



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

03081
3
2 eje.

**INFERENCIA FILOGENETICA DEL PHYLUM
PLATYHELMINTHES USANDO SECUENCIAS
GENICAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A :

ANDRES CAMPOS LOPEZ

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedico esta tesis y el esfuerzo realizado durante el desarrollo de la misma a

Laura Camarena

que en todo momento y con su valiosa amistad me otorgó su apoyo para para realizar y concluir este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fué realizada en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., bajo la dirección del Dr. Juan Pedro Laclette San Román, a quién agradezco las oportunidades y la formación académica recibida durante el desempeño del presente trabajo.

Agradezco la revisión del manuscrito por parte del jurado de sinodales formado por el Dr. Juan Pedro Laclette San Román, Dr. Michael P. Cummings, Dra. Anna Flisser Steinbruch, Dr. Rafael Lamothe Argumedo, Dr. Antonio Lazcano Araujo, , Dr. Daniel Piñero Dalmau y Dra. Carmen Gómez Eichelmann, quienes amablemente aportaron comentarios y sugerencias para el mejoramiento de la presentación del trabajo.

Agradezco a las personas que de alguna manera ayudaron a que el proyecto se llevara a cabo. En especial al Dr. Michael P. Cummings quién desde el primer momento se mostró interesado en el trabajo y colaboró en los análisis de reconstrucción filogenética. A Alan Fauconnier por la realización del banco genómico de *Taenia crassiceps*. A José Luis Reyes por la obtención de la secuencia parcial del gen de rRNA 18S de *Taenia crassiceps*. A Rosa Navarro por las secuencias parciales de los genes de rRNA 18S de *Taenia solium* y de *Posthodiplostomum minimum*. Al Dr. Charles Shomaker por su hospitalidad y sus consejos académicos. Al Dr. Rafael Lamothe Argumedo y al Dr. Gerardo Pérez Ponce de León por su ayuda desinteresada en la obtención e identificación de algunos de los especímenes empleados en este trabajo de investigación, por sus comentarios y consejos y por la bibliografía aportada.

Quiero agradecer de manera muy especial al Dr. Michael P. Cummings por su amistad y hospitalidad así como por los formación recibida durante mi estancia en su laboratorio.

Agradezco a todos mis compañeros y amigos que estuvieron o están en el laboratorio: Alan Fauconnier, José Luis Reyes, Rosa Navarro, José Vázquez, Dayana Desiré Rodríguez, Benjamín Álvarez, Patricia De La Torre, por la compañía y el apoyo que me otorgaron desinteresadamente.

Agradezco a Irene, John, Patrick, Hemma y Tao por su amistad y por los momentos académicos que compartimos durante el invierno de 1991-92.

Asimismo, agradezco la ayuda de todas aquellas personas que de alguna manera han mostrado interés por mi formación académica.

**PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF THE PLATYHELMINTHES
BASED ON 18S RIBOSOMAL, ACTIN AND α -TUBULIN SEQUENCES**

ABSTRACT

Nucleotide sequences of 18S ribosomal RNA from 63 species of Platyhelminthes were used in parsimony analysis and the phylogenetic trees were compared with the hypothesis on evolution of flatworms. Catenulids and polycladids appear as the earliest diverging groups and together are sister group to the rest of platyhelminths. "Dalyellioida" and "Typhloplanoida" do not appear to be monophyletic, and therefore, Rhabdocoela and Doliopharyngiophora do not appear to be real monophyletic. Unexpectedly, monogeneans appear as the sister group to the rest of Neodermata and this result is supported by an analysis based on combined data for sequences of α -tubulin, actin and 18S ribosomal genes resulted in a single tree also placing monogeneans. Within Trematoda, Aspidobothrii is the sister group of Digenea, which appears to consist of two major clades. Cestodes appear monophyletic, and Gyrocotilideans are the sister group of Amphilinidea and Eucestoda. Our trees support the hypothesis that parasitism evolved twice in the Platyhelminthes, once in the ancestor to "Dalyellioida" parasites and again in the ancestor to Neodermata.

Vo. Bo.



Dr. Juan Pedro Laclette San Román
Director de Tesis

RESUMEN

La gran diversidad de los Platyhelminthes (gusanos planos) refleja la experiencia evolutiva de un grupo de organismos animales, con un diseño del cuerpo poco familiar para el entendimiento humano. En las últimas décadas la clasificación de este phylum ha sufrido múltiples cambios y no todos los autores están de acuerdo sobre cuál es el mejor sistema a adoptar. El estudio de la filogenia de los platelmintos se ha basado únicamente en las especies extantes puesto que debido a su cuerpo blando, el registro fosil es extremadamente pobre. Las hipótesis disponibles actualmente son contradictorias y han sido motivo de gran discusión desde hace mucho tiempo.

En los últimos años, el RNA ribosomal 18S (rRNA 18S) ha sido usado como un buen marcador en estudios de inferencia filogenética. Esta molécula presenta regiones conservadas y regiones variables que pueden ser seleccionadas de acuerdo a la distancia filogenética de los organismos a comparar.

En el presente trabajo se obtuvieron secuencias parciales del gen que codifica para el rRNA 18S de seis especies de platelmintos: *Geoplana mexicana* (Tricladida), *Octomacrum mexicanum* (Monogenea), *Posthodiplostomum minimum* (Digenea), *Echinococcus granulosus* (Eucestoda), *Taenia crassiceps* y *Taenia solium* (Eucestoda). Estas secuencias fueron alineadas con otras cincuenta y siete especies de platelmintos, dos más de nemertinos y una de un nemátodo, obtenidas de las bases de datos. Con todas las secuencias, se llevaron a cabo análisis computacionales y se produjeron árboles filogenéticos.

Los resultados fueron comparados con los esquemas de la evolución de los platelmintos propuestos hasta ahora. La resolución de nuestros datos es tal que las especies se agrupan sin que exista una mezcla de los principales grupos tradicionales: Turbellaria, Monogenea, Trematoda y Cestoda. Sin embargo, las relaciones entre los taxa superiores así como dentro de cada uno de ellos difieren con algunos esquemas actuales. Nuestros resultados apoyan la idea de que los turbeláridos tradicionales constituyen un grupo parafilético. Los grupos colocados más basalmente en los platelmintos son Polycladida y Catenulida formando un grupo monofilético. El grupo hermano de Neodermata, Ehlers, 1985, está constituido por el resto de los turbeláridos tradicionales: Dalyellioida, Typhloplanoida, Acoela, Lecithoepitheliata y Seriata. La agrupación de las especies de Dalyellioida y Typhloplanoida sensu Ehlers, 1985, estudiadas por nosotros, indican que ambos grupos son parafiléticos o polifiléticos, sin embargo, concuerda con la clasificación tradicional de los turbeláridos neorhabdocoelos (Dalyellioida, Temnocephala, Typhloplanoida y Kalyptorhynchia), sensu Symon, 1951.

La posición de Monogenea fué especialmente estudiada empleando conjuntamente, secuencias de rRNA 18S, α -tubulina y Actina. Los resultados sugieren que Monogenea es el grupo hermano de Trematoda y Cestoda. Si bien Neodermata (Ehlers, 1985) aparece como monofilético, Rhabdocoela (Brooks, 1989a), Rhabdocoela y Doliopharyngiophora (Ehlers, 1985) son grupos polifiléticos. Esto último, apoya la idea de que el parasitismo pudo haber surgido independientemente en Neodermata y en Dalyellioida, es decir que surgió al menos dos veces en el phylum de los platelmintos.

INTRODUCCION

El Phylum Platyhelminthes

Los metazoarios bilaterales con cefalización más simple son los pertenecientes al phylum Platyhelminthes. Se trata de gusanos planos de cuerpo blando y aplanados dorsoventralmente. Presentan simetría bilateral y tienen órganos ya conformados por tejidos y organizados en sistemas. Al ser organismos acelomados triblásticos, el mesénquima llena el espacio entre la gastrodermis (diferentes órganos internos) y la epidermis (pared del cuerpo). La presencia del mesodermo como una verdadera "hoja embrionaria" hace que tanto el endodermo como el ectodermo se encuentren mejor definidos.

Los platelmintos tienen gran capacidad adaptativa y una extraordinaria diversidad en sus formas de vida. Se pueden encontrar especies de vida libre y especies simbióticas entre las que se encuentran tanto parásitos como otros tipos de asociaciones, vgr: comensalismo, mutualismo, etc. Muchos de ellos son parásitos del hombre y de sus animales domésticos por lo que se les ha estudiado desde hace más de un siglo.

Se calcula que se conocen alrededor de 15,000 especies de platelmintos (Margulis y Schwartz, 1976). Su tamaño corporal varía enormemente, pudiendose encontrar gusanos de hasta 20 metros de largo (*Diphyllobothrium latum*). Los más pequeños son apenas perceptibles por el ojo humano. La mayoría de las especies de platelmintos son hermafroditas, sin embargo al menos en las formas de vida libre rara vez ocurre la autofecundación. En la mayoría de

los platelmintos de vida libre se producen huevos de los cuales emergen diminutos gusanos con forma adulta. Otros platelmintos parásitos presentan ciclos reproductivos muy complejos en los que es posible encontrar toda una serie de estadios larvales. Finalmente, algunos platelmintos son partenogenéticos con individuos hembras que se reproducen asexualmente.

Puesto que los platelmintos son los animales más simples con simetría bilateral y los primeros en presentar tres capas embriológicas definidas dentro de los acelomados, han sido considerados como el grupo de aparición más temprana en la rama de los metazoarios (exceptuando Porifera y Celenterata) (Dobzhansky, et al., 1982; Lamothe-Argumedo, 1983; Field, et al., 1988; Willmer, 1990; Turbeville, et al., 1992; Morris, 1993). Algunas evidencias indican que los primeros metazoarios debieron aparecer hace aproximadamente 800-1,000 millones de años. Si esto es correcto el phylum Platyhelminthes emergió en el Precámbrico mucho antes de la aparición de la fauna perteneciente a la formación australiana de Ediacara (entre 580-560 millones de años) (Morris, 1993).

Taxonomía y Clasificación del Phylum platyhelminthes

La taxonomía y los esquemas filogenéticos propuestos para los platelmintos están basados en estudios de sus ciclos de vida, de su estructura anatómica, de su fisiología y embriología de las especies extantes. Solo recientemente han comenzado a surgir estudios de sistemática molecular.

En los últimos años la sistemática de los platelmintos ha sufrido muchas modificaciones y no todos los autores están de

acuerdo sobre cuál es el mejor sistema a adoptar. El gran interés por la taxonomía y filogenia de este taxa se refleja en la gran cantidad de publicaciones recientes al respecto (Gibson, 1981, 1987; Vik, 1981; Malmberg, 1981, 1986; Llewellyn, 1981, 1986; Brooks, 1982; Malmberg, 1982; Mackiewicz, 1982; Stunkard, 1983; Ohama, et. al. 1983; Ax, 1984, 1985, 1987; Bazitov, 1984; Ehlers, 1984, 1985, 1986, Brooks, et al., 1985a, 1985b; O'Grady, 1985; Sopott-Ehlers, 1985; Smith, et al., 1986; Mamkaev, 1986; Hendelberg, 1986; Williams, 1986; Smith y Tyler, 1986; Qu, L. H., et. al. 1986; Joffe, 1987; Joffe, et al., 1987; Hori, et al., 1988; Joffe y Chubrik, 1988; Field, et. al. 1988; Rohde, 1988, 1990, 1991; Brooks, 1989a, b; Brooks, et al., 1989; Joffe y Kotikova, 1989; Brooks, et al., 1991; Ivanov, 1991; Justine, 1991 a, 1991b; Ali, et. al., 1991; Baverstock, et. al., 1991; Korbsrisate, et al., 1991; Brooks, 1992; Pearson, 1992; Gusev, 1992; Turbeville, et. al., 1992; Riutort, et. al., 1992; Jondelius y Thollesson, 1993; Riutort, et. al., 1993; Blair, 1993; Blair and Barker, 1993; Barker, et. al., 1993; Johnston, et. al., 1993; Katayama, et. al., 1993; Rhode, et. al., 1993; Lumb, et al., 1993). Los diferentes esquemas propuestos acerca de la evolución del phylum han sido grandemente discutidos y son contradictorios.

Hasta hace algunas decadas se consideraba que el phylum Platyhelminthes estaba compuesto de solo tres clases: Turbellaria, Trematoda y Cestoda. Actualmente, el número de clases u otras categorías superiores es mucho mayor y varia entre los distintos autores. Sin embargo, podemos distinguir ciertos taxa superiores reconocidos por la mayoría de los autores: Turbellaria,

Aspidobothrea, Monogenea, Digenea, Gyrocotyle, Amphinilida y Cestoda. Cabe hacer notar que en los últimos años se ha propuesto insistentemente que Turbellaria es un agrupamiento artificial (Ehlers, 1986; Ax, 1987). A continuación se explican algunas de las ideas evolutivas principales al respecto de los taxa superiores de platelmintos.

Turbellaria

Las ideas más aceptadas acerca del origen del phylum Platyhelminthes están de acuerdo en que Turbellaria representa un grupo parafilético o polifilético (Ehlers, 1986, Ax, 1987). Se ha hecho énfasis en que este agrupamiento es artificial y por lo tanto debe de ser eliminado del sistema filogenético de los Platyhelminthes. Los esquemas de clasificación de los grupos que tradicionalmente constituían a los turbelaridos son variables. El reagrupamiento de las especies de turbelaridos tradicionales (Ehlers, 1985, 1986) presenta una serie de categorías muy diferentes a los esquemas propuestos anteriormente (Figs. 1 y 2).

Figura 1. Clasificación de la clase Turbellaria propuesta por Hyman (1951).

=====

Clase. Turbellaria

Orden 1. Acoela

Orden 2. Rhabdoceola

Suborden 1. Notandropora o Catenulida

Suborden 2. Opisthandropora o Macrostomida

Suborden 3. Lecithophora o Neorhabdoceola

Sección 1. Dalyellioida

Sección 2. Typhloplanoida

Sección 3. Kalyptorhynchia

Sección 4. Temnocephalida

Orden 3. Alloecoela

Suborden 1. Archoophora

Suborden 2. Lecithoepitheliata

Suborden 3. Cumulata o Holocoela

Suborden 4. Seriata

Orden 4. Tricladida

Suborden 1. Maricola o Retrobursalia

Suborden 2. Paludicola o Probursalia

Suborden 3. Terricola

Orden 5. Polycladida

Suborden 1. Acotylea

Sección 1. Craspedommata

Sección 2. Schematommata

Sección 3. Emprosthommata

Suborden 2. Cotylea

=====

Figura 2. Clasificación de la clase Turbellaria propuesta por Meixner (1938).

- =====
Clase. Turbellaria
- Orden 1. Acoela
 - Orden 2. Catenulida (sinónimo = Notandropora)
 - Orden 3. Macrostomida (sinónimo = Opisthandropora)
 - Orden 4. Polycladida
 - Orden 5. Alloecoela
 - Suborden 1. Archoophora
 - Suborden 2. Lecithoepitheliata
 - Suborden 3. Cumulata (sinónimo = Holocoela)
 - Suborden 4. Seriata
 - Sección 1. Proseriata
 - Sección 2. Tricladida
 - Tribu 1. Maricola
 - Tribu 2. Paludicola
 - Tribu 3. Terricola
 - Orden 6. Neorhabdocoela (sinónimo = Lecithophora)
 - Suborden 1. Dalyellioida
 - Suborden 2. Typhloplanoida
 - Suborden 3. Kalyptorhynchia
 - Orden 7. Temnocephalida
- =====

En el presente trabajo de tesis adoptamos la terminología de una de las clasificaciones recientes de mayor uso en la literatura (Ehlers, 1985). Entre las limitaciones de esta clasificación es que no incluye grupos como Lecithoepiteliatha ni a Prolecithophora. Aunque en esta clasificación Kalyptorhinchia es considerado un grupo monofilético incluido dentro de "Typhloplanoida" y Temnocephalidea y Udonellidae, también como grupos monofiléticos e incluidos dentro de "Dallyellioida". Ehlers mantiene abierta la posibilidad de que "Typhloplanoida" y "Dallyellioida" sean grupos parafiléticos y los nombra entre comillas (sistema que emplearemos en este trabajo) o marcándolos con un signo de interrogación (?) (Ehlers, 1985, 1986).

Finalmente, es fácil imaginar la complejidad del problema de la clasificación de los Turbellaria, si consideramos que se tratan de taxa mucho más separados entre sí, que por ejemplo, los taxa incluidos en el phylum Chordata (vertebrados). Esto ha sido sugerido por un estudio basado en datos moleculares (Riutort, et al., 1993).

Neodermata (Monogenea, Trematoda, y Cestoda)

Los Neodermata son todos parásitos y han recibido mayor atención debido a su importancia económica y médica. Se han generado preguntas importantes relacionadas a su evolución, sin embargo, muchas de estas preguntas continúan sin ser contestadas.

Existen al menos seis esquemas diferentes para los organismos incluidos en Neodermata (Monogenea, Trematoda, y Cestoda) sensu Ehlers (1985) (Fig. 3). Sin embargo, existen dos nomenclaturas para

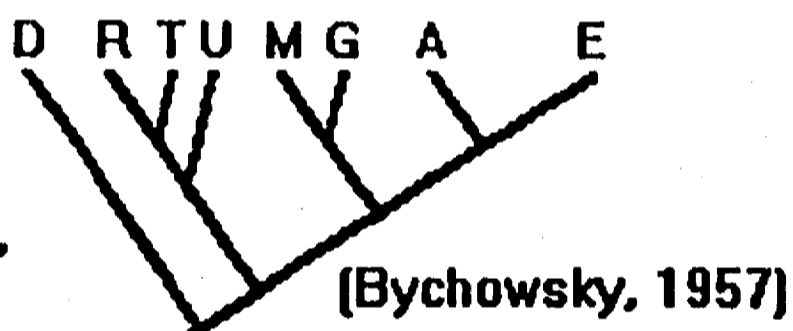
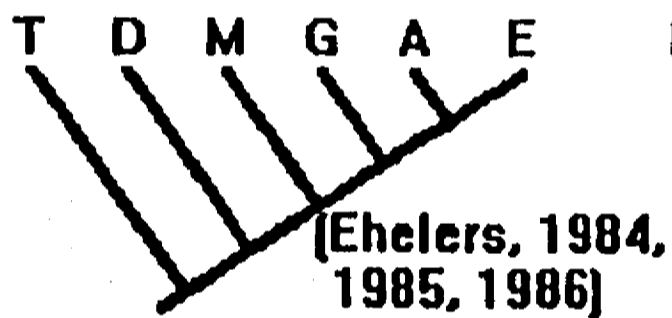
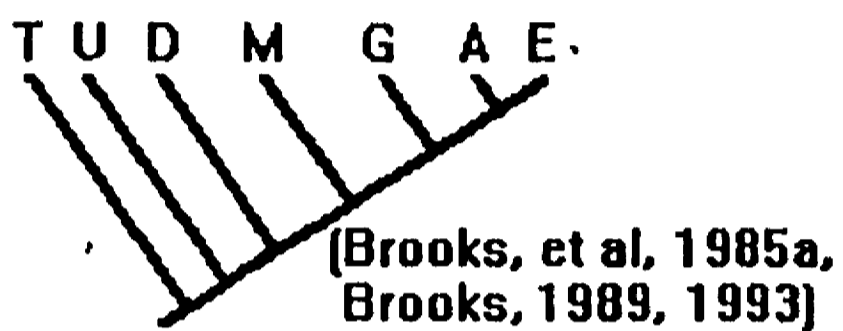
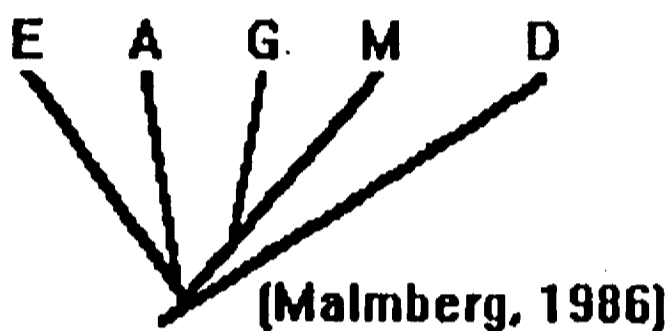
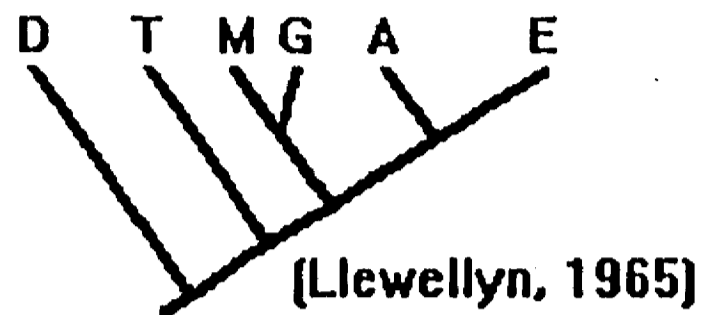
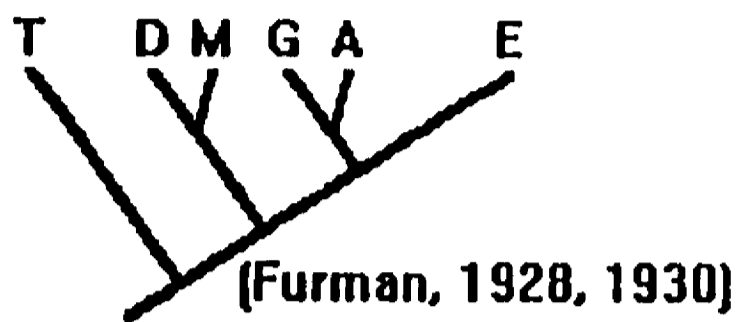


Fig. 3 Algunas de las hipótesis en conflicto que han sido propuestas para los grupos mayores de los parásitos del phylum Platyhelminthes. A, Amphilinidea; D, Digenea; E, Eucestoda; G, Gyrocotylidea; M, Monogenea; T, Temnocephalidea; R, Rhabdocoela (turbellaria); U, Udonellidea. (Modificada de Baverstock, et al., 1991)

los taxa mayores de Neodermata que han sido propuestas recientemente y que por ello son las más empleadas. Una es la nomenclatura propuesta por Ehlers (1985, 1986) (Fig. 4) y la otra es la propuesta por Brooks (1989a; Brooks y McLennan, 1993) (Fig. 5). Como se mencionó arriba, Ehlers incluye en su análisis a casi todos los grupos de platelmintos (excepto Lecithoepitheliata y Prolecithophora) mientras que Brooks solo estudia a los grupos parásitos. Ambos esquemas son muy similares a pesar de que fueron propuestos de manera independientemente. Por ello hay coincidencias y diferencias tanto en la terminología como en la organización de los grupos.

Por ejemplo, generalmente se acepta que Gyrocotylidae, Amphilinidea y Eucestoda tienen un origen monofilético. Sin embargo, las relaciones propuestas para estos grupos varían en ambos autores. Ehlers coloca a Gyrocotylidea, Amphilinidea, Caryophyllidea y Eucestoda en el clado Cestoda, mientras que Brooks y Brooks y McLennan agrupan a Gyrocotylidea, Amphilinidea y Eucestoda en el clado Cestodaria. Es decir que Cestoda *sensu* Ehlers es equivalente a Cestodaria *sensu* Brooks, pero el esquema filogenético es diferente entre ambos pues para Brooks Caryophyllidea está incluido en Eucestoda (Fig 4 y 5). La confusión en la nomenclatura es mayor si consideramos otras clasificaciones. Por ejemplo, el mismo nombre "Cestodaria" es usado por Schmidt (1986) para agrupar exclusivamente a Gyrocotilydea y Amphilinidae. Las implicaciones filogenéticas de los diferentes esquemas son importantes, baste mencionar que para Schmidt (1986) el clado formado por Gyrocotilydea-Amphilinidae es el grupo hermano de

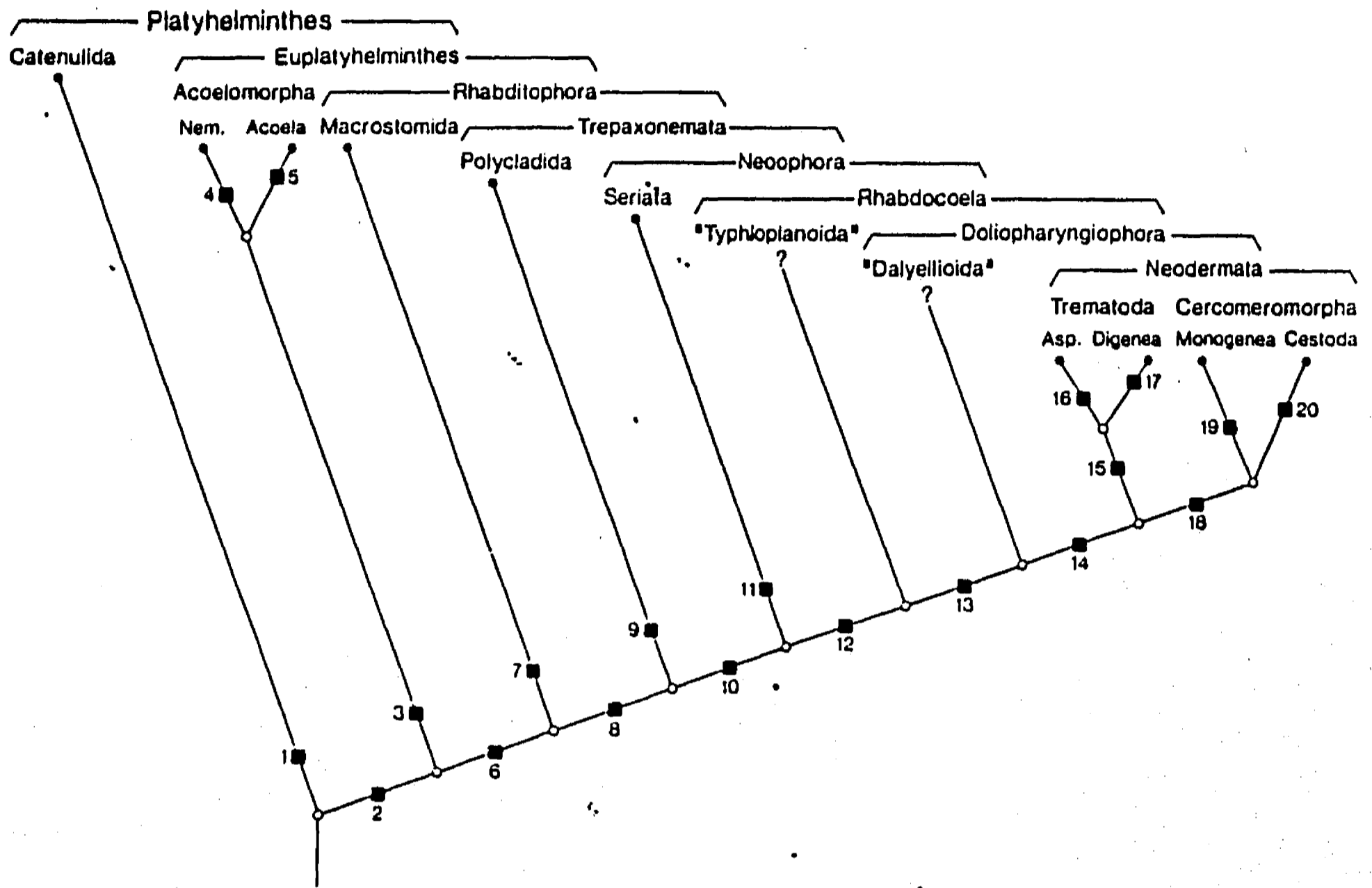


Fig. 4 Relaciones filogenéticas entre los principales taxa del phylum Platyhelminthes (excluyendo Lecithoepitheliata y Prolecithophora). Asp, Aspidobotrii; Nem, Nemertodermatida. Los cuadros negros son supuestas autopomorfias, indicando la monofilia del taxa. (Tomada de Ehlers, 1985 (ver artículo))

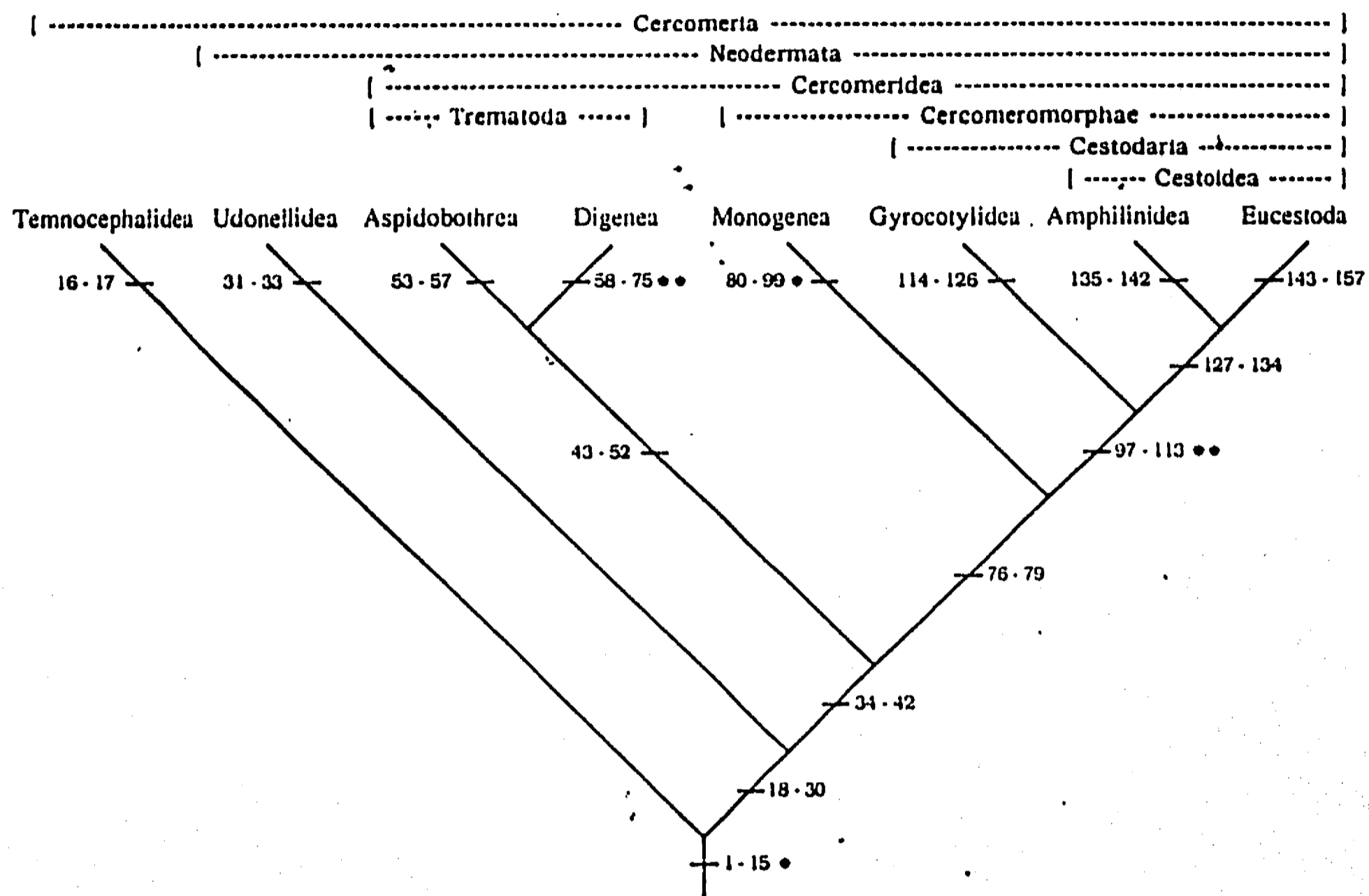


Fig. 5 Arbol filogenético con las relaciones entre los taxa mayores de los grupos parásitos del phylum Platyhelminthes. Los numeros en las ramas representan a los caracteres morfológicos sinapomórficos que apoyan a cada uno de las ramas. El árbol esta basado en 154 caracteres, tres de los cuales son homoplasias, dando una longitud total de 157 pasos. Las ocurrencias de los caracteres homoplásticos están indicados por (*). (Tomada de Brooks y McLennan, 1993)

Eucestoda mientras que para Ehlers y para Brooks y McLennan Gyrocotilydea es el grupo hermano del clado Amphilinidae-Eucestoda.

También existen coincidencias en la nomenclatura empleada por estos autores: el taxa formado por Monogenea y Cestoda, *sensu* Ehlers ó por Monogenea y Cestodaria, *sensu* Brooks, recibe el nombre de Cercomeromorphae tanto por ambos autores (Fig. 4 y 5). Igualmente, Ehlers y Brooks emplean el nombre Trematoda para agrupar a Aspidobothrii y Digenea.

Ehlers emplea el nombre Neodermata para agrupar a Trematoda y a Cercomeromorphae (Fig. 4). Brooks, por su parte, coloca a Udonellidea como grupo hermano de Cercomeridae y este nuevo taxa lo denomina Neodermata (Fig. 5). Es decir, que el nombre Neodermata, *sensu* Ehlers, es equivalente a el nombre Cercomerida, *sensu* Brooks, excepto por la posición de Udonellida. Por lo tanto, el nombre de Neodermata no es equivalente en ambos autores.

Finalmente, Brooks acomoda a Temnocephalidae como el grupo hermano de Neodermata agrupándolos en el taxa Cercomeria. Este último punto tampoco tiene equivalencia en ambos esquemas puesto que Ehlers no considera solo a Temnocephalida como grupo hermano de Neodermata sino que incluye a Temnocephalida y Udonellida en el taxa "Dalyellioida". Ehlers agrupa en Doliopharyngiophora a los "Dalyellioida" y Neodermata y en Rhabdozoela (que incluye a Kalyptorhynchia) a "Typhloplanidae" y Doliopharyngiophora.

Cabe aclarar que decidimos adoptar el esquema y la nomenclatura de Ehlers por que en su análisis incluye a casi todos los taxa de platelmintos (ver arriba), y no porque estemos de acuerdo con su propuesta ni por que nuestros resultados coincidan cabalmente con él.

Monogenea

El trabajo de Bychowsky (1961) representa una importante aportación en el estudio de las relaciones filogenéticas de los Monogenea. En ese trabajo queda explícito el origen monofilético del grupo y su división interna en dos linajes principales conocidos como Monopisthocotylidea y Polyopisthocotylea, los cuales son ampliamente aceptados. Hace algunos años, Llewelin hizo surgir una controversia al respecto que al final se debió más a una confusión de nomenclatura que a una contradicción real en las conclusiones de ambos autores (Llewelin, 1981). En resumen, se acepta generalmente que Monogenea es un grupo monofilético (Bychowsky, 1961; Llewelin 1965, 1981, 1986; Ehlers, 1985, 1986; Brooks, 1989a, 1989b; Brooks y McLennan, 1993).

Solo algunos resultados de estudios ultraestructurales de la espermiogénesis de estos parásitos, han sugerido que Monogenea pudiera no ser monofilético (Justine, 1991). Esta posibilidad fué propuesta al no encontrar caracteres sinapomórficos en los espermatozoarios de Monopisthocotylidea y Polyopisthocotylea, encontrando por el contrario, caracteres sinapomórficos para cada uno de los grupos (Justine, 1991). En la misma dirección, resultados basados en análisis de secuencias parciales de rRNA 18S

(RNA ribosomal 18S) de monogéneos y de otros platelmintos apoyan esta idea (Baverstock, et al., 1991; Blair, 1993; Rohde, 1993), aunque a nuestro juicio, los análisis no poco concluyentes (ver adelante).

Digenea

El origen monofilético de Trematoda (Aspidobothrii y Digenea) es ampliamente aceptado (Gibson, 1981, 1987; Brooks, et al., 1985b; Ehlers, 1985, 1986; Rhode, et al., 1993). Existen evidencias recientes que apoyan la idea de que Aspidobothria es el grupo hermano de Digenea (Ax, 1987; Gibson, 1987; Blair, 1993). Uno de los puntos en discusión acerca de la evolución de los digenéos es la cuestión de las familias extantes de Digenea y de su orden de aparición; la polémica se refiere a cual de las familias (si alguna) es el grupo hermano del resto. Gibson (1987) ha realizado una revisión propone que Paramphistomidae es el grupo de aparición más temprana. En cambio, Brooks (1985) ha indicado que Heronimidae es el grupo hermano del resto de los digenéos. Gibson (1987) descarta esta posibilidad puesto que considera que los heronímidos son especies aberrantes que se han especializado para ciertas condiciones y un habitat muy particular.

Cestoda

Al respecto de Cestoda, Bychowski (1957) propuso que Gyrocotylida pertenece a una clase independiente de los platelmintos parásitos y que su posición filogenética es intermedia entre Monogenea y Eucestoda, pero muy posiblemente más cercana a

Monogenea. Al igual que Gyrocotylida, Amphilinida ha sido propuesta como un clado diferente (ver arriba). El tercer grupo que conforma a Cestoda es Eucestoda que se consideran como un grupo de monofilético (Ax, 1987; Brooks, 1989a, 1989b; Brooks, et al., 1991).

En cuanto a los ordenes de Eucestoda, Stunkard (1967, 1983) ha propuesto que Tetrphyllidea junto con Tetrarhynchia y Pseudophyllidea han derivado del mismo stock ancestral. Stunkard apoya el esquema postulado por Fuhrmann (1930) con datos de los ciclos de vida y de la ontogénesis de estos organismos. Fuhrmann (1930), en una interpretacion filogenética tradicional, propuso la existencia de dos lineas de descendientes, la primera formada por Tetrarhynchidea y Pseudophyllidea y la otra por Cyclophyllidea, ambas lineas emergiendo a partir de Tetrphyllidea. En otra visión diferente, Freeman (1973) ha indicado que los Pseudophyllidea son de aparición más temprana que los Tetrphyllidea y Cyclophyllidea. Los estudios de Brooks, et al. (1991) están de acuerdo con esta última idea. Al igual que Freeman, consideran a Pseudophyllidea como el grupo hermano del resto de Eucestoda. Es decir, que la aparición de Pseudophyllidea precede al de Tetrphyllidea y Lecanicephalidea.

Relaciones de los taxos de neodermata y el origen del taxa

Existen muchas ideas diferentes que tratan de explicar el origen de Neodermata. Dichas hipótesis afectan directamente a las relaciones entre los diferentes grupos incluidos en este taxa. Debido a que estas hipótesis fueron generadas en un contexto no cladístico es difícil explicarlas en términos de sistemática

moderna. Sin embargo, debido a la importancia que representan en la historia del estudio del phylum Platyhelminthes hemos decidido mencionarlás en los términos empleados por los propios autores.

Se ha pensado en diferentes orígenes para los céstodos. Se han propuesto a Turbellaria, Trematoda y a Monogenea como candidatos para ser grupo hermano de Cestoda. Se ha postulado también, que los céstodos fueron originados de un platelminto similar a los rhabdocoelos turbeláridos¹ de vida libre (Freeman, 1973; Jareka, 1975; Vik, 1981; Stunkard, 1983; Mackiewicz, 1982). Hyman (1951) opina que tanto Trematoda como Cestoda fueron originados de forma independiente a partir de rhabdocoelos turbeláridos parásitos. En cambio, Bychowsky (1937) y Llewelyn (1965; 1986) han considerado a un ancestro monogéneo para los céstodos y a un ancestro rhabdocoelo turbelario de vida libre, para ambos grupos. Para ellos Monogenea y Cestoda emergieron independientemente de Digenea. A su vez, Freeman (1973) sugiere que los pretremátodos², precéstodos, gyrocotilidos y monogéneos provienen de formas de vida libre similares a los rhabdocoelos turbeláridos pero en diferentes tiempos en la evolución.

¹ El taxón Rhabdocoela como es usado aquí se refiere solo a los rhabdocoelos "turbeláridos" y excluye a Neodermata, toda vez que Ehlers (1985) incluye a Neodermata dentro de Rhabdocoela.

² La visión de Freeman (1973) considera a los pretremátodos como los ancestros de los prototremátodos (a su vez ancestros de Trematoda) y Aspidobothrea. Y a los precéstodos como ancestros de los protocéstodos (a su vez ancestros de Eucestoda) y Amphilinidae.

Las ideas acerca del origen de las diferentes grupos mayores de Neodermata no solo se limitan a proponer a los rhabdocoelos turbelarios como posibles ancestros. Malmberg (1974) pretende explicar la ausencia del tubo digestivo en Cestoda sugiriendo que pudieron haber surgido de formas similares a los acoelos. Cannon (1986) y Rohde (1990) coinciden en que Cestoda, Monogenea y Trematoda evolucionaron a partir de diferentes familias de Dalyellioida pero con orígenes separados.

Como es de esperarse, también existen puntos de vista que consideran a los monogéneos como los primeros en aparecer dentro de Neodermata, siendo los ancestros de Digenea y Cestoda. La similitud de la cercaria y la larva procercoide llevó a Janicki en 1921 (citado por Bychowsky, 1937 y por Hyman 1951) a proponer su denominada "teoría de la cercomera". De acuerdo a esta teoría, existe una reminiscencia ancestral del disco posterior con ganchos de los monogéneos y los ganchos de la oncosfera de los céstodos. En la cercaria, la "cola" (llamada "cercomera") es esta reminiscencia ancestral. Básicamente, el esquema de Janicki está de acuerdo en considerar a Monogenea como el origen común de Digenea y Cestoda.

Como se pudo apreciar, las controversias no solo se limitan a los taxa mayores, las relaciones internas de cada una de estos grupos no son claras y se encuentran también en discusión. Es muy claro, por la cantidad de esquemas filogenéticos que se han propuesto para el phylum Platyhelminthes, que no existe acuerdo ni siquiera para nombrar a los diferentes grupos. Sigue siendo necesario aclarar las relaciones filogenéticas del grupo. Quizás

por ello, en los últimos tres años hemos presenciado un crecimiento explosivo en el número de publicaciones que utilizan a la sistemática molecular como una nueva herramienta en el estudio de la evolución de estos organismos.

Sistemática molecular

La importancia de la sistemática molecular ha ido creciendo en los últimos años; a continuación se describen brevemente algunas de las bases y la metodología empleada. Los métodos de reconstrucción permiten emplear tanto datos de restricción como de secuencia. En el presente trabajo, solo mencionaremos los métodos en los que se emplean secuencias ya que fueron los únicos que se utilizaron para realizar la inferencia.

Los datos moleculares presentan ventajas sobre otros tipos de datos empleados en la reconstrucción filogenética tales como los morfológicos, los ontogenéticos, los etiológicos, etc. Los datos moleculares tienen ciertos atributos exclusivos tales como la claridad y precisión con la que se definen los caracteres y los estados de estos caracteres. En la mayor parte de los casos, pero con notables excepciones, los caracteres son independientes y discretos. Una consecuencia de estas propiedades es que la base de datos para contenerlos se vuelve aditiva. Por ello, con diferentes tipos de datos moleculares es posible establecer homología con los nuevos taxa y los datos de diferentes estudios pueden ser combinados (ver por ejemplo, Riutort, et al., 1992). Es decir, que un autor puede incluir fácilmente y sin riesgos de falsas interpretaciones los datos de otros autores. Además, el número de

caracteres que se puede manejar es extremadamente grande ya que son homogéneos. La homogeneidad en este contexto se refiere a que los caracteres están sujetos a el mismo proceso evolutivo (mutacional). Finalmente, una ventaja de la sistemática molecular es que los datos se pueden comparar dentro de un rango muy amplio de taxa diferentes y por lo tanto permiten hacer análisis que no se podrían realizar con otro tipo de datos. Consecuentemente, los datos moleculares pueden contestar preguntas a todos los niveles de la jerarquía taxonómica.

El concepto de homología y la alineación de secuencias

La definición de homología de los caracteres es crítica en todo estudio filogenético. El concepto de homología es complicado debido a la variedad de significados que se han aplicado al término. En general, se dice que dos caracteres son homólogos cuando tienen un origen común. Se asume que los caracteres derivados pueden presentar modificación que son los que definen el estado del carácter.

En sistemática molecular, el uso del término "homología" ha sido especialmente laxo, llegando al punto de utilizarse como sinónimo de similitud. Inclusive se ha llegado a mencionar que dos secuencias son X% homólogas entre sí. Por ello, se han generado nuevos términos que matizan el significado de homología en el contexto de la nomenclatura de secuencias de proteínas y de ácidos nucleicos. Por ejemplo, ortología es la homología debida a la especiación; paralogía es la homología debida a los eventos de duplicación de la secuencia; xenología es la homología debida a los

eventos de transferencia horizontal de material genético. Cuando se tiene interés en estudiar las relaciones entre especies y no las relaciones entre los genes, se debe de incluir solo secuencias ortólogas.

A su vez, los valores de similitud pueden ser representados en una escala cuantitativa que va de 1 a 0 o de 100 a 0%. El concepto de similitud tiene mucho que ver con el proceso de alineación de las secuencias al que son sometidos los datos moleculares. La alineación de las secuencias es un factor crucial para cumplir con el criterio de homología. En el proceso de alineación, las posiciones de los nucleótidos o aminoácidos (caracteres específicos) son asignadas para compararlas unicamente con las equivalentes de otras secuencias.

En una alineación de dos o más secuencias, los "caracteres" corresponden a las posiciones de nucleótidos o aminoácidos en la secuencia. Los "estados" de estos caracteres son los diferentes nucleótidos o residuos de aminoácidos observados en esa posición. En muchos de los casos el obtener la alineación correcta de varias secuencias no es un problema tan trivial como pudiera parecer, especialmente en casos en donde se presentan inserciones y deleciones. La alineación es probablemente el paso más crítico y difícil de la sistemática molecular. También, la alineación de las secuencias es el procedimiento menos comprendido en los análisis filogenéticos basados en datos de secuencias.

El programa computacional para alineación de secuencias de aminoácidos de Needleman y Wunsch (1970), es posiblemente el más ampliamente utilizado. El procedimiento básico consiste en asignar

valores positivos para los residuos alineables, no se asigna ningún valor a los residuos no-alineables y se asignan valores negativos para los "gaps" (espacios vacíos que resultan al realizar la alineación entre 2 o más secuencias). La alineación que maximiza el número obtenido es considerada como la mejor alineación. En una alineación de secuencias, los estados diferentes de un carácter corresponden a eventos de sustitución y los gaps corresponden a inserciones o deleciones. Los gaps son colocados cuando al insertarlos se maximiza el valor de similitud total.

Para la alineación de varias secuencias se han desarrollado un gran número de métodos. Los distintos métodos se basan en diferentes suposiciones e intentan alinear a las secuencias bajo algún criterio. Felsenstein (1988) ha observado que la alineación de las secuencias y la reconstrucción de filogenias basadas en ellas no son problemas independientes. Así entonces, existen también programas rápidos y eficientes que simultáneamente realizan la alineación y la reconstrucción. Un ejemplo es el programa "TreeAlign" (Hein, 1989a, 1989b, 1990) que funciona de esta manera.

Aunque existen programas de cómputo que realizan la alineación, estos no siempre dan como resultado la alineación correcta, muy frecuentemente es necesario realizar ajustes manuales a las alineaciones realizadas por cómputo. Esto último es imprescindible en casos en donde la base de datos de que se dispone es fragmentaria.

La medición de la "distancia" es un concepto ampliamente usado en los estudios de sistemática molecular. La definición de distancia es muy ambigua. Frecuentemente la distancia es considerada como un sinónimo de disimilitud y opuesta a similitud (ver arriba). Los valores de disimilitud son frecuentemente representados en una escala que va de 0 a 1 o de 0 a 100% y la disimilitud se define como la similitud menos 1.

En los análisis fenéticos los datos de secuencia son transformados a distancias por medio de un algoritmo de transformación. Existen diferentes tipos de transformaciones, cada uno basado en diferentes modelos.

El punto de inicio es la realización de una matriz de similitud por parejas-discretas ("pairwise similarity matrix"). La distancia (D) puede ser calculada a partir de la similitud (S) usando la siguiente fórmula (Swofford y Olsen, 1990):

$$\begin{aligned}d &= 1 - S \\d &= -\ln S \\d &= 1/S - 1\end{aligned}$$

Sin embargo, el problema de las distancias entre las secuencias es más complejo de lo que parece, puesto que el número de los estados de los caracteres tal vez sea mayor que el cambio observado debido a la estructura de el código genético y/o por los eventos de sustitución múltiple. Este mismo problema puede generar otros problemas no solo cuando se infieren las distancias a partir de análisis fenéticos, sino también cuando se realizan análisis cladísticos en donde puede causar homoplasia. Para la determinación de la distancia se han ideado diferentes técnicas que procuran

corregir los eventos de sustitución múltiple (Nei, 1987; Lewontin, 1989).

En los análisis cladísticos los datos de secuencia son usualmente tratados como un multiestado de caracteres donde el número de los estados del carácter es usualmente cuatro para DNA y veinte para los aminoácidos. Sin embargo, se pueden incorporar otras suposiciones a estos análisis y así reducir el número de los estados de los caracteres.

Cuando se emplean datos de secuencia puede ocurrir la no independencia del estado del carácter y ello representa un problema. Posiblemente el mejor ejemplo es el caso de de mutaciones "apareadas" en secuencias codificadoras de rRNA (Wheeler y Honeycut, 1988). En este caso las zonas conservadas en la estructura secundaria hacen que las bases apareadas no se mantengan independientemente una de otra. Este problema es generalmente eliminado cuando se emplean secuencias no codificadoras de DNA y/o genes que codifican para proteínas. En este último caso, las secuencias de aminoácidos son generalmente codificadas de tal manera que cada residuo de aminoácido corresponde a un estado de carácter separado. Sin embargo y ocasionalmente, un grupo de aminoácidos pueden considerarse como funcionalmente iguales bajo algunos criterios. Estos criterios y la agrupación de los aminoácidos particulares en clases específicas varía dependiendo del autor, pero usualmente están basados en la polaridad, estructura y otras características de los residuos.

Las secuencias de DNA frecuentemente son consideradas como un multiestado de caracter, con cuatro estados del caracter que corresponden a cada uno de los cuatro nucleótidos del DNA. Esto es también valido para el RNA ya que es codificado de la misma manera pero con la substitución de un uracilo por una timidina. Sin embargo, cuando los nucleótidos son agrupados en Purinas (adenina y guanidina) y en Pirimidinas (timidina y citocina) el código se considera binario.

Métodos de construcción de árboles

Existe una gran controversia en taxonomía entre los feneticistas y los cladistas. El término "cladística" puede ser definido como el estudio de las "vias" o "rutas" de la evolución. En otras palabras, la cladística está interesada en estudiar, por ejemplo, cuantas ramas existen entre un grupo de organismos, cuantas y cuales ramas se conectan entre si, cual es la secuencia evolutiva de estas ramas, etc. Aquel árbol que muestre al o a los ancestros comunes inmediatos se le denomina "cladograma". Así entonces, un cladograma es un árbol que muestra las relaciones de los descendientes por medio de un ancestro común, en él se hace mención a la topología de un árbol filogenético con raíz. Por otro lado, la fenética es el estudio de las relaciones entre un grupo de organismos en base al grado de similitud entre ellos. Esta similitud puede ser molecular, fenotípica o anatómica. El árbol cuya topología muestre las relaciones fenéticas es llamado fenograma.

Aunque un fenograma pueda funcionar como un indicador de las relaciones cladísticas no necesariamente tiene que ser idéntico a un cladograma. En el caso de que exista una relación lineal entre el tiempo de divergencia y el grado de divergencia genética (ó morfológica), los dos tipos de árboles serán idénticos uno del otro.

a. Los métodos fenéticos.

En los métodos fenéticos los datos de secuencia son convertidos a medidas de distancia tal como se discutió anteriormente. Estas medidas de distancia son luego usadas para la reconstrucción de árboles. Con los datos moleculares los métodos más comunmente empleados son el UPGMA ("Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean") y el NJ ("Neighbor Joining method").

b. Los métodos cladísticos.

El método de máxima parsimonia (o "mínima evolución") es típicamente representativo del método cladístico. Los datos de secuencia son típicamente analizados por uno de dos modelos: Parsimonias de Wagner y Parsimonia de Fitch. La parsimonia de Fitch es comunmente el modelo más usado y refleja la naturaleza general de la dinámica de las mutaciones; cada uno de los estados de los caracteres es inter-convertible. El método de parsimonia de Wagner es usado en todos los casos en donde los datos son codigos binarios. Sin embargo, existen otros modelos en los que se les puede dar diferente peso a los caracteres.

El principio de máxima parsimonia involucra la búsqueda y la identificación de un árbol filogenético que requiera el menor número de cambios evolutivos para explicar las diferencias observadas entre las unidades taxonómicas operacionales (OTUs, "operational taxonomic units") estudiadas. El árbol obtenido de esta manera es denominado "árbol de máxima parsimonia". Aunque en algunos casos solo se obtiene un solo árbol de máxima parsimonia, es frecuente obtener más de un árbol del tamaño mínimo, sin embargo, en ocasiones es posible obtener un solo árbol consenso que represente a los árboles de máxima parsimonia de la misma longitud mínima.

c. Otros métodos.

Existen otros métodos que no se les pueden considerar tan fácilmente como fenéticos o cladísticos, puesto que usan medidas de similitud o disimilitud como la distancia. Estos métodos no asumen una conexión directa entre la similitud y las relaciones evolutivas, ni tampoco intentan inferir relaciones fenéticas.

En el presente trabajo de tesis, el método empleado para estudiar las relaciones filogenéticas fué el de máxima parsimonia. Debido a la facilidad de la obtención de secuencias de rRNA 18S por métodos como la PCR o la secuenciación directa del rRNA por transcriptasa reversa, las secuencias de rRNA 18S de platelmintos de que se dispone en la base de datos son parciales en su mayoría. No se dispone de la secuencia completa de los rRNA 18S para todas las especies, y por si fuera poco, las secuencias parciales de

algunas especies no se pueden alinear debido a que corresponden a regiones diferentes del rRNA 18S. La tendencia a publicar secuencias parciales de rRNA 18S es una consecuencia de la habilidad de las nuevas técnicas para amplificar y secuenciar DNA o RNA y que hace que la obtención de resultados sea más rápida, pero no permite que la secuencia sea obtenida completa. La máxima parsimonia es el único método capaz de resolver las relaciones a partir de datos fragmentados como los que contamos nosotros. Además, el método de máxima parsimonia es adecuado para poder resolver las relaciones entre un número grande de especies, tal como es nuestro caso (66 especies) (ver apéndice en el artículo).

OBJETIVOS

En años recientes, los estudios de sistemática molecular se han concentrando en el análisis de la información contenida en las macromoléculas. Las secuencias de los ácidos nucleicos y de las proteínas documentan el proceso evolutivo de los organismos que los poseen. El rRNA 18S ha sido un buen marcador en estudios de inferencia filogenética (Lane, et al., 1985; Woese, 1987; Baverstock, et al., 1991; Morris, 1993; Wainright, et al., 1993; Patterson, et al., 1993; etc.). Esta molécula presenta regiones conservadas y regiones variables (Fig. 6), que pueden ser seleccionadas de acuerdo a la distancia filogenética de los organismos que se desea estudiar.

La sistemática molecular ha hecho contribuciones significativas al entendimiento de la filogenia de los invertebrados, algunos ejemplos son: Field, et al., 1988; Baverstock, et al., (1991), Turbeville, et al. (1992), Morris (1993), Wainright, et al. (1993), Rohde, et al. (1993), Patterson, et al., 1993, etc.

A partir de 1991 los platelmintos han sido un foco de interés para los estudios de sistemática molecular. En particular se ha hecho un gran esfuerzo en los estudios de filogenia de estos gusanos planos empleando secuencias de rRNA/rDNA 18S (Qu, et al., 1986; Baverstock, et al., 1991; Ali, et al., 1991; Turbeville, et al., 1992; Luton et al., 1992; Riutort, et al., 1992, 1993; Blair, 1993; Blair y Barker, 1993; Barker, et al., 1993; Korbsrisate, et

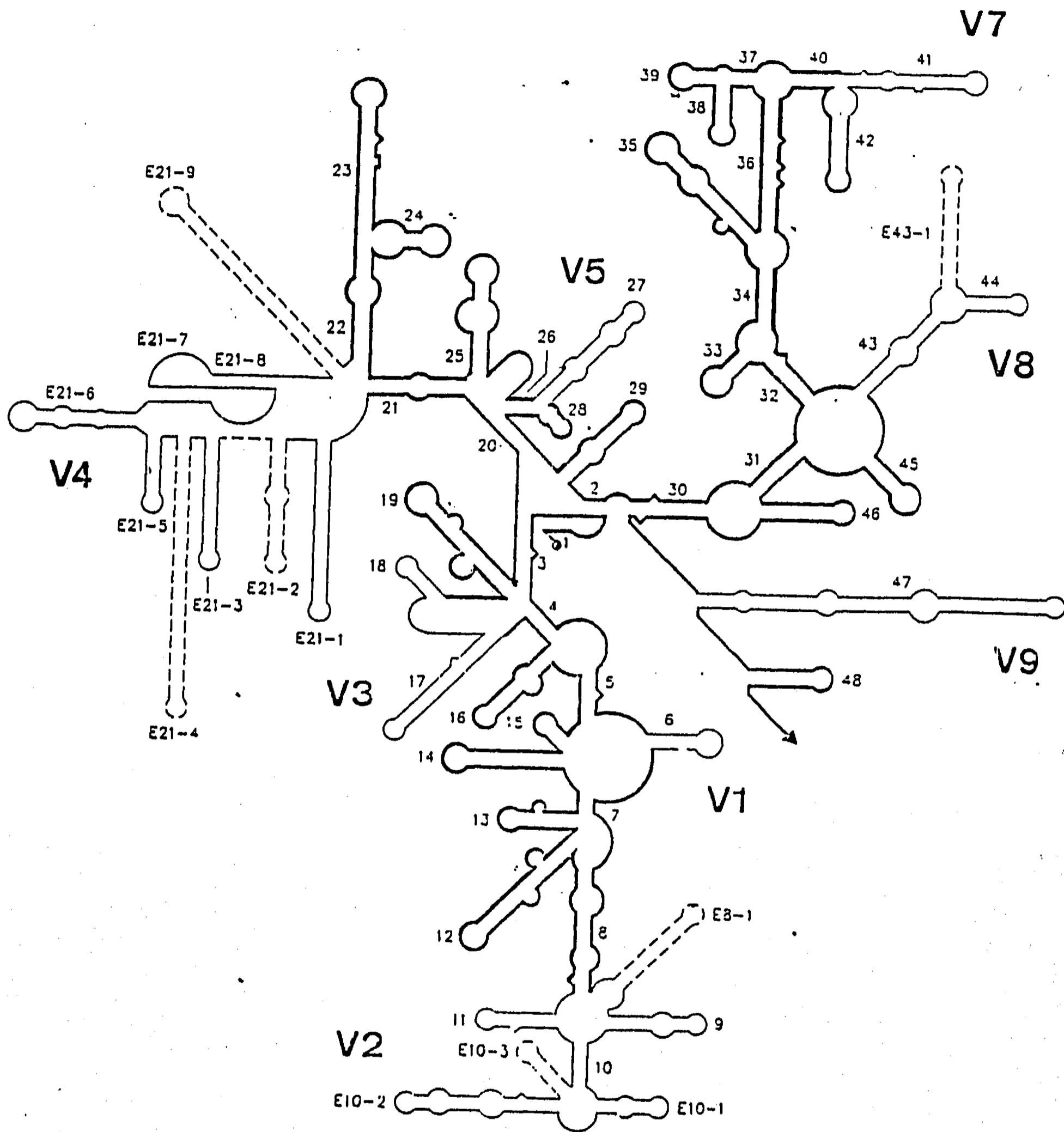


Fig. 6 Modelo de la estructura secundaria del rRNA 18S de eucariontes. El extremo-5' está simbolizado por un círculo relleno negro y el extremo-3' por una punta de flecha. Las hélices están numeradas en el orden de ocurrencia de extremo-5' al extremo-3'. Las hélices con un número sencillo son comunes tanto en eucariontes como en procariontes. Los números precedidos por una "P" son específicos de eucariontes. Las regiones relativamente conservadas están en líneas "bold", las secuencias no muy conservadas y con devariabilidad de longitud se representan con una línea delgada. Se pueden distinguir ocho regiones variables (de V1 a V9), la región V6 no existe en srRNA de eucariontes. Las hélices dibujadas con líneas partidas solo están presentes en un pequeño número de estructuras conocidas. (Tomada de Neefs, et al., 1990)

al., 1993; Lumb et al., 1993; Katayama, et al., 1993; Rohde, et al., 1993; Johnston, et al., 1993). Los resultados de estos trabajos revistan un gran interés ya que han aportado resultados frescos que apoyan o descartan a las diversas teorías acerca de la evolución de estos organismos.

El objetivo central del presente proyecto de tesis fué el de analizar las relaciones filogenéticas de los principales grupos de platelmintos usando datos de secuencias. Como objetivos secundarios se pretendía responder preguntas puntuales como el origen de los céstodos, el origen del parasitismo en el phylum, etc.

Se llevó a cabo el primer análisis general del phylum Platyhelminthes basado en todas las secuencias de rRNA 18S disponibles. Al reunir las secuencias de rRNA 18s de 63 especies de platelmintos (6 obtenidas por nosotros), 2 especies de Nemertina y una especie de Nematoda, nuestro trabajo representa el estudio más completo realizado hasta el momento en este phylum por métodos de sistemática molecular y empleando secuencias de rRNA 18S. Así mismo y aplicando el criterio de congruencia, hemos usado secuencias génicas de α -tubulina (las cuatro secuenciadas por nosotros) y de actina de cinco especies de platelmintos (cuatro de ellas obtenidas por nosotros) para estudiar particularmente la posición de Monogenea en Neodermata.

**PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF THE PLATYHELMINTHES BASED
ON 18S RIBOSOMAL, ACTIN AND α -TUBULIN SEQUENCES**

**Andrés Campos^{*}, Michael P. Cummings[†], José Luis Reyes^{*},
and Juan Pedro Laclette^{*}**

^{*}Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228, México 04510 D.F., México; and [†]Department of Integrative Biology, University of California, Berkeley, CA 94720 USA

Running head: Phylogenetic Relationships of the Platyhelminthes

Author for correspondence: Juan Pedro Laclette, Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228, México 04510 D.F., México; voice (525) 622-3860, FAX (525) 550-0048

Sequence data from this article have been deposited with the GenBank Data Libraries under Accession Nos. XXXXXX--XXXXXX.

ABSTRACT

Nucleotide sequences of 18S ribosomal RNA from 63 species of Platyhelminthes were used in parsimony analysis and the phylogenetic trees were compared with the hypothesis on evolution of flatworms. Catenulids and polycladids appear as the earliest diverging taxa that is sister group to the rest of platyhelminths. Dalyellioida and Typhloplanoida appear to be polyphyletic, and therefore, Rhabdocoela and Doliopharyngiophora do not appear to be real categories.

Unexpectedly, monogeneans appear as the sister group to the rest of Neodermata. However, a supplemental analysis based on sequences for α -tubulin, actin and 18S ribosomal genes resulted in a single tree also placing monogeneans as the basal group of Neodermata. Within Trematoda, Aspidobothrii is the sister group of Digenea which appears to consist of two major clades. Cestodes appear monophyletic and Gyrocotilideans the sister group of Amphilinidea and Eucestoda.

Our trees support the hypothesis that parasitism evolved twice in the Platyhelminthes, once within Dalyellioida and again within Neodermata.

INTRODUCTION

Platyhelminthes, the flatworms, are a diverse group of terrestrial and aquatic organisms that display a range of life histories from free-living to parasitic. Platyhelminthes might well be the earliest emerging group from bilateral animals (Field, et al., 1988; Morris, 1993), however, their evolutionary history is still unclear because of the fragmentary information on their morphology, physiology and life cycles, and because these softbodied worms have left scarce fossil remains. With the increased use of light and electron microscopy there has an explosive interest on the systematics of the Platyhelminthes as indicated by the large number of recent papers (listed in Rhode et al., 1993). However, recently molecular systematic methods have been used to assess relationships within subsets of Platyhelminthes, or the group as a whole using a small number of species (Ohama et al., 1983; Qu et al., 1986; Field et al., 1988; Hori et al., 1988; Ali et al., 1991; Baverstock et al., 1991; Korbsrisate et al., 1991; Turbeville et al., 1992; Riutort et al., 1992; Riutort et al., 1993; Blair, 1993; Blair and Barker, 1993; Barker et al., 1993; Johnston et al., 1993; Katayama et al., 1993; Rhode et al., 1993). Nevertheless, questions regarding relationships within Platyhelminthes remain, for example, relationships among the tapeworms (Eucestoda) are unclear, in part due to poor representation of this group in previous studies. Numerous 18S ribosomal sequences are available from

Platyhelminthes, and our aim was to bring these sequences together to make a comprehensive study of the phylogenetic relationships within the Platyhelminthes using molecular data.

We have compiled whole and partial sequences of 18S ribosomal RNA from 63 species within the platyhelminths (see APPENDIX). The data in this study include new partial sequences of 18S ribosomal RNA, as well as new partial sequences of actin and α -tubulin genes.

The present state of Platyhelminthes systematics features both controversies and nomenclatural complexities. For consistency, in this paper we are utilizing the relationships and names of the major groups provided in Ehlers (1986).

MATERIALS AND METHODS

Specimens

The following organisms were collected for DNA sequencing: *Taenia crassiceps* (Eucestoda) cysticerci (ORF strain) from peritoneal cavity of Balb/c mice after 6 to 8 weeks of infection; *Taenia solium* cysticerci from skeletal muscle of naturally infected pigs; *Octomacrum mexicanum* (Monogenea) (Lamothe-Argumedo, 1980) adult worms from the gills of the fish *Algansea lacustris* (Cyprinidae), in the lake of Pátzcuaro, State of Michoacán, México; *Posthodiplostomum minimum* (Digenea) metacercarias from the liver of the fish *Chirostoma attenuatum*, in the lake of Pátzcuaro, State of Michoacán, México (Pérez-Ponce de León et al., 1994); *Geoplana mexicana* (Tricladida), collected in the campus of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México City.

DNA Preparation and Cloning

T. solium and *O. mexicanum* specimens were immediately frozen in dry ice and stored at -75°C until use. *T. crassiceps* and *G. mexicana* specimens were immediately used for DNA isolation. *P. minimum* specimens were fixed in 70% alcohol. DNA was purified according to Sambrook et al. (1989), by overnight incubation at 50°C in 0.5M EDTA, 0.5% Sarkosyl and 0.1 mg/ml Proteinase K. All samples were extracted with phenol:chloroform (1:1). The genomic DNA from *Echinococcus granulosus* was kindly provided by A. Flisser.

Clones of 18S ribosomal genes of *T. crassiceps* were obtained

from a genomic DNA library in EMBL4, using a 18S rRNA probe from *Trypanosoma cruzi* (kindly provided by R. Hernández), and subcloned into M13 using TG1 cells (Gibson, 1984).

PCR Amplification

Amplification of 18S ribosomal DNA fragments from all other species was carried out by PCR (Saiki et al., 1988) using oligonucleotides JLR24, 5'-CGGAATTCGCTAGAGGTGAAATTCTTGG-3' (1009-1027), and JLR25, 5'-CCGAATTCCGCAGGTTCACCTACGG-3' (1964-1981), designed from the sequence of *T. crassiceps*. Numbers in parentheses correspond to positions of the 18S gene of *Schistosoma mansoni* (Ali et al., 1991). Amplification of actin fragments from *G. mexicana*, *O. mexicanum* and *S. mansoni* were also carried out by PCR using oligonucleotides Act5', 5'-GCACGGCATCGTGACGAACTGG-3' (632-654), and ACT3', 5'-CGTCTGGCATAACGTCTTCCTC-3' (1344-1365), designed from the sequence of two actin genes of *T. solium* (Campos et al., 1990). For PCR amplification of α -tubulin fragments of *G. mexicana*, *O. mexicanum*, *S. mansoni* and *T. solium*, degenerate oligonucleotides α - β Tub5', 5'-GGGAATTCGC (T/C/A)GT(T/C/A)GT(T/C/A)GAACCATA(T/C) AA-3' (179-185), and α -Tub3', 5'-CC(T/C)CC(G/A/C/T)GC(T/C)TC(T/A/C/G)CC(T/C)TC (G/A/C/T)AC-3' (438-447), were used as primers. These sequences were designed from the amino acid sequences of the α and β -tubulins (Little and Seehaus, 1988).

PCR reactions were performed in 100 μ l volumes of Tris buffer (70 mM, pH 8.8) containing 20 mM ammonium sulfate, 2 mM magnesium chloride, 100 mg/ml bovine serum albumin, 0.1% Triton X-100, 0.2 mM of each dNTP, 50 pmol of each primer, 250 ng of template DNA, and *Taq* polymerase (2.5 U; Bhoeringer). PCR fragments were purified by agarose gel electrophoresis followed by adsorption to glass powder (Vogelstein and Gillespie, 1979).

Sequencing Strategy

Sequence of clones was obtained by the dideoxy chain termination method (Sanger et al., 1977), using the Sequenase 2.0 kit (United States Biochemical Corporation) and α -³⁵S]dATP (New England Nuclear). Sequencing primers were either M13 primers or oligonucleotides internal to the genomic DNA fragment. PCR products were sequenced using the CircumVent Thermal Cycle Sequencing Kit (New England, BioLabs) and (New England, Inc), following recommendations of the manufacturer. Sequencing primers were JLR24, JLR25 or other internal oligonucleotides.

Data Analysis

In addition to the sequences generated for this study, sequences were obtained from GenBank or the literature as listed in the APPENDIX. All nucleotide sequences were initially aligned with the program CLUSTAL V (Higgins et al., 1991) and then manually adjusted. Variable regions V4 and V7 of the ribosomal sequences were excluded from the analyses.

Phylogenetic trees were made using the method of parsimony with the computer program PAUP (Swofford, 1992). Each nucleotide position was scored as a uniformly weighted character with gaps scored as missing data, and character state transitions were uniformly weighted. Analyses involving the entire data set, and many of those using subsets of the taxa, were done by conducting 1000 heuristic searches with random-addition of taxa and tree bisection-reconnection swapping. For searching efficiency, only one of the shortest trees was saved from each search (nchuck = 1, chucklen = some arbitrary low value, i.e. a value less than the shortest tree). Therefore, the global trees may appear to be more resolved than is actually the case. For some clades resulting from the global analysis, branch and bound searches performed, an algorithm which insures the shortest tree(s) were found. To evaluate some specific phylogenetic hypotheses, topological constraint(s) were imposed before conducting a search or searches. Other options in PAUP were default unless noted above.

RESULTS AND DISCUSSION

Global analyses

From one thousand random addition unconstrained heuristic searches, 28 equally parsimonious trees were saved, of length 4169 with a consistency index of 0.488, both values excluding autapomorphies. The strict consensus of these 28 trees is shown in Fig. 1. Using only *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) as the outgroup Platyhelminthes do not appear to be monophyletic, because species of the Nemertea (*Cerebratulus lacteus* and *Prostoma* sp.) are placed in a clade with the Polycladida and Catenulida. The most basal lineages of Platyhelminthes are composed of species from Dalyellioida and Typhloplanoidea, each of which are not monophyletic. Seriata also does not appear to be a monophyletic group, with its subgroups, Proseriata and Tricladida appearing distantly related to each other. Tricladida forms a clade with Lecithoepitheliata and Acoela. Each of three major parasitic groups (Monogenea, Trematoda and Cestoda), appear to be monophyletic, as is the group formed by the three, Neodermata. Among these groups Monogenea appears as a sister group to the rest of Neodermata. Monogenea is differentiated into two clades that correspond to Monopisthocotylea and Polyopisthocotylea. Within Trematoda the one species of Aspidobothrii included in this study appears as the sister group to Digenea. Trematoda is sister group to Cestoda.

One thousand random addition heuristic searches were conducted

with two constraints: Platyhelminthes being monophyletic; and the genus *Geocentrophora* (Lecithoepitheliata) also being monophyletic. The monophyly of Platyhelminthes is supported by previous work (Ehlers, 1986; Ax, 1987), as well as by recent trees also based on 18S sequence analysis of a small number of taxa (Turbeville, Field and Raff, 1991; Riutort et al., 1992). Decision to constrain all species of *Geocentrophora* to be monophyletic was to simplify the analysis. The searching resulted in 100 equally parsimonious trees of length 4187 with a consistency index of 0.486, both values excluding autapomorphies. The strict consensus of the 100 trees is shown in Fig. 2. Constraining the Platyhelminthes to be monophyletic resulted in substantial changes in the topology, particularly in the more basal portion of the tree. Polycladida and Catenulida together are placed as the most basal lineage. The rest of Platyhelminthes form two large clades: one consisting of Neodermata; and the other consisting of Acoela, Lecithoepitheliata, Seriata, Typhloplanoida and Dalyellioida. Relationships within Neodermata are the same as in the unconstrained analysis, with one exception; Gyrocotylidea are placed as the sister group to the rest of Cestoda.

Relationships of the major groups of Platyhelminthes

The relationships among the major groups of Platyhelminthes as presented by Ehlers (1986) are shown in Fig. 3A, contrasted with the relationships determined in our constrained global analysis as shown in Fig. 3B. One very general difference between two trees is that the tree of Ehlers (1986; see also Brooks, 1989a, Brooks and McLennan, 1993) is more pectinate and our tree more symmetrical. In addition, Ehlers (1986) did not specify the position of Lecithoepitheliata, which we have placed in our tree. The analysis constraining Platyhelminthes as a monophyletic group places Catenulida and Polycladida as sister taxa that together comprise the most basal lineage of Platyhelminthes. This close association of Polycladida and Catenulida differs from many previous hypotheses regarding the systematics of the Platyhelminthes (Hyman, 1951; Ehlers, 1985, 1986; Ax, 1987). In some of these studies Catenulida alone appear as the sister group to the rest of the phylum. In reconstructions also based in 18S ribosomal sequences, Katayama et al. (1993), place polycladids emerging later than the Acoela and the Tricladida. However, the association of Polycladida and Catenulida is also apparent in analyses of 18S ribosomal gene sequences by Rohde et al., (1993).

A clade composed of Acoela, Lecithoepitheliata, Seriata, Typhloplanoida and Dalyellioida appears as sister group to Neodermata (Fig. 3B). Although this clade shows some resolution between the major groups as determined in our constrained global analysis, this resolution does not hold up in a more restricted

analysis (see below).

Relationships of the Acoela, Lecithoepitheliata, Seriata, Typhloplanoida and Dalyellioida.

The Acoela, Lecithoepitheliata, Seriata, Typhloplanoida and Dalyellioida appear together in a single monophyletic group divided in two major clades (Fig. 2). The first clade being formed by Typhloplanoida and Dalyellioida is the sister group of the other clade which includes Acoela, Lecithoepitheliata and Seriata. However, a supplemental analysis of the 24 sequences within Acoela, Lecithoepitheliata, Seriata, Typhloplanoida and Dalyellioida (Fig. 4), had been suggested that this relationships maybe are not to strongly. This supplemental analysis was conducted by doing 1000 heuristic searches with random-addition of taxa and tree bisection-reconnection swapping. The search resulted in 76 trees of length 1476 with a consistency index of 0.672, both values excluding autapomorphies. Their consensus tree is shown in Fig. 4 and shows (as tree in Fig.2) that the relationships among Acoela, Lecithoepitheliata and Seriata are unresolved. Nevertheless, in both reconstructions, Tricladida is monophyletic with the exception of *Dugesia japonicum*. In the other hand, in this supplemental analysis, *Temnocephala dendyi* and *Bothrosostoma personatum* form a clade.

Dalyellioida and Temnocephalidea (included in Typhloplanoida) are crucial groups often involved in the origin of Neodermata (Ehlers, 1985, 1986 and Brooks 1989b, 1993, respectively). They show a variety of associations from mutualism, ecto and endo

comensalism as well as parasitism. Although Dalyellioida and Typhloplanoida are some of the groups that resulted more affected by the constrain to make platyhelminthes monophyletic, none of our results supports the idea that they are the sister group of Neodermata. Our results are not consistent with groupings such as Rhabdocoela and Dolyopharyngiophora (Ehlers, 1985) as well as Cercomeria (Brooks, 1993). A recent study based on morphological characters (Rohde, 1990) also supports the idea that the similarities between Neodermata and "turbellarian" Rhabdocoelans are mostly due to morphological convergences instead of phylogenetic relationships. Interestingly, our reconstruction in Fig. 2 is consistent with Hyman (1951), who included the Temnocephalidea, the Dalyellioida, the Kalyptorhynchia and the Typhloplanoida in a monophyletic group called Neorhabdocoela. Neorhabdocoelans (Hyman, 1951) constitute a different lineage from Neodermata, suggesting that parasitism has emerged independently in these two groups (see below).

In spite of that the relationships between the Acoela, Lecithoepitheliata and Seriata are unresolved in our reconstructions, it is possible that species within the tricladida and Lecithoepitheliata form monophyletic or paraphyletic groups. In Tricladida the clade of Dugesia is monophyletic except for the placement of the *Geoplana mexicana* and *D. japonicum*.

Relationships Within the Neodermata

Within Neodermata, our global analyses place Monogenea as the sister group of Trematoda and Cestoda. This is in agreement with

relationships proposed by Janicki (1921), but differs from schemes presented by several authors in the last decade (Ehlers, 1985; Ax, 1987; Justine, 1991; Brooks and McLennan, 1993). To examine our results in more detail we conducted 1000 random addition searches with the topological constraint that Monogenea and Cestoda be sister groups. This analysis resulted in 21 equally parsimonious trees of length 4178, 9 steps longer than the trees without the constraint, and a consistency index of 0.487, all values excluding autapomorphies. This provides support for the hypothesis that Trematoda and Cestoda together form a clade, which is sister group to Monogenea.

To further investigate the sister-taxon relationship between Trematoda and Cestoda a supplemental analysis involving additional data was performed. These data include DNA sequence of: α -tubulin encoding genes from *T. solium*, *S. mansoni*, *O. mexicanum*, and *G. mexicana*; and of actin genes from *T. solium* (2), *E. granulosus* (2), *S. mansoni*, *O. mexicanum*, and *G. mexicana*. Preliminary analysis demonstrated that the actin genes within *T. solium* and within *E. granulosus* were each other's closest relatives, and therefore a single sequence for each species was constructed by scoring nucleotide differences within each species as polymorphic sites. DNA sequences for actin, tubulin and 18S ribosomal genes for these taxa were combined into one data set and analyzed using a branch and bound search. A single most parsimonious tree was found of length 321 with a consistency index of 0.754, both values excluding autapomorphies

(Fig. 5). This combined data set was also analyzed using the topological constraint that Monogenea and Cestoda be sister groups. This analysis resulted in a single most parsimonious tree of length 342 with a consistency index of 0.708, both values excluding autapomorphies. The 21 additional steps required to accommodate this hypothesis, together with the results of the global analyses and previous constrained searches, provide support for the hypothesis that Monogenea is the sister group the rest of the Neodermata, again, in contrast to previous hypotheses. Therefore, our results suggest Cercomeromorphae (Ehlers, 1986; Brooks, 1989a) is not monophyletic.

Relationships Within the Monogenea

Recent analyses of relationships within monogeneans based on partial 18S ribosomal sequences (Baverstock *et al.*, 1991; Blair, 1993 and Rohde *et al.*, 1993), have led to the suggestion that the group might be paraphyletic. In contrast, our trees clearly show that monogeneans are monophyletic and furthermore that the traditionally recognized subgroups Monopisthocotylea and Polyopisthocotylea are also monophyletic (see Fig.1 and 2).

Relationships Within the Trematoda

Trematoda is the group that has received the most attention in recent molecular systematic studies (Ali et al., 1991; Rohde et al., 1993; Blair, 1993; Blair and Barker, 1993; Barker et al., 1993; Johnston, et al., 1993; and, Lumb et al., 1993). Analysis of a small number of 18S sequences of Platyhelminthes (Blair, 1993) could not resolve whether Aspidobothrii (=Aspidobothrea, Aspidobothria) is the sister group of Digenea alone or of the rest of Neodermata. The global analyses in the present study, carried out on a much greater number of sequences, shows that Aspidobothrii is the sister group of the digeneans alone. This is in agreement with most proposals based on morphological and life cycle characters (Rhode, 1972; Ehlers 1985; Ax, 1987; Gibson, 1987; Brooks, 1985, 1989b, 1993).

A supplemental analysis of the 20 sequences within the Trematoda was conducted by doing 1000 heuristic searches with random-addition of taxa and tree bisection-reconnection swapping. The single tree resulting from the search had a topology different than that found in the global searches. The tree was 906 steps long with a consistency index of 0.587, both values excluding autapomorphies (Fig. 6).

The phylogenetic relationships among Digenea are still controversial. Among digenean families included in our study, at least three have been proposed as the sister group of all others: Fellodistomidae (Køie, 1985), Paramphistomidae (Gibson, 1987), and

Heronimidae (Brooks, 1985). Also, *S. mansoni* was proposed to be the sister species of others belonging to seven families of digeneans including Paramphistomidae and Heronimidae (Barker, et al., 1993). Furthermore, some families of digeneans have been placed as *incerta sedis*: Paramphistomidae and Fellodistomidae (Brooks et al., 1985); and Gyliachenidae (Schell, 1982). Our analyses do not support existence of a single family as sister group to the rest of the digeneans. Instead, Digenea are split into two major groups. One of the branches is formed by eleven species belonging to seven families; Paramphistomidae, Echinostomidae, Fasciolidae, Fellodistomidae, Heronimidae, Gyliachenidae, and Lepocreadiidae. The other branch is constituted by eight species in four families; Opisthorchidae, Schistosomidae, Diplostomidae, and Lepocreadiidae.

Relationships within the group of schistosomes coincide exactly with those obtained by Johnston et al. (1993) who used the same sequence data but performed their analyses by distance matrix and maximum likelihood, constraining *O. viverrini* as the outgroup. In our trees, Paramphistomidae is the sister group of Echinostomidae and Fasciolidae. The Fellodistomidae is sister group to Heronimidae and together they form the sister group of the Paramphistomidae, Echinostomidae, Fasciolidae clade. Interestingly, Gyliachenidae appears closely related to the clade formed by the genus *Lepidapedon* (Lepocreadiidae).

In our trees, Lepocreadiidae is not monophyletic with two species, *O. bacilaris* and *T. blepta*, separated from the three species of *Lepidapedon*. The organization within the group of *Lepidapedon* coincides exactly with some results of Lumb et al. (1993). The position of Opisthorchidae (*Opisthorchis viverrini*) in our tree differs from that given by Lumb et al. (1993), which might be due the inclusion of more sequence data for *O. viverrini*, and the examination of a larger number of taxa in our study.

Relationships Within Cestoda

The unconstrained and constrained global trees (Fig. 1 and 2) each show the same unrooted topological relationships for Gyrocotilidea, Amphilinidea and Eucestoda, and this result is further supported by branch and bound analysis of all six species within Cestoda. However, the placement of the root differs between these analyses; for our data set rooting of this clade is sensitive to the taxa that constitute the outgroup. Constraining Platyhelminthes as a monophyletic group produces trees in which Gyrocotilidea is the sister group of the rest of Cestoda (Amphilinidea, Tetraphyllidea and Eucestoda) (Fig. 2), which is consistent with several recent proposals (Ehlers, 1985, 1986; Brooks, 1986, 1989a). However, the sister-taxon relationship between Amphilinidea and Tetraphyllidea has not been previously suggested.

The origin of parasitism within Platyhelminthes

A number of explanations have been proposed to explain the origin of the major parasitic groups. For example, Hyman (1951) proposed that trematodes (including monogeneans) and cestodes have originated independently from parasitic "turbellarian" rhabdocoelan ancestors. Stunkard (1983) stated that digenetic trematodes and cestodes originated from free-living turbellarian-like ancestors. Bychowsky (1937, 1957) and Llewelyn (1965, 1986) claimed a monogenean ancestry for cestodes. In this scheme, monogeneans were originated from a free-living "turbellarian" rhabdocoelan ancestor and both had separate origins from digeneans. In a similar view, pre-trematodes, pre-cestodes and monogeneans came off from free-living "turbellarian" rhabdocoel-like ancestors, but at different times in the evolution (Freeman, 1973). Similarly, Cannon (1986) suggests that monogeneans, digeneans and cestodes arose from different families of Dalyellioida and had separate origins. Finally, Janicki (1921) sees both, digenetic trematodes and cestodes originating from a monogenean ancestor.

In spite of the difficulty for the interpretation of the former proposals in the light of modern cladistics, it can be inferred that parasitism might originate one, two or three times within present Neodermata, and one or more times within present Dalyellioida.

Our analysis of sequences from the major parasitic groups, suggests that Neodermata is a monophyletic group and supports the idea that parasitism appeared within the Neodermata, separately

from the parasite species in the "turbellarian" rhabdocoelans (Dalyellioida, Typhloplanoida).

In 1982 Mackiewicz stated: "Evolutionary biology of helminths has come of age". The large volume of literature in the last decade certifies how accurate his assertion was.

A great effort has been made on molecular systematics of Platyhelminthes in the recent years. Most of the previous analysis were carried out to analyze relationships within small groups or within large groups but using small number of species. This is the most comprehensive analysis on molecular data of flatworms. However, the number of species included is still low for such diverse phylum and many sequences are fragmentary. Completing the molecular data to allow conclusive phylogenetic inference might be a goal to be reached in the next few years. Molecular phylogenetics will surely bring a refreshing air to the understanding of the evolutionary history of this bizarre group of organisms.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank A. Fauconnier and R. Navarro for technical assistance; C. B. Shoemaker for his support and advise; R. Lamothe-Argumedo and G. Pérez-Ponce de León for assistance with specimen identifications; and A. Graybeal for comments on the manuscript. This work was supported in part by a grant from PADEP-UNAM and a fellowship from CONACYT to A. Campos; a Alfred P. Sloan Foundation Fellowship in Molecular Studies of Evolution to M. P. Cummings; and by grants from CONACYT, DGAPA-UNAM, and Fundación Miguel Alemán to J. P. Lacleste.

REFERENCES

- Ali, P. O., Simpson, A. J. G., Allen, R., Waters, A. P., Humphries, C. J., Johnston, D. A. and Rollinson, D. (1991) Sequence of a small subunit rRNA gene of *Schistosoma mansoni* and its use in phylogenetic analysis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **46**: 201-208.
- Ax., P. (1987) "The Phylogenetic System: The Systematization of Organisms on the Basis of Their Phylogenesis," John Wiley & Sons New York.
- Barker, S. C., Blair, D., Cribb, T. H. and Tonion, K. (1993) Phylogenetic position of *Heronimus mollis* (Digenea): Evidence from 18S ribosomal RNA. *Intl. J. Parasitol.* **23**: 533-536.
- Baverstock, P. R., Fielke, R., Johnson, A. M., Bray, A. B. and Beveridge, I. (1991) Conflicting phylogenetic hypotheses for the parasitic platyhelminths tested by partial sequencing of 18S ribosomal RNA. *Intl. J. Parasitol.* **21**: 329-339.
- Blair, D. (1993) The phylogenetic position of the Aspidobothrii within the parasitic flatworms inferred from ribosomal RNA sequence data. *Intl. J. Parasitol.* **23**: 169-178.
- Blair, D. and Barker, S. C. (1993) Affinities of the Gyliachenidae: Utility of the 18S rRNA gene for phylogenetic inference in the Digenea (Platyhelminthes). *Intl. J. Parasitol.* **23**: 527-532.
- Brooks, D. R., O'Grady, R. T. and Glen, D. R. (1985) Phylogenetic analysis of the Digenea (Platyhelminthes: Cercomeria) with comments on their adaptive radiation. *Can. J. Zool.* **63**: 411-443.
- Brooks, D. R. (1989a) A summary of the data base pertaining to the phylogeny of the major groups of parasitic platyhelminths, with a revised classification. *Can. J. Zool.* **67**: 714-720.
- Brooks, D. R. (1989b) The phylogeny of the cercomeria (Platyhelminthes: Rhabdocoela) and general evolutionary principles. *Journal of Parasitology* **75**: 606-616.
- Brooks, D. R., Hoberg, E. P. and Weekes, P. J. (1991) Preliminary phylogenetic systematics analysis of the major lineages of the Eucestoda (Platyhelminthes: Cercomeria). *Proc. Biol. Soc. Wash.* **104**: 651-668.
- Brooks, D. R. and McLennan, D. A. (1993) Macroevolutionary patterns of morphological diversification among parasitic flatworms (Platyhelminthes: Cercomeria). *Evolution* **47**: 495-509.

Bychowsky, B. E. (1937) Ontogenic and phylogenetic relationships of parasitic flatworms. *Bull. Acad. Sci. URSS, class. Sci. Math. et Nat. Ser. Biol.*, English translation. by Virginia Institute of Marine Sciences.

Bychowsky, B. E. (1957) "Monogenetic trematodes their systematics and phylogeny," Leningrad. English translation. (1961) by W. J. Hargis, Jr. Graphic Arts Press. Washington, D.C.

Campos, A., Berhard, P., Fauconnier, A., Landa, A., Gómez, E., Hernández, R., Willms, K., and Laclette, J. P. (1990) Cloning and sequencing of two actin genes from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol. Biochem. Parasitol.* **40**: 87-94.

Cannon, L. R. G. (1986) The Pterastericolae: parasitic turbellarians from starfish. In "Parasitic Lives" (M. Cremin, C. Dobson, and D. E. Morrhouse, Eds.), pp. 15-32, University of Queensland Press, St. Lucia, London and New York.

Da Silva, C. M., Ferreira, H. B., Picon, M., Gorfinkiel, N., Ehrlich, R. and Zaha, A. (1993) Molecular cloning and characterization of actin genes from *Echinococcus granulosus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **60**: 209-220.

Ehlers, U. (1985) Phylogenetic relationships within the Platyhelminthes. In "The Systematics Association Special Volumen No. 28, The Origins and Relationships of Lower Invertebrates" (S. Conway Morris, J.D. George, R Gibson, and H. M. Platt, Eds.), pp. 143-158, Systematics Association by Clarendon Press, Oxford.

Ehlers, U. (1986) Comments on a phylogenetic system of the Platyhelminthes. *Hydrobiologia* **132**: 1-12.

Field, K. G., Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Ghiselin, M. T., Raff, E. C., Pace, N. R. and Raff, R. A. (1988) Molecular phylogeny of the animal kingdom. *Science* **239**: 748-754.

Freeman, R. S. (1973) Ontogeny of cestodes and its bearing on their phylogeny and systematics. *Adv. Parasitol.* **11**: 481-557.

Fuhrmann, O. (1930). Dritte klasse des cladus Platyhelminthes. Cestoidea. In "Handbuch der Zoologie", (Kunkenthal and Krumbach, Eds.) **2**: 141-416.

Gibson, T. J. (1984) "Studies on the Epstein-Barr virus genome," Ph.D thesis, Cambridge University, England.

Gibson, D. I. (1987) Questions in digenean systematics and evolution. *Parasitology* **95**: 429-460.

Hernández, R., Díaz-de León, F., Castañeda, M. (1988) Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **27**: 275-280.

Higgins, D. G., Bleasby, A. J. and Fuchs, R. (1992) CLUSTAL-V: improved software for multiple sequence alignment. *Comp. Appl. Biosci.* **8**: 189-191.

Hori, H., Muto, A., Osawa, S., Takai, M., Lue, K. Y. and Kawakatsu, M. (1988) Evolution of Turbellaria as deduced from 5S ribosomal RNA sequences. *Prog. Zool.* **36**: 163-167.

Hyman, L.H. (1951) "The Invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchocoela," McGraw-Hill Book Company, New York.

Jareka, L. (1975) Ontogeny and evolution of cestodes. *Acta Parasitol. Pol.* **23**: 93-114.

Johnston, D. A., Kane, R. A. and Rollinson, D. (1993) Small subunit (18S) ribosomal RNA gene divergence in the genus *Schistosoma*. *Parasitology* **107**: 147-156.

Katayama, T., Yamamoto, M., Wada, H. and Satoh, N. (1993) Phylogenetic position of Acoel turbellarians inferred from partial 18S rDNA sequences. *Zoological Science* **10**: 529--536.

Køie, M. (1985) The surface topography and life-cycles of digenetic trematodes in *Limanda limanda* (L.) and *Gadus morhua* (L.) Summary of Doctoral thesis. University of Copenhagen.

Korbsrisate, S., Mongkolsuk, S., Haynes, J. R., England, D. and Sirisinha, S. (1993) Nucleotide sequence of the small subunit ribosomal RNA-encoding gene from *Opistorchis viverrini*. *Gene* **105**: 259-261.

Lamothe-Argumedo, R. (1980) Monogéneos parásitos de peces. VIII. Descripción de una nueva especie del género *Octomacrum* Müller, 1934 (Monogenéa: Discocotylidae). *An. Inst. Univ. Nal. Autón. de Méx.* **51**, Ser. Zool. **1**: 51-60.

Little, M. and T. Seehaus. (1988) Comparative analysis of tubulin sequences. *Comp. Biochem. Physiol.* **90** 655-670.

Llewellyn, J. (1965) The evolution of parasitic Platyhelminthes. In "Evolution in parasites (A. Taylor, Ed.) British Society for Parasitology Symposium **3**: 47-78.

Llewellyn, J. (1986) Phylogenetic inference from platyhelminth life-cycle stages. *Intl. J. Parasitol.* **17**: 281-289.

Lumb, S. M., Bray, R. A. and Rollinson. (1993) Partial small subunit (18S) rRNA gene sequences from fish parasites of the families Lepocreadiidae and Fellodistomidae (Digenea) and their use in phylogenetic analyses. *Syst. Parasitol.* **26**: 141-149.

Mackiewicz, J. S. (1982) Parasitic platyhelminth evolution and systematics: perspectives and advances since ICOPA IV, 1978. In "Parasites: their world and ours" (D.F. Mettrick, and S.S. Desser, Eds.), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

Malmberg, G. (1974) On the larval protonephridial system of Gyrocotyle and the evolution of Cercomeromorphae (Platyhelminthes). *Zoologica Scripta* 3: 65-81

Morris, S. C. (1993) The fossil record and the early evolution of the Metazoa. *Nature* 361: 219-225

Ohama, T., Kumazaki, T., Hori, H., Osawa, S. and Takai, M. (1983) Fresh-water planarians and a marine planaria are relatively dissimilar in the 5S rRNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 11: 473-476.

Pérez-Ponce León, G., Mendoza, B. G. and Pulido, G. F. (1994) Helminths of the charal prieto *Chirostoma attenuatum* (Pices: Atherinidae), from Pátzcuaro Lake, Michoacán, México. *Journal of the Helminthological Society of Washington* 61: 139-141.

Qu, L. H., Hardman, N., Gill, L., Chappell, L., Nicoloso, M. and Bachellerie, J-P. (1986) Phylogeny of helminths determined by rRNA sequence comparison. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20: 93-99.

Riutort, M., Field, K. G., Turbeville, J. M., Raff, R. A. and Bagaña, J. (1992) Enzyme electrophoresis, 18S rRNA sequences, and levels of phylogenetic resolution among several species of freshwater planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola). *Can. J. Zool.* 70: 1425-1439.

Riutort, M., Field, K. G., Raff, R. A. and Bagaña, J. (1993) 18S rRNA sequences and phylogeny of Platyhelminthes. *Biochem. Sys. Ecol.* 21: 71-77.

Rohde, K., (1990) Phylogeny of platyhelminthes, with special reference to parasitic groups. *Intl. J. Parasitol.* 20: 979-1007.

Rohde, K., Hefford, C., Ellis, J. T., Baverstock, P. R., Johnson, A. M. Watson, N. A. and Dittmann, S. (1993) Contributions to the phylogeny of platyhelminthes based on partial sequencing of 18S ribosomal DNA. *Intl. J. Parasitol.* 23: 705-724.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis T. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.," Cold Spring Harbor.

Stunkard, H. W. (1967) Platyhelminth parasites of invertebrates. *J. Parasit.* **53**: 673-682.

Stunkard, H. W. (1983) Evolution and systematics. In "Biology of the Eucestoda. Volume I" (C. Arme and P.W. Pappas, Eds.), Academic Press, New York.

Swofford, D. L. (1991) PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.

Turbeville, J. M., Field, K. G. and Raff, R. A. (1992) Phylogenetic position of phylum Nemertini, inferred from 18S rRNA sequences: Molecular data as a test of morphological character homology. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 235-249.

Vik, R. (1981) Evolution in cestodes. *Parasitology* **82**: 163-164.

Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* **76**: 615-619.

APPENDIX¹

Platyhelminthes

Catenulida

Stenostomatidae

Stenostomum sp. (Rohde et al., 1993)

Acoela

Convolutidae

Amphiscolops sp. D17557 (Katayama et al., 1993)

Convoluta naikaiensis D17558 (Katayama et al., 1993)

Polycladida

Leptoplanidae

Notoplana australis (Baverstock et al., 1991)

N. koreana D17561 (Katayama et al., 1993)

Stylochoplana pusilla D17565 (Katayama et al., 1993)

Planoceridae

Planocera multitentaculata D17562 (Katayama et al., 1993)

Callioplanidae

Pseudostylochus obsuculus D17563 (Katayama et al., 1993)

Stylochidae

Stylochus orientalis D17564 (Katayama et al., 1993)

Pseudoceridae

Thysanozoon brocchii D17566 (Katayama et al., 1993)

¹ Highest taxon names based on Ehlers (1986). GenBank accession numbers and citations are given where known. A diskette containing aligned sequences can be obtained upon request.

Lecithoepitheliata

Prorhynchidae

Geocentrophora baltica X65073

G. incognita X65074

G. interstitialis X65071

G. porfirievae X65075

G. sphyrocephala X65072

G. wasiliewi X65076

Prorhynchus sp. (Rohde et al., 1993)

Seriata

Proseriata

Coelogynoporidae sp. (Rohde et al., 1993)

Tricladida

Geoplanidae

Artioposthia sp. (Rohde et al., 1993)

Geoplana mexicana FL. Accession Number (this paper);
actin - Accession Number (this paper); α -tubulin -
Accession Number (this paper)

Planariidae

Crenobia alpina M58345 (Riutort et al., 1992, 1993)

Dendrocoelidae

Dendrocoelopsis lactea D17559 (Katayama et al., 1993)

Dendrocoelum lacteum M58346 (Riutort et al., 1992,
1993)

Dugesiidae

Dugesia iberica M58343 (Riutort et al., 1992, 1993)

D. japonica D17560 (Katayama et al., 1993)

D. mediterranea M58344 (Riutort et al., 1992, 1993)

D. tigrina M20068, M20069, M20070 (Field et al.,
1988; Riutort et al., 1992)

Tphlopanoidea

Typhloplanidae

Bothromesostoma personatum M58347 (Riutort et al., 1992, 1993)

Polycystidae

Gyratrix sp. (Rohde et al., 1993)

Dalyellioida

Umagillidae

Pterastericola australis (Rohde et al., 1993)

Syndisyrix punicea (Rohde et al., 1993)

Temnocephalidae

Temnocephala dendyi (Baverstock et al., 1991; Rohde et al., 1993)

Trematoda

Aspidobothrii

Aspidogastridae

Lobatostoma manteri L16911. (Blair, 1993)

Digenea

Paramphistomidae

Calicophoron calicophorum L06566

Echinostomidae

Echinostoma caproni L06567 (Blair and Barker, 1993)

Fasciolidae

Fasciola hepatica X56041 (Riutort et al., 1992, 1993)

Fasciolopsis buski L06668 (Blair and Barker, 1993)

Fellodistomidae

Fellodistomum fellis Z12601 (Lumb et al., 1993)

Steringophorus agnotus Z12598 Z12599 (Lumb et al., 1993)

GyLIAUCHENIDAE

GyLIAUCHEN sp. L06669 (Blair and Barker, 1993)

Heronimidae

Heronimus mollis L14486 (Barker et al., 1993)

Lepocreadiidae

Lepidapedon elongatum Z12600 (Lumb et al., 1993)

L. gaevskayae Z12605 Z12606 (Lumb et al., 1993)

L. rachion Z12607 (Lumb et al., 1993)

Opechona bacillaris Z12596 Z12597 (Lumb et al.,
1993)

Tetracerasta blepta L06670 (Blair and Barker, 1993)

Opisthorchiidae

Opisthorchis viverrini X55357 (Korbsrisate et al.,
1991)

Diplostomatidae

Posthodiplostomum minimum Accession Number (this
paper)

Schistosomatidae

Schistosoma haematobium Z11976 (Johnston et al.,
1993)

S. japonicum Z11590 (Johnston et al., 1993)

S. mansoni X53047 S61067 (Ali et al., 1991);
actin -- Accession Number (this paper);
 α -tubulin -- Accession Number (this paper)

S. spindale Z11979 (Johnston et al., 1993)

Cercomeromorpha

Monogenea

Monopisthocotylea

Anoplodiscidae

Anoplodiscus cirrusspiralis (Rohde et al., 1993)

Monocotylidae

Dictyocotyle coeliaca (Baverstock et al., 1991)

Polyopisthocotylidea

Diclidophoridae

Diclidophora merlangi (Baverstock et al., 1991)

Discocotylidae

Octomacrum mexicanum Accession Number (this paper);
actin -- Accession Number (this paper);
 α -tubulin -- Accession Number (this paper)

Cestoda

Gyrocotylidea

Gyrocotylidae

Gyrocotyle rugosa (Baverstock et al., 1991)

Amphilinidea

Austramphilinidae

Austramphilina elongata (Baverstock et al., 1991)

Eucestoda

Tetraphyllidea

Oncobothriidae

Acanthobothrium heterodonti (Baverstock et al., 1991)

Cyclophyllidea

Taeniidae

Echinococcus granulosus Accession Number (this paper);
actin -- L07773, L07774 (Da Silva et al., 1993)

Taenia crassiceps Accession Number (this paper)

T. solium Accession Number (this paper);
actin -- M28996, M28997 (Campos et al., 1990);
 α -tubulin -- Accession Number (this paper)

Pseudophyllidea

Diphyllobothriidae

Spirometra erinacei (Baverstock et al., 1991)

Nematoda

Secernentea

Rhabditidae

Caenorhabditis elegans X03680

Nemertea

Anopla

Heteronemertea

Lineidae

Cerebratulus lacteus M90051/M81167, M90052/M81167,
M90053/M81167

Enopla

Hoplonemertea

Tetrastemmatidae

Prostoma sp. (Rohde et al., 1993)

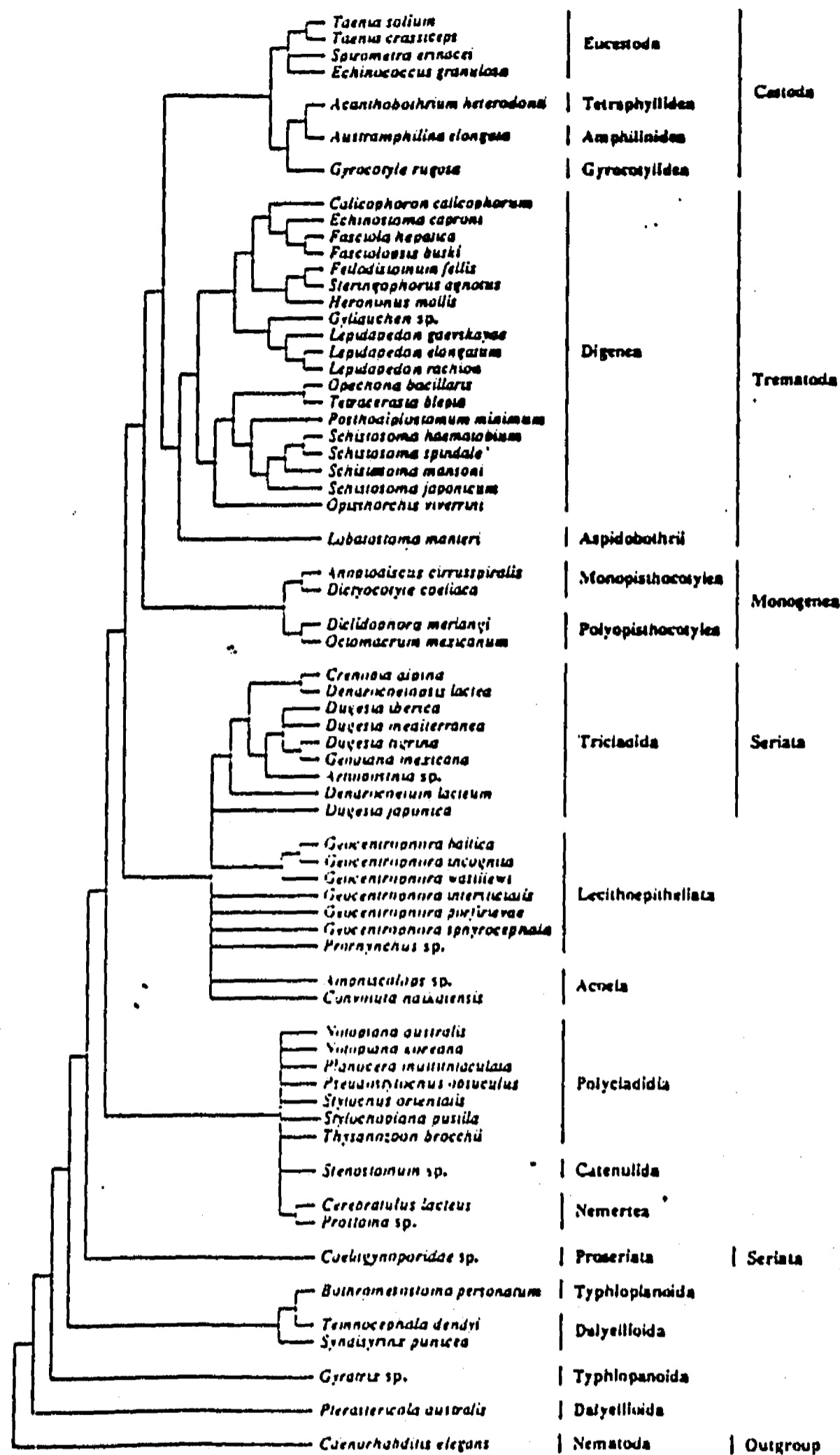


Fig. 1. Phylogenetic tree of Platyhelminthes based on an unconstrained analysis (see text). The tree is a strict consensus of 28 equally parsimonious trees of length 4169 and consistency index of 0.488. The 28 trees used to form the consensus is a subset of all trees of the shortest length found, and therefore this tree may appear to be more resolved than is actually the case (see text).

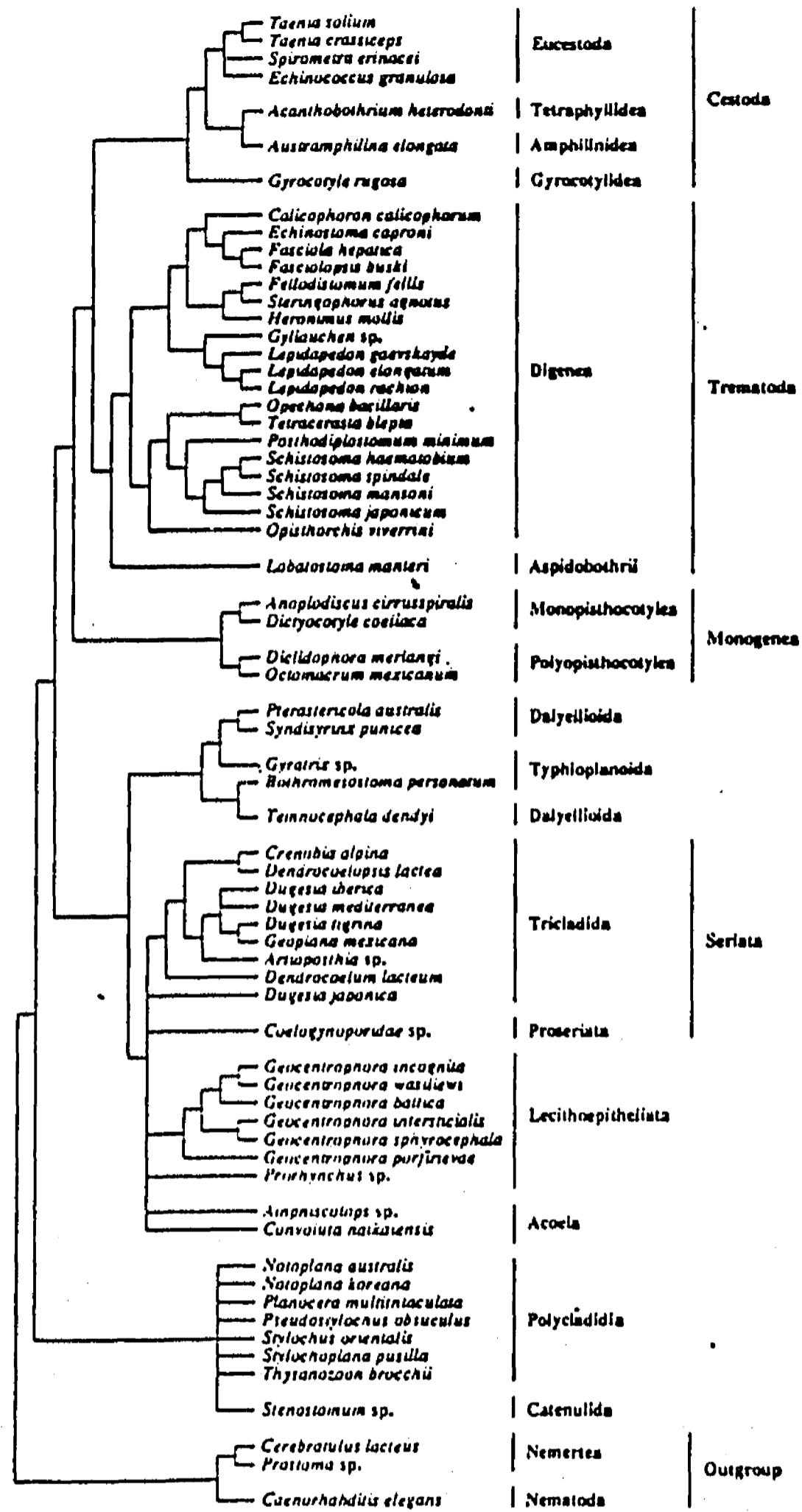
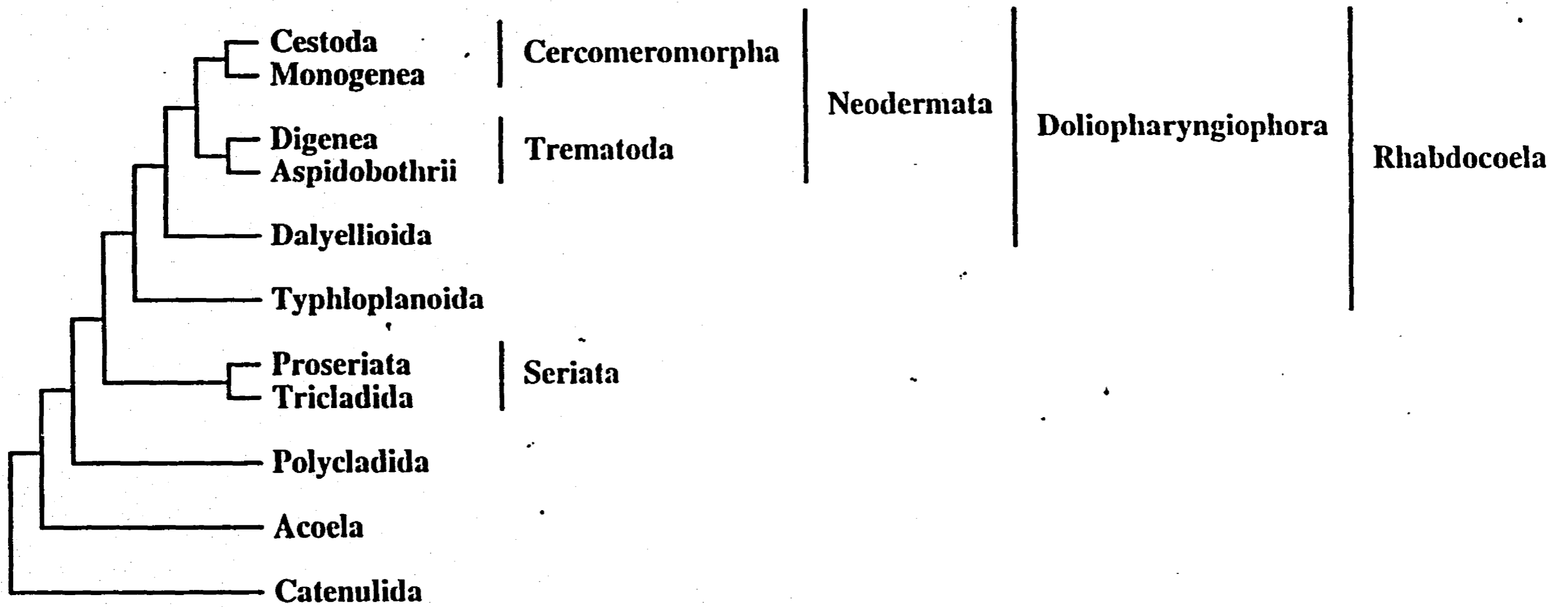
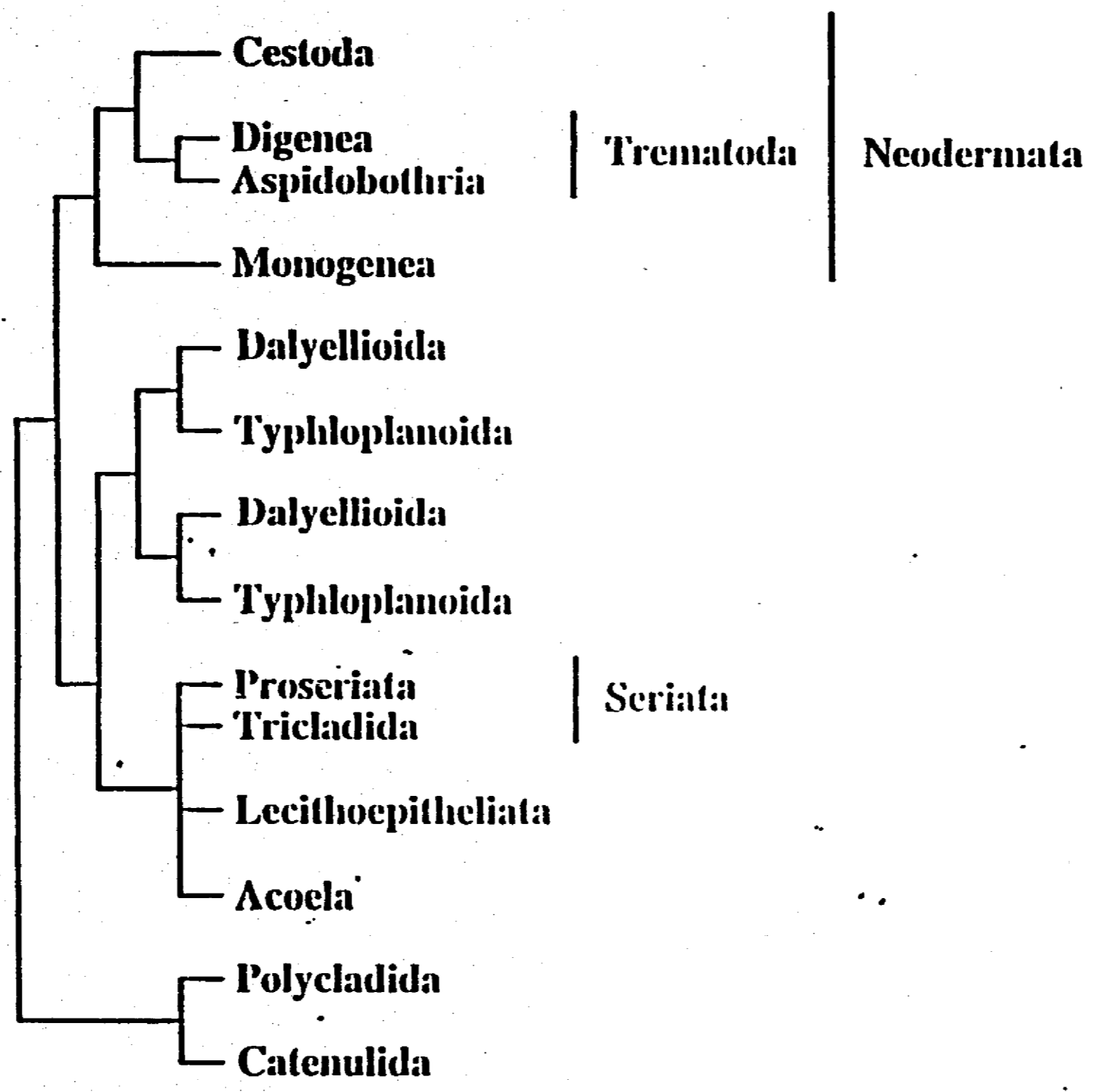


Fig. 2. Phylogenetic tree of Platyhelminthes based on an analysis with two constraints: (1) Platyhelminthes are monophyletic; and (2) that the genus *Geocentrophora* is monophyletic. The tree is a strict consensus of 100 equally parsimonious trees of length 4187 and consistency index of 0.486. The 100 trees used to form the consensus is a subset of all trees of the shortest length found, and therefore this tree may appear to be more resolved than is actually the case (see text).



3 A

Fig. 3. (A) Phylogenetic tree of major groups within Platyhelminthes derived from Ehlers (1985). (B) Phylogenetic tree of major groups within Platyhelminthes as determined in our constrained global analysis.



3B

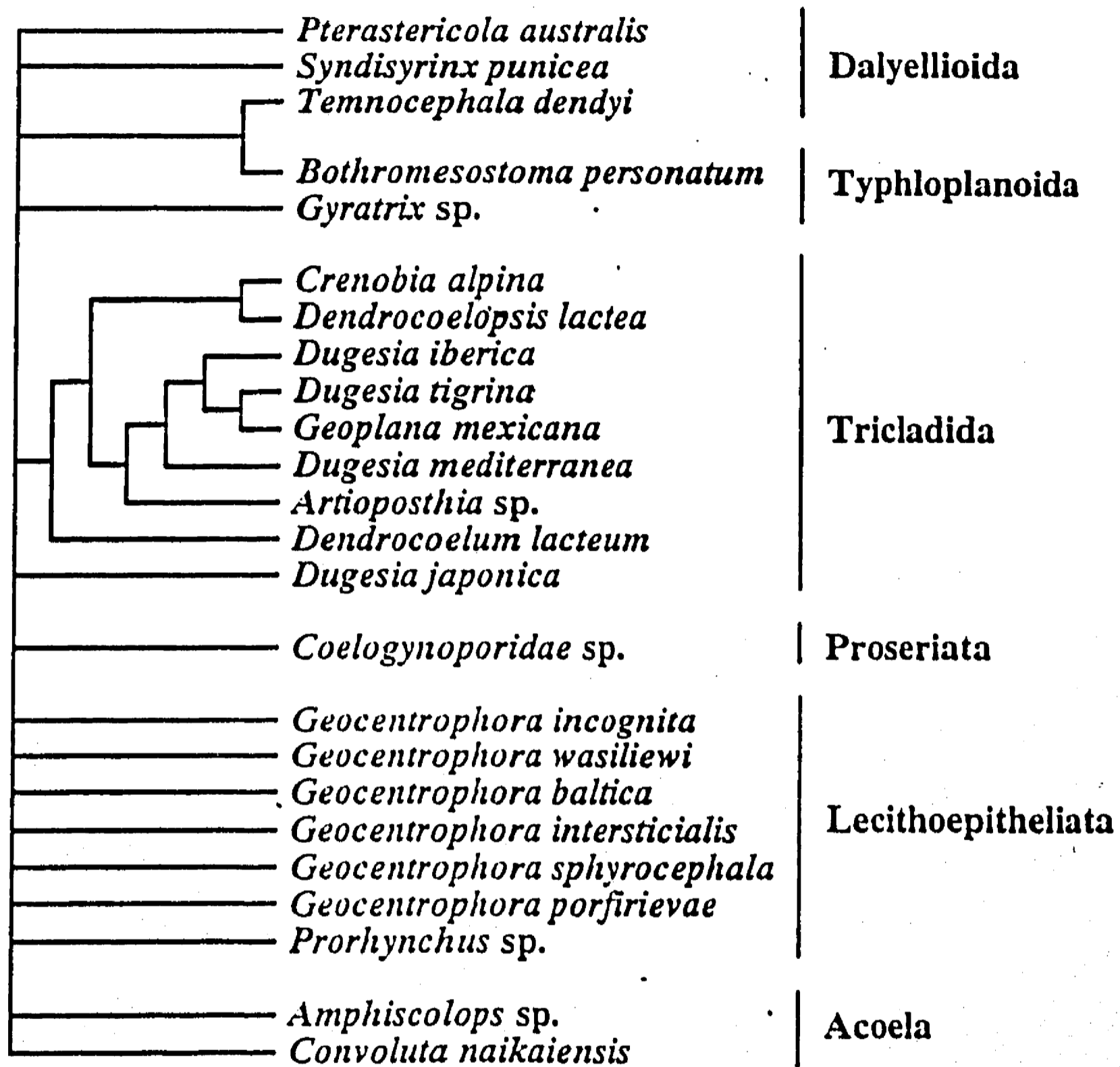


Fig. 4. Phylogenetic tree of Acoela, Lecithoepitheliata, Seriated, Typhloplanoida and Dalyellioida. The tree is a strict consensus of 76 equally parsimonious trees of length 1476 and consistency index of 0.672.

ESTE TESTIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

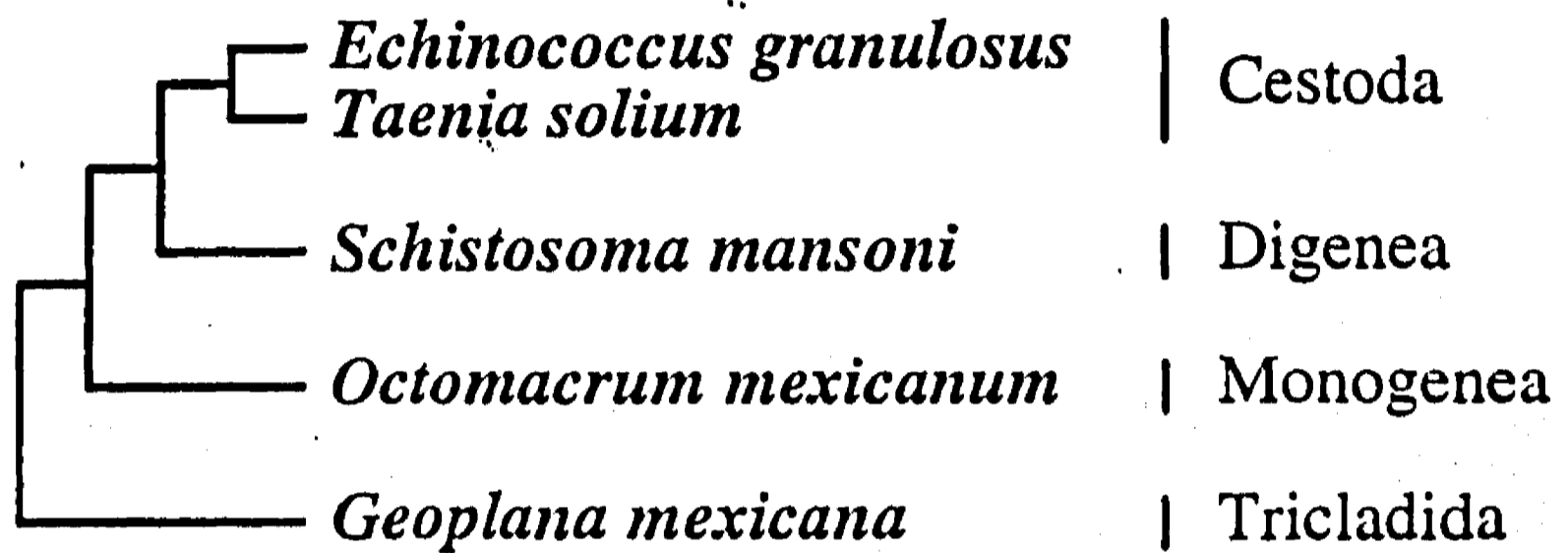


Fig. 5. Phylogenetic tree of Neodermata, with Tricladida as the outgroup, based on the combined ribosomal, actin and tubulin data. The single most parsimonious tree is shown, of length 321 and consistency index of 0.754.

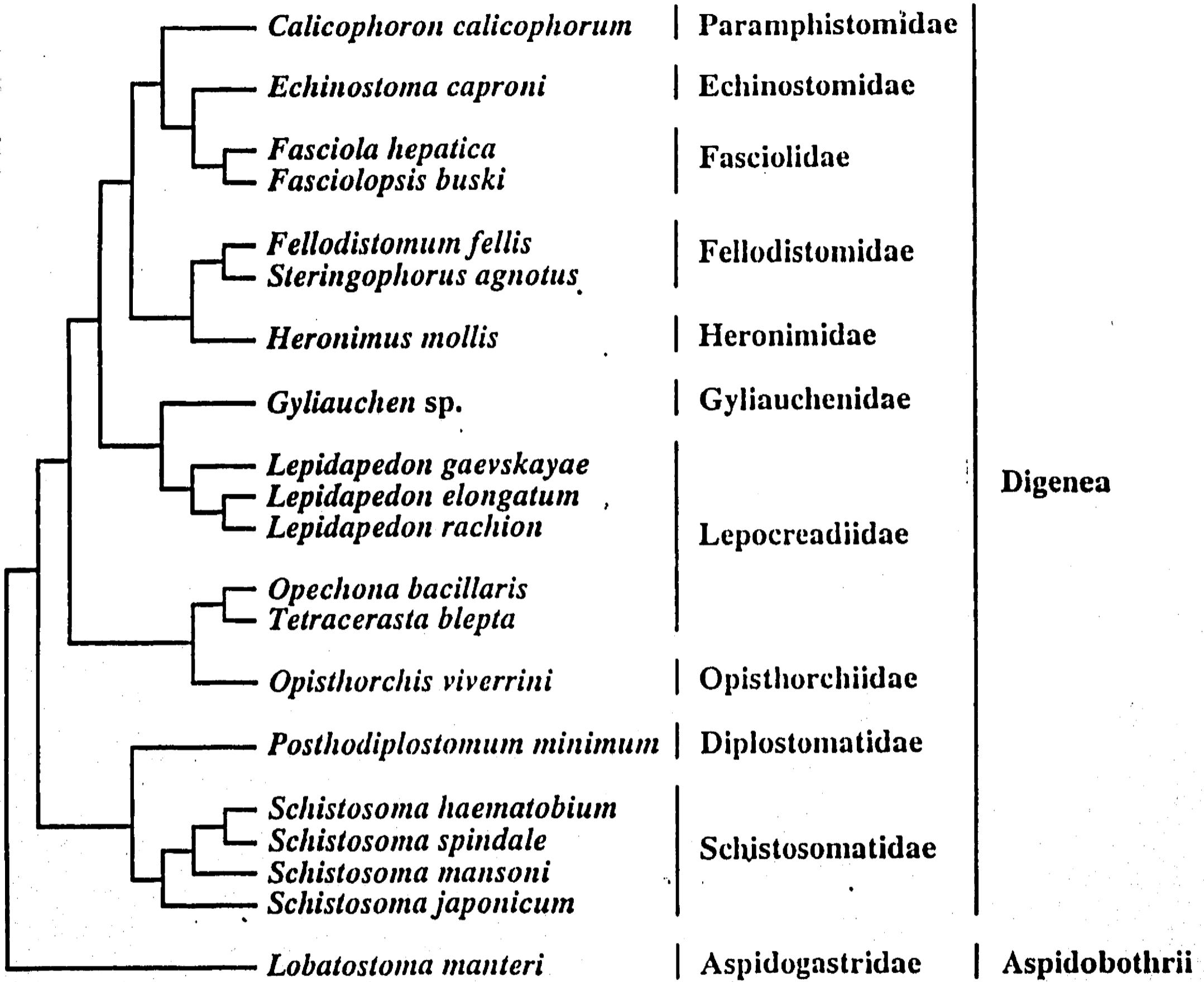


Fig. 6. Phylogenetic tree of Trematoda. The single most parsimonious tree is shown, of length 906 and consistency index of 0.587.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

- Ax., P. (1984). Das phylogenetische system. (Systematisierung der lebenden natur aufgrund ihrer phylogenese). Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, New York.
- Ax., P. (1985). The position of the Gnathostomulida and Plathelminthes in the phylogenetic system of the bilateria. En "The origins and relationships of lower invertebrates". (Edited by Conway Morris S., George J. D., Gibson, R. y Platt, H. M. pp. 168-180. Oxford University Press, Oxford.
- Bazitov, A. A. (1984) [Taxonomic relations of parasitic Platyhelminthes]. *Zoologicheskij Zhurnal* 63: 818-827. (En ruso).
- Brooks, D. R. (1982) Higher level classification of parasitic Platyhelminthes and fundamentals of cestode classification. En "Parasites: their world and ours". Mettrick, D.F. and Desser S.S. (eds.) Elsevier Biomedical Press, Amsterdam. 189-193 (281 p.)
- Brooks, D. R., O'Grady, R. T. y Glen, D. R. (1985a) The phylogeny of the Cercomeria, Brooks, 1982 (Platyhelminthes). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 52: 1-20
- Brooks, D. R., Bandoni, S. M. Macdonald, C. A. y O'Grady, R. T. (1989) Aspects of the phylogeny of the Trematoda Rudolphi, 1808 (Platyhelminthes: Cercomeria). *Can. J. Zool.* 67: 2609-2624
- Brooks, D. R. (1992) New distribution records for *Bunoderia eucaliae* and *Bunoderia inconstans* n. comb. (Digenea: Allocreadiidae: Bunoderinae) with discussion of their phylogenetic relationships. *J. Parasitol.* 78(5): 779-783
- Bychowsky, B. E. (1937) Ontogenic and phylogenetic relationships of parasitic flatworms. *Bull. Acad. Sci. URSS, class. Sci. Math. et Nat. Ser. Biol.* (Traducción al inglés del Virginia Institute of marine Sciences) 1353 p.
- Dobzhansky, T., Ayala, F. J., Stebbins, G. L. y Valentine J. W. (1980) Evolución. Omega, Barcelona España. 558 p.
- Ehlers, U. (1984). Phylogenetisches system der Plathelminthes. *Verhandlugen des Naturwissenschaftlichen Vereins Hamburg* 27: 291-294
- Ehlers, U. (1985). Das Phylogenetische System der Platyhelminthes. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, New York. 317 pp.

Fuhrmann, O. (1928) Zweite Klasse des Cladus Platyhelminthes. En "Handbuch der Zoologie", Vol. 2 (Edited by Kukenthal W. and Krumbach T.), pp 1-140. Walter de Gruyter, Berlin.

Gibson, D. I. (1981) Evolution of digeneans. *Parasitology* 82: 161-162

Gusev, A. (1992) A response to Malmberg. *Systematic Parasitology* 21: 167-168

Hendelberg, J. (1986) The phylogenetic significance of sperm morphology in the Platyhelminthes. *Hydrobiologia* 132: 53-58

Ivanov, A. V. (1991) [The state-of-the-art system of Platyhelminthes]. *Zoologicheskij Zhurnal* 70: 5-19. (En ruso).

Joffe, B. I. (1987) [On the evolution of the pharinx in flatworms]. Trudi zoologicheskogo Instituta AN SSSR, Leningrad. 167: 34-71. (En ruso).

Joffe, B. I., Slusarev, G. S. y Timofeeva, T. A. (1987) [Pharinx structure in the monogeneans and their phylogenetic relationships with the turbellarians]. *Parazitologiya* 21: 472-481. (En ruso).

Joffe, B. I. y Chubrik, G. K. (1988) [The structure of the pharinx in trematodes and phylogenetic relations between Trematoda and Turbellaria]. *Parazitologiya* 22: 296-303. (En ruso).

Joffe, B. I. y Kotikova, E. A. (1989) [System anatomy of Dalyellioida (Turbellaria, Neorhabdozoa)]. *Zoologicheskij Zhurnal* 68: 165-177. (En ruso).

Jondelius, U. y Thollesson, M. (1993) Phylogeny of the Rhabdozoa (Platyhelminthes): a working hypothesis. *Can. J. Zool.* 71: 298-308

Justine, J.-L. (1991a) Phylogeny of parasitic Platyhelminthes: a critical study of synapomorphies proposed on the basis of the ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa. *Can. J. Zool.* 69: 1421-1440

Justine, J.-L. (1991b) Cladistic study in the Monogenea (Platyhelminthes), based upon a parsimony analysis of spermiogenetic and spermatozoal characters. *Intl. J. Parasitol.* 21: 821-838

Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L. y Pace, N. R. (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 6955-6959

Lamothe-Argumedo, R. (1983) Introducción a la biología de los platelmintos. AGT editor, S. A. México, D. F. 143 p.

- Llewellyn, J. (1981) Evolution of digeneans. *Parasitology* 82: 165-167
- Malmberg, G. (1981) Evolution of digeneans. *Parasitology* 82: 164-165
- Malmberg, G. (1982) On evolutionary processes in Monogenea, though basically from a less traditionally viewpoint. En "Parasites: their world and ours". Mettrick, D.F. and Dessler S.S. (eds.) Elsevier Biomedical Press, Amsterdam. 198-202 (281 p.)
- Malmberg, G. (1986) The major parasitic platyhelminth classes - progressive or regressive evolution? *Hydrobiologia* 132: 23-29
- Mamkaev, Y. V. (1986) Initial morphological diversity as a criterion in deciphering turbellarian phylogeny. *Hydrobiologia* 132: 30-33
- Margulis, L. and K. V. Swartz (1976) Five Kingdoms. W. H. Freeman, San Francisco 338 p.
- Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48: 443-453
- O'grady, R. T. (1985) Ontogenetic sequences and the phylogenetics of parasitic flatworm life cycles. *Cladistics* 1(2): 159-170
- Patterson, C., Williams, D. M. y Humphries, C. J. (1993) Congruence between molecular and morphological phylogenies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24: 153-188.
- Pearson, J. C. (1992) On the position of the digenean family Heronimidae: an inquiry into a cladistic classification of the Digenea. *Systematic Parasitology* 21: 81-166.
- Rohde, K. (1988) Phylogenetic relationship of free-living and parasitic Platyhelminthes on the basis of ultrastructural evidence. *Fortschritte der Zoologie.* 36: 353-35"
- Rohde, K. (1991) The evolution of protonephidia of the Platyhelminthes. *Hydrobiologia* 227: 315-321
- Smith, J. P. S., Teyler, S. y Rieger, R. M. (1986) Is the Turbellaria polyphyletic? *Hydrobiologia* 132: 13-21
- Smith, J. P. S. y Teyler, S. (1986) Frontal organs in the Acoelomorpha (Turbellaria): Ultrastructure and phylogenetic significance. *Hydrobiologia* 132: 71-78

Sopott-Ehlers, (1985) The phylogenetic relationships within the Seriata (Platyhelminthes). En "The origins and relationships of lower invertebrates". (Edited by Conway Morris S., George J. D., Gibson, R. y Platt, H. M. pp. 159-167. Oxford University Press, Oxford.

Swofford, D. L. y Olsen, G. J. (1990) Phylogeny reconstruction. En "Molecular Systematics". Hillis, D. M. y Moritz, C. (eds) Sinauer Associates, Sunderland, MA

Wainright, P. O., Hinkle, G., Sogin, M. L. y Stickel, S. K. (1993) Monophyletic origins of the metazoa: An evolutionary link with fungi. *Science* **260**: 340-342

Wheeler, W. C. y Honeycut, R. L. (1988) Paired sequence difference in ribosomal RNAs: Evolutionary and phylogenetic implication. *Mol. Biol. Evol.* **5**: 90-96

Williams, J. B., (1986) Phylogenetic relationships of the Temnocephaloidea (Platyhelminthes). *Hydrobiologia* **132**: 59-67

Willmer, P. (1990) Invertebrate relationships: Patterns in animal evolution. Cambridge University Press, Cambridge. 400 p.

Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271

MOLBIO 01309

Cloning and sequencing of two actin genes from *Taenia solium* (Cestoda)

Andrés Campos¹, Philippe Bernard^{1*}, Alan Fauconnier¹, Abraham Landa¹, Erika Gómez¹, Roberto Hernández², Kaethe Willms¹ and Juan Pedro Laclette¹

Departments of ¹Immunology and ²Molecular Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

(Received 31 August 1989; accepted 15 November 1989)

Genomic and cDNA actin clones were isolated from *Taenia solium* gene libraries. The actin genes are interrupted by intervening sequences. Protein coding regions of both genes predict the same amino acid sequence. cDNA sequence data indicate that at least one gene is expressed at the larval stage. Results from Northern and Western blots showed that *T. solium* expresses an actin transcript of about 1 400 bases and a protein of 45 000 Da.

Key words: *Taenia solium*; Cestode actin DNA sequencing; Gene cloning; cDNA cloning

Introduction

Actins are contractile proteins that have been preserved with few changes during the evolution of eukaryotic organisms [1, 2]. Actins are generally coded by multigene families [3] although lower eukaryotic species with single copy genes have also been found [4 - 6]. The number of actin genes can vary in different species from 1 to more than 15.

Human and porcine cysticercosis is a parasitic disease caused by the larval stage of *Taenia solium* (Cestoda). The disease is endemic in several countries of Latin America, Africa and Asia. The actin genes were selected as an accessible model

for the study of protein coding genes in this organism. We describe the cloning and sequencing of two actin genes from *T. solium*. Evidence is presented that at least one of the genes is expressed at the larval stage.

Materials and Methods

Collection of *T. solium* larvae. Cysticerci were dissected from skeletal muscle of naturally infested pigs and frozen immediately at -70°C , until use. The cysts were always obtained between 2 and 6 h after slaughter.

Western blots. Crude extracts of *T. solium* or *Taenia crassiceps* cysticerci were obtained as described before [7]. Samples of about 100 μg of the crude extracts were electrophoresed through polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE), using 10% preparative gels as described by Laemmli [8]. Immunoblotting was carried out according to Towbin *et al.* [9] on nitrocellulose membranes, using monoclonal antibodies to human actin. Molecular weights of protein bands were estimated using the molecular weight standards from Bio-Rad Laboratories.

Correspondence (present) address: Juan Pedro Laclette, Dept. of Tropical Public Health, Harvard School of Public Health, 665 Huntington Avenue, Boston, MA 02115, U.S.A.

***Present address:** Laboratoire de Génétique, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium.

Note: Nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the GenBank™ data base with the accession numbers M28996 (pAT5) and M28997 (pAT6).

Abbreviations: IgG, immunoglobulin class G; Pol II, DNA polymerase II; SSC, standard saline citrate.

Isolation of *T. solium* DNA and RNA. 10 g of cysticerci were thawed in 100 ml of standard saline citrate (SSC): 150 mM NaCl/15 mM sodium citrate, pH 7.0, and homogenized with a Teflon tissue grinder. Nuclear material was then collected by centrifugation at 3 300×g for 20 min. The pellet was lysed at 50°C for 3 h in 0.5 M EDTA/0.5% Sarkosyl (w/v)/0.1 mg proteinase K ml⁻¹. The lysate was extracted 3 times with phenol, dialyzed against 1 mM EDTA/10 mM Tris-HCl, pH 7.5, and treated with 100 µl RNase A ml⁻¹. DNA was finally purified by ultracentrifugation to density equilibrium in CsCl.

Total cellular RNA was isolated from cysticerci following an adaptation of the guanidine chloride extraction method [10] as described previously [11].

Southern and Northern blot hybridizations. Restriction fragments of *T. solium* DNA were transferred from 0.8 – 1% agarose gels to nitrocellulose membranes following standard techniques [12]. Prehybridization and hybridization were carried out in 50% (v/v) formamide/2 mM EDTA/0.2% (w/v) SDS/4× Denhardt's solution [13]/2× SSC/120 mM sodium phosphate, pH 7.0, at 37°C for 2 and 24 h, respectively. In Southern hybridizations the nick-translated [14] 2.4-kb *Hind*III insert of an actin clone (pAA3) from *Acanthamoeba castellanii* was used as probe [15]. The nick translation kit and the [α -³²P]dATP were from Amersham International plc.

For Northern hybridizations, total RNA was transferred from 6% formaldehyde/1% agarose gels [16] to Gene Screen membranes (NEN Research Products) according to the manufacturer's directions. After being air-dried, all filter membranes were baked at 65°C for 90 min in a vacuum oven. DNA:RNA hybridization conditions were as for Southern experiments but using the 455-bp *Bgl*III – *Xho*I fragment of pAT5 as probe (see fragment D in Fig. 1). Washing conditions for both Southern and Northern hybridizations were: 0.2% (w/v) SDS in 0.1× SSC for 2 h at 37°C. Hybridization bands were detected by autoradiography of the membranes using intensifying screens.

Construction and screening of a genomic library. *T. solium* genomic DNA was digested with *Eco*RI restriction endonuclease, ligated into dephosphorylated plasmid pBR322 [17] and used to transform *Escherichia coli* cells MC1061 [18] by standard procedures [19]. 40 000 colonies were screened as described in [20] using the nick-translated 2.4-kb insert from *A. castellanii* actin clone pAA3, as heterologous probe [15]. Hybridization conditions were as above, except that the hybridization mix did not contain SDS. Two positive clones were isolated (pAT5 and pAT6) and used for further analysis.

Construction and screening of a cDNA library. *T. solium* poly(A)⁺ mRNA was obtained by chromatography of total RNA through oligo(dT) cellulose (Sigma Chemical Co.) [21]. Double-stranded cDNA was prepared using the cDNA synthesis system from Amersham International plc, based in the method described by Gluber and Hoffman [22]. Double stranded blunt-ended cDNA was extracted with phenol/chloroform; precipitated with ethanol and methylated with *Eco*RI methylase. *Eco*RI linkers (New England Biolabs, Inc.) were added before ligation into λ gt11. The *in vitro* packaging was carried out using the Proclone λ gt11 system from Promega Biotec. The library was amplified as plate lysates on agar and screened according to Benton and Davis [23] with fragment D of pAT5 as probe (Fig. 1).

Nucleotide sequence analysis. Selected restriction fragments from the 3.85-kb and 2.7-kb inserts of pAT5 and pAT6 (Fig. 1) were subcloned in both orientations into the multiple cloning sites of M13mp18 and M13mp19 vectors [24]. Cloned cDNA inserts were similarly treated. Sequence was carried out with the Sequenase kit (United States Biochemical Corporation) and/or with the *Taq* DNA polymerase kit (Stratagene) according to the dideoxy chain termination method [25], using either [α -³⁵S]dATP or [α -³²P]dATP (Amersham).

Analysis of the obtained sequences was carried out in a microcomputer with the aid of the Pustell Sequence Analysis System (International Biotechnologies, Inc).

Results and Discussion

The use of an heterologous DNA probe from *A. castellanii* in Southern blot assays, allowed detection of 3 to 8 sequences homologous to actin genes in the DNA from *T. solium*. This number of actin-related sequences is in agreement with the number of actin sequences in other eukaryotic species ranging from 1 in simple eukaryotes [4 - 6] to more than 15 in higher groups [3, 26, 27]. Thus, *T. solium* possesses a small family of actin-related sequences.

Characterization and nucleotide sequence of the actin genes. The restriction maps and sequencing strategy of the pAT5 and pAT6 inserts were deduced by double digestions (Fig. 1). Both sequences (Fig. 2) include coding regions for a complete 376-amino acid actin protein, a single intervening sequence per actin gene and untranslated upstream and downstream flanking regions. The predicted amino acid sequences from the two putative coding regions in pAT5 and pAT6 are identical (Fig. 2). Amino acid residues in sequence are numbered according to Vandekerckhove [28].

The coding region of both genes is interrupted by an intervening sequence beginning after the codon for the amino acid 41. These intronic se-

quences are 395 bp long in pAT5 and 413 bp long in pAT6. The exon-intron junction sequences implicated in the splicing of mRNA are similar to those found in other eukaryotic protein-coding split genes [29]. The 5'-splice junction sequences 5'-CAGGTTAGT-3' in pAT5 and 5'-CAGGTTGGT-3' in pAT6 are similar to the consensus sequence of donor site 5'- $\overset{\wedge}{\text{C}}\text{AGGT-}\overset{\wedge}{\text{G}}\text{AGT-3'}$, proposed by Breathnach and Chambon [30]. The 3'-splice junction sequences 5'-CCTCTTCTAGGG-3' in pAT5 and 5'-TTTCCTCCAGGG-3' in pAT6 are similar to the consensus sequence of acceptor site 5'-PyPyPyPyPyPyX $\overset{\wedge}{\text{C}}\text{AGG}\overset{\wedge}{\text{G}}\text{-3'}$ [30].

The upstream sequences 5'-CCAAT-3' (position -126) and 5'-CCAAAT-3' (position -95) in pAT5 and 5'-CCAAT-3' (position -130) in pAT6 coincide with consensus sequences of CAAT box structures [31, 32]. The upstream sequences 5'-TATATAA-3' (position -71) in pAT5 and 5'-CATAAAT-3' (position -76) and 5'-TA-TAAGA-3' (position -53) in pAT6 coincide with consensus sequences of TATA box structures [33]. Putative recognition signals for polyadenylation of eukaryotic mRNAs (AAUAAA) [34] are present in pAT5 and pAT6 inserts 63 and 73 nucleotides downstream from the stop codons, respectively.

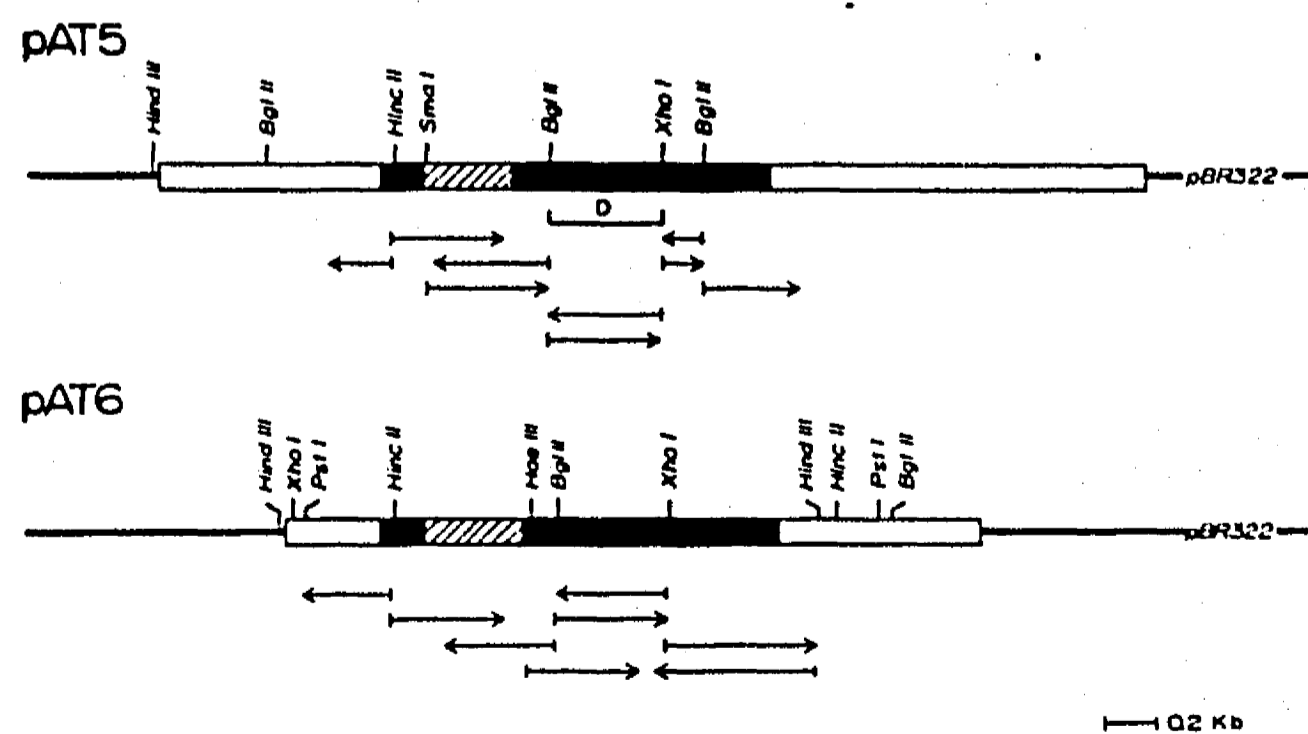


Fig. 1. restriction maps and sequencing strategy of the *T. solium* actin genomic clones pAT5 and pAT6. Both genomic fragments (shown as bars) were cloned in the *EcoRI* site of pBR322. Arrows indicate the direction and the extent of sequenced DNA. Solid bars represent the protein-coding region and the hatched area represents the intron sequences. Other *SmaI* sites in pAT5 and *HaeIII* sites in pAT6 are not shown. Fragment D (from pAT5) was used as probe in several experiments (see text).

```

-168          pAT6 TTCTCCCCGCCAGTGTGCACGTCGGTCCGCCACGGCTCCAATTGGACGTGCGGAGCGGGCTAAATC
          pAT5 CCATTTTAGGCAATAGCGGTGACTGCCCGTCCACTCTCCAACCAATCAGTACAGGGTAAGGAGTGTG
-101 AGGGTGTGCGCGTGTACAGCTTTCCATAAAATGGACATGATGGAGAGGTAAAGAGCGCTTGGTGGGACACCAGTGGCACACTTGTCCAAGGCCAGCAGT
CATAACCAAAATAGCCACGCCAAAATCTTATATAAACCGTGGGTCTTCAAGCATCGGCAACTTACGACTTGTGCTGTATCTGTATCGGCTGTCTGCAAC
  N G D E E V Q A L V V O N G S G N C K A G F A G D D A P R A V F P 33
  1 ATGGGTGACGAAGAAGTTCAGGCTCTCGTGGTTGACAAATGGCTCCGGTATGTGCAAAGCCGATTCCGCCGAGATGATGCTCCTCGTGCCGCTTTCCCT
.....A.....C.....T..G.....G..C..C.....
  S I V G R P R N 41
  101 CCATCGTTGGACGTCCCGTCACCAGGTTGGTTTCAGTTCCTCTCTAACCITTCGGTATGCTCTCCATCTTATATTCCTTGCCAAATATAGCGGCAA
.A.....T..C..T.....GTTAGTCTATTGCTCCTTCTCCTGTATACCCCGGGTAATGCAGCAGAAATGACGCTTTTATGAACCATAGC
  201 CGACACTTACATAAACCACTACTAAGTTGGAACCGTAGTATAGTTGTGTATAGTAGTTGATATCAGCTTGATAATATTTTGTGGCAGAAGTATCTGG
GTTGCCGTGCACAGCATCAATGTTTTTAGCACTGTAGTTTATGTCAGCGTTAAGACATTTACGCTGACTGAAATATGGGTAGAATAAATATCTGAGAA
  301 ATAGTAAATTAACATCCTAGAAGACAATGCATATATTAATCAGTGAGGAAGTGAAGTTGGGAGAAAGAGCTTTACCGCCACCCGTCGGTGCAAAATC
GGCAGAGGCATATATAGTCAGTAAGGAAGCTAAGTTAGGGAGATAGATTCTTATCGCCACCTGCGGTGCAAGACTCTCTTTGGCAAGTCAGAGTAAT
  401 TCTCTGACAAGTCAGTGTAACTAATATAGGACGATGGCCGAAAGACAATAGTAACTTTGAGATAGGGACACTATCTCTTCTTGGCTGCTGGTGGT
ATACCTATAAGACAATGGCCATAAAGACAATGGTGAGTGACTTTGAGATAGAGACTTATCTCTTCTTACGCTGCCTAGTGTGCAACCCAAACGGAG
          Q G V N V G M G Q K D S Y V G D E A Q S K 62
  501 GACCCGCAACCAACCGAGAGTGTATTTTTCTCCAGGGTGTCTGCTGGCGCATGGCCGCAAGGATAGCTACGTCGGTGATGAGGCGCAGTCGAAAC
AGGTAATTTTTCTCTCTAG.....A.....C.....T.....
  R G I L T L K Y P I E H G I V T M W D D M E K I W H N T F Y M E L R 96
  601 GTGGTATCCTCACCCCTGAAGTACCCCATCGAGCAGGGCATCGTGACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCATCACACCTTCTACAACGAGCTGGC
.....C.....
  V A P E E N P V L L T E A P L M P K A N R E K M T Q I N F E T F N 129
  701 TGTCCGCTCCCGAGGAGCACCCAGTACTGCTGACTGAGGCGCGCTCAACCCCTAAGGGCAACCGTGAGAAGATGACTCAAATCATGTTGAGACATTCAAC
.....
  T P A M Y V G I Q A V L S L Y A S G R T T G I V L D S G D G V T H 162
  801 ACGCCCGCATGTATGTCGGCATCCAGGCAGTGGTGTCCGTCTACCGCATCTGGTCCGTACCCTGGTATCGTGGTCCGACTCGGGTGACGGTGTCACTCACA
.....C.....T.....
  S V P I Y E G Y A L P H A I L R L D L A G R D L T D Y L M K I L T E 196
  901 GCGTGCCCATCTACGAAGGTTACGCCCTGCCCTCAGCCATCCTCGCTCTCGATTGGCTGGTGGTGTCTCACTGACTACCTCATGAAGATCCTCACAGA
.....A.....
  R G Y S F T T A E R E I V R D I K E K L C Y V A L D F E Q E M A 229
  1001 GCGCGGCTACTCGTTCACCACCACGGCAGCGTGAATCGTGGTGCATCAAGGAGAAGCTCTGCTATGTGGCTCTCGACTTCGAGCAGGAGATGGCG
.....
  T A A S S S S L E K S Y E L P D G Q V I T I G M E R F R C P E S L 262
  1101 ACTGCTGCCCTCCAGCTCCTCCCTCGAGAAGTCTACGAGCTGCCCGATGGTCAGGTCATCACCATCGGCAACGAGCGCTTCCGTGGCCCTGAATCTCTCT
.....
  F Q P S F L G M E S A G I N E S T F M A I M K C D V D I R K D L Y A 296
  1201 TCCAGCCAGCTTCTGGGTATGGAATCTCGGGTATCCAGGAGTCTACTTCAACGCTATCATGAAGTGGATGTAGACATCCGTAAGGATCTCTACGC
.....T.....A.....A.....G.....A.....
  M T V L S G G T T M Y P G I A O R M Q K E I T S L A P S T M K I K 329
  1301 CAACACTGTGTGTCTGGCGGCACCACCATGTACCCAGGATTTGCAGACCGTATGCAGAAGGAGATCACCTCACTGGCGCAAGCACCATGAAGATCAAG
.....
  I V A P P E R K Y S V W I G G S I L A S L S T F Q Q N W I S K Q E 362
  1401 ATAGTGGCCACCTGAGCGCAAGTACTCTGTCTGGATCGGTGGCTCCATCCTTGCCTCACTCTCCACCTCCAGCAGATGTGGATCTCAAGCAGGAGT
.....
  Y D E S G P G I V N R K C F 376
  1501 ACGAGGAGTCTGGCCCTGGCAITGTTCATCGCAAGTCTTCAAGCACTTCAACGTCAGCTTACCGTTTAGGGTCTAACTTAATGTCAATTCGCTT
.....A.....C..C.....GGGCTAATCAAGCTACATGTCTCTCTGCTCTTTCAGCATTCACTTATTT
  1601 ACCACACAGTTCCGGTCAATAACATGTGAGCAAAAGGCTTCGCTCTTATCCACTTACCAAACTTTT
TTTTCTTAATTAATAAATAAAAAAACATTCACCTCTGATATCTATACTCGGATGAGTGAGGCTGATGAGC

```

Fig. 2. nucleotide and predicted amino acid sequences from the minus strands of the inserts in pAT6 and pAT5. Homologous positions in the protein-coding regions are indicated by points. Putative regulatory elements: CAAT and TATA boxes; sequences for splicing and polyadenylation are underlined.

Expression of actin in T. solium cysticerci. A total protein extract from *T. solium* cysticerci was subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Detection was carried out using a monoclonal antibody against human actin. Results show a single protein band with an

apparent molecular weight of 45 000 (Fig. 3A). The molecular weight of actin detected in the protein extract of *T. crassiceps* cysticerci gave identical results. This molecular weight is similar to actins from different species. The fact that the actin of cysticerci was detected using monoclonal

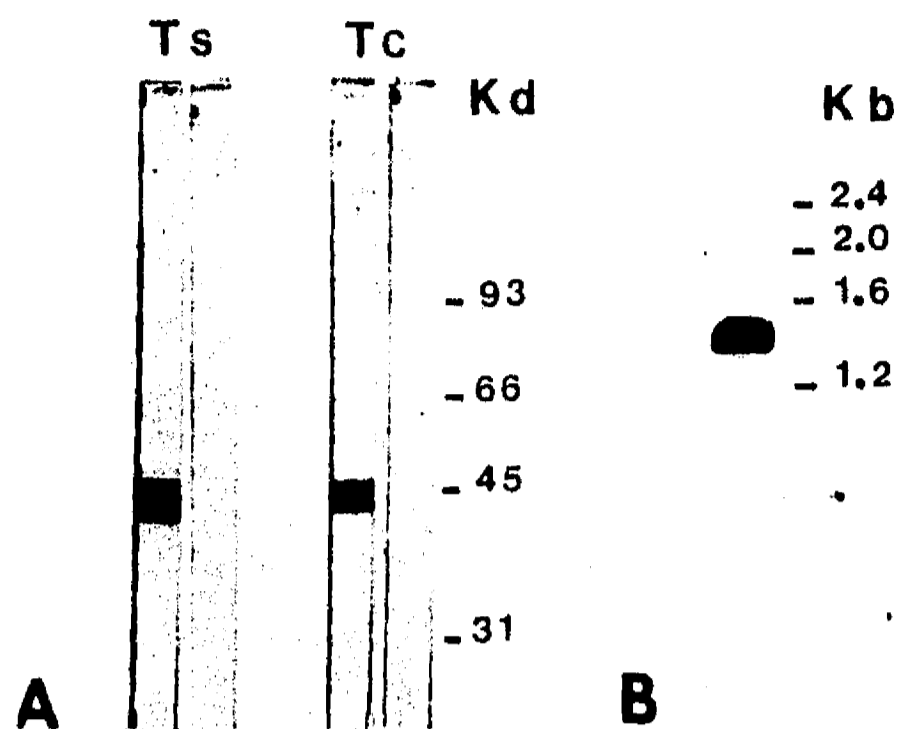


Fig. 3. Expression of actin in cysticerci. (A) Immunoblots of a crude extract from *T. solium* (lanes 1 and 2) or *T. crassiceps* (lanes 3 and 4) using monoclonal antibodies to human actin (lanes 1 and 3) or normal mouse IgG (lanes 2 and 4). (B) Northern blot of total RNA (10 μ g) from *T. solium* probed with an exonic sequence (see fragment D in Fig. 1) of *T. solium* actin gene in pAT5. The apparent length of the transcript was calculated using *Trypanosoma cruzi* rRNAs as reference [36].

antibodies specific to human actin suggests that the epitope recognized by the antibody was present in the ancestral species of Bilateria.

The occurrence of actin-related transcripts was analyzed through Northern hybridization of total RNA from *T. solium* cysticerci (Fig. 3B). The exonic 455-bp fragment D from pAT5 (Fig. 1) was used as a probe. Autoradiography showed a single hybridization band migrating as an RNA species of about 1 400 bases. However, the presence of several actin mRNAs of undistinguishable length cannot be ruled out. This length is in agreement with the size of actin transcripts reported for other eukaryotic organisms ranging from 1 200 to 1 900 bases.

Construction of the cDNA library and screening for actin transcripts. The screening of the oligo(dT)-primed cDNA library with the exonic fragment D allowed the isolation of three clones. These clones exhibited identical size inserts of about 1 350 bp, as estimated by electrophoresis. Additionally, partial sequencing of protein coding regions of the three clones showed 100% ho-

mology among themselves, indicating a common origin. One of the clones was sequenced from 7 bases upstream from the initiation methionine up to 95 bases downstream from the stop codon TAA. Analysis of this sequence showed 100% homology with the corresponding protein-encoding and non-translated regions of pAT6.

The absolute homology among the cDNA clones and corresponding regions in pAT6 indicates that this gene is expressed at the larval stage. Furthermore, the absence of the intervening sequence in the cDNA inserts demonstrates the splicing event during expression of this gene member.

The 100% homology among predicted amino acid sequences from the two genes of *T. solium*, as well as the conservation of regulatory sequences, makes it likely that the coding region in pAT5 is also expressed in *T. solium*. It is possible that the expression of these two genes is developmentally regulated as observed in other actin gene families. Evidence from experiments using the non-translated flanking sequences as probes would appropriately answer this question. Future experiments will be performed to test this.

The silent nucleotide substitutions among pAT5 and pAT6 are not homogeneously distributed along the entire protein-coding sequences. Eleven (42%) out of 26 changes appear in the first exon which is only 126 bases (11% of the protein-coding region) long. The higher conservation in the second exon cannot be explained by a particularly stringent selective pressure on the portion of the protein encoded by these region of the genes. The occurrence of gene conversions between non-allelic actin genes, as proposed by Crain et al. [35], seems a more plausible explanation.

The cellular and subcellular distribution of actin in taeniid cestodes is not known. The nucleic acid probes as well as the antibody used here can be used as molecular tools to ascertain the expression and participation of actin in the cytoskeleton and muscular tissue of this and other related organisms.

Acknowledgements

We thank W. Nellen for having provided us with the plasmid pAA3 containing an actin gene

from *A. castellanii*; F. Bolívar for the plasmid pBR322 and J.L. Savorio for the monoclonal antibodies to human actin. This work was sup-

ported by a grant from the John and Catherine MacArthur Foundation, Chicago, IL.

References

- 1 Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1984) Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins. The evolution of the different vertebrate muscle actins. *J. Mol. Biol.* 179, 391 - 413.
- 2 Hightower, R.C. and Meagher, R.B. (1986) The molecular evolution of actin. *Genetics* 114, 315 - 332.
- 3 Firtel, R.A. (1981) Multigene families encoding actin and tubulin. *Cell* 24, 6 - 7.
- 4 Ng, R. and Abelson, J. (1980) Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3912 - 3916.
- 5 Cupples, C.G. and Pearlman, R.E. (1986) Isolation and characterization of the actin gene from *Tetrahymena thermophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5160 - 5164.
- 6 Hirono, M., Endoh, H., Okada, N., Numata, O. and Watanabe, Y. (1987) Cloning and sequencing of the *Tetrahymena* actin gene and identification of its gene product. *J. Mol. Biol.* 194, 181 - 192.
- 7 Laclette, J.P., Merchant, M.T. and Willms, K. (1987) Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. *J. Parasitol.* 73, 121 - 129.
- 8 Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 - 685.
- 9 Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 4350 - 4354.
- 10 Strohman, R.C., Moss, P.S., Micou-Eastwood, J., Spector, D., Przybyla, A. and Paterson, B. (1977) Messenger RNA for myosin polypeptides: isolation from single myogenic cell cultures. *Cell* 10, 265 - 273.
- 11 Díaz de León, L., Arcos, L. and Willms, K. (1982) The uses of cell-free systems for the characterization of *Cysticercus cellulosae* antigens. In: *Cysticercosis, Present State of Knowledge and Perspectives* (Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F., eds.), pp. 465 - 475, Academic Press, New York.
- 12 Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503 - 517.
- 13 Denhardt, D. (1966) A membrane filter technique for detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23, 640 - 646.
- 14 Righy, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P. (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113, 237 - 251.
- 15 Nellen, W. and Gallwitz, D. (1982) Actin genes and actin messenger RNA in *Acanthamoeba castellanii*. Nucleotide sequences of the split gene I. *J. Mol. Biol.* 159, 1 - 18.
- 16 Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. and Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16, 4743 - 4751.
- 17 Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L. and Boyer, H.W. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles, II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95 - 113.
- 18 Casadaban, M.J. and Cohen, S.N. (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 138, 179 - 207.
- 19 Mandel, M., and Higa, A. (1970) Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53, 159 - 162.
- 20 Rowekamp, W. and Firtel, R.A. (1980) Isolation of developmentally regulated genes from *Dictyostelium*. *Dev. Biol.* 79, 409 - 418.
- 21 Aviv, H. and Leder, P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1408 - 1412.
- 22 Gluber, U. and Hoffman, B.J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25, 263 - 269.
- 23 Benton, W.D. and Davis, R.W. (1977) Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 196, 180.
- 24 Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103 - 119.
- 25 Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463 - 5467.
- 26 Humphries, S.E., Whittall, R., Minty, A., Buckingham, M. and Williamson, R. (1981) There are approximately 20 actin genes in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 9, 4895 - 4908.
- 27 Minty, A.J., Alonso, S., Guenet J.L. and Buckingham, M.E. (1983) Number and organization of actin-related sequences in the mouse genome. *J. Mol. Biol.* 167, 77 - 101.
- 28 Vandekerckhove, J. (1984) Aminoacid sequence of *Acanthamoeba* actin. *J. Mol. Biol.* 172, 141 - 147.
- 29 Seif, I., Khoury, G. and Dhar, R. (1979) BKV splice sequences based on analysis of preferred donor and acceptor sites. *Nucleic Acids Res.* 6, 3387 - 3397.
- 30 Breathnach, R. and Chambon, P. (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 349 - 383.
- 31 Efstratiadis, A., Posakony, J.W., Maniatis, T., Lawn, R.M., O'Connell, C., Spritz, R.A., DeRiel, J.K., Forget, B.G., Weissman, S.M., Slightom, J.L., Blechl, A.E., Smithies, O., Baralle, F.E., Shoulders, C.C. and Proud-

- foot, N.J. (1980) The structure and evolution of the human globin gene family. *Cell* 21, 653 - 668.
- 32 Benoist, C., O'Hare, K., Breathnach, R. and Chambon, P. (1980) The ovoalbumin gene-sequence of putative control regions. *Nucleic Acids Res.* 8, 127 - 132.
- 33 Goldberg, M. (1979). Ph.D. Thesis, Stanford University, Stanford, CA.
- 34 Fitzgerald, M. and Shenk, T. (1981) The sequence 5'-AAUAAA-3' forms part of the recognition site for polyadenylation of late SV40 mRNAs. *Cell* 24, 251 - 260.
- 35 Crain, Jr., W.R. Boshar, M.F., Cooper, A.D., Durica, D.S., Nagy, A. and Steffen, D. (1987) The sequences of a sea urchin muscle actin gene suggests a gene conversion with a cytoskeletal actin gene. *J. Mol. Evol.* 25, 37 - 45.
- 36 Castro, C., Hernández, R. and Castañeda, M. (1981) *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large molecular-mass species and number of genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2, 219 - 233.