies más primitivas tienen una concha bien desarrollada, en otras se ha reducido a una concha de pequeño tamaño que cubre sólo la parte visceral, pero la mayor parte de las especies la han perdido por completo (Jensen, 1996) (Figura I.8.F). Los grupos principales en los que se subdividen los sacoglosos son Oxynooidea, Elysioidae y Lymapontioidea.

Thecosomata incluye opistobranquios planctónicos que están presentes en todos los océanos y que se alimentan de fitoplancton. Se conocen en torno a 60 especies (van der Spoel, 1976) muy variables en su morfología. La mayoría tienen concha, aunque algunas especies la han perdido. Su tamaño es variable e incluye tanto especies pequeñas (en torno a 2 mm) como otras mayores (80 mm). Algunas especies tienen unos parapodiums de gran tamaño que se expanden a modo de alas, por lo que se les llama comúnmente "mariposas del mar" (Rudman y Willan, 1998) (Figura I.8.G). *Limacina*, *Clio*, *Cavolinia* y *Cresseis* son algunos de los géneros más representativos de este grupo.

Gymnosomata fue en un primer momento relacionado con Thecosomata (Morton, 1958a). Sin embargo, estudios morfológicos recientes han demostrado que en realidad ambos son dos grupos bien diferenciados que han evolucionado de manera paralela por compartir un modo de vida planctónico. Gymnosomata carece de concha, manto y cavidad del manto en estado adulto, tiene simetría bilateral y se alimenta de tecosomados (Rudman y Willan, 1998) (Figura I.8.H). Algunos géneros que comprende Gymnosomata son: *Pneumoderma*, *Notobranchaea*, *Cliopsis* y *Clione*.

Tylodinoidea (=Umbraculoidea) es un grupo formado por opistobranquios con una concha similar a la de las lapas en la que el animal no es capaz de retraerse. Tienen una cavidad del manto reducida y limitada a la parte posterior derecha, que alberga un ctenidio bipectinado y un osfradio. Se caracterizan por poseer un pie de gran tamaño y tres pares de apéndicescefálicos: velo oral (expansiones del manto), tentáculos orales y rinóforos (estructuras sensoriales) (Schmek et al., 1985) (Figura I.8.I). *Tylodina* y *Umbraculum* son los géneros más representativos de este grupo.

Pleurobranchoidea está constituido por organismos sin concha externa. En el caso de que exista concha siempre es interna y muy delgada. Poseen una única branquia, situada en el lado derecho, velo oral, tentáculoscefálicos y rinóforos (Rudman y Willan, 1998) (Figura I.8.J). Como se ha comentado con anterioridad, Tylodinoidea y Pleurobranchoidea se han considerado tradicionalmente como un único orden, Pleurobranomorpha o Notaspidea, aunque en la actualidad se consideran grupos independientes. *Berthella*, *Pleurobranchaea* y *Bathyberthella* son algunos géneros incluidos en este grupo.

Nudibranchia es el grupo de opistobranquios más diverso y numeroso. Ningún nudibranquio posee concha ni opérculo en estado adulto. Se encuentran en todos los océanos y son mayoritariamente bentónicos, aunque hay algunas especies planctónicas o pelágicas. Todos los nudibranquios son carnívoros y se alimentan de una gran diversidad de presas. Se caracterizan también por presentar una amplia variedad de estrategias defensivas que incluyen, entre otras, la presencia de glándulas productoras de sustancias repelentes, la incorporación de los nematocistos de los cnidarios de los que se alimentan y la adquisición de colores llamativos con una función aposemática o mimética (Wägele y Willan, 2000) (Figura I.8.K). Los nudibranquios se dividen en dos grupos principales: Anthobranchia y Dexiarchia (Wägele y Willan, 2000; Schrödl et al., 2001). El primero incluye los nudibranquios conocidos como dorídos (Dorioidea; ej. *Aldisa*, *Platydoris* y *Hypselodoris*) y el género *Bathydoris*. El segundo incluye Cladobranchia (Aeolidacea, Dendronotacea y Arminacea) y el género *Doridoxa*.

I.1.2.3.- Opisthobranchia: relaciones evolutivas internas

Como se ha comentado anteriormente, la delimitación de Opisthobranchia ha resultado un problema difícil de resolver durante más de un siglo y aún hoy la cuestión sigue abierta. Por lo tanto, la monofilia del grupo es también un tema controvertido y ha sido aceptada o rechazada según diferentes autores.

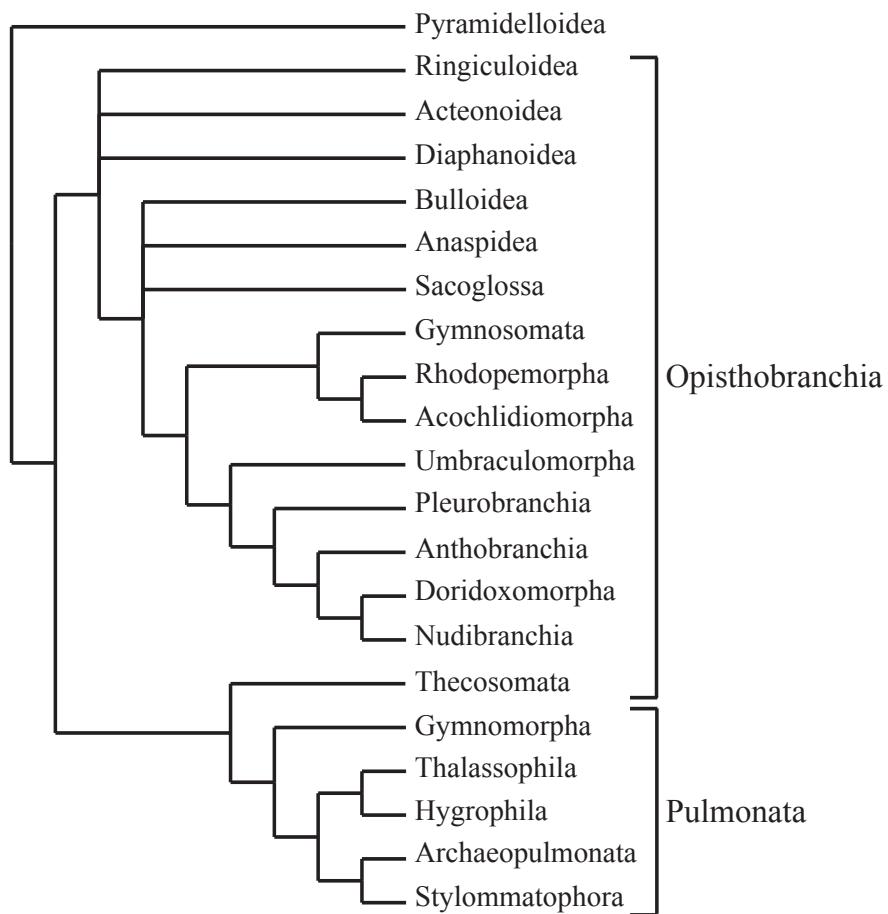


Fig. I.9. Hipótesis filogenética de Euthyneura propuesta por Salvini-Plawen y Steiner (1996), basada en datos morfológicos.

Varios trabajos han abordado el problema de la monofilia de los opistobranquios realizando estudios morfológicos. Boettger (1954), basándose en atributos de la concha y del sistema nervioso central, defiende la parafilia de los opistobranquios y describe un cuadro evolutivo en el que los cefalaspídeos son el grupo antecesor del que pulmonados y el resto de opistobranquios diverge. Ghiselin (1966), basándose en la anatomía del sistema reproductor, en el número de cromosomas y en la morfología de los espermatozoides, defiende la monofilia de los opistobranquios, situándolos como grupo hermano de los pulmonados. Gosliner (1981) apoya la existencia de un ancestro común entre pulmonados y opistobranquios, así como la monofilia de estos últimos. También define dos sinapomorfías para los opistobranquios: la presencia de un escudo céfálico bien desarrollado y del órgano de Hancock. Salvini-Plawen y Steiner (1996) realizaron un análisis cladístico exhaustivo de Euthyneura. La monofilia de los opistobranquios era rechazada por la posición de los tecosomados

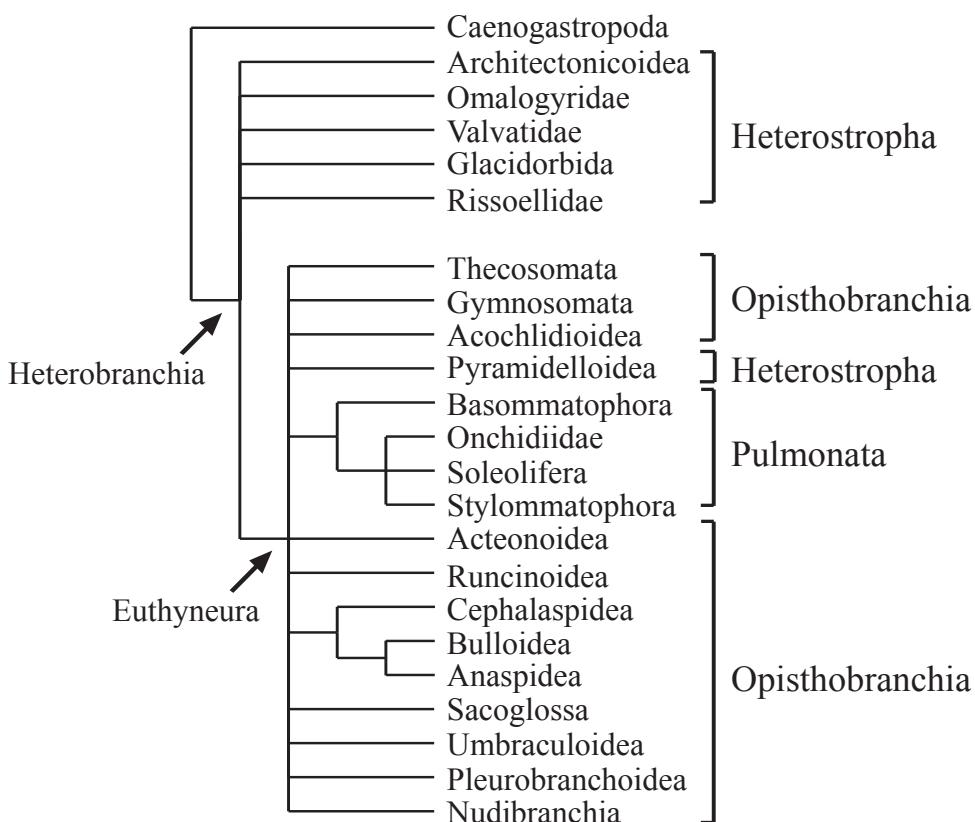


Fig. I.10. Hipótesis filogenética de Euthyneura propuesta por Dayrat y Tillier (2002), basada en datos morfológicos.

situados como grupo hermano de los pulmonados (Figura I.9). Sin embargo, el resto de los opistobranquios comparten una sinapomorfía: la presencia de una prolongación nerviosa en el nervio labio-tentacularis, que inerva la zona del órgano de Hancock. Como se ha comentado con anterioridad, Ponder y Lindberg (1997) realizaron un estudio de las relaciones evolutivas de los gasterópodos con especial atención en los más primitivos (antiguos prosobranquios). En su análisis sólo consideran cuatro miembros de Euthyneura (dos opistobranquios: Acteonidae y Aplysiidae, y dos pulmonados: Amphibolidae y Chilinidae) (Figura I.3). Los resultados obtenidos por dichos autores apoyan la parafilia de los opistobranquios. Dayrat y Tillier (2002) realizan también un análisis cladístico usando un mayor número de especies de pulmonados y opistobranquios. Los resultados carecen de resolución suficiente ya que obtienen una polifilia basal, en la que pulmonados y opistobranquios se entremezclan (Figura I.10). Finalmente, Mikkelsen (2002) apoya la monofilia de Opisthobranchia y defiende tres sinapomorfías para el grupo: la pérdida del opérculo en el estado adulto, la presencia de parapodios y la pérdida de una cámara situada en la parte posterior del estómago.

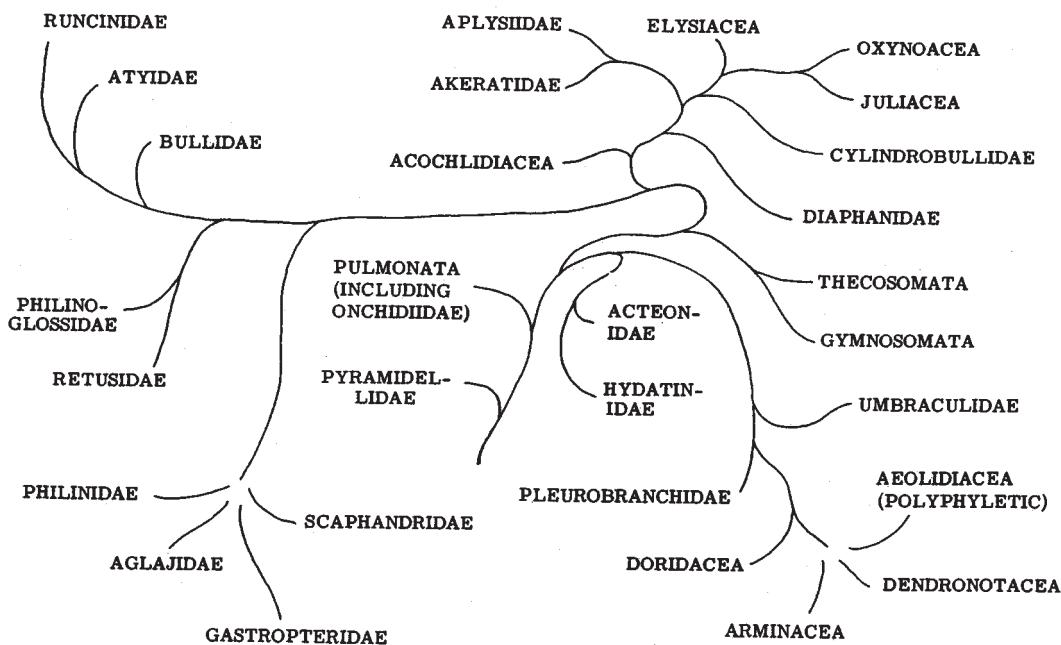


Fig. I.11. Hipótesis evolutiva de Opistobranchia propuesta por Ghiselin (1966), basada en datos morfológicos.

A pesar de todos estos estudios, la realidad es que no hay ninguna sinapomorfía que defina y compartan todos los integrantes de Opistobranchia (siempre hay alguna excepción que rechaza las sinapomorfías anteriormente descritas) debido a su gran diversidad morfológica. Por lo tanto, la mayoría de los autores hablan de tendencias evolutivas dentro del grupo, más que de sinapomorfías.

Muy pocos de estos estudios incluían taxones suficientes como para establecer de forma resolutiva las relaciones filogenéticas entre los diferentes grupos de opistobranquios. Ghiselin (1966) describe un árbol en el que los arquitectibranquios serían el grupo basal del que divergirían el resto de los opistobranquios: por un lado los cefalaspídeos, por otro acoclidáceos, anaspídeos y sacoglosos, por otro lado tecosomados y gimnosomados y, finalmente, otra línea la formarían tilodinoideos, pleurobrancoideos y nudibranquios (Figura I.11). Posteriormente, Salvini-Plawen y Steiner (1996) en su análisis cladístico obtienen a los arquitectibranquios como grupo basal. Por otra parte, cefalaspídeos, anaspídeos y sacoglosos quedan en una politomía basal como grupos hermanos del resto de los opistobranquios, que incluyen: por un lado gimnosomados, rodopemorfos y acoclidáceos, y por otro tilodinoideos, pleurobrancoideos y nudibranquios (Figura I.9). Finalmente, los cladogramas obtenidos por Dayrat y Tillier (2002) en base a caracteres morfológicos, no tienen resolución para ningún nodo que

resuelva relaciones entre grupos de opistobranquios, excepto para el que apoya la relación entre cephalaspideos y anaspideos (Figura I.10).

Además de las dificultades existentes a la hora de establecer las relaciones filogenéticas debido a la coexistencia de caracteres primitivos y derivados en algunos grupos de opistobranquios, un problema adicional, ampliamente comentado en la literatura, hace referencia a la evolución paralela que se ha producido en diferentes grupos dentro de Opisthobranchia (Gosliner y Ghiselin, 1984; Gosliner, 1985; Gosliner, 1991; Mikkelsen, 1996). Un hecho tan fundamental en la historia evolutiva del grupo como es la reducción o pérdida de la concha se ha producido varias veces a lo largo de la evolución de las distintas líneas dentro de Opisthobranchia. Se han demostrado otras evidencias de evolución paralela también en otros aspectos y tendencias dentro de los opistobranquios, como son: la detorsión (y por lo tanto la posición de la cavidad del manto), la adquisición de la condición eutineura, la cepalización (concentración de los diferentes ganglios alrededor del esófago en distintos grados de fusión), la pérdida del ctenidio, la pérdida de la rádula, la adquisición de ceratas (prolongaciones tubulares situadas a ambos lados del cuerpo que actúan como estructuras respiratorias y que pueden tener terminaciones de la glándula digestiva), la separación de gametos femeninos y masculinos y la separación de conductos para el esperma endógeno y exógeno (Gosliner y Ghiselin, 1984; Gosliner, 1991).

También se han realizado estudios moleculares para dilucidar sobre la monofilia de Opisthobranchia y las relaciones filogenéticas dentro del grupo. La mayoría de los trabajos para inferir la filogenia de los gasterópodos se han basado en genes nucleares (28S y 18S ARNr) (Rosenberg *et al.*, 1994; Tillier *et al.*, 1994; Tillier *et al.*, 1996;

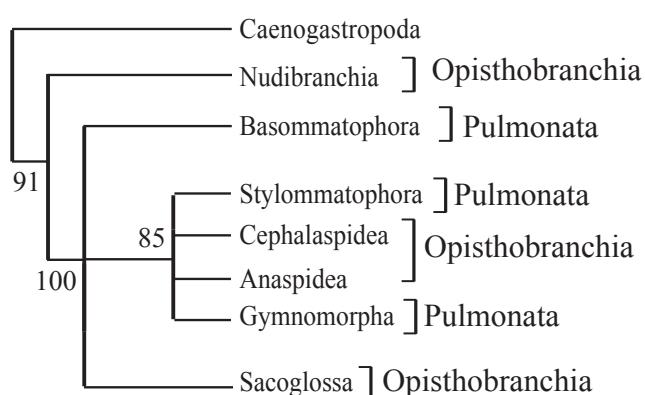


Fig. I.12. Hipótesis filogenética de Euthyneura propuesta por Wollscheid y Wägele (1999), basada en la secuencia del gen nuclear 18S ARNr.

Winneppenninckx *et al.*, 1998; Wollscheid y Wägele, 1999; Yoon y Kim, 2000; Dayrat *et al.*, 2001). Sin embargo, las hipótesis filogenéticas resultantes de estos estudios no están resueltas y los nodos que apoyan o rechazan la monofilia de los opistobranquios carecen de apoyo estadístico en la mayoría de los casos.

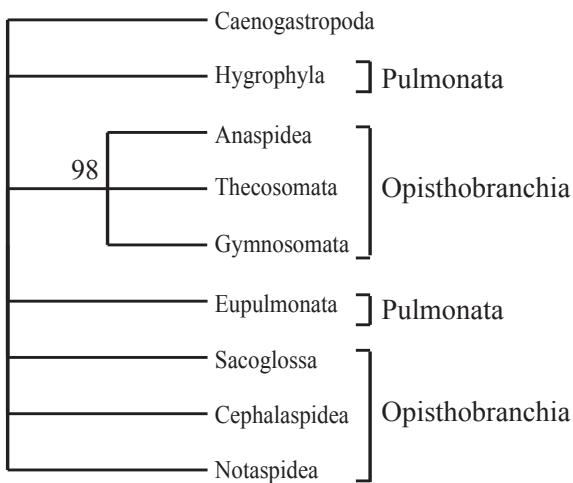


Fig. I.13. Hipótesis filogenética de Euthyneura propuesta por Dayrat y Tillier (2001) basada la secuencia del gen nuclear 28S ARNr. El número indica el valor de "bootstrap" para el nodo.

man un grupo que es a su vez grupo hermano de sacoglosos y pulmonados (basomatóforos) (Figura I.12). Los nudibraquios quedan en una posición basal. En el trabajo de Dayrat *et al.* (2001) (que se basa en el gen nuclear 28S ARNr y que considera 9 grupos de opistobranquios) el único clado con soporte es el que relaciona anaspideos con tecosomados y gimnosomados (Figura I.13).

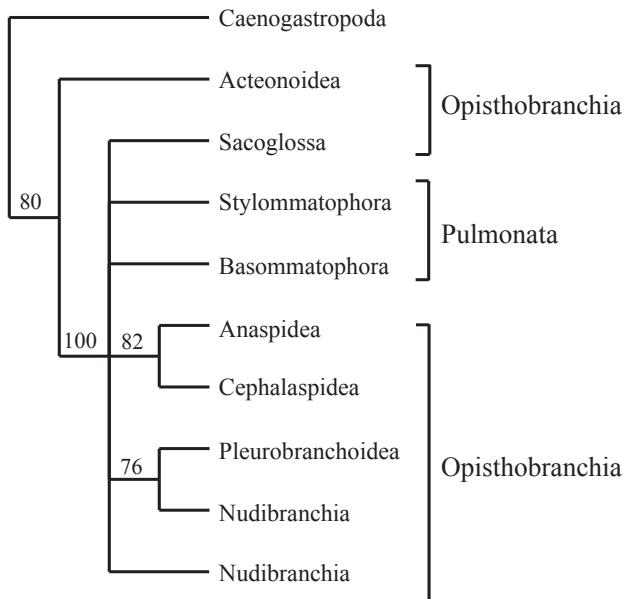


Fig. I.14. Hipótesis filogenética de Euthyneura propuesta por Thollesson (1999b) basada en la secuencia parcial del gen mitocondrial *rrnL*. Los números indican los valores de "bootstrap" para los nodos.

De todos estos trabajos, los de Wöllschied y Wägele (1999) y Dayrat *et al.* (2001) incluyen representantes de varias líneas de opistobranquios y permiten inferir relaciones evolutivas entre ellos. En el primero (que se basa en el gen nuclear 18S ARNr y que incluye 4 grupos de opistobranquios), cefalaspideos, anaspideos y dos grupos de pulmonados (estilomatóforos y gimnomorfos) for-

Por otra parte, Thollesson (1999b) infirió las relaciones evolutivas entre 6 grupos de opistobranquios y dos grupos de pulmonados (Stylommatophora y Basommatophora) basándose en la secuencia parcial (450 pb) de un gen mitocondrial (*rrnL*). Los resultados rechazan la monofilia de los opistobranquios. Los arquitectibranquios quedan como el grupo basal; los cefalaspideos y anaspideos como grupos hermanos y, finalmente, los nudibranchios serían

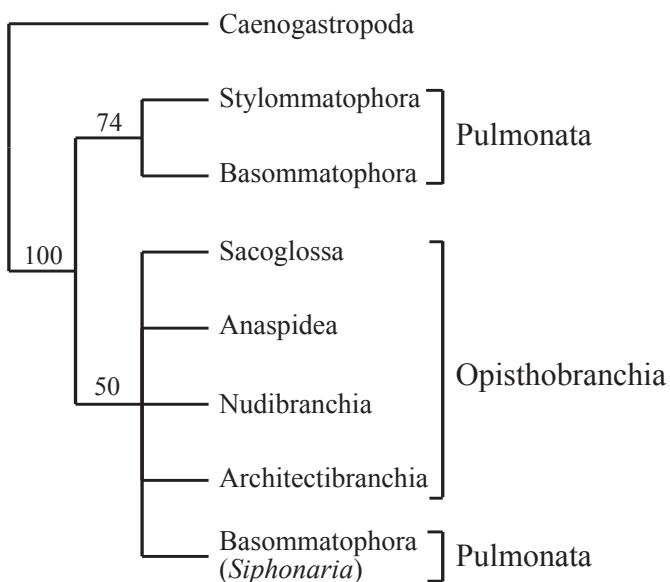


Fig. I.15. Hipótesis filogenética de Euthyneura propuesta por Remigio y Hebert (2003), basada en la secuencia parcial del gen mitocondrial *cox1*. Los números indican los valores de "bootstraps" para los nodos.

En resumen, puede decirse que los trabajos moleculares existentes hasta la fecha no aportan resolución suficiente acerca de la sistemática de Opisthobranchia debido al bajo soporte en la mayoría de los nodos. Por otra parte, el volumen de caracteres empleados para inferir las filogenias (en este caso el número de nucleótidos) resulta claramente insuficiente para el nivel de análisis escogido en la mayor parte de los casos. Así mismo, la representación de los diferentes linajes de opistobranquios y pulmonados varía mucho de unos estudios a otros.

I.1.3.- Pulmonata: características generales

Los pulmonados son gasterópodos mayoritariamente terrestres o dulceacuícolas, aunque hay algunos géneros marinos. Tienen la configuración general de un gasterópodo con cabeza, pie y masa visceral. La mayoría tiene una concha con una espiral bien desarrollada y carecen de opérculo, aunque en algunos grupos la concha ha quedado reducida a una simple placa (semejante a la de las lapas) o incluso se ha perdido. La cavidad del manto carece de ctenidio (aunque en algunas ocasiones se ha desarrollado una branquia secundaria o pseudobranquia) y de glándulas hipobran-

parafiléticos, debido a que los pleurobrancoideos resultan el grupo hermano de una rama de nudibranquios (Figura I.14). Recientemente, se ha publicado una filogenia de los principales grupos de gasterópodos en base a un fragmento corto (650 pb) del gen mitocondrial *cox1* (Remigio y Hebert, 2003). Sin embargo, los resultados de este estudio no son concluyentes en cuanto a la monofilia de los opistobranquios ni en lo que se refiere a sus relaciones internas, ya que el árbol inferior carece de soporte estadístico (Figura I.15).

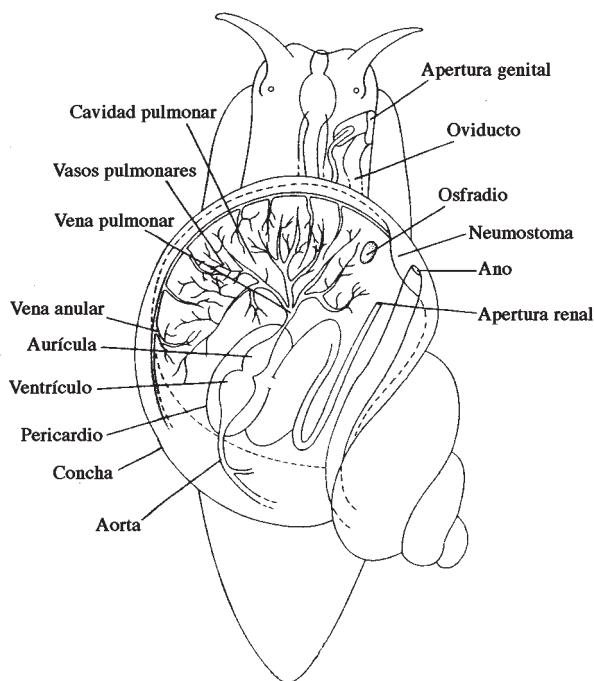


Fig. I.16. Esquema de la cavidad pulmonar de un pulmonado dulceacuícola (Basommatophora) (modificado de Smith y Stanisic, 1998).

quiales. El osfradio se ha perdido en las formas terrestres. El sistema nervioso es mayoritariamente eutineuro y el bucle visceral es significativamente más corto. Los pulmonados son hermafroditas simultáneos con diferentes grados de fusión en los tractos reproductores femeninos y masculinos. Desde el punto de vista taxonómico, caracteres como la forma general del cuerpo, el color, la forma de la concha y la posición de la cavidad del manto y las estructuras presentes en la región cefálica son de gran importancia (Smith y Stanisic, 1998)

El principal rasgo que caracteriza al grupo es la presencia de una cavidad pulmonar. En los pulmonados, los bordes del manto se fusionan y se reduce la apertura de la cavidad paleal hasta que queda reducida a un poro contráctil, llamado neumostoma (localizado en la parte derecha del cuerpo). La pared interna de la cavidad del manto está muy vascularizada, permitiendo el intercambio respiratorio (Figura I.16); es el pulmón o cavidad pulmonar (Smith y Stanisic, 1998). La mayoría de los pulmonados tiene este tipo de respiración, aunque algunas formas retienen unas branquias secundarias situadas en la cavidad del manto. En general, las formas acuáticas pueden respirar por el pulmón, por la piel o por las branquias secundarias, aunque nunca poseen un verdadero ctenidio (Haszprunar, 1985c)

I.1.3.1.- Pulmonata: origen

Los primeros registros fósiles de pulmonados terrestres son del Paleozoico (Carbonífero Superior) (Solem y Yochelson, 1979). En cambio, otros pulmonados de agua dulce y terrestres (basomatóforos) no aparecen en el registro fósil hasta el

Jurásico (Solem y Yochelson, 1979). Ya se han comentado con anterioridad las dificultades para discernir la división entre pulmonados y opistobranquios (Apartado I.1.2.2.). La mayoría de los autores han buscado caracteres del sistema nervioso para delimitar ambos grupos e indagar su origen. Así, se ha señalado la importancia de dos caracteres para la diferenciación de ambos grupos: la presencia de una inervación de tipo estreptoreuro en los tentáculos céfálicos y la ausencia del nervio del rinóforo (presente en opistobranquios y piramidélidos) caracterizaría la línea evolutiva de los pulmonados (Huber, 1987; Haszprunar, 1988b). Sin embargo, permanece aún sin aclarar si el procerebro (estructura neurosecretora) de los pulmonados y el ganglio del rinóforo de opistobranquios y piramidélidos son estructuras homólogas, hecho que algunos autores ponen en duda (van Mol, 1967; Haszprunar, 1988b; Haszprunar y Huber, 1990).

I.1.3.2.- Pulmonata: clasificación

Se han propuesto diversos sistemas de clasificación para los pulmonados (Salvini-Plawen, 1970; Tillier, 1984; Haszprunar y Huber, 1990; Nordsieck, 1992; Dayrat *et al.*, 2001) (Figura I.17). Estas clasificaciones difieren significativamente unas de otras en la agrupación de los diferentes taxones, así como en la categoría dada a los grupos.

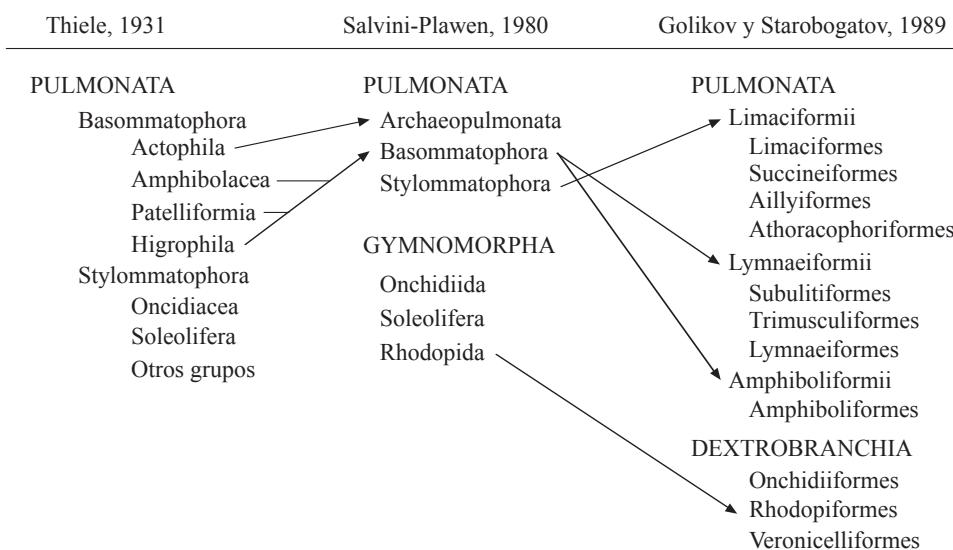


Fig. I.17. Algunas clasificaciones propuestas para Pulmonata. Diferentes grupos pueden englobarse en otros más inclusivos según diferentes autores (ver flechas) (modificado de Bieler, 1992).

Tabla I.5. Clasificación actual de Pulmonata (Haszprunar y Huber, 1990; Smith y Stanisic, 1998).

Pulmonata
Systellommatophora
Otinoidea
Onchidioidea
Rathousioidea
Basommatophora
Amphiboloidea
Siphonarioidea
Lymnaeoidea
Glacidorboidea
Eupulmonata
Actophila
Trimusculiformes
Stylommatophora

La clasificación propuesta por Haszprunar y Huber (1990) es la más aceptada por la generalidad de los malacólogos actuales. Esta clasificación reconoce tres grupos principales dentro de los pulmonados: Systellommatophora, Basommatophora y Eupulmonata (Tabla I.5).

Systellommatophora son pulmonados marinos mayoritariamente sin concha, aunque hay alguna especie que retiene una concha externa reducida. La cavidad pulmonar se encuentra en una posición posterior o bien está ausente. Son hermafroditas con separación de conductos masculinos y

femeninos. Incluye Otinoidea, Onchidioidea y Rathousioidea (Haszprunar y Huber, 1990; Smith y Stanisic, 1998) (Figura I.18.A).

Basommatophora incluyen a pulmonados con concha que viven tanto en ambientes terrestres como acuáticos (marinos y dulceacuícolas). La forma de la concha varía desde formas con una espira bien desarrollada hasta otras de tipo pateliforme. La respiración se lleva a cabo mediante pulmón, branquias secundarias y/o a través del epitelio. Son hermafroditas con separación de conductos femeninos y masculinos. Este grupo incluye Siphonarioidea, Amphiboloidea, Lymnaeoidea y Glacidorboidea (Haszprunar y Huber , 1990; Smith y Stanisic, 1998) (Figura I.18.B).

Eupulmonata está formado por gasterópodos que viven en ambientes marinos y terrestres. La mayoría posee una concha, aunque algunos grupos la han modificado o perdido. No hay opérculo en el estado adulto, ni osfradio ni filas ciliadas en la cavidad paleal. Los ojos se sitúan en la base de los tentáculos contráctiles o en el extremo de un par de tentáculos invaginables. Este grupo incluye Ellobioidea, Trimusculidae y Stylommatophora (Haszprunar y Huber , 1990; Smith y Stanisic, 1998) (Figura I.18.C). Dentro de Eupulmonata cabe destacar a Ellobioidea, un grupo con muchos caracteres morfológicos primitivos y que vive mayoritariamente en ambientes con influencia marina, en contraste con el resto de eupulmonados principalmente terrestres.

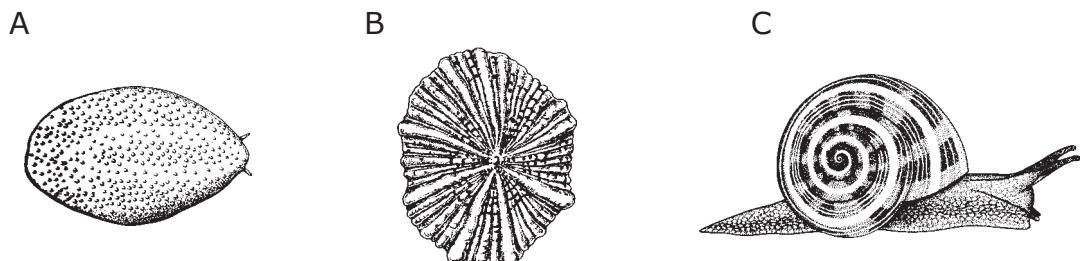


Fig. I.18. Representantes de los 3 grupos considerados actualmente dentro de Pulmonata: A, Systelommatophora: *Platevindex chameleon*. B, Basommatophora: *Siphonaria atra*. C, Eupulmonata: *Theba pisana* (reproducido de Smith y Stanisic, 1998).

I.1.3.3.- Pulmonata: relaciones evolutivas internas

Mientras que las formas primitivas de pulmonados son marinas, la mayoría de las formas derivadas son de agua dulce o terrestres. Las diferentes presiones selectivas ocasionadas por estos ambientes se ven reflejadas en la existencia de diferentes planes corporales. Como resultado, los pulmonados poseen caracteres diferenciales entre los diferentes grupos, como son una variedad de estructuras respiratorias y estrategias de desarrollo particulares, que complican la definición de sus relaciones (Gosliner, 1981). A pesar de estas diferencias, se han definido también novedades evolutivas en el sistema nervioso comunes a todos los grupos. Los pulmonados comparten un complejo sistema neurosecretor formado por procerebro, glándula cerebral y cuerpos dorsales (van Mol, 1967; van Mol, 1974). Otros caracteres, como la presencia de cavidad pulmonar, neumostoma, tentáculos anteriores transformados en palpos labiales, mandíbulas con elementos impares en la parte dorsal y la glándula del albumen con un conducto independiente, también se han considerado como sinapomorfías del grupo (Salvini-Plawen, 1970; Tillier, 1984; Nordsieck, 1992; Dayrat y Tillier, 2002).

Se han propuesto varias hipótesis para definir las relaciones evolutivas entre los diferentes grupos de pulmonados utilizando caracteres morfológicos (Tillier, 1984; Haszprunar y Huber, 1990; Nordsieck, 1992; Dayrat y Tillier, 2002).

Tillier (1984) considera válidos Stylommatophora y Basommatophora y agrupa el resto de pulmonados en un grupo llamado Archaeopulmonata simplemente por su similitud en caracteres primitivos del sistema nervioso y del sistema reproductor. Haszprunar y Huber (1990) definen varias sinapomorfías morfológicas para cada uno de los grupos que ellos consideran (Basommatophora, Systelommatophora y

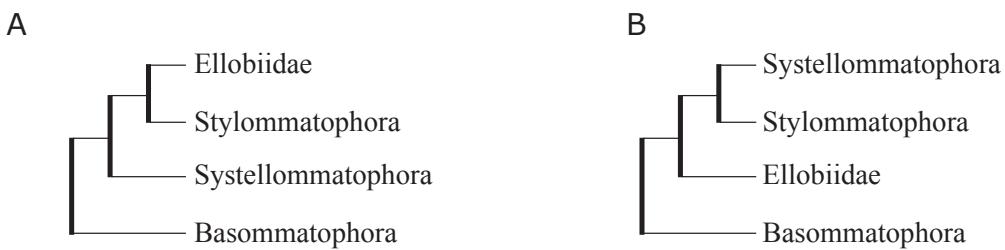


Fig. I.19. Diferentes hipótesis acerca de la historia evolutiva de Pulmonata basadas en datos morfológicos. A, Nordsieck (1992). B, Dayrat y Tillier (2002).

Eupulmonata) y defienden la estrecha relación entre Systellommatophora y Eupulmonata, patente en caracteres como el tamaño de las células nerviosas del procerebro y en el hecho de que la totalidad de los taxones respiran aire a través de un neumostoma contráctil. Nordsieck (1992) modifica el esquema de Haszprunar y Huber al incluir Systellommatophora dentro de Eupulmonata, basándose en las similitudes descritas por estos autores además de la reducción del lóbulo posterior del manto, la ausencia de osfradio y la reducción de las filas ciliares en la cavidad del manto (Figura I.19.A). Por último, Dayrat y Tillier (2002) propusieron una alternativa radicalmente diferente, en la que Systellommatophora y Stylocephalidae estarían estrechamente relacionados y compartirían varias sinapomorfías. Como grupo hermano de ambos se situarían Ellobiidae y, finalmente, Basommatophora estaría en una posición basal al resto (Figura I.19.B).

Los pocos trabajos filogenéticos de pulmonados basados en datos moleculares proponen también hipótesis contradictorias. La monofilia de los pulmonados es apoyada por los resultados de un estudio filogenético basado en la secuencia de un fragmento del gen nuclear 28S ARNr y de la región espaciadora ITS2 (1.460 pb) (Wade y Mordan, 2000) (Figura I.20.A). Según este estudio, Stylocephalidae también constituiría un grupo natural, pero no así Systellommatophora ni Eupulmonata, cuyos representantes formarían una politomía. El basomatóforo *Siphonaria* se sitúa en una posición basal (Figura I.20.A). El mismo año, se publicó otro trabajo basado en el análisis de la secuencia de un fragmento del gen nuclear 18S ARNr (1.850 pb) (Yoon y Kim, 2000) (Figura I.20.B). En este estudio, no se obtiene ni la monofilia de Pulmonata, ni la de Eupulmonata, ni la de Basommatophora. Los basomatóforos dulceacuícolas estarían en una posición basal con respecto al resto de eutineuros y separados de los basomatóforos marinos (Figura I.20.B). Finalmente, otro estudio basado en la secuencia parcial del gen mitocondrial *cox1* (650 pb) (Remigio y

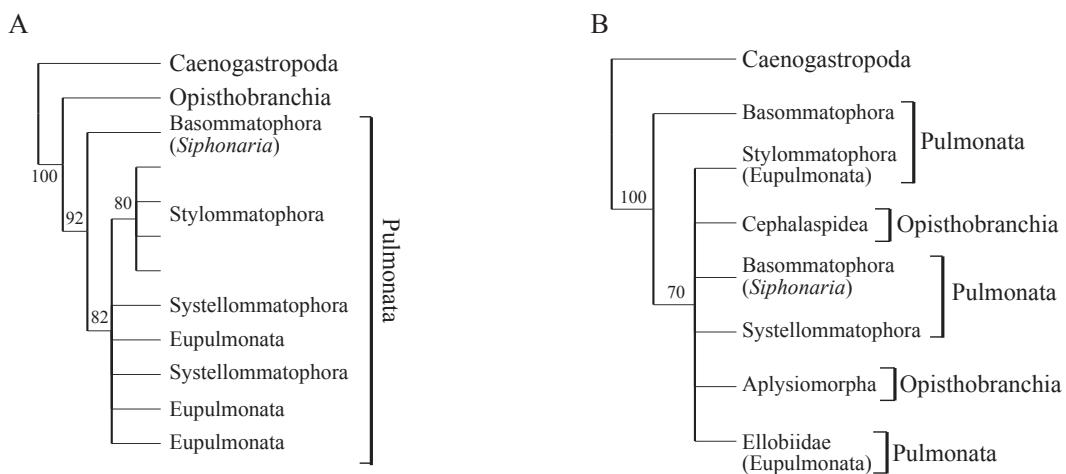


Fig. I.20. Diferentes hipótesis acerca de la historia evolutiva de Pulmonata basadas en datos moleculares. A, Wade y Mordan (2000) (ITS2 y 28S ARNr). B, Yoon y Kim (2000) (18S ARNr).

Hebert, 2003), tampoco obtiene la monofilia de Pulmonata. El basomatóforo marino *Siphonaria* se incluye dentro de los opistobranquios. El resto de los basomatóforos constituyen el grupo hermano de Stylommatophora (monofilético) (Figura I.15).

I.2.- INFERNICIA FILOGENÉTICA BASADA EN DATOS MOLECULARES

Como hemos visto, los eutineuros constituyen un grupo de gasterópodos muy interesante y controvertido desde el punto de vista filogenético. La existencia de formas mosaico (compuestas por una mezcla de caracteres primitivos y derivados) y de fenómenos de homoplasia, han condicionado claramente el establecimiento de una filogenia robusta para el grupo basada en estudios morfológicos (Gosliner y Ghiselin, 1984; Gosliner, 1991). Para intentar solucionar estos problemas filogenéticos, en esta tesis se ha llevado a cabo una aproximación molecular. Se han generado datos de secuencia y se han aplicado los métodos de inferencia filogenética más modernos con el objetivo de estudiar el origen y las relaciones evolutivas de Euthyneura, con especial atención a Opisthobranchia. A continuación, se van a describir las bases teóricas de la sistemática molecular y de los métodos de inferencia filogenética empleada en esta tesis. La metodología utilizada para la obtención de los datos moleculares en el laboratorio se describe en las secciones de material y métodos de los trabajos que forman el apartado de resultados.

I.2.1.- Sistemática molecular: ventajas y desventajas

La sistemática molecular utiliza la información filogenética presente en los datos moleculares para reconstruir árboles que reflejen las relaciones evolutivas entre especies (siempre y cuando los datos moleculares analizados sean homólogos, ver más adelante). De entre los posibles datos moleculares, el uso de las secuencias para la reconstrucción filogenética es creciente, ya que ofrece numerosas ventajas con respecto a la aproximación tradicional morfológica. Entre estas ventajas destacan la gran cantidad de caracteres disponibles para el análisis (Hillis, 1987), un alto rango de tasas de sustitución presentes en los distintos genes (lo que proporciona diferentes niveles de variabilidad), un amplio conocimiento de las bases moleculares y genéticas que rigen la evolución de las secuencias, la universalidad de este tipo de caracteres y el hecho de que la selección y definición de los caracteres pueda llevarse a cabo de manera relativamente objetiva (Hillis y Wiens, 2000). El resultado de estas características de los datos de secuencia es la inferencia de filogenias con gran robustez desde el punto de vista estadístico.

Sin embargo, la inferencia filogenética a partir de datos de secuencia no está exenta de críticas, como que la representación de taxones pueda quedar corta en algunos casos (debido a la imposibilidad de usar muestras fósiles y antiguas presentes en museos) y que los datos moleculares no sirven a la hora de describir nuevas especies (Hillis y Wiens, 2000). Además, otra crítica radica en que los árboles inferidos reflejan las relaciones evolutivas entre las secuencias analizadas, no entre taxones. Sin embargo, este hecho no es cierto en el caso de que las secuencias que se comparan sean ortólogas (es decir, que sean secuencias homólogas que han evolucionado independientemente debido a la especiación). En este caso los árboles reflejan las relaciones evolutivas entre especies. La principal limitación de los datos de secuencias es que sólo cuentan con 4 estados del carácter para comparar (A, T, C, G) a nivel de nucleótidos y 20 a nivel de aminoácidos, lo que puede conllevar a fenómenos de homoplasia (es decir, que dos posiciones a comparar tengan el mismo estado del carácter debido al azar, y no porque hayan compartido un ancestro común) por saturación en el proceso mutacional.

I.2.2.- Alineamiento de las secuencias

Uno de los puntos críticos a la hora de inferir filogenias a partir de datos moleculares radica en establecer correctamente las regiones homólogas de las secuencias para su comparación (homología de posición). Es precisamente el alineamiento el que especifica las relaciones entre cada posición de las secuencias. Por ello, la generación de los alineamientos es un requisito esencial para poder realizar cualquier análisis filogenético. Sin embargo, la definición del alineamiento que mejor se ajuste a los datos en ocasiones puede ser problemática, debido a que las secuencias pueden acumular multitud de sustituciones, inserciones, delecciones y zonas de repetición a lo largo del tiempo (Higgins, 2003).

Se han desarrollado multitud de algoritmos y de programas informáticos para la realización de los alineamientos (Lipman *et al.*, 1989; Wheeler y Gladstein, 1991-1998; Krogh *et al.*, 1994; Gotoh, 1996; Notredame y Higgins, 1996; Stoye *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 1997; Morgenstern, 1999; Löytynoja y Milinkovitch, 2001). El método mayoritariamente empleado para realizar alineamientos múltiples genera simultáneamente un árbol y un alineamiento para las secuencias. Para ello, se realizan todos los posibles alineamientos entre pares de secuencias y se calculan las correspondientes distancias (esto es, la proporción

de posiciones en las que difieren dos secuencias). Estas distancias se usan para obtener el árbol con un algoritmo de agrupamiento a partir de distancias (por ejemplo, Neighbor-Joining, NJ; (Saitou y Nei, 1987), ver más adelante). Posteriormente, el alineamiento múltiple se construye gradualmente siguiendo el orden de ramificación del árbol. El programa informático más usado para este tipo de alineamiento es Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). Sin embargo, el problema principal que presenta esta metodología es el hecho de que el alineamiento puede variar dependiendo del árbol que se usa de partida para construirlo y, por ello, deben realizarse diversos análisis partiendo de diferentes parámetros. Los alineamientos finales deben además ser supervisados manualmente.

I.2.3.- Métodos para la construcción de árboles

Existen numerosos métodos que permiten establecer relaciones filogenéticas a partir de datos de secuencias. De manera general, los métodos filogenéticos pueden agruparse según cómo se manejan los datos (métodos de distancias o discretos) y según cómo se construyen los árboles (métodos de agrupamiento y de búsqueda) (Figura I.21). Los métodos de distancias convierten el alineamiento de las secuencias en una matriz de distancias que se usa para construir el árbol. En cambio, los métodos discretos consideran cada una de las posiciones del alineamiento directamente. Por otra parte, los métodos de agrupamiento usan un algoritmo para llegar al árbol, mientras que los métodos de búsqueda usan un criterio de optimización que les permite elegir entre todo el conjunto de árboles posibles. Una de las ventajas de los métodos que usan criterios de optimización es que permiten evaluar hipótesis evolutivas alternativas, de manera que pueden estimar el grado de ajuste entre los árboles obtenidos y los datos empíricos (ver más adelante).

TIPO DE DATOS	
DISTANCIAS	DISCRETOS
AGRUPAMIENTO	UPGMA NJ
BÚSQUEDA	ME MP ML BI

Fig. I.21. Métodos de inferencia filogenética más frecuentes clasificados por el método usado para construir los árboles y por el tipo de datos en los que se basan.

I.2.3.1.- Métodos de distancias

Los métodos de distancias se basan en el cálculo de las diferencias entre secuencias, lo que permite reconstruir su historia evolutiva. Para cada dos secuencias, el número de posiciones diferentes es una subestimación de la distancia genética verdadera, puesto que algunas posiciones han podido sufrir multitud de sustituciones. Por lo tanto, los métodos de distancias, tratan de estimar el verdadero número de sustituciones que han ocurrido a lo largo de la historia evolutiva de las secuencias aplicando modelos que asumen determinados parámetros sobre la naturaleza de los cambios mutacionales (Van der Peer, 2003).

Estos modelos de sustitución (por ejemplo, Jukes y Cantor, 1969; Kimura, 1980; Felsenstein, 1981; Hasegawa *et al.*, 1985; Rodriguez *et al.*, 1990) (ver más adelante) son de vital importancia, puesto que la estimación de la distancia genética depende del modelo elegido. Actualmente, hay descritos métodos estadísticos basados en test de verosimilitud (Goldman, 2000) y en el criterio de información AIC (Akaike, 1974) para seleccionar el modelo evolutivo que mejor se ajusta a los datos a analizar (Posada y Crandall, 1998).

Hay diferentes métodos para la reconstrucción de árboles filogenéticos basados en distancias genéticas:

- Métodos de agrupamiento ("cluster analysis") (Sneath y Sokal, 1973): estos métodos reconstruyen los árboles agrupando las secuencias o grupos de secuencias que son más similares entre sí. Los métodos más usados son "un weighted-pair group method with arithmetic means" (UPGMA) y "weighted-pair group method with arithmetic means" (WPGMA), que usan algoritmos de agrupamiento secuenciales y dan lugar a árboles ultramétricos. Aunque en un primer momento fueron usados para inferir relaciones filogenéticas, actualmente no se usan debido a que son muy sensibles ante tasas evolutivas desiguales entre diferentes líneas (Huelsenbeck y Hillis, 1993).

- "Neighbor-joining" (NJ) es un algoritmo de agrupamiento heurístico para estimar el árbol en el que no se asume que los datos sean ultramétricos (Saitou y Nei, 1987). En este método, se construye una matriz de distancias modificada en la cual la separación entre cada par de nodos se ajusta en base a la divergencia media del resto de nodos. Entonces el árbol se construye uniendo los pares de nodos más próximos definidos por la matriz.

- Evolución mínima (ME): este método usa búsquedas heurísticas para reconstruir árboles a partir de distancias. El criterio de optimización elige el árbol que

tiene la longitud total (es decir, la suma de todas las longitudes de las ramas) mínima (Rzhetsky y Nei, 1992). NJ es un caso particular de ME.

I.2.3.2.- Métodos discretos

Como se ha comentado anteriormente, los métodos discretos trabajan directamente con las secuencias. Los métodos principales incluidos en esta categoría son máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (ML) e inferencia Bayesiana (IB).

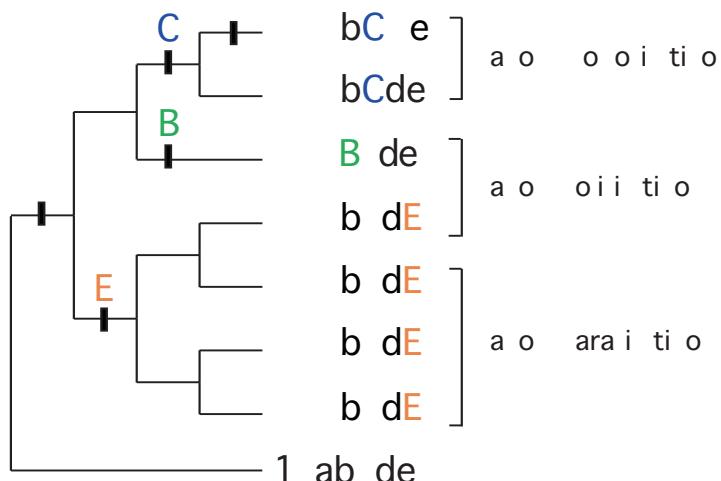
I.2.3.2.1.- Máxima parsimonia

La parsimonia trata de buscar el árbol (o conjunto de árboles) que minimiza la cantidad de cambio evolutivo (es decir, la transformación de un estado del carácter a otro) requerido para explicar los datos (Kluge y Farris, 1969; Farris, 1970; Fitch, 1971). La idea filosófica detrás de la parsimonia es que ante dos posibles explicaciones igualmente válidas de un fenómeno, siempre se prefiere la más simple. Esta es la metodología para inferir árboles filogenéticos que se ha usado mayoritariamente desde los años 70 hasta la actualidad. Si bien es cierto que estas ideas han sido discutidas durante muchos años, esta metodología seguirá empleándose por su rapidez y porque ha resultado efectiva en muchas situaciones (Hillis, 1996). La principal objeción a la parsimonia radica en que no es consistente cuando las secuencias muestran saturación o tasas evolutivas muy diferentes entre taxones. En estos casos, a medida que se añaden más datos al análisis se refuerza un árbol equivocado. El escenario clásico en el que esto ocurre es la denominada atracción de las ramas largas, el agrupamiento artificial de las ramas con mayor número de mutaciones entre sí o con el grupo externo (Felsenstein, 1978).

Para encontrar el árbol óptimo, según los criterios de la parsimonia, hay que calcular la cantidad de cambios de estado del carácter (o longitud del árbol) requerido para un árbol dado y buscar todas las posibles topologías de los árboles que minimizan esta longitud. La tarea más complicada es la búsqueda de la topología óptima, para lo que se han descrito multitud de métodos. Para un número pequeño de taxones, se han descrito métodos exactos que evalúan todas las posibles topologías hasta encontrar el árbol óptimo ("exhaustive search" y "branch-and-bound method" (Hendy y Penny, 1982)). Para los casos en los que hay una gran cantidad de taxones, se han descrito métodos aproximativos de búsqueda heurística que tratan de localizar la

topología óptima pero que no aseguran haberla encontrado. Para evitar la obtención de máximos locales y no generales se han desarrollado diversos métodos de adición de taxones al análisis y de intercambio de ramas para reorganizar las topologías. Los conocimientos que se tienen de los cambios mutacionales pueden ser incorporados a los estudios de MP mediante el pesaje de las transformaciones en las diferentes posiciones del alineamiento.

El análisis de máxima parsimonia es la metodología que representa el desarrollo de los principios del cladismo. El cladismo se ha convertido en el paradigma de la inferencia filogenética desde que fue introducido por Hennig (1950). La revolución taxonómica que supuso el cladismo radica en la postulación del principio de que las clasificaciones debían reflejar las relaciones entre los taxones objeto de dicha clasificación. La metodología para llevarlo a cabo se basa en el tratamiento que se le da a los caracteres, de manera que bajo la óptica cladista, se definen dos tipos de caracteres: homólo-



a b d e re re e ta o e tado a e tra e de o a ra tere (e tado e io Úr i o).
B C E re re e ta o e tado derivado de o a ra tere (e tado a o Úr i o).
 E e tado a o Úr i o de a ra ter de i e a ru o or ado or (e u a i a o or la a ra e o).
 No uede de i ir e e ru o ro ado or e ba e a e tado e io Úr i o de ar, ter b a -ue e te e tado uede e o trar e ta bi e otro ta o e (1) (b e u a i e io or la a ra 1).
 E e tado de ar, ter **C** de i e a ru o or ado or ie tra -ue d o o o tradi e (e u a autoa o or la de).

Fig. I.22. Árbol filogenético hipotético donde se explican algunos términos relevantes del cladismo.

gos y homoplásicos. Dos caracteres son homólogos si están relacionados evolutivamente de tal forma que su similitud se debe a que ambos provienen de un carácter en el ancestro común. En cambio, dos caracteres homoplásicos son aquellos que no están relacionados evolutivamente, es decir, que provienen de transformaciones independientes de sendos caracteres anteriores. Dentro de los caracteres homólogos se pueden distinguir los apomórficos o derivados y los plesiomórficos o ancestrales.

La importancia de esta metodología radica en que sólo las sinapomorfías (caracteres homólogos derivados compartidos) permiten reconstruir relaciones filogenéticas entre taxones. Así, un conjunto de taxones que comparten una sinapomorfía constituye un grupo monofilético, es decir, un grupo natural. Los grupos parafiléticos y polifiléticos son agrupaciones artificiales que se han realizado en base a simplesiomorfías (caracteres homólogos ancestrales compartidos) y en base a caracteres homoplásicos, respectivamente (Figura I.22).

I.2.3.2.2.- Máxima verosimilitud

El análisis de máxima verosimilitud considera la inferencia filogenética como un problema estadístico. La metodología de máxima verosimilitud calcula la probabilidad de obtener los datos observados dado un árbol filogenético y un modelo evolutivo. El árbol que maximiza dicha probabilidad es el más verosímil. La verosimilitud no es la probabilidad de que el árbol obtenido sea el verdadero, sino la probabilidad de que dicho árbol haya podido dar lugar a los datos empíricos. Básicamente, el método de máxima verosimilitud requiere de tres elementos fundamentales: un modelo evolutivo, un árbol (tanto su topología como la longitud de sus ramas) y unos datos de secuencia. Esta metodología trata de resolver dos puntos principales:

- dada una topología, cual es la longitud de las ramas que maximiza la probabilidad de obtener los datos observados
- qué árbol de entre todos los posibles es el más verosímil.

Para calcular la verosimilitud de un árbol hay que calcular la probabilidad en cada posición del alineamiento del estado observado dadas todas las posibles combinaciones de estados ancestrales. La probabilidad total a lo largo de la secuencia, es el resultado del producto de todas las probabilidades de cada posición. Puesto que las probabilidades en cada posición son muy pequeñas, es más conveniente expresarlas en forma de "log-likelihood" y la probabilidad total es el sumatorio de "log-likelihoods".

Como se ha indicado con anterioridad, la elección del modelo evolutivo es un punto clave para el desarrollo de esta metodología. Los modelos evolutivos son un conjunto de asunciones acerca de los procesos de sustitución de ADN. Describen las diferentes probabilidades de que un nucleótido se cambie por otro. Los modelos evolutivos complejos incluyen parámetros (que se estiman a partir de los datos empíricos) para la proporción de transiciones y transversiones (TS/TV) y la composición de las bases. Los modelos más utilizados son los siguientes:

- Jukes-Cantor (JC) (Jukes y Cantor, 1969): fue uno de los primeros modelos propuestos y el más simple. Asume que las cuatro bases nucleotídicas tienen idénticas frecuencias y que todas las sustituciones son igualmente probables.

- Kimura 1980 (K80) (Kimura, 1980): al igual que el modelo anterior, éste asume que las cuatro bases nucleotídicas tienen idénticas frecuencias pero, en este caso, todas las sustituciones no son igualmente probables, sino que las transiciones son generalmente más frecuentes que las transversiones.

- Felsenstein 1981 (F81) (Felsenstein, 1981): este modelo asume que la composición de las bases no es proporcional. Las sustituciones son todas igualmente probables.

- Hasegawa, Kishino y Yano 1985 (HKY85) (Hasegawa *et al.*, 1985): este modelo es una combinación de K80 y F81 ya que asume diferentes tasas para las transiciones y las transversiones, y además diferente composición de bases nucleotídicas.

- General reversible model (REV) (Rodriguez *et al.*, 1990): es el modelo más general que asume diferente composición de bases nucleotídicas, pero además, que los seis pares de sustituciones posibles entre los cuatro nucleótidos tienen diferentes probabilidades.

Cada modelo está definido por una matriz Q de cambio instantáneo. La probabilidad de cambio a lo largo de la rama de un árbol incorpora el tiempo en el cálculo de la verosimilitud.

En general, los modelos más complejos se ajustan mejor a los datos que los sencillos (Posada, 2003). Sin embargo, el uso de los modelos más complejos conlleva estimar más parámetros y por lo tanto, aumenta la varianza en cada estima. Como se ha dicho anteriormente, el modelo que mejor se ajusta a los datos puede ser estimado actualmente de manera estadística mediante contrastes de hipótesis por medio del programa informático MODELTEST (Posada y Crandall, 1998).

Los modelos de máxima verosimilitud asumen que cada una de las posiciones del alineamiento de secuencias es independiente y evoluciona con la misma tasa.

Este último punto no siempre es cierto y a que no todas las posiciones dentro de un gen están sujetas a la misma presión selectiva. Para incorporar el efecto de la heterogeneidad de tasas entre sitios, se puede calcular la proporción de sitios invariantes (I) en el alineamiento a analizar o bien calcular la distribución de tasas en el alineamiento (distribución G). Esta distribución se caracteriza por un parámetro a que se incorpora al cálculo de la máxima verosimilitud (Yang, 1996).

Otro punto de interés hace referencia a que ML considera que los cambios son más probables a lo largo de las ramas largas que de las cortas. De este modo este método es consistente cuando las tasas de sustitución entre las líneas no son constantes.

I.2.3.2.3.- Inferencia bayesiana

Se trata de un método de inferencia filogenética que se ha descrito recientemente (Rannala y Yang, 1996) y cuyo uso está aumentado paulatinamente entre los sistemáticos moleculares, gracias, entre otros motivos, a que presenta las mismas ventajas que ML pero es mucho más rápido. Además, desde el punto de vista estadístico, supone una forma mas directa de calcular el árbol filogenético más probable. También cabe destacar que los análisis bayesianos, dada su rapidez, permiten realizar particiones de los datos, con lo que los parámetros de los modelos evolutivos pueden ser estimados independientemente para cada partición.

La inferencia bayesiana se basa en el concepto de probabilidad posterior, es decir, en probabilidades que son estimadas después de adquirir conocimiento previo de los datos. La mejor estima filogenética es aquella que maximiza la probabilidad posterior de que un árbol sea el correcto. Para calcular la probabilidad posterior de un árbol se utiliza el Teorema de Bayes, que combina la probabilidad previa de una filogenia con su verosimilitud, y con la probabilidad de los datos.

El cálculo de la probabilidad posterior implica evaluar todos los posibles árboles y para cada árbol, investigar todas las posibles combinaciones de longitud de rama y parámetros del modelo. No se puede realizar esa estima analíticamente, pero sí obtener una aproximación de la probabilidad posterior mediante el método de "Markov Chain Monte Carlo" (MCMC) (Yang y Rannala, 1997; Larget y Simon, 1999) implementado en MrBayes 3.0 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Se trata de realizar una simulación estocástica para obtener muestras de la distribución posterior. El proceso parte de un árbol (que puede ser establecido al azar o

especificado) con unas determinadas longitudes de ramas y además, con unos parámetros definidos de los modelos de sustitución y de las tasas de variación entre posiciones. Este es el estado inicial de la cadena. Posteriormente se propone una nueva localización en el espacio de parámetros como el siguiente eslabón de la cadena generada por la modificación al azar de alguno de los parámetros del estado anterior de la cadena. Entonces se calcula la probabilidad posterior de este nueva localización y se compara con la probabilidad posterior original. Si esta nueva localización tiene una mayor probabilidad se acepta directamente, constituye el siguiente eslabón de la cadena y se repite el ciclo . Si por el contrario el cambio implica un peor valor de probabilidad, el aceptarlo o rechazarlo depende de si la fracción entre las probabilidades de la combinación inicial y la actual es superior o inferior a un valor al azar, es decir, se determina si el cambio a la baja en probabilidad es mínimo o significativo. Si el cambio es mínimo se acepta y si es significativo se rechaza. En el caso de que se rechace, la localización actual se añade como siguiente paso en la cadena (de manera que los dos últimos eslabones de la cadena son idénticos) y se repite el ciclo . Este proceso se repite millones de veces y se crea una cadena larga de localizaciones de los parámetros en el espacio. Este tipo de estrategia provoca que la cadena tienda a permanecer en las regiones con altos valores de probabilidad posterior (convergencia en la fase estacionaria). La proporción de veces que la cadena está en una región del espacio de unos parámetros se puede usar como una estima de la probabilidad posterior de esa región. Así, cuanto mayor sean las cadenas, mayor será la precisión de la estima. El análisis proporciona una estima de la probabilidad de que un árbol determinado sea el árbol evolutivo verdadero dado los datos observados.

Para evitar que la búsqueda quede atrapada en un conjunto de árboles subóptimos y encuentre el mejor de entre los subóptimos, se corren en paralelo varias cadenas de manera independiente comenzando desde el mismo árbol inicial (método de "Metrópolis-couple Markov Chain Monte Carlo", MCMCMC). Cada cierto número de generaciones se salva un árbol de una de las cadenas (cadena fría). El resto de las cadenas (cadenas calientes) elevan la probabilidad posterior de un árbol a una potencia entre 0 y 1, lo que supone favorecer el salto entre picos de probabilidad. De esta manera, durante el proceso de búsqueda, se producen cruces entre las cadenas para visitar los árboles en el espacio de probabilidad posterior según lo explicado anteriormente.

1.2.4.- Métodos de validación de árboles

Una vez que se ha obtenido un árbol filogenético (independientemente del método de inferencia escogido) surge el interrogante de cual es el grado de confianza o fiabilidad que merece la interpretación del árbol resultante. En general, una estimación pobre de la filogenia de un grupo suele deberse no al método usado para su reconstrucción, sino a los datos en sí mismos. Si los datos contienen homoplásia estructurada, entonces diferentes sitios nucleotídicos pueden sustentar árboles diferentes. Por lo tanto, las estimaciones filogenéticas siempre llevan asociadas un error de muestreo (Page y Holmes, 1998).

Se han propuesto diferentes metodologías para medir ese error de muestreo, de entre las que destaca el "bootstrapping". Se trata de un test estadístico no paramétrico que ha sido propuesto como una metodología para estimar los límites de confianza de las ramas internas de un árbol filogenético (Felsenstein, 1985). Este método estadístico es una técnica de remuestreo que asume que la muestra interna representa fielmente las características del universo al que representa y, por lo tanto, en vez de muestrear dicho universo, pueden generarse nuevas muestras a partir de la original por remuestreo de la misma. Cada remuestreo es una pseudorréplica, y de cada una podemos estimar los parámetros que queremos medir. La variación entre las estimaciones obtenidas de cada réplica es una medida del error de muestreo asociado con el parámetro (Page y Holmes, 1998). En el caso del "bootstrap", cada pseudorréplica se obtiene mediante remuestreo con reemplazamiento de los datos originales, poseyendo éstas el mismo tamaño que la original. Entonces, el nivel de confianza de una hipótesis puede estimarse como el porcentaje de veces que la hipótesis es apoyada por las pseudorréplicas construidas por el "bootstrap". Los datos originales son las matrices de caracteres y las pseudorréplicas son las matrices con el mismo número de taxones y caracteres, pero en las que los caracteres han sido remuestreados con reemplazamiento, de manera que algunos estarán repetidos una o más veces y otros estarán ausentes. Posteriormente, se obtiene un árbol para cada una de las pseudorréplicas y, finalmente, el apoyo de una rama determinada será el porcentaje de veces que el clado que define aparece en el conjunto de árboles de las pseudorréplicas (lo que se conoce con el nombre de proporción de bootstrap (BP)) (Arnedo, 1999).

Otro punto a destacar es la existencia de tests basados en la metodología de máxima verosimilitud, para evaluar y comparar diferentes hipótesis filogenéticas. Es decir, dados dos árboles con diferentes topologías pero obtenidos en base a los mis-

mos datos, podemos preguntarnos si uno de los árboles tiene una probabilidad significativamente mayor de obtener los datos observados que el otro. El test que ha tenido mayor repercusión es el propuesto por Kishino y Hasegawa (1989) y posteriormente corregido por Shimodaira y Hasegawa (1999) que se basa en calcular la diferencia entre los "log-likelihoods" del mejor árbol y de cada una de las hipótesis alternativas, y estimar la varianza de las diferencias mediante un método de remuestreo.

Se han descrito test análogos basados en el test de señal-rango de Wilcoxon que pueden aplicarse a la metodología de parsimonia (Templeton, 1983). En este caso, el test estadístico se basa en la suma de las diferencias en el número de pasos requerido para cada posición en los dos árboles que se comparan. La hipótesis nula es que esa suma no sea significativamente diferente de cero.

El resultado del análisis bayesiano es la probabilidad posterior de cada árbol muestreado. Un árbol consenso de todos los árboles seleccionados muestra en cada uno de sus nodos el valor de probabilidad posterior, que indica su soporte estadístico. La probabilidad posterior de los nodos en el análisis bayesiano es por lo general mayor que la del "bootstrap" del análisis de ML y NJ. Los "bootstraps" dan una estimación más conservadora de la confianza estadística de los nodos (Suzuki *et al.*, 2002).

II.- OBJETIVOS

El conocimiento de la biodiversidad y de los procesos evolutivos que la generan son de vital importancia para afrontar de la forma más adecuada la gestión y la conservación de la misma. Mientras que para los gasterópodos primitivos (antiguos prosobranquios) se han realizado en los últimos años varios estudios sistemáticos que han revolucionado las hipótesis evolutivas para el grupo, para los heterobranquios (y en concreto para los eutineuros) las propuestas actuales carecen de resolución y consistencia. En esta tesis se plantea el establecimiento de la filogenia de Euthyneura que permitirá establecer una base taxonómica sólida y una clasificación robusta y estable, lo cual representa una herramienta básica para cualquier otro tipo de investigación, ya sea básica o aplicada, que tenga a este grupo animal como objeto.

El objetivo principal de esta tesis es establecer un marco filogenético robusto desde el punto de vista estadístico para Euthyneura a partir de datos moleculares. Los objetivos concretos de esta tesis son:

- 1.- Caracterizar y determinar la estructura del genoma mitocondrial de un nudibranquio (*Roboastra europea*).
- 2.- Comparar la organización de todos los genomas mitocondriales de gasterópodos secuenciados hasta el momento.
- 3.- Establecer las relaciones filogenéticas dentro de Euthyneura con especial atención a los principales grupos incluidos en Opisthobranchia en base a la información aportada por genes mitocondriales.
- 4.- Comprobar la monofilia de Opisthobranchia.
- 5.- Establecer una clasificación precisa para Opisthobranchia basada en los datos evolutivos recuperados.
- 6.- Determinar los patrones y tendencias evolutivas dentro de Opisthobranchia a partir del marco filogenético establecido.

III.- RESULTADOS

Los resultados de esta tesis se presentan en forma de tres publicaciones. Las tres estudian las relaciones evolutivas entre varios miembros de Euthyneura, aunque con diferentes datos de partida y tipos de análisis.

En la primera de las publicaciones (Grande *et al.* 2002), se describe la secuencia completa del genoma mitocondrial de un opistobranquio avanzado (nudibranquio) (objetivo 1) y se realizan diversos análisis filogenéticos con las secuencias de los genes presentes en los genomas mitocondriales completos de los gasterópodos descritos hasta el momento. Además, la secuenciación y análisis del genoma mitocondrial del nudibranquio, permitió seleccionar los genes con una tasa de evolución más adecuada para abordar la filogenia de Euthyneura.

Los resultados de este trabajo han determinado la secuencia nucleotídica completa (14.472 pb) del genoma mitocondrial del nudibranquio *R. europaea*. Se ha comprobado que este genoma tiene una organización muy compacta, casi idéntica a la que se encuentra en otros opistobranquios y en pulmonados (Euthyneura), aunque es muy diferente de la de otros gasterópodos primitivos (los anteriormente llamados prosobranquios) (objetivo 2). Además, el análisis filogenético del genoma mitocondrial del nudibranquio *R. europaea* (opistobranquio derivado) junto con el del arquitectibranquio *Pupa strigosa* (opistobranquio primitivo) previamente secuenciado (Kurabayashi y Ueshima, 2000a), permite establecer las relaciones evolutivas entre dos linajes de opistobranquios bien caracterizados. El genoma mitocondrial de *Roboastra* tan sólo se diferencia del genoma de *Pupa*, en la posición del gen *trnC*. Las secuencias de *Pupa* y *Roboastra* han resultado ser más similares entre sí que si se las compara con las de los pulmonados (objetivo 2). Los resultados de todos los análisis realizados (MP, ME, ML y BI) basados en las secuencias de aminoácidos de todos los genes codificantes de proteínas presentes en el genoma mitocondrial apoyan la monofilia de los opistobranquios. También se han realizado diversos análisis con los métodos más comunes de inferencia filogenética de un fragmento de 2.500 pb que incluye los genes mitocondriales *cox1*, *rrnL*, *nad6* y *nad5* para representantes de cinco órdenes de opistobranquios. Los resultados de estos análisis confirman la monofilia de los opistobranquios.

En la segunda de las publicaciones (Grande *et al.* 2004), se ha llevado a cabo la secuenciación de varios fragmentos del genoma mitocondrial de diferentes representantes de Euthyneura (con especial atención a los principales linajes evolutivos dentro de Opisthobranchia) con la intención de ampliar el tamaño muestral y obtener un marco filogenético apropiado del grupo (objetivo 3). Los análisis filogenéticos

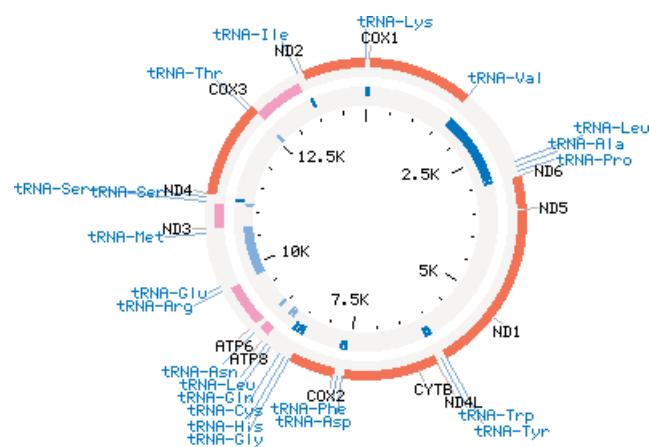
se han basado en dos fuentes de información: las secuencias primarias de los genes mitocondriales *cox1*, *trnV*, *rrnL*, *trnL(cun)*, *trnA*, *trnP*, *nad6* y *nad5* y la existencia de dos cambios genómicos poco frecuentes (la posición relativa del gen *trnP* y un evento de inserción-delección en una zona conservada de la proteína mitocondrial Cox 1). En este trabajo se ha evaluado por primera vez el potencial filogenético de estos cambios genómicos y los resultados obtenidos los proponen como unos marcadores filogenéticos útiles para los miembros de Heterobranchia.

Como resultado de estos análisis, se ha propuesto una novedosa y robusta (desde el punto de vista estadístico) hipótesis filogenética para Euthyneura. Los datos obtenidos rechazan claramente la monofilia de los pulmonados, un grupo de gasterópodos firmemente establecido en base a datos morfológicos, como ya se ha comentado en la introducción de esta tesis. El pulmonado basomatóforo marino *Siphonaria* se sitúa dentro de los opistobranquios y comparte con ellos la inserción de un aminoácido Glicina en la proteína Cox 1 (objetivo 4). El pulmonado sistelomatóforo *Onchidella* se sitúa en la base del clado Opistobranchia+*Siphonaria*. Los opistobranquios, comparten con *Siphonaria* y *Onchidella* la posición relativa del gen *trnP* entre los genes *trnA* y *nad6*. Otros resultados destacables son la inclusión del heterrostrofo *Pyramidella* dentro de Euthyneura y el apoyo a la monofilia de los pulmonados estilomatóforos que constituyen una rama que se separa en una etapa temprana en la filogenia de Euthyneura.

En la tercera de las publicaciones (Grande *et al.* 2004) se han reconstruido las relaciones filogenéticas entre 37 especies que representan siete linajes dentro de Opistobranchia (Mollusca: Gastropoda) en base a la secuencia parcial de los genes mitocondriales *cox 1* y *rrnL*. Los resultados apoyan una nueva clasificación para los opistobranquios (objetivo 5). Los análisis filogenéticos confirman que todos los linajes de opistobranquios considerados en este estudio, excepto los nudibranquios, forman grupos monofiléticos. El sacogloso *Ascobulla* se sitúa como el linaje más basal dentro de los opistobranquios. El pulmonado basomatóforo *Siphonaria* se sitúa dentro de Opistobranchia, entre *Ascobulla* y el resto de opistobranquios. Estos últimos se dividen en dos linajes evolutivos pendientes de una descripción formal: por una parte Cephalaspidea, Tylodinoidea y Anaspidea (que comparten caracteres en los sistemas reproductor, digestivo y circulatorio), y por otra parte Architectibranchia y Nudipleura (que comparten caracteres del sistema circulatorio). Los resultados obtenidos en los análisis filogenéticos han permitido la descripción de un nuevo taxón dentro de Nudipleura: Pleuroanthobranchia (Pleurobranchoidea junto con

Anthobranchia). Este nuevo taxon se define por la presencia de una glándula sanguínea, de espículas calcáreas en el tegumento y de un ciego con una apertura directa al estómago. La definición de esta filogenia molecular proporciona un marco robusto para estudios comparativos e insta a una revisión de las sinapomorfías morfológicas que caracterizan los principales linajes dentro de Opisthobranchia (objetivo 6).

III.1.- The complete mitochondrial genome of the nudibranch *Roboastra europaea* (Mollusca: Gastropoda) supports the monophyly of opisthobranchs. *Molecular Biology and Evolution* 19: 1672-1685. (2002)



The Complete Mitochondrial Genome of the Nudibranch *Roboastra europaea* (Mollusca: Gastropoda) Supports the Monophyly of Opisthobranchs

Cristina Grande,* José Templado,* J. Lucas Cervera,† and Rafael Zardoya*

*Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid, Spain; and

†Departamento de Biología, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad de Cádiz, Puerto Real, Spain

The complete nucleotide sequence (14,472 bp) of the mitochondrial genome of the nudibranch *Roboastra europaea* (Gastropoda: Opisthobranchia) was determined. This highly compact mitochondrial genome is nearly identical in gene organization to that found in opisthobranchs and pulmonates (Euthyneura) but not to that in prosobranchs (a paraphyletic group including the most basal lineages of gastropods). The newly determined mitochondrial genome differs only in the relative position of the *trnC* gene when compared with the mitochondrial genome of *Pupa strigosa*, the only opisthobranch mitochondrial genome sequenced so far. *Pupa* and *Roboastra* represent the most basal and derived lineages of opisthobranchs, respectively, and their mitochondrial genomes are more similar in sequence when compared with those of pulmonates. All phylogenetic analyses (maximum parsimony, minimum evolution, maximum likelihood, and Bayesian) based on the deduced amino acid sequences of all mitochondrial protein-coding genes supported the monophyly of opisthobranchs. These results are in agreement with the classical view that recognizes Opisthobranchia as a natural group and contradict recent phylogenetic studies of the group based on shorter sequence data sets. The monophyly of opisthobranchs was further confirmed when a fragment of 2,500 nucleotides including the mitochondrial *cox1*, *rrnL*, *nad6*, and *nad5* genes was analyzed in several species representing five different orders of opisthobranchs with all common methods of phylogenetic inference. Within opisthobranchs, the polyphyly of cephalaspideans and the monophyly of nudibranchs were recovered. The evolution of mitochondrial tRNA rearrangements was analyzed using the *cox1+rrnL+nad6+nad5* gene phylogeny. The relative position of the *trnP* gene between the *trnA* and *nad6* genes was found to be a synapomorphy of opisthobranchs that supports their monophyly.

Introduction

Sea slugs and their relatives (Gastropoda: Opisthobranchia) are one of the most diverse and successful groups of mollusks. The 5,000 or so opisthobranch species currently recognized are classified into nine orders (Cephalaspidea, Acochlidea, Rhodopemorpha, Sacoglossa, Anaspidea, Notaspidea, Thecostomata, Gymnostomata, and Nudibranchia) (Rudman and Willan 1998). They are distributed throughout the world and occur in almost every marine environment. Regression of the shell, development of aposematic colorations, and acquisition of toxic defenses are general evolutionary trends within the group (Poulichek, Voss-Foucart, and Jeuniaux 1991). Traditionally, opisthobranchs have been recognized as a natural group and have been included within the gastropods together with prosobranchs and pulmonates (Thiele 1929–1935, pp. 1–1134). Prosobranchs (which used to include caenogastropodans, heterostrophans, retigastropodans and other related groups) are currently considered to be a paraphyletic group (Haszprunar 1988; Ponder and Lindberg 1997; Winnepenninckx et al. 1998; Yoon and Kim 2000) and represent the most basal lineages of gastropods, with pulmonates as the closest relatives of opisthobranchs (Spengel 1881; Fretter and Graham 1962, pp. 1–755; Morton 1979, pp. 1–264; Rudman and Willan 1998). The latter two groups have several synapomorphies and are commonly referred to as Euthyneura (Spengel 1881).

Several recent phylogenetic analyses based on morphological characters support the validity of the Euthyneura clade but tentatively reject the monophyly of both opisthobranchs and pulmonates (e.g., Haszprunar 1985; Salvini-Plawen and Steiner 1996; Ponder and Lindberg 1997) (fig. 1A and B). Depending on the phylogenetic analysis, different lineages of pulmonates are placed as sister groups of different orders of opisthobranchs (fig. 1). Additionally, the monophyly of some opisthobranch orders (e.g., Cephalaspidea and Notaspidea) has also been recently questioned (Schmekel 1985; Mikkelsen 1996; Wägele and Willan 2000). Apparently, the high degree of convergence or parallelism exhibited by many morphological characters of opisthobranchs (associated with reduction and loss of the shell and the mantle cavity; Gosliner and Ghiselin 1984; Gosliner 1985; Salvini-Plawen and Steiner 1996) has seriously complicated phylogenetic inferences within the group.

Molecular data can help in these cases by providing an independent set of characters. So far, most molecular studies on the phylogeny of opisthobranchs have been based on nuclear *18S* and *28S rRNA* sequence data (Tillier et al. 1994; Winnepenninckx et al. 1998; Wollscheid and Wägele 1999; Yoon and Kim 2000; Dayrat et al. 2001). These studies recovered poorly resolved phylogenetic trees in which the relationships of opisthobranch orders were unclear and the monophyly of opisthobranchs was rejected (fig. 1C and D). The lack of resolution of nuclear rRNA gene sequence data is likely because of an extensive rate heterogeneity among sites that significantly reduces the number of positions that are phylogenetically informative at any level of divergence (Olsen and Woese 1993). A recent phylogeny of

Address for correspondence and reprints: Rafael Zardoya, Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, José Gutiérrez Abascal, 2, 28006 Madrid, Spain. E-mail: rafaz@mncn.csic.es.

Mol. Biol. Evol. 19(10):1672–1685, 2002
© 2002 by the Society for Molecular Biology and Evolution. ISSN: 0737-4038

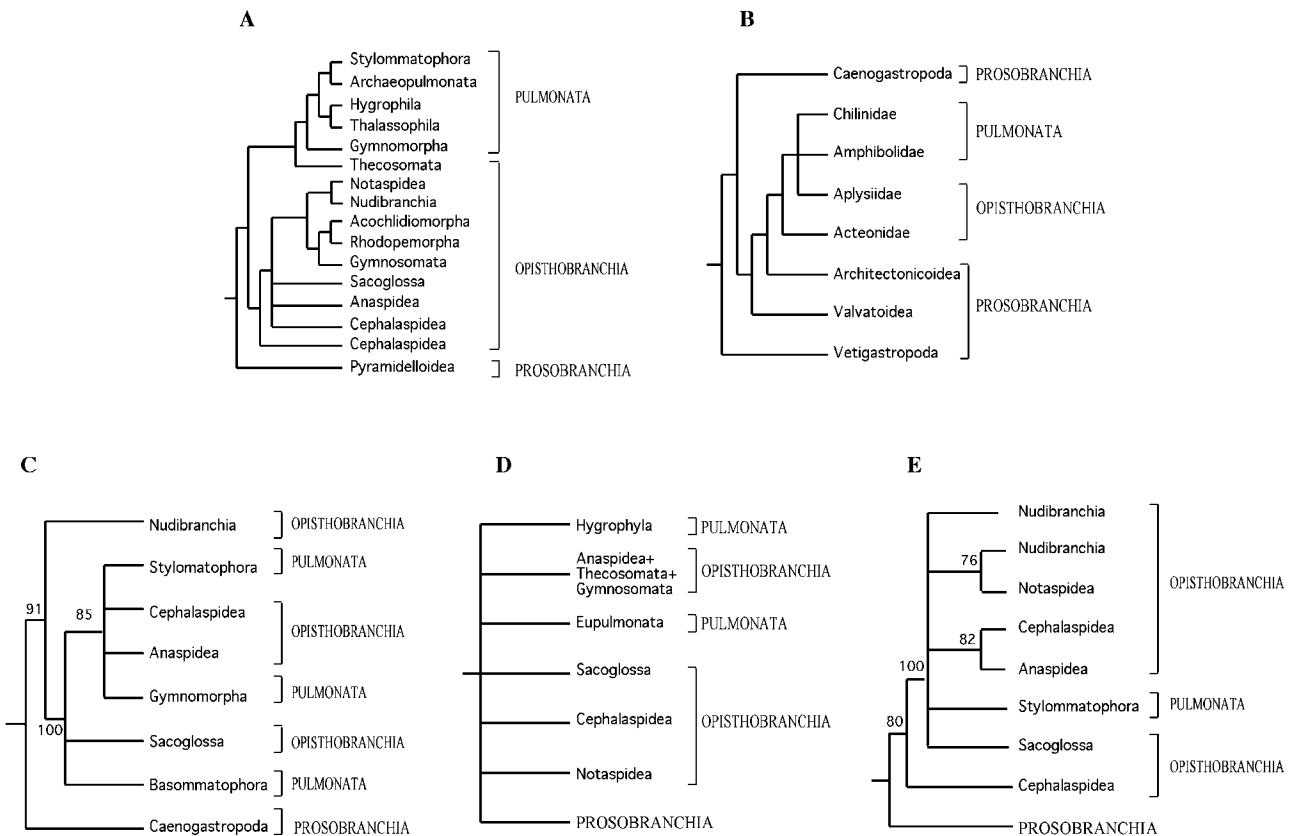


FIG. 1.—Phylogenetic hypotheses on the evolutionary position of opisthobranchs relative to other gastropods based on morphological ([A] Salvini-Plawen and Steiner 1996 and [B] Ponder and Lindberg 1997) and molecular data ([C] Wollscheid and Wägele 1999, [D] Dayrat et al. 2001, and [E] Thollesson 1999b). Note that all of them reject the monophony of opisthobranchs. For the molecular phylogenies, nodes with bootstrap values below 50% were forced to collapse.

Euthyneura based on partial sequences of the mitochondrial *rrnL* gene rejected the monophyly of opisthobranchs as well as those of the orders Cephalaspidea and Nudibranchia (Thollesson 1999b) (fig. 1E). But these results were based on rather short sequence data. The phylogenies of some orders of opisthobranchs (Anaspidea and Nudibranchia) based on partial sequences of nuclear *18S rRNA* and mitochondrial *rrnS*, *rrnL*, and *cox1* genes were also published recently (Thollesson 1999a; Medina and Walsh 2000; Wollscheid et al. 2001).

Several phylogenetic analyses have demonstrated recently that the use of complete mitochondrial genomes in phylogenetic studies significantly increases the confidence of the phylogenetic history inferred compared with phylogenetic hypotheses based on individual or partial mitochondrial genes (Cummings, Otto, and Wakely 1995; Russo, Takezaki, and Nei 1996; Zardoya and Meyer 1996). So far, the complete mitochondrial DNA sequences of seven mollusks are available: a cephalopod, *Loligo bleekeri* (Sasuga et al. 1999); a bivalve, *Crassostrea gigas* (S. H. Kim, E. Y. Je, and D. W. Park, personal communication; GenBank accession no. NC_001276); a polyplacophoran, *Katharina tunicata* (Boore and Brown 1994); and four gastropods—three pulmonates (*Albinaria coerulea* [Hatzoglou, Rodakis, and Lecanidou 1995], *Cepaea nemoralis* [Terrett, Miles,

and Thomas 1996], and *Euhadra herklotsi* [Yamazaki et al. 1997]) and a primitive opisthobranch (*Pupa strigosa* [Kurabayashi and Ueshima 2000a]). The incomplete mitochondrial genomes of a bivalve (*Mytilus edulis* [Hoffmann, Boore, and Brown 1992]) and two gastropods (a caenogastropodan, *Littorina saxatilis* [Wilding, Mill, and Grahame 1999], and a heterostrophian, *Omalogyra atomus* [Kurabayashi and Ueshima 2000b]) have also been described.

The mitochondrial DNA of mollusks shows extreme variations in gene organization (Boore and Brown 1994; Yamazaki et al. 1997; Boore 1999; Kurabayashi and Ueshima 2000a; Rawlings, Collins, and Bieler 2001). The mitochondrial gene arrangements of pulmonates (*Euhadra*, *Cepaea*, and *Albinaria*), the heterostrophian (insofar as has been determined; *Omalogyra*), and the opisthobranch (*Pupa*) are nearly identical (Kurabayashi and Ueshima 2000a, 2000b). The gene organization of the mitochondrial genomes of *Littorina*, *Katharina*, and *Loligo* shows greater resemblance to the consensus gene arrangement of arthropods (Boore 1999; Sasuga et al. 1999; Wilding, Mill, and Grahame 1999). The lack of *atp8* gene in *Crassostrea* and *Mytilus* (Hoffmann, Boore, and Brown 1992; S. H. Kim, E. Y. Je, and D. W. Park, unpublished data; GenBank accession no. NC_001276), the presence of additional tRNA genes in *Katharina* and *Mytilus* (Hoffmann, Boore, and Brown

1992; Boore and Brown 1994), and an unusual mode of inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA (Zouros et al. 1994; Saavedra, Reyero, and Zouros 1997; Zouros 2000) are other intriguing features of the mitochondrial genomes of mollusks.

To test the monophyly of opisthobranchs and to clarify their relative phylogenetic position within gastropods, as well as to further investigate variations in the mitochondrial genome organization of mollusks, we have sequenced the complete mitochondrial genome of a nudibranch, *Robostra europaea* García-Gómez 1985. We have compared this new mitochondrial genome with the only opisthobranch mitochondrial genome described so far, that of *P. strigosa*, and with mitochondrial genomes of other gastropods. To further understand opisthobranch systematics, we have also sequenced a mitochondrial DNA fragment of about 2,500 bp (including part of *coxl*, the complete *rrnL* and *nad6* genes, and a portion of the *nad5* gene) in several species that represent different orders of opisthobranchs.

Materials and Methods

DNA Extraction, Polymerase Chain Reaction Amplification, Cloning, and Sequencing

A single fresh specimen from Cabo de Trafalgar (Cádiz, Spain) was used to determine the sequence of the complete mitochondrial genome of *R. europaea*. Total cellular DNA was purified following a standard phenol-chloroform extraction. Universal primers were used to amplify fragments of the mitochondrial *rrnS* (H1478 and L1091; Kocher et al. 1989) and *rrnL* (16Sar-L and 16Sbr-H; Palumbi et al. 1991, pp. 1–45) genes by polymerase chain reaction (PCR). Standard PCR reactions containing 67 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 mM of each dNTP, 2.5 μM of each primer, template DNA (10–100 ng), and *Taq* DNA polymerase (1 unit, Biotoools) in a final volume of 25 μl were subjected to 30 cycles of denaturing at 94°C for 60 s, annealing at 42°C for 60 s, and extending at 72°C for 90 s. The amplified fragments were sequenced with the BigDye Deoxy Terminator cycle sequencing kit (Perkin-Elmer Biosystems) in an automated DNA sequencer (ABI PRISM 3100) using the PCR primers and following the manufacturer's instructions.

The sequences of both fragments were used to design two sets of specific primers (LP-F, LP1-R and LP1-F, LP-R; see table 1) that amplified, by long PCR, two fragments of about 7,000 bp each, that covered the remaining mitochondrial genome (fig. 2). Long PCRs containing 60 mM Tris-SO₄ (pH 9.1), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 1–2 mM MgSO₄, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 μM of each primer, and elongase enzyme (1 unit; Life Technologies) in a final volume of 50 μl were subjected to 40 cycles of denaturing at 94°C for 30 s, annealing at 52°C for 30 s, and extending at 68°C for 7 min.

Twenty-two more primers were designed on the basis of gastropod mitochondrial genome DNA sequences to amplify by standard PCR (see conditions described previously) overlapping fragments using the long PCR products as DNA templates (table 1 and fig. 2). The

PCR products were cloned into the pGEM-T vector (Promega) and were sequenced using M13 universal primers (see conditions described previously). PCR amplification of a mitochondrial genome might introduce up to 0.25% mutations (Arnason, Xu, and Gullberg 1996). Divergences of 0.25% correspond to variation at the intraspecific level.

Total cellular DNA was also purified from several species of opisthobranchs that represent five different orders: *Chelidonura africana* (Cephalaspidea); *Ascidella fragilis* (Sacoglossa); *Aplysia punctata* (Anaspidea); *Umbraculum mediterraneum* (Notaspidea); and *Aeolidia papillosa* (Nudibranchia). Two sets of primers, Opis COI-F (5'-ACTTTTTTCCTCAGCATTYTT-3')/16Sbr and LP-F/Opis-2R (table 1), were used to amplify by standard PCR two overlapping DNA fragments that covered the 3' end of the mitochondrial *coxl* gene, the complete mitochondrial *rrnL*, *trnL(cun)*, *trnA*, *trnP*, and *nad6* genes, and the 5' end of the mitochondrial *nad5* gene. PCR products were cloned into the pGEM-T vector (Promega) and were sequenced using M13 universal primers.

Molecular and Phylogenetic Analyses

Sequence data were analyzed with the GCG program version 10.2 (Devereux, Haeberli, and Smithies 1984), MacClade version 3.08a (Maddison WP and Maddison DR 1992, pp. 1–398), and PAUP* version 4.0b8 (Swofford 1998). Nucleotide and amino acid sequences were aligned using CLUSTAL X version 1.62b (Thompson et al. 1997) followed by refinement by eye. Ambiguous alignments and gaps were excluded from the analysis using GBLOCKS 0.73b (Castresana 2000). Alignments are available from <http://www.molbiolevol.org>.

The following five complete mollusk mitochondrial genomes were analyzed in this study: *L. bleekeri* (Sasuga et al. 1999); *A. coerulea* (Hatzoglou, Rodakis, and Lecanidou 1995); *C. nemoralis* (Terrett, Miles, and Thomas 1996); *P. strigosa* (Kurabayashi and Ueshima 2000a); and *R. europaea* (this study). *Loligo bleekeri* was used as the out-group in all phylogenetic analyses because most authors currently consider cephalopods as the sister group of gastropods (Haszprunar 1988; Bieler 1992). The deduced amino acid sequences of all 13 protein-coding genes encoded by the mitochondrial genomes were combined into a single data set that was subjected to maximum parsimony (MP), minimum evolution (ME), maximum likelihood (ML), and Bayesian methods of phylogenetic inference. MP analyses were performed with PAUP* using heuristic searches (TBR branch swapping; MulTrees option in effect) with 10 random additions of taxa. ME analyses (Rzhetsky and Nei 1992) were carried out with PAUP* using mean character distances. ML analyses were performed with PUZZLE version 4.0.1 (Strimmer and von Haeseler 1996) using the mtREV model (Adachi and Hasegawa 1996). The robustness of the resulting MP and ME trees was evaluated by bootstrapping (Felsenstein 1985) (as implemented in PAUP* with 1,000 pseudoreplicates).

Table 1
Primers Used in the Sequencing of the Complete Mitochondrial Genome of *Robostra europaea*

	Sequence (5' → 3')	Approximate Product Length (bp)
Long PCR primers		
LP-F	GTTTGTGACCTCGATGTTGGACT	7,400
LP1-R	GAAATTGGACTTGAAAGTAA	
LP-R	GATTGCGCTACCTTAGCACGGTCA	7,100
LP1-F	TCATTTAYCTGGTAAGTCCCCT	
Standard PCR primers		
Opis1-F	GGGGATGATCACTTTATAATGT	2,080
Opis1-R	ATTAYGCTACCTTAGCACRGTC	
16Sar-L ^a	CGCTCTGTTATCAAACAT	450
16Sbr-H ^a	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	
LP-F	See above	1,460
Opis2-R	ACTAGAGTAGAAGAGTGGACTAA	
Opis3-F	ACTAAAAGAGCCAGTATCCTTT	830
Opis3-R	GAAAAACAAAGTTGATAGGGCTC	
Opis4-F	CTCGATTATGGTTGGTAGAGCC	700
Opis4-R	TCCCCCTCTGCAAATCAA	
Opis5-F	TGGGCTTCAAACCTCTAAATA	1,340
Opis5-R	GTAGCACCTCAAAGATATTG	
Opis6-F	ATAGCAACAGCATTGTGG	1,240
Opis6-R	TCGGGGATTATATAAGAATC	
Opis7-F	CACGCTAACGGAGCTCGCTTTT	1,190
Opis7-R	ATTCAAGCTATGTTTTAC	
Opis8-F	GGTGTAAATTGTGGCAT	960
Opis8-R	AACATATACTGAATCTTAATC	
H1478 ^b	TGACTGCAGAGGGTGACGGCGGTGT	340
L1091 ^b	AAAAAGCTCAAACGGATTAGATACCCCACTAT	
LP1-F	See above	1,540
Opis9-R	ACATGAGCCTTAGGGAGCCA	
Opis10-F	TGAGGTTATCAGCCCGAACG	2,100
Opis10-R	GCTTGAAATACAAAATATT	
Opis11-F	CGCCGGCGAACGGGTATCATTGATGT	1,250
Opis11-R	ACTATTCAATTTCACACCCCCCAAT	
Opis12-F	GGTCTACCCCTTTTATGTATT	1,980
Opis12-R	AACCATTATACAAAAGGTA	

^a Palumbi et al. (1991).

^b Kocher et al. (1989).

The robustness of the resulting ML tree was evaluated by quartet puzzling (as implemented in PUZZLE with 10,000 puzzling steps). A Bayesian inference of gastropod phylogeny was performed with MrBayes 2.01 (Huelskenbeck and Ronquist 2001) by simulating a Markov chain for 10,000 cycles under the Jones model (Jones, Taylor, and Thornton 1992). The same phylogenetic analyses at the amino acid level were performed

including only the mitochondrial protein-coding genes that were available for the caenogastropodan *L. saxatilis* (Wilding, Mill, and Grahame 1999), i.e., *cox1*, *cox2*, *atp8*, *atp6*, *nad1*, *nad6*, and *cob*. Sequence data of the six protein-coding genes known for the heterostrophan *O. atomus* (Kurabayashi and Ueshima 2000b) were not included in the phylogenetic analyses because they were not available on EMBL-GenBank data libraries.

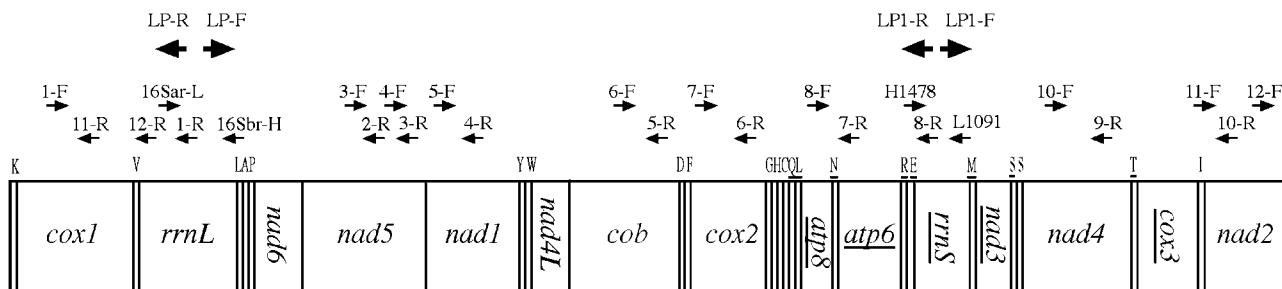


FIG. 2.—Genorganization and sequencing strategy for the mitochondrial genome of *R. europaea*. Genes encoded by the minor strand are underlined. Arrows denote the localization and direction of the primers used in the PCR amplification (see table 1 for the primer DNA sequence associated with each number).

tRNA^K
 GTTTTGGTACCGAGTTAGGTGAAAGATTAAATCTTACGGATAATTCTCAAAGCAATGCCGTTGACTTTTC---(1497)---GTAACG
 T T V * tRNA^V
 ACAACTGTGTAGTAGTTAAAGGAATAAGGGTAGTATAAATTTCATCTCAGTTACATTGAGAAGATCCGCATGAGGCTCCCTATACATAA
 ATGTTAAATTCATATTCT---(1049)---GACCAGCTCTTAGTATTTATATAAAAAGATTGACTTGCGAGAATTAGATGCCATTGATTAG
 tRNA^A
 ATCAATTATAATTTAGATATTAGCTGGTACTGACTTTATTAGAAGGTCTGGTTGCAACTAGAAAAGATTATATCTCAGAACCATATGTT
 nad^B
 tRNA^P
 ATGTCAAAAGAGTTCCGAGAACACTAACTTGGGAGTTAGAGGTAGTTGATAAAACTATTTGAATTGGGATTTATATTG---(438)---AGA
 nad^S
 G E K S * M L L F R Y S M F T Y * M L T C L C
 GGTGAAAGCTTAAGAGTTAAATTTCTTGTACTTTAGGTAC---(1614)---TCAATATTACTTATTAGAATTAAACCTGTTATGTT---
 M G L H M * tRNA^Y tRNA^M
 -(858)---ATAGGTCTACACATGTAATTGATGGCTGAATTAAAGCGATAGATTGAAATCTACTAATGGTTGATAACCTCACGTATGAAAGTAA
 nad^D
 M L K I S G S S
 TAGGTTAAATACATAAAACCATGGCCTCAAGCCTGGAATGAGTGAGTCTAACCTTGGTGTGTTGTTAAAATTCGGG---(246)---AGATCT
 cob
 L N F * M Y K V R T A K L I S * tRNA^D
 TTAAATTCTATGTATAAAGTCGCACA---(1086)---GCTAAATTGATCTCATAAATTACAGCCTAGTTATAAATAAAATAAAGTTGTCAGCT
 tRNA^F
 TTAGAAACAATTATTGGTGGTCTCAAGAGAGTGGTAGCTAAAGCACAACATTGAAGCTGTTATTAGATTATTCTCTACTCCA
 ox²
 S F W G Q C S L E F * tRNA^G
 TGAGATTTGAGGTCAA---(639)---TGTAGTTAGAGTTAGAATTCCCTAAAAGTATTAGTGTACATTGCTTCAAGCAAAAGGCTAGCAA
 tRNA^H
 TATGTTAGTTAGGATAAAATGTAAGGGTAGTTAATAAAAAATTGGCTGTGGACCATAGATAATCAGTAAGATTACCCCTATAACTTATGTT
 tRNA^C
 TATTCAGGCTGTAGTTAATAAAATTTAAGTGCAACTAAAGTGAGGTTATGCACCTCTGTCTGGTAAAATATAAAATTAGCTACTGAAAGT
 ATTCAAGAACCTAGGTACTAATAATTATCTGGGGAGTTAACAGGAATGACTCTCTATAAACTTCTGGTCTAACCCCTGGAGAACAA
 ←tRNA^Q ←tRNA^L(uur)
 ACTCCCGTGCATTACACCAAAAGATAAAACACTTGTAAAAGACAAATTAGTCATAATAAACGCTTAAAGTTACGCATTTCCTGCAATTTC
 ←atp^B
 * K F F H H P S L Q P M ←atp^B
 AAATTATTAGAATAACGATTATTAAAAAAATGGT---(129)---CGGTCTAAGTTGAGGCATACGAAAAGGCACAATTAACTTGTCTATT
 ←atp^B
 ←tRNA^N * N T T P H F L D S M M
 ATTAACAATCAAATGCTCTATTAGCTCTATTCTACGCTTACTAATTGTTGGATG---(633)---AAATAAATCTGACATCATATAACTTG
 ←tRNA^R
 AGAGATATCATTCTCAAAGCTAACGGCGAAACTTAGTGCAGGTTCGCTTCAAGTAGTTTATCTTAACTCAACTTCACCTTGA
 ←tRNA^E ←tRNA^S
 AAGTGTGATATTTCACCATAAAGCAGGGTGCACCTTCCGGTACACCTACTGTGT---(680)---CGCTAATTAACTCATCACAAAGTTGGT
 ←tRNA^{M*} S S F W D R
 TAAACAGGGGAATATAGTCATTGTTGGTTATGAGCCAAAAGCTTATAAATTAGCTTACCTGTTATGAACTAAATCAGTC---(345)---ACGAC
 ←nad³
 S K T M M ←tRNA^S(ucn) ←tRNA^S(agn)
 TTTTGTATTATTTACGTAATTGTTGAGAAATTCTCTTTAAAGGTTTCAAAACCTCTACTATAACAAAAAATTGAAAATCTGAAAC
 nad⁴
 M I E L I F K L K M K G S S
 TTAGGCTGCTAATTGAGTCGGGAATTGTTCTCCATTTCATGTGATTGAACTTATTG---(1293)---AAACTAAAATAAAAGGATCTAGA
 K S F Y L S L S Y K V S A L E L S Y S S M I L I S K Y * ←tRNA^{*} S G W W Y I S V H
 AAAAGTTTATTATCTGAGTTACAAAGTCAGTGTAGAATTAGCTATTCTAGAAATGACTCCTCATCAGTAAATACAAAC---(735)---ATGAC
 ←cox³
 F P Q K M ←tRNA^I
 AAAGGTTGTTCATAAATAGGCTTAAATGGACATTTCATTATTTTATTAAAGTAAAATTGAGTAGGCGCCGGATGAACGGATATCATTGAT
 nad²
 M S S G N L T M F I F *
 GTTGTAGATATGGAATGAAACATTCTCTGCTTATGCTTCTGAAATCTT---(900)---ACTATGTTATTAAATT
 ←tRNA^I

FIG. 3.—Schematic representation of the major strand nucleotide sequence of the mitochondrial genome of *R. europaea*. Position 1 corresponds to the first nucleotide of the *trnK* gene. Direction of transcription for each gene is represented by arrows. The beginning and end of the deduced amino acid sequence for each gene product is shown above the nucleotide sequence (one-letter amino acid abbreviation is placed above the first nucleotide of each codon). Termination codons are indicated by an asterisk. tRNA genes are underlined, and the corresponding anticodons are overlined.

To recover phylogenetic relationships among opisthobranchs, nucleotide sequences of part of the mitochondrial *cox1* gene, the complete mitochondrial *rrnL* and *nad6* genes, and a fragment of the mitochondrial *nad5* gene of several species that represent the main orders of opisthobranchs were analyzed with common methods of phylogenetic inference. MP analyses were performed with PAUP* without weighting based on the

estimated empirical value ($T_s/T_v = 0.71$). ME and ML analyses were performed with PAUP* using the GTR model (Rodríguez et al. 1990). The robustness of MP, ME, and ML analyses was tested by bootstrapping with 1,000 pseudoreplicates. Bayesian inference of opisthobranch phylogeny was performed with MrBayes 2.01 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) using the GTR model and 10,000 generations.

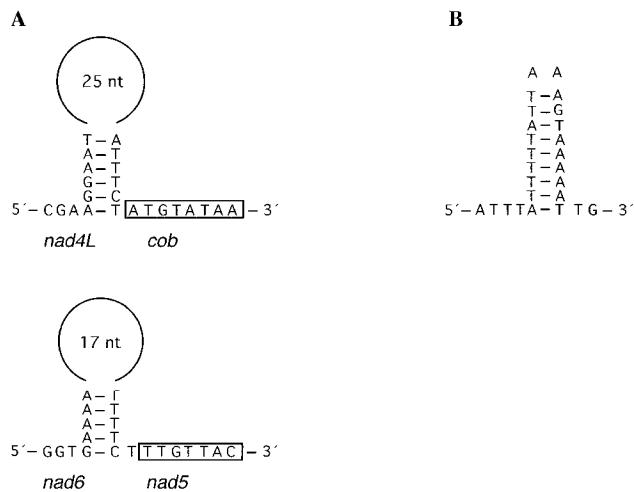


FIG. 4.—Putative functional secondary structures within the mitochondrial genome of *R. europaea*. A, Stem-loop structures between the end of the *nad4L* gene and the beginning of the *cob* gene, as well as between the *nad6* and *nad5* genes, which could serve as potential recognition signals for RNA-processing enzymes during transcription. B, A+T-rich hairpin structure between the *cox3* and *trnI* genes which potentially could be used as a signaling element for the control region of the *Robostra* mitochondrial genome.

Statistical differences between alternative phylogenetic hypotheses were evaluated in PAUP* (Swofford 1998) using the Templeton (1983), Kishino and Hasegawa (1989), and Shimodaira and Hasegawa (1999) tests.

The nucleotide sequences of opisthobranchs reported in this article have been deposited at the EMBL-GenBank data libraries under accession numbers AY083457 and AY098927–AY098931.

Results

Genome Organization and Structural Features

The gene order and main features of the mitochondrial genome of *R. europaea* are summarized in figure 3. The total length of the mitochondrial DNA is 14,472 bp. The overall base composition of the major strand is A, 27.6%; T, 38.5%; C, 14.5%; and G, 19.4%. The mitochondrial genome of *R. europaea* encodes 2 rRNAs, 22 tRNAs, and 13 protein-coding genes (figs. 2 and 3). The major strand encodes 13 out of the 37 genes (*trnQ*; *trnL(uur)*; *atp8*; *trnN*; *atp6*; *trnR*; *trnE*, *rrnS*; *trnM*; *nad3*; *trnS(ucn)*, *trnT*; *cox3*). All protein-coding genes are separated by tRNA genes except two sets of genes (*nad6/nad5/nad1* and *nad4L/cob*). A potential stem-loop secondary structure which could putatively serve as a signal for RNA-processing enzymes (Boore and Brown 1994) was found between *nad4L* and *cob* genes, as well as between the *nad6* and *nad5* genes, but not between the *nad5* and *nad1* genes (fig. 4A). The largest noncoding regions are located between *trnC* and *trnQ* genes (93 bp) and between *cox3* and *trnI* genes (54 bp) (fig. 3). The latter region has the potential to fold into a hairpin secondary structure (fig. 4B).

The mitochondrial *rrnL* (1,109 bp) and *rrnS* (740 bp) genes are located between *trnV* and *trnL(cun)* genes

and between *trnE* and *trnM* genes, respectively (figs. 2 and 3). The mitochondrial genome of *R. europaea* contains 22 tRNA genes that range in size from 54 to 69 nucleotides (fig. 5). All the deduced tRNAs can be folded into a cloverleaf secondary structure with the exception of tRNA(S-UCN) and tRNA(S-AGN) that lack the DHU arm. Mismatches in the acceptor stems of tRNA(L-CUN) and tRNA(Y) (fig. 5) might be corrected by the tRNA editing described by Yokobori and Pääbo (1995). Interestingly, the *trnC* gene is located between *trnH* and *trnQ* genes and not between *trnN* and *atp6* genes as in the mitochondrial genome of *Pupa* (Kurabayashi and Ueshima 2000a). The anticodons of all *Robostra* mitochondrial tRNAs are preceded by a thymine and followed by a purine.

Seven out of the 13 protein-coding genes use ATG as the start codon (*cox1*, *cob*, *cox2*, *atp8*, *atp6*, *cox3*, and *nad2*). Other genes begin with TTG (*nad6*, *nad5*, and *nad4L*), ATA (*nad3*), ATT (*nad1*), and GTG (*nad4*) (fig. 3). Most *Robostra* open reading frames end with TAA (*nad6*, *cob*, *atp8*, *nad4*, and *nad2*) or TAG (*cox1*, *nad5*, *cox2*, and *atp6*). The remaining have incomplete stop codons, either T (*nad4L*, *nad3*, and *cox3*) or TA (*nad1*) (fig. 3). In many mitochondrial genomes, *nad4L* has a complete stop codon and overlaps with a contiguous protein-coding gene. An alternative complete stop codon for *nad4L* can be postulated if it overlaps *cob* by eight nucleotides.

The genetic code of the *Robostra* mitochondrial genome is the same as that used by other mollusks. It differs from the universal genetic code in that ATA codes for methionine, TGA for tryptophan, and AGR for serine. A total of 3,665 amino acids are encoded by the *Robostra* mitochondrial genome (table 2). The most abundant amino acid residue is leucine, whereas the rarest is cysteine (table 2). Thymines are preferentially used in third codon positions. Cytosine is generally the rarest nucleotide in third codon positions (table 2).

Sequence Variation and Phylogenetic Analyses

The deduced amino acid sequences of all 13 mitochondrial protein-coding genes were combined into a single data set that produced an alignment of 3,869 positions. Of these, 1,227 were excluded from the analyses because of ambiguity in the homology assignment, 980 were invariant, and 357 were parsimony-informative. The mean character distance between *Robostra* and *Pupa* is 0.27. The mean character distance between *Albinaria* and *Cepaea* is 0.43. The average mean character distance between opisthobranchs and pulmonates is 0.40.

ML analysis of the combined amino acid data set arrived at a tree (log likelihood = -22,320.08) that strongly supports the monophyly of opisthobranchs (*Pupa* + *Robostra*) and pulmonates (*Albinaria* + *Cepaea*) (fig. 6). Bayesian inference rendered an identical result (fig. 6A). When MP (one single tree of 3,441 steps; consistency index [CI] = 0.94) and ME (score = 1.03) analyses were performed, only the opisthobranchs were recovered as a monophyletic group (fig. 6A). But

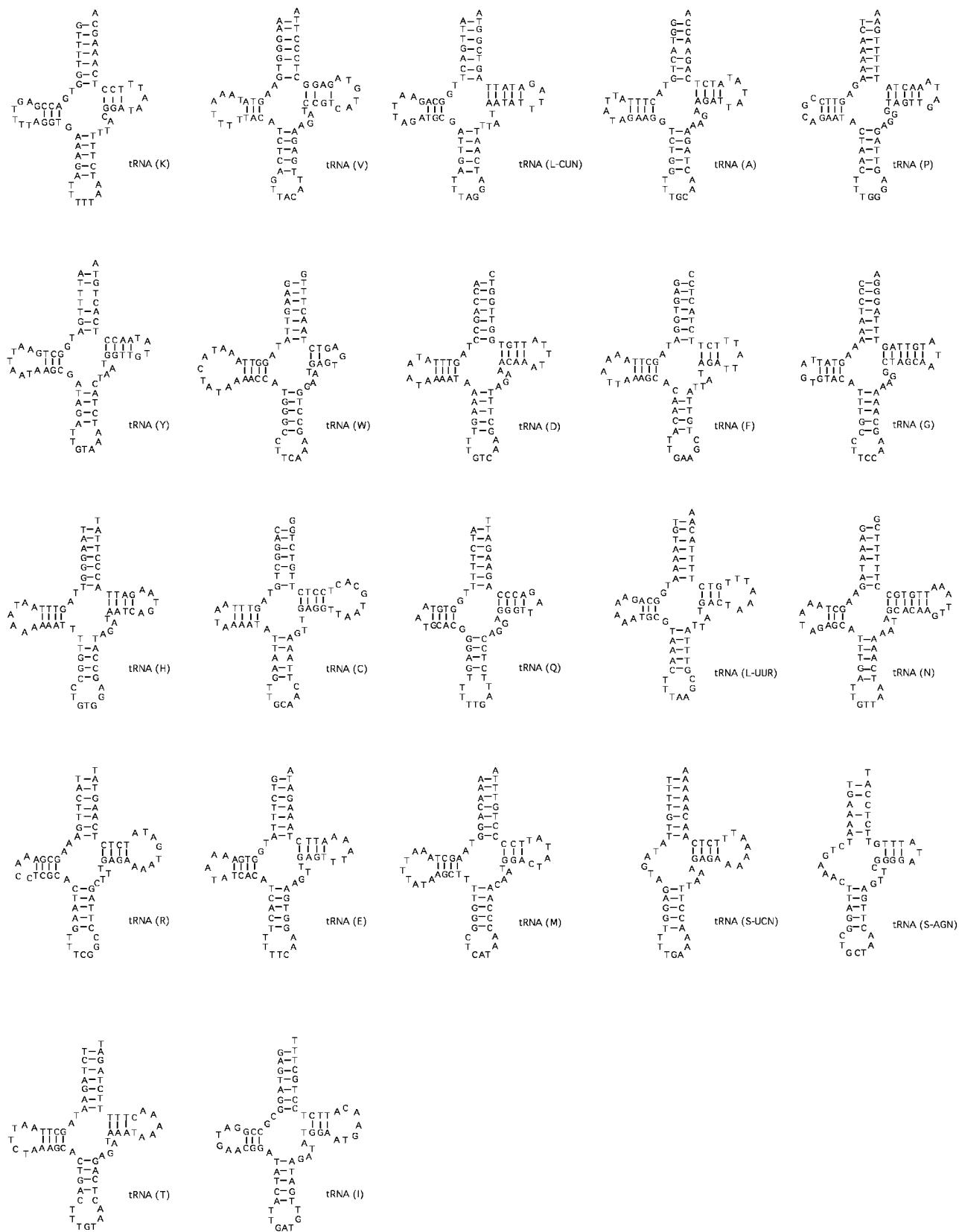


FIG. 5.—Proposed cloverleaf secondary structures of the 22 tRNAs deduced from the complete sequence of the mitochondrial genome of *R. europaea*.

Table 2
Codon Usage of *Robostra europaea* Mitochondrial DNA-Encoded Proteins

Amino Acid	Codon	Number	Fraction	Amino Acid	Codon	Number	Fraction
Gly . .	GGG	83	0.29	Trp	TGG	40	0.44
Gly . .	GGA	86	0.30	Trp	TGA	50	0.56
Gly . .	GGT	104	0.36	Cys	TGT	45	0.82
Gly . .	GTC	14	0.05	Cys	TGC	10	0.18
Glu . .	GAG	43	0.47	End	TAG	4	0.31
Glu . .	GAA	49	0.53	End	TAA	9	0.69
Asp . .	GAT	58	0.85	Tyr	TAT	97	0.68
Asp . .	GAC	10	0.15	Tyr	TAC	45	0.32
Val . .	GTG	47	0.17	Leu	TTG	89	0.16
Val . .	GTA	73	0.26	Leu	TTA	265	0.47
Val . .	GTT	140	0.51	Phe	TTT	261	0.78
Val . .	GTC	17	0.06	Phe	TTC	72	0.22
Ala . .	GCG	18	0.08	Ser	TCG	24	0.06
Ala . .	GCA	39	0.18	Ser	TCA	63	0.16
Ala . .	GCT	126	0.58	Ser	TCT	116	0.30
Ala . .	GCC	34	0.16	Ser	TCC	13	0.03
Ser . .	AGG	33	0.09	Arg	CGG	15	0.26
Ser . .	AGA	55	0.14	Arg	CGA	20	0.34
Ser . .	AGT	65	0.17	Arg	CGT	18	0.31
Ser . .	AGC	18	0.05	Arg	CGC	5	0.09
Lys . .	AAG	28	0.29	Gln	CAG	14	0.27
Lys . .	AAA	67	0.71	Gln	CAA	37	0.73
Asn . .	AAT	74	0.78	His	CAT	46	0.58
Asn . .	AAC	20	0.22	His	CAC	33	0.42
Met . .	ATG	56	0.30	Leu	CTG	18	0.03
Met . .	ATA	128	0.70	Leu	CTA	60	0.11
Ile . .	ATT	220	0.87	Leu	CTT	98	0.18
Ile . .	ATC	32	0.13	Leu	CTC	26	0.05
Thr . .	ACG	15	0.08	Pro	CCG	21	0.14
Thr . .	ACA	61	0.32	Pro	CCA	31	0.21
Thr . .	ACT	93	0.50	Pro	CCT	83	0.56
Thr . .	ACC	19	0.10	Pro	CCC	12	0.08

a Wilcoxon signed-ranks test (Templeton 1983) showed that the second most parsimonious tree that supported the monophyly of pulmonates was not statistically significantly different (3,444 steps; $Z = -0.31$; $P = 0.75$). *Cepaea* exhibits a rather long branch, and its basal position in the MP and ME analyses might be an artifact attributable to long-branch attraction by the out-group (Felsenstein 1978).

To include the caenogastropodan *L. saxatilis* into the phylogenetic analyses, a smaller subset of protein-coding genes including *cox1*, *cox2*, *atp8*, *atp6*, *nad1*, *nad6*, and *cob* was analyzed with MP, ME, ML, and Bayesian methods of phylogenetic inference. The alignment of 1,789 positions was analyzed. Of these, 689 were excluded from the analyses because of ambiguity in the homology assignment, 495 were invariant, and 249 were parsimony-informative. All phylogenetic analyses recovered a monophyletic opisthobranchia clade and *Littorina* as the most basal taxon of the in-group (fig. 6B). In MP (one single tree of 1,287 steps; CI = 0.91), ME (score = 0.94), and ML (log likelihood = -9,451.60) phylogenetic analyses, pulmonates were paraphyletic (fig. 6B). In Bayesian phylogenetic analyses, however, pulmonates were monophyletic with a 98% posterior probability (not shown).

The nucleotide sequences of the mitochondrial *cox1*, *rrnL*, *nad6*, and *nad5* genes were combined into a single data set that produced an alignment of 2,631 positions. Of these, 942 were excluded because of ambiguity in the homology assignment, 437 were invariant, and 900 were parsimony-informative. The mean pairwise uncorrected p distance among opisthobranchs is 0.32 ± 0.03 . The minimum and maximum uncorrected p distances are between *Aplysia* and *Umbraculum* (0.25) and between *Pupa* and both *Robostra* and *Aplysia* (0.36), respectively. The uncorrected p distance between *Albinaria* and *Cepaea* is 0.47. The mean pairwise uncorrected p distance between opisthobranchs and pulmonates is 0.43 ± 0.02 . ML (log likelihood = -15,722.75) and Bayesian methods of phylogenetic inference arrived at identical topologies (fig. 7). ME (score = 2.65) only differed from the ML tree in that *Aplysia* was recovered as sister group of *Umbraculum* to the exclusion of *Chelidonura*. MP recovered two trees of 3,779 steps (CI = 0.62), one with the topology shown in figure 7 and the other supporting the monophyly of pulmonates. In all cases, opisthobranchs were monophyletic with strong statistical support (fig. 7). The Kishino and Hasegawa (1989) and Shimodaira and Hasegawa (1999) tests rejected statistical differences between the ML tree and a tree with a monophyletic pulmonate clade (log likelihood = -15,724.52; $P = 0.78$ and $P = 0.38$, respectively). Within opisthobranchs, cephalaspideans (*Pupa* and *Chelidonura*) were polyphyletic. *Pupa* was consistently the sister group of *Ascobulla* (order Sacoglossa), and both species were placed basal to the rest of opisthobranchs (fig. 7). *Chelidonura* was placed in a derived position either as sister group of *Aplysia* (order Anaspidea) (MP, ML, and Bayesian analyses) or as sister group of *Aplysia* + *Umbraculum* (order Notaspidea) (ME analyses). Because of the low bootstrap support, the relationships between *Chelidonura*, *Aplysia*, and *Umbraculum* remain unresolved. The nudibranchs (*Robostra* and *Aeolidia*) were monophyletic (fig. 7).

Rearrangements of the *trnV*, *trnL(cun)*, *trnA*, and *trnP* genes located between the *cox1*, *rrnL*, and *nad6* genes were analyzed by mapping the relative positions of these tRNA genes onto the recovered phylogeny (fig. 8). The *trnV* gene is located between the *cox1* and *rrnL* genes in all in-group taxa. *Cepaea* only presents the *trnL(cun)* and *trnA* genes between the *rrnL* and *nad6* genes. *Albinaria* presents the *trnP* gene between the *trnL(cun)* and *trnA* genes. With this data set, it is not possible to infer which tRNA genes were located between the *rrnL* and *nad6* genes in the ancestors of euothyneurans and of pulmonates. In all opisthobranchs, the *trnP* gene is located between the *trnA* and *nad6* genes (fig. 8). This relative position of the *trnP* gene seems to be a synapomorphy of opisthobranchs.

Discussion

The mitochondrial genome of *R. europaea* is one of the smallest known among Metazoa. The small size of the genome of *Robostra* is the result of its compact gene organization, the absence of long noncoding re-

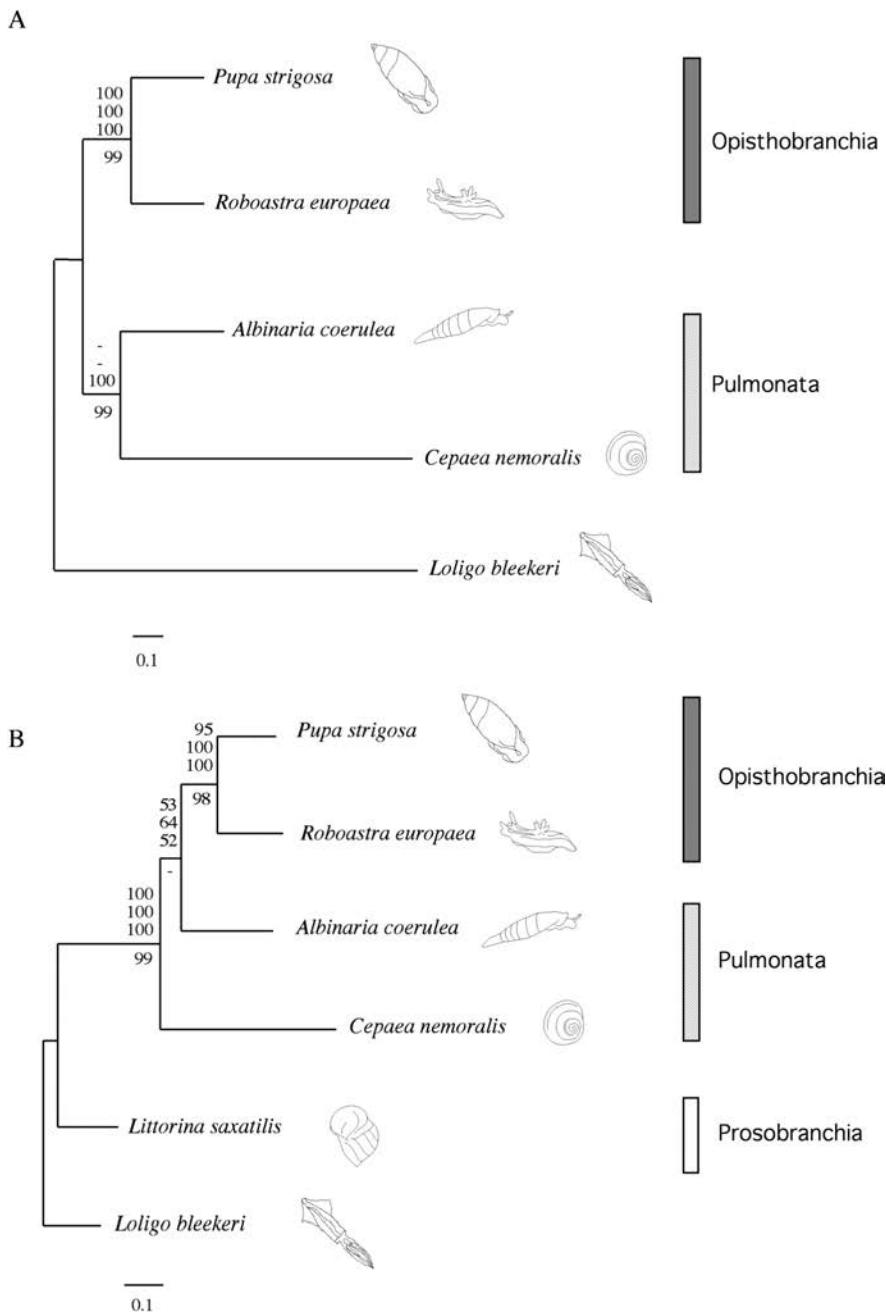


FIG. 6.—Phylogenetic position of *R. europaea*. *A*, The deduced amino acid sequences of all mitochondrial protein-coding genes of *Robostra*, *Pupa*, *Albinaria*, and *Cepaea* were combined into a single data set. *B*, The deduced amino acid sequences of *cox1*, *cox2*, *atp8*, *atp6*, *nad1*, *nad6*, and *cob* genes of the aforementioned genera and *Littorina* were combined into a single data set. Both data sets were analyzed with MP (upper value of each triplet of numbers above branches represents bootstrap support), ME (mean character distances; middle value of each triplet of numbers above branches represents bootstrap support), ML (mtREV model; lower value of each triplet of numbers above branches represents quartet puzzling support), and Bayesian (Jones model; numbers below branches represent Bayesian posterior probabilities) methods of inference. The ML (mtREV model) trees are shown. *Loligo bleekeri* was used as the out-group.

gions, and the reduced size of its genes. This feature seems to be common to all Euthyneura because the size of the genome of *Robostra* is within the range of variation in genome size found in *Pupa* (14.2 kb; Kurabayashi and Ueshima 2000a) and in pulmonates (14.1–14.5 kb; Hatzoglou, Rodakis, and Lecanidou 1995; Terrett, Miles, and Thomas 1996; Yamazaki et al. 1997). The mitochondrial genome of *Robostra* shows an A+T content (66.1%) similar to that of other mollusks (Hoff-

man, Boore, and Brown 1992; Boore and Brown 1994; Hatzoglou, Rodakis, and Lecanidou 1995; Terrett, Miles, and Thomas 1996; Yamazaki et al. 1997; Sasuga et al. 1999; Kurabayashi and Ueshima 2000a, 2000b).

The gene arrangement of *Robostra* is similar to that of *Pupa* (Kurabayashi and Ueshima 2000a) but differs in the transposition of the *trnC* gene. Moreover, the relative position of the *trnC* gene in pulmonates is different from that of both opisthobranchs (fig. 9). The re-

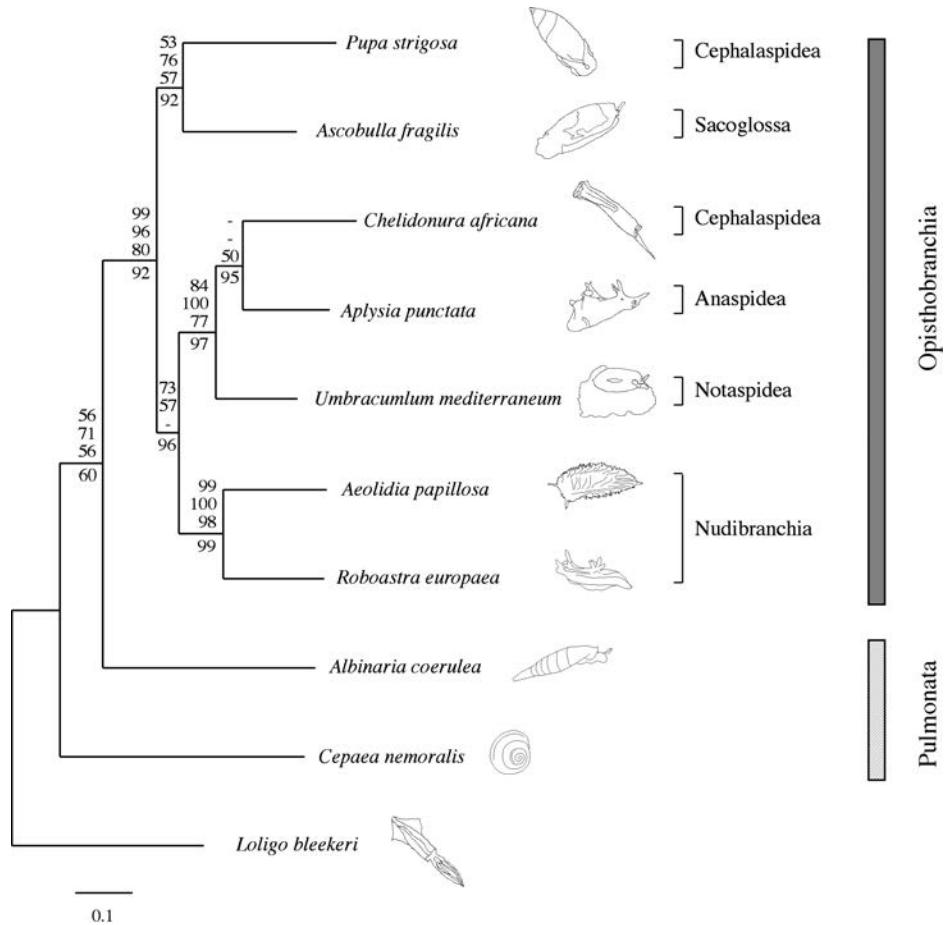


FIG. 7.—Phylogenetic relationships of representative orders of opisthobranchs as inferred from the nucleotide sequences of the *cox1*, *rrnL*, *nad6*, and *nad5* genes. The ML tree is shown. Numbers above branches represent MP (Ts:Tv = 1:1; upper value of each triplet of numbers), ME (GTR distances; middle value of each triplet of numbers), and ML (GTR model; lower value of each triplet of numbers) nonparametric bootstrap values. The numbers below branches represent Bayesian (GTR model) posterior probabilities. *Loligo bleekeri* was used as the out-group.

arrangement of tRNA genes is very frequent in invertebrate mitochondrial genomes and may mobilize adjacent protein-coding and rRNA genes (Boore 1999). The Heterostropha, Pulmonata, and Opisthobranchia mitochondrial genomes described so far share a rather conserved gene arrangement (Hatzoglou, Rodakis, and Lecanidou 1995; Terrett, Miles, and Thomas 1996; Yamazaki et al. 1997; Kurabayashi and Ueshima 2000a, 2000b) (fig. 9). In contrast, a group traditionally considered within Prosobranchia, Caenogastropoda, shows a highly divergent gene arrangement that could be related to the gene arrangement of nongastropod mollusks (Boore 1999) (fig. 9). Therefore, the conserved gene arrangement of heterostrophans, pulmonates, and opisthobranchs (all together Heterobranchia) may present a derived state with respect to the ancestral state represented by the caenogastropodan *Littorina* (Boore 1999).

Of the two largest noncoding regions, that located between the *cox3* and *trnI* genes is the only one that contains a sequence with the potential to fold into a hairpin structure (fig. 4B). In addition, this region shows a high A+T content (87%). Both features are typical of invertebrate mitochondrial control regions (e.g., *Drosophila*; Clary and Wolstenholme 1985). Hence, this re-

gion seems to be a good candidate to contain the signals associated with the origin of replication and transcription of the *Robostra* mitochondrial genome.

The amino acid sequence divergence between *Pupa* and *Robostra* is almost half that between *Albinaria* and *Cepaea*. Furthermore, the amino acid sequence divergence within pulmonates is as much as that found between pulmonates and opisthobranchs. All phylogenetic analyses based on the combined protein-coding gene data set strongly support the monophyly of opisthobranchs (*Robostra* and *Pupa*) (fig. 6A). The monophyly of opisthobranchs is also highly supported when *Littorina* is included in the phylogenetic analyses (fig. 6B). The genus *Pupa* is a representative of the most ancestral order (Cephalaspidea) of opisthobranchs. In fact, members of its family (Acteonidae) have been proposed as a model of the archetypal opisthobranch because their external morphology is similar to that of prosobranchs (Rudman 1972). In contrast, the genus *Robostra* represents the most derived order (Nudibranchia) of the group with numerous morphological innovations (Wägele and Willan 2000).

Our results are in full agreement with the traditional view that opisthobranchs are a natural group of gas-

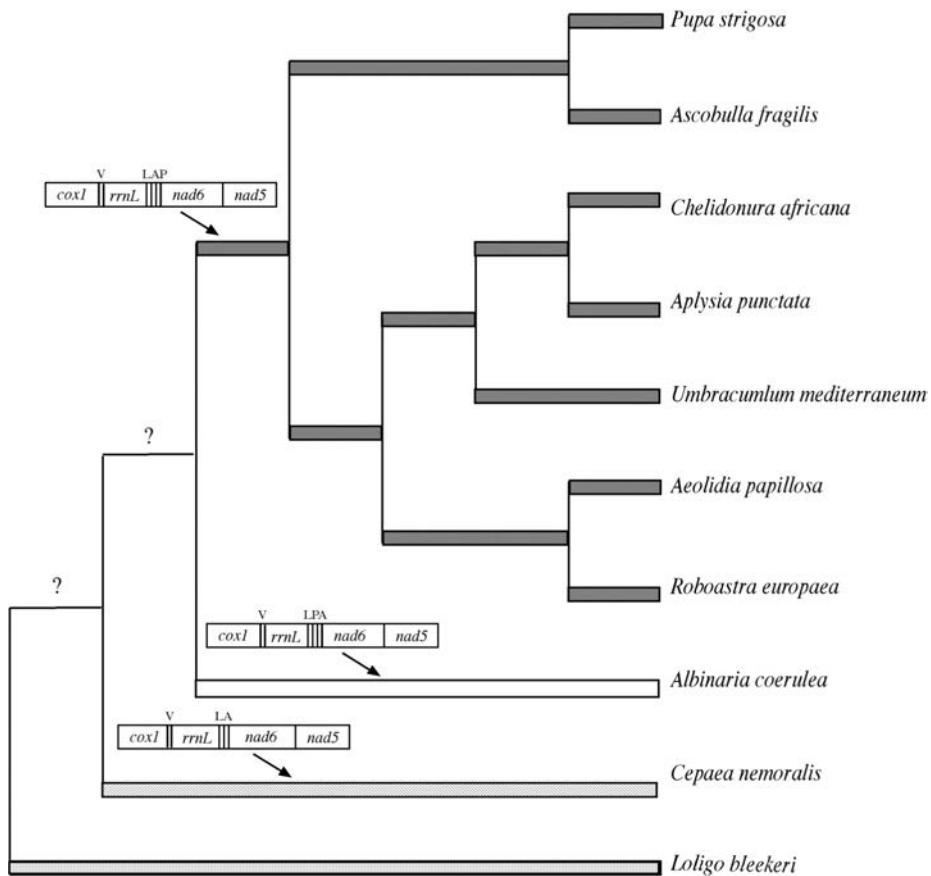


FIG. 8.—Mitochondrial rRNA gene rearrangements during gastropod evolution. The relative positions of the *trnV*, *trnL*(UCN), *trnA*, and *trnP* genes were mapped onto the *cox1+rrnL+nad6+nad5* phylogeny.

tropods (Thiele 1929–1935) and contradict recent molecular studies (e.g., Thollesson 1999b; Wollscheid and Wägele 1999; Dayrat et al. 2001) (fig. 1C–E). Our larger sequence data set and the lack of phylogenetically informative sites of previous molecular data sets (either because of their shorter size or their higher among-site rate variation) likely explain the discrepancy in resolution and statistical support between our results and those of previous studies. To test the validity of morphological hypotheses (Salvini-Plawen and Steiner 1996; Ponder and Lindberg 1997; fig. 1A and B) that challenge the monophyly of opisthobranchs, more opisthobranch as well as heterostrophan and pulmonate taxa need to be included in future phylogenetic analyses based on molecular data.

The monophyly of opisthobranchs is further supported by all phylogenetic analyses based on mitochondrial *cox1*, *rrnL*, *nad6*, and *nad5* genes at the nucleotide level (fig. 7). The relative position of the *trnP* gene between the *trnA* and *nad6* genes seems to be a shared derived character of opisthobranchs. Within opisthobranchs, the monophyly of cephalaspideans is rejected because *Pupa* is closely related to *Ascobulla* (order Sacoglossa), and *Chelidonura* appears as sister group to either *Aplysia* (order Anaspidea) or *Aplysia+Umbraculum* (fig. 7). This result is consistent with recent phylogenetic analyses based on morphological (Mikkelsen 1996) and molecular (Thollesson 1999b) data. Accord-

ing to morphological and molecular evidence, cephalaspideans can be separated into at least two groups: one basal to other opisthobranchs and the other related to anaspideans (Mikkelsen 1996; Thollesson 1999b). Our results only differ from these hypotheses in suggesting a close relationship of sacoglossans to basal cephalaspideans. This relationship is not that surprising because *Ascobulla*, which exhibits typical sacoglossan-type radular teeth, shares many external morphological characters with cephalaspideans (Mikkelsen 1998). The order Notaspidea is represented in our molecular phylogeny by the genus *Umbraculum* which is placed close to *Aplysia* and *Chelidonura* (fig. 7). This result supports previous morphological evidence that related some lineages of notaspideans to anaspideans (Schmekel 1985). The order Notaspidea includes two distinct groups, Umbraculomorpha and Pleurobranchomorpha (Rudman and Willan 1998). Several morphological characters such as an open seminal groove, a nonretractile penis, an albumen gland, plates in the gizzard, and the absence of a blood gland suggest that the Umbraculomorpha are closer to the Anaspidea than to the Pleurobranchomorpha (Schmekel 1985). Furthermore, the latter group seems to be more closely related to nudibranchs (Schmekel 1985; Wägele and Willan 2000). In this regard, a recent molecular phylogeny based on mitochondrial *rrnL* gene sequence data suggests that Pleurobranchomorpha may even be placed deep within the nudibranchs (Thollesson

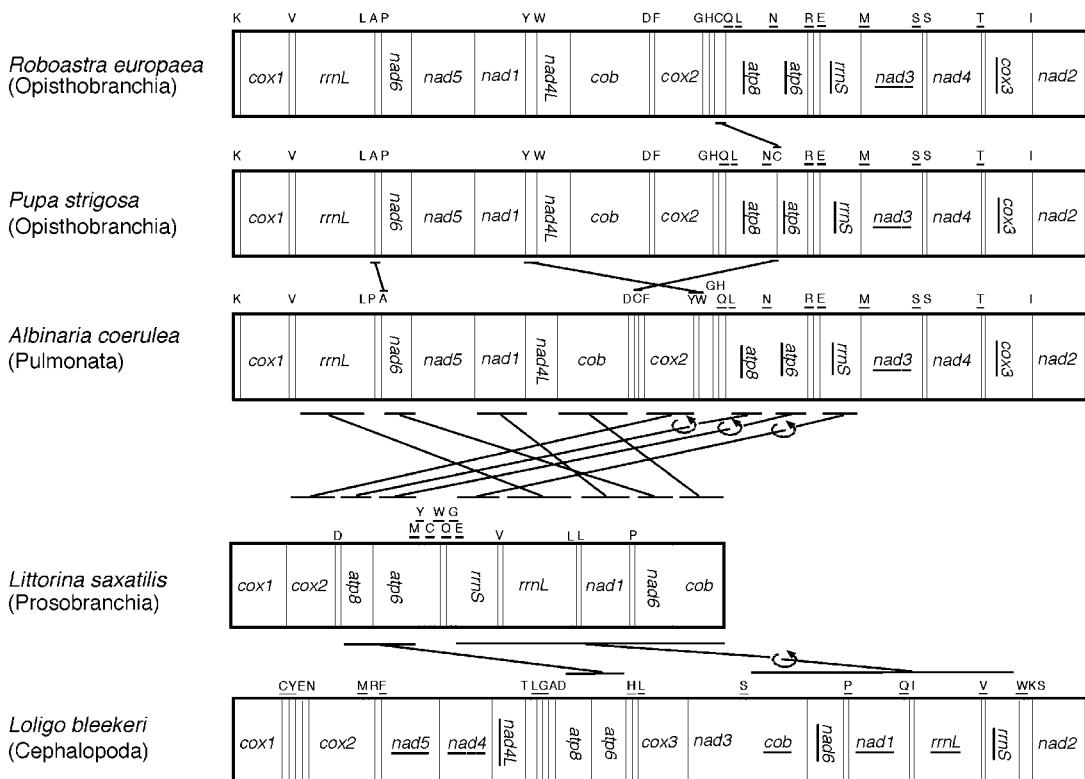


FIG. 9.—Differences in gene arrangement between *Robostra* and other mollusks. Transpositions of protein-coding and rRNA genes are depicted among all taxa. Translocations of tRNA genes are only depicted among opisthobranchs and pulmonates. Most gene translocations have occurred between *Littorina* and Euthyneura (opisthobranchs and pulmonates). Genes encoded by the minor strand are underlined.

1999b). The monophyly of nudibranchs (without considering Pleurobranchomorpha) is well supported by several morphological (Schmekel 1985; Haszprunar 1988; Salvini-Plawen and Steiner 1996; Wägele and Willan 2000) and molecular (Wollscheid and Wägele 1999; Wollscheid et al. 2001) studies. The two nudibranchs (*Robostra* and *Aeolidia*) included in our study are grouped together in the recovered phylogeny.

In conclusion, our analyses show that the newly determined mitochondrial genome of the nudibranch *R. europaea* is similar in size and gene arrangement to the mitochondrial genome of the cephalaspidean *P. strigosa*. Both species represent the most derived and basal lineages of opisthobranchs, respectively. These two mitochondrial genomes show the greatest sequence similarity when compared with other gastropod mitochondrial genomes. All phylogenetic analyses performed in this study both at the amino acid (including two orders) and at the nucleotide (including five orders) level, as well as the relative position of the *trnP* gene, support the monophyly of opisthobranchs with respect to pulmonates. The monophyly of this latter group is supported by ML and Bayesian analyses and is not rejected by MP analyses. Nevertheless, more representatives of heterostrophans, opisthobranchs, and pulmonates need to be included in future analyses to confirm further the monophyly of these gastropod groups.

Acknowledgments

Guillermo San Martín and Xavier Turón provided some opisthobranch samples. Thanks to two anonymous

reviewers for providing helpful suggestions on the manuscript. C.G. was sponsored by a predoctoral fellowship of the Ministerio de Ciencia y Tecnología. This work received financial support from projects of the Ministerio de Ciencia y Tecnología to J.T. (REN2000-0890/GLO) and to R.Z. (REN2001-1514/GLO).

LITERATURE CITED

- ADACHI, J., and M. HASEGAWA. 1996. Model of amino acid substitution in proteins encoded by mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **42**:459–468.
- ARNASON, U., X. XU, and A. GULLBERG. 1996. Comparison between the complete mitochondrial DNA sequences of Homo and the common chimpanzee based on nonchimeric sequences. *J. Mol. Evol.* **42**:145–152.
- BIELER, R. 1992. Gastropod phylogeny and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **23**:311–338.
- BOORE, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* **27**:1767–1780.
- BOORE, J. L., and W. M. BROWN. 1994. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the black chiton, *Katharina tunicata*. *Genetics* **138**:423–443.
- CASTRESANA, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **17**:540–552.
- CLARY, D. O., and D. R. WOLSTENHOLME. 1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. *J. Mol. Evol.* **22**:252–271.
- CUMMINGS, M. P., S. P. OTTO, and J. WAKELEY. 1995. Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **12**:814–822.

- DAYRAT, B., A. TILLIER, G. LECOINTRE, and S. TILLIER. 2001. New clades of Euthyneuran Gastropods (Mollusca) from 28S rRNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **19**:225–235.
- DEVEREUX, J., P. HAEBERLI, and O. SMITHIES. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**:387–395.
- FELSENSTEIN, J. 1978. Cases in which parsimony and compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.* **27**:401–410.
- . 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783–791.
- FRETTER, V. G., and A. GRAHAM. 1962. British prosobranch molluscs. Ray Society, London.
- GOSLINER, T. M. 1985. Parallelism, parsimony and testing of phylogenetics hypotheses: the case of opisthobranch gastropods. Pp. 105–107 in E. S. VRBA, ed. Species and speciation. Transvaal Museum, Pretoria.
- GOSLINER, T. M., and M. T. GHISELIN. 1984. Parallel evolution in opisthobranch gastropods and its implications for phylogenetic methodology. *Syst. Zool.* **33**:255–274.
- HASZPRUNAR, G. 1985. The Heterobranchia—a new concept of the phylogeny of the higher Gastropoda. *Z. Zool. Syst. Evolutionsforsch.* **23**:15–37.
- . 1988. On the origin and evolution of major gastropods group, with special reference to the streptoneura. *J. Molluscan Stud.* **54**:367–441.
- HATZOGLOU, E., G. C. RODAKIS, and R. LECHANIDOU. 1995. Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the land snail *Albinaria coerulea*. *Genetics* **140**:1353–1366.
- HOFFMANN, R. J., J. L. BOORE, and W. M. BROWN. 1992. A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Genetics* **131**:397–412.
- HUELSENBECK, J. P., and F. R. RONQUIST. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17**:754–755.
- JONES, D. T., W. R. TAYLOR, and J. M. THORNTON. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comp. Appl. Biosci.* **8**:275–282.
- KISHINO, H., and M. HASEGAWA. 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea. *J. Mol. Evol.* **29**:170–179.
- KOCHER, T. D., W. K. THOMAS, A. MEYER, S. V. EDWARDS, S. PAABO, F. X. VILLABLANCA, and A. C. WILSON. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:6196–6200.
- KURABAYASHI, A., and R. UESHIMA. 2000a. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the primitive opisthobranch gastropod *Pupa strigosa*: systematics implication of the genome organization. *Mol. Biol. Evol.* **17**:266–277.
- . 2000 b. Partial mitochondrial genome organization of the heterostrophan gastropod *Omalogyra atomus* and its systematic significance. *Venus* **59**:7–18.
- MADDISON, W. P., and D. R. MADDISON. 1992. MacClade: analysis of phylogeny and character evolution. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- MEDINA, M., and P. J. WALSH. 2000. Molecular systematics of the order Anaspidea based on mitochondrial DNA sequence (12S, 16S, and COI). *Mol. Phylogenet. Evol.* **15**:41–58.
- MIKKELSEN, P. M. 1996. The evolutionary relationships of Cephalaspidea s. l. (Gastropoda: Opisthobranchia): a phylogenetic analysis. *Malacologia* **37**:375–442.
- . 1998. *Cylindrobulla* and *Ascobulla* in the western Atlantic (Gastropoda, Opisthobranchia, Sacoglossa): systematic review, description of a new species, and phylogenetic reanalysis. *Zool. Scripta* **27**:49–71.
- MORTON, J. E. 1979. Molluscs. 5th edition. Hutchinson & Co. Ltd., London.
- OLSEN, G. J., and C. R. WOESKE. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.* **7**:113–123.
- PALUMBI, S., A. MARTIN, S. ROMANO, W. O. McMILLAN, L. STICE, and G. GRABOWSKI. 1991. The simple fool's guide to PCR. Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu.
- PONDER, W. F., and D. R. LINDBERG. 1997. Towards a phylogeny of gastropod molluscs: an analysis using morphological characters. *Zool. J. Linn. Soc.* **119**:83–265.
- POULICEK, M., M.-F. VOSS-FOUCART, and C. JEUNIAUX. 1991. Regressive shell evolution among opisthobranch gastropods. *Malacologia* **32**:223–232.
- RAWLINGS, T. A., T. M. COLLINS, and R. BIELER. 2001. A major mitochondrial gene rearrangement among closely related species. *Mol. Biol. Evol.* **18**:1604–1609.
- RODRÍGUEZ, F., J. F. OLIVER, A. MARÍN, and J. R. MEDINA. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* **142**:485–501.
- RUDMAN, W. B. 1972. A study of the anatomy of *Pupa* and *Maxacteon* (Acteonidae, Opisthobranchia) with an account of the breeding cycle of *Pupa kirki*. *J. Nat. Hist.* **6**:547–560.
- RUDMAN, W. B., and R. C. WILLAN. 1998. Opistobranchia. Pp. 915–1035 in P. L. BEESLEY, G. J. B. ROSS, and A. WELLS, eds. Mollusca: the southern synthesis. Fauna of Australia, Vol. 5. CSIRO publishing, Melbourne.
- RUSSO, C. A. M., N. TAKEZAKI, and M. NEI. 1996. Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. *Mol. Biol. Evol.* **13**:525–536.
- RZHETSKY, A., and M. NEI. 1992. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Mol. Biol. Evol.* **9**:945–967.
- SAAVEDRA, C., M. I. REYERO, and E. ZOUROS. 1997. Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics* **145**:1073–1082.
- SALVINI-PLAWEN, L., and G. STEINER. 1996. Synapomorphies and plesiomorphies in higher classification of Mollusca. Pp. 29–51 in J. TAYLOR, ed. Origin and evolutionary radiation of the Mollusca. The Malacological Society of London, London.
- SASUGA, J., S. YOKOBORI, M. KAIFU, T. UEDA, K. NISHIKAWA, and K. WATANAVE. 1999. Gene content and organization of a mitochondrial DNA segment of the squid *Loligo bleekeri*. *J. Mol. Evol.* **48**:692–702.
- SCHMEKEL, L. 1985. Aspects of the evolution within the opisthobranchs. Pp. 221–267 in E. R. TRUEMAN and M. R. CLARKE, eds. The Mollusca. Academic Press, London.
- SHIMODAIRA, H., and M. HASEGAWA. 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* **16**:1114–1116.
- SPENGEL, J. 1881. Die Geruchsorgane und das Nervensystem der Mollusken. *Z. Wiss. Zool. Leipzig* **35**:333–383.
- STRIMMER, K., and A. VON HAESLER. 1996. Quartet puzzling: a quartet maximum-likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* **13**:964–969.
- SWOFFORD, D. L. 1998. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4.0. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.
- TEMPLETON, A. R. 1983. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular refer-

- ence to the evolution of human and the apes. *Evolution* **37**: 221–244.
- TERRETT, J. A., S. MILES, and R. H. THOMAS. 1996. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Cepaea nemoralis* (Gastropoda: Pulmonata). *J. Mol. Evol.* **42**:160–168.
- THIELE, J. 1929–1935. *Handbuch der Systematischen Weichtierkunde*. 4 volumes. Jena, Germany.
- THOLLESSON, M. 1999a. Phylogenetic analysis of dorid nudibranchs (Gastropoda: Doridacea) using the mitochondrial 16S rRNA gene. *J. Molluscan Stud.* **65**:335–353.
- 1999b. Phylogenetic analysis of Euthyneura (Gastropoda) by means of the 16s rRNA gene: use of a fast gene for higher-level phylogenies. *Proc. R. Soc. Lond. B* **266**: 75–83.
- THOMPSON, J. D., T. J. GIBSON, F. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN, and D. G. HIGGINS. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876–4882.
- TILLIER, S., M. MASSELOT, J. GUERDOUX, and A. TILLIER. 1994. Monophyly of major gastropod taxa tested from partial 28S rRNA sequences, with emphasis on Euthyneura and hot-vent limpets peltospiroidea. *Nautilus* **2**:122–140.
- WÄGELE, H., and R. C. WILLAN. 2000. Phylogeny of nudibranchia. *Zool. J. Linn. Soc.* **130**:83–181.
- WILDING, C. S., P. J. MILL, and J. GRAHAME. 1999. Partial sequence of the mitochondrial genome of *Littorina saxatilis*: relevance to gastropod phylogenetics. *J. Mol. Evol.* **48**: 348–359.
- WINNEPENNINCKX, B., G. STEINER, T. BACKELJAU, and R. DE WACHTER. 1998. Details of gastropod phylogeny inferred from 18S rRNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **9**:55–63.
- WOLLSCHEID, E., J. L. BOORE, W. M. BROWN, and H. WÄGELE. 2001. The phylogeny of Nudibranchia (Opisthobranchia, Gastropoda, Mollusca) reconstructed by three molecular markers. *Org. Diver. Evol.* **1**:241–256.
- WOLLSCHEID, E., and H. WÄGELE. 1999. Initial results on the molecular phylogeny of the Nudibranchia (Gastropoda, Opisthobranchia) based on 18s rRNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* **13**:215–226.
- YAMAZAKI, N., R. UESHIMA, J. A. TERRET et al. (12 co-authors). 1997. Evolution of pulmonate gastropod mitochondrial genomes: comparisons of gene organizations of *Euhadra*, *Cepaea* and *Albinaria* and implications of unusual tRNA secondary structures. *Genetics* **145**:749–758.
- YOKOBORI, S. I., and S. PÄÄBO. 1995. Transfer RNA editing in land snail mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10432–10435.
- YOON, S. H., and W. KIM. 2000. Phylogeny of some gastropod mollusks derived from 18s rRNA sequences with emphasis on the Euthyneura. *Nautilus* **114**:84–92.
- ZARDOYA, R., and A. MEYER. 1996. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Mol. Biol. Evol.* **13**:933–942.
- ZOUROS, E. 2000. The exceptional mitochondrial DNA system of the mussel family Mytilidae. *Genes Genet. Syst.* **75**:313–318.
- ZOUROS, E., A. O. BALL, C. SAAVEDRA, and K. R. FREEMAN. 1994. Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* **368**:818.

ROSS CROZIER, reviewing editor

Accepted April 26, 2002

III.2.- Molecular phylogeny of Euthyneura (Mollusca: Gastropoda).

Molecular Biology and Evolution 21: 303-313. (2004)



Molecular Phylogeny of Euthyneura (Mollusca: Gastropoda)

Cristina Grande,* José Templado,* J. Lucas Cervera,† and Rafael Zardoya*

*Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid, Spain;
†Departamento de Biología, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad de Cádiz, Cádiz, Spain

A new phylogenetic hypothesis for Euthyneura is proposed based on the analysis of primary sequence data (mitochondrial *coxl*, *trnV*, *rrnL*, *trnL(cun)*, *trnA*, *trnP*, *nad6*, and *nad5* genes) and the phylogenetic utility of two rare genomic changes (the relative position of the mitochondrial *trnP* gene, and an insertion/deletion event in a conserved region of the mitochondrial Cox1 protein) is addressed. Both sources of phylogenetic information clearly rejected the monophyly of pulmonates, a group of gastropods well supported so far by morphological evidence. The marine basommatophoran pulmonate *Siphonaria* was placed within opisthobranchs and shared with them the insertion of a Glycine in the Cox 1 protein. The marine systellommatophoran pulmonate *Onchidella* was recovered at the base of the opisthobranch + *Siphonaria* clade. Opisthobranchs, *Siphonaria*, and *Onchidella* shared the relative position of the mitochondrial *trnP* gene between the mitochondrial *trnA* and *nad6* genes. The land snails and slugs (stylommatophoran pulmonates) were recovered as an early split in the phylogeny of advanced gastropods. The monophyly of the Euthyneura (Opisthobranchia + Pulmonata) was rejected by the inclusion of the heterostrophan *Pyramidella*.

Introduction

Molecular data have proved to be very helpful in resolving phylogenetic relationships among different taxa at multiple hierarchical levels. Most molecular phylogenetic hypotheses are based on the comparative analysis of the pattern of nucleotide or amino acid substitutions along sequences. However, phylogenetic inferences based on primary sequence data are known to have at least two specific limitations: (1) saturation caused by multiple-hits, which renders homoplasious changes, and (2) uncertainty in positional homology assignment at indel-rich regions, usually with high rates of substitution. The potential negative effect of these two problems becomes more relevant at progressively higher taxonomic levels (Boore and Brown 1998).

In cases where phylogenetic analyses based on sequence substitutions render conflicting results, rare genomic changes (RGCs) may be very helpful in discerning among alternative phylogenetic hypotheses (see Rokas and Holland [2000] for a review). Insertion/deletion (indel) events within well-conserved regions of the genome and gene rearrangements are two examples of RGCs that have been successfully used to resolve deep phylogenetic relationships (Rivera and Lake 1992; Macey et al. 1997; Boore and Brown 1998; Keeling and Palmer 2000; Venkatesh, Erdmann, and Brenner 2001).

The potential of RGCs for phylogenetic reconstruction has been tested in gastropods, a group of mollusks known to have high sequence substitution rates (Thomaz, Guiller, and Clarke 1996; Davison 2002). For instance, the absence or reduction of entire stem/loop structures in several domains of the secondary structure of the mitochondrial large subunit rRNA has been shown to be a molecular synapomorphy of derived gastropods (Lydeard et al. 2000, 2002b). Moreover, mitochondrial DNA gene rearrangements have been useful in identi-

fying phylogenetic affinities among several gastropod groups at different taxonomic levels (Kurabayashi and Ueshima 2000b; Rawlings, Collins, and Bieler 2001; Lydeard et al. 2002a).

Gastropods were traditionally classified into three main subclasses, Prosobranchia, Pulmonata, and Opisthobranchia (Thiele 1931). However, recent morphological studies rejected the monophyly of Prosobranchia (Haszprunar 1988) and failed to recover the monophyly of Opisthobranchia (Salvini-Plawen and Steiner 1996; Ponder and Lindberg 1997; Dayrat and Tillier 2002; fig. 1A). According to new morphological data, the monophyletic Pulmonata (Salvini-Plawen 1970; Tillier 1984; Haszprunar 1985; Haszprunar and Huber 1990; Nordsieck 1992; Dayrat and Tillier 2002) and the paraphyletic Opisthobranchia (Boettger 1955; Haszprunar 1988; Salvini-Plawen and Steiner 1996; Ponder and Lindberg 1997) are clearly distinct from the remaining gastropods and are grouped together in the clade Euthyneura Spengel 1881. The monophyly of Euthyneura is generally accepted and is supported by several morphological synapomorphies (Gosliner 1981; Haszprunar 1988; Salvini-Plawen and Steiner 1996; but see Dayrat and Tillier 2002). Euthyneura together with the paraphyletic group Heterostropha (pyramidelids and other related groups) define the clade Heterobranchia (Haszprunar 1985).

Opisthobranchs are almost exclusively marine organisms, with the only exception being few freshwater acochlidians (Rudman and Willan 1998). The reduction or loss of the shell, an extensive body reorganization, and the acquisition of chemical defenses are evolutionary trends shared to different degrees by most opisthobranch clades. In contrast, pulmonates are mainly land and freshwater gastropods, although there are a few marine groups. All pulmonates share the presence of a lung as the respiratory surface. Most of the species have a shell, although it is modified or absent in some groups.

Most phylogenetic analyses based on nuclear 18S and 28S rRNA gene sequences rejected the monophyly of both Opisthobranchia and Pulmonata (Tillier and Ponder 1992; Rosenberg et al. 1994; Tillier et al. 1994; Tillier, Masselot, and Tillier 1996; Winnepanningckx et al. 1998; Wollscheid and Wägele 1999; Yoon and Kim 2000; Dayrat et al. 2001;

Key words: Opisthobranchia, Pulmonata, indels, gene arrangement, mtDNA.

E-mail: cristina@mncn.csic.es.

Mol. Biol. Evol. 21(2):303–313. 2004

DOI: 10.1093/molbev/msh016

Advance Access publication December 5, 2003

Molecular Biology and Evolution vol. 21 no. 2

© Society for Molecular Biology and Evolution 2004; all rights reserved.

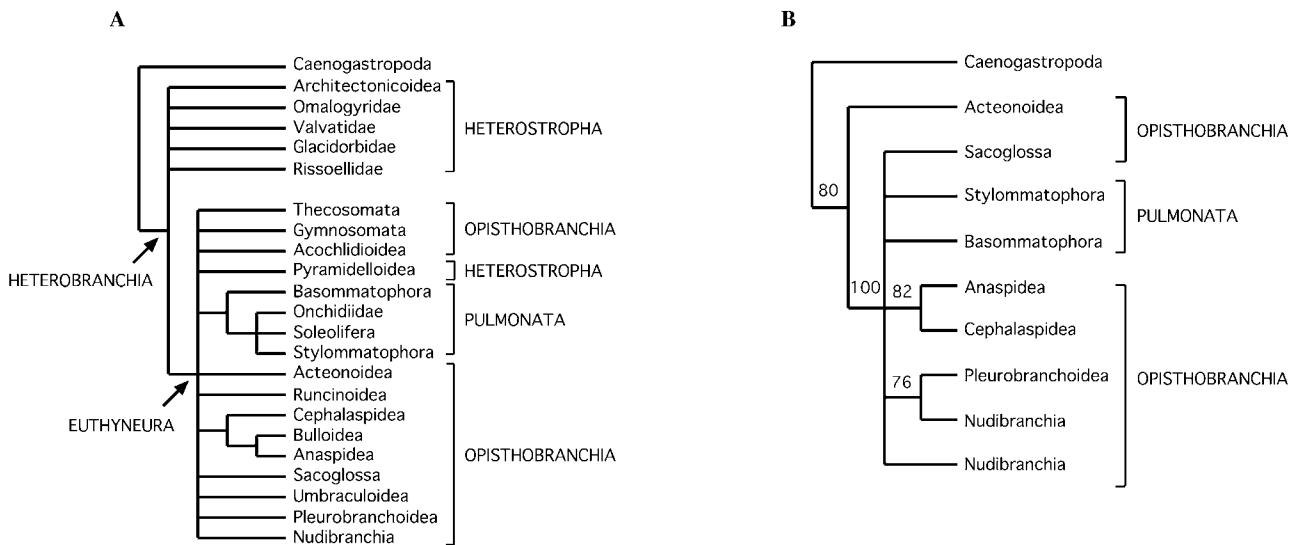


FIG. 1.—Phylogenetic relationships among gastropods based on (A) morphological data (Dayrat et al. 2002) and (B) molecular data (Thollesson 1999). For the molecular phylogeny, nodes with bootstrap values below 50% were forced to collapse.

Wollscheid et al. 2001). However, these analyses rendered conflicting results, and their conclusions lacked sufficient support because of the low resolution of nuclear rRNA genes at this taxonomic level. In contrast, a recent study (Wade and Mordan 2000) based on a nuclear fragment including partial 5.8S rDNA, complete ITS-2, and partial large subunit rDNA sequences supported the monophyly of the above-mentioned gastropod groups. Thollesson (1999) proposed a phylogenetic hypothesis for Euthyneura based on a small fragment (480 bp) of the mitochondrial *rrnL* gene and rejected the monophyly of opisthobranchs (fig. 1B). In contrast, Grande et al. (2002) tentatively concluded that opisthobranchs are monophyletic based on the phylogenetic analyses of the mitochondrial *cox1*, *rrnL*, *nad6*, and *nad5* genes from several species representing five different orders of opisthobranchs. These conflicting results may be clarified and resolved if more representatives of each gastropod group are included in the phylogenetic analyses, if large sequence data sets are compiled, and if the potential phylogenetic utility of RGCs is explored, as suggested by Grande et al. (2002).

To further understand phylogenetic relationships within derived gastropods, we have determined partial sequences of mitochondrial *cox1* and *nad5* genes and the complete sequences of mitochondrial *trnV*, *rrnL*, *trnL(cun)*, *trnA*, *trnP*, and *nad6* genes for representative species of the main orders of Pulmonata and Opisthobranchia, as well as the heterostrophan *Pyramidella dolabrata*. The new sequences were analyzed with current methods of phylogenetic inference and screened for RGCs.

Materials and Methods

Samples and DNA Extraction

A total of 42 species of derived gastropods were sequenced anew in this study (table 1). Sequence data from the complete mitochondrial genomes of the opisthobranchs *Pupa strigosa* (Kurabayashi and Ueshima 2000a), and *Robostra europaea* (Grande et al. 2002); the pulmonates

Cepaea nemoralis (Terrett, Miles, and Thomas 1996), and *Albinaria coerulea* (Hatzoglou, Rodakis, and Lecanidou 1995); the squid *Loligo bleekeri* (Sasuga et al. 1999), and the partial mitochondrial genome of the caenogastropodan *Littorina saxatilis* (Wilding, Mill, and Grahame 1999) were also included in the phylogenetic analyses (table 1). For each specimen, tissue was ground in liquid nitrogen, and resuspended in 500 µl of extraction buffer (Towner 1991). After homogenization, total cellular DNA was purified by a standard phenol/chloroform procedure followed by an ethanol precipitation.

Polymerase Chain Reaction Amplification, Cloning, and Sequencing

Five overlapping DNA fragments (fig. 2) were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the following sets of primers: primers LCO-1490 and HCO-2198 (Folmer et al. 1994); OPISA-F, 5'-GGGGCAATTAAATT-TTATTAC-3' and OPISA-R, 5'-ACCATTATACAA-AAGGT-3'; OPIS COI-F and OPIS1-R (Grande et al. 2002); 16Sar-L and 16Sbr-H (Palumbi et al. 1991); LP-F (Grande et al. 2002) and OPISB-R, 5'-ACTCCTAGCC-CATCTCANCC-3'.

Standard PCR reactions containing 67 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 mM of each dNTP, 2.5 µM of each primer, template DNA (10–100 ng), and Taq DNA polymerase (1 unit, Biotoools) in a final volume of 25 µl were subjected to 40 cycles of denaturing at 94°C for 60 s, annealing at 42°–52°C for 60 s, and extending at 72°C for 90 s. The PCR products were ethanol precipitated and, either directly sequenced using the corresponding PCR primers or cloned into the pGEM-T vector (Promega) and sequenced using the M13 universal (forward and reverse) sequencing primers. DNA sequences of both strands were obtained using the BigDye Terminator cycle-sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Inc.) on an automated DNA sequencer (Applied Biosystems Prism 3700) according to the manufacturer's instructions.

Table 1
List of Samples Analyzed in This Study

Species	Locality	Sequenced PCR Fragment*
Opisthobranchia		
Architectibranchia		
<i>Pupa strigosa</i>	—	AB028237
<i>Micromelo undata</i>	Cape Verde Islands	1–4
Cephalaspidea		
<i>Haminoea callidegenita</i>	Pontevedra, N Spain	1–4
<i>Philine aperta</i>	Murcia, SE Spain	1–4
<i>Chelidonura africana</i>	Porto Santo, Madeira Islands	1, 2, AY098930
<i>Runcina coronata</i>	Sagres, Portugal	1–4
Anaspidea		
<i>Aplysia punctata</i>	Pontevedra, NW Spain	1, 2, AY098931
<i>Petalifera petalifera</i>	Murcia, SE Spain	1–4
<i>Dolabrifera dolabrifera</i>	Cape Verde Islands	1–4
Sacoglossa		
<i>Ascobulla fragilis</i>	Murcia, SE Spain	1, 2, AY098929
Tylocinoidea		
<i>Umbraculum mediterraneum</i>	Gerona, NE Spain	1, 2, AY098928
<i>Tylocina perversa</i>	Porto Santo, Madeira Islands	1–4
Pleurobranchoidea		
<i>Berthella plumula</i>	Pontevedra, NW Spain	1–5
<i>Pleurobranchaea meckeli</i>	Gerona, NE Spain	1–4
<i>Bathyberthella antarctica</i>	Antarctica	1–4
Nudibranchia		
<i>Aeolidia papillosa</i>	Pontevedra, NW Spain	1, 2, AY098927
<i>Roboastra europaea</i>	—	AY083457
<i>Ancula gibbosa</i>	Kingsbarns, Scotland	1–4
<i>Doris pseudoargus</i>	Kingsbarns, Scotland	1–4
<i>Facelina bostoniensis</i>	Clachan Seil, Scotland	1–4
<i>Tergipes tergipes</i>	Clachan Seil, Scotland	1–4
<i>Onchidoris muricata</i>	Clachan Seil, Scotland	1–4
<i>Cadlina laevis</i>	Kinkell Braes, Scotland	1–4
<i>Tethys fimbria</i>	Tarragona, NE Spain	1–4
<i>Chromodoris krohni</i>	Murcia, SE Spain	1–4
<i>Flabellina affinis</i>	Murcia, SE Spain	1–4
<i>Platydoris argo</i>	Ceuta, S Spain	1–4
<i>Tambja ceutae</i>	Porto Santo, Madeira Islands	1–4
<i>Aldisa banyulensis</i>	Porto Santo, Madeira Islands	1–4
<i>Discodoris confusa</i>	Porto Santo, Madeira Islands	1–4
<i>Dendronotus frondosus</i>	Oban, Scotland	1–4
<i>Favorinus branchialis</i>	Oban, Scotland	1–4
<i>Cuthona ocellata</i>	Sagres, Portugal	1–4
<i>Rostanga pulchra</i>	California, USA	1–4
<i>Triopha maculata</i>	California, USA	1–4
<i>Eubranchus sp.</i>	Sagres, Portugal	1–4
<i>Hancockia uncinata</i>	Sines, Portugal	1–4
Pulmonata		
Systelomatophora		
<i>Onchidella celtica</i>	Ceuta, S Spain	1–5
Basommatophora		
<i>Siphonaria pectinata</i>	Ceuta, S Spain	1–5
Eupulmonata		
<i>Rumina decollata</i>	Assumar, Portugal	1–4
<i>Elona quimperiana</i>	Asturias, N Spain	1–4
<i>Helix aspersa</i>	Pontevedra, NW Spain	1–5
<i>Myosotella myosotis</i>	Pontevedra, NW Spain	1–4
<i>Cepaea nemoralis</i>	—	NC_001816
<i>Albinaria coerulea</i>	—	NC_001761
Other Gastropoda		
Heterostropha		
<i>Pyramidella dolabrata</i>	Annobon Island, Gulf of Equatorial Guinea	1–5
Caenogastropoda		
<i>Littorina saxatilis</i>	—	AJ132137
Other Mollusca		
<i>Loligo bleekeri</i>	—	NC_002507

* Numbers correspond to fragments in figure 2 or to accession entries from GenBank.

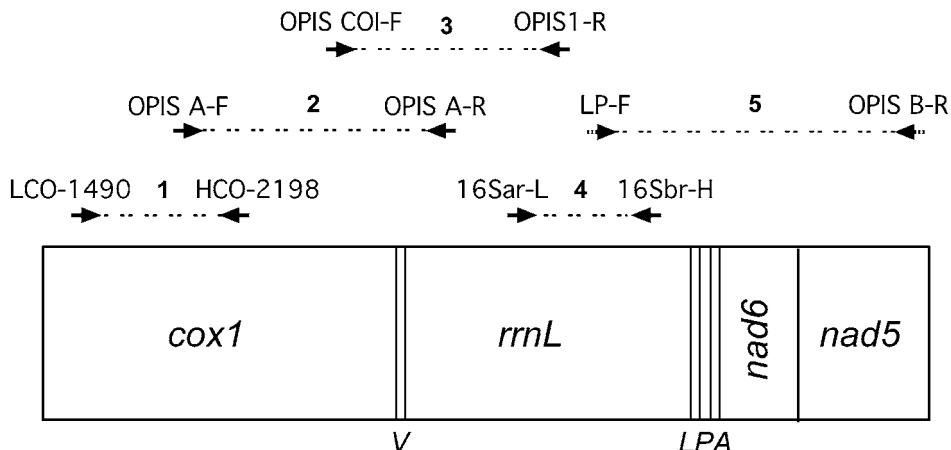


FIG. 2.—Mitochondrial DNA fragment amplified in this work and sequencing strategy. Arrows denote the localization and direction of the primers used in the PCR amplification. See text for the primer sources.

Molecular and Phylogenetic Analyses

Gene boundaries were determined by comparison with other gastropod mitochondrial genomes. Protein-coding genes were delimited by their start and stop codons. Deduced tRNAs were folded into their corresponding cloverleaf secondary structure.

Nucleotide (for the mitochondrial *rrnL* gene) and deduced amino-acid sequences (for the mitochondrial *cox1*, *nad6*, and *nad5* genes) were aligned using ClustalX version 1.62b (Thompson et al. 1997) followed by refinement by eye. Ambiguous alignments and gaps were excluded from the analysis using Gblocks 0.73b (Castresana 2000). Modeltest version 3.06 (Posada and Crandall 1998) was used to estimate the evolutionary model that best fit the nucleotide (mitochondrial *rrnL* gene) data set. The Akaike information criteria (AIC) implemented in Modeltest selected the GTR + I + Γ (Rodriguez et al. 1990) evolutionary model.

Bayesian inferences (BI) of gastropod phylogeny were performed with MrBayes 3.0b3 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) by Metropolis coupled Markov chain Monte Carlo (MCMCMC) sampling for 1 million generations (four simultaneous MC chains; sample frequency 100; burn-in 1,000 generations). Bayesian analyses were run independently at least twice, beginning with different starting trees (Huelsenbeck and Bollback 2001). We used GTR + I + Γ (for the *rrnL* nucleotide sequence data) and mtREV (Adachi and Hasegawa 1996) (for the *cox1*, *nad6*, and *nad5* amino-acid sequence data) as evolutionary models. Support for tree nodes was determined based on the values of Bayesian posterior probability (BPP) obtained from a majority-rule consensus tree with MrBayes 3.0b3.

To further confirm the gastropod trees reconstructed by the Bayesian method of inference, the deduced amino-acid sequences of mitochondrial protein-coding genes (*cox1*, *nad6*, and *nad5*) were combined into a single data set that was subjected to maximum-parsimony (MP) and minimum evolution (ME) methods of phylogenetic inference. The MP analyses were performed with PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002) using heuristic searches (TBR

branch swapping; MulTrees option in effect) with 10 random additions of taxa. The ME analyses (Rzhetsky and Nei 1992) were carried out with PAUP* 4.0b10 using mean character distances. Robustness of MP and ME analyses was tested by bootstrapping with 1,000 pseudo-replicates each (Felsenstein 1985).

The sequences reported in this article have been deposited in the GenBank database (accession nos. AY345014–AY345055).

Results

A Molecular Phylogeny of Euthyneura

Phylogenetic hypotheses of gastropod relationships were based on two different sequence data sets. The first data set included the deduced amino acid sequences of mitochondrial *cox1* (partial), *nad6* (complete), and *nad5* (partial) genes combined with the nucleotide sequence of the complete mitochondrial *rrnL* gene for 14 gastropod taxa (fig. 3). The squid *Loligo bleekeri* (Sasuga et al. 1999) was used as outgroup because most authors currently consider cephalopods to be the sister group of gastropods (Haszprunar 1988; Bieler 1992). This data set comprised 2,301 positions, of which 1,179 (mostly in the *rrnL* gene) were excluded because of ambiguity in positional homology assignment at gap-rich regions. The second data set included the deduced amino acid sequence of the mitochondrial *cox1* gene (partial), combined with the nucleotide sequence of the *rrnL* gene (complete) for 47 gastropod taxa. This data set comprised 1,986 positions and was reduced to 857 homologous positions after the exclusion of gap-rich regions (mostly in the *rrnL* gene).

The majority-rule consensus tree resulting from the Bayesian inference based on the 15-taxon sequence data set under the GTR + I + Γ (*rrnL* gene) and mtREV (*cox1*, *nad6*, and *nad5* genes) substitution models is presented in figure 3. The recovered topology rejected the monophly of Euthyneura, Pulmonata, and Opisthobranchia (fig. 3). The relative position of the heterostrophan *Pyramidella dolabrata* deep within Euthyneura (supported by a 100% BPP) made this group paraphyletic (fig. 3). Pulmonates

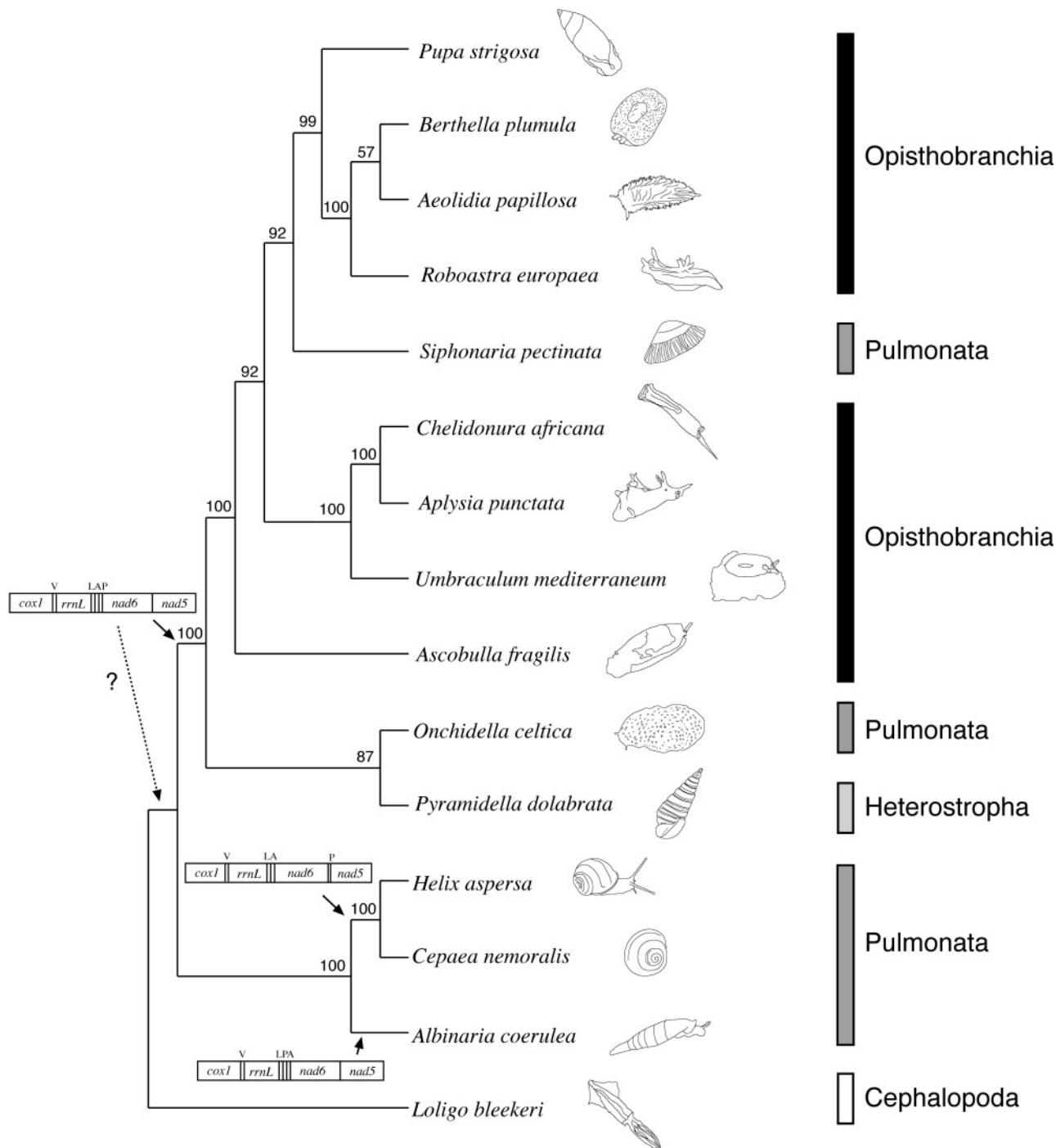


FIG. 3.—50% majority rule Bayesian tree for 14 species of gastropods inferred from a combined data set including sequences of the mitochondrial *rrnL* gene (GTR + I + Γ) and the deduced amino-acid sequences of mitochondrial *cox1*, *nad6*, and *nad5* genes (mt-REV). The numbers above branches represent Bayesian posterior probabilities (only values above 95% are statistically significant). The squid, *Loligo bleekeri* was used as outgroup. Mitochondrial tRNA gene rearrangements were mapped onto the inferred phylogeny. A question mark indicates the possibility that the *rrnL*, *trnL*, *trnA*, *trnP*, *nad6*, *nad5* gene order may be the ancestral state for Heterostropha.

were recovered as a polyphyletic group. The inclusion of the marine basommatophoran pulmonate *Siphonaria pectinata* within the Opisthobranchia (100% BPP) made this group paraphyletic (fig. 3). The marine systelommatophoran pulmonate *Onchidella celtica* was placed with *P. dolabrata* as sister group of Opisthobranchia + *S. pectinata* (100% BPP) (fig. 3). Land stylommatophoran

pulmonates (*Helix* + *Cepaea* + *Albinaria*) were monophyletic (100% BPP) and resolved as the sister group of all other gastropod taxa included in the analysis (fig. 3). A Bayesian analysis under the GTR + I + Γ (*rrnL* gene) and mtREV (*cox1* and *nad6* genes) substitution models, using the same ingroup taxa but with *Littorina* as outgroup, also recovered the Opisthobranchia + *S. pectinata* clade (99%

BPP) as well as the basal position of *O. celtica* and *P. dolabrata* (99% BPP) with respect to Opisthobranchia + *S. pectinata* (not shown).

Both the MP and the ME phylogenetic inferences based on a 15-taxon data set that combined the deduced amino acid sequences of mitochondrial *cox1*, *nad6*, and *nad5* genes and with *Loligo* as outgroup recovered congruent trees that also supported the Opisthobranchia + *S. pectinata* clade (97% and 100% bootstrap values, respectively) as well as the basal position of *O. celtica* and *P. dolabrata* (83% and 98% bootstrap values, respectively) with respect to Opisthobranchia + *S. pectinata*. The same two nodes were also supported with high bootstrap values when the deduced amino acid sequences of mitochondrial *cox1* and *nad6* genes and the same ingroup taxa were analyzed, with *Littorina* as outgroup (not shown).

The new gastropod phylogeny was further confirmed by a Bayesian inference based on an extended 47-taxon sequence data set. The majority-rule consensus tree resulting from the Bayesian inference under the GTR + I + Γ (*rrnL* gene) and mtREV (*cox1* gene) substitution models is presented in figure 4. The recovered phylogeny was in agreement with that based on the 15-taxon data set. Euthyneura are not monophyletic because of the relative position of the heterostrophan *P. dolabrata*. Pulmonata is polyphyletic with basommatophoran, systelommatophoran, and stylommatophoran lineages recovered in different positions of the tree. The basommatophoran *S. pectinata* was included within the Opisthobranchia with high statistical support (100% BPP). The systelommatophoran pulmonate *O. celtica* together with *P. dolabrata* were placed as the sister group of the Opisthobranchia + *S. pectinata* clade (90% BPP). Stylommatophoran pulmonates are monophyletic (100% BPP), and together with the marine ellobioideid pulmonate *Myosotella myosotis*, were placed as the most basal of the analyzed gastropod lineages. Within Opisthobranchia, the order Sacoglossa was recovered as the most basal group (fig. 4). The orders Anaspidea, Tylodinoidea, and Cephalaspidea formed a well-supported clade (100% BPP). The validity of the order Architectibranchia as an independent opisthobranch lineage was confirmed by our analysis. The order Pleurobranchoidea was located within Nudibranchia, rendering the latter paraphyletic (opisthobranch intrarelationships will be further analyzed elsewhere).

trnP Gene Rearrangements

A fragment of 3,600 bp including partial sequences of the mitochondrial *cox1* and *nad5* genes and the complete sequences of the mitochondrial *trnV*, *rrnL*, *trnL(cun)*, *trnA*,

trnP, and *nad6* genes was analyzed for 14 species of derived gastropods. The most striking result from the comparative analysis of these sequences was the variable position of the mitochondrial *trnP* gene in the different gastropod lineages that defined three distinct groups (fig. 3). All analyzed opisthobranchs, the pulmonates *Siphonaria pectinata* (order Basommatophora) and *Onchidella celtica* (order Systelommatophora), as well as the heterostrophan *Pyramidella dolabrata* shared the same gene order with the *trnP* gene between the *trnA* and *nad6* genes (fig. 3). The stylommatophoran pulmonates *Cepaea nemoralis* and *Helix aspersa* shared the same gene order with the *trnP* gene located between the *nad6* and *nad5* genes (fig. 3). Finally, the stylommatophoran pulmonate *Albinaria coerulea* presented a unique gene order with the *trnP* gene between *trnL(cun)* and *trnA* genes (fig. 3).

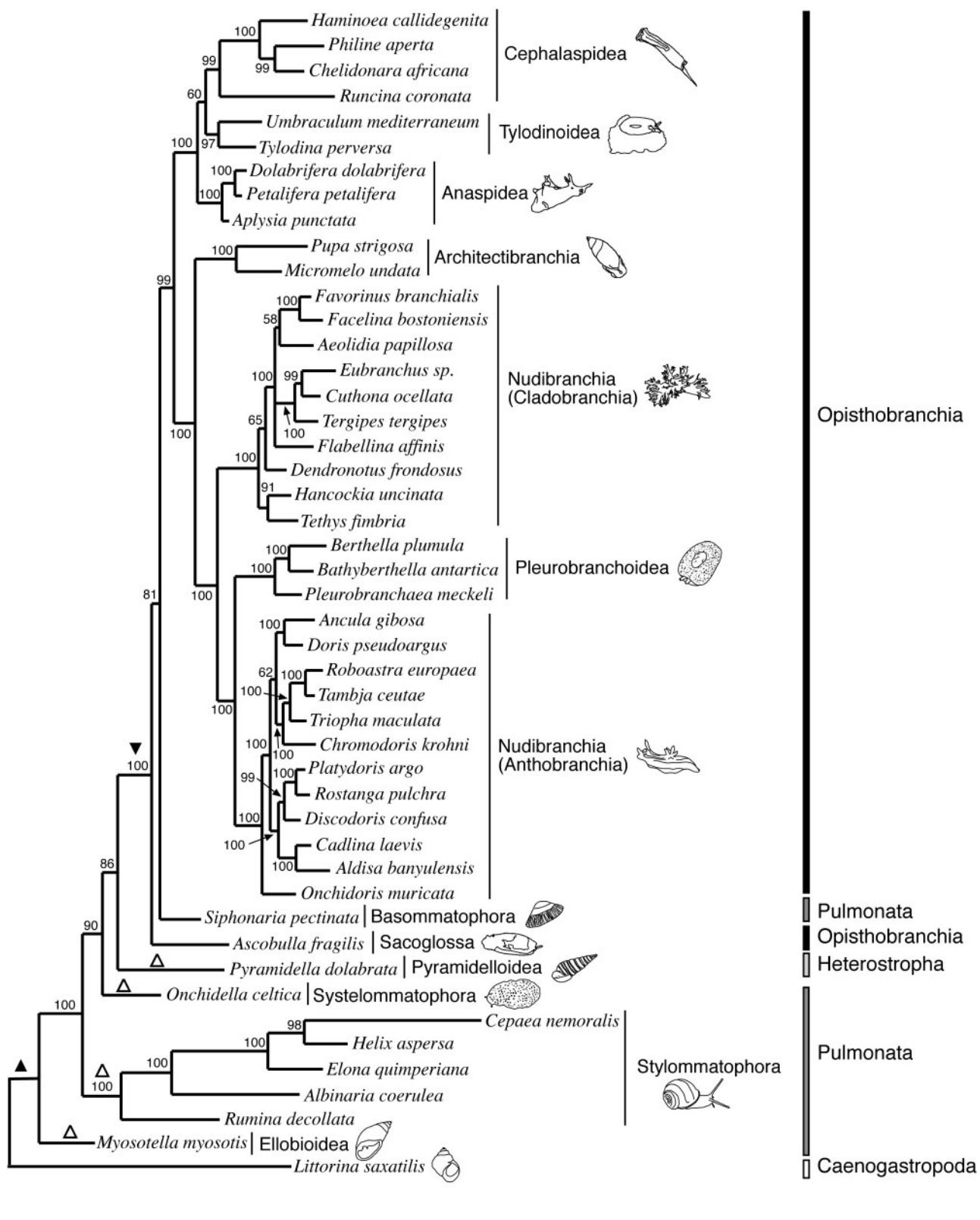
An Indel in the Deded Amino Acid Sequence of the *cox1* Gene

The deduced amino acid sequences of the *cox1*, *nad6*, and *nad5* genes of the same 14 species of derived gastropods were screened for indels. A single informative amino-acid indel was found at position 46 of the mitochondrial Cox1 protein (numbered according to the *Roboastra europaea* Cox1 amino acid sequence). The indel in the Cox1 protein was further analyzed in a larger data set that included 47 gastropod species. All analyzed opisthobranchs, as well as the pulmonate *Siphonaria pectinata*, had a Glycine at that position (fig. 5). The remaining pulmonates and the heterostrophan *Pyramidella dolabrata* had a deletion (fig. 5). The caenogastropod *Littorina saxatilis* had a Glycine at that position, and the squid *Loligo bleekeri* had an Asparagine at that position. We searched GenBank for additional gastropod *cox1* gene sequences and found that Caenogastropoda and related groups (formerly included in Prosobranchia), as well as the heterostrophan *Cornirostra pellucida*, shared a Glycine at position 46 of the mitochondrial Cox1 protein. In contrast, all mitochondrial Cox1 amino acid sequences of Pulmonata found in GenBank (except *Siphonaria zelandica*) had a deletion at the above-mentioned position (fig. 5).

Discussion

Here we present a molecular phylogeny of Euthyneura based on mitochondrial sequence data that resolves several controversies regarding phylogenetic relationships of the major lineages of gastropods and supports a revision of

FIG. 4.—Bayesian tree for 47 species of gastropods inferred from the nucleotide sequences of the mitochondrial *rrnL* gene (GTR + I + Γ) and the deduced amino-acid sequences of the mitochondrial *cox1* gene (mt-Rev). The numbers above branches represent Bayesian posterior probabilities (only values above 95% are statistically significant). The Caenogastropod *Littorina saxatilis* was used as outgroup. Filled and open triangles indicate alternative hypotheses for the evolution of the indel at position 46 of the mitochondrial Cox1 protein (numbering corresponds to the amino acid Cox1 sequence of *R. europaea*) (see text). ▲, △ indicate a proposal amino acid deletion. ▼ indicates a proposal insertion.



0.1

<i>Robostra europaea*</i>	SLLIRFELGTAGAFL G DDHFYNVIVTAHAFVMIFFMVMPLMI	Opisthobranchia
<i>Pupa strigosa*</i>	SLLIRFELGTAGALL G DDHFYNVIVTAHAFVMIFFMVMPLMI	
<i>Chelidonura africana</i>	SLLIRFELGTASAFL G DDHFYNVIVTAHAFVMIFFMVMPLMI	
<i>Aplysia punctata</i>	SLLIRFELGTAGAFL G DDHFYNVIVTAHAFVMIFFMVMPLMI	
<i>Umbraculum mediterraneum</i>	SLLIRFELGTAGAFL G DDHFYNVIVTAHAFVMIFFMVMPLMI	
<i>Berthella plumula</i>	SLLIRFELGTSGALL G DDHFYNVIVTAHAFVMIFFMVMPLMI	
<i>Aeolidia papillosa</i>	SLLIRFELGTAGALL G DDHLYNVIVTAHAFVMIFFMVMPLMI	
<i>Ascobulla fragilis</i>	SLLIRFELGTSGAFL G DDHFYNVIVTAHAFVMIFFMVMPLMI	
<i>Siphonaria pectinata</i>	SLLIRFELGTAGAFL G DDHFYNVIVTAHAFVMIFFMVMPLMI	Basommatophora (Pulmonata)
<i>Siphonaria zelandica*</i>	SMLIRLELGTAGVML G DPHLYNVIVTSHAFVMIFFLVMPAMI	
<i>Salinator solida*</i>	SLLIRFELGTAGVLM-DEHFYNVIVTAHAFVMIFFMVMPLMI	Basommatophora (Pulmonata)
<i>Onchidium sp.*</i>	SLLIRFELGTAGVLL-DDHFYNVIVTAHAFVMIFFMVMPLMI	Systelommatophora (Pulmonata)
<i>Onchidella celtica</i>	SLLIRFELGTGVLL-DNHFYNVIVTAHAFVMIFFMVMPLMI	
<i>Helix aspersa</i>	SWLIRFELGTSGVLT-DDHFYNVIVTAHAFVMIFFMVMPLMI	Stylommatophora (Pulmonata)
<i>Cepaea nemoralis*</i>	SLLIRLELGTAGVLT-DDHFYNVIVMYAHALYDLFMVMPIMI	
<i>Elona quimperiana</i>	SLLIRLELGTSGVLS-DDHFFNVIVTAHAFVMIFFMVMPLMI	
<i>Rumina decollata</i>	SLLIRLELGTAGVLT-DDHFFNVVVTAHAFVMIFFMVMPLMI	
<i>Albinaria coerulea*</i>	SLLIRLELGTSGTLT-DDHFYNVIVTAHAFVMIFFMVMPLMI	
<i>Hedleyoconcha delta*</i>	SLLVRLELGTAGVLL-DDHFFNVIVTAHAFVMIFFMVMPLMI	
<i>Myosotella myosotis</i>	SLLIRLELGTAGMLL-DDHLFNVIVTAHAFVMIFFMVMPLMI	
<i>Ophicardelus ornatus*</i>	SLLIRFELGTAGNLL-DDHFYNVIVTAHAFVMIFFMVMPLMI	
<i>Pyramidella dolabrata</i>	SLLIRYELGTAGVLT-DEHFYNVVVTAHAFVMIFFMVMPLMI	Pyramidelloidea (Heterostropha)
<i>Cornirostra pellucida*</i>	SLLIRIELGTPGTFL G DDQLYNVIVTAHAFLMIFFFVMPMMI	Valvatoidea (Heterostropha)
<i>Cancellaria undulata*</i>	SLLIRAEQPGALL G DDQLYNVIVTAHAFVMIFFFLVMPMMI	Caenogastropoda
<i>Conus miles*</i>	SLLIRAEQPGALL G DDQLYNVIVTAHAFVMIFFFLVMPMMI	
<i>Mitra cucumerina*</i>	SLLIRAEQPGALL G DDQLYNVIVTAHAFVMIFFFLVMPMMI	
<i>Dicathais orbita*</i>	SLLIRAEQPGALL G DDQLYNVIVTAHAFVMIFFFLVMPMMI	
<i>Littorina saxatilis*</i>	SLLIRAEQPGALL G DDQLYNVIVTAHAFVMIFFFLVMPMMI	
<i>Nassarius burchardi*</i>	SLLIRAEQPGALL G DDQLYNVIVTAHAFVMIFFFLVMPMMI	
<i>Nerita atramentosa*</i>	SLLIRAEQPGALL G DDQLYNVIVTAHAFVMIFFFLVMPMMI	
<i>Montfortula rugosa*</i>	SMLIRAEQPGALL G DDQLYNVIVTAHAFVMIFFFLVMPMMI	
<i>Loligo bleekeri*</i>	SLMIRTELGKPGTLL N DDQLYNVVVTAHGFIMIFFMVMPLMI	Cephalopoda

FIG. 5.—Indel event in the deduced amino acid sequence of the mitochondrial *cox1* gene of several gastropods. The indel is shown in bold and corresponds to position 46 in the Cox1 amino acid sequence of *R. europaea*. For opisthobranchs only representatives of the main lineages are shown. The following Cox1 amino acid sequences (denoted by an asterisk) were retrieved from GenBank: AY083457, NC_002179, AY296849, AY296845, AY296844, NC_001816, NC_001761, AY296871, AY296850, AY296842, AY296841, AY296840, AY296839, AY296838, AJ132137, AY296837, AY296824, AY296819, NC_002507.

gastropod systematics. The monophyly of both Opisthobranchia and Pulmonata, as well as that of Euthyneura, is clearly rejected (figs. 3 and 4). Opisthobranchia was recovered as a paraphyletic group because of the inclusion of the basommatophoran *S. pectinata*. The taxonomic position of the marine Siphonarioidea within the basommatophoran pulmonates has been discussed extensively (Köhler 1893; Haszprunar and Huber 1990; Nordsieck 1992). Haszprunar and Huber (1990) suggested the inclusion of Siphonarioidea in the basommatophoran, based on the symplesiomorphic presence of osphradium, pallial ciliary tracts, and several features of the nervous system (Tillier, Masselot, and Tillier 1996). Recent molecular studies based on 18S and 28S rRNA nuclear genes failed to recover Basommatophora as a monophyletic

group (Tillier, Masselot, and Tillier 1996; Yoon and Kim 2000; Dutra-Clarke et al. 2001). In these studies, marine and freshwater basommatophorans are separated into clearly distinct groups that may be related to Opisthobranchia + Systelommatophora (in agreement with our results), and land Stylommatophora, respectively (Dutra-Clarke et al. 2001). In contrast, a recent study (Wade and Mordan 2000) based on a nuclear fragment including partial 5.8S rDNA, complete ITS-2, and partial large subunit rDNA sequences recovered *Siphonaria* as the sister group of other pulmonates. Hence, the phylogenetic status of *Siphonaria* (and Basommatophora in general) remains controversial.

The placement of the systelommatophoran *Onchidella* in a basal position relative to opisthobranchs independently rejected the monophyly of pulmonates

(figs. 3 and 4). Different morphologists have considered systelommatophorans as either opisthobranchs (Boettger 1955), pulmonates (Haszprunar 1988; Haszprunar and Huber 1990; Tillier and Ponder 1992) or even as an independent group closely related to opisthobranchs (Salvini-Plawen 1970).

The heterostrophan *Pyramidella* was recovered within the Euthyneura rendering this clade paraphyletic (figs. 3 and 4). In fact, pyramidellids have been considered by many authors to be opisthobranchs (Thorson 1946; Fretter and Graham 1949; Thompson 1973) because both groups share a rhinophoral nerve, a sinistral larval shell produced by the planktotrophic veliger (heterostrophy), simultaneous hermaphroditism, and the absence of a pectinibranch gill (ctenidium), among other characters. However, some authors criticized the validity of these characters as true synapomorphies (Gosliner 1981; Robertson 1985; Haszprunar 1988).

Interestingly, we found two mitochondrial RGCs, the relative position of the *trnP* gene and an indel in the *Cox1* protein, that can be used as a valuable independent source to confirm and strengthen phylogenetic relationships within Heterobranchia (Euthyneura and heterostrophans) recovered from primary sequence data. The mitochondrial gene order is highly conserved in Heterobranchia with few tRNA gene translocations (Kurabayashi and Ueshima 2000b; Grande et al. 2002). Hence, the distinct relative position of the *trnP* gene in different taxa (fig. 3) seems a very promising phylogenetic marker. According to our results, the mitochondrial gene order *rnlL*, *trnL(cun)*, *trnA*, *trnP*, *nad6*, and *nad5* is associated with the Opisthobranchia + *Onchidella* + *Pyramidella* clade, and it might represent a molecular synapomorphy of these taxa. However, it is also likely that this gene order may be the ancestral state of Heterobranchia. The relative position of the mitochondrial *trnP* gene would need to be determined in more heterostrophans and pulmonates to discern between these two competing hypotheses. According to our results, a Glycine in position 46 of the *Cox1* protein was present in Caenogastropoda and related basal gastropods (formerly included in Prosobranchia) and was further deleted in the ancestor of Euthyneura + *Pyramidella*. A reversal (or a convergence) due to structural constraints to the ancestral condition in gastropods (i.e., presence of Glycine) may have occurred in the ancestor of Opisthobranchia + *Siphonaria*. Alternatively, although less parsimonious, several independent deletions of the Glycine in different lineages of pulmonates (except *Siphonaria*) and the heterostrophan *Pyramidella* may also explain the pattern found with equal likelihood.

The phylogenetic hypothesis presented here corroborates the close relationships among all lineages of opisthobranchs (their monophyly is only rejected because of the relative position of *Siphonaria*), as previously suggested (Thiele 1931; Grande et al. 2002); yet it strongly rejects the validity of pulmonates as a natural group (against most morphological studies; e.g., Haszprunar and Huber [1990]; Dayrat and Tillier [2002]). These results stress the need of a thorough re-evaluation of the morphological characters that were used to define the monophyly of pulmonates, and they support the in-

dependent and recurrent evolution of the lung as the respiratory surface in gastropods. The recovered phylogeny provides a robust phylogenetic framework for many comparative studies involving this group and may allow a better understanding of evolutionary trends within gastropods.

Acknowledgments

G. San Martín, X. Turón, E. Rolán, G. Calado, I. Martínez-Solano, and M. Schrödl collaborated in the species sampling. Lukas Rüber and two anonymous reviewers provided helpful comments on an earlier version of the manuscript. C.G. was sponsored by a predoctoral fellowship of the Ministerio de Ciencia y Tecnología. This work received financial support from projects of the Ministerio de Ciencia y Tecnología to J.T. (REN2000-0890/GLO), to J.L.C. (REN2001-1956-C17-02/GLO), and to R.Z. (REN2001-1514/GLO).

Literature Cited

- Adachi, J., and M. Hasegawa. 1996. Model of amino acid substitution in proteins encoded by mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **42**:459–468.
- Bieler, R. 1992. Gastropod phylogeny and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **23**:311–338.
- Boettger, C. R. 1955. Die Systematik der euthyneuren Schnecken. *Verh. dt. Zool. Ges.* **18**:253–280.
- Boore, J. L., and W. M. Brown. 1998. Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**:668–674.
- Castresana, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **17**:540–552.
- Davison, A. 2002. Land snails as a model to understand the role of history and selection in the origins of biodiversity. *Popul. Ecol.* **44**:129–136.
- Dayrat, B., and S. Tillier. 2002. Evolutionary relationships of euthyneuran gastropods (Mollusca): a cladistic re-evaluation of morphological characters. *Zool. J. Linn. Soc.* **135**:403–470.
- Dayrat, B., A. Tillier, G. Lecointre, and S. Tillier. 2001. New clades of euthyneuran gastropods (Mollusca) from 28S rRNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **19**:225–235.
- Dutra-Clarke, A. V. C., C. Williams, R. Dickstein, N. Kaufer, and J. R. Spotila. 2001. Inferences on the phylogenetic relationships of Succineidae (Mollusca, Pulmonata) based on 18S rRNA gene. *Malacologia* **43**:223–236.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783–791.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* **3**:294–299.
- Fretter, V., and A. Graham. 1949. The structure and mode of life of the Pyramidellidae, parasitic opisthobranchs. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* **28**:493–532.
- Gosliner, T. M. 1981. Origins and relationships of primitive members of the Opisthobranchia (Mollusca: Gastropoda). *Biol. J. Linn. Soc.* **16**:197–225.
- Grande, C., J. Templado, J. L. Cervera, and R. Zardoya. 2002. The complete mitochondrial genome of the nudibranch *Roboastra europaea* (Mollusca: Gastropoda) supports the monophyly of opisthobranchs. *Mol. Biol. Evol.* **19**:1672–1685.

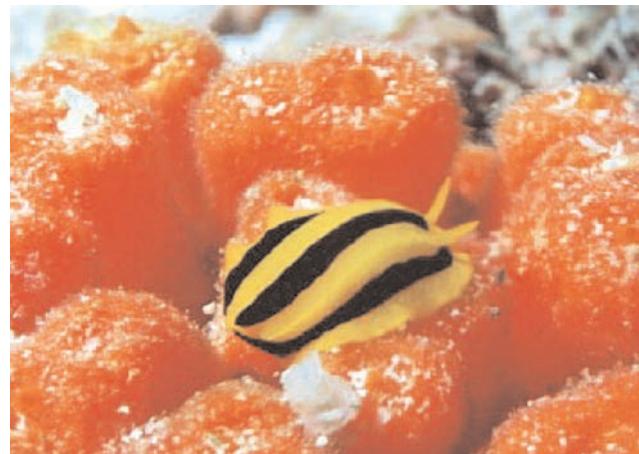
- Haszprunar, G. 1985. The Heterobranchia—a new concept of the phylogeny and evolution of the higher Gastropoda. *Z. Zool. Syst. Evolut.-forsch.* **23**:15–37.
- . 1988. On the origin and evolution of major gastropods group, with special reference to the streptoneura. *J. Moll. Stud.* **54**:367–441.
- Haszprunar, G., and G. Huber. 1990. On the central nervous system of Smeagolidae and Rhodopidae, two families questionably allied with the Gymnomorpha (Gastropoda: Euthyneura). *J. Zool.* **220**:185–199.
- Hatzoglou, E., G. C. Rodakis, and R. Lecanidou. 1995. Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the land snail *Albinaria coerulea*. *Genetics* **140**:1353–1366.
- Huelsenbeck, J. P., and J. P. Bollback. 2001. Empirical and hierarchical Bayesian estimation of ancestral states. *Syst. Biol.* **50**:351–366.
- Huelsenbeck, J. P., and F. R. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17**:754–755.
- Keeling, P. J., and J. D. Palmer. 2000. Parabasalian flagellates are ancient eukaryotes. *Nature* **405**:635–637.
- Köhler, A. 1893. Beiträge zur Anatomie der Gattung *Siphonaria*. *Zoologische Jahrbücher, Abteilung Anatomie* **7**:1–92.
- Kurabayashi, A., and R. Ueshima. 2000a. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the primitive opisthobranch gastropod *Pupa strigosa*: systematics implication of the genome organization. *Mol. Biol. Evol.* **17**:266–277.
- . 2000b. Partial mitochondrial genome organization of the heterostrophon gastropod *Omalogyra atomus* and its systematic significance. *Venus* **59**:7–18.
- Lydeard, C., W. E. Holznagel, M. Glaubrecht, and W. F. Ponder. 2002a. Molecular phylogeny of a circum-global, diverse gastropod superfamily (Cerithioidea: Mollusca: Caenogastropoda): pushing the deepest phylogenetic limits of mitochondrial LSU rDNA sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* **22**:399–406.
- Lydeard, C., W. E. Holznagel, M. N. Schnare, and R. R. Gutell. 2000. Phylogenetic analysis of molluscan mitochondrial LSU rDNA sequences and secondary structures. *Mol. Phylogen. Evol.* **15**:83–102.
- Lydeard, C., W. E. Holznagel, R. Ueshima, and A. Kurabayashi. 2002b. Systematic implications of extreme loss or reduction of mitochondrial LSU rRNA helical-loop structures in gastropods. *Malacologia* **44**:349–352.
- Macey, J. R., A. Larson, N. B. Anajeva, Z. Fang, and T. J. Papenfuss. 1997. Two novel gene orders and the role of light-strand replication in rearrangement of the vertebrate mitochondrial genome. *Mol. Biol. Evol.* **14**:91–104.
- Nordsieck, H. 1992. Phylogeny and system of the Pulmonata (Gastropoda). *Arch. Moll.* **121**:31–52.
- Palumbi, S., A. Martin, S. Romano, W. O. McMillan, L. Stice, and G. Grabowski. 1991. The simple fool's guide to PCR. Version 2.0. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii, Honolulu, Hi. 96822.
- Ponder, W. F., and D. R. Lindberg. 1997. Towards a phylogeny of gastropod molluscs: an analysis using morphological characters. *Zool. J. Linn. Soc.* **119**:83–265.
- Posada, D., and K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**:817–818.
- Rawlings, T. A., T. M. Collins, and R. Bieler. 2001. A major mitochondrial gene rearrangement among closely related species. *Mol. Biol. Evol.* **18**:1604–1609.
- Rivera, M. C., and J. A. Lake. 1992. Evidence that Eukaryotes and Eocyte Prokaryotes are immediate relatives. *Science* **257**:74–76.
- Robertson, R. 1985. Four characters and the higher systematics of gastropods. *Am. Malac. Bull. Special Iss.* **1**:1–22.
- Rodriguez, F., J. F. Oliver, A. Marín, and J. R. Medina. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* **142**:485–501.
- Rokas, A., and P. W. H. Holland. 2000. Rare genomic changes as a tool for phylogenetics. *Trends Ecol. Evol.* **15**:454–459.
- Rosenberg, G., G. S. Kuncio, G. M. Davis, and M. G. Harasewych. 1994. Preliminary ribosomal RNA phylogeny of Gastropod and Unionoidean bivalve mollusks. *The Nautilus Suppl* **2**:111–121.
- Rudman, W. B., and R. C. Willan. 1998. Opisthobranchia. Pp. 915–1035 in P. L. Beesley, G. J. B. Ross, and A. Wells, eds. *Mollusca: the southern synthesis. Fauna of Australia*. CSIRO, Melbourne.
- Rzhetsky, A., and M. Nei. 1992. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Mol. Biol. Evol.* **9**:945–967.
- Salvini-Plawen, L. 1970. Zur systematischen Stellung von Soleolifera und Rhodope (Gastropoda, Euthyneura). *Zool. Jahrb. Syst.* **97**:285–299.
- Salvini-Plawen, L., and G. Steiner. 1996. Synapomorphies and plesiomorphies in higher classification of Mollusca. Pp. 29–51 in J. Taylor, ed. *Origin and evolutionary radiation of the Mollusca*. The Malacological Society of London, London.
- Sasuga, J., S. Yokobori, M. Kaifu, T. Ueda, K. Nishikawa, and K. Watanave. 1999. Gene content and organization of a mitochondrial DNA segment of the squid *Loligo bleekeri*. *J. Mol. Evol.* **48**:692–702.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Terrett, J. A., S. Miles, and R. H. Thomas. 1996. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Cepaea nemoralis* (Gastropoda: Pulmonata). *J. Mol. Evol.* **42**:160–168.
- Thiele, J. 1931. *Handbuch der systematischen Weichterkunde*, II. Verlag von Gustav Fischer, Jena, Germany.
- Thollesson, M. 1999. Phylogenetic analysis of Euthyneura (Gastropoda) by means of the 16S rRNA gene: use of a fast gene for higher-level phylogenies. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* **266**:75–83.
- Thomaz, D., A. Guiller, and B. Clarke. 1996. Extreme divergence of mitochondrial DNA within species of pulmonate land snails. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* **263**:363–368.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The ClustalX- Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**:4876–4882.
- Thompson, T. E. 1973. Euthyneuran and other molluscan spermatozoa. *Malacologia* **14**:167–206.
- Thorson, G. 1946. Reproduction and larval ecology of Danish marine invertebrates. *Meddelelser fra Kommissionen for Danmarks Fiskeri-Og Havundersogelser, Plankton* **4**:1–523.
- Tillier, S. 1984. Relationships of gymnomorph gastropods (Mollusca: Gastropoda). *Zool. J. Linn. Soc.* **82**:345–362.
- Tillier, S., M. Masselot, J. Guerdoux, and A. Tillier. 1994. Monophyly of major gastropod taxa tested from partial 28S rRNA sequences, with emphasis on Euthyneura and hot-vent Limpets peltospiridoidea. *The Nautilus* **2**:122–140.
- Tillier, S., M. Masselot, and A. Tillier. 1996. Phylogenetic relationships of the Pulmonate Gastropods from rRNA sequences and tempo and age of the Stylocephalophoran radiation. Pp. 267–284 in J. Taylor, ed. *Origin and evolutionary radiation of the Mollusca*. Oxford University Press, Oxford, U.K.
- Tillier, S., and W. F. Ponder. 1992. New species of Smeagol from Australia and New Zealand, with a discussion of the affinities of the genus (Gastropoda: Pulmonata). *J. Moll. Stud.* **58**:135–155.

- Towner, P. 1991. Purification of DNA. Pp. 47–68 in T. A. Brown, ed. Essential molecular biology. a practical approach. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Venkatesh, B., M. V. Erdmann, and S. Brenner. 2001. Molecular synapomorphies resolve evolutionary relationships of extant jawed vertebrates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**:11382–11387.
- Wade, C. M., and P. B. Mordan. 2000. Evolution within the gastropod molluscs; using the ribosomal RNA gene-cluster as an indicator of phylogenetic relationships. J. Moll. Stud. **66**:565–570.
- Wilding, C. S., P. J. Mill, and J. Grahame. 1999. Partial sequence of the mitochondrial genome of *Littorina saxatilis*: relevance to gastropod phylogenetics. J. Mol. Evol. **48**:348–359.
- Winnepenninckx, B., G. Steiner, T. Backeljau, and R. de Wachter. 1998. Details of gastropod phylogeny inferred from 18s rRNA sequences. Mol. Phylogen. Evol. **9**:55–63.
- Wollscheid, E., J. L. Boore, W. M. Brown, and H. Wägele. 2001. The phylogeny of Nudibranchia (Opisthobranchia, Gastropoda, Mollusca) reconstructed by three molecular markers. Org. Diver. Evol. **1**:241–256.
- Wollscheid, E., and H. Wägele. 1999. Initial Results on the molecular phylogeny of the Nudibranchia (Gastropoda, Opisthobranchia) based on 18s rRNA. Mol. Phylogen. Evol. **13**:215–226.
- Yoon, S. H., and W. Kim. 2000. Phylogeny of some gastropod mollusks derived from 18s rRNA sequences with emphasis on the Euthyneura. The Nautilus **114**:84–92.

Axel Meyer, Associate Editor

Accepted September 16, 2003

III.3.- Phylogenetic relationships among Opisthobranchia (Mollusca: Gastropoda) based on mitochondrial *cox 1* and *rrnL* genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Enviado (2004)



Phylogenetic relationships among Opisthobranchia (Mollusca: Gastropoda) based on mitochondrial *cox 1* and *rrnL* genes

Cri ti a Gra de¹ Jo e ado¹ J. u a Cervera a d Ra ae Zardo a¹

¹ e arta e to de Biodiver idad Bio o la Evo utiva u eo Na io a de Cie ia Natura e C IC Jo Guti rre ba a 00 adrid ai ; a d e arta e to de Bio o la a utad de Cie ia de ar U iver idad de C, di o l o o de Rio a edro / uerto Rea 11 10 C, di IN

Abstract

We re o tru ted t e o e eti reatio i a o e ie re re e ti eve ai i ea e wit) i (i t obra ia(o u a: Ga tro oda) ba ed o artia e-ue e o t e ito o dria o 1a d rr ee (about 00 b). o e eti a a e o ir ed te tative t at a studied ai o i t obra i ea e o or ed o o eti rou e e t Nudibra ia. e a o o a obu awa a ed a t e o tba a i ea e o o i t obra . e ba o ato ora u o ate i o aria wa re overed wit i (i t obra ia betwee obu a a d t e re ai i o i t obra . e atter were divided i to two di ere t i ea e t at await or a de ri tio :o o e ide Ce aa idea odi oidea a d a idea(ari eature i t e re ro) du tive di e tive a d ir uator te) were rou ed to et er a d o t e ot er r ite tibia ia a d Nudi eura(ari i iaritie i t e ir uator te) were re overed a i ter rou ta a. wo we) u) orted ade were re overed wit i Nudi eura: euroa t obra ia (ew ta o) a d Cadobra ia. euroa t obra ia (eurobra oidea u t obra ia) wa de i ed b t e re e e o bood a d t e re e eo a areou i ue i t e i t e u e t a d t e re e eo a ae u wit a o e i dire t i to t e to a . e ew oe u ar o e rovided a robu tra e work or o arative tudie a d ro t) ed a revi o o t e or oo ia a o or ie dia o i t e ai ade wit i o i t obra .

Ke word : (i t obra ia t N o e o 1 rr Ga tro oda.

1. Introduction

(i t obra o rie tru tura diver i ed a d oour u or a i . e are o o oite a-uati or a i t at o u a reat variet o e o o i a i e a o t e u) ive i arie abitat (Rud a a d Wia 199). e ai evoutio ar tre do a t e i ea e wit i (i t obra iai t e redutio or o o t e e wi a a owed ot er bod art ike t e eadoot or a t e to be o eeaborated i diver e wa . e redutio o t e e a d ub e-ue t o o i)

a rote tio ave bee a o a ied b t e evoutio o ot er de e i ve trate ie u a t e a -ui itio o re u ator a d a d a o e ati ooratio . ara ei a d o ver e e o or o) o i a tru ture a ear to ave bee o) o a e duri t e radiatio o o i t o) bra (Go i er a d G iei 19 ; Go i er 1991; ikke e 199) a d a ered revi ou o e eti tudie . a re ut evera o o i a i iatio te (ee e. . abe 1) o o i t obra were ro o ed t rou

Table 1
Systematic position of the taxa analyzed
in this study

Opisthobranchia
Architectibranchia
Cephalaspidea
Bulloidea
Phillinoidea
Runcinoidea
Anaspidea
Sacoglossa
Tylodinoidea
Nudipleura
Pleurobranchoidea
Nudibranchia
Dexiarchia
Cladobranchia
Doridoxa
Anthobranchia
Cryptobranchia
Phanerobranchia
Pulmonata
Systellomatophora
Basommatophora
Pyramidelloidea

Modified from Rudman and Willan, 1998;
Wägele and Willan, 2000; Schrödl et al.,
2001; Mikkelsen, 2002

the ear (Boettcher 1991; a or a d o 1991; Giese 1991; o o 1991; Rudaa d Wia 1991). (i t obra are evera a o or) ie wit u o ate (a ot er rou o derived a tro od) a d to et er o or t e ade Eut eura (e e 1 1). However t e o o o o i t obra wit re et to u o ate re ai u ear a ordi to a o e e eti ot e e ba ed o or oo ia ara ter (avi i) awe a d tei er 1991; o der a d idber 1991; a rat a d i ier 00). I a re et a er (o e o 1999b) o t e o e eti reatio i o Eut eura ba ed o artia ito o dria rr e e e-ue e data t o ato ora a d ba o ato ora u o ate were re ov) ered wit i o i t obra re deri t e at) ter ara eti . I o tra t Gra de et a. (00) advo ated or t e o o o o i t obra ba ed o o e eti a a) e o artia ito o dria o 1 o ete rr o ete ad a d artia ad e e e-ue e data. However t e aut or oted t at i t at tud u o ate i ea e were

u derre re e ted (Gra de et a. 00). He e t e o o o bot o i t obra a d u o ate re ai to be o ir ed bot o or oo ia a d oe u ar rou d . ere are e eve ai rou (r i t e tibra ia Ce aa idea o idio or a Rodo e or a a idea a o o a e o o ata G o o ata odi oidea eurobra oidea a d Nudibra ia) ure t re o i ed wit i (i t obra ia (eke 1991; ikke e 1991; Rudaa d Wia 1991; ikke e 00). t ou a or oo ia a d oe u ar o e eti tudie ave o u edo ea o t e e rou (avi i) awe 1990; eke 1991; Wia 1991; avi i) awe 1991; Je e 1991; ikke e 1991; Wo eid a d Wäee 1999; edi a a d Wa 000; Wäee a d Wia 000; edi a et a. 001; Wo eid et a. 001; ikke e 00) t eir i ter) rou reatio i re ai u re o ved. wo e ber o t e i ea e r i t e tibra ia (Ri iua a d teo) (retter a d Gra a 1991; orto 1991; Go i er 1991) ave bee ater ative ro) o ed a t e o t ba a o i t obra a d t e re ore a a o de o a ar et a o i t o bra . t ou t e o o o evera rou (a idea a o o a) i e era a e ted (eke 1991; Je e 1991; ikke e 1991; o e o 1999b; edi a d Wa 000; ikke e 00) t e vaidit o ot er (r i t e tibra ia Ce aa idea Nudibra ia) i o trover ia (i i ev 1990; eke 1991; ikke e 1991; o e o 1999b; Wo eid a d Wäee 1999; Wäee a d Wia 000; Wo eid et a. 001; ikke e 00). or i ta e t e are o or oo ia a o or ie de ribed or r i t e tibra ia (ikke e 00). Re ardi Nudibra ia di ere t o e eti o t e e ba ed o or oo ia a d oe) uar data u ort t e eit era a o o et) i rou (Boettcher 1991; eke 1991; Wo eid a d Wäee 1999; Wäee a d Wia 000; Wo eid et a. 001) or a ara eti rou (i i ev 1990; o e o 1999b). I t i tud we ave o ied artia e-ue e o t e ito o dria o 1 a d rr e e (00 b) i evera ta a re re e ti

eve out o t e e eve rou o o i t o) bra . ito o dria e e ave bee ow to be u e u i re overi o e eti reatio) i at di ere t ierar ia eve a o (i t obra ia (o e o 1999b; o e o 1999a; edi a a d Wa 000; edi a et a. 001; Wo eid et a. 001; Gra de et a. 00 ; Re i io a d Hebert 00 ; ad 00). He e t e were e e ted to be u e u or t e o e eti -ue tio at a d. ri ar e-ue e were a a ed wit ure t et od o o e eti i ere e. e e o dar tru ture o t e rr e e (deard et a. 00) wa a o u ed to i er o e eti reatio i a o t e studied ta a. oreover we review or oo i a a o or ie t at a u ort t ed e t ade wit i tere overed o e u ar o e eti ot e i .

2. Materials and methods

1. a o a i a d N e tra tio

irt eve o i t obra a d two u) o ate were a a ed i t e re e t tud (abe). e etero tro a ra ide a do obrata wa u ed a out rou . N wa e tra ted ro t e oote eti t o e a e o a a i a w e r t e w o e e i e wa u ed. i ue were rou dedi i uid itro e a dre u e dedi 00 μ o e tra tio bu er (ow er 1991). ota e u ar N wa i o at) ed ro ea a e u i e o / oro or e tra tio a d t e re i itated wit et a o .

. . o era e C ai Rea tio (CR) a i i atio o i a d e-ue i

ra e t o about 00 b (i udi t e artia e-ue e o t e ito o dria o 1 a d rr e e a d t e o ete e-ue e o tr e e) wa a i ied b CR u i our et o ri er: C(1) 90 a d HC(1) 19 (o er et a. 199); (I) (')GGGC (C) ' a d (I)R (')CC (C GG) ' ; (I C(I) a d (I 1)R (Gra de et a. 00) a d 1 ar) a d 1 br H (au bi et a. 1991).

ta dard CR rea tio o i ted o 0 e wit a de aturi te erature o 9 °C

or 0 a eai at °C) °C or 0 a d e te di at °C or 90 i a tota vou eo μ. CR rodu t were re i itated wit et a o a d eit er dire t e-ue ed u i t e orre o di CR ri er or o ed i to t e GE) ve tor (ro e a) a d e-ue ed u i 1 u iver a (orward a d rever e) e-ue i ri er . N e-ue e o bot tra d were obtai ed u i t e Bi e er i ator e-ue i read rea tio kit (ied Bio te l.) o a auto ated N e-ue er (ied Bio te ri 00) o owi aua turer' i tru tio .

. . o e eti a a e

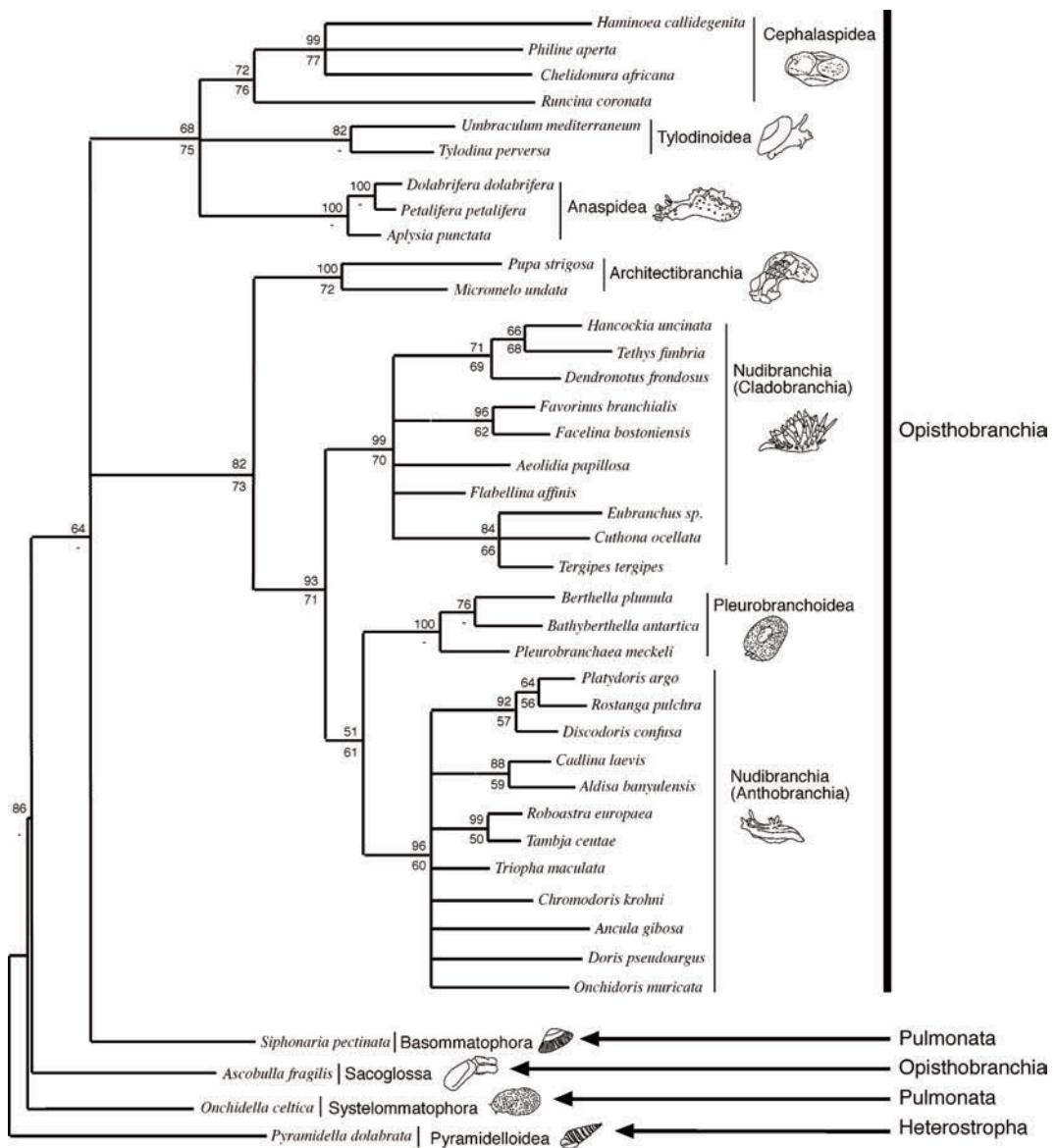
e-ue e were ai ed u i C U X ver io 1. b (o o et a. 199) o) owed b re i e et b e e. bi uou ai) e t a d a were e uded ro t e a a) i ui GB (CK 0. b (Ca tre a a 000). e u eotide e-ue e o artia ito o) dria o 1 (o ir t a d e o d o itio) a d rr e e were ubje ted to a i u ar i o () a d a i u ikei ood () a a e. wa er or ed i U * .0b10 (wo ord 00) u i euri ti ear e (u ree o tio i e e t) wit 10 ra do te wi e additio o ta a. :1 tra ver io (v): tra itio () wei i e e wa u ed ba ed o e iri a evide e (/ v= . 0). We u ed t e kaike i or atio rite) rio (IC) i e e ted i (E E ver io .0 (o ada a d Cra da 199) to deter i et e a ro riate ode o evoutio . wa er or ed i U * u i t e G R ode (Rodri ue et a. 1990) a d o ti i ed ara) eter value . e robu t e o a d a a e wa te ted b boot tra i wit 1000 eudore i ate .

Ba e ia i ere e wa er or ed wit rBa e .0b (Hue e be k a d Ro -uit 001) ba ed o a o bi ed data et t at i uded t e dedu ed artia a i o)a id e-ue e o o 1 e e a d t e artia u eotide e-ue e o rr e e u i t e tRE (or tRE +I+G) (da i a d Ha e awa 199) a d t e G R+I+G (Rodri ue et a. 1990) ub titutio ode re e tive (' et artitio ' a d 'u i k' o tio). Ba e ia i ere e wa au ed

abe i to a e a a edit i tud	e ie	o ait	Ge Ba k a . o .
(I H(BR NCHI			
r ite tibra ia			
u a tri o *	—		BO
i ro e o u data	Ca e erde l a d		Y 01
Ce aa idea			
Ha i oea a ide e ita	o tevedra. N ai		Y 01
ii e a erta	ur ia. E ai		Y 01
C eido ura a ri a a	orto a to. adeira l a d		Y 01
Ru i a oro ata	a re . ortu a		Y 01
a idea			
ia u tata	o tevedra. NW ai		Y 019
eta i era eta i era	ur ia. E ai		Y 0 0
o abri era do abri era	Ca e erde l a d		Y 0 1
a o o a			
obu a ra ii	ur ia. E ai		Y 0
odi oidea			
U bra uu edittera eu	Gero a. NE ai		Y 0
odi a erver a	orto a to. adeira l a d		Y 0
eurobra oidea			
Bert e a u ua	o tevedra. NW ai		Y 0
eurobra aea e kei	Gero a. NE ai		Y 0
Bat bert e a a tarti a	tarti a		Y 0
Nudibra ia			
eo idia a i o a	o tevedra. NW ai		Y 0
Roboa tra euro ae*	—		YO
ua ibbo a	Ki bar . ota d		Y 0 9
ori eudoar u	Ki bar . ota d		Y 0 0
a ei a bo to ie i	Ca a ei. ota d		Y 0 1
er i e ter i e	Ca a ei. ota d		Y 0
(idori uri ata	Ca a ei. ota d		Y 0
Cadi a aevi	Ki ke Brae . ota d		Y 0
et i bria	arra o a. NE ai		Y 0
C ro odori kro i	ur ia. E ai		Y 0
abe i a a i i	ur ia. E ai		Y 0
at dori ar o	Ceuta. trait o Gibra tar		Y 0
a bja eutae	orto a to. adeira l a d		Y 0
di a ba ue i	orto a to. adeira l a d		Y 0 9
i odori o u a	orto a to. adeira l a d		Y 0 0
e dro otu ro do u	(ba . ota d		Y 0 1
avori u bra iai	(ba . ota d		Y 0
Cut o a o e ata	a re . ortu a		Y 0
Ro ta a u ra	Cai or ia. We to U		Y 0
rio a a uata	Cai or ia. We to U		Y 0
Eubra u .	a re . ortu a		Y 0
Ha o kia u i ata	i e . ortu a		Y 0
U (N			
teo ato ora			
(ide a e ti a	Ceuta. trait o Gibra tar		Y 0
Ba o ato ora			
i o aria e ti ata	Ceuta. trait o Gibra tar		Y 0 9
(HER G R((
ra ide oidea			
ra ide a do abrata	obo I a d. Gu o Gui ea		Y 0

* ire t retrieved ro Ge Ba k

wit ra do tarti tree a d ru or e e were er or ed twi e be i i wit
 1 000 000 e eratio a i t e arkov di ere t tarti tree a d a are tatio)
 ai at i terva o 100 e eratio . our ar eve were o ared or o ver e e
 eated arkov ai (u i de aut eati (Hue e be k a d Bo ba k 001). u ort or
 value) were u ed. tota o 1 000 outo t e tree ode wa deter i ed ba ed o t e va)
 10 000 re uti tree were di arded a ue o Ba e ia o terior robabit (B)
 "bur ji ". o e ure t at arkov ai were obtai ed ro a ajorit)rue o e u tree.
 ot tra ed o o a o ti a Ba e ia i er)



— 50 changes

Figure 1. Phylogenetic tree showing the relationships of Opisthobranchia and related groups. The tree is rooted on the right side. Major clades are indicated by vertical bars on the left. Support values are given at nodes. Illustrations of representative species are shown next to their respective clades.

3. Results

The phylogenetic tree (Figure 1) shows the relationships of Opisthobranchia and related groups. The tree is rooted on the right side. Major clades are indicated by vertical bars on the left. Support values are given at nodes. Illustrations of representative species are shown next to their respective clades.

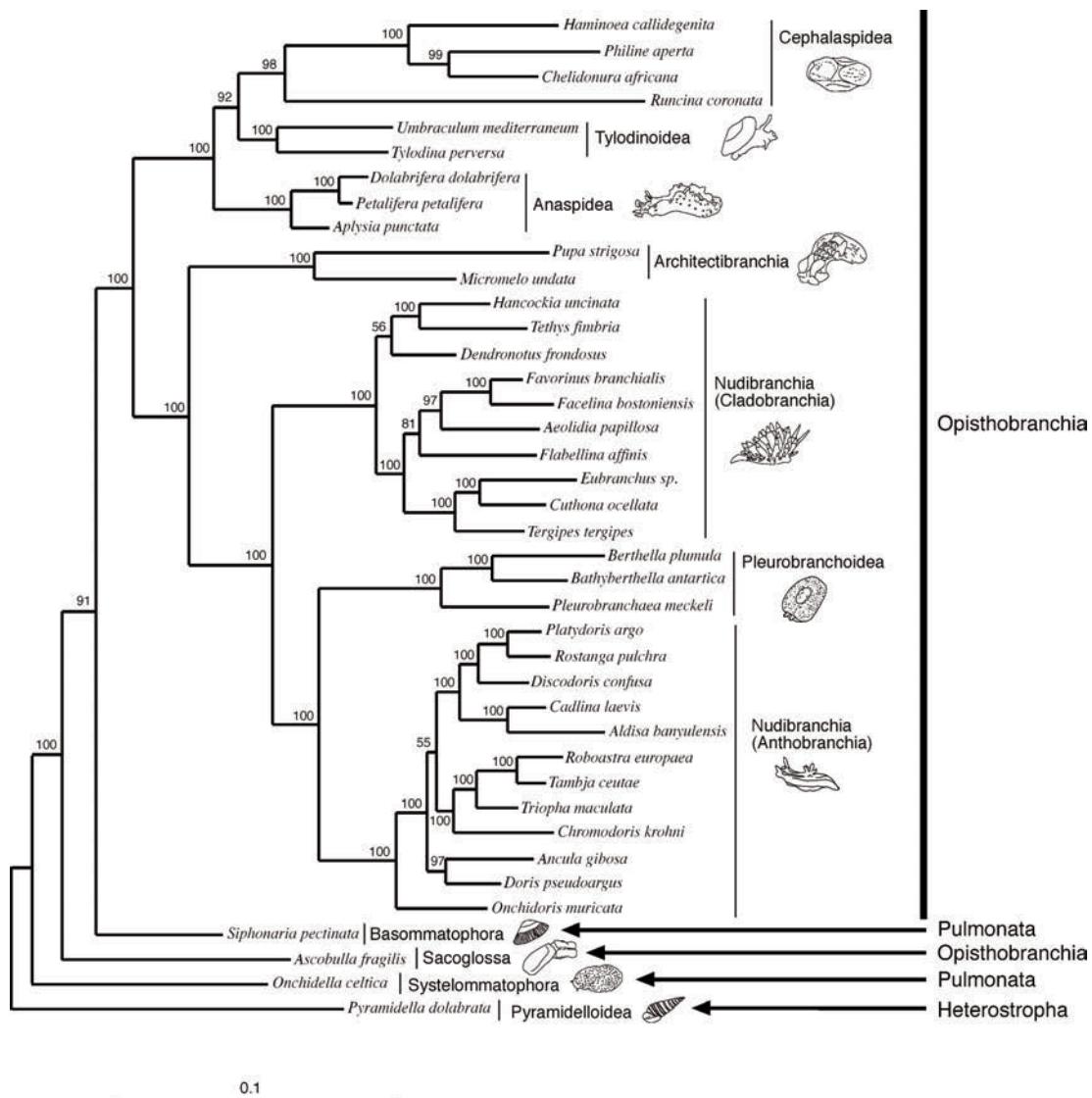
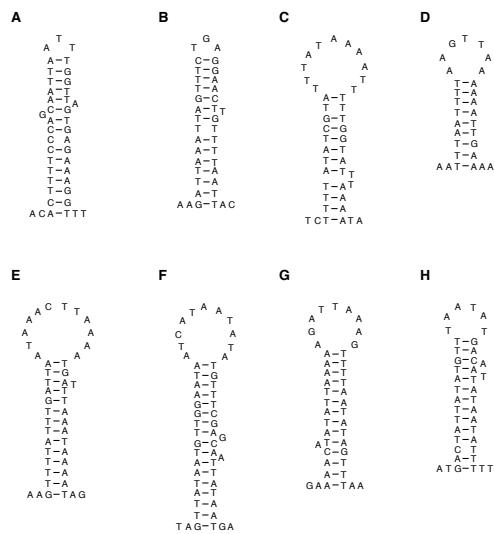


Figure 1. Bayesian 50% majority rule tree inferred from deduced amino acid sequences of the *tRE* gene (G+R+I+G). Support values above branches refer to posterior probabilities (values above 95% are considered statistically significant). Raideawa was used as root.

i or active. a a e arrived at o e o t) ar i o iou tree o te w e a :1 v: wei ti wa a u ed (Cl= 0. ; RI= 0.) (i . 1). e teo ato ora (ide awa te ot ba a i rou i ea e. e a o o a obu awa te et i ea e bra i o t e tree (i . 1). e ba o) ato ora u o ate i o aria wa re ov) ered wit i (it obra ia (i . 1). e re overed to oo owed two i u ort) ed ai i ea e wit i o it obra : o e i uded Ce aa idea a idea ad odi oidea w erea t e ot er i uded rite tibra ia a d Nudi eura (Nudibr ia + eurobra oidea) (i . 1). e o o o ea o t e rou wit i t e two ai i ea e wa u orted b i boot) tra value (i . 1). However t e relative o itio o eurobra oidea wit i Nudibr ia re dered t e atter ara eti (i . 1). e era a k o re outio wa ob erved wit i t e ter i a rou t at wa ike related wit t e i eve o aturatio ou d i ito o dria o 1 e e at t e

u eotide eve (ot ow). () = 1 .) arrived to a tree wit t e a e bra i atter (i . 1).
 e e o d data et rodu ed a ai) e to 1 9 o itio . ter re ovi a a bi uou o itio (o t i terr e e) a tota o o itio were u ed or urt er o e eti a a e (9 u eotide o i) tio or rr e e a d 9 i erred a i o) a id o itio or o 1 e e). Ba e ia i ere e ba ed o t i data et ui t e G R+I+G (u eotide e ue e data) ad t e tRE (a i o a id e ue e data) ub titutio od e were er or ed. e re o tru ted Ba e ia 0% ajorit)rue o e u tree i de i tedi i ure . ter ative a Ba e ia i ere e u i t e tRE +I+G ub titutio ode ort ea i o a id e ue e data re ov ered t e a e tree a d i i ar o terior roba biit value or a t e o de (ot ow). e re overed to oo u orted t e ba a o i) tio o t e order a o o a (re re e ted b obu a) wit re e t to a ot er studied o i t obra (i .). e ba o) ato ora u o ate i o aria wa re ov ered wit i (i t obra ia. e re ai i studied o i t obra were re o ved i to two di ti t i ea e : o e i uded Ce aa idea



i ure . o eea e o utative ei aoo tru ture wit i o ai ll o te ito o dria rr e ei Nudi eura. e e tru ture are ab e t i te ot er ta a studied. : Ha o kia u i ata; B: abe i a a i ; C: Eubra u .; : Bat bert e a a tari a; E: eurobra aea e kei; : Ro ta a a u ra; G: di a ba ue i; H: rio a a uata.

a idea a d odi oidea w erea t e ot er i uded r ite tibra ia a d Nudi eura. Wit i Nudi eura eurobra oidea wa re overed wit i Nudibra ia re deri t e atter ara eti (i .). Hi er u ort or t e di ere t i erred ade a we a i er re outio o ter i a ode were ob erved.

I additio tote o e eti a a e o ri ar e ue e data t e e o dar tru)ture o rr ito o dria e e wa e ored or a t e tudied ta a (i .) i order to ear or a o e eti a i or ative i) a (deard et a. 00). We i erred t e tree ei aoo tru ture (wit i o ai ll III a d o t e rr ito o dria e e) t at were reviou u ed a o e eti a i or ative ara ter i a re e t tud o Heterobra ia (a te o a tro od t at i ude Eut eura + Hetero tro a) (deard et a. 00). No ei aoo tru ture were ou d wit i o ai ll a d i a o t e tudied ta a. I tere ti e ber o t e Nudi eura ade (Cadobra ia eurobra oidea a d t obra ia) areda ei aoo tru ture wit i o ai ll o t e rr e o dar tru ture wi i ab e t i t e ot er tudied ta a (i .).

4. Discussion

e re e t tud rovide a robu t o) e eti ot e i or t e reatio i a o di ere t i ea e o o i t obra ba ed o ito o dria e e ue e data. o e eti a a e o artia ito o dria o 1 (o ir t a d e o d o itio) a d rr e e u eotide e ue e re o tru ted rat er u re o ved to oo ie arti uar at ter i a o de . However t e Ba e ia a a i ba ed o a o) bi ed data et i udi t e dedu ed a i o a id e ue e o ito o dria o 1 e e a d t e u eotide e ue e o ito o dria rr e e arrived at a i re o ved tree t at i our be t ot e i or t e o e eti reatio) i o o i t obra . edi ere e i re o) utio betwee bot o e eti tree wa ike) due to aturatio o ito o dria e ue e at t e u ear eve (but ot at t e a i o a id eve) t at re uted i a adver e o e eti i a / oi e ratio (Zardo a a d e er 001) i t e ir t e ue e data et.

abe
 or oo ia ad oeuar eature t at u ortt ere overed ade wit i t e oeuar o e eti
 ot e i . ee i ure or
 t e ide ti atio o t e ode

a a	Node	eature	Node	eature
Nudi eura		re e eo a ei a)oo tru ture wit i o ai llo o t e ito o dria rr e e		
	B	b e eo t eo radiu *		
euroa t obra	ia	C re e eo b ood a d re e eo a areou i ue i t eite u eta d re e eo a ae u wit		
t obra	ia	a o e i dire t i to t e to a		
Ce aa idea+	a idea+ E	re e eo a ae u i ed wit iated e it eiu a otu over rowi o to e a d o tero) edia iteo a u e ro ro ta da a a i *		
odi oidea		re e eo a o e e i a rolove a d o)etra tie e i a abu e a d ate i t e i ard a d ab e e o		
a idea		b ood a d		
Ce aa idea	G	re e eo a i ter a ber ¥		
ii oidea	H	re e eo a i de ted ra idia ab e or eve o o i ard i e e ed iated tri ¥		
r ite tibra	ia	reedi abit ¥		
C addobra	ia	I Redu tio o t e to a a d rotatio o t e a te avit o e i ro a terior to atera ¥		
eurobra	oidea	J b e eo t e ri ar i ai or jaw ab e eo t e bur a o uatri a d ab e eo t e b ood a d *		
	K	re e eo id ut a id a d eda a di ature e ua i dividua a dt e re e eo a arrow ora vei i reatio to t e bod widt §		

* Wä e e a d Wi a 000

¥ ikke e 00

§ Wi a 199

o e eti a a e eror edi t i
 tud re overed t e ba o ato ora u)
 o ate i o aria wit i (i t obra ia.
 e i itio o (i t obra iai uret va ue
 be au e o t e rete tio o ri itive a)
 tro od ara ter i t e ea t derived e)
 ber o (i t obra ia (Kö er 19 ; retter
 a d Gra a 19 9; retter a d Gra a 19 ;
 Ri b 19 ; G iei 19 ; Robert o 19 ;
 Go ier 19 1; i ier 19 ; Ha ru ar a d
 Huber 1990; avi i) awe 1991; ikke e
 00). (ure ut ro t or a re)evaluatio
 o t e o oo ad tate o t e or oo i)
 a ara ter o i o aria taki i to a ou t
 it ew o e eti o itio wit i o ito
 bra a we a or a revi io o t e or o)
 o i a a o or ie t at dia o e
 (i t obra ia.
 e ba a o itio o t e a o o a
 obu a wit re et to t e ot er o ito
 bra wa a o re overed i a o e eti
 a a e . i reut i i a ree et wit revi
 ou or oo i a tudie t at ave ow
 obu a to be a ver ri itive ta o wit i
 o it obra wit e io or i ara ter
 u a ead ied e ter a e ad iatidiu
 (eke 19 ; Je e 199 ; ikke e
 199). reviou tudie u e ted o e e)
 ber o r ite tibra ia (teo orater ative)
 Ri i ua) a t e o t ba a o it obra
 (Go ier 19 1; eke 19 ; ikke e
 199 ; ikke e 00). o vaidate o t i
 o t e i a d to ear or t e ori i o t e
 o it obra teo a d Ri i ua oud be
 i uded i uture oe uara a e .
 o e eti a a e eror edi t i
 tud re overed two di ti t i ea e wit i
 (i t obra ia t at await or a de ri tio :
 o e i uded Ce aa idea a idea a d
 odi oidea a d t e ot er i uded
 r ite tibra ia a d Nudi eura.
 Ce aa idea are ara teri ed b two or o)
 o i a a o or ie (abe a d i .): t e
 re e eo t ree i ard ate a d e ed/e o)
 rou iiated tri (ikke e 00). (ur
 re ut u ort t eir o o a d t ee i)
 te e o t ree di ti t i ea e wit i t i rou :
 Bu oidea ii oidea a d Ru i oidea t at are
 re re e ted b Ha i oea ii e+ C eido ura
 a d Ru i a re e tive . (t e o t e
 a i e to Ru i oidea to Ce aa idea wa

-ue tio ed ((d er 19). However ara)
 ter i t e ervou a d re rodu tive te
 (wit o e e i a roove a d er ati bub)
 u ort t eir a i itie to e aa idea
 (Kre 19 ; eke 19).
 e ber o t e r ite tibra ia were
 traditio a i uded wit i Ce aa idea
 a t ou re e t or oo i a tudie owed
 t at bot rou were o uited b e io or)
 ie (ikke e 199 ; ikke e 00). (ur
 re ut u orted radi a di ere t ori i or
 Ce aa idea a d r ite tibra ia. oi t)
 ed out b ikke e (00) r ite tibra ia
 are ike ot o o eti a d ore re re e)
 tative o t e rou eed to be i uded i
 uture oe uar o e eti a a e to
 re ovet eir te ati .

e o o o a idea a re overed
 b oura a a e i we u orted bot o or)
 oo i a (eke 19 ; ikke e 199 ;
 ikke e 00) a d oe uar rou d
 (o e o 199b; edi a a d Wa 000).
 e rou i de i ed b t e re e eo a iter
 a ber(ikke e 00)(abe a d i .).
 Nota idea are ure t divided i to
 odi oidea a d eurobra oidea (Rud a
 a d Wi a 199). However a ordi to
 eke (19) a t e ara ter t at
 de i ed t e Nota idea were ear e io or)
 ie a d odi oidea a we a
 eurobra oidea were o diver e t i t eir
 or oo t at t e did ot ee to are
 t e a eori i . (ure ut u ort eke
 (19) view . I our tud odi oidea wa
 re overed a t e i ter rou o Ce aa idea.
 I a t evera ara ter u a a o e
 e i a roove a d o)retra tie e i a
 abu e a d ate i t e i ard a d
 ab e e o bood a d u et t at
 odi oidea i ore o e related to
 a idea a d Ce aa idea t a to
 eurobra oidea (abe a d i .).
 ordi to our re ut eurobra oidea i
 o e related to Nudibra ia (but ee be ow).

Wä eea d Wi a (000) u e ted o e
 o e eti reatio i betwee
 eurobra oidea a d Nudibra ia a d
 de i ed t e ade Nudi eura to rou t e
 to et er. Nudi eura wa dia o ed b t e
 o e io o abood a d a drodiaui re ro)
 du tive te a d t e a k o o radiu

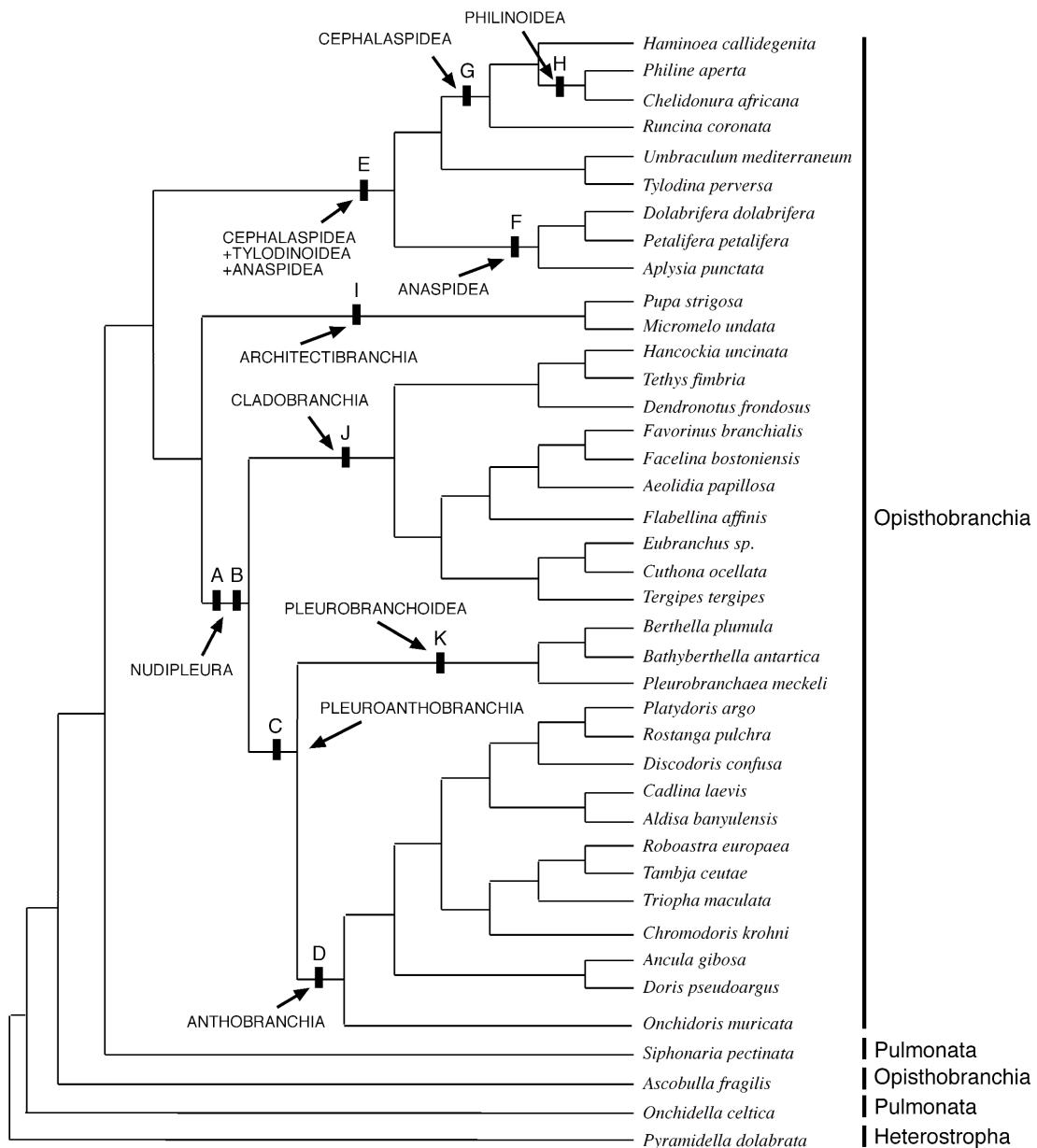


Figure . Review of nudibranch diversity and distribution over time. The tree is rooted on the left and branches to the right. Major clades are labeled with capital letters and arrows pointing to specific nodes. Nodes A, B, C, D, E, G, H, and F are marked with double black bars. Nodes I, J, and K are marked with single black bars. The tree includes the following taxonomic groups and species names:

(Wägele et al. 2000). However, the evidence for a monophyletic group of nudibranchs (including Tylodinoidea and Anaspidea) is weak (Giese 1991; Kluge 1999). Therefore, the monophyly of Nudibranchia is not well supported. The relationships within Nudibranchia are still under investigation. The tree presented here is based on morphological and molecular data and shows the current state of knowledge. The tree is rooted on the left and branches to the right. Major clades are labeled with capital letters and arrows pointing to specific nodes. Nodes A, B, C, D, E, G, H, and F are marked with double black bars. Nodes I, J, and K are marked with single black bars. The tree includes the following taxonomic groups and species names:

re orted i ba a a tro od i ea e w erea it wa ab et i u o ate a d i t e ar i) te tibra u a (deard et a. 000; deard et a. 00). e ew e-ue e re e ted i t i tud ow t att i ei a)oo tru ture wit i o ai III o terr e e i a o re e t i Nudi eura.

t ou t e o o o Nudi eura a ot bee -ue tio ed t at o Nudibra ia i o trover ia (i i ev 19 0; eke 19 ; o e o 1999b; Wo eid a d Wä ee 1999; Wä ee a d Wi a 000). ere are two ajor i ea e wit i udibra : t obra ia a d e iar ia (Cadobra ia+ orido a) (Wä ee a d Wi a 000; röd et a. 001). o e ara ter u a oid r i o ore ab e e (t rou o)o t e e eri ardia o e orie tated o itudi a ad t e re e e o e iai ed va uo ated e it eiu were ro o ed to u ort t e o o o Nudibra ia (Wä ee a d Wi a 000). However t e ab e e o t e e i ot e u i ve re tri ted to udibra a o o i t obra (Rud a a d Wi a 199) ad t e eri ardia o e orie tated o itudi a i a o ou di eurobra oidea (Wi a 19). i i ev (19 0) de e ded di) ere t(a di o e a e eve o o ite) evo u) tio ar tre d i re irator iruator a d re rod u tive te between t e two ai rou o udibra u e ti di ere t ori i or t e a dt e re ore ro o ed t eir a) i i atio i to di ere t order .

e o e uar o e re overed eurobra oidea a i ter rou o t obra ia re deri Nudibra ia ara) eti . ere ore we or a i trodu e t e a e euroa t obra ia ew ta o or t e rou or ed b eurobra oidea a d t obra ia. e ew ta o i de i ed b t e re e e o bood a d a areou i ue i t e i te u e t a da ae u dire t o e ed i to t e to a (abe a d i .).

t obra ia were re overed o o eti . i i i a ree e t wit o e et) i a a e ba ed o or oo i a data t at re o i ed t e o o wi a o or ie o t e rou : re e e o a ae u i ed wit i) iated e it eiu a otu over rowi ead a de o i r i o ore duri o to e a o tero) edia ite o a u re e e o a

e ro ro t a d a a i (Wä ee a d Wi a 000) (abe a d i .). However our re ut did ot u ort t e traditio a ubdivi) io o t obra ia i to Cr tobra ia a d a ero bra ia ba ed o t e re e e or ab e eo a i o ket re e tive . Neit er t e a ero bra ((idori ua rio a a bja a d Roboa tra) or t e r to) bra (ori C ro odori di a Cadi a i odori Ro ta a a d at dori) or ed o o eti rou . ere ore t e rote) tive avit or t e i i t obra ia ut ave evo ved evera ti e i de e de t dur) i t e evoutio ar i tor o t e rou .

Cadobra ia were re overed o o eti i t i tud at ou t ere are o or oo i a a o or ie u orti t i ade (Wä ee a d Wi a 000). o ado) bra t e o o o eo idiae wa re overed but ot t o e e dro otoidea (Ha o kia et a d e dro otu) a d er i ediae (er i e a d Cut o a).

e o e uar o e re o tru ted i t i tud rovide ew i i t o t e reatio) i a d evo utio ar tre d wit i (i t obra ia. e ba o ato ora i o aria i re overed wit i o i t obra a d ro t or a ore o ete a a i o t e o e eti reatio i between o i t o) bra a d u o ate to t e t e o o o ea rou . (ur o e eti ot e i u ort o o e ide a o o a e t o r or a idea odi oidea a d Ce aa idea (ara teri ed b t e re e eo a o e e) i a roove a d o)retra tie e i a abu e a d ate i t e i ard a d t e ab e e o bood a d)a d o t e o t e r ide a o o ori i or r ite tibra ia a d Nudi eura (ari i i aritie i t eir iruator te). (ur data u ort t e o o o a t e tud) ied rou wit i t e e two ai i ea e wit t e e e tio o Nudibra ia. ore re re e) tative o a o o a a d r ite tibra ia eed to be i uded i uture tudie to te t t eir o o eti ori i a d to orroborate t eir ba a o itio wit i o i t obra . urt er i ve t i atio oud a o i vove t e re ai i order o (i t obra ia (e o o ata G o o ata o idio or a a d Rodo e or a) ot o idered i t e re e t tud .

Acknowledgements

G. a artì X. urÛ E.Ro., G. Ca ado a d . röd o aborated i t e e ie a) i . C.G. wa o ored b a redo tora e) ow i o t e i i terio de Cie ia e oo ìa. i work re eived i a ia u) ort ro roje t o t e i i terio de Cie ia e oo ìa to J. . (REN 000)0 90/G () to J. .C. (REN 001)19)C1)0 /G () a d to R. Z. (REN 001)1 1 /G ().

References

- da i J. Ha e awa . 199 . ode o a i o a id ub titutio i rotei e oded b ito o dr) ia N .J. o. Evo. 9) .
- Boett er C.R. 19 . ie te atik der eut eure e ke . er a du e der eut e Zoo o i e Gee ati übi e 1) 0.
- Ca tre a a J. 000. ee tio o o erved bo k ro uti eai et ort eirue i o e) eti a a i. o. Bio. Evo. 1 0) .
- a rat B. iier . 00 . Evoutio ar reatio i o eut eura a tro od (ou a):a adi ti re)evalutio o or oo ia ara ter . Zoo . J. i . o . 1 0) 0.
- o er (. Ba k . Hoe W. ut R. rije oek R. 199 . N ri er or a i i atio o ito) o dria to ro e o ida e ubu it l ro diver e eta oa i vertebrate . o. ar. Bio. Biote . 9) 99.
- retter . Gra a . 19 9. e tru ture a d ode o i e o t e ra ide idae ara iti o ito) bra . J. ar. Bio. . UK 9) .
- retter . Gra a . 19 . (b ervatio o t e o i t obra ou teo tor ati i (.) J. ar. Bio. . UK) .
- retter . Gra a . 19 . Briti ro obra ou . Ra o iet o do .
- G iei . . 19 . Re rodutive u tio a d t e o e o o i t obra a tro od . aa oo ia) .
- Go ier . . 19 1. (ri i a d reatio i o ri itive e ber o t e (i t obra ia (ou a: Ga tro oda). Bio. J. i . o . 1 19) .
- Go ier . . 1991. or oo ia ara ei i o i t obra a tro od . aa oo ia 1) .
- Go ier . . G iei . . 19 . ara e evoutio i (i t obra a tro od a d it i i atio or o e eti et odo o . t. Zoo .) .
- Gra de C. e ado J. Cervera J. . Zardo a R. 00 . e o ete ito o dria e o e o t e udibra Roboa tra euro aea (ou a: Ga tro oda) u ort t e o o o o i t o bra . o. Bio. Evo. 19 1) 1 .
- Ha ru ar G. Huber G. 1990. (t e e tra erv) ou te o ea oidae a d R odo idae two a iie -ue tio ab a ied wit t e G o or a (Ga tro oda: Eut eura). J. Zoo. 0 1) 199.
- Hue e be k J. . Bo ba k J. . 001. E iri a a d ierar i a Ba e ia e tia atio o a e tra tate . t. Bio. 0 1) .
- Hue e be k J. . Ro -ui t .R. 001. rBa e : Ba e ia i ere e o o e . Bioi or ati 1) .
- Je e K.R. 199 . o e eti te ati a d a i i atio o t e a o o a (ou a Ga tro oda (i t obra ia). i. ra . R. o . o do B 1 91)1 .
- Kö er . 1 9 . Beiträ e ur ato ie der Gattu i o aria. Zoo o i e Ja rbü er bteiu ato ie 19) .
- Kre . . 19 . Ru i a erru i ea. . (Ce aa idea: (i t obra ia: Ga tro oda) a ewru i id ro Great Britai . J. ar. Bio. . UK 01) 11.
- deard C. Ho a e W.E. are .N. Gute R.R. 000. o e eti a a i o ou a ito) o dria U r N e-ue e a d e o dar tru ture . o. o e et. Evo. 1 10) .
- deard C. Ho a e W.E. Ue i a R. Kuraba a i . 00 . te ati i i atio o e tre e o or redu tio o ito o dria U rRN e) i a)o o tru ture i a tro od . aa oo ia 9) .
- edi a . Co i . . Wa .J. 001. t N ribo o a e e o e o ea are i t e e u ia (Ga tro oda (i t obra ia a idea): i i atio or o arative euro) bioo . t. Bio. 0) .
- edi a . Wa .J. 000. o e uar te ati o t e order a idea ba ed o ito o dria N e-ue e (1 1 a d C(I). o. o e et. Evo. 1 1) .
- ikke e . . 199 . e evoutio ar reatio i o Ce aa idea . . (Ga tro oda:

(i t obra ia): a o e eti a a i .
 a a o o ia) .
 ikke e . . 00 . e ed (i t obra . dv.
 ar. Bio.)1 .
 i i ev Y. . 19 0. (t e ori i a d te o
 udibra iate o u (Ga tro oda
 (i t obra ia). o it. Zoo. Ita. 1 9)1 .
 orto J.E. 19 . o u a. Hut i o & Co. td.
 o do .
 (d er N.H. 19 . te ati ue [i] ou) a e
 de o i t obra e.l : ra (Ed.) rait de
 Zoo o ie. a o ari .) 9 .
 au bi . arti . Ro a o . ia W(. ti e
 . Graboww ki G. 1991. e i e oo' uide
 to CR. er io .0. e art e to Zoo o a d
 Kewao arie aborator U iver it o Hawaii
 Ho o u H 9 .
 o der W. . idber .R. 199 . oward a)
 o e o a tro od o u :a a a i u i
 or oo i a ara ter. Zoo. J. i . o . 119
) .
 o ada . Cra da K. . 199 . o de te t: te ti
 t e o de o N ub titutio . Bioi or ati
 1 1) 1 .
 Re i io E. . Hebert . .N. 00 . e ti t e utii
 t o artia C(I e ue e or o e eti e ti
 ate o a tro od reatio i . o .
 o e et. Evo. 9 1) .
 Ri b J.E. 19 . u i ea utri: a terre tria
 o i t obra o u . . Zoo. o . o d. 1
) .
 Robert o R. 19 . e bio o o t e
 r ite to i idae a tro od o bi i ro o)
 bra a do i t obra trait . aa o o ia 1
 1) 0.
 Rodri ue . (iver J. . arl . edi a J.R. 1990.
 e e era to a ti o de o u eotid e ub)
 titutio . J. eor. Bio. 1) 01.
 Rud a W.B. Wi a R.C. 199 . (i t obra ia. l :
 Bee e Ro GJB We (Ed.) o u a:
 e out er t e i . au a o u tra ia.
 C IR(ebour e . 91)10 .
 avi i) awe . 19 0. Zur te ati e te u
 vo o eo i era u d R odo e (Ga tro oda
 Eut eura). Zoo o i e Ja rbu ür
 te atik 9) 99.
 avi i) awe . 1991. e tatu o t e
 R odo idae (Ga tro oda: Eut eura).
 a a o o ia 01) 11.
 avi i) awe . tei er G. 199 . a o or ie
 a d e io or ie i i er a i i atio o
 ou a.l : a or J(Ed.) (ri i a d e voutio)
 ar radiatio o t e ou a. e aa o o ia
 o iet o o do o do . 9) 1.
 eke . 19 . e t o t e evoutio wit i
 t e o i t obra . l : rue a ER Carke R
 (Ed.) e ou a. ade i re o do
 . 1) .
 röd . Wä ee H. Wi a R.C. 001. a o o i
 rede ri tio o t e orido idae (Ga tro oda:
 (i t obra ia) a e i ati a i o dee
 water udibra wit di u io o ba a udi)
 bra o e . Zoo. . 0)9 .
 e e J. 1 1. ie Geru or a e u d da
 Nerve te der o u ke . Zeit rit ür
 Wi e a t i e Zoo o ie. ei i) .
 wo ord . . 00 . U *: o e eti a a i
 u i ar i o (*a d ot er et od) ver io
 .0. i auer o iate u dera d .
 a or .W. o N. . 19 . out i e o a tro od
 a i i atio . aa o o ia 1) .
 o e o . 1999a. o e eti a a i o dorid
 udibra (Ga tro oda: orida ea) u i t e
 ito o dria 1 rRN e e. J. o . tud.
) .
 o e o . 1999b. o e eti a a i o
 Eut eura (Ga tro oda) b ea o t e 1
 rRN e e: u e o a a t e e or i er)eve
 o e ie . ro .R. o . o d. B) .
 o o J. . Gib o .J. ew iak . Jea ou i
 . Hi i .G. 199 . e C U X wi dow
 i ter a e: e ib e trate ie or uti e
 e-ue e ai e t aided b -uait a a i
 too . Nu ei id Re .) .
 o o .E. 19 . Bio o o (i t obra o)
 u . e Ra o iet o do .
 iier . 19 . Reatio i o o or a)
 tro od (o u a: Ga tro oda). Zoo o i a J.
 i . o .) .
 ow er . 1991. ur i atio o N . l : Brow
 (Ed.) E e tia o e uar bio o . ra ti a
 a roa . (ord U iver it re (ord .
) .
 ad . 00 . rei i ar o e uar o e o
 t e radua)e dorid (Ga tro oda:
 (i t obra ia) ba ed o 1 t N
 e-ue e data. J. o . tud. 9) 0.
 Wä ee H. Wi a R.C. 000. o e o
 Nudibra ia. Zoo. J. i . o . 1 0)1 1.
 Wi a R.C. 19 . o e eti te ati o t e
 Nota idea((i t obra ia) wit rea rai a o
 a iie a d e era. . aa .Bu . 1) 1.

Wo eid E. Boore J. . Brow W. . Wä e e H. Zardo a R. e er . 001. ertebrate o e :
001. e o e o Nudibra ia i it o i ere e o ito o dria e o e a d
((i t obra ia Ga tro oda ou a) re o) u ear r N -ue e data due to a adver e
trued b t ree oeuar arker .(r . iver. o e eti i a/ oi e ratio. I : ber E
Evo. 1 1) . (Ed.) a jor eve t i ear vertebrate evo utio .
Wo eid E. Wä e e H. 1999. I itia Re ut o t e a or a d ra i o do . 10)11 .
oeuar o e o t e Nudibra ia (Ga tro oda (i t obra ia) ba ed o 1
rRN . o. o e et. Evo. 1 1) .

IV.- DISCUSIÓN

El estudio de las relaciones filogenéticas dentro de los gasterópodos supone un reto debido, entre otras cosas, a su larga historia evolutiva, a la existencia de radiaciones frecuentes y rápidas, así como a la adaptación a diversos hábitats por parte de formas emparentadas y al mismo hábitat por parte de formas alejadas. Este hecho es especialmente patente dentro de Euthyneura, un grupo con una gran diversidad y caracterizado por la evolución en mosaico de los miembros que lo componen. Así, en las diferentes formas del grupo pueden encontrarse caracteres típicamente primitivos junto con caracteres típicamente derivados. Por lo tanto, entender los procesos ocurridos a lo largo de la evolución de Euthyneura ha despertado gran interés a lo largo de la historia de la malacología, pero aún hoy sigue con multitud de puntos sin aclarar.

Los avances en las técnicas de la biología molecular están permitiendo que aumente de manera creciente el uso de las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos para inferir las relaciones filogenéticas entre los organismos a diferentes niveles taxonómicos. Del mismo modo, también se está realizando un gran esfuerzo en la mejora de las metodologías de tratamiento de las secuencias y de inferencia de árboles filogenéticos. Como resultado las filogenias basadas en datos moleculares son muy robustas desde el punto de vista estadístico y son actualmente las herramientas más empleadas por los biólogos para abordar estudios comparativos de tipo evolutivo, biogeográfico, etc.

En la primera parte de la presente tesis, se ha podido ahondar en el conocimiento de los genomas mitocondriales de los moluscos. Se ha proporcionado información relevante acerca de las características moleculares, del procesamiento de los ARN_{st} y del orden génico presente en el genoma mitocondrial de un nudibránquio. En la segunda parte de la tesis, las hipótesis filogenéticas propuestas suponen que, por primera vez, se pueda establecer un marco filogenético consistente para Euthyneura, aclarar la delimitación entre algunos de los grupos que lo integran y proponer sinapomorfías moleculares y morfológicas que los sustentan.

IV.1.- EL GENOMA MITOCONDRIAL DE *R. EUROPAEA*

La caracterización del genoma mitocondrial del nudibranquio *Roboastra europaea* ha aportado información relevante tanto desde el punto de vista de su descripción molecular como desde el punto de vista sistemático. El tamaño del genoma mitocondrial de *R. europaea* ha resultado ser uno de los más pequeños descritos hasta el momento dentro de los metazoos (14.472 bp). Este hecho parece ser una característica de los genomas mitocondriales de Heterobranchia (*Albinaria coerulea* (Hatzoglou *et al.*, 1995); *Cepaea nemoralis* (Terrett *et al.*, 1996); *Euhadra herklotsi* (Yamazaki *et al.*, 1997); *Pupa strigosa* (Kurabayashi y Ueshima, 2000a); *Omalogyra atomus* (Kurabayashi y Ueshima, 2000b)) y es el resultado de una reducción tanto de los genes codificados por el genoma mitocondrial, como de las regiones no codificantes localizadas entre ellos. Otro factor a tener en cuenta es la existencia de solapamiento entre genes que se transcriben en sentidos complementarios (en *R. europaea* entre *nad4* y *trnT* y *cox3*) o entre genes codificados por la misma cadena (en *R. europaea* entre *trnL* (*cun*) y *trnA*). Este hecho, que ocurre también en otros metazoos (Wolstenholme, 1992), es más frecuente en los genomas mitocondriales de los heterobranquios descritos hasta el momento (Hatzoglou *et al.*, 1995; Terrett *et al.*, 1996; Yamazaki *et al.*, 1997; Kurabayashi y Ueshima, 2000a; Kurabayashi y Ueshima, 2000b).

El genoma mitocondrial de *R. europaea* codifica para 37 genes (13 codificantes para proteínas, 2 ARNs ribosomales y 22 ARNs de transferencia) al igual que todos los genomas mitocondriales de metazois descritos hasta el momento, salvo algunas excepciones (Hoffmann *et al.*, 1992; Okimoto *et al.*, 1992; Boore y Brown, 1994; Dörner *et al.*, 2001).

El código genético del genoma mitocondrial de *R. europaea* es el mismo que el descrito para otros moluscos (Boore y Brown, 1994; Hatzoglou *et al.*, 1995; Terrett *et al.*, 1996; Yamazaki *et al.*, 1997; Wilding *et al.*, 1999; Kurabayashi y Ueshima, 2000a; Kurabayashi y Ueshima, 2000b) y se diferencia del código universal en que ATA codifica para metionina, TGA para triptófano y AGR para serina. Al igual que en el resto de los metazoos, existe una tendencia a encontrar con frecuencia muy baja el nucleótido G en las terceras posiciones de los codones. Los codones más usados por el genoma mitocondrial de *R. europaea* son TTA (que codifica para leucina) y TTT (que codifica para fenilalanina), y los menos usados son GAC (que codifica para ácido aspártico), TGC (que codifica para cisteína) y CGC (que codifica para arginina). El contenido en A+T del genoma mitocondrial de *R. europaea* es muy

elevado (66,1%). El porcentaje de A+T es mayor que el de otros moluscos (Boore y Brown, 1994; Hatzoglou *et al.*, 1995; Terrett *et al.*, 1996; Yamazaki *et al.*, 1997; Kurabayashi y Ueshima, 2000a), pero menor que el de otros invertebrados, como el del díptero *Apis mellifera* (84,9%) (Crozier y Crozier , 1993) o el del nematodo *Caenorhabditis elegans* (72,0%) (Okimoto *et al.*, 1992).

Las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial de *R. europaea* utilizan mayoritariamente ATG como codón de iniciación, aunque también pueden usar otros codones, como TTG, ATA, ATT y GTG. Estos últimos son menos frecuentes en celomados, aunque ya se habían descrito en heterobranquios con anterioridad (Hatzoglou *et al.*, 1995; Terrett *et al.*, 1996; Yamazaki *et al.*, 1997; Kurabayashi y Ueshima, 2000a; Kurabayashi y Ueshima, 2000b). Los codones de terminación mayoritarios son TAG y TAA, aunque al igual que en otros metazodos, también se encuentran codones incompletos con T o TA que son completados mediante poliadenilización de los ARNm (Ojala *et al.*, 1981).

El genoma mitocondrial de *R. europaea* contiene 22 ARNst. Por lo tanto, no se han localizado ARNst extras como los descritos para otros moluscos (Hoffmann *et al.*, 1992; Boore y Brown, 1994). Se ha podido definir la estructura secundaria típica en forma de trébol para cada uno de los 22 ARNst del genoma mitocondrial. Sin embargo, el brazo de dihidroduridina (DHU) no está presente en el *trnS(ucn)*, al igual que en otros gasterópodos (Terrett *et al.*, 1996; Yamazaki *et al.*, 1997; Kurabayashi y Ueshima, 2000a) ni en el *trnS(agn)*, al igual que en otros metazodos (Wolstenholme, 1992) (Figura IV.1). Algunos autores han apuntado la posible importancia de este tipo de cambios estructurales en los ARNst para las reconstrucciones filogenéticas (Wolstenholme, 1992). Sin embargo, aunque existe un patrón general entre los heterobranquios descritos hasta el momento de una alta frecuencia de pérdida del brazo DHU o TΨC en diferentes ARNst, no puede decirse que exista una determinada anomalía que defina a un grupo.

Otro aspecto de interés es la presencia de bases no emparejadas en el brazo aminoacídico de varios ARNst del genoma mitocondrial de *R. europaea* (Figura IV.1). Esta característica se cumple también en algunos ARNst de los genomas mitocondriales de otros heterobranquios descritos hasta el momento (Hatzoglou *et al.*, 1995; Terrett *et al.*, 1996; Yamazaki *et al.*, 1997; Kurabayashi y Ueshima, 2000a; Kurabayashi y Ueshima, 2000b). Sin embargo, en todos los genomas mitocondriales de heterobranquios excepto en el de *R. europaea*, las bases no emparejadas se corresponden con solapamientos del extremo 3' de esos ARNst con los genes adyacentes.

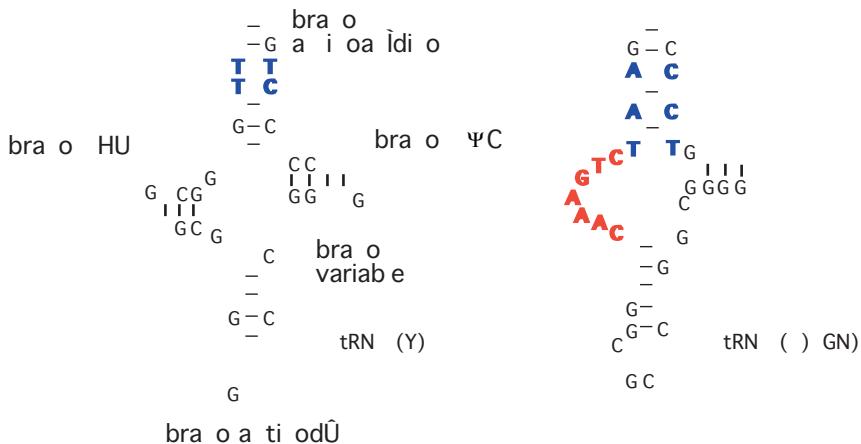


Fig. IV.1. Estructura secundaria de los genes *trnY* y *trnS(agn)* deducida de la secuencia completa del genoma mitocondrial de *R. europaea*. En rojo se indican las bases nucleotídicas del gen *trnS(agn)* que no forman el brazo de dihidrouridina (DHU). En azul se indican las bases no emparejadas en el brazo aminoacídico.

centes a ellos. Para estos ARNst se ha descrito un modo de procesamiento único por el cual se eliminan los nucleótidos del extremo 3' que no se emparejan correctamente y se añaden residuos A (poliadenilización) (Yokobori y Pääbo, 1995). En el genoma de *R. europaea* no existe el solapamiento entre esos genes. Una hipótesis alternativa al modo de procesamiento de los ARNst que podría darse en *R. europaea* sería la corrección de las bases mal emparejadas después de la transcripción mediante reemplazamiento (Yokobori y Pääbo, 1995). Por lo tanto, las modificaciones sobre el esquema general de procesamiento de los ARNst podrían caracterizar a los genomas mitocondriales de los heterobranquios.

Los ARNst del genoma mitocondrial de *R. europaea* se encuentran intercalados entre los genes codificantes para proteínas y los ARNsrs, excepto entre los genes *nad6-nad5-nad1* y entre *nad4L-cob*. Se ha hipotetizado acerca de la importancia de la estructura secundaria de los ARNst para señalizar los puntos de corte de las enzimas encargadas de procesar el ARN transcripto policistrónico, y de ahí su localización intergénica (Battey y Clayton, 1980; Ojala *et al.*, 1981). Para los puntos intergénicos en los que no se ha encontrado un ARNt en el genoma de *R. europaea* (con la excepción de *nad5-nad1*), se han encontrado estructuras secundarias "stem-loop" que podrían tener la misma función (Boore y Brown, 1994).

En la mayoría de los genomas mitocondriales de los metazoos, la zona no codificante de mayor tamaño es la que contiene la señal de inicio de la transcripción y replicación, por lo que se le denomina región control (Wolstenholme, 1992). Según los resultados de esta tesis, la región control del genoma mitocondrial de *R. euro-*

paea podría encontrarse entre los genes *cox3* y *trnI*. Esta hipótesis está sustentada por: 1) el alto contenido en A+T (87%) de esta zona, 2) su capacidad para formar una estructura secundaria a modo de horquilla y 3) el hecho de que la región control del opistobranquio *P. strigosa* se ha localizado entre los mismos genes. Las dos primeras características son típicas de la región control de invertebrados (Clary y Wolstenholme, 1985) y se encuentran también en los genomas mitocondriales de los heterobranquios descritos hasta la fecha (Hatzoglou *et al.*, 1995; Terrett *et al.*, 1996; Yamazaki *et al.*, 1997; Kurabayashi y Ueshima, 2000a).

Otro tipo de información relevante que puede aportar la secuenciación completa de un genoma mitocondrial es la referente a la ordenación de los genes par a los que codifica. Cada vez es más frecuente en la literatura encontrar trabajos en los que se emplea el orden génico como un carácter molecular robusto para inferir, mediante su comparación, las relaciones filogenéticas entre div ersos grupos. Este carácter presenta varias ventajas con respecto a la inferencia filogenética basada en secuencias génicas. En primer lugar, los genes mitocondriales son secuencias homólogas presentes en todos los organismos (Boore y Brown, 1998; Boore, 1999), lo que permite hacer comparaciones a todos los niveles taxonómicos. Además, el nivel de homoplasia es muy bajo, ya que es muy improbable que se produzca de manera independiente la misma ordenación génica en más de un genoma mitocondrial, debido al gran número de posibles combinaciones entre los genes. Finalmente, mientras que las secuencias de los genes mitocondriales cambian de maner a más o menos rápida a lo largo del tiempo , su ordenación puede mantenerse sin cambios dur ante largos períodos de tiempo a escalas evolutivas (Boore y Brown, 1998; Boore, 1999).

Se han descrito varios mecanismos por medio de los cuales se producen cambios en el orden génico (Boore y Brown, 1998; Rawlings *et al.*, 2003). El más común implica una duplicación de una parte del genoma mitocondrial por un error en el emparejamiento de las bases o en la terminación de la replicación. P osteriormente, se produce la pérdida por delección de una de las copias duplicadas. Para que se produzca esa pérdida, hay un proceso por el cual se genera en primer lugar un pseudogen y, posteriormente, se continúa la degeneración hasta que no quedan vestigios del gen. Dependiendo de cuál sea la copia que se pierda, la ordenación original puede mantenerse o perderse. Otros mecanismos propuestos implican errores poco frecuentes en las enzimas responsables de cortar los ARNst en el procesamiento del transcripto primario o en topoisomerasas que pueden producir recombinaciones. Sin embargo, otros mecanismos aún no descritos deben estar in volucrados en las tras-

posiciones de genes a posiciones alejadas de la original (Boore y Brown, 1998). Un hecho ampliamente descrito en la literatura es la mayor frecuencia de las transposiciones de ARNst en comparación con las de los genes que codifican para proteínas o para los ARNs r y, de hecho, se ha propuesto que su estructura secundaria podría facilitar su movilidad en el genoma mitocondrial (Stanton *et al.*, 1994; Saccone *et al.*, 1999).

El orden de los genes mitocondriales de *R. europaea* es casi idéntico al observado en el del opistobranquio *P. strigosa*. Tan sólo se diferencian en la posición del *trnC*. Los resultados de esta tesis corroboran la hipótesis que plantea la existencia de un orden génico común para los heterobranquios claramente diferenciado del que presentan los gasterópodos primitivos (antiguos prosobranquios) (Boore *et al.*, 1995; Hatzoglou *et al.*, 1995; Terrett *et al.*, 1996; Yamazaki *et al.*, 1997; Wilding *et al.*, 1999; Kurabayashi y Ueshima, 2000a; Kurabayashi y Ueshima, 2000b). Cuando se compara el orden génico de los genomas mitocondriales de los heterobranquios secuenciados hasta la fecha, puede verse que tan sólo se diferencian entre sí en la posición de algún ARNt. En cambio, cuando se compara el modelo tipo de ordenación génica para heterobranquios con el de caenogasterópodos, pueden observarse reordenaciones drásticas tanto de ARNst como de genes que codifican para proteínas o de ARNs r. Por otra parte, el orden génico de los caenogasterópodos secuenciados hasta la fecha es muy parecido al del celalópodo *L. bleekeri* (Boore *et al.*, 1995; Sasuga *et al.*, 1999; Wilding *et al.*, 1999). Por lo tanto, puede decirse que la ordenación presente en los caenogasterópodos representa la ordenación primitiva frente a la de los heterobranquios, que representa el estado derivado. Este estado derivado no se encuentra en ningún otro metazoóido secuenciado hasta el momento, así que el modo de ordenación génica mitocondrial puede ser considerado como una sinapomorfía para Heterobranchia. Todos estos datos indican la existencia de períodos estacionales (como por ejemplo, el período posterior a la aparición del clado Heterobranchia), en contraposición con otros períodos de mayor actividad de reordenación génica (en los antecesores de Heterobranchia). Por ello, no es posible establecer ningún tipo de reloj molecular para la reordenación génica (Boore, 1999).

IV.2.- ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

IV.2.1.- Comparación de las metodologías empleadas y los resultados obtenidos en los diferentes análisis filogenéticos

Los diferentes análisis filogenéticos realizados en esta tesis han proporcionado hipótesis evolutivas para Euthyneura consistentes y robustas. Los diferentes tipos de datos de secuencias y de metodologías empleadas han permitido comparar árboles congruentes entre sí, de manera que se han podido establecer relaciones filogenéticas a diferentes niveles taxonómicos dentro de Euthyneura. Los datos del ADN mitocondrial han contribuido a aclarar en parte tanto las relaciones filogenéticas entre Heterostropha, Opisthobranchia y Pulmonata, como las relaciones entre los principales linajes evolutivos dentro de Opisthobranchia.

Las filogenias presentadas en esta tesis se han basado en los análisis de tres tipos de datos: 1) las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de los genes codificantes de proteínas de los genomas mitocondriales completos de los gasterópodos secuenciados hasta el momento, 2) las secuencias nucleotídicas de un fragmento de genoma mitocondrial que incluye los genes *rrnL*, *cox1*, *nad6* y *nad5* para representantes de los principales linajes evolutivos dentro de Euthyneura y 3) las secuencias nucleotídicas de un fragmento de genoma mitocondrial que incluye los genes *rrnL* y *cox1* para un número mayor de representantes de Euthyneura (principalmente de opistobranquios).

La divergencia existente entre las secuencias de aminoácidos de todos los genes codificantes de proteínas presentes en el genoma mitocondrial de un representante del linaje más primitivo (*P. strigosa*) dentro de los opistobranquios con respecto a un representante del linaje más derivado (*R. europaea*) ha resultado ser muy pequeña (casi la mitad que la encontrada entre los pulmonados estilomatíforos *Cepaea* y *Albinaria*) y sugiere una estrecha relación entre ambos linajes. Todos los métodos de inferencia filogenética (ME, MP, ML y BI) empleados en los análisis de las secuencias aminoacídicas deducidas a partir de todos los genes codificantes de proteínas de los genomas mitocondriales completos de los gasterópodos secuenciados hasta el momento han obtenido estos dos linajes de opistobranquios (primitivo y derivado) como grupos hermanos (*Pupa* + *Robostra*). Estos análisis se han basado en la secuencia de aminoácidos, y no en la secuencia nucleotídica de los genes, con la intención de minimizar el efecto de la satélite.

ración que pudiera existir en las secuencias. En los análisis de los genomas mitocondriales en los que además se ha incluido el genoma incompleto del caenogasterópodo *Littorina saxatilis*, se han obtenido idénticos resultados.

Estos resultados son congruentes con los obtenidos en el resto de análisis filogenéticos llevados a cabo en esta tesis, en los que se ha ampliado el número y la diversidad taxonómica de los gasterópodos considerados. Se ha elegido BI como método de inferencia filogenética para el análisis del fragmento mitocondrial que incluye los genes *rrnL*, *cox1*, *nad6* y *nad5*, debido a que esta metodología permite combinar secuencias de aminoácidos con secuencias de nucleótidos en un mismo análisis y ha proporcionado árboles con mayor resolución. Así, para el análisis bayesiano se han inferido las secuencias de aminoácidos para los genes codificantes de proteínas *cox1*, *nad6* y *nad5* (debido a la existencia de saturación en las secuencias de nucleótidos de dichos genes) y se han analizado junto con la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para el ARNr *rrnL*. Se han realizado también análisis de MP y ME basados en las secuencias de aminoácidos de los genes *cox1*, *nad6* y *nad5* (sin considerar las secuencias de nucleótidos del gen *rrnL*). MP y ME han proporcionado sendos árboles en los que los nodos terminales tienen una resolución menor que el árbol resultante del análisis bayesiano. Sin embargo, en los nodos basales los resultados con las tres metodologías (BI, MP y ME) son idénticos y tienen altos valores de apoyo estadístico. Estos nodos basales sitúan la posición del heterostrofo *Pyramidella dolabrata* dentro de Euthyneura, apoyan la hipótesis de la polifilia de Pulmonata y la inclusión de *Siphonaria pectinata* dentro de Opisthobranchia.

Como en el caso anterior, el análisis mixto para un número mayor de representantes de Euthyneura basado en las secuencias nucleotídicas del gen *rrnL* y en las secuencias de aminoácidos del gen *cox1* realizados con BI, ha producido hipótesis filogenéticas con una mayor resolución en los nodos terminales que los de los análisis de MP y ML basados en las secuencias de nucleótidos de ambos genes. En la topología obtenida por MP, ML y BI (aunque ML no tiene suficiente apoyo estadístico en algunos nodos), de nuevo el heterostrofo *Pyramidella dolabrata* resulta dentro de Euthyneura, los pulmonados son un grupo polifilético y el pulmonado *Siphonaria pectinata* queda dentro de Opisthobranchia, entre otros resultados.

IV.2.2.- Valor de los RGCs en la inferencia filogenética de Heterobranchia

En esta tesis se ha abordado el estudio de tres RGCs ("r are genomic changes") para la reconstrucción de la historia evolutiva de Heterobranchia: reordenaciones de los genes codificantes para ARNst en el genoma mitocondrial, eventos de inserción y delección en la secuencia del gen mitocondrial *cox1* y cambios en la estructura secundaria del gen mitocondrial *rrnL*.

Como se ha explicado con anterioridad, la ordenación génica está muy conservada dentro de Heterobranchia, con sólo pequeñas variaciones en la posición de algunos ARNst. Por lo tanto, el hecho de que el gen *trnP* tenga diferentes posiciones relativas en diversos grupos dentro de Heterobranchia ha sugerido la importancia de su uso como marcador filogenético. Así, la ordenación génica *rrnL*, *trnL(cun)*, *trnA*, *trnP*, *nad6* y *nad5* caracteriza el linaje Opisthobranchia + *Siphonaria* + *Onchidella* + *Pyramidella*. En el futuro, será necesario examinar la posición del gen *trnP* en otros grupos de heterostrofos con el fin de determinar si la posición del gen *trnP* entre los genes *trnA* y *nad6* representa una sinapomorfía del grupo antes mencionado o por el contrario es el estado ancestral de Heterobranchia.

La presencia de la inserción de un aminoácido Glicina en la posición 46 (de acuerdo con *R. europaea*) del gen *cox1* en Opisthobranchia y *Siphonaria* apoya la hipótesis de una estrecha relación evolutiva entre ambos grupos. El hecho de que este aminoácido esté presente en el heterostrofo *Cornirostra* (Valvatoidea), pero no se halle en el heterostrofo *Pyramidella* (Pyramidelloidea) también apoya la hipótesis de parafilia para Heterostropha.

Finalmente, la presencia de la estructura "stem-loop" en el dominio III del gen *rrnL* en Pleurobranchoidea y Nudibranchia apoya la monofilia de Nudipleura (ver más adelante la discusión sobre dicha monofilia). El hecho de que Nudipleura cuenta con esta estructura en su gen *rrnL* es significativo, ya que esta estructura no se ha encontrado hasta el momento en ningún otro linaje dentro de Heterobranchia.

La información filogenética proporcionada por los RGCs es complementaria a la obtenida en el análisis filogenético basado en la secuencia primaria de los genes mitocondriales, explicada con anterioridad. La independencia de estas dos fuentes de información apoya los resultados obtenidos. Por lo tanto, la congruencia y robustez de los resultados de esta tesis en los diferentes análisis filogenéticos han permitido la discusión y el planteamiento de algunas hipótesis consistentes acerca de la

historia evolutiva de este diverso grupo de gasterópodos derivados, que se explican con mayor detalle en los siguientes apartados. Del mismo modo también se ha podido establecer la clasificación para Euthyneura que se indica en el apéndice 1 de esta tesis. En el apéndice 2 se indican las especies de eutineuros empleadas en este estudio según la clasificación propuesta en el apéndice 1.

IV.2.3.- Posición filogenética de Pyramidellidae

Todos los análisis filogenéticos realizados en esta tesis sitúan al heterostrofo *Pyramidella dolabrata* dentro de Euthyneura con altos valores de significación estadística (Figura IV.2). La posición filogenética de los piramidélidos dentro de los gasterópodos ha sido tema de debate durante el último siglo, aunque finalmente Haszprunar (1985b) los ha incluido dentro de Allogastropoda, posteriormente denominado Heterostropha por Ponder y Warén (1988), grupo hermano de Euthyneura. Con anterioridad al trabajo de Haszprunar, otros autores los han considerado como prosobranquios (Thiele, 1931; Franc, 1968; Golikov y Starobogatov, 1975) o como opistobranquios (Pelseneer, 1899; Fretter y Graham, 1949; Taylor y Sohl, 1962; Hyman, 1967; Thompson, 1976) según diferentes criterios.

Thiele (1931) definió el grupo Aglossa para incluir a los piramidélidos junto con otras familias de prosobranquios (Aclididae, Melanellidae, Stiliferidae y Entoconchidae) en base a la ausencia de rádula (de ahí el nombre del grupo), de mandíbulas y del modo de vida parasitario. Posteriormente, Fretter y Graham (1949) realizaron un exhaustivo estudio morfológico del grupo y presentaron diversas semejanzas entre piramidélidos y opistobranquios. Sin embargo, su trabajo fue

discutido por Gosliner (1981), que rebatió cada uno de los argumentos en los que los autores británicos se basaron para relacionar ambos grupos. Por ejemplo, Fretter y Graham (1949) consideraron que la concha heterostrófica con un gran diente columelar presente en los piramidélidos es homólogo

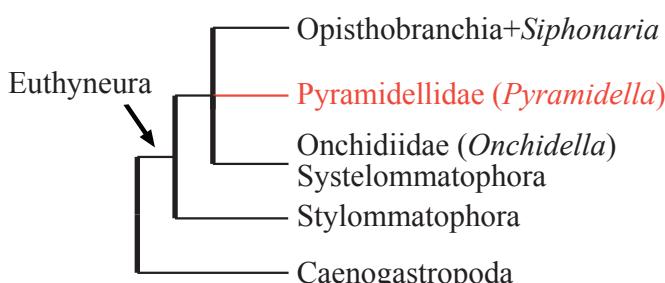


Fig. IV.2. Cladograma reducido que resume los resultados obtenidos en esta tesis. Los nodos que se muestran son estadísticamente robustos en las diferentes metodologías empleadas. En rojo se marca la posición filogenética de Pyramidellidae.

ga a la que se encuentran en algunos grupos primitivos de opistobranquios, como Ringiculidae, Acteonidae y Diaphanidae. Sin embargo, Gosliner (1981) apuntó que tanto la concha heterostrófica como el diente columelar patente (carácter este último que además no cumplen algunos piramidélidos, como *Turbanilla*) están también presentes en algunos grupos de caenogasterópodos (por ejemplo, Cancellariidae y Marginellidae) y pulmonados (por ejemplo, Ellobiidae). Fretter y Graham (1949) también consideraron la presencia de bandas ciliadas en la cavidad del manto como un carácter común entre piramidélidos y opistobranquios primitivos. Sin embargo, estos cilios también están presentes en los heterostrofos de la familia Architectonicidae y del género *Omalogyra* (Robertson, 1974), y en los pulmonados primitivos *Siphonaria* (Marcus y Marcus, 1961), *Amphibola* (Hubendick, 1945) y *Chilina* (Harry, 1964). Asimismo, según Fretter y Graham (1949) la posición del riñón ha sufrido un desplazamiento a la parte anterior del cuerpo en piramidélidos y opistobranquios. Sin embargo, en otros heterostrofos como *Omalogyra* o *Rissoella* también tiene una localización similar (Gosliner, 1981). La existencia de una glandula pigmentaria marrón-rojiza en el manto podría ser una característica común a ambos grupos (Fretter y Graham, 1949), pero no se ha comprobado su homología (Gosliner, 1981). El hecho de que tanto piramidélidos como opistobranquios sean hermafroditas simultáneos también ha sido considerado como un carácter unitario (Fretter y Graham, 1949). Sin embargo, otros grupos de heterostrofos como Architectonicidae, *Omalogyra*, *Valvata* y *Rissoella*, así como los pulmonados, también poseen un hermafrotitismo simultáneo.

Otro carácter muy discutido es la condición eutínea presente en ambos grupos. Todos los datos morfológicos apuntan a que este carácter se ha adquirido de manera independiente en piramidélidos y en opistobranquios. Mientras que en opistobranquios la condición eutínea se ha adquirido gracias a la detorsión, la de los piramidélidos es el resultado de un acortamiento de los cordones nerviosos longitudinales laterales (Gosliner, 1981).

A pesar de todas estas diferencias, trabajos posteriores a los estudios de Fretter y Graham (1949) sobre la morfología de la larva veligera, el sistema nervioso, la morfología de los espermatoides y la estructura del osfradio encontraron semejanzas entre piramidélidos y opistobranquios (Thorson, 1946; Thompson, 1973; Haszprunar, 1985b; Huber, 1987; Healy, 1988). De entre ellas, cabe destacar la presencia en ambos grupos de un nervio que sale del ganglio cerebral y que se denomina nervio rinofórico. Este nervio es exclusivo de piramidélidos y opistobranquios.

Aunque todos estos caracteres (al igual que los resultados de esta tesis) apoyan una estrecha similitud entre piramidélidos y opistobranquios, ambos grupos se han mantenido independientes de manera formal por diversos autores (Robertson, 1974; Gosliner, 1981; Haszprunar, 1985c; Robertson, 1985; Salvini-Plawen y Haszprunar, 1987; Haszprunar, 1988a). Nuestros resultados sugieren una revisión de la posición filogenética de *Pyramidella*, en relación con otros heterobranquios basales.

IV.2.4.- Posición filogenética de Onchidiidae

Todos los análisis filogenéticos llevados a cabo en esta tesis relacionan al sistematóforo *Onchidella celtica* con opistobranquios y *Pyramidella* con altos valores de significación estadística. Por lo tanto, su posición rompe la monofilia de los pulmonados (Figura IV.3). La posición filogenética de Onchidiidae ha sido muy discutida a lo largo de los últimos años por diversos autores, que los han descrito como opistobranquios (Fretter, 1943; Boettger, 1954), como pulmonados (Solem, 1959; Ghiselin, 1966; Haszprunar y Huber, 1990) o como un grupo independiente (Gymnomorpha) situado en una posición intermedia entre ambos (Salvini-Plawen, 1970).

Todos los argumentos morfológicos propuestos a favor de una inclusión de Onchidiidae en Opisthobranchia han sido rebatidos en la actualidad (Ghiselin, 1966; Salvini-Plawen, 1970; Gosliner, 1981; Tillier, 1984). Por ejemplo, el hecho de que la cavidad del manto se sitúe en una posición posterior y que la aurícula esté detrás del ventrículo ha sido considerado como un carácter común a onquídidos y opistobranquios (Fretter, 1943). Sin embargo, Ghiselin (1966) ha propuesto que en Onchidiidae esta posición es el resultado del desplazamiento del aparato respiratorio a la parte posterior del cuerpo. La reducción a tres pares de ganglios en el bucle visceral también ha sido considerada por Fretter (1943) como un carácter compartido por ambos grupos. Sin embargo, esta reducción también se encuentra en otros grupos de pulmonados, como en *Amphibola*.

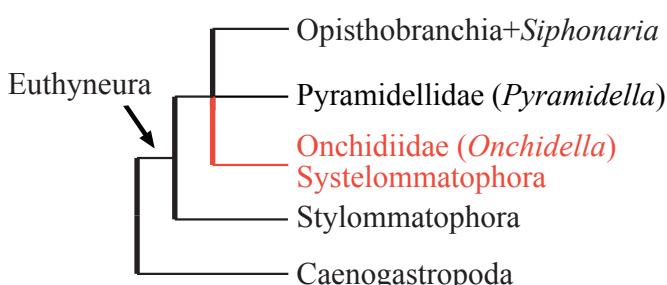


Fig. IV.3. Cladograma reducido que resume los resultados obtenidos en esta tesis. Los nodos que se muestran son estadísticamente robustos en las diferentes metodologías empleadas. En rojo se marca la posición filogenética de Onchidiidae.

Por otra parte, la forma y disposición del aparato reproductor de Onchidiidae es similar a la que se encuentra en el resto de pulmonados. Ambos grupos comparten la presencia de unas góndolas compactas, una separación del conducto espermático, por una parte en la "ampulla" y, por otra, en una zona para el almacenamiento del esperma, la reducción del receptáculo seminal, el tipo de próstata, la presencia de una glándula del albumen bien diferenciada y una separación del vaso deferente del gonoducto paleal (Ghiselin, 1966; Gosliner, 1981). En cuanto al sistema nervioso, también pueden encontrarse semejanzas entre ambos grupos, como por ejemplo el hecho de que los ganglios del sistema nervioso central tiendan a fusionarse en la parte inferior del esófago (Ghiselin, 1966) y que, tanto en pulmonados como en onquídidos, no esté presente el nervio del rinofórico (que se localiza de manera exclusiva en opistobranquios y piramidélidos).

Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis apoyan la hipótesis de Salvini-Plawen (1970), que separa Onchidiidae del resto de pulmonados y los incluye dentro de Gymnomorpha, un grupo con una posición filogenética intermedia entre pulmonados y opistobranquios. Según este autor, Gymnomorpha se caracteriza porque la superficie dorsal del cuerpo forma un noto sin escudocefálico, mientras que la superficie ventral está formada por un hiponoto que rodea la parte inferior del pie. Además, las aperturas de los orificios de los aparatos digestivo, respiratorio y reproductivo se encuentran en el hiponoto. Estas características de la morfología externa pueden encontrarse tanto en opistobranquios (nudibranquios) como en algunos pulmonados (estilomatóforos) (Tillier, 1984).

IV.2.5.- Posición filogenética de Siphonariidae

Todos los árboles filogenéticos inferidos en base al ADN mitocondrial presentados en esta tesis sitúan al basomatóforo *Siphonaria pectinata* dentro de Opistobranchia. De nuevo, estos resultados rechazan la monofilia de los pulmonados (Figura IV.4). La posición de Siphonariidae dentro de los gasterópodos ha variado según los puntos de vista de diferentes autores. Los miembros de este grupo de gasterópodos marinos pateliformes fueron incluidos dentro de Opistobranchia en base a datos morfológicos (Köhler, 1893), aunque con posterioridad han sido considerados como pulmonados. Sin embargo, su situación dentro de los pulmonados también ha sido motivo de discrepancia entre diversos autores (Tillier, 1984; Haszprunar y Huber, 1990; Nordsieck, 1992; Wade y Mordan, 2000; Yoon y Kim, 2000; Dutra-Clarke *et al.*, 2001).

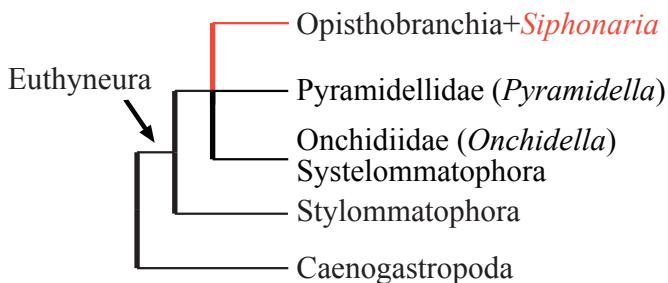


Fig. IV.4. Cladograma reducido que resume los resultados obtenidos en esta tesis. Los nodos que se muestran son estadísticamente robustos en las diferentes metodologías empleadas. En rojo se marca la posición filogenética de Siphonariidae.

Tillier (1984) describe Siphonariidae como pulmonados primitivos y los incluye junto con el resto de pulmonados marinos en un grupo denominado Archaeopulmonata. Sin embargo, Haszprunar y Huber (1990), basándose principalmente en estudios del sistema nervioso, incluyen a Siphonariidae,

junto con otros pulmonados de agua dulce, dentro de Basommatophora, al comparar ambos grupos algunos caracteres, como la presencia en el procerebro de células exclusivamente grandes, ausencia de un pneumostoma contráctil y presencia de osfradio y de filas ciliares en la cavidad del manto. Nordsieck (1992) los mantiene dentro de Basommatophora, pero los relaciona con otro grupo de pulmonados marinos (Amphibolidae), ya que comparten la presencia de un aparato genital monoálico adquirido de manera secundaria.

Los estudios moleculares en los que se han incluido representantes de Siphonariidae se han basado en genes nucleares y han obtenido relaciones contradictorias entre sí y con respecto a las obtenidas con datos morfológicos. Así, según los análisis basados en secuencias del gen nuclear 18S ARNr, los basomatóforos no son monofiléticos, ya que quedan separados en dos grupos bien diferenciados: por un lado, los basomatóforos marinos (Siphonariidae), que están más estrechamente relacionados con opistobranquios y systelomatóforos (hipótesis corroborada con los resultados presentados en esta tesis), y por otra parte los basomatóforos de agua dulce, que están relacionados con los estilomatóforos (Dutra-Clarke *et al.*, 2001). Por otra parte, los estudios basados en el fragmento nuclear que incluye los genes 5,8S ADNr, ITS-2 y 28S ARNr obtienen la monofilia de los pulmonados, con *Siphonaria* como grupo hermano del resto de pulmonados (Wade y Mordan, 2000). Finalmente, los análisis basados en un fragmento corto del gen mitocondrial cox1, recientemente publicados, obtienen también a *Siphonaria* dentro de los opistobranquios, aunque el nodo que lo sustenta no tiene soporte estadístico suficiente (Remigio y Hebert, 2003).

Según todo lo expuesto anteriormente, es evidente que existe gran discrepancia en la literatura acerca de la posición filogenética de Siphonariidae. Nuestros

datos apoyan la relación entre Siphonariidae y Opisthobranchia, aunque debe llevarse a cabo una exhaustiva revisión morfológica para establecer los caracteres homólogos entre ambos grupos y las sinapomorfías que los sustentan.

IV.2.6.- Posición filogenética de Stylommatophora

Los resultados obtenidos en esta tesis apoyan la monofilia del grupo de pulmonados Stylommatophora (Figura IV.5). Este hecho corrobora todos los datos presentados con anterioridad en la literatura, y es uno de los pocos puntos acerca de la historia evolutiva de los gasterópodos en los que hay un acuerdo absoluto entre diferentes autores. Tanto los datos morfológicos como los moleculares obtienen un origen único para el grupo y una posterior diversificación, unida a un gran éxito evolutivo en el ambiente terrestre (Nordsieck, 1992; Rosenberg *et al.*, 1994; Tillier *et al.*, 1994; Salvini-Plawen y Steiner, 1996; Tillier *et al.*, 1996; Rosenberg *et al.*, 1997; Wade *et al.*, 2001; Dayrat y Tillier, 2002). Precisamente, asociada a la colonización del medio terrestre y posterior diversificación, han surgido una gran cantidad de novedades morfológicas en el grupo con respecto al resto de pulmonados. De entre las sinapomorfías morfológicas del grupo destacan la modificación de parte de los palpos labiales en tentáculos labiales, una glándula anal reducida, la presencia de una comisura subcerebral y de un procerebro de gran tamaño, más o menos fusionado con el ganglio cerebral, un estómago muscular, los tentáculos retráctiles, la posición de los ojos en el extremo de los tentáculos, la presencia de huevos sin chalaza (cordón mucoso que mantiene unidos a los huevos) y órganos excretores con uréter (Robertson, 1985; Nordsieck, 1992; Salvini-Plawen y Steiner, 1996).

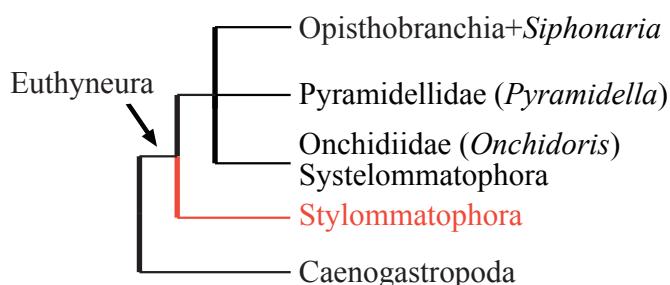


Fig. IV.5. Cladograma reducido que resume los resultados obtenidos en esta tesis. Los nodos que se muestran son estadísticamente robustos en las diferentes metodologías empleadas. En rojo se marca la posición filogenética de Stylommatophora.

De los resultados de esta tesis se deducen nuevos datos acerca de la historia evolutiva de Stylommatophora. Su posición basal dentro de Euthyneura en todas las filogenias inferidas en este trabajo sugiere que uno de los eventos más trascendentales en la historia evolutiva del grupo, la coloniza-

ción del medio terrestre llevada a cabo por los estilomatóforos, ocurrió en una etapa temprana. Este resultado contradice las hipótesis previas basadas en datos morfológicos, en las que se ha considerado a *Stylophora* como la rama más derivada dentro de los pulmonados (Nordsieck, 1992; Dayrat y Tillier, 2002). La inclusión de taxones de pulmonados dulceacuícolas (como *Amphiboloidea* y *Lymnaeoidea*) en futuros análisis filogenéticos basados en ADN mitocondrial, así como un completo estudio del registro fósil podrían ayudar a esclarecer las etapas de diversificación ecológica por las que han atravesado los diversos grupos de pulmonados. Con los datos obtenidos en esta tesis, no puede afirmarse que la colonización del medio terrestre se haya producido desde un ancestro marino, o bien desde un ancestro dulceacuícola.

IV.2.7.- Relaciones evolutivas dentro de Opistobranchia

Todos los análisis realizados en esta tesis sitúan al sacoglos *Ascobulla fragilis* como el opistobranquio más basal de todos los considerados en el estudio. Esta posición basal concuerda con diversos caracteres primitivos de su morfología, como la presencia de una concha externa, de un escudocefálico y de un plicatidium como estructura respiratoria (Schmekel, 1985; Jensen, 1996; Mikkelsen, 1996). Por otro lado, los resultados de otros análisis filogenéticos basados tanto en datos morfológicos como en datos moleculares sitúan a *Acteon* o *Ringicula* (no representados en este estudio) como las líneas más primitivas dentro de los opistobranquios (Ghiselin, 1966; Salvini-Plawen y Steiner, 1996; Thollesson, 1999b; Mikkelsen, 2002). En concreto, se han descrito similitudes entre *Acteon* y los piramidélidos en caracteres de la concha, opérculo, rádula, sistema nervioso, la posición de los ojos, así como la presencia en ambos grupos (y sólo en ellos dentro de los heterobranquios) de células granulares en la hemolinfa (Thiele, 1931; Yonow y Renwrantz, 1986; Mikkelsen, 2002). En el futuro, deberán incluirse en los análisis filogenéticos basados en ADN mitocondrial representantes de estos taxones para corroborar o refutar esta hipótesis y situar el origen de los opistobranquios.

Debido a que no se ha incluido en este estudio ningún otro linaje de sacoglosos, no puede comprobarse su monofilia comúnmente aceptada (e.g. (Jensen, 1996), que sugiere que estos opistobranquios constituyen un grupo natural, muy diferenciado del resto, con diversas apomorfías y con una gran uniformidad ecológica. Queda por aclarar cual es el posible grupo hermano de los sacoglosos, ya que en

los análisis realizados en esta tesis no hay ningún representante de los grupos propuestos en las dos hipótesis al respecto presentadas hasta el momento: una de ellas sugería a los acochlidaceos (Gosliner y Ghiselin, 1984) y la otra a los cefalaspídeos de la familia Diaphanidae (Marcus y Marcus, 1956; Thompson, 1976; Salvini-Plawen, 1990; Jensen, 1996). Estos taxones, al igual que más representantes sacoglosos, deben incluirse en futuros análisis para delimitar el origen y la monofilia del grupo.

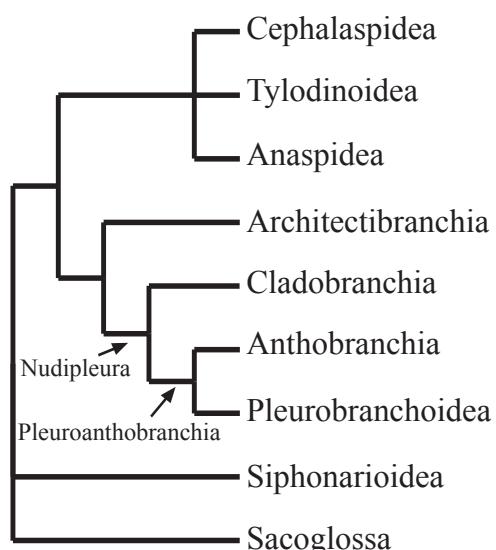


Fig. IV.6. Cladograma reducido que resume los resultados obtenidos en esta tesis dentro de Opistobranchia. Los nodos que se muestran son estadísticamente robustos en las diferentes metodologías empleadas.

basada en datos del sistema reproductor (Eliot, 1910). Posteriormente, Ghiselin (1966) también incluyó en esa relación a Tylodinoidea y Pleurobranchoidea. A continuación se detallan algunos aspectos acerca de la historia evolutiva de cada uno de estos grupos de opistobranquios.

Los resultados presentados en esta tesis apoyan la monofilia de Cephalaspidea s.s. y la diferenciación de tres linajes dentro del grupo: Bulloidea (*Haminoea*), Philinoidea (*Philine* y *Chelidonura*) y Runcinoidea (*Runcina*). Estos resultados corroboran estudios previos en los que la monofilia de Cephalaspidea está sustentada por caracteres morfológicos, como la presencia de tres placas en la molleja (que ayudan a la trituración del alimento) y de filas de cilios con una curvatura cerca de la apertura lateral del manto (para favorecer la circulación del agua dentro de la cavidad del

Con referencia al resto de opistobranquios considerados en esta tesis, se pueden establecer , según los resultados obtenidos, dos líneas evolutivas divergentes y bien diferenciadas: una constituida por Cephalaspidea, Anaspidea y Tylodinoidea y otra formada por Architectibranchia y Nudipleura (Figura IV.6). La relación estrecha entre Anaspidea y Cephalaspidea ya había sido propuesta por estudios morfológicos y moleculares previos (Mikkelsen, 1996; Thollesson, 1999b; Dayrat y Tillier, 2002). También ha sido descrita con anterioridad la relación entre Architectibranchia y Nudibranchia

manto) (Ghiselin, 1966; Mikkelsen, 1996; Mikkelsen, 2002). Por su parte, Bulloidea se caracteriza por la presencia de un bulbo para el almacenamiento del autoesperma al final del órgano copulatorio céfálico y porque los miembros que lo componen son herbívoros (Mikkelsen, 1996; Mikkelsen, 2002). Philinoidea también es considerado monofilético, según los datos morfológicos que se poseen por el momento. Se trata de animales carnívoros, en los que las placas de la molleja carecen de espinas y que poseen un diente raquídico dentado (Mikkelsen, 1996; Mikkelsen, 2002). Sin embargo, la inclusión de Runcinoidea dentro de Cephalaspidea no ha sido claramente apoyada en la literatura. Así, estos diminutos opistobranquios han sido considerados como un grupo independiente de Cephalaspidea y sin relación clara dentro de Opisthobranchia (Odhner, 1968), como un grupo relacionado con Pleurobranchidae y Tylodinoidea (Pelseneer, 1894) o, finalmente (como corroboran los resultados de esta tesis), como un grupo dentro de Cephalaspidea, según datos del sistema nervioso y reproductor (Ghiselin, 1966; Thompson, 1976; Kress, 1977; Schmekel, 1985).

Los resultados obtenidos apoyan orígenes diferentes para Architectibranchia y Cephalaspidea. Architectibranchia ha estado tradicionalmente incluido dentro de Cephalaspidea, aunque estudios posteriores han demostrado que no existe ninguna sinapomorfía para ambos (Mikkelsen, 1996; Mikkelsen, 2002). Los dos representantes de Architectibranchia considerados en esta tesis (*Pupa* y *Micromelo*) se agrupan en un mismo clado como grupos hermanos. Por lo tanto, estos resultados apoyan la monofilia de Architectibranchia. Los estudios de Mikkelsen (1996, 2002) proponen la parafilia de Architectibranchia, definido como un grupo sin sinapomorfías compuesto por taxones basales que no tienen una ubicación clara en ningún lugar concreto dentro de Opisthobranchia. En futuros análisis deben incluirse más representantes de este grupo (como *Acteon*, miembros de Ringiculidae y de Diaphanidae) para evaluar esta hipótesis.

Los miembros de Anaspidea considerados en este trabajo se agrupan entre sí formando un grupo monofilético con altos valores de significación estadística en todos los análisis realizados. Estos resultados concuerdan con los datos presentes en la literatura, que definen a Anaspidea como un grupo bien delimitado, cuya monofilia ha sido apoyada por datos morfológicos (Schmekel, 1985; Mikkelsen, 1996; Mikkelsen, 2002) y moleculares (Thollesson, 1999b; Medina y Walsh, 2000). Las sinapomorfías del grupo se basan en caracteres morfológicos del sistema digestivo (con la presencia de una cámara entre la molleja y el estómago), del sistema nervioso, de los espermatozooides y del desarrollo de la larva (Mikkelsen, 2002).

Los resultados obtenidos en este trabajo obtienen orígenes evolutivos totalmente diferentes para Tylodinoidea y Pleurobranchoidea. Mientras que el primer grupo está más relacionado con Cephalaspidea y Anaspidea, el segundo se relaciona con Nudibranchia en todos los árboles inferidos (Figura IV.6). Tylodinoidea y Pleurobranchoidea han sido tradicionalmente considerados como grupos hermanos englobados dentro de Notaspidea, nombre que sigue usándose por diversos autores en trabajos recientes (Willan, 1987; Rudman y Willan, 1998; Thollesson, 1999b; Mikkelsen, 2002). Willan (1987) realizó un análisis sistemático de Notaspidea basado en datos morfológicos y concluyó que los notaspídeos eran monofiléticos y que habrían sufrido una temprana y rápida divergencia en su historia evolutiva dando lugar a Tylodinoidea y Pleurobranchoidea. Este autor definió varias sinapomorfías que sustentaban a los notaspídeos, como son la presencia de rinóforos con una hendidura longitudinal, una amplia prolongación a modo de velo entre los tentáculos orales, la localización lateral de las branquias bipinnadas y la posición del ano en la parte posterior de las branquias. Sin embargo, en este análisis sólo se incluyeron representantes de Notaspidea (tanto de Tylodinoidea como de Pleurobranchoidea) sin utilización de grupo externo ni de ningún otro opistobranquio. Por lo tanto, las conclusiones acerca de la monofilia de los notaspídeos presentadas en el trabajo de Willan (1987) no están suficientemente bien fundadas. Años más tarde, Mikkelsen (2002) repitió el análisis de Willan para notaspídeos, junto con otros miembros de diversas líneas dentro de los opistobranquios. Los resultados de estos análisis no apoyaron la monofilia de Notaspidea, sino que Pleurobranchidae, Tylodinoidea y Nudibranchia formaban una politomía.

Otros trabajos basados en datos morfológicos han demostrado la divergencia existente entre Pleurobranchidae y Tylodinoidea y han defendido diferentes orígenes para ellos (Ghiselin, 1966; Schmekel, 1985; Salvini-Plawen y Steiner, 1996). El trabajo de mayor trascendencia fue el de Schmekel (1985), que separó formalmente ambas líneas de notaspídeos. Según esta autoría, las sinapomorfías definidas para Notaspidea no tienen ningún peso, ya que en realidad son simplesiomorfías y no hay ningún carácter que ambos grupos compartan de manera exclusiva. Mientras que Schmekel (1985) establece una relación entre Tylodinoidea y Anaspidea, otros autores sitúan a Tylodinoidea como grupo hermano de Pleurobranchoidea y Nudibranchia (Ghiselin, 1966; Salvini-Plawen y Steiner, 1996). Los datos aportados por esta tesis apoyan la hipótesis de una estrecha relación entre Tylodinoidea, Anaspidea y Cephalaspidea sustentada además por la similitud en algunos caracteres morfológi-

cos, como la presencia de un surco espermático abierto , un pene no retráctil, una glándula del albúmen, placas en la molleja y la ausencia de la glándula sanguínea.

Por otra parte, varios autores han apuntado la existencia de una estrecha relación entre Pleurobranchoidea y Nudibranchia (Ghiselin, 1966; Schmekel, 1985; Salvini-Plawen y Steiner, 1996), aunque no fue hasta el trabajo de Wägele y Willan (2000) cuando ambos grupos fueron formalmente incluidos en el clado Nudipleur a. Nudipleura está definido por la posesión de glándula sanguínea, un sistema reproductor androdiáulico y la ausencia (por pérdida) del osfradio (Wägele y Willan, 2000). Sin embargo, la única sinapomorfía que puede ser mantenida es la ausencia de osfradio, ya que la glándula sanguínea no está presente en todos los miembros de Nudipleura (Minichev, 1970) y el sistema androdiáulico está también presente en otros grupos como Architectibranchia y Sacoglossa (Ghiselin, 1966; Mikkelsen, 1996). Todos los análisis realizados en esta tesis apoyan la monofilia de Nudipleura.

La monofilia de Nudibranchia ha sido aceptada o rechazada según distintos estudios basados en datos morfológicos y moleculares (Minichev, 1970; Schmekel, 1985; Thollesson, 1999b; Wollscheid y Wägele, 1999; Wägele y Willan, 2000). Actualmente se reconocen dos grupos dentro de Nudibranchia: Anthobranchia (Doridoidea y Bathydoridoidea) y Dexiarchia, que incluye Cladobranchia (Aeolidacea, Arminacea y Dendronotacea) y Doridoxa (Wägele y Willan, 2000; Schrödl *et al.*, 2001), aunque en esta tesis sólo se han incluido representantes de Doridoidea, Aeolidacea y Dendronotacea. Wägele y Willan (2000) han defendido un origen común para estos dos grupos y han definido las siguientes sinapomorfías para ambos: la presencia de rinóforos sólidos, la ausencia (por pérdida) de la concha, la orientación longitudinal del complejo pericárdico y la presencia de valvulas especializadas en el epitelio . Sin embargo, ha sido reiteradamente expuesto que la pérdida de la concha es un fenómeno evolutivo que ha ocurrido varias veces a lo largo de la historia evolutiva de Opisthobranchia y, por lo tanto, no es exclusivo de Nudibranchia. Del mismo modo, la orientación longitudinal del complejo pericárdico tampoco es exclusiva de Nudibranchia, ya que también se encuentra en Pleurobranchoidea (Willan, 1987). El mayor detractor, y prácticamente el único, de la hipótesis que apoya la monofilia de Nudibranchia fue Minichev (1970), que realizó un estudio morfológico exhaustivo en base al cual consideraba diferentes tanto el origen como las tendencias evolutivas entre las dos ramas de nudibranquios. En primer lugar, según este autor, hay diferencias claras en la organización corporal de ambos grupos: mientras que en Anthobranchia las branquias, el ano y el orificio renal se sitúan en una posición dorsal,

en Cladobranchia se sitúan en el lado derecho del cuerpo, al igual que en el estado larvario. Por lo tanto, en Anthobranchia se ha completado una simetría bilateral interna y externa mientras que en Cladobranchia aún existe una asimetría interna pronunciada. En segundo lugar, las estructuras respiratorias no son homólogas; las branquias de los antobranquios son estructuras primitivas (ctenidios), homólogas a las que tienen otros grupos de opistobranquios, como los cefalaspideos, cuya inervación se localiza en el ganglio supra-intestinal (Evans, 1914; Minichev, 1970). En cambio, las branquias de los cladobranquios tienen una inervación localizada en los ganglios pleurales (Thompson, 1958; Minichev, 1970). Además de éstas, Minichev (1970) también describe profundas diferencias en el sistema reproductor y circulatorio y concluye que son suficientes como para considerarlos grupos independientes.

Los datos presentados en esta tesis corroboran la hipótesis de Minichev (1970), ya que sostienen orígenes diferentes para Anthobranchia y Cladobranchia. Por lo tanto, según los resultados obtenidos en la presente tesis, Nudibranchia es un grupo parafilético, debido a que Pleurobranchoidea siempre se obtiene como grupo hermano de Anthobranchia con valores altos de significación estadística (Figura IV.6). Esta relación fue comentada por Willan (1987) (aunque él hablaba de la relación de los antobranquios con todos los notaspideos, no sólo con los pleurobránquidos) en base a semejanzas en el sistema nervioso, digestivo y reproductor. Esta estrecha relación queda formalizada con la introducción en esta tesis del nombre Pleuroanthobranchia (nuevo taxón) que engloba los representantes de Pleurobranchoidea y Anthobranchia. Este taxón nuevo se define por los siguientes caracteres exclusivos: la presencia de glándula sanguínea, espículas calcáreas en el tegumento y un ciego cuya apertura comunica con el estómago.

Por lo tanto, según los árboles inferidos, el grupo monofilético Nudipleur a queda separado en dos líneas evolutivas divergentes, que son: por una parte Cladobranchia y por otra Pleuroanthobranchia (Figura IV.6).

Por su parte, Anthobranchia es monofilético en todos los análisis realizados. Esto concuerda con los estudios morfológicos previos, que apuntan a la presencia de branquias anales, nefroprocto, la posición posterodorsal del ano y un noto que recubre la cabeza y los rinóforos durante la ontogenia, como sinapomorfías del grupo (Wägele y Willan, 2000). Tradicionalmente, Antobranchia se ha dividido en Cryptobranchia y Phanerobranchia, según la posesión o no (respectivamente) de una cavidad protectora para las branquias. Los resultados de esta tesis no apoyan esta división, ya que ni los fanerobranquios (*Onchidoris*, *Ancula*, *Triopha*, *Tambja* y

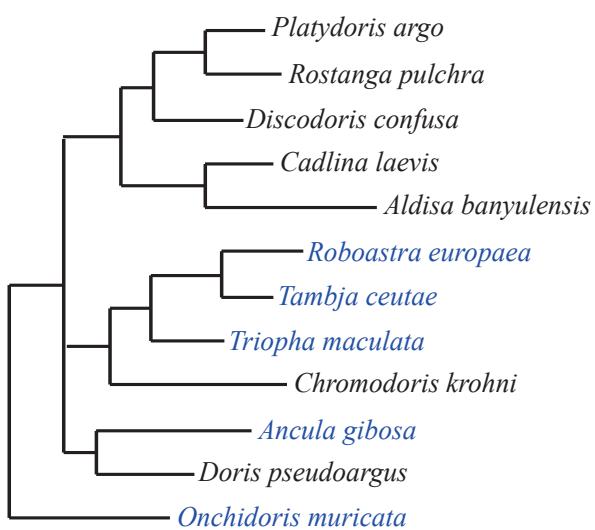


Fig. IV.7. Cladograma reducido que resume los resultados obtenidos en esta tesis dentro de Anthobranchia. Los nodos que se muestran son estadísticamente robustos en las diferentes metodologías empleadas. En azul se muestran los antobranquios fanerobranquios (ver texto).

que forman *Platydoris* y *Rostanga* como grupos hermanos (lo que corrobora los resultados de estudios morfológicos previos que unen ambos grupos por la presencia en ambos de cariofilidios (estructuras sensoriales especializadas) (Valdés, 2001; 2002)) y por otra parte, la posición alejada de *Cadlina* y *Chromodoris* que cuestiona la monofilia de Chromodoridae, grupo que incluye ambos taxones. La posición dudosa de *Cadlina* dentro de Chromodoridae ya había sido apuntada con anterioridad y, por lo tanto está pendiente de una revisión profunda de su morfología (Thollesson, 1999a; Wollscheid *et al.*, 2001).

Finalmente, Cladobranchia (grupo del que, aunque incluye Dendronotacea, Aeolidaecea y Arminacea, sólo se han estudiado aquí representantes de los dos primeros grupos) es monofilético en todos los análisis realizados en esta tesis. Aunque su monofilia también se obtiene en los análisis filogenéticos basados en datos morfológicos, aún no se ha definido ninguna sinapomorfía que caracterice al grupo (Wägele y Willan, 2000). Si bien se ha sugerido que las semejanzas que se encuentran entre ellos en caracteres del sistema digestivo y reproductor puedan haberse adquirido por convergencia (Ghiselin, 1966), los resultados de esta tesis apoyan un origen común, al menos para los representantes de Dendronotacea y Aeolidaecea.

En los árboles filogenéticos inferidos en esta tesis, Dendronotoidea

Roboastra) ni los criptobranquios (*Doris*, *Chromodoris*, *Aldisa*, *Cadlina*, *Discodoris*, *Rostanga* y *Platydoris*) resultan grupos monofiléticos (Figura IV.7). En los árboles obtenidos, *Onchidoris* es el taxón basal dentro de Antobranchia. Por lo tanto, el estado plesiomórfico sería la ausencia de cavidad protectora para las branquias, que, con posterioridad, se habría ido desarrollando varias veces de forma independiente a lo largo de la historia evolutiva de los antobranquios.

Otras relaciones de interés dentro de Antobranchia obtenidas en este estudio son, por una parte, la

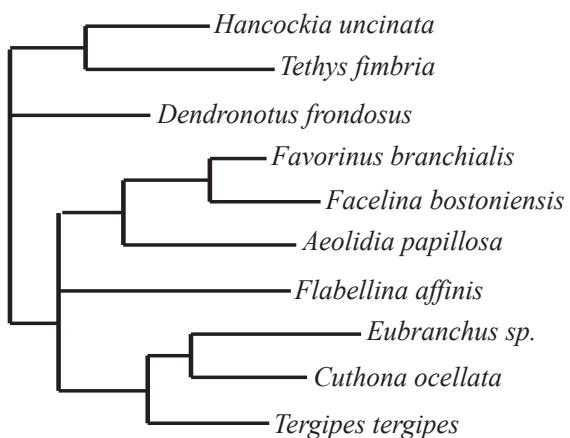


Fig. IV.8. Cladograma reducido que resume los resultados obtenidos en esta tesis dentro de Cladobranchia. Los nodos que se muestran son estadísticamente robustos en las diferentes metodologías empleadas.

darios que han servido de presas a los aeolidaceos y que tienen una función defensiva) en la parte dorsal del cuerpo como carácter derivado exclusivo del grupo (Wägele y Willan, 2000; Wollscheid *et al.*, 2001).

IV.3.- Tareas pendientes para futuros análisis

El presente estudio ha permitido avanzar en el conocimiento de las relaciones filogenéticas de los principales linajes de Euthyneura. En el futuro será necesaria la incorporación de representantes de los diferentes linajes de Heterostropha (Valvatoidea, Architectonicoidea, Rissoelloidea y Omalogyroidea) así como de diversos grupos de Caenogastropoda (Rissooidea y Littorinoidea) con el fin de localizar el origen evolutivo de Heterobranchia. El estudio de los diferentes heterostrofos permitirá del mismo modo, establecer los límites de Euthyneura, grupo que como ha quedado patente en este trabajo no está totalmente delimitado.

La futura consideración de los representantes de los grupos de pulmonados no incluidos en este análisis (Otinoidea, Rathouisiaoidea, Amphiboloidea, Lymnaeoidea, Glacidorboidea y Tridacnidae), permitirá definir la historia evolutiva de los pumonados (grupo polifilético, según se ha propuesto en esta tesis) y establecer una clasificación robusta y estable para este grupo. Del mismo modo, la incorporación de estos taxones, aclarará las características ecológicas de los grupos ancestrales a Stylommatophora y cómo se produjo la colonización del medio terrestre por parte de Euthyneura.

(*Hancockia*, *Tethys* y *Dendronotus*) no forma un grupo monofilético, hecho que ha sido señalado con anterioridad en la literatura (Wägele y Willan, 2000; Wollscheid *et al.*, 2001) (Figura IV.8). Finalmente, Aeolidoidea sí es un grupo monofilético en los árboles obtenidos en esta tesis lo que corrobora estudios basados en datos morfológicos previos, que consideran la presencia de cnidosacos (receptáculos donde se almacenan los cnidocistos de los cnidarios que han servido de presas a los aeolidaceos y que tienen una función defensiva) en la parte dorsal del cuerpo como carácter derivado exclusivo del grupo (Wägele y Willan, 2000; Wollscheid *et al.*, 2001).

El estudio de representantes del género *Acteon* y de las familias Ringiculidae y Diaphanidae en futuros análisis moleculares permitirá establecer su relación con los heterostrofos y con los opistobranquios, así como el origen de éstos últimos. Dentro de Opisthobranchia, es básica la incorporación en futuros análisis de representantes de Thecosomata, Gymnosomata, Acochlidiomorpha y Rhodopemorpha, que no han sido considerados en este estudio y que, debido a su reducido tamaño y su rareza, han sido muy poco estudiados por los malacólogos a lo largo de la historia, lo cual lo hace más interesante si cabe. Deben incluirse también más representantes de Sacoglossa, con el fin de comprobar su monofilia y su posición dentro de los opistobranquios. Del mismo modo, queda pendiente establecer las relaciones entre Dendronotacea, Aeolidacea y Arminacea.

Hasta que, al menos, todos estos puntos hayan sido aclarados, no será posible establecer una clasificación estable para el conjunto de Heterobranchia.

V.- CONCLUSIONES

- 1.- De la secuenciación del genoma mitocondrial completo de *R. europaea* se pueden extraer las siguientes conclusiones principales:
 - El genoma mitocondrial completo del nudibranquio *R. europaea* tiene un tamaño de 14.472 bp y codifica para 37 genes (13 codificantes para proteínas, 2 ARNs ribosomales y 22 ARNs de transferencia).
 - La región control del genoma mitocondrial de *R. europaea* se encuentra entre los genes *cox3* y *trnI*.
 - El orden de los genes mitocondriales de *R. europaea* es casi idéntico al observado en el opistobranquio basal *P. strigosa*, del que sólo se diferencia en la posición del *trnC*.
- 2.- De la observación de la ordenación génica de los genomas mitocondriales de diversos eutineuros estudiados se deduce que el orden *rrnL*, *trnL(cun)*, *trnA*, *trnP*, *nad6* y *nad5* caracteriza el linaje Opisthobranchia+ *Siphonaria*+ *Onchidella*+ *Pyramidella*.
- 3.- De la revisión de las secuencias de aminoácidos inferidas de los genes mitocondriales de diversos heterobranquios estudiados se deduce que la presencia de la inserción de un aminoácido Glicina en la posición 46 (de acuerdo con *R. europaea*) del gen *cox1* en Opisthobranchia y *Siphonaria* apoya la hipótesis de una estrecha relación evolutiva entre ambos grupos. Además, el hecho de que este aminoácido esté presente en el heterostrofo *Cornirostra* (Valvatoidea), pero no se halle en el heterostrofo *Pyramidella* (Pyramidelloidea) también apoya la hipótesis de parafilia para Heterostropha.
- 4.- De la revisión de la estructura secundaria del gen mitocondrial *rrnL* de diversos eutineuros estudiados se deduce que la presencia de una estructura "stem-loop" en el dominio III de dicho gen en Pleurobranchoidea y Nudibranchia apoya la monofilia de Nudipleura. Esta estructura no se ha encontrado hasta el momento en ningún otro linaje dentro de Heterobranchia.
- 5.- De todos los análisis filogenéticos realizados en esta tesis se concluye en los siguientes puntos:
 - el ADN mitocondrial es útil para elaborar hipótesis sobre la historia evolutiva de Euthyneura.

- *Pyramidella dolabrata* se sitúa dentro de Euthyneura. Estos resultados instan a una revisión de la posición filogenética de Pyramidelloidea, ya que contradicen las hipótesis tradicionales.
- Pulmonata no es un grupo monofilético. El sistelomatóforo *Onchidella celtica* se sitúa separado del resto de pulmonados y se relaciona más estrechamente con Opistobranchia y *Pyramidella*. Por lo tanto, Onchidiidae es un grupo con una posición filogenética intermedia entre pulmonados y opistobranquios. Por otra parte, el basomatóforo *Siphonaria pectinata* se sitúa dentro de Opistobranchia. De los resultados obtenidos se concluye que debe llevarse a cabo una exhaustiva revisión morfológica para establecer los caracteres homólogos entre Opistobranchia y *Siphonaria*, así como las sinapomorfías que los sustentan.
- Los pulmonados estilomatóforos son monofiléticos. Su posición basal dentro de Euthyneura permite concluir que la colonización del medio terrestre llevada a cabo por los estilomatóforos, ocurrió en una etapa temprana dentro de la historia evolutiva de Euthyneura.
- *Ascobulla* (Sacoglossa) constituye el linaje más basal de los opistobranquios estudiados.
- Hay dos líneas evolutivas divergentes y bien diferenciadas dentro de Opistobranchia: una constituida por Cephalaspidea, Anaspidea y Tylodinoidea y otra formada por Architectibranchia y Nudipleura. Todos estos grupos son monofiléticos.
- Cephalaspidea y Architectibranchia constituyen dos linajes evolutivos independientes, al igual que Tylodinoidea y Pleurobranchoidea.
- Bulloidea, Philinoidea y Runcinoidea son tres linajes evolutivos bien diferenciados dentro de Cephalaspidea.
- Nudibranchia es un grupo parafilético. Hay orígenes diferentes para Anthobranchia y Cladobranchia.
- Pleurobranchoidea y Anthobranchia comparten un mismo origen evolutivo, lo que ha permitido definir en esta tesis el nuevo taxón Pleuroanthobranchia que engloba a ambos grupos. Este taxón nuevo se define por los siguientes caracteres exclusivos: la presencia de una glándula sanguínea, espículas calcáreas en el tegumento y un ciego cuya apertura comunica con el estómago.
- Anthobranchia es monofilético. Sin embargo, ni criptobranquios ni fanero-

branquios constituyen grupos monofiléticos. Por lo tanto, la cavidad protectora para las branquias, que tradicionalmente ha servido para definir ambos grupos, se habría desarrollado varias veces de forma independiente a lo largo de la historia evolutiva de los antobranquios.

- Cladobranchia es monofilético. Sin embargo, la monofilia de Dendronotoidea no puede ser confirmada ni rechazada con los resultados obtenidos en esta tesis. Por otra parte, Aeolidoidea es un grupo monofilético.

6.- Se proponen modificaciones en la clasificación actual de los Euthyneura.

VI.- BIBLIOGRAFÍA

- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. IEEE T. Automat. Contr. 19, 716-723.
- Andrews, E. B., 1985. Structure and function in the excretory system of archaeogastropods and their significance in the evolution of gastropods. Phil. Trans. R. Soc. London B 310, 383-406.
- Arnedo, M. A., 1999. Cladismo: La reconstrucción filogenética basada en parsimonia. Bol. S.E.A. 26, 57-84.
- Bandel, K., 1982. Morphologie und Bildung der frühontogenetischen Gehäuse bei conchiferen Mollusken. Facies (Erlangen) 7, 1-198.
- Battey, J., Clayton, D. A., 1980. The transcription map of human mitochondrial DNA implicates transfer RNA excision as a major processing event. J. Biol. Chem. 255, 11599-11606.
- Beesley, P. L., Ross, G. J. B., Wells, A., 1998. Mollusca: The Southern Synthesis. Fauna of Australia. Melbourne.
- Bieler, R., 1990. Haszprunar's "clado-evolutionary" classification of the gastropoda - a critique. Malacologia 31, 371-380.
- Bieler, R., 1992. Gastropod Phylogeny and Systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst. 23, 311-338.
- Boettger, C. R., 1954. Die Systematik der euthyneuren Schnecken. Verh. Deutschen Zool. Gesell. Tübingen 18, 253-280.
- Boore, J. L., 1999. Animal mitochondrial genomes. Nucleic Acids Res. 27, 1767-1780.
- Boore, J. L., Brown, W. M., 1994. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the black chiton, *Katharina tunicata*. Genetics 138, 423-443.
- Boore, J. L., Brown, W. M., 1998. Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. Curr. Opin. Genet. Dev. 8, 668-674.
- Boore, J. L., Collins, T. M., Stanton, D., Daehler, L. L., Brown, W. M., 1995. Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. Nature 376, 163-165.
- Brace, R., 1977. Anatomical changes in nervous and vascular system during the transition from prosobranch to opisthobranch organization. Trans. Z. Soc. London 1-25.
- Clark, K. B., Jensen, K. R., Stirts, H. M., 1990. Survey of functional kleptoplasty among west Atlantic Ascoglossa (Sacoglossa) (Mollusca: Opisthobranchia). The Veliger 33, 339-345.
- Clary, D. O., Wolstenholme, D. R., 1985. The mitochondrial DNA molecule of

- Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. J. Mol. Evol. 22, 252-271.
- Climo, F. M., 1980. Smeagolida, a new order of gymnomorph molluscs from New Zealand based on a new genus and species. New Zeal. J. Zool. 5, 275-288.
- Cox, L. R., 1960. Thoughts on the classification of the Gastropoda. P. Malac. Soc. Lond. 33, 239-261.
- Crozier, R. H., Crozier, Y. C., 1993. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. Genetics 133, 97-117.
- Dayrat, B., Tillier, A., Lecointre, G., Tillier, S., 2001. New Clades of Euthyneuran Gastropods (Mollusca) from 28S rRNA sequences. Mol. Phylogenetic Evol. 19, 225-235.
- Dayrat, B., Tillier, S., 2002. Evolutionary relationships of euthyneuran gastropods (Mollusca): a cladistic re-evaluation of morphological characters. Zool. J. Linn. Soc. 135, 403-470.
- Debelius, H., 1997. Guía de nudibranquios y caracolas de mar del Indopacífico. Grupo Editorial M&G Difusión, S.L., Frankfurt.
- Dörner, M., Altmann, M., Pääbo, S., Mörl, M., 2001. Evidence for import of a Lysyl-tRNA into marsupial mitochondria. Mol. Biol. Cell. 12, 2688-2698.
- Dutra-Clarke, A. V. C., Williams, C., Dickstein, R., Kaufer, N., Spotila, J. R., 2001. Inferences on the phylogenetic relationships of Succineidae (Mollusca, Pulmonata) based on 18S rRNA gene. Malacologia 43, 223-236.
- Eliot, C., 1910. The British nudibranchiate Mollusca. Ray Society, London.
- Evans, I. J., 1914. The anatomy of a new species of *Bathydoris* and the affinities of the genus. Trans. R. Soc. Edinb. 50, 191-209.
- Farris, J. S., 1970. Estimating phylogenetic trees from distance matrices. Am. Nat. 106, 645-668.
- Felsenstein, J., 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. Syst. Zool. 27, 401-410.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. J. Mol. Evol. 17, 368-376.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39, 783-791.
- Fitch, W. M., 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. Syst. Zool. 20, 406-416.
- Franc, A., 1968. Traité de Zoologie. Opisthobranches. Masson, Paris.

- Fretter, V., 1943. Studies on the functional morphology and embryology of *Onchidella celtica* (Forbes & Hanley) and their bearing on its relationships. J. Mar. Biol. Ass. UK. 25, 685-720.
- Fretter, V., Graham, A., 1949. The structure and mode of life of the Pyr amidellidae, parasitic opisthobranchs. J. Mar. Biol. Ass. UK. 28, 493-532.
- Fretter, V., Graham, A., 1954. Observations on the opisthobranch mollusc *Acteon tornatilis* (L.). J. Mar. Biol. Ass. UK. 33, 565-583.
- Ghiselin, M. T., 1966. Reproductive function and the phylogeny of opisthobranch gastropods. *Malacologia* 3, 327-378.
- Goldman, N., Anderson, J. P., Rodrigo, A. G., 2000. Likelihood-based test of topologies in phylogenetics. *Syst. Biol.* 49, 652-670.
- Golikov, A. N., Starobogatov, Y. I., 1975. Systematics of prosobranch gastropods. *Malacologia* 15, 185-232.
- Gosliner, T. M., 1981. Origins and relationships of primitive members of the Opisthobranchia (Mollusca: Gastropoda). *Biol. J. Linn. Soc.* 16, 197-225.
- Gosliner, T. M., 1985. Parallelism, parsimony and testing of phylogenetic hypotheses: the case of opisthobranch gastropods. In: VRBA, E. (Eds.), *Species and speciation*. 4. Transvaal Museum, Pretoria, pp. 105-107.
- Gosliner, T. M., 1991. Morphological parallelism in opisthobranch gastropods. *Malacologia* 32, 313-327.
- Gosliner, T. M., Ghiselin, M. T., 1984. Parallel evolution in Opisthobranch gastropods and its implications for phylogenetic methodology. *Syst. Zool.* 33, 255-274.
- Gotoh, O., 1996. Significant improvement in accuracy of multiple-protein sequence alignments by iterative refinements as assessed by reference to structural alignments. *J. Mol. Biol.* 264, 823-838.
- Götting, K. J., 1980. Origin and relationships of the Mollusca. *Z. Zool. Syst. Evolut.-forsch.* 18, 24-27.
- Graham, A., 1985. Evolution within the Gastropoda: Prosobranchia. *The Mollusca*. In: Trueman, E. R. Clarke, M. R. (Eds.), *Evolution*. 10. Academic Press, New York, pp. 151-186.
- Gutmann, W. F., 1974. Die evolution der Mollusken-Konstruktion: ein phylogenetisches modell. *Aufsätze Reden Senckenb. Naturforsch. Ges.* 25, 1-84.
- Harry, H. W., 1964. Anatomy of *Chilina* and basommatophoran phylogeny. *Malacologia* 1, 355-385.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T., 1985. Dating of the human-ape splitting by a

- molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 21, 160-174.
- Haszprunar, G., 1985a. The fine morphology of the osphradial sense organs of the Mollusca. I. Gastropoda, Prosobranchia. *Phil. Trans. R. Soc. London B* 307, 457-496.
- Haszprunar, G., 1985b. The fine morphology of the osphradial sense organs of the Mollusca. II. Allogastropoda (Architectonicidae, Pyramidellidae). *Phil. Trans. R. Soc. London B* 307, 497-505.
- Haszprunar, G., 1985c. The Heterobranchia- a new concept of the phylogeny and evolution of the higher Gastropoda. *Z. Zool. Syst. Evolut.-forsch.* 23, 15-37.
- Haszprunar, G., 1987. The fine structure of the ctenidial sense organs (bursicles) of Vetigastropoda (Zeugobranchia, Trochoidea) and their functional and phylogenetic significance. *J. Moll. Stud.* 53, 46-51.
- Haszprunar, G., 1988a. Anatomy and affinities of pseudococculinid limpets (Mollusca, Archaeogastropoda). *Zool. Scr.* 17, 161-190.
- Haszprunar, G., 1988b. On the origin and evolution of major gastropods group, with special reference to the streptoneura. *J. Moll. Stud.* 54, 367-441.
- Haszprunar, G., 1990. Towards a phylogenetic system of gastropoda. Part I: traditional methodology-a reply. *Malacologia* 32, 195-202.
- Haszprunar, G., Huber, G., 1990. On the central nervous system of Smeagolidae and Rhodopidae, two families questionably allied with the Gymnomorpha (Gastropoda: Euthyneura). *J. Zool.* 220, 185-199.
- Hatzoglou, E., Rodakis, G. C., Lecanidou, R., 1995. Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the land snail *Albinaria coerulea*. *Genetics* 140, 1353-1366.
- Healy, J. M., 1988. Sperm morphology and its systematic importance in the Gastropoda. *Malacological Rev. Supp.* 4, 251-266.
- Hendy, M. D., Penny, D., 1982. Branch-and-bound algorithms to determine minimal evolutionary trees. *Math. Biosci.* 59, 277-229.
- Hennig, W., 1950. Grundzüge einer theorie der phylogenetischen systematik. Deutscher Zentralverlag, Berlin.
- Higgins, D., 2003. Multiple alignment. In: Salemi, M.V andamme, A. (Eds.), *The phylogenetic handbook*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 45-71.
- Hillis, D. M., 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 23-42.
- Hillis, D. M., 1996. Inferring complex phylogenies. *Nature* 383, 130.

- Hillis, D. M., Wiens, J. J., 2000. Molecules versus morphology in systematics: conflicts, artifacts, and misconceptions. Smithsonian Institutions Press, Washington and London.
- Hoffmann, R. J., Boore, J. L., Brown, W. M., 1992. A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Genetics* 131, 397-412.
- Hubendick, B., 1945. On the family Amphibolidae. *P. Malac. Soc. Lond.* 26, 103-110.
- Huber, G., 1987. Zum cerebralen Nervensystem mariner Heterobranchia (Gastropoda). Dissertation am Institut für Zoologie der Universität Wien, Wien, Austria.
- Huelsenbeck, J. P., Hillis, D. M., 1993. Success of phylogenetic methods in the four-taxon case. *Syst. Biol.* 42, 247-264.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F. R., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 754-755.
- Hyman, L., 1967. Mollusca I. In: (Eds.), *The Invertebrates*. 6. pp. 1-792.
- Jensen, K. R., 1996. Phylogenetic systematics and classification of the Sacoglossa (Mollusca, Gastropoda, Opisthobranchia). *Phil. Trans. R. Soc. London B* 351, 91-122.
- Jukes, T., Cantor, C. R., 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro, H. N. (Eds.), *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York, pp. 21-132.
- Kandel, E. R., 1979. Behavioural Biology of *Aplysia*: A contribution to the comparative study of Opisthobranch molluscs. Freeman W.H. & Company, San Francisco.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 15, 111-120.
- Kishino, H., Hasegawa, M., 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order of the Homonoidea. *J. Mol. Evol.* 29, 170-179.
- Kluge, A. G., Farris, J. S., 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst. Zool.* 18, 1-32.
- Köhler, A., 1893. Beiträge zur Anatomie der Gattung *Siphonaria*. *Zoologische Jahrbücher, Abteilung Anatomie* 7, 1-92.
- Koike, K., 1985. Comparative ultrastructural studies on the spermatozoa of the Prosobranchia (Mollusca: Gastropoda). *Sci. Rep. Fac. Educ. Gunma Univ.* 34,
- Kress, A., 1977. *Runcina ferruginea*. n. sp. (Cephalaspidea: Opisthobranchia: Gastropoda), a new runcinid from Great Britain. *J. Mar. Biol. Ass. UK.* 57, 201-211.
- Krogh, A., Brown, M., Mian, I. S., Sjolander, K., Haussler, D., 1994. Hidden Markov

- models in computational biology: Applications to protein modeling. *J. Mol. Biol.* 235, 1501-1531.
- Kurabayashi, A., Ueshima, R., 2000a. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the primitive opisthobranch gastropod *Pupa strigosa*: systematics implication of the genome organization. *Mol. Biol. Evol.* 17, 266-277.
- Kurabayashi, A., Ueshima, R., 2000b. Partial mitochondrial genome organization of the heterostrophan gastropod *Omalogyra atomus* and its systematic significance. *Venus* 59, 7-18.
- Larget, B., Simon, D. L., 1999. Markov Chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 16, 750-759.
- Lemche, H., Wingstrand, K. G., 1959. The anatomy of *Neopilina galatheae* Lemche, 1957. *Galathea Rept.* 3, 9-71.
- Lindberg, D. R., 1988. The Patellogastropoda. In: Ponder, W. F. (Eds.), Prosobranch phylogeny. *Malacological Rev. Supp.* 4. pp. 35-63.
- Linsley, R. M., 1978. Locomotion rates and shell form in the Gastropoda. *Malacologia* 25, 241-254.
- Lipman, D. J., Altschul, S. F., Kececioglu, J. D., 1989. A tool for multiple-sequence alignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4412-4415.
- Löytynoja, A., Milinkovitch, M. C., 2001. SOAP, cleaning multiple alignments from unstable blocks. *Bioinformatics* 17, 573-574.
- Marcus, E., Marcus, E., 1956. On the tectibr anch gastropod *Cylindrobulla*. *Annales Acad. Bras. Cienc.* 28, 119-128.
- Marcus, E., Marcus, E., 1961. On *Siphonaria hispida*. *Bol. Fac. Fil. Ciênc. Let.* 23, 107-139.
- McLean, J. H., 1981. The Galapagos rift limpet *Neomphalus*: relevance to understanding the evolution of a major Paleozoic- Mesozoic radiation. *Malacologia* 21, 291-336.
- McLean, J. H., 1988. New archaeogastropod limpets from hydrothermal vents; superfamily Lepetodrilacea. I. Systematic descriptions. *Phil. Trans. R. Soc. London B* 318, 1-32.
- McLean, J. H., 1990. Neoleptopsidae, a new docoglossate limpet family from hydrothermal vents and its relevance to Patellogastropod evolution. *J. Zool.* 222, 485-528.
- Medina, M., Walsh, P. J., 2000. Molecular systematics of the order Anaspidea based on mitochondrial DNA sequence (12S, 16S, and COI). *Mol. Phylogenetics Evol.* 15, 41-58.
- Mikkelsen, P. M., 1996. The evolutionary relationships of Cephalaspidea s. l.

- (Gastropoda: Opisthobranchia): a phylogenetic analysis. *Malacologia* 37, 375-442.
- Mikkelsen, P. M., 2002. Shelled Opisthobranchs. *Adv. Mar. Biol.* 42, 67-136.
- Minichev, Y. S., 1970. On the origin and system of nudibranchiate molluscs (Gastropoda, Opisthobranchia). *Monit. Zool. Ital.* 4, 169-182.
- Morgenstern, B., 1999. DIALIGN2: Improvement of the segment-to-segment approach to multiple-sequence alignment. *Bioinformatics* 15, 211-218.
- Morton, J. E., 1955. The evolution of the Ellobiidae with a discussion on the origin of Pulmonata. *P. Zool. Soc. Lond.* 125, 127-168.
- Morton, J. E., 1958a. Observations on the gymnosomatous pteropod *Clione limacina* (Phipps.). *J. Mar. Biol. Ass. UK.* 37, 287-297.
- Morton, J. E., 1958b. Torsion and the adult snail; a re-evaluation. *P. Malac. Soc. Lond.* 33, 2-10.
- Morton, J. E., 1968. Mollusca. Hutchinson & Co. Ltd., London.
- Newnam, W. A., 1985. The abyssal hydrothermal vent invertebrate fauna: A glimpse at antiquity? In: Jones, M. L. (Eds.), *The hydrothermal vents of the Eastern Pacific. An overview*. Biological Society of Washington, Bulletin 6. pp. 231-242.
- Nordsieck, H., 1992. Phylogeny and system of the Pulmonata (Gastropoda). *Arch. Moll.* 121, 31-52.
- Notredame, C., Higgins, D. G., 1996. SAGA: Sequence alignment by genetic algorithm. *Nucleic Acids Res.* 24, 1515-1524.
- Odhner, N. H., 1968. Systematique [in] Sous-classe des opisthobranches. In: Franc, A. (Eds.), *Traité de Zoologie*. vol: 5. Gastéropodes. Masson, Paris, pp. 834-893.
- Ojala, D., Montoya, J., Attardi, G., 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290, 470-474.
- Okimoto, R., Macfarlane, J. L., Clary, D. O., Wolstenholme, D. R., 1992. The mitochondrial genome of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Genetics* 130, 471-498.
- Page, R. D. M., Holmes, E. C., 1998. Molecular evolution. Blackwell Science, Cambridge.
- Pelseneer, P., 1894. Recherches sur divers opisthobranches. *Mem. Cour Cl. Sci. Nat. Acad. Roy. Belgique* 53, 160.
- Pelseneer, P., 1899. Recherches morphologiques et phylogénétiques sur les Mollusques Archaïques. *Mémoires couronnés et Mémoires des savants étrangés, l'Academie Royale des Sciences de Belgique*. 57, 1-112, I-XXIV.
- Ponder, W. F., 1991. Marine valvatoideans gastropods, implications for early heterobranch phylogeny. *J. Moll. Stud.* 57, 21-32.

- Ponder, W. F., Lindberg, D. R., 1996. Gastropod phylogeny challenges for the 90S. In: Taylor, J. (Eds.), Origin and evolutionary radiation of the Mollusca. The Malacological Society of London. Oxford University Press, pp. 135-154.
- Ponder, W. F., Lindberg, D. R., 1997. Towards a phylogeny of gastropod molluscs: an analysis using morphological characters. Zool. J. Linn. Soc. 119, 83-265.
- Ponder, W. F., Warén, A., 1988. Classification of the Caenogastropoda and Heterostropha – a list of the family group names and higher taxa. In: Ponder, W. F. (Eds.), Prosobranch phylogeny. Malacological Rev. Supp. 4. pp. 288-328.
- Posada, D., 2003. Selecting models of evolution. In: Salemi, M. Vandamme, A. (Eds.), The phylogenetic handbook. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 256-282.
- Posada, D., Crandall, K. A., 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14, 817-818.
- Rannala, B., Yang, Z. H., 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. J. Mol. Evol. 43, 304-311.
- Rawlings, T. A., Collins, T. M., Bieler, R., 2003. Changing identities: tRNA duplication and remolding within animal mitochondrial genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 15700-15705.
- Remigio, E. A., Hebert, P. D. N., 2003. Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. Mol. Phylogenet. Evol. 29, 641-647.
- Rigby, J. E., 1965. *Succinea putris*: a terrestrial opisthobranch mollusc. P. Zool. Soc. Lond. 144, 445-486.
- Robertson, R., 1974. The biology of the Architectonicidae, gastropods combining prosobranch and opisthobranch traits. Malacologia 14, 215-220.
- Robertson, R., 1985. Four characters and the higher systematics of gastropods. Am. Malac. Bull. Special Ed. 1, 1-22.
- Rodriguez, F., Oliver, J. F., Marín, A. Medina, J. R., 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. J. Theor. Biol. 142, 485-501.
- Ros, J., 1976. Sistemas de defensa en los Opistobranquios. Oecologia aquatica 2, 41-77.
- Rosenberg, G., Kuncio, G. S., Davis, G. M., Harasewych, M. G., 1994. Preliminary ribosomal RNA phylogeny of Gastropod and Unionoidean bivalve mollusks. The Nautilus. Supplement 2, 111-121.
- Rosenberg, G., Tillier, S., Tillier, A., Kuncio, G. S., Hanlon, R. T., Masselot, M.,

- Williams, C. J., 1997. Ribosomal RNA phylogeny of selected major clades in the Mollusca. *J. Moll. Stud.* 63, 301-309.
- Rudman, W. B., Willan, R. C., 1998. Opisthobranchia. In: Beesley, P. L., Ross, G. J. B. Wells, A. (Eds.), *Mollusca: The southern synthesis. Fauna of Australia*. vol 5. CSIRO, Melbourne, pp. 915-1035.
- Runnegar, B., 1983. Molluscan phylogeny revisited. *Mem. Assoc. Australas. Paleontol.* 1, 121-144.
- Rzhetsky, A., Nei, M., 1992. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Mol. Biol. Evol.* 9, 945-967.
- Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G., Reyes, A., 1999. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238, 195-209.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Salvini-Plawen, L., 1970. Zur systematischen Stellung von Soleolifera und Rhodope (Gastropoda, Euthyneura). *Zool. Jahr. Syst.* 97, 285-299.
- Salvini-Plawen, L., 1980. A reconsideration of systematics in the Mollusca (Phylogeny and higher classification). *Malacologia* 19, 249-278.
- Salvini-Plawen, L., 1990. Origin, phylogeny and classification of the phylum Mollusca. *Iberus* 9, 1-33.
- Salvini-Plawen, L., 1991. The status of the Rhodopidae (Gastropoda: Euthyneura). *Malacologia* 32, 301-311.
- Salvini-Plawen, L., Haszprunar, G., 1987. The Vetigastropoda and the systematics of streptoneurous gastropods (Mollusca). *J. Zool. London A* 211, 747-770.
- Salvini-Plawen, L., Steiner, G., 1996. Synapomorphies and plesiomorphies in higher classification of Mollusca. In: Taylor, J. (Eds.), *Origin and evolutionary radiation of the Mollusca*. The Malacological Society of London, London, pp. 29-51.
- Sasuga, J., Yokobori, S., Kaifu, M., Ueda, T., Nishikawa, K., Watanabe, K., 1999. Gene content and organization of a mitochondrial DNA segment of the squid *Loligo bleekeri*. *J. Mol. Evol.* 48, 692-702.
- Schmekel, L., 1985. Aspects of the evolution within the opisthobranchs. In: Trueman, E. R. Clarke, M. R. (Eds.), *The Mollusca*. vol 10. Academic Press, London, pp. 221-267.
- Schrödl, M., Wägele, H., Willan, R. C., 2001. Taxonomic redescription of the Doridoxidae (Gastropoda: Opisthobranchia), an enigmatic family of deep water nudibranchs, with discussion of basal nudibranch phylogeny. *Zool. Anz.* 240, 83-97.

- Shileyko, A. A., 1977. The symmetry of the Docoglossa and the problem of the origin of the order (Mollusca: Gastropoda) (in Russian). Bull. Moscow Nat. Soc., Biological Series 81, 60-65.
- Shimodaira, H., Hasegawa, M., 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. Mol. Biol. Evol. 16, 1114-1116.
- Smith, B. J., Stanisic, J., 1998. Pulmonata. In: Beesley, P. L., Ross, G. J. B. Wells, A. (Eds.), Mollusca: The southern synthesis. Fauna of Australia. 5. CSIRO, Melbourne, pp. 1037-1115.
- Sneath, P. H., Sokal, R. R., 1973. Numerical taxonomy. Freeman, W.H., San Francisco.
- Solem, A., 1959. Systematics and zoogeography of the land and freshwater Mollusca of the New Hebrides. Fieldiana Zool. 43, 1-359.
- Solem, A., Yochelson, E. L., 1979. North American Paleozoic land snails, with a summary of other Paleozoic non-marine snails. United States Geological Survey, Professional Paper. 1072, i-iii, 1-42.
- Stanton, D. J., Daehler, L. L., Moritz, C. C., Brown, W. M., 1994. Sequences with the potential to form stem-loop structures are associated with coding-region duplication in animal mitochondrial DNA. Genetics 137, 233-241.
- Stoye, J., Moulton, V., Dress, A. W., 1997. DCA: An efficient implementation of the divide-and-conquer approach to simultaneous multiple-sequence alignment. Comp. Appl. Biosci. 13, 625-626.
- Suzuki, Y., Glazko, G. V., Nei, M., 2002. Overcredibility of molecular phylogenies obtained by Bayesian phylogenetics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 16138-16143.
- Szal, R., 1971. "New" sense organ of primitive gastropods. Nature 229, 490-492.
- Taylor, D. W., Sohl, N. F., 1962. An outline of gastropod classification. Malacologia 1, 7-32.
- Templeton, A. R., 1983. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of human and the apes. Evolution 37, 221-244.
- Terrett, J. A., Miles, S., Thomas, R. H., 1996. Complete DNA Sequence of the mitochondrial genome of *Cepaea nemoralis* (Gastropoda: Pulmonata). J. Mol. Evol. 42, 160-168.
- Thiele, J., 1931. Handbuch der Systematischen Weichtierkunde. Jena.
- Thollesson, M., 1999a. Phylogenetic analysis of dorid nudibranchs (Gastropoda: Doridacea) using the mitochondrial 16s rRNA gene. J. Moll. Stud. 65, 335-353.
- Thollesson, M., 1999b. Phylogenetic analysis of Euthyneura (Gastropoda) by means

- of the 16s rRNA gene: use of a fast gene for higher -level phylogenies. Proc. R. Soc. Lond. B 266, 75-83.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G., 1997. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25, 4876-4882.
- Thompson, T. E., 1958. The natural history, embryology, larval biology and post-larval development of *Adalaria proxima* (Alder & Hancock) (Gastropoda Opisthobranchia). Phil. Trans. R. Soc. London B 242, 1-58.
- Thompson, T. E., 1967. Adaptative significance of gastropoda torsion. Malacologia 5, 423-430.
- Thompson, T. E., 1973. Euthyneuran and other molluscan spermatozoa. Malacologia 14, 167-206.
- Thompson, T. E., 1976. Biology of Opisthobranch molluscs. The Ray Society, London.
- Thorson, G., 1946. Reproduction and larval ecology of Danish marine invertebrates. Medd. Kom. Dan. Fisk. Havunders., Plankton 4, 1-523.
- Tillier, S., 1984. Relationships of gymnomorph gastropods (Mollusca: Gastropoda). Zool. J. Linn. Soc. 82, 345-362.
- Tillier, S., Masselot, M., Guerdoux, J., Tillier, A., 1994. Monophyly of major gastropod taxa tested from partial 28S rRNA sequences, with emphasis on Euthyneura and hot-vent Limpets peltospiroidea. The Nautilus 2, 122-140.
- Tillier, S., Masselot, M., Tillier, A., 1996. Phylogenetic relationships of the pulmonate gastropods from rRNA sequences and tempo and age of the Stylommatophoran radiation. In: Taylor, J. (Eds.), Origin and Evolutionary radiation of the Mollusca. pp. 267-284.
- Tracey, S., Todd, J. A., Erwin, D. H., 1993. Mollusca: Gastropoda. In: Benton, M. J. (Eds.), The Fossil Record 2. Chapman & Hall, London, pp. 131-167.
- Valdés, A., 2001. Systematics and phylogeny of the caryophyllidia-bearing dorids (Mollusca, Nudibranchia), with descriptions of a new genus and four new species from Indo-Pacific deep waters. Zool. J. Linn. Soc. 133, 103-198.
- Valdés, A., 2002. A phylogenetic analysis and systematic revision of the cryptodibranch dorids (Mollusca, Nudibranchia, Anthobranchia). Zool. J. Linn. Soc. 136, 535-636.
- van der Peer, Y., 2003. Phylogeny inference based on distance methods. In: Salemi, M. Vandamme, A. (Eds.), The phylogenetic handbook. Cambridge University Press, Cambridge, pp.

- van der Spoel, S ., 1976. Pseudothecosomata, Gymnosomata and Heteropoda (Gastropoda). Bohn, Scheltema and Holkema, Utrecht.
- van Mol, J. J., 1967. Étude morphologique et phylogénétique du ganglion cérébroïde des gastéropodes pulmonés (mollusques). Mém. Acad. R. Belg. Cl. Sci. 37, 1-168.
- van Mol, J. J., 1974. Evolution phylogénétique du ganglion cérébroïde chez les gastéropodes pulmonés. *Haliotis* 4, 77-86.
- Wade, C. M., Mordan, P. B., 2000. Evolution within the gastropod molluscs; using the ribosomal RNA gene-cluster as an indicator of phylogenetic relationships. *J. Moll. Stud.* 66, 565-570.
- Wade, C. M., Mordan, P. B., Clarke, B., 2001. A phylogeny of the land snails (Gastropoda: Pulmonata). *Proc. R. Soc. Lond. B.* 268, 413-422.
- Wägele, H., Willan, R. C., 2000. Phylogeny of Nudibranchia. *Zool. J. Linn. Soc.* 130, 83-181.
- Wenz, W., 1938-1944. Gastropoda, Teil 1, Allgemeiner Teil [pp. 1-84] und Prosobranchia [pp. 85-231]. In: Schindewolf, O. H. (Eds.), *Handbuch der Paläozoologie*. 6. Gebtrüder Bornträger, Berlin, pp. 1639.
- Wheeler, W. C., Gladstein, D. S., 1991-1998. Malign. Program and documentation. New York.
- Wilding, C. S., Mill, P. J., Grahame, J., 1999. Partial sequence of the mitochondrial genome of *Littorina saxatilis*: relevance to gastropod phylogenetics. *J. Mol. Evol.* 48, 348-359.
- Willan, R. C., 1987. Phylogenetic systematics of the Notaspidea (Opisthobranchia) with reappraisal of families and genera. *Am. Malac. Bull.* 5, 215-241.
- Wingstrand, K. G., 1985. On the anatomy and relationships of recent Monoplacophora. *Galathea Rept.* 16, 1-94.
- Winnepenningckx, B., Steiner, G., Backeljau, T., de Wachter, R., 1998. Details of gastropod phylogeny inferred from 18s rRNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9, 55-63.
- Wollscheid, E., Boore, J. L., Brown, W. M., Wägele, H., 2001. The phylogeny of Nudibranchia (Opisthobranchia, Gastropoda, Mollusca) reconstructed by three molecular markers. *Org. Diver. Evol.* 1, 241-256.
- Wollscheid, E., Wägele, H., 1999. Initial Results on the molecular phylogeny of the Nudibranchia (Gastropoda, Opisthobranchia) based on 18s rRNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13, 215-226.
- Wolstenholme, D. R., 1992. Animal mitochondrial genome: structure and evolution.

- Int. Rev. Cytol. 141, 172-216.
- Yamazaki, N., Ueshima, R., Terret, J. A., Yokobori, S., Kaifu, M., Segawa, R., Kobayashi, T., Numachi, K., Ueda, T., Nishikawa, K., Watanabe, K., Thomas, R. H., 1997. Evolution of pulmonate gastropod mitochondrial genomes: Comparisons of gene organizations of *Euhadra*, *Cepaea* and *Albinaria* and implications of unusual tRNA secondary structures. Genetics 145, 749-758.
- Yang, Z., 1996. A mon-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. Trends Ecol. Evol. 11, 367-372.
- Yang, Z., Rannala, B., 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo method. Mol. Biol. Evol. 14, 717-724.
- Yokobori, S., Pääbo, S., 1995. Transfer RNA editing in land snail mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 10432-10435.
- Yonge, C. M., 1947. The pallial organs in the aspidobranch Gastropoda and their evolution throughout the Mollusca. Phil. Trans. R. Soc. London B 232, 443-518.
- Yonow, N., Renwrantz, L., 1986. Studies on the haemocytes of *Acteon tornatilis* (L.) (Opisthobranchia: Acteonidae). J. Moll. Stud. 52, 150-155.
- Yoon, S. H., Kim, W., 2000. Phylogeny of some gastropod mollusks derived from 18s rRNA sequences with emphasis on the Euthyneura. The Nautilus 114, 84-92.
- Zilch, A., 1959-60. Gastropoda, Teil 2, Euthyneura. In: Schindewolf, O. H. (Eds.), Handbuch der Paläozoologie. 6. Gebträger Bornträger, Berlin, pp. 834.

VII.- GLOSARIO

"Ampolla": Expansión del conducto hermafrodita donde se almacena el esperma endógeno.

Aposemático: Que posee colores de aviso o señales que indican a un posible depredador que el organismo es nocivo.

Bursa copulatrix: Saco con una apertura que comunica con la vagina, donde se almacena el esperma exógeno después de la cópula y que puede tener también una función gametolítica.

Carácteres homólogos: Aquellos que son adquiridos por descendencia a partir de un antecesor común.

Carácteres homoplásicos: Aquellos que son adquiridos de forma independiente.

Cariofilidio: Estructura, tipo tubérculo, presente en el dorso de algunos miembros de Nudibranchia que posee un órgano sensorial apical rodeado de un anillo con espículas calcáreas.

Cerata: Prolongaciones de la superficie corporal dorsal presentes en algunos miembros de Nudibranchia que actúan como branquias y que en los miembros de Aeolidina poseen terminaciones de la glándula digestiva.

Cnidocisto: Célula urticante de cnidarios, que se compone de un saco de fluido en el que se encuentra un filamento largo enrollado que se dispara cuando se estimula.

Ctenidio: Órgano respiratorio presente en la cavidad del manto de los gasterópodos; está formado por un eje y series de lamelas a ambos lados.

Cuerpo dorsal: Estructura asociada al ganglio cerebral presente en Pulmonata que tiene una función neurosecretora.

Epipodio: Expansiones musculares de los laterales y de la parte superior del pie que pueden formar los parapodios en Opistobranchia y en los que puede haber todo tipo de estructuras, como papilas, tentáculos y áreas sensoriales.

Escudocefálico: Estructura anterior que cubre la cabeza de los miembros de Cephalaspidea y de algunos otros grupos de gasterópodos excavadores y que posee un surco superficial en su línea media y un par de prolongaciones laterales.

Estatocisto: Vesícula revestida con células sensoriales, que contiene cuerpos que se mueven por la acción de la gravedad y que está relacionado con la percepción del equilibrio.

Estreptoneuro: Que tiene el lazo visceral del sistema nervioso cruzado formando una figura asimétrica de un ocho.

Eutineuro: Que tiene el lazo visceral del sistema nervioso desenrollado.

Glándula del albumen: Masa glandular localizada junto al oviducto de algunos gasterópodos que proporciona un fluido extraembrionario al huevo.

Glándula cerebral: Estructura asociada al ganglio cerebral presente en Pulmonata y que tiene una función neurosecretora.

Glándula hipobranquial: Glándula situada en la superficie del manto compuesta por un epitelio glandular columnar.

Glándula opalina: Glándula que produce sustancias repelentes y que está presente en la cavidad del manto de algunos miembros de Anaspidea.

Glándula pedal: Glándula asociada al pie de los gasterópodos, que produce una sustancia mucosa que facilita el desplazamiento.

Glándula prostática: Parte del gonoducto masculino de algunos gasterópodos que produce secreciones proteicas. Puede formar parte del vaso deferente o ser un divertículo independiente con una apertura al vaso deferente.

Glándula púrpura: Glándula que produce una sustancia de color púrpura, presente en algunos miembros de Anaspidea.

Glándula sanguínea: Masa glandular folicular presente en algunos opistobranquios que se sitúan en la aorta y que puede estar asociada con la producción de amebocitos.

Grupo monofilético: Conjunto de taxones que incluye su ancestro más próximo y todos sus descendientes. Se define a partir de sinapomorfías.

Grupo parafilético: Conjunto de taxones que incluye su ancestro más próximo pero que no contiene todos sus descendientes. Se define a partir de simiomorfías.

Grupo polifilético: Es aquel en el cual el antepasado común más reciente es asignado a otro grupo y no al grupo en cuestión.

Heterostrofia: Cambio de dirección en el enrollamiento de la concha entre el estadio larvario y el adulto.

Hiponoto: Borde exterior del pie de los pulmonados sistelomatóforos.

Manto: Tegumento que cubre la masa visceral de los moluscos; separa la concha en aquellos moluscos que la posean.

Neumostoma: Poro respiratorio formado por la fusión del borde del manto con el cuello de los pulmonados, situado normalmente en el lado derecho del cuerpo.

Nota: Parte del dorso, a modo de escudo, presente en los pulmonados y en los opistobranquios que carecen de concha o tienen una concha interna. En los pulmonados

nados puede separarse de la parte ventral (hiponoto) mediante un surco.

Opérculo: Estructura córneo o calcárea que cierra la apertura de la concha de muchos gasterópodos.

Órgano de Hancock: Órgano quimiorreceptor presente en Cephalaspidea situado entre el pie y el escudo cefálico .

Osfradio: Órgano quimiorreceptor situado en la cavidad del manto cerca del ctenidio.

Palpos labiales: Apéndices triangulares situados a ambos lados de la boca de algunos gasterópodos, que los utilizan para manejar la comida.

Parapodios: Expansiones laterales del pie presentes en algunos miembros de Opistobranchia que pueden servir para la natación.

Procerebro: Estructura asociada al ganglio cerebral presente en Pulmonata, que tiene una función neurosecretora.

Propodio: Parte anterior del pie de los gasterópodos.

Rádula: Banda membranosa con filas longitudinales de dientes quitinosos situada en la cavidad bucal de la mayoría de los gasterópodos.

Receptáculo seminal: Saco para la recepción y almacenamiento del esperma exógeno presente en algunos gasterópodos.

Región control: Zona no codificante que contiene el inicio de la transcripción y replicación del genoma mitocondrial de los metazoos.

Rinóforo: Tentáculo quimiorreceptor par situado en la región cefálica de los opistobranquios.

Secuencias ortólogas: Que descienden de la secuencia de un gen ancestral que no ha sufrido duplicación.

Simplesiomorfía: Carácter ancestral compartido.

Sinapomorfía: Carácter derivado compartido.

Sistema reproductor androdiáulico: Modalidad de sistema reproductor en el que la vagina y el oviducto comparten un único conducto, mientras que el vaso deferente permanece independiente.

Sistema reproductor monoáulico: Modalidad de sistema reproductor en el que el vaso deferente, la vagina y el oviducto comparten un único conducto.

Sistema reproductor oodiáulico: Modalidad de sistema reproductor en el que la vagina y el vaso deferente comparten un único conducto , mientras que el oviducto permanece independiente.

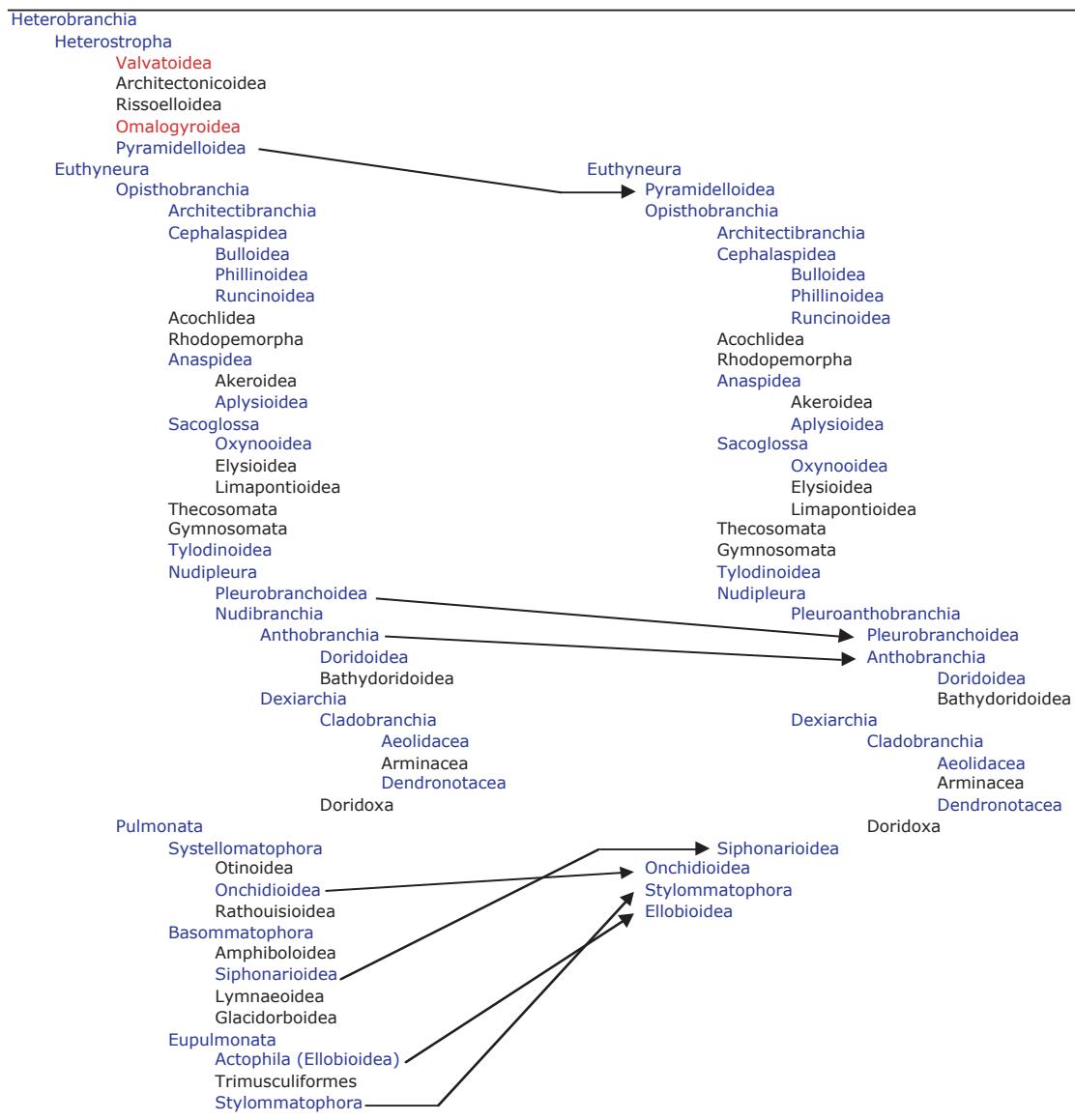
Sistema reproductor triáulico: Modalidad de sistema reproductor en el que el vaso deferente, la vagina y el oviducto tienen cada uno un conducto independiente.

Transición: Proceso por el cual un nucleótido purina (A y G) se sustituye por otra purina o un nucleótido pirimidina (C y T) se sustituye por otra pirimidina.

Transversión: Proceso por el cual un nucleótido purina se sustituye por una pirimidina y viceversa.

VIII.- APÉNDICE

Apéndice 1. Clasificación actual de Heterobranchia (izquierda) (Beesley, Ross y Wells, 1998; Wägele y Willan, 2000; Schrödl *et al.*, 2001; Mikkelsen, 2002) y clasificación de Euthyneura propuesta basada en los datos evolutivos recuperados en esta tesis (derecha). Las flechas indican los cambios entre ambas clasificaciones. En azul se indican los taxones de los cuales se ha analizado algún representante en esta tesis. En rojo se indican los taxones de heterostrofos no representados en esta tesis pero de los que existe información molecular publicada previamente y que ha sido considerada en los análisis (ver texto).



Apéndice 2. Lista de especies consideradas en los análisis filogenéticos de la presente tesis clasificadas según la propuesta del apéndice 1.

Euthyneura
Pyramidelloidea
<i>Pyramidella dolabrata</i> (Linné, 1758)
Opisthobranchia
Architectibranchia
<i>Micromelo undata</i> (Brugière, 1792)
<i>Pupa strigosa</i> (Gould, 1859)
Cephalaspidea
Bulloidea
<i>Haminoea callidegenita</i> (Gibson & Chia, 1989)
Phillinoidea
<i>Philine aperta</i> (Linné, 1767)
<i>Chelidonura africana</i> Pruvot-Fol, 1953
Runcinoidea
<i>Runcina coronata</i> (de Quatrefages, 1844)
Anaspidea
Aplysioidea
<i>Aplysia punctata</i> (Cuvier, 1803)
<i>Petalifera petalifera</i> (Rang, 1828)
<i>Dolabrifera dolabrifera</i> (Cuvier, 1817)
Sacoglossa
Oxynooidea
<i>Ascobulla fragilis</i> (Jeffreys, 1856)
Tylodinoidea
<i>Tylodina perversa</i> (Gmelin, 1791)
<i>Umbraculum mediterraneum</i> (Lamarck, 1812)
Nudipleura
Pleuroanthobranchia
Pleurobranchoidea
<i>Berthella plumula</i> (Montagu, 1803)
<i>Bathyberthella antarctica</i> Willan & Bertsch, 1987
<i>Pleurobranchaea meckeli</i> (de Blainville, 1826)
Anthobranchia
Doridoidea
<i>Ancula gibbosa</i> (Risso, 1818)
<i>Doris pseudoargus</i> (Rapp, 1827)
<i>Roboastra europea</i> García-Gómez, 1985
<i>Tambja ceutae</i> Garcia-Gomez & Ortea, 1988
<i>Triopha maculata</i> MacFarland, 1905
<i>Chromodoris krohni</i> (Vérany, 1846)
<i>Platydoris argo</i> (Linné, 1767)
<i>Rostanga pulchra</i> MacFarland, 1905
<i>Discodoris confusa</i> Ballesteros, Llera & Ortea 1985
<i>Cadlina laevis</i> (Linné, 1767)
<i>Aldisa banyulensis</i> Pruvot-Fol, 1951
<i>Onchidoris muricata</i> (Müller, 1776)
Dexiarchia
Cladobranchia
Aeolidacea
<i>Aeolidia papillosa</i> (Linné, 1761)
<i>Facelina bostoniensis</i> (Couthouy, 1838)
<i>Tergipes tergipes</i> (Forskal, 1775)
<i>Flabellina affinis</i> (Gmelin, 1791)
<i>Favorinus branchialis</i> (Rathke, 1806)
<i>Cuthona ocellata</i> (Schmekel, 1966)
<i>Eubranchus</i> sp.
Dendronotacea
<i>Tethys fimbria</i> (Linné, 1767)
<i>Dendronotus frondosus</i> (Ascanius, 1774)
<i>Hancockia uncinata</i> (Hesse, 1872)
Siphonarioidea
<i>Siphonaria pectinata</i> (Linné, 1758)
Onchidioidea
<i>Onchidella celtica</i> (Cuvier, 1817)
Styliommatophora
<i>Helix aspersa</i> Müller 1774
<i>Cepaea nemoralis</i> (Linné, 1758)
<i>Elonaquimperiana</i> (Férussac, 1821)
<i>Rumina decollata</i> (Linné, 1758)
<i>Albinaria coerulea</i> (Rossmassler, 1835)
Ellobioidea
<i>Myosotella myosotis</i> (Draparnaud, 1801)

IX.- ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIC	Criterio de información de Akaike
ARNm	Ácido ribonucléico mensajero
ARNr	Ácido ribonucléico ribosómico
ARNt	Ácido ribonucléico de transferencia
<i>atp6 y 8</i>	Genes que codifican para las subunidades 6 y 8 de la ATPasa mitocondrial
BI	Inferencia bayesiana
pb	Pares de bases
BPP	Probabilidad posterior bayesiana
<i>cob</i>	Gen que codifica para el citocromo b
<i>cox1, 2 y 3</i>	Genes que codifican para las subunidades 1, 2 y 3 de la citocromo oxidasa
dNTP	Desoxinucleótido
GTR	“General time reversible model”
ITS	Espaciador transcripto interno
MCMCMC	“Metropolis-couple Markov Chain Monte Carlo”
ME	Evolución mínima
MgCl ₂	Cloruro magnésico
MgSO ₄	Sulfato magnésico
ML	Máxima verosimilitud
μM	Micromolar
mM	Milimolar
MP	Máxima parsimonia
<i>nad1-6 y 4L</i>	Genes que codifican para las subunidades 1-6 y 4L de la NADH deshidrogenasa
NJ	Unión por vecindad
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RGC	Cambios genómicos inusuales
REV	Modelo reversible general
<i>rrnL</i>	Gen que codifica para la subunidad grande del ácido ribonucléico ribosómico
<i>rrnS</i>	Gen que codifica para la subunidad pequeña del ácido ribonucléico ribosómico
TBR	“Tree bisection and reconnection”
trnA	Ácido ribonucléico de transferencia Alanina
trnC	Ácido ribonucléico de transferencia Cisteína
trnD	Ácido ribonucléico de transferencia Ácido Aspártico
trnE	Ácido ribonucléico de transferencia Ácido Glutámico
trnF	Ácido ribonucléico de transferencia Fenilalanina
trnG	Ácido ribonucléico de transferencia Glicina
trnH	Ácido ribonucléico de transferencia Histidina
trnI	Ácido ribonucléico de transferencia Isoleucina
trnK	Ácido ribonucléico de transferencia Lisina
trnL(ucn)	Ácido ribonucléico de transferencia Leucina
trnL(uur)	Ácido ribonucléico de transferencia Leucina

trnM	Ácido ribonucléico de transferencia Metionina
trnN	Ácido ribonucléico de transferencia Asparagina
trnP	Ácido ribonucléico de transferencia Prolina
trnQ	Ácido ribonucléico de transferencia Glutamina
trnR	Ácido ribonucléico de transferencia Arginina
trnS(ucn)	Ácido ribonucléico de transferencia Serina
trnS(agn)	Ácido ribonucléico de transferencia Serina
trnT	Ácido ribonucléico de transferencia Treonina
trnV	Ácido ribonucléico de transferencia Valina
trnY	Ácido ribonucléico de transferencia Tirosina
trnW	Ácido ribonucléico de transferencia Triptófano
Ts	Transición
Tv	Transversión
UPGMA	"Unweighted-pair group method with arithmetic means"
WPGMA	"Weighted-pair group method with arithmetic means"