

PHYLOGENOMISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR AUFLÄRUNG DES METAZOA-STAMMBAUMS

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Alexandra Rebecca Wey-Fabrizius
geb. in Koblenz

Mainz, April 2014

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2014

Dekan

1. Gutachter

2. Gutachter

VORWORT

Diese Dissertation wurde kumulativ angefertigt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse wurden in den folgenden Veröffentlichungen detailliert beschrieben:

Kapitel 2.1: Weber, M., Wey-Fabrizius, A.R., Podsiadlowski, L., Witek, A., Schill, R.O., Sugár, L., Herlyn, H., Hankeln, T. (2013) Phylogenetic analyses of endoparasitic Acanthocephala based on mitochondrial genomes suggest secondary loss of sensory organs. *Mol. Phylogenet. Evol.* **66**, 182-189.

Kapitel 2.2: Wey-Fabrizius, A.R., Podsiadlowski, L., Herlyn, H., Hankeln, T. (2013) Platyzoan mitochondrial genomes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **69**, 365-375

Kapitel 2.3: Wey-Fabrizius, A.R., Herlyn, H., Rieger, B., Rosenkranz, D., Witek, A., Mark Welch, D.B., Ebersberger, I., Hankeln, T. (2014) Transcriptome data reveal syndermatan relationships and suggest the evolution of endoparasitism in Acanthocephala via an epizotic stage. *PLOS ONE* **9(2)**, e88618

Kapitel 2.4: Hankeln, T., Wey-Fabrizius, A.R., Herlyn, H., Witek, A., Weber, M., Nesnidal, M.P., Struck, T.H. (2014) Phylogeny of platyzoan taxa based on molecular data. Book chapter in "Deep Metazoan Phylogeny: the backbone of the tree of life". Eds. Waagele, J.W., Bartolomaeus, T. ISBN 978-3-11-027752-4

Kapitel 2.5: Struck, T.H., Wey-Fabrizius, A.R., Golombek, A., Hering, L., Weigert, A., Bleidorn, C., Nickel, B., Meyer, M., Klebow, S., Iakovenko, N., Hausdorf, B., Peterson, M., Kück, P., Herlyn, H., Hankeln, T. (in press) Platyzoan paraphyly based on phylogenomic data supports a non-coelomate ancestry of Spiralia.

Zusätzliche, bisher unpublizierte Ergebnisse, die im Rahmen der Dissertation erzielt wurden, werden in Kapitel 2.6 beschrieben.

INHALTSVERZEICHNIS

VORWORT	I
INHALTSVERZEICHNIS	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Molekulare Phylogenie und Phylogenomik.....	1
1.1.1 Grundlagen der Phylogenie	1
1.1.2 Inkongruenz und Phylogenomik	2
1.1.3 Phylogenien im Wandel der Zeit	3
1.1.4 Limitationen der Phylogenomik	6
1.1.5 Offene Fragestellungen im „Tree of Life“ der Metazoa	7
1.2 Biologie und Phylogenie der Syndermata: Rädertiere und Kratzwürmer.....	11
1.2.1 Die traditionellen Rädertiere: Monogononta, Bdelloidea und Seisonidea.....	11
1.2.2 Die endoparasitischen Kratzwürmer	16
1.2.3 Die interne Phylogenie der Syndermata	20
1.2.4 Gnathifera und Platyzoa: Syndermata im Kontext des Metazoa-Stammbaums ..	22
1.3 Zielsetzung.....	25
2. ERGEBNISSE	27
2.1 Phylogenetic analyses of endoparasitic Acanthocephala based on mitochondrial genomes suggest secondary loss of sensory organs	27
2.1.1 Kurzbeschreibung (deutsche Übersetzung)	27
2.1.2 Geleistete Beiträge zu dieser Publikation	27
2.2 Platyzoan mitochondrial genomes	29
2.2.1 Kurzbeschreibung (deutsche Übersetzung)	29
2.2.2 Geleistete Beiträge zu dieser Publikation	29
2.3 Transcriptome data reveal syndermatan relationships and suggest the evolution of endoparasitism in Acanthocephala via an epizoid stage.....	31
2.3.1 Kurzbeschreibung (deutsche Übersetzung)	31
2.3.2 Geleistete Beiträge zu dieser Publikation	31

2.4 Phylogeny of platyzoan taxa based on molecular data.....	33
2.4.1 Kurzbeschreibung (deutsche Übersetzung)	33
2.4.2 Geleistete Beiträge zu dieser Publikation	33
2.5 Platyzoan paraphyly based on phylogenomic data supports a non-coelomate ancestry of Spiralia	35
2.5.1 Kurzbeschreibung (deutsche Übersetzung)	35
2.5.2 Geleistete Beiträge zu dieser Publikation	35
2.6 Bisher unpublizierte Daten	37
2.6.1 Die Phylogenie der Syndermata basierend auf den Sequenzdaten ribosomaler Proteine	37
2.6.2 Die mitochondrialen Genome der Monogononta.....	42
3. DISKUSSION UND AUSBLICK	50
3.1 Die interne Phylogenie der Syndermata - Implikationen für die Evolution klassisch-biologischer Merkmale	50
3.1.1 Morphologische Merkmalsevolution	50
3.1.2 Die Evolution von Reproduktionsstrategien	54
3.1.3 Die Evolution des Endoparasitismus der Acanthocephala.....	55
3.1.4 Konvergenz und sekundärer Verlust – warum morphologische Merkmale in die Irre führen können	57
3.2 Methodische Aspekte der Phylogenomik	60
3.2.1 Die Analyse transkriptomischer Daten von Nicht-Modellorganismen – Probleme und Möglichkeiten.....	60
3.2.2 Mehr Taxa + mehr Daten = bessere Bäume?	65
3.2.3 Die Qual der Wahl: Welche Marker für tiefe Phylogenien?.....	66
3.3 Das DFG Schwerpunktprogramm 1174 „Deep Metazoan Phylogeny“ – Fortschritt und offene Fragestellungen.....	68
3.3.1 Architektur der mitochondrialen Genome der Syndermata.....	68
3.3.2 Die Frage nach den Gnathifera und der Platyzoa-Hypothese.....	70
4. ZUSAMMENFASSUNG	74
5. LITERATURVERZEICHNIS.....	76
6. DANKSAGUNG.....	97
7. LEBENSLAUF	98
8. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	100

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

+F	empirisch ermittelte Basen <u>f</u> requenzen
+G	<u>G</u> amma-Distribution der Substitutionsraten
+I	Anteil <u>i</u> nvariabler Positionen
µg	<u>M</u> ikro <u>g</u> ramm
ATP6/8	„ <u>A</u> TP Synthase F0 subunit <u>6</u> “, „ <u>A</u> TP Synthase F0 subunit <u>8</u> “
AU	„ <u>A</u> pproximately <u>u</u> nbiased“
Blast	„ <u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool“
BlastN	„Nucleotide Blast“ (Suchsequenz und Datenbank: Nukleotide)
BlastX	Suchsequenz: Nukleotide, Datenbank: Proteine
tBlastN	Suchsequenz: Protein, Datenbank: übersetzte Nukleotidsequenzen
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aare
cDNA	„ <u>C</u> omplementary <u>D</u> NA“ (komplementäre DNA)
COI	„ <u>C</u> ytochrome <u>o</u> xidase subunit <u>I</u> “ (siehe COX)
COX	<u>C</u> ytochrom-c- <u>O</u> xidase (COX1/2/3)
CYTB	<u>C</u> ytochrom <u>b</u> -Gen
DFG	<u>D</u> eutsche <u>F</u> orschungsgemeinschaft
DMP	„ <u>D</u> eep <u>M</u> etazoan <u>P</u> hylogeny“ (Tiefe Phylogenie der Metazoa)
DNA	„ <u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid“ (Desoxyribonukleinsäure)
EST	„ <u>E</u> xpressed <u>s</u> equen <u>e</u> <u>t</u> ag“ (exprimierter Sequenz-Schnipsel)
E-Value	„ <u>E</u> xpect <u>v</u> alue“ (Erwartungswert)
ExoSAP	<u>E</u> xonuklease I – <u>S</u> hrimp <u>A</u> lkaline <u>P</u> hosphatase
GC-Gehalt	Gehalt der Basen <u>G</u> uanin und <u>C</u> ytosin
HaMStR	<u>H</u> idden <u>M</u> arkov <u>M</u> odel based <u>S</u> earch for orthologs using <u>R</u> eciprocity
Hsp82	<u>82</u> kD <u>h</u> eat <u>s</u> hock <u>p</u> rotein
Indel	<u>I</u> nsertion oder <u>D</u> eletion
ISBN	<u>I</u> nternationale <u>S</u> tandard- <u>B</u> uch <u>n</u> ummer
kb	<u>K</u> ilo <u>b</u> asen
kD	<u>K</u> ilo <u>d</u> alton
LB-Score	„ <u>L</u> ong- <u>b</u> ranch <u>s</u> core“
LBA	„ <u>L</u> ong- <u>b</u> ranch <u>a</u> ttraction“
LG	Aminosäure-Substitutionsmatrix von <u>L</u> e und <u>G</u> ascuel
LR-ELW	„ <u>L</u> ocal <u>r</u> earrangement <u>e</u> xpected- <u>L</u> ikelihood <u>w</u> eights“

LR-PCR	„ <u>L</u> ong <u>R</u> ange <u>P</u> CR“
LSO	<u>L</u> aterale <u>s</u> ensorische <u>O</u> rgane
Mio.	<u>M</u> illions
MITOS	„ <u>M</u> itochondrial genome annotation <u>s</u> erver“
ML	<u>M</u> aximum <u>L</u> ikelihood
MRP	<u>M</u> atrix <u>R</u> epresentation <u>P</u> arsimony
mt	<u>m</u> itochondrial
NADH	reduzierte Form des <u>N</u> icotinamid- <u>A</u> denin- <u>D</u> inukleotids
NCBI	<u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> iotechnology <u>I</u> nformation
NCR	„ <u>N</u> on- <u>c</u> oding <u>r</u> egion“ (nicht-kodierende Region)
ND	„ <u>N</u> ADH <u>d</u> ehydrogenase subunit“ (ND1/2/3/4/4L/5/6)
NGS	„ <u>N</u> ext generation <u>s</u> equencing“
Numt	“ <u>N</u> uclear <u>m</u> itochondrial DNA“
OLC	„ <u>O</u> verlap <u>L</u> ayout <u>C</u> onsensus“
PCR	„ <u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction“ (Polymerasekettenreaktion)
pWSK	<u>p</u> osteriore <u>W</u> ahr <u>s</u> cheinlich <u>k</u> eit
qPCR	<u>q</u> uantitative RealTime- <u>P</u> CR
RGCs	„ <u>R</u> are <u>g</u> enomic <u>c</u> hanges“ (seltene genomische Änderungen)
RNA	„ <u>R</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid“ (Ribonukleinsäure)
RP	<u>r</u> ibosomale/s <u>P</u> rotein/e
RPG	„ <u>R</u> ibosomal <u>P</u> rotein <u>G</u> ene Database“
rpl	Protein der großen Untereinheit eines eukaryotischen Ribosoms (rpl41)
rps	Protein der kleinen Untereinheit eines eukaryotischen Ribosoms (rps4/4x/27a/40)
rRNA	<u>r</u> ibosomale <u>R</u> NA
rtREV	Aminosäure-Substitutionsmatrix basierend auf den Sequenzen <u>r</u> etro <u>v</u> iraler <u>r</u> everser <u>T</u> ranskriptasen
S	<u>S</u> vedberg (16S, 18S, 28S)
SEM	„ <u>S</u> canning <u>E</u> lectron <u>M</u> icroscope“ (Rasterelektronenmikroskop)
spec.	nicht genau definierte Spezies (aus dem lateinischen: „ <u>s</u> pecies“)
StdDev	„ <u>S</u> tandard <u>d</u> eviation of split frequencies“
tRNA	<u>t</u> ransfer <u>R</u> NA
vs.	<u>v</u> ersus
z. B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1 – Darstellung der Supermatrix- und Supertree-Methoden.....	3
ABBILDUNG 2 – Schemata der traditionellen und der molekular basierten Metazoa-Phylogenie	4
ABBILDUNG 3 – Phylogenie der Spiralia (Stand 2010).....	8
ABBILDUNG 4 – Darstellung verschiedener Formen und Lebensweisen der Rotifera.....	12
ABBILDUNG 5 – Schematische Darstellung eines Rädertiers (Rotifera).....	13
ABBILDUNG 6 – Schematische Darstellung eines adulten Kratzwurmes (Acanthocephala).....	17
ABBILDUNG 7 – Hypothesen zur internen Phylogenie der Syndermata	21
ABBILDUNG 8 – Hypothesen zur internen Phylogenie der Acanthocephala.....	22
ABBILDUNG 9 – Hypothesen zur Phylogenie der Protostomia.....	23
ABBILDUNG 10 – Ergebnisse der Analysen des „RP76“ Datensatzes	39
ABBILDUNG 11 – Ergebnisse der Analysen des „RP38“ Datensatzes	40
ABBILDUNG 12 – Mitochondriales Genom von <i>Brachionus manjavacas</i> : Subgenom I	45
ABBILDUNG 13 – Mitochondriales Genom von <i>Brachionus manjavacas</i> : Subgenom II	46
ABBILDUNG 14 – Mitochondriales Genom von <i>Brachionus calyciflorus</i>	48
ABBILDUNG 15 – Annotation der mitochondrialen Contigs von <i>Lecane inermis</i>	49
ABBILDUNG 16 – Ausprägung der Corona bei Bdelloidea und Seisonidea	51
ABBILDUNG 17 – Hypothesen zur Evolution der Corona innerhalb der Syndermata	52
ABBILDUNG 18 – Hypothesen zur Evolution der lateralen sensorischen Organe innerhalb der Acanthocephala	53
ABBILDUNG 19 – Darstellung der Unterschiede zwischen OLC-Methode und de Bruijn-Graph	61
ABBILDUNG 20 – Phylogenie der Protostomia	72

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1 – Ergebnisse phylogenetischer Rekonstruktionen nach Taxon-Exklusion.....	41
TABELLE 2 – Mitochondriale Contigs der drei untersuchten Monogononta-Spezies	43
TABELLE 3 – Primer zur Kopienzahl-Bestimmung der <i>B. manjavacas</i> mt Subgenome	47
TABELLE 4 – Assemblierungsergebnisse <i>Seison spec.</i> 454 reads.....	63
TABELLE 5 – Assemblierungsergebnisse <i>M. hirudinaceus</i> Illumina reads	64
TABELLE 6 – Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sequenzierte und analysierte mitochondriale Genome	68
TABELLE 7 – Im Rahmen des DMP-Programms hergestellte transkriptomische Daten von „Platyzoa“-Taxa	71

1. EINLEITUNG

1.1 Molekulare Phylogenie und Phylogenomik

„Virtually all comparative studies of biological variation among species depend on a phylogenetic framework for interpretation.“

(Hillis und Bull, 1991)

1.1.1 Grundlagen der Phylogenie

Die klassische Phylogenetik umfasst die Auswertung der Ontogenese sowie morphologischer, ultrastruktureller und physiologischer Merkmale von rezenten und fossilen Lebewesen, um die Verwandtschaftsverhältnisse und die stammesgeschichtliche Entwicklung dieser Lebewesen in Form von phylogenetischen Bäumen zu rekonstruieren. Mit der Entdeckung der DNA als universellen Träger der Erbinformation aller Lebewesen (Avery et al., 1944) und den in den Folgejahren entwickelten Methoden zur DNA-Amplifikation, -Sequenzierung und -Analyse wurde die Phylogenetik revolutioniert (siehe hierzu z. B. die Bücher von Patterson, 1985; Nei und Kumar, 2000). Inzwischen machen molekular-phylogenetische Analysen, also solche, die auf dem Vergleich von DNA- oder daraus abgeleiteten Proteinsequenzen basieren, einen großen Teil der publizierten phylogenetischen Arbeiten aus (Page und Holmes, 2008). Die Vorteile molekularer Daten liegen auf der Hand:

- 1) Sie sind (im Gegensatz zu manch morphologischen Merkmalen) eindeutig zu beschreiben.
- 2) Durch sie ist ein Vergleich von Taxa über große phylogenetische Distanzen hinweg problemlos möglich.
- 3) Sie sind vergleichsweise einfach, günstig und in großer Menge herzustellen und auch bereits in großem Umfang in öffentlichen Datenbanken hinterlegt.

Vor allem der letzte genannte Punkt gewinnt mehr und mehr an Bedeutung (Bininda-Emonds, 2011). Mit Etablierung der sogenannten „Next Generation Sequencing“ (NGS)-Methoden zur DNA-Sequenzierung ist es inzwischen möglich, in vergleichsweise kurzer Zeit immense Datenmengen zu produzieren – und das bei stetig sinkenden Kosten pro sequenzierter Base (Metzker, 2010). Trotz der genannten Vorteile birgt auch die Verwendung molekularer Daten zur Rekonstruktion von Verwandtschaftsverhältnissen verschiedene potentielle Fehlerquellen (Stevens und Schofield, 2003; siehe Yang und Rannala, 2012 für einen aktuellen methodischen Überblick). Neben systematisch-methodischen Fehlern wie der Wahl eines falschen Modells für die Sequenz evolution (Substitutionsmodell) oder einer ungeeigneten Rekonstruktionsmethode kann bereits die Auswahl der Sequenzen selbst kritisch sein. Zur Rekonstruktion eines Speziesbaums sind ausschließlich homologe Sequenzen geeignet, die Sequenzen müssen also aus einem

gemeinsamen Vorläufer entstanden sein. Innerhalb homologer Merkmale wird auf Genomebene weiterhin zwischen paralogen (durch Duplikation entstandenen) und orthologen Sequenzen unterschieden, wobei sich nur letztere zur Rekonstruktion von Spezies-Phylogenien eignen. Im Gegensatz zu Homologien stehen Homoplasien als Merkmale, die konvergent und damit unabhängig voneinander entstanden sind. Grund hierfür ist meist ein ähnlich gerichteter Selektionsdruck. Mannigfaltige Beispiele illustrieren solch konvergente Evolution auf morphologischer wie auch auf molekularer Ebene. Als Beispiele seien hier jüngste Forschungen auf dem Gebiet der Insekten genannt. Niehuis et al. (2012) konnten zeigen, dass spezielle Merkmale der Larvalentwicklung der Strepsiptera (Fächerflügler) zwar jenen der holometabolen Insektenlarven zum Verwechseln gleichen, die in ihrer Arbeit berechnete Topologie auf Grundlage von Genomsequenzen jedoch „in überwältigender Weise“ eine konvergente Evolution dieser morphologischen Charaktere unterstützt. Konvergenz auf molekularer Ebene konnten zum Beispiel Klopstein und Ronquist (2013) nachweisen: innerhalb der Hymenoptera (Hautflügler) weisen Kopien des Elongation factor-1 α -Gens die gleichen Intron-Positionen wie ihre Paralogen auf. Diese konvergente Evolution der Intron-Positionen basiert auf stark konservierten Nukleotiden, die als spezifische Intron-assoziierten Sequenzmotive („Proto-splice-sites“) fungieren.

1.1.2 Inkongruenz und Phylogenomik

Phänomene wie versteckte Paralogie, multiple Allelie und horizontaler Gentransfer können mitunter dazu führen, dass unter Verwendung verschiedener molekularer Marker verschiedene unvereinbare Aussagen (Genbäume) über die Verwandtschaftsverhältnisse und somit die Evolution von Organismen generiert werden. Dieses Phänomen wird als Inkongruenz oder als das „Genbaum vs. Speziesbaum“-Problem bezeichnet (Maddison, 1997; Page und Charleston, 1997). Bereits Charles Darwin erkannte, dass die Klassifizierung von Lebewesen basierend auf nur einem Merkmal scheitern kann, wohingegen Evidenzen von mehreren Merkmalen größere Sicherheit bieten:

„The value indeed of an aggregate of characters is very evident in natural history.“

„ [...] it has been found, that a classification founded on any single character, however important that may be, has always failed [...]“

Kapitel 13 in „On the origin of species“ (Darwin, 1859)

Genau dieses Erkenntnis wird heutzutage in der „Phylogenomik“ praktisch umgesetzt: um das Problem der Inkongruenz einzudämmen sowie den Auswirkungen von potentiell vorhandenen stochastischen Fehlern in den Daten entgegenzuwirken, werden viele DNA- oder Proteinsequenzen gleichzeitig analysiert (Rokas et al., 2003). Dazu werden meist alle ausgewählten Sequenzen zu einer „Supermatrix“ konkateniert (de Queiroz und Gatesy, 2007; ABBILDUNG 1), wodurch eine simultane Analyse aller Daten möglich ist. Eine weniger häufig genutzte Alternative oder Erweiterung zu dieser Vorgehensweise stellen „Supertrees“ dar (Bininda-Emonds, 2004; ABBILDUNG 1). Hierbei können Bäume, die auf Grundlage

einzelner Gensequenzen oder auch auf Grundlage verschiedener Supermatrizen berechnet wurden, miteinander kombiniert werden. Dazu werden die erhaltenen Topologien zunächst in eine sogenannte „MRP-Matrix“ (MRP = Matrix Representation Parsimony) konvertiert, diese kann anschließend mit Hilfe der MRP-Parsimony Methode ausgewertet werden.

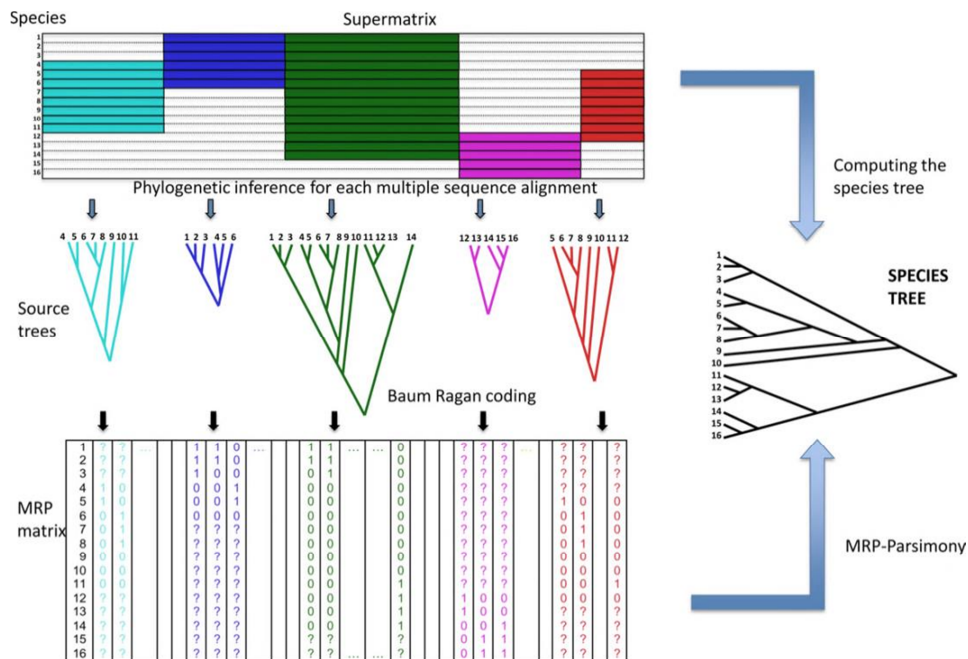


ABBILDUNG 1 – Darstellung der Supermatrix- und Supertree-Methoden

Die Supermatrix-Methode nutzt die konkatenierten Genalignments zur Stammbaumberechnung mit den gängigen Baumrekonstruktionsmethoden. Bei der Supertree-Methode wird für jedes Genalignment ein eigener Baum berechnet. Die entstandenen Topologien werden in Form einer MRP-Matrix rekodiert. Diese Matrix dient als Grundlage für die Speziesbaumberechnung per MRP-Parsimony. Abbildung aus von Haeseler (2012).

Zusätzlich zur Erweiterung der zu analysierenden Datenmenge ist es mittlerweile wissenschaftlicher Standard, eine Baumtopologie erst dann als gesichert anzusehen, wenn mit unabhängigen Datensätzen und / oder verschiedenen Methoden kongruente Ergebnisse erzielt werden (Miyamoto und Fitch, 1995; Delsuc et al., 2005; Ebersberger et al., 2012).

1.1.3 Phylogenien im Wandel der Zeit

Mit Hilfe der molekularen Phylogenie wurden althergebrachte phylogenetische und evolutionäre Konzepte teilweise verworfen und somit unser grundlegendes Verständnis der Evolution stark verändert. Bereits in den siebziger Jahren erschien eine auf rRNA-Daten basierende Arbeit, welche die Einordnung der Lebewesen in die zwei Domänen „Prokaryoten“ und „Eukaryoten“ in Frage stellte (Woese und Fox, 1977). Einige Jahre später bestätigten weitere molekular-phylogenetische Studien diese Arbeit (Gogarten et al., 1989; Iwabe et al., 1989), was schließlich zum heute akzeptierten „3-Domänen-System“ aller Lebewesen führte (Woese et al., 1990). In diesem System bildet eine Linie bestehend aus den beiden Domänen Archaea und Eukaryoten die Schwestergruppe zur Domäne der (Eu-)Bakterien.

Auch innerhalb des Stammbaums der vielzelligen Tiere (Metazoa) haben sich traditionelle Vorstellungen erheblich gewandelt. Die ursprüngliche Unterteilung der bilateral-symmetrischen Tiere (Bilateria) basierte auf Morphologie und Embryologie und wurde zunächst je nach Beschaffenheit der Leibeshöhle vorgenommen (Acoelomata, Pseudocoelomata, Coelomata; siehe ABBILDUNG 2 links). Die Coelomata wurden weiterhin in Protostomia (Urmünder), Deuterostomia (Neumünder) und Lophophorata (Kranzföhler) unterteilt. Die phylogenetische Analyse von rRNA-Sequenzen hingegen ordnet jeden Tierstamm innerhalb der Bilateria entweder den Deuterostomia oder den Protostomia zu. Die Protostomia werden weiterhin in die Großgruppen Ecdysozoa (Häutungstiere) und Lophotrochozoa unterteilt (Halanych et al., 1995; ABBILDUNG 2 rechts). Dies führte unter anderem dazu, dass das klassische Taxon „Articulata“ (Gliedertiere), eine vermeintlich monophyletische Gruppierung aus Annelida (Ringelwürmer) und Arthropoda (Gliederfüßer), nun polyphyletisch im Baum vorlag (ABBILDUNG 2, rot markierte Taxa). Die Auswirkungen dieser neuen Sichtweise auf das Verständnis der Evolution komplexer morphologischer Merkmale waren enorm. Nahm man bisher an, dass solche Merkmale (im Falle der Articulata die Segmentierung und das Strickleiternnervensystem) während der Evolution nur einmal entstanden seien, so implizierte die „neue“ Topologie eine konvergente Evolution (oder aber den sekundären Verlust) dieser Merkmale. Diese „Revolution“ basierte zunächst auf Einzelgenanalysen, findet aber inzwischen auch breite Unterstützung durch phylogénomische Arbeiten (z. B. Edgecombe et al., 2011).

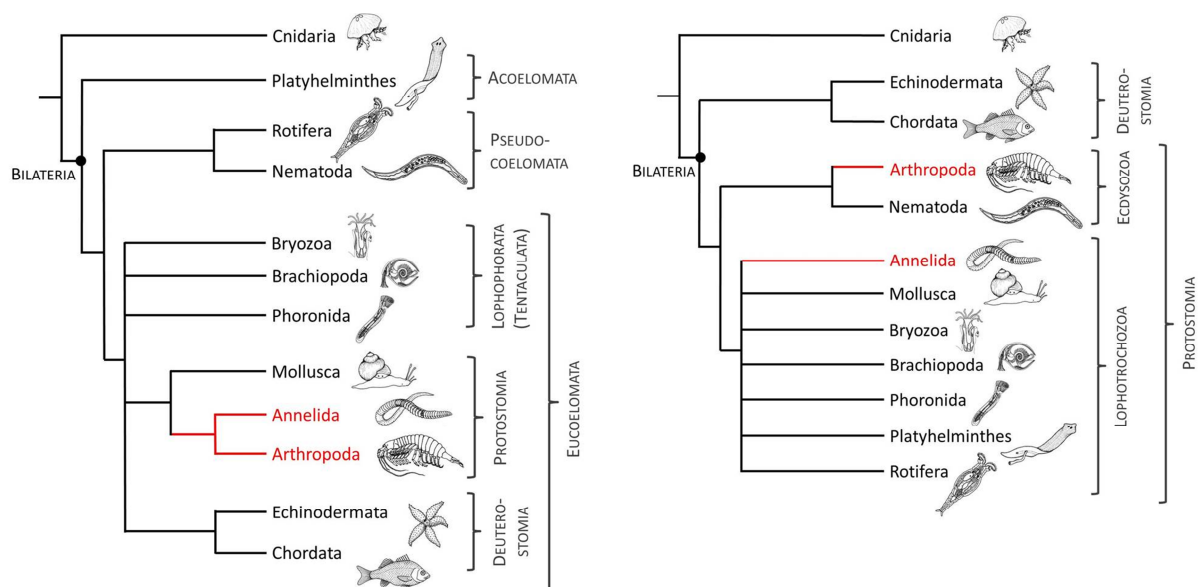


ABBILDUNG 2 – Schemata der traditionellen und der molekular basierten Metazoa-Phylogenie

Die linke Seite zeigt die auf Morphologie basierende Phylogenie der Metazoa, die rechte Seite zeigt die auf rRNA-Sequenzen basierende Phylogenie nach Halanych et al. (1995). Alle Piktogramme der Tiergruppen stammen von BIODIDAC¹, die Topologien sind abgeleitet und vereinfacht nach Halanych (2004). Taxa, die aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten den Articulata (Gliedertiere) zugeordnet wurden, sind rot hervorgehoben.

¹ biodidac.bio.uottawa.ca

Natürlich wurden bestehende, ursprünglich auf Morphologie basierende Konzepte durch phylogenetische und phylogenomische Arbeiten nicht nur widerlegt, sondern vielfach auch bestätigt. Beispielsweise wurden nahezu alle durch Morphologie definierten Ordnungen der Eutheria (plazentale Säugetiere) auch in molekularen Studien als monophyletische Gruppierungen erkannt. Lediglich die Ordnung der Insektivoren wurde nicht als Monophylum bestätigt (Springer et al., 1997; Stanhope et al., 1998; van Dijk et al., 2001; Delsuc et al., 2005). Einige zuvor den Insektivoren zugeordnete Taxa wie die Goldmulle oder die Tenreks sind nach derzeitigem Wissensstand tatsächlich näher mit Elefanten und anderen aus Afrika stammenden Tieren verwandt (Überordnung Afrotheria), als mit den morphologisch deutlich ähnlicheren Igelrn oder Maulwürfen.

Auch hat die molekulare Phylogenie und Phylogenomik bedeutende Beiträge zur Klärung von seit langem bestehenden biologischen Fragestellungen geleistet, die auf morphologischer Ebene nicht oder nur unzureichend adressiert werden konnten. Prominentes Beispiel ist die Frage nach den nächsten Verwandten des Menschen: molekulare Analysen konnten die Trichotomie zwischen Mensch, Schimpanse und Gorilla auflösen, was den Grundstein für ein besseres Verständnis der Evolution „typisch menschlicher“ Attribute wie der Sprache legte (Patterson et al., 1993; Bradley, 2008; Fedurek und Slocombe, 2011). Ein weiteres Beispiel findet man im Taxon *Xenoturbella*: der äußerst reduzierte Bauplan dieser Tiere (keine Gonaden, so gut wie keine Organe, diffuses Nervensystem) macht eine Positionierung im Stammbaum der Metazoa auf Grundlage morphologischer Daten fast unmöglich (siehe Perseke et al., 2007 für einen umfassenden Überblick postulierter Positionen und Evidenzen). Molekulare Daten hingegen sprechen fast einstimmig für eine Ansiedlung der Tiere innerhalb der Deuterostomia (Perseke et al., 2007; Dunn et al., 2008; Bourlat et al., 2009; de Mendoza und Ruiz-Trillo, 2011; Philippe et al., 2011).

An dieser Stelle seien weiterhin aktuelle Arbeiten zur Frage nach der Schwestergruppe der Landwirbeltiere genannt. Zwar wurden in den meisten molekularen und morphologischen Studien Lungenfische gegenüber Quastenflossern als Schwestertaxon der Landwirbeltiere favorisiert (siehe Referenzen in Liang et al., 2013), jedoch waren molekulare Daten rar und alternative Hypothesen konnten mit diesen Datensätzen oft nicht endgültig verworfen werden (z. B. Meyer und Dolven, 1992; Brinkmann et al., 2004). Die beiden umfassendsten molekularen Studien (basierend auf 43 bzw. 44 Genen) unterstützten entgegen der gängigen Meinung eine monophyletische Gruppierung aus Lungenfischen und Quastenflossern als Schwestertaxon zu den Landwirbeltieren (Shan und Gras, 2011) oder konnten die Verwandtschaftsverhältnisse nicht auflösen (Takezaki et al., 2004). Durch die kürzlich erfolgte Sequenzierung des Genoms eines Quastenflossers (*Latimeria*) sowie durch ein umfassendes Transkriptom-Sequenzierprojekt für einen Lungenfisch (*Protopterus*) wurden die Grundlagen für größere phylogenomische Analysen geschaffen (Amemiya et al., 2013). Die Ergebnisse dieser phylogenomischen Arbeiten brachten eine deutliche Unterstützung für ein Schwestergruppenverhältnis der Lungenfische und Landwirbeltiere hervor (Amemiya et al., 2013; Liang et al., 2013).

1.1.4 Limitationen der Phylogenomik

Selbstverständlich stößt auch die Phylogenomik irgendwann an ihre Grenzen. Die stetig wachsende Datenmenge, sowohl in Bezug auf die Speziesanzahl als auch in Bezug auf die Datenmenge pro Taxon, birgt sowohl Vor- als auch Nachteile. Einerseits ist eine Erhöhung der Taxon-Zahl sowie der Datenmenge pro Taxon (Datensatzabdeckung) erwünscht und teilweise sogar notwendig, um bestehende Fragestellungen klären zu können. Andererseits stellen die immer größer werdenden Datensätze erhebliche computertechnische und methodische Anforderungen, und die Entwicklung neuer, schneller Algorithmen ist inzwischen mindestens ebenso wichtig wie die Generierung der neuen Sequenzdaten selbst (z. B. Stamatakis, 2006; Stamatakis et al., 2008; Lartillot et al., 2013; siehe auch Chan und Ragan, 2013).

Aus der Fülle der zur Verfügung stehenden Daten ergibt sich außerdem das Problem, dass aus systematischen Fehlern bei der Auswertung leicht eine statistisch signifikante Unterstützung eines „falschen“ Baums resultiert (Jeffroy et al., 2006; Kumar et al., 2012). Ein aktuelles Beispiel findet sich im Bereich der Weichtiere (Mollusca). Innerhalb von nur fünf Wochen wurden in der Zeitschrift NATURE zwei phylogenomische Studien veröffentlicht, die miteinander nicht vereinbare (inkongruente), aber jeweils für sich selbst sehr gut unterstützte Topologien zeigten. In der Arbeit von Kocot et al. (2011) wurden 308 Gene untersucht, die resultierenden Bäume zeigten eine maximal unterstützte Schwestergruppierung von Gastropoda (Schnecken) und Bivalvia (Muscheln). Smith et al. (2011) hingegen untersuchten bis zu 1185 Gene und erhielten eine Schwestergruppierung von Gastropoda und Scaphopoda (Kahnfüßer), abermals mit sehr guten Unterstützungswerten von bis zu 100 %. Da mindestens eine der beiden Topologien falsch sein muss, zeigt dieses Beispiel sehr deutlich, dass „viele Daten“ nicht immer mit „wahrer Topologie“ gleichzusetzen sind.

Systematische Fehler bei der Analyse molekularer Daten sind vielfältig (Sanderson und Shaffer, 2002). Einer der Vorteile dieser Daten, nämlich die eindeutige Beschreibbarkeit, gerät hierbei mitunter zum Nachteil. Da an einer definierten Stelle der Sequenz eines Taxons nur vier (bei DNA-Daten) bzw. zwanzig (bei Protein-Daten) mögliche Zustände existieren, ist das konvergente Auftreten einer Base oder Aminosäure in mehreren Taxa relativ wahrscheinlich. Verschlimmert wird diese Situation, sobald sich im Datensatz Taxa mit einer erhöhten Evolutionsrate befinden, da bei diesen Taxa die Wahrscheinlichkeit für das konvergente Auftreten von Basen oder Aminosäuren nochmals deutlich erhöht ist. Betroffene Taxa weisen in den rekonstruierten Bäumen lange terminale Äste auf und werden bedingt durch die (vermeintlich durch gemeinsame Evolution entstandene) Ähnlichkeit der Sequenzen oft fälschlicherweise zusammengruppiert. Die Tatsache, dass sich Taxa mit stark unterschiedlichen Evolutionsraten im Datensatz befinden, bezeichnet man als Ratenheterogenität („rate heterogeneity“), das Phänomen der fälschlich zusammen gruppierten langen Äste als „long-branch attraction“ oder kurz LBA (Felsenstein, 1978; Sanderson und Shaffer, 2002; Bergsten, 2005). Ebenfalls kann der sogenannte

„compositional bias“ zur Rekonstruktion einer nahen, auf Homoplasien basierenden Verwandtschaft führen: ist die Basenzusammensetzung oder das Aminosäure-Spektrum in mehreren Taxa unabhängig voneinander sehr ähnlich (beispielsweise bei einem hohen GC-Gehalt), so führt auch dies zu einem erhöhten Anteil an Konvergenzen in den Sequenzen und schließlich zu falschen Ergebnissen (z. B. Foster und Hickey, 1999).

Neben den Daten selbst nimmt selbstverständlich auch die Wahl des Substitutionsmodells sowie des Rekonstruktions-Algorithmus großen Einfluss auf die erstellte Phylogenie (siehe Yang und Rannala, 2012 für eine aktuelle Zusammenstellung der Vor- und Nachteile verschiedener Rekonstruktionsmethoden). Dabei muss stets eine Balance zwischen der nötigen Akkuratez der Modelle und Algorithmen einerseits und der möglichen Überparametrisierung sowie der zur Berechnung benötigten Rechenleistung andererseits gefunden werden (z. B. Sullivan und Joyce, 2005; Baele und Lemey, 2013; Chan und Ragan, 2013).

1.1.5 Offene Fragestellungen im „Tree of Life“ der Metazoa

Aufgrund der genannten und anderer Limitationen bezüglich phylogenetischer Rekonstruktionen gibt es im Stammbaum des Lebens immer noch Verzweigungen, zu denen widersprüchliche Hypothesen existieren (z. B. Nosenko et al., 2013). Eine dieser bedeutsamen offenen Fragestellungen betrifft die Placozoa (Plattentiere) mit der bisher einzigen bekannten Art *Trichoplax adhaerens* (Schulze, 1883). Die Position dieser Tiere im Stammbaum der Metazoa ist besonders interessant, da sie enorme Auswirkungen auf unser Verständnis vom Aussehen des ursprünglichsten Metazoen (Urmetazoa) haben wird. Aufgrund der morphologischen Simplizität von *Trichoplax adhaerens* (keine Gewebe, keine Organe, nur vier Zelltypen) ist ihre Einordnung im Stammbaum der Metazoa faktisch nur über molekulare Daten möglich. Verschiedene molekulare Analysen haben jedoch widersprüchliche Ergebnisse geliefert. Über die Jahre wurden daher verschiedene Baum-Positionen für die Placozoa postuliert, darunter die Einordnung als Schwestergruppe zu den Cnidaria (Nesseltiere), zu den Bilateria oder zu den Eumetazoa (Gewebetiere; einen aktuellen Überblick geben Dohrmann und Wörheide, 2013). Da phylogenomische Ansätze in diesem Fall offenbar nicht weiter führen, wird inzwischen der Ruf nach „quality data“ statt „quantity data“ laut: statt die Sequenzdatenmenge immer weiter zu erhöhen, sollten nach Meinung von Osigus et al. (2013) eher Daten zur Syntanie (Genanordnung) und Molekül-Morphologie als phylogenetische Marker genutzt werden. Solche Daten zählen zu den sogenannten „rare genomic changes“ (RGCs) und stellen Änderungen des Erbguts dar, von denen angenommen wird, dass sie während der Evolution eher selten auftreten. Hierzu gehören beispielsweise auch größere Indels¹ in Gen- und Proteinsequenzen. Aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit eines konvergenten Auftretens solcher Merkmale sind Taxa, die einen RGC gemein haben, wahrscheinlich aus einem gemeinsamen Vorläufer mit eben diesem Merkmal hervorgegangen, wodurch phylogenetische Aussagen auf Grundlage von

¹ Indel ist die Kurzform von „Insertion oder Deletion“.

Häufig wird der Name „Lophotrochozoa“ synonym für Spiralia verwendet. Es besteht jedoch die Frage, ob diese synonyme Nutzung der Namen für die Schwestergruppe der Ecdysozoa gerechtfertigt ist. Da Lophotrochozoa ursprünglich als „der gemeinsame Vorfahre von Mollusken, Anneliden und Lophophoraten sowie allen Abkömmlingen desselbigen“ definiert wurde (Halanych et al., 1995), hängt die Antwort von der Position der sogenannten Polyzoa (zu denen auch das „Lophophorata“-Taxon Bryozoa zählt) im Stammbaum ab (ABBILDUNG 3). Möglicherweise stellen die Lophotrochozoa also ein Subtaxon innerhalb der Spiralia dar (Hejnol, 2010).

Eine verwandte wichtige phylogenetische Fragestellung im Stammbaum der Metazoa ist die mögliche Monophylie des Supertaxons Platyzoa innerhalb der Spiralia, welches laut Cavalier-Smith (1998) die Platyhelminthes (Plattwürmer), die Gastrotricha (Bauchhärlinge) und die Gnathifera (Kieferträger) vereint. Platyzoa umfasst somit meist kleine Tiere mit oft nicht einfach zu interpretierenden morphologischen Merkmalen. Auch molekulare Analysen können derzeit kaum Beiträge zur Klärung der Platyzoa-Frage leisten, da die betreffenden Taxa aufgrund ihrer oft längen Äste sehr schwierig zu positionieren sind, ohne dass systematische Fehler in Betracht kommen (z. B. Dunn et al., 2008; Hejnol et al., 2009; siehe Kapitel 1.2.4). Zusätzlich Gewicht bekommt diese Problematik durch den Umstand, dass von einigen der putativen Platyzoa-Taxa keine oder nur sehr wenige Sequenzdaten vorhanden sind. Während für die Platyhelminthes aufgrund der pathogenen Bedeutung der parasitischen Arten für den Menschen recht viele Daten zur Verfügung stehen, sind die Gastrotricha und Gnathifera (Micrognathozoa + Gnathostomulida + Syndermata) in molekular-phylogenetischen Arbeiten stark unterrepräsentiert. Die Gründe liegen neben der meist geringen Größe der Tiere (mit Ausnahme der Acanthocephala, einer Untergruppe der Syndermata, maximal 3 mm lang) und den damit verbundenen labortechnischen Schwierigkeiten auch im Auffinden, Sammeln und Bestimmen der Tiere. Beispielsweise wurde die einzige bekannte Art der Micrognathozoa (*Limnognathia maerski*) bisher nur in einer Süßwasserquelle auf Grönland sowie auf den subantarktischen Crozetinseln gefunden (Kristensen und Funch, 2000; De Smet, 2002), Polyacanthocephalen sind nur aus dem Darm von südamerikanischen Kaimanen bekannt (Kennedy, 2006) und verschiedene Arten der winzigen Rädertiere (ebenfalls eine Untergruppe der Syndermata, siehe Kapitel 1.2.1) unterscheiden sich anatomisch oft nur in sehr feinen Nuancen (siehe z. B. Donner, 1965). Somit ist die Zusammenarbeit mit Experten zur Erweiterung der Taxon-Abdeckung unabdingbar.

Die mögliche Monophylie der Platyzoa sowie zahlreiche phylogenetische Unsicherheiten innerhalb dieser putativen Großgruppe (siehe Kapitel 1.2.3 und 1.2.4) lassen sich auf molekularer Ebene erst adressieren, wenn Daten zusätzlicher Taxa vorliegen. Insbesondere die Syndermata (Rotifera + Acanthocephala) spielen hierbei eine Schlüsselrolle. Mit rund 3.300 Arten sind die Syndermata die zweitgrößte Gruppe der putativen Platyzoa (nach den Platyhelminthes mit rund 13.000 Arten, siehe Kapitel 2.4) und beinhalten Spezies mit sehr diversen Lebensweisen und Fortpflanzungsstrategien (Kapitel 1.2). Somit können durch die Erhöhung der Taxon-Anzahl innerhalb der Syndermata nicht nur tiefe Verzweigungen besser

und verlässlicher analysiert werden, sondern es können auch Fragestellungen der internen Phylogenie der Syndermata adressiert werden. Dies ist besonders interessant, da das enthaltene Subtaxon Acanthocephala (Kratzwürmer) ein potentielles Modellsystem zur Analyse der Evolution des Parasitismus darstellt. Im Vergleich zu anderen parasitischen Taxon-Gruppen wie Platyhelminthes (Plattwürmer) oder Nematoda (Fadenwürmer) wird eine Nutzung der Acanthocephala als Modellsystem durch mehrere Merkmale begünstigt (Near et al., 1998; Near, 2002):

- (1) Die Diversität innerhalb der Acanthocephala ist mit ca. 1300 Arten überschaubar.
- (2) Der grundlegende Lebenszyklus mit zwei Wirten ist bei allen Arten konserviert.
- (3) Der Parasitismus ist nur einmal auf dem Stammbaum der Taxon-Gruppe entstanden.

Zur Untersuchung adaptiver Prozesse, die mit der Entwicklung eines parasitären Lebensstils einhergehen, ist es jedoch unabdingbar, die freilebende Schwestergruppe des betreffenden parasitischen Taxons zu bestimmen, denn nur so können sinnvolle Aussagen über Innovationen und sekundäre Verluste von Merkmalen getroffen werden (Near, 2002).

1.2 Biologie und Phylogenie der Syndermata: Rädertiere und Kratzwürmer

Die Syndermata umfassen die traditionellen Rädertiere (Rotifera) sowie die Kratzwürmer (Acanthocephala). Eine nahe Verwandtschaft dieser beiden Taxa wurde ursprünglich aufgrund morphologischer Merkmale wie Spermien-Morphologie, Ei-Segmentierung, Protonephridien und der syncytialen Epidermis postuliert (Haffner, 1950; Ahrlichs, 1995, 1997, 1998; Ferraguti und Melone, 1999). Nachfolgend wurde diese nahe Verwandtschaft durch viele molekular-phylogenetische Arbeiten bestätigt (z. B. Garey et al., 1996; García-Varela et al., 2000; Sørensen und Giribet, 2006; Witek et al., 2008), weshalb sie inzwischen als unstrittig gilt. Der Name Syndermata für die Taxon-Gruppe wurde von Ahrlichs (1995) eingeführt und bezieht sich auf die syncytiale Epidermis der Taxa. Da die Acanthocephala nicht das Schwestertaxon zu den Rotifera sondern ein Subtaxon innerhalb der Rotifera sind (siehe Kapitel 1.2.3), wurde der Name Syndermata mit Rotifera *sensu lato* gleichgesetzt (Sørensen und Giribet, 2006). In der vorliegenden Arbeit wird die Bezeichnung „Syndermata“ genutzt, „Rotifera“ bezieht sich daher immer auf die paraphyletische Taxon-Gruppe der traditionellen Rädertiere (Rotifera *sensu stricto*).

1.2.1 Die traditionellen Rädertiere: Monogononta, Bdelloidea und Seisonidea

Rädertiere (Rotifera) sind kleine, aquatisch lebende Tiere, deren Zellzahl oftmals genetisch festgelegt ist (Eutellie; Wallace, 2002). Die Taxon-Gruppe im klassischen Sinn umfasst etwa 2000 Arten in den drei Subtaxa Monogononta (>1500 Spezies), Bdelloidea (>400 Spezies) und Seisonidea (4 Spezies) (Segers, 2007; Leasi et al., 2012). Die Rotifera wurden Ende des 17ten Jahrhunderts entdeckt; meist wird ihre Entdeckung dem berühmten niederländischen Naturforscher und Mikroskopbauer Antoni van Leeuwenhoek zugeschrieben, doch etwa zeitgleich hatte auch der englische Pfarrer John Harris diese Tiere beobachtet (Hudson und Gosse, 1886; Dobell, 1958). Aufgrund fehlender fossiler Belege kann über das erdgeschichtliche Alter der Taxon-Gruppe nur spekuliert werden. Überreste von Bdelloidea wurden in zumindest 30 bis 40 Millionen Jahre altem Bernstein gefunden (Poinar und Ricci, 1992; Waggoner und Poinar, 1993), jedoch sind die Rotifera vermutlich wesentlich älter. Die Extrapolation der molekularen Evolutionsraten der beiden Untergruppen Bdelloidea und Monogononta legt eine Trennung dieser beiden Taxa vor mindestens 100 Millionen Jahren und damit den Ursprung der Rotifera im Mesozoikum nahe (siehe Mark Welch et al., 2008 sowie darin enthaltene Referenzen).

Verbreitung und ökologische Bedeutung

Rotifera sind global verbreitet und besiedeln nahezu jedes erdenkliche aquatische Biotop (Pejler, 1995; Fontaneto et al., 2006; Segers, 2008). An Land findet man sie beispielsweise in feuchten Böden, zwischen Moosen und Flechten, auf Pilzen und in Regenpfützen. Doch auch in jeglichen Gewässern, sowohl stehenden als auch fließenden, limnischen und marinen, sind die Rotifera heimisch. Dabei besiedeln sie unterschiedlichste Habitate auch unter extremen Umweltbedingungen. So findet man mehrere Arten in Thermalquellen mit Temperaturen

weit über 40 °C (Castenholz, 1969), andere in antarktischen Lebensräumen (Sudzuki, 1988). Die Kälteresistenz einzelner Arten geht so weit, dass sie selbst mehrere Jahre bei - 80 °C überleben können (Newsham et al., 2006). Die Rotifera bilden einen bedeutenden Teil des Zooplanktons und damit einen grundlegenden Teil der Nahrungskette (Wallace, 2002). Sie spielen eine tragende Rolle für den Nährstoffkreislauf (z. B. Makarewicz und Likens, 1979), sorgen für Balance in den aquatischen mikrobiellen Gemeinschaften (Arndt, 1993) und dienen als Nahrung für Fische, Quallen, Ruderfußkrebse, Seesterne, Kaulquappen und andere Tiere (Wallace et al., 2006).

Morphologie und Lebensweise

Die Rotifera sind maximal 3 mm lang und ihre Körperform ist je nach Lebensweise globulär (planktonische Spezies), wurmartig (kriechende und aktiv schwimmende Spezies) oder vasenförmig (sessile Spezies). Die meisten Arten sind freilebend, jedoch gibt es auch einige parasitische Formen (May, 1989). Einen Eindruck der Erscheinungsformen gibt ABBILDUNG 4.

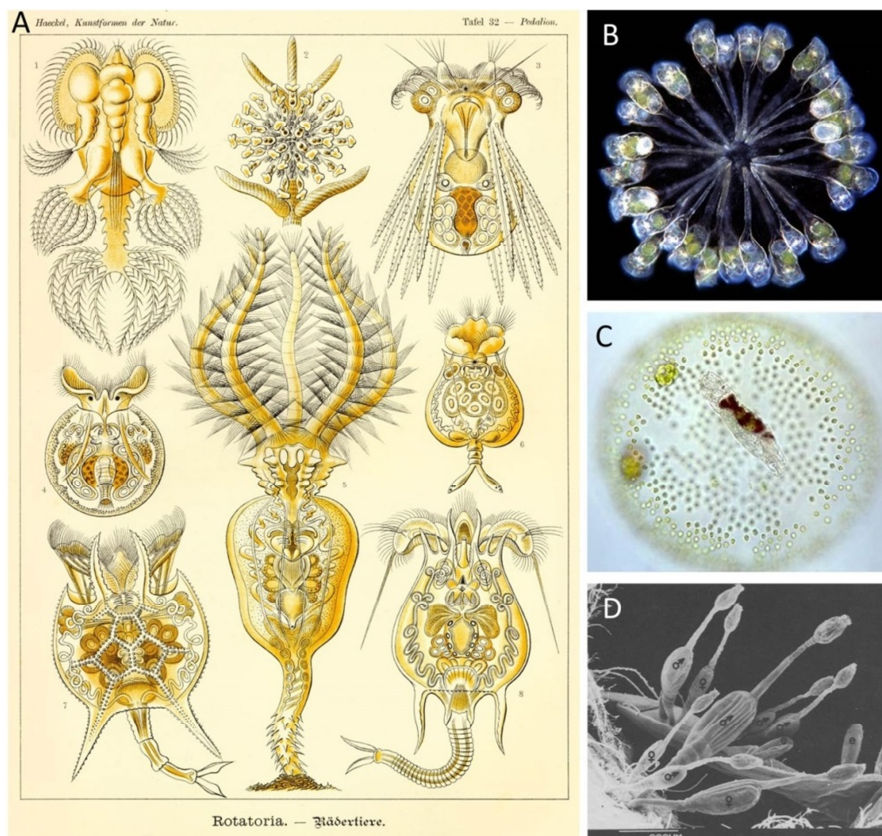


ABBILDUNG 4 – Darstellung verschiedener Formen und Lebensweisen der Rotifera

A: Schemata diverser freilebender Formen, einer kolonialen Form (*Lacinularia socialis*, Mitte oben) und einer sessilen Form (*Stephanoceros eichhornii*, Mitte unten); Tafel 32 aus Ernst Haeckels „Kunstformen der Natur“ (1904).

B: koloniale Form (*Conochilus*); Foto: Wim van Egmond.

C: endoparasitische Form (*Proales parvita*) in Wirt *Volvox*; Foto: Wim van Egmond

D: epizoische Form (*Seison nebaliae*) auf Wirt *Nebalia bipes*; Abbildung aus Ricci et al. (1993)

Der Körper gliedert sich in Kopf, Nacken, Rumpf und Fuß (ABBILDUNG 5), wobei der Nacken besonders bei den Seisonidea klar ausgeprägt ist (ABBILDUNG 4 D; Ricci et al., 1993). Am Fuß finden sich oft ein oder mehrere Zehen, die die Ausgänge der Zementdrüsen beinhalten, deren Sekret dem temporären oder dauernden Anheften der Tiere an Objekte dient. Dies ist sowohl bei sessilen Formen zur Verankerung als auch bei kriechenden Formen zur Fortbewegung wichtig (z. B. Wallace, 1980; Hochberg und Litvaitis, 2000).

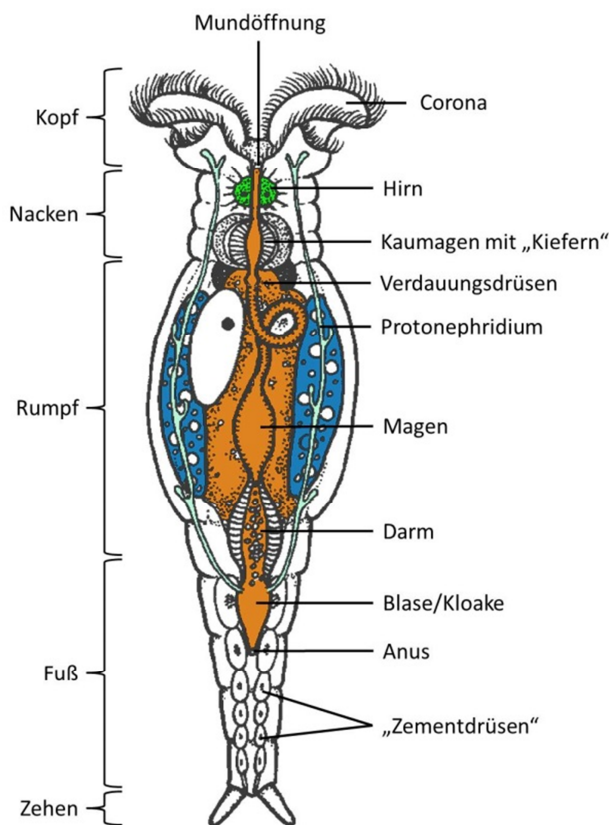


ABBILDUNG 5 – Schematische Darstellung eines Rädertiers (Rotifera)

Abbildung adaptiert von BIODIDAC¹.

Namensgebend für die Tiergruppe ist das charakteristische Räderorgan (Corona), eine Krone aus Zilien, die bei den meisten Arten deutlich ausgebildet ist. Eine bemerkenswerte Ausnahme bilden die epizoischen Seisonidea, bei denen die Corona nur rudimentär vorhanden ist. Die Corona kann je nach Art unterschiedlichste Formen annehmen (ABBILDUNGEN 4 und 5; de Beauchamp, 1907; Melone, 1998). Der Zilienschlag erweckt bei vielen Arten den Eindruck zweier sich drehender Räder und dient zur Lokomotion und / oder zur Bewegung des umgebenden Wassers zur Mundöffnung hin (Wallace, 2002). Nach Passieren der Mundöffnung werden Nahrungspartikel, meist Bakterien, Algen oder Detritus, im muskulösen Kaumagen (Mastax) der Rotifera mit Hilfe der sogenannten "Kiefer" (Trophien) zerkleinert, bevor sie in den Magen weitergeleitet werden (ABBILDUNG 5; Wallace, 2001). Die Morphologie dieser Kauwerkzeuge ist sehr divers (einen Überblick sowie eine

¹ biodidac.bio.uottawa.ca

Zusammenstellung von SEM-Bildern bietet die „Rotifer trophi Web page“¹), weshalb sie eines der bedeutendsten Bestimmungsmerkmale für die Rotifera darstellt (Wulfken und Ahlrichs, 2012).

Reproduktion und Überlebensstrategien

Die drei Untergruppen Monogononta, Bdelloidea und Seisonidea unterscheiden sich reproduktionsbiologisch stark. Seisonidea vermehren sich rein sexuell, wobei Männchen und Weibchen zu jeder Jahreszeit parallel auftreten (Ricci et al., 1993). Die Untergruppen Monogononta und Bdelloidea hingegen besitzen die Fähigkeit zur Parthenogenese, also der asexuellen Vermehrung (Wallace, 2002). Diese ist nur bei den Bdelloidea obligat, die Monogononta können sich sowohl sexuell als auch asexuell vermehren (zyklische Parthenogenese; siehe Schröder, 2005). Die sexuelle Fortpflanzung der Monogononta findet vor allem dann statt, wenn die Lebensbedingungen ungünstig sind: die Weibchen reagieren auf äußere Stimuli wie sinkende Temperaturen und beginnen, haploide (miktische) statt diploide (amiktische) Eier zu legen. Werden diese nicht befruchtet, entwickeln sich daraus haploide Männchen, welche deutlich schwächer als die Weibchen sind. Wird ein haploides Ei von einem Männchen befruchtet, entstehen sogenannte „ruhende“ diploide Eier, die eine dicke Schale besitzen und den Winter (oder auch weitaus längere Zeitspannen, siehe King und Serra, 1998; Kotani et al., 2001) problemlos überstehen können. Bei Verbesserung der Lebensbedingungen im Frühling entwickeln sich aus diesen Eiern dann wieder diploide Weibchen.

Die rein asexuelle Vermehrung der Bdelloidea verhindert zwar die Produktion resistenter Eier, jedoch haben sie mit der Fähigkeit zur Anhydrobiose eine andere Möglichkeit zur Überbrückung widriger Umstände vorzuweisen (Ricci, 1998). Bei drohender Trockenheit ziehen sich die Tiere unabhängig von ihrem Entwicklungsstadium zusammen, verlieren fast alles im Körper befindliche Wasser und können in diesem inaktiven Stadium der Dormanz Trockenheit unbeschadet überstehen (Ricci, 2001; Marotta et al., 2010). Auch sind die dormanten Tiere resistenter gegenüber anderen Stressoren wie UV-Strahlung und Temperaturschwankungen (Caprioli et al., 2002). Es gibt dokumentierte Fälle, in denen Tiere mehrere Jahre andauernde Dormanzzeiten überlebt haben, die Reaktivierung durch verbesserte Lebensbedingungen (Rehydrierung, zum Beispiel durch Regen) dauert hingegen nur wenige Stunden (Ricci, 2001).

Genetische Besonderheiten

Die Resistenz der Bdelloidea gegenüber Austrocknung und ionisierender Strahlung (Gladyshev und Meselson, 2008), beides Stressoren, die Doppelstrangbrüche in der DNA induzieren, deutet auf ein äußerst effizientes DNA-Reparatursystem hin. Dies liegt vermutlich in der Genomstruktur der Bdelloidea begründet. Durch die Entdeckung von vier

¹ http://www.rotifera.hausdernatur.at/Rotifer_data/trophi/start.html

Genkopien des hsp82-Gens und die anschließenden Untersuchungen der umgebenden DNA-Sequenzen dieser Genloci konnten Evidenzen für eine degenerierte Tetraploidie in zwei untersuchten Bdelloidea-Spezies gefunden werden (Mark Welch et al., 2008; Hur et al., 2009). Jedes Chromosom liegt demnach in vier Kopien vor. Dabei konnten zwei Chromosomenpaare ausgemacht werden, die eine gewisse Anzahl an Genen in gleicher Reihenfolge und Orientierung gemein haben, sich aber durch die An- bzw. Abwesenheit anderer Gene unterscheiden. Da sich zwischen den Chromosomenpaaren keine Sequenzhomologie außerhalb der proteinkodierenden Bereiche feststellen lässt, wird der Ursprung dieser (wahrscheinlich durch Genomduplikation entstandenen) Tetraploidie zeitlich vor der Radiation der Bdelloidea vermutet (Mark Welch et al., 2008; Hur et al., 2009). Diese spezielle Genomstruktur scheint es den Bdelloidea zu ermöglichen, durch mitotische Rekombination und Genkonversion, gekoppelt mit Doppelstrangbruch-Reparaturen, die genetische Information trotz der durch Stressoren induzierten Schäden intakt zu halten (Gladyshev und Meselson, 2008; Mark Welch et al., 2008).

Eine weitere Besonderheit der Bdelloidea-Genome stellt die Verteilung transposabler Elemente dar: diese wurden bisher nur in telomeren/subtelomeren Regionen detektiert, während genreiche Regionen offenbar frei von diesen Elementen sind (Gladyshev et al., 2008; Gladyshev und Arkhipova, 2010). Ebenfalls in den subtelomeren Genomregionen finden sich proteinkodierende Bereiche, die Homologie zu Sequenzen von Bakterien, Pflanzen oder Pilzen aufweisen (Gladyshev et al., 2008; Gladyshev und Arkhipova, 2010). Dies ist ein Hinweis auf ein hohes Maß an horizontalem Gentransfer, ein Phänomen, das innerhalb der Metazoa bisher nur selten, und wenn dann in Verbindung mit symbiotischen oder parasitischen Beziehungen, beschrieben wurde. Auch wurden Evidenzen für das innerhalb der Metazoa ebenfalls relativ seltene Trans-Splicing von RNA gefunden (Pouchkina-Stantcheva und Tunnacliffe, 2005). Die kürzlich veröffentlichte erste Genomsequenz eines Bdelloidea-Taxons (*Adineta vaga*) bestätigte diese Ergebnisse: 8 % der annotierten Gene werden als potentiell via horizontalem Gentransfer erworben angesehen, viele weitere Gene (beispielsweise solche, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind) liegen in mehreren Kopien vor und transposable Elemente treten zwar in großer Diversität aber in ungewöhnlich geringer Anzahl pro Transposon-Familie auf (Flot et al., 2013).

Für das Kerngenom der Monogononta wurden solche Beobachtungen bisher nicht beschrieben. Die den Monogononta zugehörigen Arten *Brachionus plicatilis* und *B. koreanus* weisen jedoch eine innerhalb der Metazoa einzigartige und funktionell bisher unverstandene Organisation des mitochondrialen (mt) Genoms auf: dieses liegt in zwei zirkulären Subgenomen vor (Suga et al., 2008; Hwang et al., 2014).

1.2.2 Die endoparasitischen Kratzwürmer

Kratzwürmer (Acanthocephala) sind Darmparasiten, die ebenso wie die Rotifera Eutelie, also eine genetisch festgelegte Zellanzahl aufweisen (van Cleave, 1932). Die Taxon-Gruppe umfasst knapp 1300 Arten in den Subtaxa Archi-, Palae-, Eo- und Polyacanthocephala (Amin, 2013). Das vierte Subtaxon Polyacanthocephala wurde 1987 formal eingeführt (Amin, 1987) und inzwischen durch molekular-phylogenetische Studien bestätigt (García-Varela et al., 2002; García-Varela und Nadler, 2006). Die bekannten Endwirte dieser kleinsten Untergruppe der Acanthocephala sind südamerikanische Kaimane (siehe „Wirtsspektren“), ansonsten ist über ihre Biologie recht wenig bekannt (Kennedy, 2006).

Verbreitung und Bedeutung

Acanthocephala sind weltweit verbreitet und befallen sowohl aquatisch als auch terrestrisch lebende Zwischen- und Endwirte (Kennedy, 2006). Als Parasit des Menschen haben sie nur eine untergeordnete Bedeutung, da eine Infektion fast ausschließlich über den Verzehr von rohen Insekten erfolgen kann (siehe „Wirtsspektren“) und die Infektionen daher regional begrenzt und sehr selten sind (Schmidt, 1971; Berenji et al., 2007). In der Haus- und Nutztierzucht trifft man sie jedoch oft an. Schweine in offener Weidehaltung werden recht häufig vom Riesenkratzer *Macracanthorhynchus hirudinaceus* befallen, jedoch mit milder Symptomatik. Ein starker Befall mit Acanthocephala in Fisch- und Geflügelzuchten kann hingegen zu Wachstumsstörungen und in Extremfällen sogar zum Tod der Wirtstiere führen (Boch und Supperer, 2006). Große Bedeutung haben die Acanthocephala auch für ökotoxikologische Studien, da sie eine Reihe von Schwermetallen akkumulieren und somit sensitive Bioindikatoren für Metallkontaminationen in aquatischen Lebensräumen darstellen (für einen Überblick siehe Sures, 2004).

Morphologie

Acanthocephala werden je nach Art wenige Millimeter bis mehrere Zentimeter lang, wobei die Weibchen größer werden als die Männchen. Ihre Morphologie korreliert mit der parasitischen Lebensweise. So besitzen sie beispielsweise in keinem ihrer Entwicklungsstadien (siehe „Lebenszyklus und Überlebensstrategien“) einen Verdauungsapparat, die Nährstoffe werden über die Epidermis direkt aus dem Darminhalt des Wirtes aufgenommen (Starling, 1985; Kennedy, 2006). Auch Exkretionsorgane fehlen in den meisten Spezies, Ausnahmen findet man lediglich innerhalb der Oligacanthorhynchidae (z.B. beim Riesenkratzer *Macracanthorhynchus hirudinaceus*) in Form von einfach gebauten Protonephridien (Dunagan und Miller, 1986). Der Trivialname der Acanthocephala, „Kratzwürmer“, ist abgeleitet vom hakenbewehrten Rüssel (Proboscis), mit dessen Hilfe sich die adulten Tiere in der Darmwand des Wirtes verankern (ABBILDUNG 6; Crompton und Nickol, 1985). Dieser Rüssel ist rückziehbar, im Inneren des Wurmes befinden sich zu diesem Zweck Retraktormuskeln sowie ein Hohlraum, die Proboscis-Scheide (ABBILDUNG 6). Viele Arten

haben zusätzliche Haken- oder Dornenkränze am Nacken und / oder dem vorderen Teil des Rumpfes.

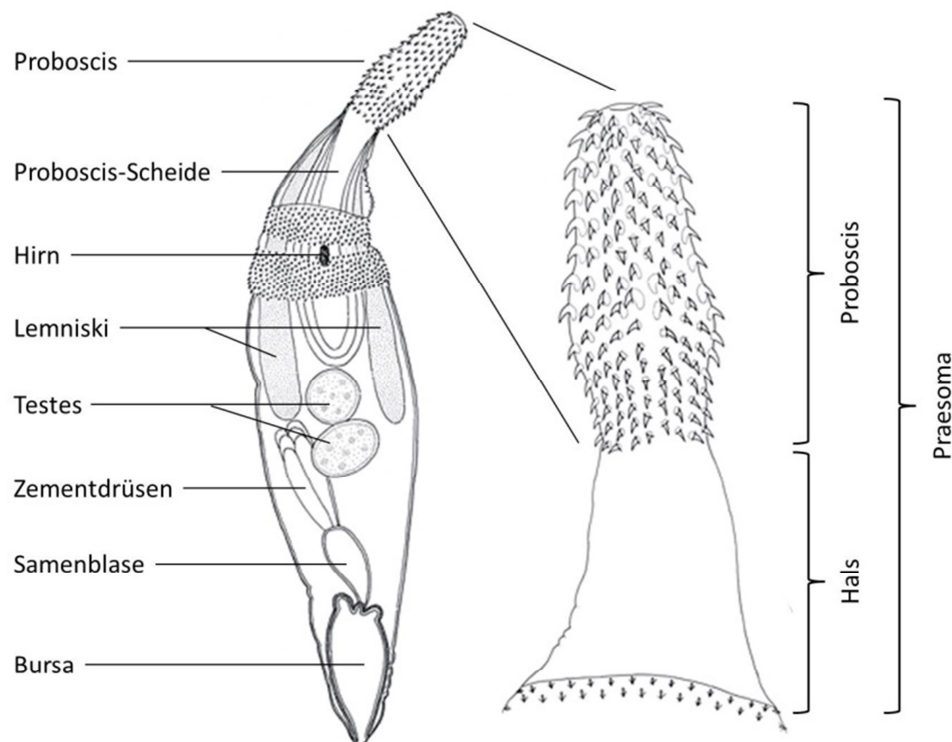


ABBILDUNG 6 – Schematische Darstellung eines adulten Kratzwurmes (Acanthocephala)

Morphologie von *Andracantha tandemtesticulata*. Links: Adultes Männchen, rechts: Vergrößerung des Praesoma. Abbildung adaptiert von Monteiro et al. (2006).

Im Inneren des vorderen Rumpfteils finden sich die sogenannten „Lemniski“ (ABBILDUNG 6). Dies sind von Muskulatur umgebene Einstülpungen der Epidermis, die vermutlich zusammen mit der Rüsselmuskulatur für die hydraulischen Bewegungen des Rüssels zuständig sind (Bush et al., 2001). Der hintere Teil des Rumpfes wird vom Geschlechtsapparat der Tiere eingenommen. Bei den Weibchen finden sich frei in der Leibeshöhle flottierende Ovarialbälle sowie die Uterusglocke, deren Aufgabe darin besteht, eine Sortierung von reifen und unreifen Eiern vorzunehmen (z. B. Whitfield, 1970; Asaolu, 1980). Männchen hingegen besitzen meist zwei recht kompakte Hoden sowie eine oder mehrere Zementdrüsen (ABBILDUNG 6), deren Sekret nach der Paarung als „Versiegelung“ des weiblichen Geschlechtstraktes dient (Miller und Dunagan, 1985; Poulin und Morand, 2000). Die Reproduktion der Acanthocephala erfolgt stets sexuell (Kennedy, 2006).

Wirtsspektren

Die Zwischenwirte der Acanthocephala sind Insekten oder Krebstiere. Als Endwirte fungieren Wirbeltiere (Vertebrata), hauptsächlich Fische, Vögel und Säugetiere, aber auch Amphibien und Reptilien. Weit verbreitete Acanthocephala-Arten befallen global verbreitete Wirte (z. B. *Moniliformis moniliformis* als Parasit der Wanderratte) oder weisen ein relativ flexibles und

breites Wirtsspektrum auf (z. B. parasitiert *Echinorhynchus truttae* in verschiedenen Ordnungen von Süßwasserfischen, darunter Lachsfische, Karpfenartige, Dorschartige, Stichlingsartige und Drachenkopffartige; Daten aus Strona et al., 2013). Andere Acanthocephala-Arten sind auf bestimmte, lokale Wirte spezialisiert und dadurch nur räumlich begrenzt anzutreffen, so zum Beispiel die nur in Beuteltieren anzutreffende Art *Australiformis semoni* (Schmidt und Edmonds, 1989) oder die in Reunion auf Aale spezialisierte Art *Acanthocephalus reunionensis* (Smales et al., 2007).

Die Palaeacanthocephala findet man gleichermaßen in terrestrisch als auch in aquatisch lebenden Wirten, wohingegen Archiacanthocephala ausschließlich terrestrische und Eoacanthocephala ausschließlich aquatische Zwischen- und Endwirte befallen (Kennedy, 2006). Von einigen Arten sind die Wirte bisher unbekannt, zum Beispiel Im Falle von *Polyacanthorhynchus kenyensis* (Polyacanthocephala). Unreife Zwischenstadien (Cystacanth; siehe „Lebenszyklus und Überlebensstrategien“) dieser Spezies wurden in verschiedenen Süßwasserfischen in einem afrikanischen See gefunden (Amin und Dezfuli, 1995; Aloo und Dezfuli, 1997). Alle gefundenen Exemplare befanden sich außerhalb des Verdauungstraktes der Fische und somit in einer Körperregion, in der eine Weiterentwicklung zum adulten Wurm nicht möglich ist. Daher werden diese Fische als sogenannte Stapelwirte (paratenische Wirte; siehe „Lebenszyklus und Überlebensstrategien“) und nicht als Endwirte angesehen. Weder die Zwischen- noch die Endwirte von *P. kenyensis* sind bekannt, jedoch scheiden Kaimane (die Endwirte aller anderen Polyacanthocephala) aus, da sie in dem betreffenden Habitat nicht heimisch sind (Amin und Dezfuli, 1995; Aloo und Dezfuli, 1997).

Lebenszyklus und Überlebensstrategien

In einem Lebenszyklus durchläuft ein Acanthocephala-Individuum mindestens einen Wirtswechsel sowie mehrere Entwicklungsstadien: Ei (= umhüllter Acanthor), Acanthella, Cystacanth (= infektiöse Acanthella) und Adultus. Eine detaillierte Beschreibung der folgenden Zusammenfassung findet sich in den Kapiteln 7 und 8 im Buch „Biology of the Acanthocephala“ (Crompton und Nickol, 1985).

Im Darm des Endwirtes legen adulte Weibchen Eier ab, die von einer mehrschichtigen Eischale umhüllt sind und in denen sich bereits die sogenannten Acanthoren entwickelt haben. Die Eier werden mit dem Kot des Wirtes ausgeschieden und müssen für die weitere Entwicklung des Wurmes von geeigneten Zwischenwirten aufgenommen werden. Sobald dies geschieht, platzt die Eischale und der freigesetzte Acanthor kann mit Hilfe bereits entwickelter Muskeln und Haken am vorderen Körperende in die Darmwand des Zwischenwirtes eindringen. Von dort aus arbeitet er sich weiter ins Körperinnere bis in die Leibeshöhle vor, gleichzeitig beginnt die Organogenese und somit die Umorganisation zur Acanthella. In der späten Acanthella-Entwicklung wird schließlich auch der charakteristische Rüssel gebildet. Dieser wird bei vielen Arten invaginiert, was dem Tier eine rundliche Form verleiht. Außerdem reagiert das Immunsystem des Zwischenwirts auf den Eindringling mit

Bildung einer Zystenhülle, weshalb die fertig ausgebildete, infektiöse Acanthella auch als Cystacanth bezeichnet wird. Die Entwicklung der Cystacanth zum Adulten erfolgt nach oraler Aufnahme des Zwischenwirts (und damit auch des Cystacanth) durch den Endwirt. Im Darm des Endwirtes verlässt der Cystacanth die Zystenhülle und bohrt sich mit Hilfe der Proboscis in die Darmwand, wo er sich zum Adulten entwickelt und Nachkommen produziert.

Acanthocephala haben Methoden entwickelt, um die Wahrscheinlichkeit ihrer Transmission von einem Wirt zum anderen zu erhöhen. So werden Eier nicht nur mit den Fäzes der Endwirte verbreitet, sondern können teilweise auch von befruchteten Weibchen, die sich außerhalb eines Wirtes befinden, an die Umgebung abgegeben werden (Wahl und Sparkes, 2012). Weiterhin sind Cystacanth, unter anderem durch Freisetzung von Neuromodulatoren wie Serotonin, dazu fähig, das Verhalten der Zwischenwirte so zu ändern, dass die Ingestion durch einen passenden Endwirt wahrscheinlicher wird (Cézilly et al., 2010; Thomas et al., 2010; Helluy, 2013; Lagrue et al., 2013; Perrot-Minnot und Cézilly, 2013). Trotzdem ist die Wahrscheinlichkeit, in einem anderen als dem gewünschten Wirt zu landen, sehr hoch. Um die Chancen zu erhöhen, einen Lebenszyklus erfolgreich zu beenden, ist dieser daher meist variabel (Schmidt, 1985; Kennedy, 2006). Neben den „bevorzugten“ Wirten können Acanthocephala auch Nebenwirte nutzen, um ihre Entwicklung (wenn auch langsamer als im bevorzugten Wirt) fortzusetzen. Auch bedienen sich die Würmer paratenischer Wirte (auch Stapelwirte genannt) als Zwischenstationen: gelangt beispielsweise ein Cystacanth vom Zwischenwirt in einen solchen paratenischen Wirt statt in den Endwirt, kann er sich zwar nicht weiter entwickeln, jedoch überdauern. Dies ist besonders dann von Vorteil, wenn der Zwischenwirt nicht auf der Speisekarte des gewünschten Endwirtes steht, der paratenische Wirt aber schon. Die Cystacanth (ebenso wie die Eier) der Acanthocephala sind also Dauerstadien, die Wirtsabwesenheit oder Perioden schlechter Umweltbedingungen überdauern können (Kennedy, 2006). Weiterhin sterben die Würmer nicht zwangsläufig ab, wenn der infizierte Endwirt gefressen wird: manche Acanthocephala-Arten können sich durch post-zyklische Transmission zusätzliche Endwirte erschließen (Kennedy, 1999; Rauque et al., 2002). Dieser Mechanismus greift auch bei Kannibalismus innerhalb einer Wirts-Art (Richardson und Abdo, 2011).

Ein illustratives Beispiel für die Flexibilität der Lebenszyklen bietet *Plagiorhynchus cylindraceus*: ausgehend vom Zwischenwirt (Assel) kann der Wurm auf verschiedenen Wegen in einen passenden Endwirt (Vogel) gelangen:

- (i) direkt (Endwirt: Sperlingsvögel)
- (ii) über ein kleines Säugetier als paratenischen Wirt (Endwirt: Raubvögel)
- (iii) über einen Igel als paratenischen oder Nebenwirt (Endwirt: aasfressende Vögel)

Dabei ist der dritte Weg tatsächlich nur mit Hilfe des Menschen (Tötung der Igel durch Verkehrsunfälle) möglich und somit recht „modern“ (Skuballa et al., 2010).

1.2.3 Die interne Phylogenie der Syndermata

Die Monophylie der Syndermata (Rotifera + Acanthocephala) wird durch morphologische und molekulare Daten gut unterstützt und ist nach aktuellem Wissensstand unstrittig (Nielsen, 2012). Als Synapomorphien gelten unter anderem die namensgebende syncytiale Epidermis, die anteriore Insertion des Flagellums der Spermienzellen und die intracytoplasmatische Lamina (Ahlrichs, 1995, 1997). Von molekularer Seite unterstützen nukleäre Marker wie 18S und 28S rRNA (Garey et al., 1996; Littlewood et al., 1998; García-Varela et al., 2000; Passamanek und Halanych, 2006; Paps et al., 2009b; Mallatt et al., 2012), hsp82 (82 kD heat shock protein; Mark Welch, 2000) und RPs (ribosomale Proteine; Hausdorf et al., 2007; Struck und Fisse, 2008; Witek et al., 2008; Witek et al., 2009; Hausdorf et al., 2010) ebenso wie mt Genome (Min und Park, 2009), Kombinationen aus nukleären und mitochondrialen Markern (Garey et al., 1998; García-Varela und Nadler, 2006) sowie eine phylogenomische Studie auf Basis von 13 funktionell nicht verwandten Gensequenzen (Paps et al., 2009a) diese Gruppierung. Auch sogenannte „total evidence“ Studien, die molekulare Marker und morphologische Merkmale simultan analysieren, zeigen monophyletische Syndermata (Giribet et al., 2000; Sørensen und Giribet, 2006).

Zu den Verwandtschaftsverhältnissen der Syndermata-Subtaxa Acanthocephala, Seisonidea, Bdelloidea und Monogononta existieren jedoch mehrere konkurrierende Hypothesen. Jede der vorgeschlagenen Topologien wurde sowohl von morphologischen als auch von molekularen Markern mehr oder weniger gut unterstützt (siehe Witek et al., 2008). Die Konfusion, die durch diese verschiedenen Hypothesen entstand, wurde in jüngster Zeit auf den ersten Blick etwas aufgelöst, da phylogenomische Analysen von ribosomalen Proteinen (Witek et al., 2008; Witek et al., 2009) und mt Sequenzen (Min und Park, 2009) starke Hinweise für eine Paraphylie der Eurotatoria (Monogononta + Bdelloidea) lieferten. In diesen Analysen wurde festgestellt, dass die Bdelloidea näher mit den Acanthocephala verwandt sind als mit den Monogononta (ABBILDUNG 7 A). Jedoch enthielt keine dieser Studien Daten des Subtaxons Seisonidea, was der geringen Verfügbarkeit molekularer Daten für dieses Taxon geschuldet ist. Derzeit sind in öffentlichen Datenbanken lediglich eine 18S rRNA-Sequenz sowie partielle Sequenzen der 28S rRNA, des hsp82 Gens und des mitochondrialen COI (cytochrome oxidase subunit I) Gens hinterlegt.

Eine erste molekular-phylogenetische Analyse unter Einbezug einiger Sequenzen der Seisonidea positionierte diese als Schwestertaxon zu den verbleibenden Syndermata (Mark Welch, 2000). Diese Topologie wurde jedoch bisher durch keine andere Studie bestätigt und ist vermutlich ein Artefakt, das aus der Verwendung einer zu entfernt verwandten Außengruppe (*C. elegans*) bei der phylogenetischen Rekonstruktion resultiert (Herlyn et al., 2003). Die meisten Studien, die Sequenzen der Seisonidea enthielten, postulierten eine Schwestergruppierung von Seisonidea und Acanthocephala (Zrzavý, 2001; Herlyn et al., 2003; Zrzavý, 2003; ABBILDUNG 7 B). Diese „Pararotatoria“ genannte Taxon-Gruppierung wird auf morphologischer Ebene von der Präsenz spezieller epidermaler Filamente und dichter Körperchen (dense bodies) im Flagellum der Spermien von Acanthocephala und Seisonidea

unterstützt (Ahlrichs, 1995, 1997, 1998). Die Pararotatoria wurden in diesen Studien jedoch als Schwestertaxon zu monophyletischen Eurotatoria positioniert (ABBILDUNG 7 B). Lediglich eine Studie, die Daten der Seisonidea beinhaltete, implizierte deutlich eine Paraphylie der Eurotatoria. Es handelt sich dabei um eine “total evidence” Studie von 74 morphologischen Charakteren sowie allen vier oben genannten molekularen Markern (Sørensen und Giribet, 2006). Hier wurden die Monogononta als Schwestertaxon zu allen anderen Syndermata positioniert (ABBILDUNG 7 C). Die interne Topologie der verbleibenden, als “Hemirotifera” zusammengefassten Syndermata-Taxa (Acanthocephala + Seisonidea + Bdelloidea) konnte nicht mit Gewissheit aufgelöst werden, jedoch schienen die Daten eine Schwestergruppierung von Acanthocephala und Seisonidea zu favorisieren.

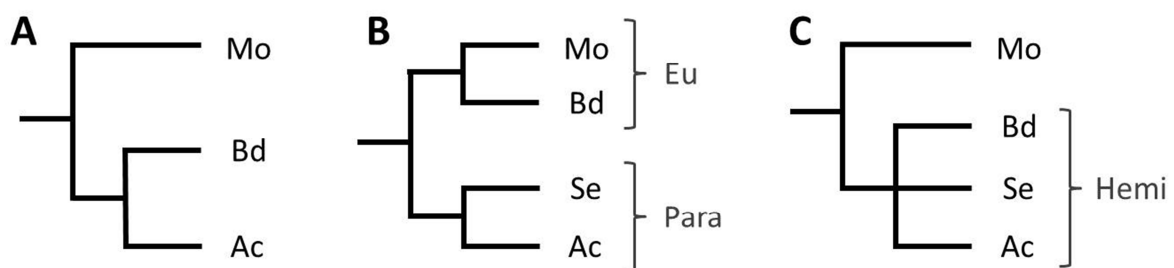


ABBILDUNG 7 – Hypothesen zur internen Phylogenie der Syndermata

[A] Eine Paraphylie der Eurotatoria wird von phylogenomischen Studien nahegelegt, es fehlen jedoch Daten der Seisonidea (Witek et al., 2008; Min und Park, 2009; Witek et al., 2009). [B] Analysen einzelner oder weniger Gene sowie „total evidence“ Analysen gruppieren Acanthocephala + Seisonidea als Schwestertaxa zu Bdelloidea + Monogononta (Zrzavý, 2001; Herlyn et al., 2003; Zrzavý, 2003). [C] Eine andere „total evidence“ Analyse zeigt Monogononta als Schwestergruppe zu einer Trichotomie aus Acanthocephala + Seisonidea + Bdelloidea (Sørensen und Giribet, 2006). Ac = Acanthocephala, Bd = Bdelloidea, Eu = Eurotatoria, Hemi = Hemirotifera, Mo = Monogononta, Para = Pararotatoria, Se = Seisonidea.

Somit bleibt nicht nur die Position der Seisonidea innerhalb der Syndermata ungewiss (siehe hierzu auch die inkongruenten Ergebnisse in García-Varela und Nadler, 2006), sondern es stellt sich auch die Frage, ob das Fehlen der Daten für das Taxon Seisonidea die phylogenetischen Rekonstruktionen der größeren phylogenomischen Arbeiten in Richtung paraphyletische Eurotatoria beeinflusst haben könnte.

Auch die interne Topologie der Acanthocephala ist nicht vollkommen gesichert (ABBILDUNG 8). In den meisten molekular-phylogenetischen Studien werden monophyletische Archiacanthocephala als Schwestertaxon zu einer Gruppierung aus Palae- und Eoacanthocephala positioniert (Near et al., 1998; García-Varela et al., 2000; García-Varela et al., 2002; Near, 2002; García-Varela und Nadler, 2006). Waren in den Analysen auch Daten der Polyacanthocephala enthalten, gruppieren diese zu den Eoacanthocephala (García-Varela et al., 2002; García-Varela und Nadler, 2006). Jedoch wird die Monophylie verschiedener Subtaxa angezweifelt: das Ergebnis einer Parsimony-Analyse von über 100 morphologischen Charakteren zeigte die Archiacanthocephala als paraphyletisch (Monks, 2001) und Analysen von 18S rRNA-Sequenzen stellten die Monophylie der

Palaeacanthocephala oder des in ihnen enthaltenen Subtaxons Echinorhynchida in Frage (García-Varela et al., 2002; Near, 2002; Herlyn et al., 2003; Verweyen et al., 2011).

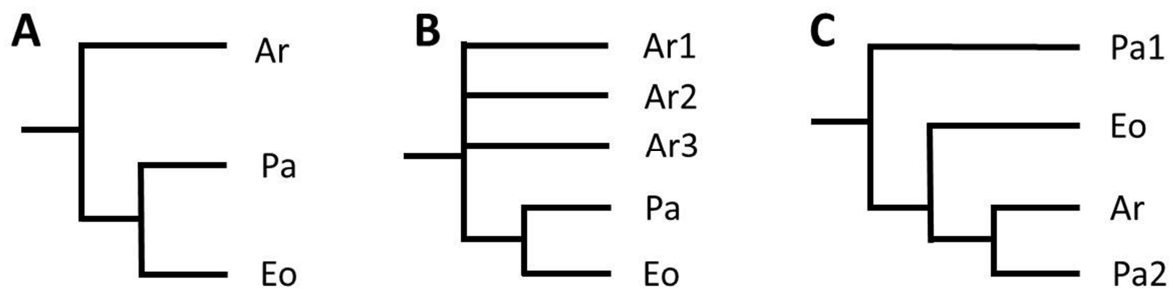


ABBILDUNG 8 – Hypothesen zur internen Phylogenie der Acanthocephala

[A] Die meisten molekular-phylogenetischen Studien unterstützen eine Topologie mit Palaeacanthocephala als Schwestertaxon zu den Eoacanthocephala. Die Archiacanthocephala sind Schwestertaxon zu den vorgenannten. [B] Eine Analyse morphologischer Charaktere ergab Hinweise auf eine Paraphylie der Archiacanthocephala. [C] Analysen von 18S rRNA Sequenzen ergaben Hinweise auf eine Paraphylie der Palaeacanthocephala. Ar = Archiacanthocephala, Eo = Eoacanthocephala, Pa = Palaeacanthocephala. Referenzen im Fließtext.

1.2.4 Gnathifera und Platyzoa: Syndermata im Kontext des Metazoa-Stammbaums

Die Syndermata werden auf morphologischer Basis zusammen mit den Taxa Gnathostomulida (Kiefernündchen) und Micrognathozoa (griechisch für „mit kleinen Kiefern“) zu einer taxonomischen Gruppe namens Gnathifera (Kieferträger) zusammengefasst. Molekulare Daten der Micrognathozoa sind rar und rein molekular-phylogenetische Analysen, die alle drei putativen Gnathifera-Subtaxa beinhalteten, konnten bisher keine Unterstützung für monophyletische Gnathifera liefern (Giribet et al., 2004; Baguñà et al., 2008; Paps et al., 2009b). Größere, auf RP-Sequenzen basierende phylogenomische Studien unterstützen zwar eine monophyletische Gruppierung von Syndermata und Gnathostomulida, doch fehlt in diesen Analysen das Taxon Micrognathozoa (Witek et al., 2009; Hausdorf et al., 2010). Dennoch ist die Monophylie der Gnathifera relativ unbestritten (Nielsen, 2012), da die ultrastrukturellen Ähnlichkeiten der namensgebenden „Kiefer“ beachtlich sind (Rieger und Tyler, 1995; Herlyn und Ehlers, 1997; Kristensen und Funch, 2000; Sørensen, 2003) und auch eine „total evidence“-Studie bereits Unterstützung für diese Gruppierung geliefert hat (Zrzavý, 2003).

Die Gnathifera wurden von Cavalier-Smith (1998) zusammen mit den Gastrotricha (Bauchhärlinge) und Platyhelminthes (Plattwürmer) in der Taxon-Gruppe Platyzoa vereint. Morphologische Evidenzen für eine solche Gruppierung sind jedoch nur schwer zu finden. Von Cavalier-Smith wurden Zilien, ein pseudo- oder acoelomatischer Körperbau, ein fehlendes Gefäßsystem sowie fehlende Segmentierung als gemeinsame morphologische Merkmale der Gruppe angegeben. Auch auf molekularer Ebene hat sich die Bestätigung der Platyzoa-Hypothese als sehr schwierig erwiesen. Bisher konnten molekulare Studien nur

vereinzelt monophyletische Platyzoa unterstützen. Als Beispiele können die Arbeiten von Dunn et al. (2008) und Hejnol et al. (2009) angeführt werden, da dies die bisher einzigen großen phylogenomischen Analysen sind, bei denen alle drei putativen Platyzoa-Subtaxa (also Gnathifera, Platyhelminthes und Gastrotricha) im Datensatz vorhanden waren (siehe ABBILDUNG 9). In den Analysen von Dunn et al. (2008) erschienen die drei Platyzoa-Subtaxa zwar zunächst innerhalb einer Taxon-Gruppe, diese enthielt allerdings auch Taxa der Acoelomorpha und Myzostomida und war zudem schlecht unterstützt (< 70 % Bootstrap Unterstützung). Weiterhin erschienen die (eigentlich unbestritten monophyletischen, siehe oben) Gnathifera als paraphyletisch. Nähere Analysen zeigten eine starke Instabilität der meisten Platyzoa-Taxa (Ausnahme sind Platyhelminthes), die daraufhin aus dem Datensatz ausgeschlossen wurden. Bei Hejnol et al. (2009) zeigte sich ein ähnliches Bild: der berechnete ML-Baum zeigte zwar monophyletische Platyzoa, jedoch ohne statistisch signifikante Unterstützung (6 % bzw. 28 % Bootstrap Unterstützung). Innerhalb dieser Platyzoa-Gruppe erschienen die Gnathifera abermals als paraphyletisch. Eine recht gute Unterstützung von 77 % bzw. 82 % Bootstrap für Platyzoa konnte erst durch eine Verfeinerung der Analyse (wie bei Dunn et al. durch den Ausschluss instabiler Taxa) erreicht werden, dann fehlten jedoch alle Gnathifera-Taxa, so dass sich diese Unterstützung lediglich auf unvollständige Platyzoa (Platyhelminthes + Gastrotricha) bezog.

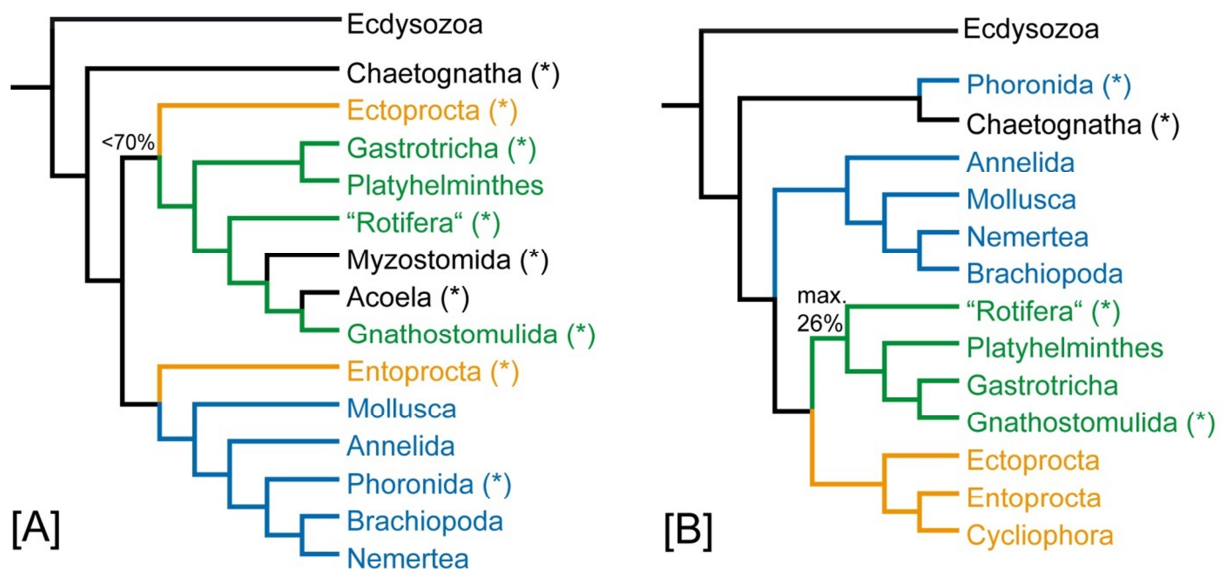


ABBILDUNG 9 – Hypothesen zur Phylogenie der Protostomia

[A] In den Analysen von Dunn et al. (2008) erschienen die Platyzoa paraphyletisch, da sie mit weiteren langästigen Taxa wie Acoelomorpha und Myzostomida gruppierten. [B] In den Analysen von Hejnol et al. (2009) erschienen die Platyzoa als monophyletisch, wurden jedoch sehr schlecht unterstützt. (*) = instabile Taxa, die aus den weiteren Analysen ausgeschlossen wurden. Grün = Platyzoa-Taxa, Blau = Lophotrochozoa-Taxa, Orange = Polyzoa-Taxa. Die Bootstrap-Unterstützung für das die Platyzoa-Taxa beinhaltende Monophylum ist in % angegeben.

Auffällig bei nahezu allen relevanten molekular-phylogenetischen Analysen ist, dass die Platyzoa-Taxa in den resultierenden Bäumen sehr lange Äste aufweisen, bedingt durch hohe Substitutionsraten während der Sequenzevolution. Dies trifft besonders auf die parasitischen Platyhelminthes und Acanthocephala zu und ist auch in anderen Bereichen des Metazoa-Stammbaums (beispielsweise bei Nematoda und Acoelomorpha) leider keine Seltenheit. Diese mit Substitutionen „gesättigten“ Äste neigen dazu, sich in phylogenetischen Rekonstruktionen durch das konvergente Auftreten gleicher Basen oder Aminosäuren gegenseitig anzuziehen, ein Phänomen, das als „long-branch attraction“ (LBA) bekannt ist (Felsenstein, 1978). Molekular-phylogenetische und phylogenomische Analysen von Platyzoa-Taxa stießen daher immer wieder auf LBA-Probleme: vermutlich artifizielle Gruppierungen einiger oder aller Platyzoa-Taxa mit langästigen Taxa wie Nematoda und Acoelomorpha waren keine Seltenheit (Steinauer et al., 2005; Dunn et al., 2008; Helmkampf et al., 2008; Podsiadlowski et al., 2008; Struck und Fisse, 2008; Podsiadlowski et al., 2009; Hausdorf et al., 2010; Nesnidal et al., 2010). Auch das Auftreten monophyletischer Platyzoa an sich könnte durchaus ein LBA-Artefakt darstellen, da alle Platyzoa-Taxa recht hohe Evolutionsraten und damit verhältnismäßig lange Äste aufweisen (Telford, 2006; Edgecombe et al., 2011).

1.3 Zielsetzung

Erstes Ziel dieser Dissertation war die Analyse der internen Verwandtschaftsverhältnisse der Syndermata auf Basis molekularer Daten sowie die Interpretation der Ergebnisse im Hinblick auf die morphologische Merkmalsevolution in dieser Taxon-Gruppe (Kapitel 2.1, 2.3 und 2.6.1). Weiterhin sollten Datengrundlagen für die Überprüfung der Platyzoa-Hypothese geschaffen werden (Kapitel 2.5). Zur Analyse der mt Genomorganisation innerhalb der Monogononta sollten verschiedene mt Genom-Sequenzierungen initiiert werden (Kapitel 2.6.2). Die Arbeit sollte außerdem die Erstellung von Übersichtspublikationen bezüglich der molekular-phylogenetischen Analysen von mt Genomen und transkriptomischen Daten der Platyzoa-Taxa beinhalten (Kapitel 2.2 und 2.4).

Die interne Phylogenie der Acanthocephala: Analyse mitochondrialer Genome (Kapitel 2.1)

Mit Hilfe der Sequenzen mitochondrialer (mt) Genome sollten phylogenetische Fragestellungen innerhalb der Acanthocephala geklärt werden. Im Speziellen sollte die fragliche Monophylie der Archi- und Palaeacanthocephala adressiert werden. Hierzu sollten mt Genome von jeder der drei großen Subtaxa der Acanthocephala amplifiziert, sequenziert und ausgewertet werden (u.a. im Rahmen der von mir mitbetreuten Diplomarbeit von Mathias Weber (Mainz, 2010)). Die Auswertung sollte neben der Analyse der Sequenzdaten in molekular-phylogenetischen Ansätzen auch die Betrachtung der Genreihenfolge, der RNA Strukturen und des Codon-Gebrauchs beinhalten.

Die interne Phylogenie der Syndermata: Analyse transkriptomischer Daten (Kapitel 2.3 und 2.6.1)

Die ungeklärte Position der Seisonidea innerhalb der Syndermata sollte auf Grundlage von neuen transkriptomischen Daten mehrerer Syndermata-Taxa untersucht werden. Für die Taxa *Seison spec.* (Seisonidea) und *Paratenuisentis ambiguus* (Eoacanthocephala) sollte RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben werden. Nach Sequenzierung der amplifizierten cDNAs mittels Pyrosequenzierung (454) sollten aus den erhaltenen Sequenzdaten sowie aus von unserem Kooperationspartner David Mark Welch bereitgestellten Datensätzen für die Taxa *Brachionus manjavacas* (Monogononta) und *Adineta vaga* (Bdelloidea) orthologe Gensequenzen für molekular-phylogenetische Rekonstruktionen bioinformatisch extrahiert werden. Hierzu sollten sowohl Sequenzen ribosomaler Proteine (Extraktion mittels Blast-Suchen) als auch Sequenzen von funktionell nicht verwandten Genen herangezogen werden.

Die Syndermata im Kontext des Metazoa-Stammbaums: Analyse transkriptomischer Daten (Kapitel 2.5)

Um die Frage nach der Positionierung der Syndermata im Kontext des Metazoa-Stammbaums zu adressieren und die Platyzoa-Hypothese zu überprüfen, sollten in Zusammenarbeit mit unserem Kooperationspartner Torsten Struck weitere Transkriptom-

Datensätze von putativen Platyzoa-Taxa generiert werden. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Torsten Struck konzentrierte sich auf die Taxa Gastrotricha und Gnathostomulida, während ich weitere Syndermata-Taxa bearbeiten sollte. Dabei sollte die Taxon-Abdeckung innerhalb der

- (i) Monogononta um ein Taxon außerhalb der Brachionidae (*Lecane inermis*; im Rahmen der von mir mitbetreuten Diplomarbeit von Sabrina Klebow (Mainz, 2011))
- (ii) Acanthocephala um einen Vertreter der dritten großen Acanthocephala-Untergruppe Archiacanthocephala (*Macracanthorhynchus hirudinaceus*)
- (iii) Bdelloidea um ein Taxon des Genus Rotaria (*Rotaria rotatoria*)

erweitert werden.

Die mitochondrialen Genome der Monogononta: Analyse der Genomorganisation (Kapitel 2.6.2)

Die beiden bisher publizierten mt Genome der Monogononta (*Brachionus plicatilis* und *B. koreanus*) weisen eine aberrante Struktur und eine innerhalb der Syndermata einzigartige Genreihenfolge auf. Um Hinweise zu erhalten, ob diese Genomorganisation spezifisch für die Brachionidae oder ein gemeinsames Merkmal aller Ploimida (der größten Untergruppe der Monogononta) ist, sollten Vorarbeiten zur Analyse der mt Genome verschiedener Ploimida geleistet werden. Als Vertreter der Brachionidae sollten *B. manjavacas* und *B. calyciflorus*, als Vertreter der Lecanidae sollte *Lecane inermis* untersucht werden.

Übersicht: die mitochondrialen Genome der Platyzoa (Kapitel 2.2)

Es sollten Datenbankrecherchen zu Literatur und Sequenzen aller mt Genome der Platyhelminthes, Gastrotricha und Gnathifera durchgeführt werden. Die Daten sollten zusammenfassend dargestellt und Besonderheiten herausgestellt werden. Hierzu waren unter anderem Analysen in Bezug auf Gengehalt, Genreihenfolge, Codon-Gebrauch und Basenzusammensetzung notwendig. Weiterhin sollten die Ergebnisse bisheriger molekular-phylogenetischer Analysen der Platyzoa-Taxa analysiert und kritisch bewertet werden.

Übersicht: die Phylogenie der Platyzoa basierend auf molekularen Daten (Kapitel 2.4)

Die Arbeiten zur molekularen Phylogenie der Platyzoa sollten recherchiert und zusammenfassend dargestellt werden. Insbesondere Ergebnisse, die innerhalb des DFG Schwerpunktprogramms "Deep Metazoan Phylogeny" erzielt wurden, sollten herausgestellt und im Kontext internationaler Publikationen kritisch bewertet werden.

2. ERGEBNISSE

2.1 Phylogenetic analyses of endoparasitic Acanthocephala based on mitochondrial genomes suggest secondary loss of sensory organs

Veröffentlicht in Molecular Phylogenetics and Evolution (2013)

Band 66, Ausgabe 1, Seiten 182-189

2.1.1 Kurzbeschreibung (deutsche Übersetzung)

Das Metazoen-Taxon Syndermata (Monogononta, Bdelloidea, Seisonidea, Acanthocephala) beinhaltet Spezies, deren Lebensweisen sich erheblich voneinander unterscheiden. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb des Syndermata-Subtaxons Acanthocephala (Kratzwürmer, obligate Endoparasiten). Um die kontrovers diskutierten phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Subtaxa der Acanthocephala zu untersuchen, wurden die mitochondrialen (mt) Genome von *Echinorhynchus truttae* (Palaeacanthocephala), *Paratenuisentis ambiguus* (Eoacanthocephala), *Macracanthorhynchus hirudinaceus* (Archiacanthocephala) und *Philodina citrina* (Bdelloidea) sequenziert. Dadurch wurde der bisher größte molekulargenetische Datensatz für diese Fragestellung hergestellt, welcher alle größeren Subtaxa der Acanthocephala enthält. Zusammen mit öffentlich verfügbaren mt Genomdaten von vier weiteren Syndermata- sowie 18 anderen Lophotrochozoa (Spiralia)-Taxa sowie einem Außengruppentaxon wurden die abgeleiteten Protein-kodierenden Sequenzen für phylogenetische Analysen mittels Maximum Likelihood und Bayes'schen Methoden verwendet. Die Ergebnisse sind vollkommen kongruent und zeigen monophyletische Archiacanthocephala als Schwestertaxon zu einer Gruppierung aus Eoacanthocephala und monophyletischen Palaeacanthocephala (Echinorhynchida). Diese Topologie suggeriert den sekundären Verlust lateraler sensorischer Organe (sensorische Poren) innerhalb der Palaeacanthocephala und steht im Einklang mit dem Aufkommen apikaler sensorischer Organe in der Stammlinie der Archiacanthocephala.

2.1.2 Geleistete Beiträge zu dieser Publikation

- Konzeption des Themas der Diplomarbeit (zusammen mit Prof. Dr. Thomas Hankeln)
- Durchführung von Teilen der Laborarbeit (20 %)
- Durchführung von Teilen der Datenanalyse und der phylogenetischen Rekonstruktionen (20 %)
- Schreiben des Manuskripts sowie Erstellung der Abbildungen (gemeinsam mit Mathias Weber)



Phylogenetic analyses of endoparasitic Acanthocephala based on mitochondrial genomes suggest secondary loss of sensory organs

Mathias Weber^{a,1}, Alexandra R. Wey-Fabrizius^{a,1}, Lars Podsiadlowski^b, Alexander Witek^a, Ralph O. Schill^c, László Sugár^d, Holger Herlyn^{e,*}, Thomas Hankeln^{a,*,2}

^a Institute of Molecular Genetics, Johannes Gutenberg-University Mainz, J.-J. Becherweg 30a, D-55099 Mainz, Germany

^b Institute of Evolutionary Biology and Ecology, University of Bonn, Bonn, Germany

^c Department of Zoology, Biological Institute, University of Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, D-70569 Stuttgart, Germany

^d Faculty of Animal Science, Kaposvár University, Guba S. 40, H-7400 Kaposvár, Hungary

^e Institute of Anthropology, Johannes Gutenberg-University Mainz, Colonel-Kleinmann-Weg 2, D-55099 Mainz, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 March 2012

Revised 6 September 2012

Accepted 17 September 2012

Available online 5 October 2012

Keywords:

Syndermata

Acanthocephala

Rotifera

Mitochondrial genome

Sense organs

Sensory pores

ABSTRACT

The metazoan taxon Syndermata (Monogononta, Bdelloidea, Seisonidea, Acanthocephala) comprises species with vastly different lifestyles. The focus of this study is on the phylogeny within the syndermatan subtaxon Acanthocephala (thorny-headed worms, obligate endoparasites). In order to investigate the controversially discussed phylogenetic relationships of acanthocephalan subtaxa we have sequenced the mitochondrial (mt) genomes of *Echinorhynchus truttae* (Palaeacanthocephala), *Paratenuisentis ambiguus* (Eoacanthocephala), *Macracanthorhynchus hirudinaceus* (Archiacanthocephala), and *Philodina citrina* (Bdelloidea). In doing so, we present the largest molecular phylogenetic dataset so far for this question comprising all major subgroups of Acanthocephala. Alongside with publicly available mt genome data of four additional syndermatans as well as 18 other lophotrochozoan (spiralian) taxa and one outgroup representative, the derived protein-coding sequences were used for Maximum Likelihood as well as Bayesian phylogenetic analyses. We achieved entirely congruent results, whereupon monophyletic Archiacanthocephala represent the sister taxon of a clade comprising Eoacanthocephala and monophyletic Palaeacanthocephala (Echinorhynchida). This topology suggests the secondary loss of lateral sensory organs (sensory pores) within Palaeacanthocephala and is further in line with the emergence of apical sensory organs in the stem lineage of Archiacanthocephala.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The metazoan taxon Syndermata (also named Rotifera) joins Acanthocephala (“thorny-headed worms”) with three taxa formerly subsumed as Rotifera (“wheel-animals”), i.e. Bdelloidea, Monogononta, and Seisonidea (Ahlrichs, 1995, 1997). The representatives of Syndermata are consistently characterized by an eponymous syncytial epidermis with an electron dense internal layer penetrated by intrusions of the distal plasma membrane (Ahlrichs, 1995, 1997). The syndermatan subtaxa are distinguished from each other by different lifestyles: While Bdelloidea and Monogononta are free-living, Seisonidea live epizootically on crustaceans of the leptostracan genus *Nebalia* (see, e.g., Ax, 2003). Acanthocephalans, on the other hand,

are endoparasites with a complex lifecycle including at least a hexapod or crustacean intermediate host and a neognathostome definite host (for a compilation of species-specific host spectra, see Meyer, 1933; Petrochenko, 1956, 1958; see also Near et al., 1998; Herlyn et al., 2003). Syndermatan biology lately received considerable attention, e.g. due to the ability of acanthocephalans to accumulate heavy metals (which renders them highly sensitive bioindicators for ecotoxicological studies; see e.g. Sures, 2004). Research further focused on the genome structure evolution in asexual bdelloids (e.g., Mark Welch and Meselson, 2000; Hur et al., 2009) and the molecular interactions between acanthocephalans and their hosts (Piscart et al., 2007; Sures and Radszuweit, 2007; Medoc and Beisel, 2008).

In most molecular analyses of the acanthocephalan phylogeny, monophyletic Archiacanthocephala appeared as sister to a clade comprising palaeacanthocephalan and eoacanthocephalan representatives (Near et al., 1998; Garcia-Varela et al., 2000; Near, 2002; Garcia-Varela and Nadler, 2006; Fig. 1A). As far as polyacanthocephalans were included, they clustered with Eoacanthocephala (Garcia-Varela et al., 2002; Garcia-Varela and Nadler, 2006).

* Corresponding authors.

E-mail addresses: weber011@uni-mainz.de (M. Weber), wey@uni-mainz.de (A.R. Wey-Fabrizius), lars@cgae.de (L. Podsiadlowski), witek.alexander@gmail.com (A. Witek), ralph.schill@bio.uni-stuttgart.de (R.O. Schill), sugar.laszlo@ke.hu (L. Sugár), herlyn@uni-mainz.de (H. Herlyn), hankeln@uni-mainz.de (T. Hankeln).

¹ These authors contributed equally to this work.

² Joint senior authors.

Despite some consensus on the internal acanthocephalan phylogeny, the monophyly of some of the higher-ranked subtaxa is not undisputed. In particular, parsimony analysis of 138 morphological characters suggested that archiacanthocephalans are paraphyletic stem lineage representatives of a monophylum comprising Eoacanthocephala and Palaeacanthocephala (Monks, 2001; Fig. 1B). Other studies based on 18S rDNA questioned the monophyly of Palaeacanthocephala, in particular of the palaeacanthocephalan subtaxon Echinorhynchida (García-Varela et al., 2002; Near, 2002; Herlyn et al., 2003; Verweyen et al., 2011; Fig. 1C).

Non-monophyletic Echinorhynchida appear plausible considering the presence/absence of lateral sensory organs in this clade. Lateral sensory organs (also called lateral sensory pits, lateral sense organs, sensory pores, and neck sense organs) are paired subepidermal structures in the transition zone of trunk and proboscis. They are laterally located and consist of dendritic endings embedded in protrusions of a so-called support cell (“Stützzelle”) (Harada, 1931; Gee, 1987; Herlyn et al., 2001). While most acanthocephalan species possess lateral sensory organs, the trait is absent in some palaeacanthocephalan species and outside the acanthocephalan clade (Gee, 1987; Herlyn et al., 2001; Monks, 2001). This character distribution requires more or less evolutionary steps, depending on the monophyly of Palaeacanthocephala. Archiacanthocephala possess additional sensory organs at the proboscis apex, called apical sensory (or sense) organs. These structures are either paired or unpaired and again consist of dendritic endings and protrusions of the support cell (e.g., von Haffner, 1943; Budziakowski and Mettrick, 1986; Gee, 1987; Dunagan and Bozzola, 1989; Herlyn et al., 2001). As such, they have to be distinguished from the epidermis cone at the proboscis apex of eoacanthocephalans and, possibly, polyacanthocephalans (e.g. Van Cleave and Bullock, 1950; Gee, 1987; Herlyn, 2001). Depending on the monophyly or paraphyly of archiacanthocephalans, apical sensory organs either represent an evolutionary novelty of archiacanthocephalans as a whole or of some undefined subtaxon (Gee, 1987; Herlyn et al., 2001). Both, lateral and apical sensory organs exemplify that interpretations on the character evolution require robust hypotheses on the internal acanthocephalan phylogeny. However, molecular analyses of acanthocephalan phylogeny so far have been compromised by relying on rather small sequence datasets and/or a limited sampling of the acanthocephalan subtaxa (e.g. Witek et al., 2008, 2009; Fontaneto and Jondelius, 2011; Verweyen et al., 2011; Gazi et al., 2012). These studies were therefore not sufficient to draw robust conclusions on the evolution of sensory organs within the acanthocephalan clade.

The present phylogenetic study uses widely complete mt genomes of bdelloids, monogononts, archiacanthocephalans, eoacanthocephalans, and palaeacanthocephalans, thus allowing for a re-assessment of the relationships among the major acanthocephalan taxa as a prerequisite for conclusions on the evolution of lateral and apical sensory organs. The dataset comprises all

presently available syndermatan mt genomes from GenBank as well as newly sequenced mt genomes from *Echinorhynchus truttae* (Palaeacanthocephala), *Paratenuisentis ambiguus* (Eoacanthocephala), *Macracanthorhynchus hirudinaceus* (Archiacanthocephala) and *Philodina citrina* (Bdelloidea). We examine mt genome information not only at the sequence level, but also at the level of gene repertoire and gene order (Boore and Brown, 1998; Adams and Palmer, 2003).

2. Material and methods

2.1. Species collection and isolation of total DNA

Specimens of *P. ambiguus* were collected from the intestine of their host, European eel (*Anguilla anguilla*), in the river Weser near Gimte (Germany). *E. truttae* was extracted from the intestine of a brown trout (*Salmo trutta*) from the Leine river near Göttingen (Germany). Specimens of *M. hirudinaceus* were collected from their host, wild pig (*Sus scrofa*), at Bakony Mountain north of Lake Balaton (Hungary). *P. citrina* was collected from a small pond north of Tübingen (Germany) and cultured in the laboratory since many years. All animals were stored in dry condition at -80°C or RNA-later at -80°C prior to extraction of nucleic acids. DNA extraction was performed with the Quick Genomic DNA Prep (Huang et al., 2009).

2.2. Amplification and sequencing of mtDNA

Partial gene pieces of less than 500 bp (“starting points”) were amplified by PCR using the TrueStart™ Hot Start Taq DNA-Polymerase (Fermentas) and degenerate primers derived from conserved regions in multiple sequence alignments (MSAs). The MSAs were conducted applying MAFFT (Katoh et al. 2002) to orthologous, publicly available mtDNA sequences from closely related syndermatan species. Amplified starting points were sequenced by dye terminator sequencing and thereafter served as a template for the design of non-degenerate primer molecules for long range PCRs. These long range PCRs to amplify the remaining fractions of the mt genomes were performed using the Long-Amp® Taq DNA-Polymerase (NEB) or the Long PCR Enzyme Mix (Fermentas). Amplicons intended for 454 (Roche) pyrosequencing were purified using the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) and sequenced by AGOWA (Berlin, Germany). Amplicons intended for dye terminator sequencing were digested by Sau3A (Roche) and subsequently cloned into BamHI-digested and dephosphorylated pUC19 plasmid. Recombinant plasmids were isolated with the GeneJET™ Miniprep Kit (Fermentas) and sequenced at StarSEQ GmbH (Mainz, Germany). Resulting sequences were used to start sequencing via primer walking.

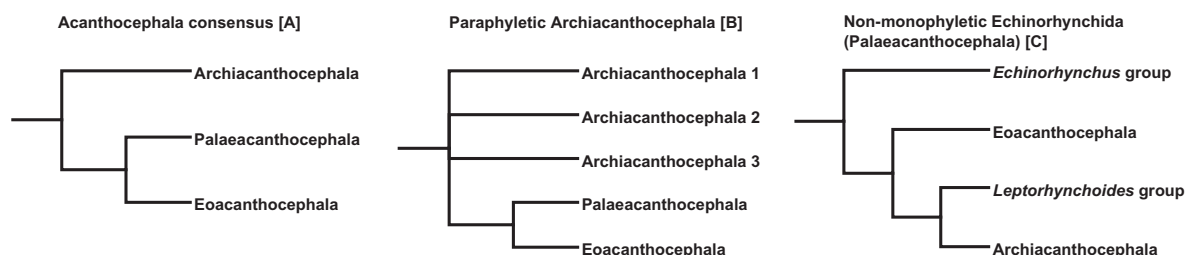


Fig. 1. Hypothetical relationships within Acanthocephala. Phylogenetic tree topologies that have been discussed in the literature. For the relationships within Acanthocephala, most studies (for references see text) support a topology as seen in the consensus (A). Opposing hypotheses are (B) paraphyletic Archiacanthocephala (Monks, 2001) and (C) non-monophyletic Echinorhynchida (Palaeacanthocephala) (Herlyn et al., 2003; see also García-Varela et al., 2002; Near, 2002; Verweyen et al., 2011).

2.3. Annotation

Identification of protein coding genes was performed by BLASTX searches (Altschul et al., 1990), ribosomal RNA genes were located using BLASTN searches. To determine the correct start and end positions of genes, protein coding gene regions were compared with multiple sequence alignments of already annotated orthologous sequences of closely related species. rRNA genes were extended on both sides until reaching the flanking genes. Transfer RNA genes were identified using tRNAscan SE (Lowe and Eddy, 1997), ARWEN (Laslett and Canback, 2008), DOGMA (Wyman et al., 2004), MITOS (<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de>) and by manual search, looking for the anticodon and flanking regions that could form tRNA specific secondary structures.

2.4. Phylogenetic analyses

Derived amino acid sequences of the protein coding genes ($n = 11$, no *atp* subunit sequences were used) were aligned using MAFFT (default parameters; Katoh et al. 2002). Resulting single gene alignments were refined using GBlocks (Castresana, 2000) with low stringency parameters. Subsequently, two supermatrices were produced by concatenating either the raw or the refined alignments (comprising 4157 and 1789 amino acids, respectively). The best fitting substitution models for both supermatrices were determined using ProtTest 2.4 (Abascal et al., 2005) and TreeFinder (Jobb et al., 2004). For the edited dataset, ProtTest selected MtArt (Abascal et al., 2007) with a gamma distribution (+G), a proportion of invariable sites (+I) and empirical base frequencies (+F) as the best fitting substitution model, followed by LG (Le and Gascuel, 2008) and WAG (Whelan and Goldman, 2001), both again with the options +G, +I and +F. For the larger, unedited dataset, LG and WAG were preferred over the MtArt model (each plus the options +I, +G and +F). TreeFinder proposed to use a mixed model for both supermatrices, composed of MtArt, MtMam (Cao et al., 1998) and MtREV (Adachi and Hasegawa, 1996) with different weightings depending on the underlying matrix.

Phylogenetic reconstructions were performed using MrBayes 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003), RAxML 7.2.8 (Stamatakis, 2006) and TreeFinder (Jobb et al., 2004). Since neither the MtArt model nor the LG model is implemented in MrBayes, WAG as the next best available model was used for both supermatrices (again applying options +I, +G and +F). RAxML and TreeFinder were run with the best fitting model according to ProtTest and with the WAG+I+G+F model as in the Bayesian analyses. The mixed model proposed by TreeFinder was applied solely on TreeFinder. The MrBayes analyses were performed using two parallel runs with 10 chains each. Statistical support was achieved by rapid bootstrapping for RAxML (100 replicates, Stamatakis et al., 2008), standard bootstrapping for TreeFinder (100 replicates) and posterior probability values for MrBayes (1,200,000 generations, sample frequency 100, burnin fraction 20%).

3. Results

3.1. General features of the mt genomes

The sizes of the complete mt genomes from *M. hirudinaceus* (14,282 bp; GenBank ID: FR856886), *P. ambiguus* (13,574 bp; GenBank ID: FR856885) and *P. citrina* (14,003 bp; GenBank ID: FR856884) are comparable to those of other syndermatan as well as other spiralian taxa (e.g., Fig. 1 in Gissi et al. (2008)). The sequencing of the mt genome of *E. truttae* could not be fully completed due to the presence of an internal repetitive structure, but the sequence obtained so far already comprises 13,659 bp

(GenBank ID: FR856883). Sequence annotation revealed that only two protein-coding genes (*nd4*, *nd4l*), some tRNA genes and the control region are still missing in the *E. truttae* mtDNA. This leads to an expected final size of approximately 14.5–15 kb, fitting the size range of other acanthocephalan mt genomes. The AT content of the newly sequenced mt genomes was calculated to range between 63.1% and 66.9% for the three acanthocephalan mt genomes and 77.7% for the mt genome of the bdelloid *P. citrina* (Supplementary Table 1). AT-skews are negative and in the same range for all examined taxa. GC-skews are steady and positive for all taxa except *Brachionus plicatilis* (Supplementary Table 1; Suga et al., 2008). As expected for syndermatan taxa (Gissi et al., 2008; Min and Park, 2009), no *atp8* gene was found in any of the presented syndermatan mt genomes. Its loss is also reported from several other, phylogenetically distant taxa, such as Platyhelminthes, Chaetognatha and Nematoda (Gissi et al., 2008). All mt genes in syndermatan taxa are transcribed from one strand, a feature shared again with a broad range of taxa, like, e.g. Platyhelminthes, Tunicata, Brachiopoda, Annelida and Nematoda (Gissi et al., 2008).

3.2. Codon usage

As expected, all syndermatan taxa sequenced use the colloquially called “invertebrate” mitochondrial code. For initiation of translation not only ATG codons are used, as already described for other mt genomes (Wolstenholme, 1992; Supplementary Table 2). For termination of translation, the usage of abbreviated stop codons (TA or T) is common among animal mt genomes (Boore and Brown, 1995 and references therein) and can also be found in the genomes presented in our study (four cases in *M. hirudinaceus*, two in *P. ambiguus*, three in *E. truttae* so far, one in *P. citrina*; Supplementary Table 2). When using complete stop codons, TAA is preferred over TAG in all taxa.

3.3. rRNA and tRNA genes

A comparison of the lengths of the two encoded ribosomal RNA genes can be found in Supplementary Table 3. When compared to most other syndermatan taxa, the extremely short 16S rRNA genes in both bdelloids as well as a rather long 12S rRNA gene in *P. citrina* are remarkable. Except for *B. plicatilis*, the 12S and 16S rRNA genes (*rrns* and *rrnl*, respectively) of syndermatan species are significantly shorter than those of other spiralian and metazoan taxa (usually >700 bp and >1 kb for *rrns* and *rrnl* respectively; see Supplementary Fig. 1). Likewise, the monogonont *B. plicatilis* shows a normal quantity and structure of tRNA genes, while both bdelloid mt genomes sequenced so far possess less tRNA genes than the expected $n = 22$ (Supplementary Table 3). In the four completely sequenced acanthocephalan mt genomes, the number of tRNA genes varies between 21 and 24 (Supplementary Table 3). Both taxa, acanthocephalans and bdelloids, show several remarkably modified tRNA structures. Not less than half of the tRNAs per taxon either have a dihydrouridine (DHU) arm replacement loop or a T Ψ C and variable loop (TV) replacement loop or even both (Supplementary Table 3, Supplementary Figs. 2–5).

3.4. Non-coding regions

In all newly sequenced taxa, the mt genomes contain one to three non-coding regions (NCRs) larger than 200 bp, which partly even exceed 400 bp (Supplementary Table 4). The mt genome of the bdelloid *P. citrina* exhibits 15% NCRs, which is at least double as much as in any acanthocephalan mt genome (Supplementary Table 4, values of *E. truttae* are not taken into account due to their preliminary character). NCR(s) can always be found downstream of

the *nd3* gene in each mt genome (sometimes interrupted or shortened by tRNA genes) and most acanthocephalan taxa exhibit an additional NCR downstream of the *nd1* gene (Fig. 2). The NCRs of acanthocephalans are rather small (300–500 bp), while the NCRs of the bdelloid *P. citrina* span 1.6 kb (Supplementary Table 4).

Within the NCRs of the newly sequenced taxa we identified several open reading frames (ORFs) on both strands of up to 306 bp in length. The location of these ORFs cannot be correlated between the taxa and none of the ORFs revealed significant BLAST hits. Their functionality therefore remains obscure, and even non-functionality cannot be excluded.

Some indications for the NCRs containing the control region were found by analysing the NCR sequences with MFOLD (Zuker, 2003). Adequate stem loop structures were displayed by all large NCRs of all taxa. However, similarly distinct secondary structures can be found in the coding regions of the mt genomes as well, which might be due to the base composition of the mt genomes (high AT content). We therefore cannot conclusively rule out that the stem loop structures in the NCRs occur by chance.

3.5. Gene order

Mitochondrial gene order varies within the syndermatan taxa (Fig. 2). Many tRNA variations can be found even between taxa of the same subgroup. However, the order of protein coding and rRNA genes is consistent within the subgroups Acanthocephala and Bdelloidea. Disregarding the tRNA genes, a conversion between the bdelloidean and the acanthocephalan gene order can

be performed by adjusting the positions of only three genes (*nd3*, *nd1* and *cytb*, Fig. 2). Several blocks of genes are similar between Acanthocephala and Bdelloidea: the segment spanning over *trnN-nd2-cox1-trnG-trnY-rrnL-trnL-nd6-trnD-atp6* is similar in all six species, except for a few additional tRNA genes in individual species and the *trnY* gene in *P. citrina*. Another segment with moderate syntenic conservation (not including tRNA genes) between acanthocephalans and bdelloids is *rrnS-cox2-cox3*.

3.6. Phylogeny

Using different reconstruction algorithms and different molecular datasets (see Section 2.4), eleven out of twelve phylogenetic trees showed a congruent topology (Fig. 3). According to this consensus, Platyhelminthes and Syndermata are monophyletic sister taxa, although with only moderate support in case of Syndermata (BPP 0.96; BS 69–88). With respect to the relationships within Syndermata, the present mt data suggest paraphyly of Eurotatoria. Based on the present taxon sample, *B. plicatilis* (Monogononta) branches off basal within Syndermata, whereas Bdelloidea (*R. rotatoria* + *P. citrina*) and Acanthocephala appear as sister groups, united by a branch with maximum to moderate support, depending on the algorithm and dataset used (BPP 0.92–1.0; BS 65–96).

In all topologies obtained by our analyses, the internal relationships of acanthocephalans are identical and all but one internal node achieved maximum support. Monophyletic Archiacanthocephala, represented by *M. hirudinaceus* and *O. lueheii*, appear as the sister taxon of a clade comprising monophyletic Echinorhynchida

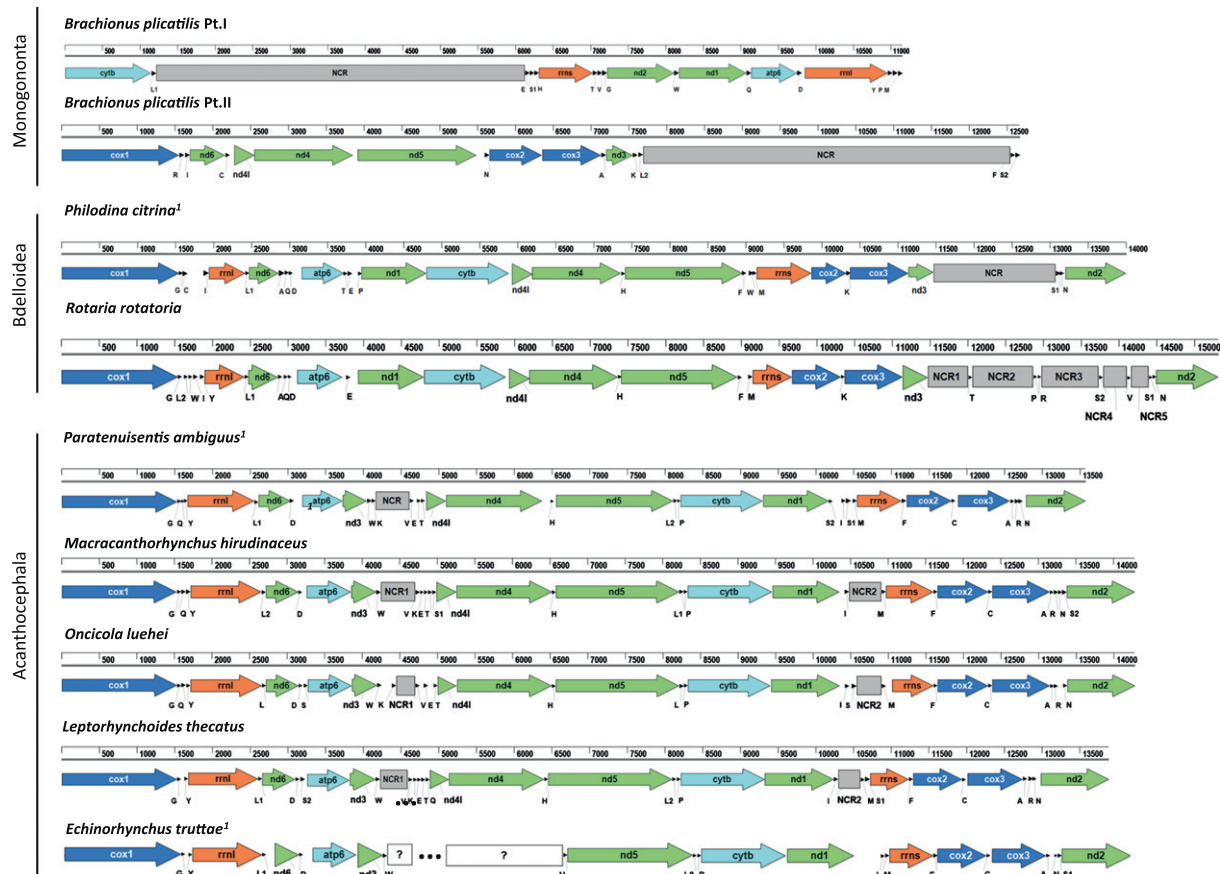


Fig. 2. Gene order in syndermatan mt genomes. The unit of the scale bars is basepairs, arrows indicate the direction of gene transcription. Gene identifier: *rrns/rrnl* = small and large subunit rRNA, *nd1-6,4L* = NADH dehydrogenase subunits 1–6+4L, *cox1-3* = cytochrome c oxidase subunits 1–3, *atp6* = ATP synthase subunit 6, *cytb* = cytochrome b, tRNA genes are labelled according to the one letter amino acid code. Grey boxes symbolize non-coding regions (NCRs), white boxes are sequenced regions without annotation. ¹ = Newly sequenced/presented in this study.

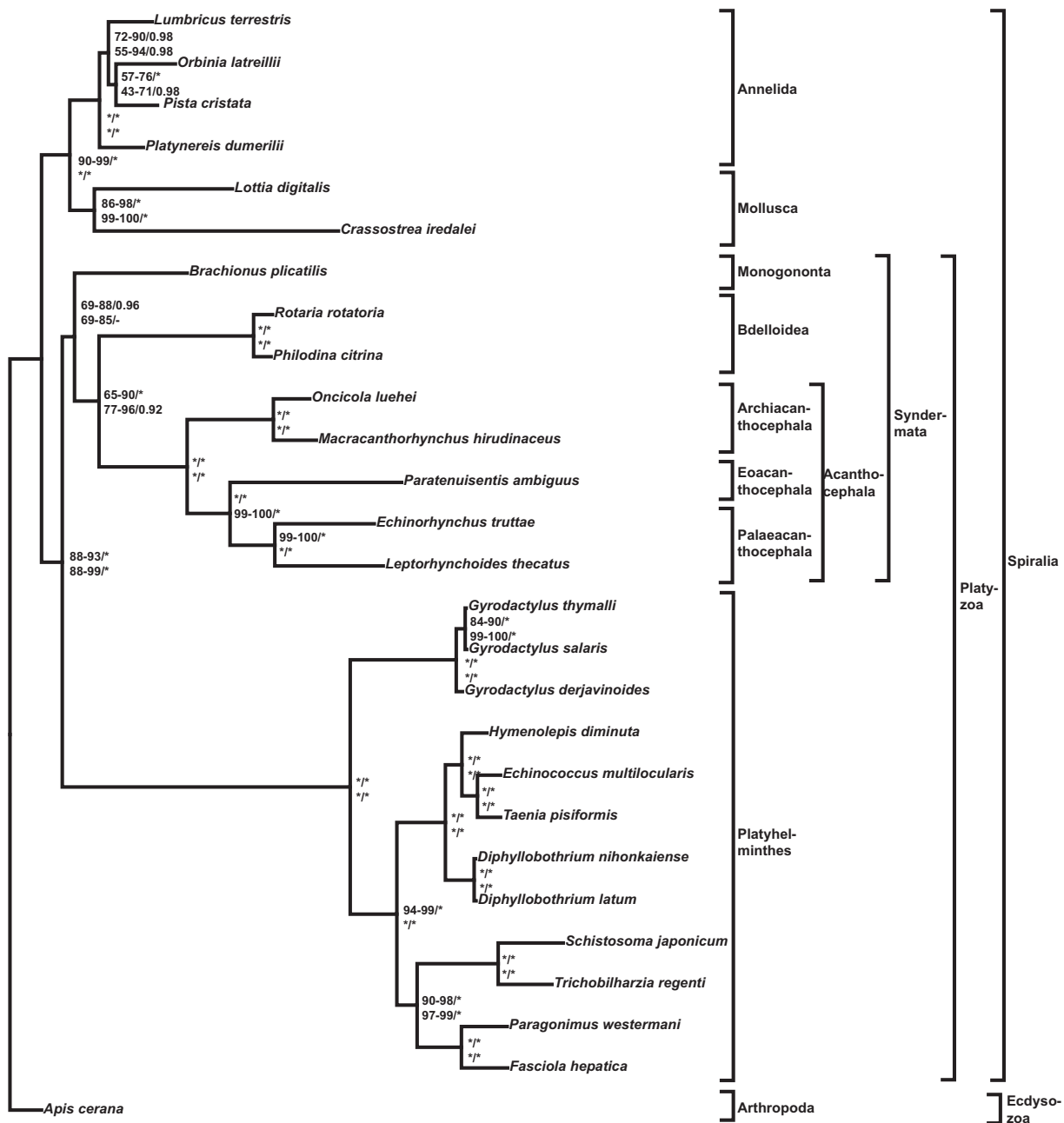


Fig. 3. Phylogeny inferred from mitochondrial protein sequences. The tree shows the topology found in almost all phylogenetic reconstructions based on concatenated data of 11 mitochondrial encoded protein sequences. Reconstructions were performed using TreeFinder, RAXML or Mr. Bayes as well as different models of sequence evolution. Branch lengths are redrawn according to the RAXML analysis of the edited dataset using the mtArt+I+G+F model. Only minimum and maximum support values of our various analyses are denoted (BS/PP) to the right of the corresponding node. Numbers in the upper row represent support values for the dataset edited by GBlocks, those in the lower row were obtained using the raw MAFFT alignments. Asterisk (*) denotes BS = 100 and PP = 1.0.

as representatives of Palaeacanthocephala (*E. truttae* + *L. thecatus*) and the single representative of Eoacanthocephala included in the present sample (*P. ambiguus*).

4. Discussion

4.1. Evolution of sensory organs in the acanthocephalan clade

Before the present study, only two complete acanthocephalan mt genomes were published, namely from the palaeacanthocephalan *L. thecatus* (Steinauer et al., 2005) and the archiacanthocephalan *O. luehei* (Gazi et al., 2012). Data of three additional acanthocephalan

species, each representing a different higher-ranked acanthocephalan taxon, expanded this dataset in the present work. The inferred tree topology (Fig. 3) does not only corroborate previous hypotheses on the syndermatan phylogeny (see below), but also allows for an analysis of the relationships among the three most species-rich acanthocephalan taxa, i.e. Eoacanthocephala, Archiacanthocephala and Palaeacanthocephala, and bears implications for the evolution of lateral sensory organs during acanthocephalan divergence. Regarding the phylogenetic relations between Eo-, Archi-, and Palaeacanthocephala, our results are in line with most previous findings obtained from smaller molecular datasets (Near et al., 1998; Garcia-Varela et al., 2000; Garcia-Varela and Nadler, 2005, 2006), placing monophyletic Archiacanthocephala as sister to a clade

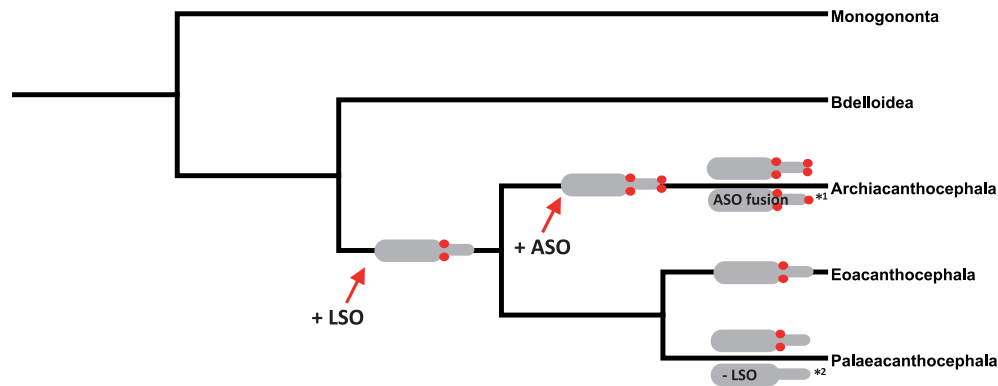


Fig. 4. Gain and loss of morphological traits in acanthocephalan evolution. Morphological features, i.e. lateral sensory organs (LSO) and apical sensory organs (ASO), were mapped onto the mtDNA tree. Grey pictograms symbolise body and proboscis of an acanthocephalan animal, dots symbolise the presence of apical and lateral sensory organs. (For surveys on the character distribution within Acanthocephala, see, e.g., Gee, 1987; Herlyn et al., 2001; Monks, 2001.) *¹ = Probable fusion of the two apical sensory organs in the subgroup Oligacanthorhynchida (von Haffner, 1943; Herlyn et al., 2001). *² = No lateral sensory organs can be found in e.g. *Brentisentis uncinus*, *Plagiorhynchus cylindraceus*, *Acanthocephalus anguillae* and *Pomphorhynchus bulbocollis* (Gee, 1987; Herlyn and Ehlers, 2001; Monks, 2001).

comprising monophyletic Palae- and Eoacanthocephala. On the other hand, morphological synapomorphies of the potential sister groups Palaeacanthocephala and Eoacanthocephala are hard to find. The morphological data matrix of Monks (2001), for instance, postulates only one character state as present in all analyzed palae- and eoacanthocephalans, but absent in all archiacanthocephalans studied (“proboscis cuticle not swollen around the hooks”). However, hooks which could be homologized with the ones of acanthocephalans are absent in bdelloids, monogononts and other acanthocephalan relatives. It is thus difficult to decide whether a “swollen proboscis cuticle around the hooks” is a plesiomorphic or apomorphic character state, compared to the alternative of “proboscis cuticle not swollen around the hooks”.

With regard to the evolution of lateral sensory organs, the topology of our mtDNA tree (Fig. 3) suggests the emergence of these structures in the acanthocephalan stem lineage. The topology furthermore implies a several-fold loss of lateral sensory organs within Palaeacanthocephala, as illustrated by their absence in palaeacanthocephalan species such as *Brentisentis uncinus*, *Plagiorhynchus cylindraceus*, *Acanthocephalus anguillae* and *Pomphorhynchus bulbocollis* (Leotta et al., 1982; Gee, 1987; Herlyn and Ehlers, 2001; Monks, 2001, see Fig. 4). The present findings are furthermore in line with an occasionally questioned monophyletic origin of Archiacanthocephala (see, e.g. Monks, 2001; Fig. 1B). In detail, the two sampled Archiacanthocephala (*M. hirudinaceus*, *O. luehei*), both belonging to the subtaxon Oligacanthorhynchida, form a monophyletic group in our results, whereas the two oligacanthorhynchids in the study of Monks (2001; i.e., *Macracanthorhynchus ingens* and *Oligacanthorhynchus tortuosa*) appeared to be a paraphyletic assemblage. Assuming archiacanthocephalan monophyly, sensory organs at the proboscis apex (apical sensory organs) as described for diverse archiacanthocephalans (for a survey, see Herlyn et al., 2001; Monks, 2001) probably emerged as an evolutionary novelty in the archiacanthocephalan stem lineage. The emergence of apical sensory organs goes along with an increasing complexity of the syncytial support “cell” (more nuclei, more protrusions) as a constituent of lateral and apical sensory organs (Gee, 1987; Herlyn et al., 2001). Although not covered by the present species sampling, the character distribution within archiacanthocephalans suggests that paired apical sensory organs represent the original character state, while an unpaired apical sensory organ as in *M. hirudinaceus* evolved later within archiacanthocephalans (for a survey, see Herlyn et al., 2001; Monks, 2001). The appearance, loss and fusion of complex morphological characters like sensory organs thus occur over comparatively short phylogenetic distances (although we are currently not able to date the radiation

of syndermatan taxa). A similar tendency is illustrated by the potential emergence and secondary reduction or loss of the wheel-organ in syndermatans (Witek et al., 2008) or the loss and re-gain of wings in stick insects (Phasmatodea) (Whiting et al., 2003). As a general notion, such seemingly complex structures appear as rather “volatile” traits during evolution, rendering these characters less suitable for determining phylogenetic relationships.

Despite the progress made here, there are still open questions in acanthocephalan phylogeny. Only few molecular data of Polyacanthocephala are available so far, and therefore it would be desirable to corroborate a close phylogenetic relationship of Eo- and Polyacanthocephala (Garcia-Varela et al., 2002; Garcia-Varela and Nadler, 2006) based on broad-scale molecular data such as mt genomes or transcriptome data. Furthermore, to fully assure archiacanthocephalan monophyly by more comprehensive molecular data, a broader taxon sampling within Archiacanthocephala is necessary.

4.2. Syndermatan phylogeny: Paraphyletic Eurotatoria

The results of the phylogenetic reconstructions presented here support a grouping of acanthocephalans and bdelloids under exclusion of monogononts. This topology was already supported by EST-based phylogenomic studies (Witek et al., 2008, 2009), while work using mt genome data so far either supported (Steinauer et al., 2005; Min and Park, 2009; Gazi et al., 2012) or refused (Podsiadlowski et al., 2009) this topology. Apparently, the inclusion of a second bdelloid species (*P. citrina*) in a broad mt molecular dataset was helpful to confirm eurotatorian paraphyly. On the other hand, data from Seisonidea are needed to unambiguously determine the acanthocephalan sister group.

Additional hints supporting eurotatorian paraphyly can be found in the mitochondrial gene order, which is strikingly similar for bdelloids and acanthocephalans (Section 3.5), while comparing the mt gene order of the monogonont *B. plicatilis* to either bdelloids or acanthocephalans is complicated due to the aberrant organisation of *B. plicatilis* mtDNA in two subgenomes. Still, two patterns in the gene order of the larger (protein coding and rRNA) genes on one of the two subgenomes can be found that are shared between *B. plicatilis* and Bdelloidea (*cox2-cox3-nd3* and *nd4l-nd4-nd5*, Fig. 2). The latter segment can also be found in acanthocephalans and is common amongst other Spiralia (Podsiadlowski et al., 2009). However, the gene order of the other *B. plicatilis* subgenome is utterly mixed up in comparison to the other syndermatan taxa. There are hints from genomic sequence data that the gene order observed in *B. plicatilis* is conserved at least within the genus *Brachionus* (Mark Welch, personal communication). However, this

aberrant organisation and gene order might actually be restricted to single species of the genus *Brachionus*. Hence data on non-*Brachionus* monogonont mt genomes will possibly show a single circular organisation and thereby provide further hints on gene order evolution and position of Monogononta within the syndermatan clade.

5. Conclusions

With the presented dataset we are able to provide strong support from mt DNA for the paraphyly of Eurotatoria, supporting results from recent phylogenomic studies (Witek et al., 2008, 2009; Min and Park, 2009). To further investigate syndermatan phylogeny using mt genome data, the inclusion of the taxon Seisonidea in the dataset is indispensable to determine the sister group of Acanthocephala. Furthermore, it will be essential to investigate more monogonont mt genomes to decide whether the organisation in subgenomes and other special features (e.g. skew values) are species-specific traits or synapomorphic for all monogononts.

The data moreover corroborate a closer phylogenetic relation of Palae- and Eoacanthocephala under exclusion of Archiacanthocephala, which suggests gain and loss events of complex morphological traits such as the lateral sensory organs among the evolution of acanthocephalan worms. To investigate whether Archiacanthocephala are paraphyletic (Monks, 2001) and whether Polyacanthocephala do belong to Eoacanthocephala (García-Varela et al., 2002; García-Varela and Nadler, 2006), a denser taxon sampling and more data of these taxa will be needed in future.

Acknowledgments

This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft grant Ha2103/4 (DFG Priority Project 1174, Deep Metazoan Phylogeny). M.W. and T.H. gratefully acknowledge additional funding by the Center for Computational Sciences (SRFN) of the Johannes Gutenberg-University Mainz. The authors thank two anonymous reviewers for their helpful comments.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2012.09.017>.

References

- Abascal, F., Zardoya, R., Posada, D., 2005. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21, 2104–2105.
- Abascal, F., Posada, D., Zardoya, R., 2007. MtArt: a new model of amino acid replacement for Arthropoda. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1–5.
- Adachi, J., Hasegawa, M., 1996. Model of amino acid substitution in proteins encoded by mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 42, 459–468.
- Adams, K.L., Palmer, J.D., 2003. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29, 380–395.
- Ahlrichs, W., 1995. Ultrastruktur und Phylogenie von *Seison nebaliae* (Grube 1859) und *Seison annulatus* (Claus 1876): Hypothesen zu phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen innerhalb der Bilateria. Cuvillier, Göttingen.
- Ahlrichs, W., 1997. Epidermal ultrastructure of *Seison nebaliae* and *Seison annulatus*, and a comparison of epidermal structures within the Gnathifera. *Zoomorphology* 117, 41–48.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Ax, P., 2003. *Multicellular Animals III: Order in Nature – System Made by Man*. Springer, Berlin.
- Boore, J.L., Brown, W.M., 1995. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the annelid worm *Lumbricus terrestris*. *Genetics* 141, 305–319.
- Boore, J.L., Brown, W.M., 1998. Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 668–674.
- Budziakowski, M.E., Metrick, D.F., 1986. Morphology and function of the support cell and the nerve tracts innervating the presoma of *Moniliformis moniliformis* (Acanthocephala). *Can. J. Zool.* 64, 2801–2810.
- Cao, Y., Janke, A., Waddell, P.J., Westerman, M., Takenaka, O., Murata, S., Okada, N., Pääbo, S., Hasegawa, M., 1998. Conflict among individual mitochondrial proteins in resolving the phylogeny of eutherian orders. *J. Mol. Evol.* 47, 307–322.
- Castresana, J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17, 540–552.
- Dunagan, T.T., Bozzola, J.J., 1989. Fine Structure of Anterior Terminus of Apical Sense Organ in *Macracanthorhynchus hirudinaceus* (Acanthocephala). *J. Parasitol.* 75, 297–302.
- Fontaneto, D., Jondelius, U., 2011. Broad taxonomic sampling of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I does not solve the relationships between Rotifera and Acanthocephala. *Zool. Anz.* 250, 80–85.
- García-Varela, M., Nadler, S.A., 2005. Phylogenetic relationships of Palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences. *J. Parasitol.* 91, 1401–1409.
- García-Varela, M., Nadler, S.A., 2006. Phylogenetic relationships among Syndermata inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 40, 61–72.
- García-Varela, M., Perez-Ponce de Leon, G., de la Torre, P., Cummings, M.P., Sarma, S.S., Laclette, J.P., 2000. Phylogenetic relationships of Acanthocephala based on analysis of 18S ribosomal RNA gene sequences. *J. Mol. Evol.* 50, 532–540.
- García-Varela, M., Cummings, M.P., Perez-Ponce de Leon, G., Gardner, S.L., Laclette, J.P., 2002. Phylogenetic analysis based on 18S ribosomal RNA gene sequences supports the existence of class Polyacanthocephala (Acanthocephala). *Mol. Phylogenet. Evol.* 23, 288–292.
- Gazi, M., Sultana, T., Min, G.-S., Park, Y.C., García-Varela, M., Nadler, S.A., Park, J.-K., 2012. The complete mitochondrial genome sequence of *Oncicola luehei* (Acanthocephala: Archiacanthocephala) and its phylogenetic position within Syndermata. *Parasitol. Int.*
- Gee, R.J., 1987. A comparative morphological study of the stützelle (support cell) in the phylum Acanthocephala. *Can. J. Zool.* 65, 660–668.
- Gissi, C., Iannelli, F., Pesole, G., 2008. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity* 101, 301–320.
- Harada, I., 1931. Das Nervensystem von *Bolbosoma turbinella* (Diesing.). *Jpn. J. Zool.* 3, 161–199.
- Herlyn, H., 2001. First description of an apical epidermis cone in *Paratenuisentis ambiguus* (Acanthocephala: Eoacanthocephala) and its phylogenetic implications. *Parasitol. Res.* 87, 306–310.
- Herlyn, H., Ehlers, U., 2001. Organisation of the praesoma in *Acanthocephalus anguillae* (Acanthocephala, Palaeacanthocephala) with special reference to the muscular system. *Zoomorphology* 121, 13.
- Herlyn, H., Martini, N., Ehlers, U., 2001. Organisation of the praesoma of *Paratenuisentis ambiguus* (Van Cleave, 1921) (Acanthocephala: Eoacanthocephala), with special reference to the lateral sense organs and musculature. *Syst. Parasitol.* 50, 105–116.
- Herlyn, H., Piskurek, O., Schmitz, J., Ehlers, U., Zischler, H., 2003. The syndermatan phylogeny and the evolution of acanthocephalan endoparasitism as inferred from 18S rDNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26, 155–164.
- Huang, A.M., Rehm, E.J., Rubin, G.M., 2009. Recovery of DNA sequences flanking P-element insertions in *Drosophila*: inverse PCR and plasmid rescue. *Cold Spring Harb Protoc* 2009, pdb prot5199.
- Hur, J.H., Van Doninck, K., Mandigo, M.L., Meselson, M., 2009. Degenerate tetraploidy was established before bdelloid rotifer families diverged. *Mol. Biol. Evol.* 26, 375–383.
- Jobb, G., von Haeseler, A., Strimmer, K., 2004. TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol. Biol.* 4, 18.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T., 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30, 3059–3066.
- Laslett, D., Canback, B., 2008. ARWEN: a program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences. *Bioinformatics* 24, 172–175.
- Le, S.Q., Gascuel, O., 2008. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1307–1320.
- Leotta, S.H., Schmidt, G.D., Kuntz, R.E., 1982. *Brentisentis uncinus* gen. et sp. n. and *Gorgorhynchus satoi* (Morisita 1937) Yamaguti 1963 from Taiwan. *J. Parasitol.* 68, 134–137.
- Lowe, T.M., Eddy, S.R., 1997. TRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 25, 955–964.
- Mark Welch, D.B., Meselson, M., 2000. Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science* 288, 1211–1215.
- Mark Welch, D.B., personal communication.
- Medoc, V., Beisel, J.N., 2008. An acanthocephalan parasite boosts the escape performance of its intermediate host facing non-host predators. *Parasitology* 135, 977–984.
- Meyer, A., 1933. Acanthocephala. In: Dr. H.G. Bronns Klassen und Ordnungen des Tierreichs 4 (2/2). Akademische Verlagsgesellschaft mbH, Leipzig.
- Min, G.S., Park, J.K., 2009. Eurotatoria paraphyly: revisiting phylogenetic relationships based on the complete mitochondrial genome sequence of *Rotaria rotatoria* (Bdelloidea: Rotifera: Syndermata). *BMC Genomics* 10, 533.
- Monks, S., 2001. Phylogeny of the Acanthocephala based on morphological characters. *Syst. Parasitol.* 48, 81–116.
- Near, T.J., 2002. Acanthocephalan phylogeny and the evolution of parasitism. *Integr. Comp. Biol.* 42, 668–677.
- Near, T.J., Garey, J.R., Nadler, S.A., 1998. Phylogenetic relationships of the Acanthocephala inferred from 18S ribosomal DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 10, 287–298.

- Petrochenko, V.I., 1956. Acanthocephala of Domestic and Wild Animals I. Academy of Sciences of the USSR, Moskau. Translated from Russian by Blake, Z., Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem.
- Petrochenko, V.I., 1958. Acanthocephala of Domestic and Wild Animals II. Academy of Sciences of the USSR, Moskau. Translated from Russian by Blake, Z., Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem.
- Piscart, C., Webb, D., Beisel, J.N., 2007. An acanthocephalan parasite increases the salinity tolerance of the freshwater amphipod *Gammarus roeseli* (Crustacea: Gammaridae). *Naturwissenschaften* 94, 741–747.
- Podsiadlowski, L., Braband, A., Struck, T.H., von Dohren, J., Bartolomaeus, T., 2009. Phylogeny and mitochondrial gene order variation in Lophotrochozoa in the light of new mitogenomic data from Nemertea. *BMC Genomics* 10, 364.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HP: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688–2690.
- Stamatakis, A., Hoover, P., Rougemont, J., 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Syst. Biol.* 57, 758–771.
- Steinauer, M.L., Nickol, B.B., Broughton, R., Orti, G., 2005. First sequenced mitochondrial genome from the phylum Acanthocephala (*Leptorhynchoides thecatus*) and its phylogenetic position within Metazoa. *J. Mol. Evol.* 60, 706–715.
- Suga, K., Mark Welch, D.B., Tanaka, Y., Sakakura, Y., Hagiwara, A., 2008. Two circular chromosomes of unequal copy number make up the mitochondrial genome of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1129–1137.
- Sures, B., 2004. Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. *Trends Parasitol.* 20, 170–177.
- Sures, B., Radszuweit, H., 2007. Pollution-induced heat shock protein expression in the amphipod *Gammarus roeseli* is affected by larvae of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala). *J. Helminthol.* 81, 191–197.
- Van Cleave, H.J., Bullock, W.L., 1950. Morphology of *Neoechinorhynchus emydis*, a typical representative of the Eoacanthocephala. I. The praesoma. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 69, 288–308.
- Verwey, L., Klimpel, S., Palm, H.W., 2011. Molecular phylogeny of the Acanthocephala (class Palaeacanthocephala) with a paraphyletic assemblage of the orders Polymorphida and Echinorhynchida. *PLoS ONE* 6, e28285.
- von Haffner, K., 1943. Die Sinnesorgane an der Rüsselspitze von Acanthocephalen. *Z. Morphol. Oekol. Tiere* 40, 80–92.
- Whelan, S., Goldman, N., 2001. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* 18, 691–699.
- Whiting, M.F., Bradler, S., Maxwell, T., 2003. Loss and recovery of wings in stick insects. *Nature* 421, 264–267.
- Witek, A., Herlyn, H., Meyer, A., Boell, L., Bucher, G., Hankeln, T., 2008. EST based phylogenomics of Syndermata questions monophyly of Eurotatoria. *BMC Evol. Biol.* 8, 345.
- Witek, A., Herlyn, H., Ebersberger, I., Mark Welch, D.B., Hankeln, T., 2009. Support for the monophyletic origin of Gnathifera from phylogenomics. *Mol. Phylogenet. Evol.* 53, 1037–1041.
- Wolstenholme, D.R., 1992. Genetic novelties in mitochondrial genomes of multicellular animals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2, 918–925.
- Wyman, S.K., Jansen, R.K., Boore, J.L., 2004. Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA. *Bioinformatics* 20, 3252–3255.
- Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406–3415.

2.2 Platyzoan mitochondrial genomes

Veröffentlicht in Molecular Phylogenetics and Evolution (2013)

Band 69, Ausgabe 2, Seiten 365-375

2.2.1 Kurzbeschreibung (deutsche Übersetzung)

Platyzoa beschreibt ein mutmaßliches Subtaxon der Lophotrochozoa (Spiralia) innerhalb des Protostomia-Teils der Metazoa und beinhaltet eine Reihe biologisch mannigfaltiger, meist kleiner und wurmförmiger Tiere. Über die Monophylie der Platyzoa, die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den vermeintlichen Subtaxa Platyhelminthes, Gastrotricha und Gnathifera (letzteres beinhaltet zumindest Gnathostomulida, „Rotifera“ und Acanthocephala) sowie einige Aspekte der internen Phylogenie dieser Subtaxa wird in hohem Maße diskutiert. Hier wird besprochen, inwiefern Daten vollständiger mitochondrialer (mt) Genome zu diesen Diskussionen beitragen. Es werden Besonderheiten der mitochondrialen Genome herausgestellt und Probleme mit mtDNA basierten Phylogenien diskutiert. Daten mitochondrialer Genome scheinen ungeeignet zur Klärung der Stellung der Platyzoa innerhalb der Spiralia zu sein, können jedoch bei internen phylogenetischen Fragestellungen helfen. Die vorliegende Arbeit beinhaltet eine tabellarische Bestandsaufnahme aller publizierter mt Genome der Platyzoa.

2.2.2 Geleistete Beiträge zu dieser Publikation

- Durchführung der Literaturrecherchen
- Auswertung und teilweise Re-Annotation der mt-Daten aus der NCBI-Datenbank
- Schreiben des Manuskripts sowie Erstellung der Abbildungen



Review

Platyzoan mitochondrial genomes

Alexandra R. Wey-Fabrizius^a, Lars Podsiadlowski^b, Holger Herlyn^c, Thomas Hankeln^{a,*}^a*Institute of Molecular Genetics, Johannes Gutenberg-University Mainz, J.J. Becherweg 30a, D-55099 Mainz, Germany*^b*Institute of Evolutionary Biology and Ecology, University of Bonn, Bonn, Germany*^c*Institute of Anthropology, Johannes Gutenberg-University Mainz, Colonel-Kleinmann-Weg 2, D-55099 Mainz, Germany*

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 26 December 2012

Keywords:

Platyhelminthes

Gastrotricha

Gnathifera

Syndermata

Rotifera

Acanthocephala

ABSTRACT

Platyzoa is a putative lophotrochozoan (spiralian) subtaxon within the protostome clade of Metazoa, comprising a range of biologically diverse, mostly small worm-shaped animals. The monophyly of Platyzoa, the relationships between the putative subgroups Platyhelminthes, Gastrotricha and Gnathifera (the latter comprising at least Gnathostomulida, “Rotifera” and Acanthocephala) as well as some aspects of the internal phylogenies of these subgroups are highly debated. Here we review how complete mitochondrial (mt) genome data contribute to these debates. We highlight special features of the mt genomes and discuss problems in mtDNA phylogenies of the clade. Mitochondrial genome data seem to be insufficient to resolve the position of the platyzoan clade within the Spiralia but can help to address internal phylogenetic questions. The present review includes a tabular survey of all published platyzoan mt genomes.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	366
1.1. Biological and morphological features of the animals	366
1.1.1. Gastrotricha	366
1.1.2. Platyhelminthes	366
1.1.3. Gnathifera	367
1.2. Platyzoa in the metazoan tree of life	367
1.3. Composition of platyzoan subgroups	367
2. The mitochondrial genome record of platyzoan taxa	368
2.1. Data availability	368
2.2. Special features of platyzoan mitochondrial genomes	368
2.2.1. Size, architecture and gene repertoire	368
2.2.2. Base composition, strand asymmetry, genetic code and codon usage	369
2.3. Gene order	369
3. Phylogeny of Platyzoa	371
3.1. Position of Platyzoa in the metazoan tree of life	371
3.2. Internal phylogeny of Syndermata	372
3.3. Internal phylogeny of Platyhelminthes	372
3.4. Suitability of mt genome data for reconstructing the platyzoan phylogeny	373
3.5. Potential causes for the non-spiralian positions of the platyzoan subgroups in the large context of metazoan relationships	373
Acknowledgments	373
References	373

* Corresponding author.

E-mail addresses: wey@uni-mainz.de (A.R. Wey-Fabrizius), lars@cgae.de (L. Podsiadlowski), herlyn@uni-mainz.de (H. Herlyn), hankeln@uni-mainz.de (T. Hankeln).

1. Introduction

1.1. Biological and morphological features of the animals

The metazoan taxon Platyzoa comprises Gastrotricha (hairly backs), Platyhelminthes (flatworms) and Gnathifera (Cavalier-Smith, 1998). Many of the platyzoan species are small, worm-shaped and either pseudo- or acoelomate (Giribet, 2008; Fig. 1). As far as they are free-living, platyzoans develop directly. Acanthocephala (thorny-headed worms), which belong to Gnathifera, and Neodermata belonging to Platyhelminthes have convergently evolved a parasitic lifestyle with larval stages. The age of the clade has not yet been determined, since no traces of platyzoan taxa have been found in the palaeozoic fossil record. This is most likely due to the fact that, apart from the pharyngeal hard parts of gnathiferans, no hard parts are present in Platyzoa. Alternatively, but less likely, their occurrence may postdate the emergence of all other major animal taxa (Giribet, 2008).

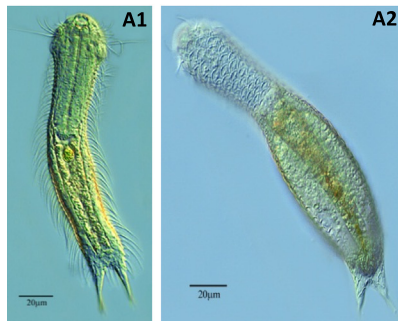
1.1.1. Gastrotricha

Gastrotricha are small meiobenthic worm- or cone-shaped animals that occur with high abundances in freshwater as well as in marine and brackish environments. Their body including the dorsal surface is covered with cilia, which is why they are called “hairly backs” (Fig. 1(A1) and (A2)). Their paired terminal appendices bear characteristic cement glands which serve in adhesion. Gastrotrichs are eutelic and reproduce either parthenogenetically or sexually. Currently, more than 700 species are known to science. Additional species descriptions will likely follow considering that 14 species have recently been described by Hummon (2011).

1.1.2. Platyhelminthes

Platyhelminthes comprise the paraphyletic free-living “Turbellaria” (about 4500 species) and the above-mentioned Neodermata. The latter group includes the three parasitic taxa Cestoda (tapeworms; about 3500 species), Trematoda (flukes; about 20,000 species) and Monogenea (about 1000 species). Most of the “turbellarian” representatives are free-living hermaphrodites preying on small animals or feeding on death organic matter. They live in water or in shaded, humid terrestrial environments and some of them are strikingly colored (Fig. 1(B1)). Many of the neodermatan parasites are highly relevant for husbandry and human health (Littlewood et al., 1999; Valles and Boore, 2006). For example, flukes of the genus *Schistosoma* (Fig. 1(B2)) cause Schistosomiasis, a disease that affects over 207 million people worldwide (Gryseels, 2012; see www.unhco.org). Moreover, larvae of the tapeworm genus *Echinococcus* (Fig. 1(B3)) can infect humans, causing Echinococcosis: after egg ingestion by the host, larvae are released which penetrate the intestinal wall and move through the circulatory system into different organs where they develop into cysts (Brunetti and White, 2012). One prominent character of adult tapeworms is their anterior attachment organ called scolex which enables the worms to adhere to the inner surface of the host's intestine. Adult cestodes generate typical proglottids, successive hermaphroditic segments that are released from the remainder body once they are mature, i.e. filled with eggs. The detached proglottids are capable of active movements and are excreted via feces. Complex life cycles including secondary and definite hosts, can be observed in tapeworms and especially in flukes, where a typical lifecycle comprises six stages (eggs, miracidia, sporocysts, rediae, cercariae, and adults). In contrast to that, monogeneans are external parasites without intermediate hosts.

[A] Gastrotricha



[B] Platyhelminthes



[C] Gnathifera

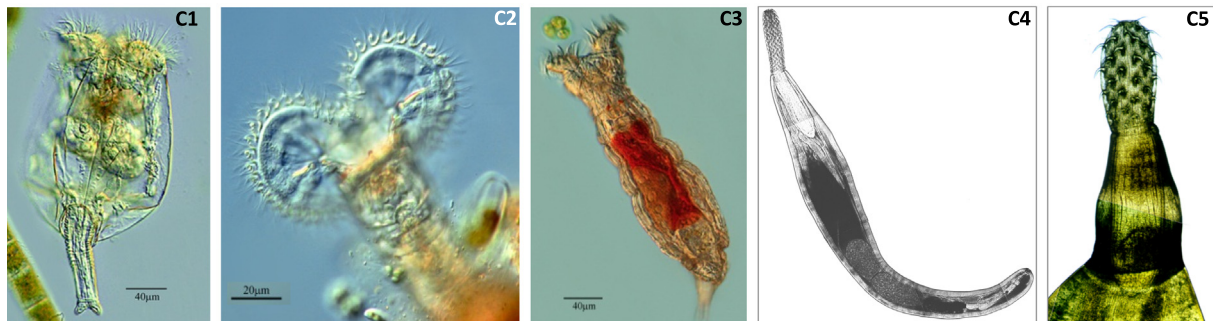


Fig. 1. Exemplary pictures of Platyzoan taxa illustrating the bauplan diversity. Pictures of animals representing the platyzoan taxa Gastrotricha (A1–2), Platyhelminthes (B1–3) and Gnathifera (C1–5). A1: *Chaetonotus maximus*; A2: *Chaetonotus bisacer*; B1: *Pseudoceros ferrugineus* (“Turbellaria”); B2: *Schistosoma mansoni*, male and female (Trematoda); B3: *Echinococcus granulosus* (Cestoda); C1: *Brachionus* (Syndermata – Monogononta); C2: *Limnias* (Syndermata–Monogononta); C3: *Philodina* (Syndermata–Bdelloidea); C4: *Paratenuisentis ambiguus*, male (Syndermata–Acanthocephala); C5: praesoma and anterior trunk of *Acanthocephalus anguillae*, female (Syndermata–Acanthocephala). Pictures A1, A2, C1, C2 and C3 by Antonio Guillén (www.flickr.com/people/microagua); picture B1 by Bernard Dupont (www.flickr.com/people/berniedup/); picture B2 by Marc Perkins (www.marcperkins.net); picture B3 by Steve J. Upton (Kansas State University; www.k-state.edu/biology); pictures C5 and C6 by Holger Herlyn.

1.1.3. Gnathifera

The monophyly of the third platyzoan taxon, Gnathifera, has been inferred from ultrastructural (pharyngeal jaws with supportive rods) and molecular data (e.g. Ahlrichs, 1995; Herlyn and Ehlers, 1997; Kristensen and Funch, 2000; Kristensen, 2002; Witek et al., 2009). The taxon Gnathifera was originally assumed to comprise Syndermata (Acanthocephala and traditional “Rotifera”) and Gnathostomulida (Ahlrichs, 1997). The recently discovered Micrognathozoa as well as Cycliophora may represent additional members of this clade (Winneppenninckx et al., 1998; Kristensen and Funch, 2000; Kristensen, 2002; Giribet et al., 2004; see 1.3).

1.1.3.1. Syndermata (or Rotifera including Acanthocephala). As mentioned above, the monophylum Syndermata comprises “thorny-headed worms” (Acanthocephala; ≥ 1000 described species) and traditional “wheel animals” (“Rotifera”), which again include Bdelloidea (about 400 described species), Monogononta (about 1500 described species), and Seisonidea (four described species). The name “Syndermata” refers to an evolutionary novelty of the group, i.e. a syncytial epidermis with a particular ultrastructure (Ahlrichs, 1995, 1997). The syndermatan taxa comprise species with very different lifestyles: The vast majority of bdelloids and monogononts are free-living (e.g., Ax, 2003), while seisonids live epizoically on leptostracan crustaceans of the genus *Nebalia* (Sørensen et al., 2005). The free-living species possess a ciliated corona (“wheel-organ”) at their apical end which enables them to swim and whirl food particles into their pharynx (Fig. 1(C1–3)). This organ is less developed in seisonids that include ectoparasites such as *Paraseison* (formerly *Seison*) *annulatus* that presumably feed on their host’s hemolymph (Sørensen et al., 2005). Acanthocephalans are distinguished from other syndermatans by an obligate endoparasitic lifestyle including an arthropod intermediate and vertebrate definite hosts (e.g. Near, 2002; Herlyn et al., 2003). Some species additionally use paratenic hosts (e.g. Skuballa et al., 2010). Probably due to their lifestyle, acanthocephalans lack a corona, but instead possess a retractable proboscis with hooks, which anchor the worms to the host’s intestinal wall (Fig. 1(C4) and (C5)). In addition, no digestive system, and therefore no pharyngeal hard parts are present in acanthocephalans (for the basal pattern of Acanthocephala, see, e.g. Herlyn and Ehlers, 2001; Monks, 2001).

Recent studies revealed many interesting biological features of syndermatans. Bdelloids, for example, possess a degenerate tetraploid genome with a very effective DNA repair system (Hur et al., 2009), which renders them rather resistant to ionizing radiation (Gladyshev and Meselson, 2008). Moreover, the ability of anhydrobiosis enables bdelloids to withstand desiccation (Marotta et al., 2010). It is also remarkable that Bdelloids obtained many genes via horizontal gene transfer (Gladyshev et al., 2008), a mechanism documented for only a few metazoan species so far. Besides that, their obligate parthenogenetic lifestyle and easy cultivation make bdelloids invaluable model organisms for evolutionary biologists investigating the evolutionary consequences of parthenogenesis (Mark Welch and Meselson, 2000; Fussmann, 2010). On the other hand, Acanthocephalans have been shown to accumulate a range of heavy metals which renders them most sensitive indicators for ecotoxicological studies not only in aquatic, but also in terrestrial biotopes (reviewed in Sures (2004)). In addition, acanthocephalan intermediate stages (“acanthellae”) are seemingly able to increase infection rates of definite hosts by manipulating gene expression and behavior of their intermediate hosts (e.g. Piscart et al., 2007; Sures and Radszuweit, 2007; Medoc and Beisel, 2008).

1.1.3.2. Gnathostomulida. Gnathostomulida belong to the interstitial meiobenthos. They can be found in sediments with extremely low oxygen concentrations and even tolerate reducing conditions (Powell and Bright, 1981). The about 100 described species possess

pharyngeal hard parts with supportive rods, as hypothesized for the gnathiferan basal pattern (=ground pattern; e.g. Herlyn and Ehlers, 1997). Locomotion of gnathostomulids is actually a gliding resulting from beating cilia (all epithelia are monociliate). Gnathostomulids are hermaphrodites with a direct development and exhibit a complex reproductive system (Kristensen, 2002; Sørensen et al., 2006).

1.1.3.3. Micrognathozoa. Animals of the single described species of Micrognathozoa, *Limnognathia maerski*, live epiphytic on water mosses (from a cold spring in West Greenland). Ventral ciliation and an adhesive pad at the posterior end enable the animals to crawl, swim and attach. It is suspected that all adult animals are parthenogenetic females, since only specimens with a female reproductive system were found. SEM examinations further revealed an extraordinarily complicated jaw apparatus (Kristensen and Funch, 2000).

1.1.3.4. Cycliophora. Cycliophorans live epizoically on the mouthparts of marine decapods (lobsters). These microscopic animals exhibit a commensal lifestyle (Funch et al., 2008), which gave rise to the name “Symbion” for the single genus known to science (Funch and Kristensen, 1995). Only two species have been described (*S. pandora*, *S. americanus*), but population genetic analyses pointed towards a third species (Obst et al., 2005). Cycliophorans possess an adhesive disc at their posterior end, which is used by the sessile feeding stage to attach themselves to their host. The complex and unique life cycle of cycliophorans consists of an asexual and a sexual generation, and includes several internal budding steps and sessile as well as free-living stages that swim actively (Kristensen, 2002). A recent study detected an unknown endosymbiont throughout the body of the female (Neves et al., 2012). Another one reported an extraordinarily high complexity in dwarf males albeit very low cell numbers (Neves et al., 2009).

1.2. Platyzoa in the metazoan tree of life

The question for the platyzoan monophyly as well as the position of individual platyzoan taxa within the metazoan tree of life is not fully resolved (Edgecombe et al., 2011). Gastrotrichs, for example, were placed at various positions over time (see Todaro et al., 2011 and references therein), amongst others as close relatives of Nematoda (roundworms) and other ecdysozoan taxa. However, most authors now regard gastrotrichs as members of the spiralian clade within the metazoan tree (Winneppenninckx et al., 1995; Littlewood et al., 1998; Giribet et al., 2000; Todaro et al., 2006; Petrov et al., 2007). In line with this, recent phylogenomic studies using EST data (Dunn et al., 2008; Hejnol et al., 2009; Paps et al., 2009a; Witek et al., 2009) confirm a position of gastrotrichs within Spiralia. Another example are Gnathostomulida, whose exact placement in the metazoan tree of life has been debated for many years (see Sørensen et al., 2006, and references therein). The ultrastructural composition of the pharyngeal hard parts including jaws suggests that gnathostomulids are close relatives of bdelloids, monogononts and seisonids (and acanthocephalans) (Rieger and Tyler, 1995), a conclusion that lately got support from phylogenomic analyses (Witek et al., 2009).

1.3. Composition of platyzoan subgroups

Besides the unsettled placement of platyzoan taxa within the metazoan tree of life, the composition of some platyzoan subgroups is still under debate. Acoelomorpha, for instance, were originally included in monophyletic Platyhelminthes that again were regarded as basally branching bilaterians (see Olson and Tkach, 2005, and references therein). However, several molecular analyses

(based on e.g. myosin II, rRNA, EST data, microRNA and mt genome data) questioned the inclusion of Acoelomorpha into Platyhelminthes and strongly suggested that acoelomorphs represent basally branching bilaterians instead of basally branching platyhelminths (Ruiz-Trillo et al., 1999, 2002; Telford et al., 2003; Ruiz-Trillo et al., 2004; Philippe et al., 2007; Sempere et al., 2007; Egger et al., 2009; Mwinyi et al., 2010). In line with this, acoelomorphs are distinguished from platyhelminths by a limited set of Hox genes (Cook et al., 2004) and a deviant mitochondrial codon usage (Telford et al., 2000) and may actually be closer related to *Xenoturbella* and Deuterostomia (Philippe et al., 2011). On the other hand, acoelomorphs might share a unique stem cell system with rhabdioran flatworms which points again to their inclusion within traditional Platyhelminthes (Egger et al., 2009).

Gnathostomulida represent another example for a taxon that was originally regarded as a platyhelminth subtaxon (Ax, 1956), but has been recognized as a separate taxon for more than 40 years (Riedl, 1969). Due to the already mentioned ultrastructural composition of the pharyngeal hard parts, Gnathostomulida are now regarded as members of the monophylum Gnathifera. The monophyly of such Gnathifera (Gnathostomulida + Syndermata) gained support from different kinds of morphological (Ahlich, 1997; Herlyn and Ehlers, 1997) as well as molecular data in more recent studies (Giribet et al., 2000, 2004; Witek et al., 2009). However, the comprehensiveness of Gnathifera is still debated with regard to several other taxa that show affinities to gnathiferans (see Sørensen et al., 2006, and references therein). Due to ultrastructural similarities, the jaw apparatus of micrognathozoans is regarded as homologous to the jaws of monogononts, bdelloids, seisonids and gnathostomulids (Kristensen, 2002), leading to the inclusion of Micrognathozoa in Gnathifera. In addition, some aspects of reproduction seem to be similar to those of monogonont species (thin-walled, rapidly developing eggs and thick-walled resting eggs, see e.g. Gilbert, 1974). Sequence data (of one mitochondrial and three nuclear markers) could neither support nor reject the inclusion of Micrognathozoa in the gnathiferan clade (Giribet et al., 2004). Nuclear as well as mitochondrial data pointed to a close relationship of Cycliophora to Gnathifera (Winneppinckx et al., 1998; Giribet et al., 2004). These animals originally were thought to be closely related to Ectoprocta (also Bryozoa or moss animals) and Entoprocta, also called Kamptozoa (Funch and Kristensen, 1995; Funch, 1996; Zrzavy et al., 1998; Sørensen et al., 2000). However, the position of cycliophorans remains ambiguous since more recent molecular analyses (using nuclear and mitochondrial markers as well as EST data) again gave evidence for entoproct affinities (Hejnol et al., 2009; Paps et al., 2009b; Fuchs et al., 2010).

2. The mitochondrial genome record of platyzoan taxa

2.1. Data availability

Out of the platyzoan taxa complete mt genomes are available only for Platyhelminthes and Gnathifera, but not the Gastrotricha (Table 1).

The parasitic flatworm taxa Cestoda, Trematoda, and Monogenea are well represented by mt genome data (22 tapeworm species, 10 fluke species, and 9 monogenean species), while only a single mt genome of a free-living platyhelminth species ("Turbellaria") has been completely sequenced (*Dugesia japonica*, a representative of Seriata). However, additionally a partial mt genome sequence of a "turbellarian" species (*Microstomum lineare*, a representative of Macrostomophora; sequence length 6881 bp) is available, too (Ruiz-Trillo et al., 2004). Among the trematodes, mt genomes are available from Digenea, but not yet from Aspidogastrea. The sampling within the cestodes is rather comprehensive, but not representative for all subtaxa. Only two out of 16 subtaxa

from the Eucestoda (characterized by hexacanth larvae) are covered, while the other two monophyletic taxa within Cestoda, Gyrocotylidae and Amphilinidae (which all share decacanth larvae as a plesiomorphic character inherited from the basal pattern of Cestoda), are not covered at all (see Ax, 1996 for data on larval hook number).

Among Gnathifera, the only group with complete mt genome data available is the Syndermata. Within Syndermata, there are eight completely sequenced mt genomes available in GenBank. Monogononta, Bdelloidea, and three of the four major subtaxa of Acanthocephala are thus covered. Still missing are mt genomes of Seisonidea and Polyacanthocephala. Despite the fact that there is a quite reasonable coverage of subgroups within Syndermata, it appears desirable to produce more than one mt genome per subgroup, e.g. in order to examine whether all monogononts have a mt genome made of two rings like *Brachionus plicatilis* (Suga et al., 2008) or to make sure that gene order differences are taxon-specific traits (see below the case of Asian vs. African *Schistosoma*). Recently, the mt genomes of some more bdelloids (*Adineta vaga* and six strains of *Macrotrachela quadricornifera*) were sequenced, but unfortunately only the protein-coding sequences were submitted to GenBank (Lasek-Nesselquist, 2012).

2.2. Special features of platyzoan mitochondrial genomes

2.2.1. Size, architecture and gene repertoire

Size and gene composition of platyzoan mt genomes are similar to that of other eumetazoan taxa (13–16 kb, ~37 genes). Compared to some other metazoan groups, the size variation in Platyhelminthes mt genomes is relatively small (approx. 14 kb ± 1 kb), and the same can be seen for most syndermatan taxa (Gissi et al., 2008; Lasek-Nesselquist, 2012; Weber et al., 2013).

All but one platyzoan mt genome sequenced so far are composed of one circular molecule each. The only exception is the mt genome of the monogonont *B. plicatilis* whose mt genome is made up of two rings (Suga et al., 2008) totaling 23.8 kb. In all platyzoan mt genomes sequenced so far, all genes are located on only one of the two strands per circular molecule (Gissi et al., 2008; Weber et al., 2013). This extreme gene strand asymmetry is a feature shared by a few distantly related taxa (such as Nematoda, Annelida (ringed worms) and Tunicata) while the mitochondrial genes of many other taxa are distributed on both strands (Gissi et al., 2008).

All platyzoan mt genomes described so far appear to lack the *atp8* gene (Le et al., 2002a; Gissi et al., 2008; Lasek-Nesselquist, 2012; Weber et al., 2013). In fact there were putative *atp8* genes annotated for some platyzoan mt genomes (Lavrov and Brown, 2001; Steinauer et al., 2005), but careful re-examination of these annotations by Gissi et al. (2008) suggested them to be misinterpretations. However, ATPase genes seem to be truly absent in the mt genomes of Chaetognatha (arrow worms), bivalvian Mollusca and most of the nematode species (Gissi et al., 2008), so that their absence in the mt genomes of diverse platyzoan representatives can be taken as a plesiomorphic character.

In general, mitochondrial protein coding and rRNA genes and their products do not differ much between platyhelminths and other metazoan taxa (Le et al., 2002a), but structural modifications can be seen in the tRNAs. Some tRNAs tend to lack the DHU arm (e.g. tRNA(S) in flatworms as well as in other Metazoa; tRNA(A) in Cestoda, (Le et al., 2002a)).

In most metazoan taxa, such as Mollusca, Annelida and Arthropoda, the lengths of the rRNA genes usually range from 1 kb to 1.5 kb for the 16S rRNA gene and from 700 bp to 1 kb for the 12S rRNA gene. However, there are taxa displaying extremely compact rRNA genes. In ctenophores, for example, a 12S rRNA gene of less than 400 bp (Pett et al., 2011) and a 16S rRNA gene of less than 450 bp (Kohn et al., 2012) have been described. Similarly,

but to a lesser extent, syndermatan or at least acanthocephalan rRNA genes are usually significantly shorter than those of most other metazoan taxa (Steinauer et al., 2005; Min and Park, 2009; Gazi et al., 2012; Weber et al., 2013; Table 1). Exceptions can be seen in the monogonont *B. plicatilis* whose rRNAs sizes are in the “normal range” (>1 kb for the 16S gene, >700 bp for the 12S gene; Suga et al., 2008) and the 12S rRNA genes of Bdelloidea, which are in a “normal” size range, too. The special status of *B. plicatilis* can again be seen in the tRNA structures. While in acanthocephalans and bdelloids at least half of the tRNAs lack either the TΨC arm or the DHU arm or even both (Steinauer et al., 2005; Min and Park, 2009; Gazi et al., 2012; Weber et al., 2013), *Brachionus* tRNAs display no such structural modifications (Suga et al., 2008).

While the number of tRNA genes is generally rather variable in metazoan mt genomes (22–27, see Gissi et al., 2008; Castellana et al., 2011), platyhelminth mt genomes display a reduced variability ranging from 22 tRNA genes in most of the analyzed species to 23 in *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni*, which is due to a duplication of *trnC* in the latter two species. The gene composition of the mt genome varies more in syndermatans. The two available bdelloidean mt genomes show less tRNA genes compared to other metazoans (21 in *Rotaria rotatoria* and 18 in *Philodina citrina*), while the acanthocephalan (Palaeacanthocephala) *Leptorhynchoides thecatus* was thought to exhibit two additional tRNA genes (*trnS* and *trnK*; Steinauer et al., 2005). However, the respective additional tRNA genes might represent annotation artifacts since they are encoded by the minor strand, a circumstance that would represent a novelty for Platyzoa. To conclusively verify or falsify current annotations, transcriptomic data will be needed in future.

2.2.2. Base composition, strand asymmetry, genetic code and codon usage

Platyzoan mt genomes tend to be AT rich (peak values > 70% AT-content, (Le et al., 2002a; Castellana et al., 2011; Weber et al., 2013)) with T as the most common base on the coding strand. In most metazoans, the GC-skew values are significantly negative whereas the AT-skews are rather slightly positive (Castellana et al., 2011). Platyzoa on the contrary show significant values for both skews, with the GC-skew being positive and the AT-skew being negative (Castellana et al., 2011; Weber et al., 2013).

Like in the vast majority of metazoan species, commonly summarized as “invertebrates”, the genetic code for the mt genomes of Platyzoa differs from that of vertebrates. The codons AGA and AGG, translated to arginine in the standard code, code for serine instead, and TGA encodes tryptophan instead of causing termination of translation. An exception to the colloquially called “invertebrate” mitochondrial code can be found in the codon ATA which codes for isoleucine in most flatworms (exception: Catenulida) as in the standard code, and not for methionine as in other “invertebrate” mt genomes (Telford et al., 2000). In the standard as well as in the “invertebrate” mitochondrial code AAA codes for lysine, in contrast to most flatworm mt genomes (exception: Catenulida) where it codes for asparagine (Bessho et al., 1992; Telford et al., 2000; Le et al., 2002a).

In Platyhelminthes, GTG is sometimes used as a start codon instead of ATG (e.g. COX3 and ND2 in trematodes and cestodes; Feagin, 2000; Le et al., 2002a) and even a GTT start codon has been reported (*cox1* in *Hymenolepis diminuta*; Le et al., 2002b). The initiation codon in syndermatan mt genomes is very variable. Besides the most common initiation codons ATG and GTG, the codons ATA and ATT are frequently used (Steinauer et al., 2005; Suga et al., 2008; Min and Park, 2009; Gazi et al., 2012; Weber et al., 2013). For the palaeacanthocephalan *L. thecatus* a TTG start codon has been reported (Steinauer et al., 2005), for the archiacanthocephalan *Oncicola luehei* a TTG and even a GTA start codon are described (Gazi et al., 2012). For both flatworms and syndermatans,

this codon usage reflects an abundant appearance of G and T rich codons, as expected from the GC and AT skews (Min and Hickey, 2007).

In trematodes and cestodes *atp6* and *nd4* terminate at TAA instead of the more frequently used TAG. Also, abbreviated stop codons have been shown to occur in flatworm mt genomes (Le et al., 2002a; Le et al., 2004). In syndermatans, TAA stop codons are more frequent than TAG and abbreviated stop codons also are observed (Steinauer et al., 2005; Suga et al., 2008; Min and Park, 2009; Weber et al., 2013).

2.3. Gene order

The gene order within Platyhelminthes appears highly conserved with only a few exceptions (Fig. 2). For most flatworms, the order of protein coding and rRNA genes is *cox1*, *rnl*, *rns*, *cox2*, *nd6*, *nd5*, *cox3*, *cytb*, *nd4l*, *nd4*, *atp6*, *nd2*, *nd1*, *nd3*. Within Cestoda, even the tRNA genes are in stable positions. Among the 19 completely sequenced cestode mt genomes, only one shows a single tRNA variation (*H. diminuta* exhibits the gene order *trnY-trnS-trnL-trnL-trnR* instead of *trnY-trnL-trnS-trnL-trnR* between *nd6* and *nd5*; personal observation). In the annotation of *Echinococcus granulosus*, there are several tRNA genes missing (*trnY*, *trnL*, *trnS*, *trnL*, *trmR*, *trnG*), but re-annotation of the mt genome sequence (NC_008075) using MITOS (Bernt et al., 2013b) revealed all missing tRNAs in the positions expected. The highly conserved gene order within Cestoda was confirmed by a recent study providing partial mt genomes for 18 cestode species (Waeschenbach et al., 2012).

Among the analyzed representatives of Monogenea, three basic gene order patterns can be distinguished, two of them differing only by the positions of the tRNA genes *trnQ* and *trnM*. A minor exception to this monogenean gene order can be seen in *Benedenia serialae*, where *trnT* is located after *nd4* instead of the “normal” position between *cox1* and *rnl*. Some more comprehensive rearrangements can be observed in the mt genomes of *Microcotyle sebastis*, *Polylabris halichoeres* and *Pseudochauhannea macrorchis* (representing the monogenean subtaxon Polyopisthocotylea), which exhibit several tRNA translocations and a changed order of protein coding genes, due to a shift of *cox3*.

Among trematodes, three patterns of mt gene order emerge, two of which differ again in the position of tRNA genes (*trnE*, *trnV*, *trnS*), while the third pattern is distinguished by major variations in the order of protein coding genes. This extraordinary third gene order pattern in trematodes is limited to African schistosomes (*S. mansoni*, *S. spindale*, *S. haematobium*). Such striking differences in gene order even within one genus illustrate the necessity for a careful reconsideration of the applicability of mitochondrial gene orders as a phylogenetically informative trait, especially when only few species represent major taxa (Le et al., 2000).

The mt genome sequences of the free-living platyhelminths *D. japonica* and *M. lineare* (only a partial sequence in the latter case) reveal gene orders completely different from those of all other Platyhelminthes (Fig. 2; Ruiz-Trillo et al., 2004) and also very different from each other. The investigation of mt genomes from free-living flatworms therefore appears to be a promising research topic.

Compared to (parasitic) Platyhelminthes, the gene order within the syndermatan taxa is more variable (Fig. 3). Lots of tRNA variation can be found even between taxa of the same subgroup (Weber et al., 2013). However, the order of protein coding and rRNA genes is consistent within the subgroups. This observation cannot be confirmed for Monogononta since there is only one taxon sequenced by now, but preliminary genomic NGS data suggest that gene order is conserved in monogononts, or at least in Brachionidae, too (D. Mark Welch, personal communication). Differences in the widely conserved gene order of bdelloids and acanthocephalans can be explained by shifts in the localization of *nd3* and the tandem *nd1*-

Table 1
Availability and properties of complete mt genome data for platyzoan taxa.

Taxonomic group			Species	Acc. No.	mt genome length [bp]	%GC	#encoded proteins	#RNA genes	length rms [bp]	length rml [bp]	AT skew	GC skew	gene order		
Gastrotricha (n=0)			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Platyhelminthes (n=42)	Neodermata (n=41)	Cestoda (n=22)	Diphylobothriidea (n=5)	Diphylobothrium latum	NC_008945	13,608	31.8	12	24	740	968	-0.309	0.245	C	
				AB269325	13,720	31.7	12	24	744	967	-0.310	0.249	C		
				Diphylobothrium nihonkaiense	NC_009463	13,747	32.2	12	24	743	963	-0.301	0.225	C	
				EF420138	13,607	32.3	12	24	743	964	-0.299	0.221	C		
				Diplogonoporus balaenopterae	NC_017613	13,724	31.3	12	24	730	962	-0.326	0.287	C	
			Diplogonoporus grandis	NC_017615	13,725	31.3	12	24	731	963	-0.326	0.286	C		
			Spirometra erinaceuropaei	NC_011037	13,643	33.6	12	24	730	973	-0.388	0.348	C		
			Cyclophyllidea (n=17)	Echinococcus canadensis	NC_011121	13,721	32.4	12	24	726	978	-0.423	0.490	C	
				AB235847	13,719	32.3	12	24	726	978	-0.424	0.493	C		
				AB235848	13,717	32.4	12	24	726	977	-0.424	0.495	C		
				Echinococcus equinus ¹	AF346403	13,598	32.1	11 (12)	18 (24)	698	977	-0.413	0.517	C	
				Echinococcus granulosus ¹	NC_008075	13,588	33.0	12	18 (24)	700	977	-0.430	0.515	C	
				Echinococcus multilocularis	NC_000928	13,738	31.0	12	24	704	983	-0.404	0.509	C	
				Echinococcus oligarthrus	NC_009461	13,791	30.7	12	24	725	983	-0.399	0.516	C	
				Echinococcus orteppi	NC_011122	13,717	32.2	12	24	727	981	-0.421	0.485	C	
				Echinococcus shiquicus	NC_009460	13,807	31.6	12	24	725	985	-0.411	0.523	C	
				Echinococcus vogeli	NC_009462	13,750	32.9	12	24	721	980	-0.436	0.539	C	
				Hymenolepis diminuta ²	NC_002767	13,900	29.0	12	24	709	967	-0.285	0.334	(C)	
				Taenia asiatica	NC_004826	13,703	28.6	12	24	731	975	-0.319	0.444	C	
				Taenia crassiceps	NC_002547	13,503	26.0	12	24	722	960	-0.314	0.413	C	
				Taenia hydatigena	NC_012896	13,492	29.1	12	24	730	972	-0.297	0.394	C	
				FJ518620	13,489	29.2	12	24	706	973	-0.293	0.385	C		
		Taenia multiceps		NC_012894	13,693	28.7	12	24	737	977	-0.316	0.413	C		
		FJ495086		13,700	28.7	12	24	737	975	-0.315	0.409	C			
		Taenia pisiformis	NC_013844	13,387	26.8	12	24	728	970	-0.242	0.343	C			
		Taenia saginata	NC_009938	13,670	28.5	12	24	732	972	-0.322	0.445	C			
		Taenia solium	NC_004022	13,709	28.0	12	24	705	980	-0.295	0.408	C			
		Taenia taeniaeformis	NC_014768	13,647	27.0	12	24	717	959	-0.265	0.390	C			
		JQ663994	13,740	27.4	12	24	725	959	-0.280	0.407	C				
		Amphiliinidea (n=0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		Gyrocotylidae (n=0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		Monogenea (n=9)	Monopisthocotylea (n=6)	Benedenia hoshinai	NC_014591	13,554	25.9	12	24	729	956	-0.224	0.148	M1	
				Benedenia seriatae	NC_014291	13,498	24.4	12	24	752	982	-0.236	0.193	M1	
				Gyrodactylus derjavinoi	NC_010976	14,741	31.8	12	24	706	961	-0.028	0.105	M2	
				Gyrodactylus salaris	NC_008815	14,790	37.5	12	24	711	957	-0.045	0.086	M2	
				Gyrodactylus thymalli	NC_009682	14,788	37.3	12	24	710	958	-0.045	0.085	M2	
				Tetrancistrum nebulosi	NC_018031	13,392	34.6	12	24	727	966	-0.168	0.243	M1	
			Polyopisthocotylea (n=3)	Microcotyle sebastis	NC_009055	14,407	29.5	12	24	721	975	-0.166	0.341	M3	
				Polylabris halichoeres	NC_016057	15,527	27.4	12	24	724	982	-0.188	0.333	M3	
				Pseudocaulaneia macrorchis	NC_016950	15,031	28.5	12	24	736	977	-0.164	0.250	M3	
				Trematoda (n=10)	Digenea (n=10)	Opisthorchiida (n=2)	Clonorchis sinensis	NC_012147	13,875	39.9	12	24	779	998	-0.426
	JF729304		13,877				40.0	12	24	779	998	-0.426	0.377	T1	
	JF729303		13,879			40.0	12	24	779	999	-0.426	0.378	T1		
	Opisthorchis felineus		NC_011127		14,277	40.1	12	24	779	994	-0.425	0.383	T1		
	Echinostomida (n=1)		Fasciola hepatica		NC_002546	14,462	37.8	12	24	766	987	-0.483	0.475	T1	
			Plagiuchiida (n=1)		Paragonimus westermani ³	NC_002354	14,965	48.3	12	24	(724)	987	-0.395	0.295	T1
	Strigeidida (n=6)				Schistosoma haematobium	NC_008074	15,003	27.6	12	24	762	1055	-0.197	0.423	T3
			NC_002544		14,085	29.0	12	25	744	1004	-0.299	0.422	T2		
			HM120841 - HM120845		14,087	29.1	12	25	744	1004	-0.300	0.419	T2		
			HM120846 - HM120848		14,089	29.1	12	25	744	1004	-0.298	0.417	T2		
			Schistosoma mansoni ⁴	NC_002545	14,415	31.5	12	25	752	1055	-0.260	0.458	T3		
		Schistosoma mekongi	NC_002529	14,072	27.8	12	24	709	1019	-0.281	0.484	T2			
	Schistosoma spindale	NC_008067	16,901	27.3	12	24	760	1056	-0.159	0.482	T3				
	Trichobilharzia regenti	NC_009680	14,838	31.5	12	24	772	1016	-0.358	0.512	T2				
	Aspidogastrea (n=0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	"Turbellaria" / Seriata (n=1)	Dugesia japonica ¹	NC_016439	17,799	24.3	11 (12)	24	775	894	-0.400	0.246	S			
Gnathiifera (n=8)	Syndermata (n=8)	Bdelloidea (n=2)	Rotaria rotatoria ⁶	NC_013568	15319	26.9	12	23	521	529	-0.195	0.292	B		
			Philodina citrina ⁶	FR856884	14003	22.3	12	20	720	477	-0.193	0.340	B		
		Monogononta (n=1)	Brachionus plicatilis ⁷	NC_010472	11153	36.1	4	15	716	1107	-0.103	-0.103	MG		
			NC_010484	12672	37.1	8	9			-0.143	-0.114				
		Seisonidea (n=0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		Acanthocephala (n=5)	Palaeacanthocephala (n=2)	Leptorhynchoides thecatus ⁴	NC_006892	13888	28.4	12	26	513	926	-0.249	0.408	A	
				Echinorhynchus truttae ⁸	FR856883	13659	36.9	10	17	580	921	-0.290	0.436	A	
			Eoacanthocephala (n=1)	Paratenusentis ambiguus	FR856885	13574	33.1	12	24	590	883	-0.260	0.459	A	
			Archiacanthocephala (n=2)	Macracanthorhynchus hirudinaceus	FR856886	14282	34.8	12	24	633	942	-0.227	0.505	A	
				Oncicola luehei	NC_016754	14182	39.8	12	24	553	950	-0.253	0.487	A	
Polyacanthocephala (n=0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
Gnathostomulida (n=0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
Micrognathozoa (n=0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
Cycliophora (n=0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					

Shading scale	Max (=100%)	≥ 80%	≥ 60%	≥ 40%	≥ 20%	< 20%	Min (=0%)
Genome length [bp]	17799						11153
GC content [%]	48.3						22.3
rRNA length [bp]	1107						477
Skew values	0.539						-0.483

CESTODA	cox1 T rml C rms cox2 E nd6 Y L S L R nd5 G cox3 H cytb nd4L nd4 Q F M atp6 nd2 V A D nd1 N P I K nd3 S W
MONOGENEA 1	cox1 T rml C rms cox2 E nd6 Y L S L R nd5 G cox3 H cytb nd4L nd4 F Q M atp6 nd2 V A D nd1 N P I K nd3 S W
MONOGENEA 2	cox1 T rml C rms cox2 E nd6 Y L Q M S L R nd5 G cox3 H cytb nd4L nd4 F atp6 nd2 V A D nd1 N P I K nd3 S W
MONOGENEA 3	cox1 G T rml rms cox2 H, M cox3 C, K, L1, L2, nd6 , R, S, Y nd5 E cytb nd4L nd4 Q F atp6 nd2 V A D nd1 N P I K nd3 S W
TREMATODA 1	cox1 T rml C rms cox2 nd6 Y L S L R nd5 E G cox3 H cytb nd4L nd4 Q F M atp6 nd2 V A D nd1 N P I K nd3 S W
TREMATODA 2	cox1 T rml C rms cox2 nd6 Y L S L R nd5 G cox3 E H cytb nd4L nd4 Q F M atp6 nd2 A D nd1 N P I K nd3 W V S
TREMATODA 3	cox1 T rml C rms cox2 nd6 Y L S N I F atp6 nd2 A L R nd5 G cox3 E H cytb nd4L nd4 Q K nd3 D nd1 V P M W S
SERIATA	cox1 nd6 nd5 S D R cox3 I Q K atp6 V nd1 W cox2 P nd3 L nd2 E N M H F rms Y G S rml L T A C cytb nd4L nd4

Fig. 2. Gene orders in Platyhelminthes. Linearized schemes of gene orders in flatworm mt genomes. Variable genes within each of the three groups Cestoda, Monogenea and Trematoda are marked bold. Boxes with more than one gene name indicate variable gene orders within the specific group. Gene identifier: *rms/rml* = small and large subunit rRNA, *nd1–6,4L* = NADH dehydrogenase subunits 1–6 + 4L, *cox1–3* = cytochrome c oxidase subunits 1–3, *atp6* = ATP synthase subunit 6, *cytb* = cytochrome b, tRNA genes are labeled according to the one letter amino acid code. Gene orders derived from the mt genomes of *Diphyllbothrium latum*, *D. nihonkaiense*, *Diplogonoporus balaenopterae*, *D. grandis*, *Echinococcus canadensis*, *E. equinus*, *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus*, *E. orteppi*, *E. shiquicus*, *E. vogeli*, *Hymenolepis diminuta*, *Spirometra erinaceieuropaei*, *Taenia asiatica*, *T. crassiceps*, *T. hydatigena*, *T. multiceps*, *T. pisiformis*, *T. saginata*, *T. solium*, *T. taeniaeformis* for CESTODA; *Benedenia hoshinai*, *B. seriolae*, *Tetrancistrum nebulosi* for MONOGENEA 1; *Gyrodactylus derjavinioides*, *G. salaris*, *G. thymalli* for MONOGENEA 2; *Microcotyle sebastis*, *Polylabris halichoeres*, *Pseudochauhannea macrorchis* for MONOGENEA 3; *Clonorchis sinensis*, *Fasciola hepatica*, *Opisthorchis felineus*, *Paragonimus westermani* for TREMATODA 1; *Schistosoma japonicum*, *S. mekongi*, *Trichobilharzia regent* TREMATODA 2; *Schistosoma haematobium*, *S. mansoni*, *S. spindale* for TREMATODA 3; *Dugesia japonica* for SERIATA.

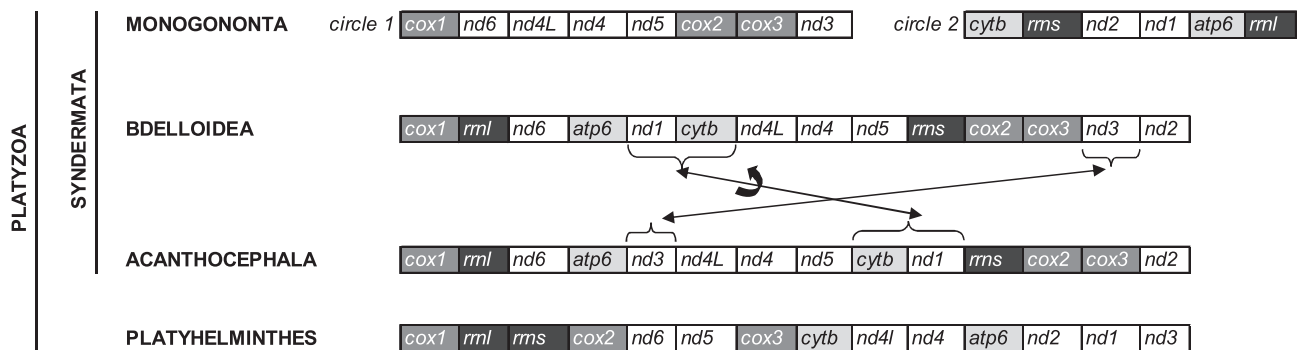


Fig. 3. Gene orders in Syndermata and comparison to Platyhelminthes. Linearized scheme of gene orders in platyzoan mt genomes. The more variable positions of tRNA genes are not shown here. Gene identifier: *rms/rml* = small and large subunit rRNA, *nd1–6,4L* = NADH dehydrogenase subunits 1–6 + 4L, *cox1–3* = cytochrome c oxidase subunits 1–3, *atp6* = ATP synthase subunit 6, *cytb* = cytochrome b. Gene orders derived from the mt genomes of *Brachionus plicatilis* for MONOGONONTA; *Philodina citrina*, *Rotaria rotatoria* for BDELLOIDEA; *Echinorhynchus truttae*, *Leptorhynchoides thecatus*, *Macracanthorhynchus hirudinaceus*, *Oncicola luehei*, *Paratenuisentis ambiguus* for ACANTHOCEPHALA; all available species except those with gene orders M3, T3 and S (see Fig. 2 and Table 1) for PLATYHELMINTHES.

cytb, with the latter two genes switching positions (see Fig. 3, possible mechanisms explained in Bernt et al., 2013a).

Comparing the basic patterns of gene orders of the different syndermatan subgroups (with the exclusion of Monogononta, since this cannot be regarded as a group specific pattern yet) to the general gene order of Platyhelminthes (without tRNA genes and not taking the extraordinary gene orders of *M. sebastis*, *P. halichoeres*, *P. macrorchis*, African *Schistosoma* and free-living Platyhelminthes into account) clearly indicates the closer relationship of the syndermatan taxa to each other than to the Platyhelminthes (Fig. 3). Additional data are urgently needed to understand if “exceptional” gene orders are really rare cases in certain lineages.

3. Phylogeny of Platyzoa

3.1. Position of Platyzoa in the metazoan tree of life

In the molecular phylogenetic study presented by Bernt et al. (2013c), the platyzoan taxa uniformly group within the ecdysozoan clade, mostly close to nematodes and several groups of Arthropoda. The Platyzoa concept cannot be verified since syndermatan and flatworm taxa do not group as a monophyletic assembly. This topology contradicts the well-established Ecdysozoa–Lophotrochozoa concept (Aguinaldo et al., 1997; Hejnol et al., 2009) and occurs most likely due to long branch attraction artifacts. This

For each taxonomic group, the number of species with complete mt genome data available (*n*) is indicated. If no complete mt genome data is available (*n* = 0), the name of the respective subtaxon is underlined.

For each mt genome record, the GenBank accession number, genome length, GC-content, number of encoded proteins, number of RNA genes (includes tRNA and rRNA genes), length of the rRNA genes (*rms* = small subunit ribosomal RNA gene, *rml* = large subunit ribosomal RNA gene), AT- and GC-skew values as well as the gene order code (C = Cestoda, M1–3 = Monogenea 1–3, T1–3 = Trematoda 1–3, S = Seriata, B = Bdelloidea, MG = Monogononta, A = Acanthocephala; see Fig. 2 and Fig. 3) are denoted. Superior numbers on species names indicate specialties that are explained below. For references check the respective GenBank entries.

^aIn the GenBank annotations genes are missing, re-annotation with MITOS shows these missing genes (number of genes in brackets). Missing genes are: *trnY*, *trnL*, *trnS*, *trnL*, *trnR*, *trnG* and *nd5* in *E. equinus*; *trnY*, *trnL*, *trnS*, *trnL*, *trnR* and *trnG* in *E. granulosus*; *nd4L* in *D. japonica*.

^b*H. diminuta* is the only cestode showing tRNA variations. Therefore, the gene order code C is in brackets.

^cIn the GenBank record of *P. westermani*, two *trnG* genes are annotated while the *rms* gene is missing. Re-annotation with MITOS shows only one *trnG* and finds the *rms* gene (length of *rms* in brackets).

^dIncreased number of RNA genes because of: a second *trnC* in *S. japonicum* and *S. mansoni*; a third *trnS* and a second *trnK* in *L. thecatus*.

^eIf more than one *S. japonicum* mt genome of equal length was present in GenBank, skew values and GC content were averaged for those genomes.

^fDecreased number of RNA genes. Missing genes are: *trnC* in *R. rotatoria*; *trnY*, *trnR*, *trnV* and *trnL* in *P. citrina*.

^gThe mt genome of *B. plicatilis* is splitted in two subgenomes.

^hThe mt genome of *E. truttae* is incomplete, therefore all values are preliminary.

observation, however, is not surprising, since several recent broad-scale analyses of the metazoan phylogeny revealed that platyzoan taxa are difficult to place in a larger context. A previous study also using mt genome data likewise revealed the platyzoan taxa as sister group to Nematoda, although the latter are part of the lophotrochozoan lineage in that study (Podsiadlowski et al., 2009). Using 13 nuclear genes, Paps et al. (2009a) obtained paraphyletic Gnathifera (with Gnathostomulida and Gastrotricha forming a monophyletic clade that is splitting off as the first lophotrochozoan lineage). In phylogenetic reconstructions on the basis of 18S and 28S rRNA data (Paps et al., 2009b), Gnathostomulida and Gastrotricha again appeared as basal branching lophotrochozoans, however without being sister taxa. The latter findings contrast with recent results from a broad-scale EST based analyses, which provided additional support for the Platyzoa hypothesis (Hejnol et al., 2009). However, statistical support for the branch uniting Platyhelminthes, Gnathostomulida, and Gastrotricha was rather low (Hejnol et al., 2009). When excluding taxa due to their leaf stability indices, better statistical support of the tree was achieved, but in these reduced datasets, both Syndermata and Gnathostomulida were no longer present. Another example for the difficulties in placing syndermatan taxa in a larger phylogenetic context can be seen in the examination of ribosomal protein sequences by Hausdorf et al. (2010). Depending on the program and evolutionary model used, the authors obtain either monophyletic Gnathifera as sister group to Platyhelminthes or an assemblage of Gnathifera and Nematoda, leaving Platyhelminthes as sister to Entoprocta. The authors suggest that the latter aspect of the topology results from long-branch attraction artefacts. Long branch attraction seems to be a major problem in the present study (Bernt et al., 2013c) as well. The obtained cluster with taxa of different phylogenetic affinity (Platyhelminthes, Syndermata, Nematoda, Copepoda, Chelicerata/Acariformes and others) is not biologically reasonable at all, in particular with respect to the implied polyphyletic status of arthropods. Possible reasons for such a clustering will be discussed below.

We note that, despite the fact that the placement of the platyzoan subgroups in the large context of metazoan relationships is uncertain in the present study (Bernt et al., 2013), the internal topologies of the two platyzoan subtaxa (Syndermata and Platyhelminthes, respectively) can be reasonably discussed here.

3.2. Internal phylogeny of Syndermata

The phylogeny within the syndermatan clade is still a matter of debate. During the last 20 years five competing topologies have been suggested, each of which has gained support from the interpretation of morphological traits or the analysis of molecular data (see Witek et al., 2008 and references therein). Since most recent phylogenomic studies rejected the monophyly of Eurotatoria (Bdelloidea and Monogononta, respectively), three of these proposed topologies seem to be unlikely (Witek et al., 2008; Min and Park, 2009; Witek et al., 2009; Gazi et al., 2012; Weber et al., 2013). Two hypotheses still appear possible, i.e. the Lemniscea

hypothesis (Lorenzen, 1985, Fig. 4A) and the Hemirotrifera hypothesis (Sørensen et al., 2006; Fig. 4B). The former assumes a sister-group relationship of acanthocephalans and bdelloids (“Lemniscea”), but does not specify the relative position of seisonids and monogononts to such Lemniscea. The latter hypothesis assumes the monogononts to be the most basal branching syndermatan taxon, while the relationships between the other three syndermatan subgroups remain undetermined.

In the broad mtDNA analyses presented in this special issue (Bernt et al., 2013), monophyly of Syndermata is moderately supported (82% and 69% bootstrap support for METAZOA and METAZOA-300, respectively). These low support values maybe due to affinities of one or more syndermatan taxa to other long branch taxa like platyhelminths or nematodes since in the reduced dataset “METAZOA-100” (144 taxa left), where platyhelminths and nematodes are excluded, the bootstrap support for syndermatan monophyly raises to 100. The internal topology of syndermatans shows monophyletic Eurotatoria (Bdelloidea and Monogononta; bootstrap support 72%) only in the METAZOA-300 analysis, while the other two datasets METAZOA and METAZOA-100 reveal a sister-group relationship between Bdelloidea and Acanthocephala bootstrap support values 56% and 64%, respectively), thus yielding paraphyletic Eurotatoria. The latter topology is in good concordance with a number of recent phylogenomic analyses, which reject monophyly of Eurotatoria (Witek et al., 2008; Min and Park, 2009; Witek et al., 2009; Gazi et al., 2012; Weber et al., 2013). However, the sister-group relationship of Acanthocephala and Bdelloidea could still be altered with respect to Seisonidea, a syndermatan taxon which was not included in the present analyses.

3.3. Internal phylogeny of Platyhelminthes

The relationships among the three major neodermatan (i.e., parasitic flatworm) groups have been debated in the literature (see e.g. Ehlers, 1986; Park et al., 2007). A long established sister-group relationship between Cestoda and Monogenea gained broad support by morphological as well as molecular data for a long period of time (e.g. Ehlers, 1986; Campos et al., 1998; Littlewood et al., 1999). However, other molecular analysis, including most recent broad-scale analyses, favor a sister-group relationship between Cestoda and Trematoda, leaving Monogenea as sister to these two (Mollaret et al., 1997; Lockyer et al., 2003; Park et al., 2007; Podsiadlowski et al., 2009; Perkins et al., 2010; Weber et al., 2013). There are no convincing morphological data supporting this topology but molecular datasets repeatedly supported this finding. The same is true for the topology within Platyhelminthes presented in this special issue (datasets “METAZOA” and “METAZOA-300”; see Bernt et al., 2013c). A sister-group relationship between Cestoda and Trematoda is obtained and Monogenea appear as basal branching Platyhelminthes but not as a monophylum. Monophyly of Monogenea is also questioned in the literature, again mainly based on molecular analyses (Mollaret et al., 1997; Park et al., 2007; Podsiadlowski et al., 2009; Perkins et al., 2010 and references therein) while morphological characters typically

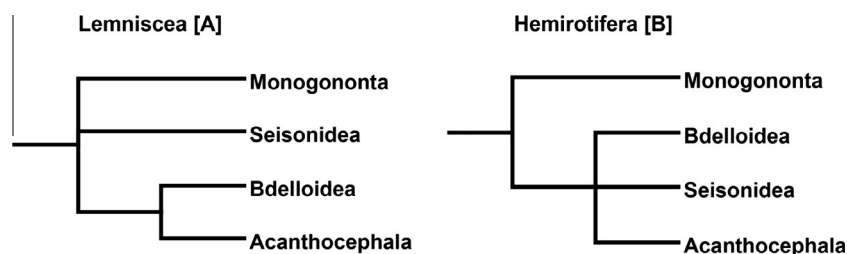


Fig. 4. Internal syndermatan relationships. Alternative phylogenetic tree topologies within Syndermata, as based on the current literature. The two scenarios showing paraphyletic Eurotatoria are [A] the Lemniscea hypothesis by Lorenzen (1985) and [B] the Hemirotrifera hypothesis by Sørensen and Giribet (2006).

support a monophyletic origin (see Ax, 1996; Perkins et al., 2010 and references therein).

Maximum support is achieved for the monophyly of Platyhelminthes and almost all groupings within them. An exception can be seen in the support for monophyletic Trematoda in the META-ZOA-300 analysis (93% bootstrap support). Within trematodes, the Opisthorchiida (represented by *Opisthorchis felineus*) and Plagiorchiida (represented by *Paragonimus westermani*) are sister groups, the two *Schistosoma* species representing the Strigeidida (*S. mansoni*, *S. japonicum*) appear as a monophylum and as sister group to the former mentioned digenean groups. This also is in concordance with other studies (e.g. Littlewood et al., 2006; Perkins et al., 2010; Weber et al., 2013).

3.4. Suitability of mt genome data for reconstructing the platyzoan phylogeny

The results of the analyses presented in this special issue (Bernt et al., 2013) agree with the findings of other recent molecular analyses, at least with respect to the internal phylogeny of the platyzoan subgroups Syndermata and Platyhelminthes. Thus, using amino acid sequences derived from mt genomes for phylogenetic reconstructions is not unfeasible in general, but depends on the taxonomic level and the taxon sampling. In the special case of Platyzoa, one should leave out long branching taxa as outgroups (e.g. Nematoda) to avoid artificial groupings or in other words, reduce the tree diameter (that is a smaller phylogenetic scope covered by the taxa chosen). Such a taxon sampling (only lophotrochozoans except for one arthropod outgroup taxon) has been used in Weber et al. (2013), revealing reasonable and congruent internal relationships among the platyzoan taxa. This may be due to the broader taxon sampling within the groups which is known to increase phylogenetic accuracy (e.g. Pollock et al., 2002; Zwickl and Hillis, 2002). While Weber et al. (2013) uses 12 flatworm and seven syndermatan taxa, the analyses presented here include only nine flatworm and three syndermatan mt genomes.

3.5. Potential causes for the non-spiralian positions of the platyzoan subgroups in the large context of metazoan relationships

Since the nucleotide composition is known to affect the amino acid composition of the encoded proteins (Foster et al., 1997), the high AT content of platyzoan mt genomes should be taken into consideration when using protein sequences for phylogenetic reconstructions. The same is true for the skew values. As expected from these values (in Platyzoa: GC positive, AT negative), GT-rich codons are numerous in platyzoan taxa. This has an impact on the amino acid composition of the encoded proteins, even affecting another subset of amino acids, as does the AT content (Min and Hickey, 2007). The study by Hassanin (2006) confirmed that strand bias can lead to artificial groupings of unrelated taxa in phylogenetic reconstructions, using MP, ML or Bayesian algorithms. Hassanin proposed a recoding scheme to solve the problem. This scheme excludes transitions at rapidly evolving neutral sites. The study of Min and Hickey (2007), however, showed that not only neutral but also non-neutral sites are affected by the strand bias in mt genomes. Therefore the recoding scheme proposed by Hassanin (2006) still leaves some bias in the data, though reducing it significantly (Hassanin, 2006; Jones et al., 2007).

It was found that even within the platyzoan group, such biases can affect phylogenetic reconstructions. Le et al. (2004) examined protein coding sequences of mt genomes of trematodes and cestodes and showed that in cases of close phylogenetic relation, some taxa show significant differences in amino acid composition. Such similarities or differences in amino acid composition, which are not

necessarily correlated and potentially evolved convergently, can of course lead to erroneous tree reconstructions. Despite these shortcomings and limitations of mt genome data, phylogenies of Platyhelminthes and Syndermata inferred from mt genome data so far show reasonable topologies within the groups (Park et al., 2007; Perkins et al., 2010; Weber et al., 2013; this study). This may be due to the fact that not all subgroups of Platyhelminthes are covered with data yet, and the amino acid composition may have more influence on the reconstructions, once data from more closely related species are added (Le et al., 2004).

Another study addressing compositional heterogeneity in metazoan phylogenomic inference showed that the deviating amino acid composition in platyzoan taxa is not restricted to mt genomes (Nesnid et al., 2010). In this study, the two included syndermatan taxa (*Philodina roseola* and *Pomphorhynchus laevis*, respectively) as well as the Platyhelminthes showed significantly deviating amino acid compositions in their ribosomal proteins and therefore significantly violated the assumptions of the used CAT evolutionary model. Therefore, taxon sampling, data processing, choice of evolutionary models and algorithms are altogether critical, whenever examining the phylogeny of platyzoan (and other deep-branching) taxa. Moreover, results from the reconstructions should be carefully examined on the background of all other available biological data.

Acknowledgments

This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Priority Project 1174, Deep Metazoan Phylogeny, Grant Ha2103/4) and by the Center for Computational Sciences (SRFN) of Johannes-Gutenberg University Mainz. ARWF and TH gratefully acknowledge Mathias Weber for assistance in data processing. The authors thank Antonio Guillén, Bernard Dupont, Marc Perkins and Steve J. Upton/Biology department of the Kansas State University for kindly providing pictures and the two reviewers for their helpful comments.

References

- Aguinaldo, A.M., Turbeville, J.M., Linford, L.S., Rivera, M.C., Garey, J.R., Raff, R.A., Lake, J.A., 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387, 489–493.
- Ahlrichs, W.H., 1995. Ultrastruktur und Phylogenie von Seison nebaliae (Grube 1859) und Seison annulatus (Claus 1876) Hypothesen zu phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen innerhalb der Bilateria. Cuvillier Verlag, Göttingen.
- Ahlrichs, W.H., 1997. Epidermal ultrastructure of Seison nebaliae and Seison annulatus, and a comparison of epidermal structures within the Gnathifera. *Zoomorphology* 117, 41–48.
- Ax, P., 1956. Die Gnathostomulida, eine rätselhafte Wurmgruppe aus dem Meeressand. Verlag der Akademie der Wissenschaften und der Literatur; in Kommission bei F. Steiner, Wiesbaden, Mainz.
- Ax, P., 1996. Multicellular Animals I: A New Approach to the Phylogenetic Order in Nature. Springer, Berlin, London.
- Ax, P., 2003. Multicellular Animals III: Order in Nature – System Made by Man. Springer, Berlin.
- Bernt, M., Bleidorn, C., Braband, A., Dambach, J., Donath, A., Fritzsche, G., Golombek, A., Hadrys, H., Jühling, F., Meusemann, K., Middendorf, M., Misof, B., Perseke, M., Podsiadlowski, L., von Reumont, B., Schierwater, B., Schlegel, M., Schrödl, M., Simon, S., Stadler, P.F., Stöger, I., Struck, T.H., 2013a. A comprehensive analysis of metazoan mitochondrial genomes and animal phylogeny. *Mol. Phylogenet. Evol.* 69, 352–364.
- Bernt, M., Braband, A., Schierwater, B., Stadler, P.F., 2013b. Genetic aspects of mitochondrial genome evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.* 69, 328–338.
- Bernt, M., Donath, A., Jühling, F., Externbrink, F., Florentz, C., Fritzsche, G., Pütz, J., Middendorf, M., Stadler, P.F., 2013c. MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 69, 313–319.
- Bessho, Y., Ohama, T., Osawa, S., 1992. Planarian mitochondria. II. The unique genetic code as deduced from cytochrome c oxidase subunit I gene sequences. *J. Mol. Evol.* 34, 331–335.
- Brunetti, E., White Jr., A.C., 2012. Cestode infestations: hydatid disease and cysticercosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26, 421–435.

- Campos, A., Cummings, M.P., Reyes, J.L., Laclette, J.P., 1998. Phylogenetic relationships of Platyhelminthes based on 18S ribosomal gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 10, 1–10.
- Castellana, S., Vicario, S., Saccone, C., 2011. Evolutionary patterns of the mitochondrial genome in Metazoa: exploring the role of mutation and selection in mitochondrial protein coding genes. *Genome Biol. Evol.* 3, 1067–1079.
- Cavalier-Smith, T., 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 73, 203–266.
- Cook, C.E., Jimenez, E., Akam, M., Salo, E., 2004. The Hox gene complement of acoel flatworms, a basal bilaterian clade. *Evol. Dev.* 6, 154–163.
- Dunn, C.W., Hejnol, A., Matus, D.Q., Pang, K., Browne, W.E., Smith, S.A., Seaver, E., Rouse, G.W., Obst, M., Edgecombe, G.D., Sørensen, M.V., Haddock, S.H., Schmidt-Rhaesa, A., Okusu, A., Kristensen, R.M., Wheeler, W.C., Martindale, M.Q., Giribet, G., 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452, 745–749.
- Edgecombe, G.D., Giribet, G., Dunn, C.W., Hejnol, A., Neves, R.C., Kristensen, R.M., Sørensen, M.V., Rouse, G.W., Worsaae, K., 2011. Higher-level metazoan relationships: recent progress and remaining questions. *Org. Divers. Evol.* 11, 151–172.
- egger, B., Steinke, D., Tarui, H., De Mulder, K., Arendt, D., Borgonie, G., Funayama, N., Gschwentner, R., Hartenstein, V., Hobmayer, B., Hooge, M., Hrouda, M., Ishida, S., Kobayashi, C., Kuaes, G., Nishimura, O., Pfister, D., Rieger, R., Salvenmoser, W., Smith, J., Technau, U., Tyler, S., Agata, K., Salzburger, W., Ladurner, P., 2009. To be or not to be a flatworm: the acoel controversy. *PLoS ONE* 4, e5502.
- Ehlers, U., 1986. Comments on a phylogenetic system of the Platyhelminthes. *Hydrobiologia* 132, 1–12.
- Feagin, J.E., 2000. Mitochondrial genome diversity in parasites. *Int. J. Parasitol.* 30, 371–390.
- Foster, P.G., Jermin, L.S., Hickey, D.A., 1997. Nucleotide composition bias affects amino acid content in proteins coded by animal mitochondria. *J. Mol. Evol.* 44, 282–288.
- Fuchs, J., Iseto, T., Hirose, M., Sundberg, P., Obst, M., 2010. The first internal molecular phylogeny of the animal phylum Entoprocta (Kamptozoa). *Mol. Phylogenet. Evol.* 56, 370–379.
- Funch, P., 1996. The chordoid larva of *Symbion pandora* (Cycliophora) is a modified trochophore. *J. Morphol.* 230, 231–263.
- Funch, P., Kristensen, R.M., 1995. Cycliophora is a new phylum with affinities to Entoprocta and Ectoprocta. *Nature* 378, 711–714.
- Funch, P., Thor, P., Obst, M., 2008. Symbiotic relations and feeding biology of *Symbion pandora* (Cycliophora) and *Triticella flava* (Bryozoa). *Vie et milieu* 58, 185–188.
- Fussmann, G.F., 2010. Rotifers: excellent subjects for the study of macro- and micro-evolutionary change. *Hydrobiologia* 662, 11–18.
- Gazi, M., Sultana, T., Min, G.-S., Park, Y.C., García-Varela, M., Nadler, S.A., Park, J.-K., 2012. The complete mitochondrial genome sequence of *Oncicola luehei* (Acanthocephala: Archiacanthocephala) and its phylogenetic position within Syndermata. *Parasitol. Int.* 61, 307–316.
- Gilbert, P.J., 1974. Dormancy in rotifers. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 93, 490–513.
- Giribet, G., 2008. Assembling the lophotrochozoan (=spiralian) tree of life. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363, 1513–1522.
- Giribet, G., Distel, D.L., Polz, M., Sterrer, W., Wheeler, W.C., 2000. Triploblastic relationships with emphasis on the acoelomates and the position of Gnathostomulida, Cycliophora, Plathelminthes, and Chaetognatha: a combined approach of 18S rDNA sequences and morphology. *Syst. Biol.* 49, 539–562.
- Giribet, G., Sørensen, M.V., Funch, P., Kristensen, R.M., Sterrer, W., 2004. Investigations into the phylogenetic position of Micrognathozoa using four molecular loci. *Cladistics* 20, 1–13.
- Gissi, C., Iannelli, F., Pesole, G., 2008. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity* 101, 301–320.
- Gladyshev, E., Meselson, M., 2008. Extreme resistance of bdelloid rotifers to ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 5139–5144.
- Gladyshev, E.A., Meselson, M., Arkhipova, I.R., 2008. Massive horizontal gene transfer in bdelloid rotifers. *Science* 320, 1210–1213.
- Gryseels, B., 2012. Schistosomiasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26, 383–397.
- Hassanin, A., 2006. Phylogeny of Arthropoda inferred from mitochondrial sequences: strategies for limiting the misleading effects of multiple changes in pattern and rates of substitution. *Mol. Phylogenet. Evol.* 38, 100–116.
- Hausdorf, B., Helmkamp, M., Nesnidal, M.P., Bruchhaus, I., 2010. Phylogenetic relationships within the lophophorate lineages (Ectoprocta, Brachiopoda and Phoronida). *Mol. Phylogenet. Evol.* 55, 1121–1127.
- Hejnol, A., Obst, M., Stamatakis, A., Ott, M., Rouse, G.W., Edgecombe, G.D., Martinez, P., Baguna, J., Bailly, X., Jondelius, U., Wiens, M., Muller, W.E., Seaver, E., Wheeler, W.C., Martindale, M.Q., Giribet, G., Dunn, C.W., 2009. Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proc. Biol. Sci.* 276, 4261–4270.
- Herlyn, H., Ehlers, U., 1997. Ultrastructure and function of the pharynx of *Gnathostomula paradoxa* (Gnathostomulida). *Zoomorphology* 117, 135–145.
- Herlyn, H., Ehlers, U., 2001. Organisation of the praesoma in *Acanthocephalus anguillae* (Acanthocephala, Palaeacanthocephala) with special reference to the muscular system. *Zoomorphology* 121, 13–18.
- Herlyn, H., Piskurek, O., Schurek, J., Ehlers, U., Zischler, H., 2003. The syndermatan phylogeny and the evolution of acanthocephalan endoparasitism as inferred from 18S rDNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26, 155–164.
- Hummon, W.D., 2011. Marine Gastrotricha of the Near East: 1. Fourteen New Species of Macrodasyda and a Redescription of Dactylopodola Agadasy Hochberg, 2003. *Zookeys*, pp. 1–59.
- Hur, J.H., Van Doninck, K., Mandigo, M.L., Meselson, M., 2009. Degenerate tetraploidy was established before bdelloid rotifer families diverged. *Mol. Biol. Evol.* 26, 375–383.
- Jones, M., Gantenbein, B., Fet, V., Blaxter, M., 2007. The effect of model choice on phylogenetic inference using mitochondrial sequence data: lessons from the scorpions. *Mol. Phylogenet. Evol.* 43, 583–595.
- Kohn, A.B., Citarella, M.R., Kocot, K.M., Bobkova, Y.V., Halanych, K.M., Moroz, L.L., 2012. Rapid evolution of the compact and unusual mitochondrial genome in the ctenophore, *Pleurobrachia bachei*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 63, 203–207.
- Kristensen, R.M., 2002. An introduction to Loricifera, Cycliophora, and Micrognathozoa. *Integr. Comp. Biol.* 42, 641–651.
- Kristensen, R.M., Funch, P., 2000. Micrognathozoa: a new class with complicated jaws like those of Rotifera and Gnathostomulida. *J. Morphol.* 246, 1–49.
- Lasek-Nesselquist, E., 2012. A mitogenomic re-evaluation of the bdelloid phylogeny and relationships among the Syndermata. *PLoS ONE* 7, e43554.
- Lavrov, D.V., Brown, W.M., 2001. *Trichinella spiralis* mtDNA: a nematode mitochondrial genome that encodes a putative ATP8 and normally structured tRNAs and has a gene arrangement relatable to those of coelomate metazoans. *Genetics* 157, 621–637.
- Le, T.H., Blair, D., Agatsuma, T., Humair, P.F., Campbell, N.J., Iwagami, M., Littlewood, D.T., Peacock, B., Johnston, D.A., Bartley, J., Rollinson, D., Herniou, E.A., Zarlenga, D.S., McManus, D.P., 2000. Phylogenies inferred from mitochondrial gene orders – a cautionary tale from the parasitic flatworms. *Mol. Biol. Evol.* 17, 1123–1125.
- Le, T.H., Blair, D., McManus, D.P., 2002a. Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. *Trends Parasitol.* 18, 206–213.
- Le, T.H., Pearson, M.S., Blair, D., Dai, N., Zhang, L.H., McManus, D.P., 2002b. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse-dog and sheep-dog strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 124, 97–112.
- Le, T.H., McManus, D.P., Blair, D., 2004. Codon usage and bias in mitochondrial genomes of parasitic Platyhelminthes. *Korean J. Parasitol.* 42, 159–167.
- Littlewood, D.T., Telford, M.J., Clough, K.A., Rohde, K., 1998. Gnathostomulida – an enigmatic metazoan phylum from both morphological and molecular perspectives. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9, 72–79.
- Littlewood, D., Rohde, K., Clough, K., 1999. The interrelationships of all major groups of Platyhelminthes: phylogenetic evidence from morphology and molecules. *Biol. J. Linn. Soc.* 66, 75–114.
- Littlewood, D.T., Lockyer, A.E., Webster, B.L., Johnston, D.A., Le, T.H., 2006. The complete mitochondrial genomes of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma spindale* and the evolutionary history of mitochondrial genome changes among parasitic flatworms. *Mol. Phylogenet. Evol.* 39, 452–467.
- Lockyer, A.E., Olson, P.D., Littlewood, D.T.J., 2003. Utility of complete large and small subunit rRNA genes in resolving the phylogeny of the Neodermata (Platyhelminthes): implications and a review of the cercomer theory. *Biol. J. Linn. Soc.* 78, 155–171.
- Lorenzen, S., 1985. Phylogenetic aspects of pseudocoelomate evolution. In: Conway Morris, S., George, J.D., Gibson, R., Platt, H.M. (Eds.), *The Origins and Relationships of Lower Invertebrates*. Clarendon Press, Oxford, pp. 210–223.
- Mark Welch, D., Meselson, M., 2000. Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science* 288, 1211–1215.
- Marotta, R., Leasi, F., Uggetti, A., Ricci, C., Melone, G., 2010. Dry and survive: morphological changes during anhydrobiosis in a bdelloid rotifer. *J. Struct. Biol.* 171, 11–17.
- Medoc, V., Beisel, J.N., 2008. An acanthocephalan parasite boosts the escape performance of its intermediate host facing non-host predators. *Parasitology* 135, 977–984.
- Min, X.J., Hickey, D.A., 2007. DNA asymmetric strand bias affects the amino acid composition of mitochondrial proteins. *DNA Res.* 14, 201–206.
- Min, G.S., Park, J.K., 2009. Eurotatorian paraphyly: revisiting phylogenetic relationships based on the complete mitochondrial genome sequence of *Rotaria rotatoria* (Bdelloidea: Rotifera: Syndermata). *BMC Genomics* 10, 533.
- Mollaret, I., Jamieson, B.G., Adlard, R.D., Hugall, A., Lecointre, G., Chombar, C., Justine, J.L., 1997. Phylogenetic analysis of the Monogenea and their relationships with Digenea and Eucestoda inferred from 28S rDNA sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.* 90, 433–438.
- Monks, S., 2001. Phylogeny of the Acanthocephala based on morphological characters. *Syst. Parasitol.* 48, 81–116.
- Mwinyi, A., Bailly, X., Bourlat, S.J., Jondelius, U., Littlewood, D.T., Podsiadlowski, L., 2010. The phylogenetic position of Acoela as revealed by the complete mitochondrial genome of *Symsagittifera roscoffensis*. *BMC Evol. Biol.* 10, 309.
- Near, T.J., 2002. Acanthocephalan phylogeny and the evolution of parasitism. *Integr. Comp. Biol.* 42, 668–677.
- Nesnidal, M.P., Helmkamp, M., Bruchhaus, I., Hausdorf, B., 2010. Compositional heterogeneity and phylogenomic inference of metazoan relationships. *Mol. Biol. Evol.* 27, 2095–2104.
- Neves, R.C., Sørensen, K.J., Kristensen, R.M., Wanninger, A., 2009. Cycliophoran dwarf males break the rule: high complexity with low cell numbers. *Biol. Bull.* 217, 2–5.
- Neves, R.C., Kristensen, R.M., Funch, P., 2012. Ultrastructure and morphology of the cycliophoran female. *J. Morphol.* 273, 850–869.
- Obst, M., Funch, P., Giribet, G., 2005. Hidden diversity and host specificity in cycliophorans: a phylogeographic analysis along the North Atlantic and Mediterranean Sea. *Mol. Ecol.* 14, 4427–4440.

- Olson, P.D., Tkach, V.V., 2005. Advances and trends in the molecular systematics of the parasitic Platyhelminthes. *Adv. Parasitol.* 60, 165–243.
- Paps, J., Baguna, J., Riutort, M., 2009a. Bilaterian phylogeny: a broad sampling of 13 nuclear genes provides a new Lophotrochozoa phylogeny and supports a paraphyletic basal Acoelomorpha. *Mol. Biol. Evol.* 26, 2397–2406.
- Paps, J., Baguna, J., Riutort, M., 2009b. Lophotrochozoa internal phylogeny: new insights from an up-to-date analysis of nuclear ribosomal genes. *Proc. Biol. Sci.* 276, 1245–1254.
- Park, J.K., Kim, K.H., Kang, S., Kim, W., Eom, K.S., Littlewood, D.T., 2007. A common origin of complex life cycles in parasitic flatworms: evidence from the complete mitochondrial genome of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Platyhelminthes). *BMC Evol. Biol.* 7, 11.
- Perkins, E.M., Donnellan, S.C., Bertozzi, T., Whittington, I.D., 2010. Closing the mitochondrial circle on paraphyly of the Monogenea (Platyhelminthes) infers evolution in the diet of parasitic flatworms. *Int. J. Parasitol.* 40, 1237–1245.
- Petrov, N.B., Pegova, A.N., Manylov, O.G., Vladychenskaia, N.S., Miuge, N.S., Aleshin, V.V., 2007. Molecular phylogeny of gastrotricha based on 18S rRNA genes comparison: rejection of hypothesis of relatedness with nematodes. *Mol. Biol. (Mosk)* 41, 499–507.
- Pett, W., Ryan, J.F., Pang, K., Mullikin, J.C., Martindale, M.Q., Baxevanis, A.D., Lavrov, D.V., 2011. Extreme mitochondrial evolution in the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*: insight from mtDNA and the nuclear genome. *Mitochondr. DNA* 22, 130–142.
- Philippe, H., Brinkmann, H., Martinez, P., Riutort, M., Baguna, J., 2007. Acoel flatworms are not platyhelminthes: evidence from phylogenomics. *PLoS ONE* 2, e717.
- Philippe, H., Brinkmann, H., Copley, R.R., Moroz, L.L., Nakano, H., Poustka, A.J., Wallberg, A., Peterson, K.J., Telford, M.J., 2011. Acoelomorph flatworms are deuterostomes related to *Xenoturbella*. *Nature* 470, 255–258.
- Piscart, C., Webb, D., Beisel, J.N., 2007. An acanthocephalan parasite increases the salinity tolerance of the freshwater amphipod *Gammarus roeseli* (Crustacea: Gammaridae). *Naturwissenschaften* 94, 741–747.
- Podsiadlowski, L., Braband, A., Struck, T.H., von Dohren, J., Bartolomaeus, T., 2009. Phylogeny and mitochondrial gene order variation in Lophotrochozoa in the light of new mitogenomic data from Nemertea. *BMC Genomics* 10, 364.
- Pollock, D.D., Zwickl, D.J., McGuire, J.A., Hillis, D.M., 2002. Increased taxon sampling is advantageous for phylogenetic inference. *Syst. Biol.* 51, 664–671.
- Powell, E.S., Bright, T.J., 1981. A thioibios does exist – gnathostomulid domination of the canyon community at the east flower garden brine seep. *Int. Revue ges Hydrobiol. Hydrogr.* 66, 675–683.
- Riedl, R.J., 1969. Gnathostomulida from America. *Science* 163, 445–452.
- Rieger, R.M., Tyler, S., 1995. Sister-group relationship of Gnathostomulida and Rotifera-Acanthocephala. *Invertebr. Biol.* 114, 186–188.
- Ruiz-Trillo, I., Riutort, M., Littlewood, D.T., Herniou, E.A., Baguna, J., 1999. Acoel flatworms: earliest extant bilaterian Metazoans, not members of Platyhelminthes. *Science* 283, 1919–1923.
- Ruiz-Trillo, I., Paps, J., Loukota, M., Ribera, C., Jondelius, U., Baguna, J., Riutort, M., 2002. A phylogenetic analysis of myosin heavy chain type II sequences corroborates that Acoela and Nemertodermatida are basal bilaterians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 11246–11251.
- Ruiz-Trillo, I., Riutort, M., Fourcade, H.M., Baguna, J., Boore, J.L., 2004. Mitochondrial genome data support the basal position of Acoelomorpha and the polyphyly of the Platyhelminthes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33, 321–332.
- Sempere, L.F., Martinez, P., Cole, C., Baguna, J., Peterson, K.J., 2007. Phylogenetic distribution of microRNAs supports the basal position of acoel flatworms and the polyphyly of Platyhelminthes. *Evol. Dev.* 9, 409–415.
- Skuballa, J., Taraschewski, H., Petney, T.N., Pfaffle, M., Smales, L.R., 2010. The avian acanthocephalan *Plagiorhynchus cylindraceus* (Palaeacanthocephala) parasitizing the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) in Europe and New Zealand. *Parasitol. Res.* 106, 431–437.
- Sørensen, M.V., Funch, P., Willerslev, E., Hansen, A.J., Olesen, J., 2000. On the phylogeny of the Metazoa in the light of Cycliophora and Micrognathozoa. *Zoologischer Anzeiger* 239, 297–318.
- Sørensen, M.V., Giribet, G., 2006. A modern approach to rotiferan phylogeny: combining morphological and molecular data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 40, 585–608.
- Sørensen, M.V., Segers, H., Funch, P., 2005. On a new *Seison* Grube, 1861 from coastal waters of Kenya, with a reappraisal of the classification of the Seisonida (Rotifera). *Zool. Stud.* 44, 34–43.
- Sørensen, M.V., Sterrer, W., Giribet, G., 2006. Gnathostomulid phylogeny inferred from a combined approach of four molecular loci and morphology. *Cladistics* 22, 32–58.
- Steinauer, M.L., Nickol, B.B., Broughton, R., Orti, G., 2005. First sequenced mitochondrial genome from the phylum Acanthocephala (*Leptorhynchoides thecatus*) and its phylogenetic position within Metazoa. *J. Mol. Evol.* 60, 706–715.
- Suga, K., Mark Welch, D.B., Tanaka, Y., Sakakura, Y., Hagiwara, A., 2008. Two circular chromosomes of unequal copy number make up the mitochondrial genome of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1129–1137.
- Sures, B., 2004. Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. *Trends Parasitol.* 20, 170–177.
- Sures, B., Radszuweit, H., 2007. Pollution-induced heat shock protein expression in the amphipod *Gammarus roeseli* is affected by larvae of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala). *J. Helminthol.* 81, 191–197.
- Telford, M.J., Herniou, E.A., Russell, R.B., Littlewood, D.T., 2000. Changes in mitochondrial genetic codes as phylogenetic characters: two examples from the flatworms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 11359–11364.
- Telford, M.J., Lockyer, A.E., Cartwright-Finch, C., Littlewood, D.T., 2003. Combined large and small subunit ribosomal RNA phylogenies support a basal position of the acoelomorph flatworms. *Proc. Biol. Sci.* 270, 1077–1083.
- Todaro, M.A., Telford, M.J., Lockyer, A.E., Littlewood, D.T.J., 2006. Interrelationships of the Gastrotricha and their place among the Metazoa inferred from 18S rRNA genes. *Zool. Scr.* 35, 251–259.
- Todaro, M.A., Kanneby, T., Dal Zotto, M., Jondelius, U., 2011. Phylogeny of Thaumastodermatidae (Gastrotricha: Macrotrichida) inferred from nuclear and mitochondrial sequence data. *PLoS ONE* 6, e17892.
- Valles, Y., Boore, J.L., 2006. Lophotrochozoan mitochondrial genomes. *Integr. Comp. Biol.* 46, 544–557.
- Waeschenbach, A., Webster, B.L., Littlewood, D.T.J., 2012. Adding resolution to ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with large fragments of mtDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 63, 834–847.
- Weber, M., Wey, A.R., Podsiadlowski, L., Witek, A., Schill, R.O., Sugár, L., Herlyn, H., Hankeln, T., 2013. Phylogenetic analyses of endoparasitic Acanthocephala based on mitochondrial genomes suggest secondary loss of sensory organs. *Mol. Phylogenet. Evol.* 66, 182–189.
- Winneppenninckx, B., Bäckeljau, T., Mackey, L.Y., Brooks, J.M., De Wachter, R., Kumar, S., Garey, J.R., 1995. 18S rRNA data indicate that Aschelminthes are polyphyletic in origin and consist of at least three distinct clades. *Mol. Biol. Evol.* 12, 1132–1137.
- Winneppenninckx, B.M.H., Bäckeljau, T., Kristensen, R.M., 1998. Relations of the new phylum Cycliophora. *Nature* 393, 636–638.
- Witek, A., Herlyn, H., Meyer, A., Boell, L., Bucher, G., Hankeln, T., 2008. EST based phylogenomics of Syndermata questions monophyly of Eurotatoria. *BMC Evol. Biol.* 8, 345.
- Witek, A., Herlyn, H., Ebersberger, I., Mark Welch, D.B., Hankeln, T., 2009. Support for the monophyletic origin of Gnathifera from phylogenomics. *Mol. Phylogenet. Evol.* 53, 1037–1041.
- Zrzavy, J., Mihulka, S., Kepka, P., Bezdek, A., Tietz, D., 1998. Phylogeny of the Metazoa based on morphological and 18S ribosomal DNA evidence. *Cladistics* 14, 249–285.
- Zwickl, D.J., Hillis, D.M., 2002. Increased taxon sampling greatly reduces phylogenetic error. *Syst. Biol.* 51, 588–598.

2.3 Transcriptome data reveal syndermatan relationships and suggest the evolution of endoparasitism in Acanthocephala via an epizoid stage

Veröffentlicht in PLOS ONE (2014)
Band 9, Ausgabe 2, e88618

2.3.1 Kurzbeschreibung (deutsche Übersetzung)

Das Taxon Syndermata beinhaltet die biologisch interessanten Rädertiere ("Rotifera": Bdelloidea + Monogononta + Seisonidea) und Kratzwürmer (Acanthocephala) und ist von zentraler Bedeutung zur Überprüfung übergeordneter phylogenetischer Hypothesen (Platyzoa, Gnathifera) im Stammbaum der Metazoa. Jüngste Analysen zur Phylogenie der Syndermata legten eine Paraphylie der Eurotatoria (freilebende Bdelloidea und Monogononta) in Bezug auf die endoparasitischen Acanthocephala nahe. Die Topologie der Syndermata-Phylogenie könnte jedoch durch das Fehlen von Daten der epizoiden Seisonidea in diesen Baumrekonstruktionen beeinflusst worden sein. Weiterhin könnte die Position der Seisonidea innerhalb der Syndermata zu einem besseren Verständnis der Evolution des Endoparasitismus der Acanthocephala beitragen. Wir präsentieren die erste phylogenomische Analyse, die alle vier Großgruppen der Syndermata enthält. Die Datensätze beinhalten neue transkriptomische Daten der Taxa *Seison spec.* (Seisonidea), *Brachionus manjavacas* (Monogononta), *Adineta vaga* (Bdelloidea) und *Paratenuisentis ambiguus* (Acanthocephala). Maximum Likelihood und Bayes'sche Stammbäume für insgesamt 19 Taxa der Metazoa wurden auf Grundlage von Sequenzen von bis zu 410 funktionell verschiedenartigen Protein-Orthologen rekonstruiert. Alle Ergebnisse platzierten Monogononta basal innerhalb der Syndermata, Bdelloidea traten als das Schwestertaxon zu einer Gruppierung aus epizoiden Seisonidea und endoparasitischen Acanthocephala auf. Unsere Ergebnisse unterstützen daher die Monophylie der Syndermata, Hemirotifera (Bdelloidea + Seisonidea + Acanthocephala) und Pararotatoria (Seisonidea + Acanthocephala) und verwerfen die Monophylie der traditionellen Rotifera und Eurotatoria. Diese Baumtopologie impliziert, dass frühe Acanthocephala epizoid oder als Ektoparasiten auf Arthropoden lebten, bevor ihr komplexer Lebenszyklus, der einen Arthropoden als Zwischenwirt und einen Vertebraten als Endwirt beinhaltet, evolvierte.

2.3.2 Geleistete Beiträge zu dieser Publikation

- Durchführung der Laborarbeiten für *Seison spec.* und *Paratenuisentis ambiguus* (teilweise bereits im Rahmen der Diplomarbeit)
- Assemblierung fast aller verwendeten Datensätze
- Durchführung des Hauptteils der phylogenetischen Rekonstruktionen
- Schreiben des Manuskripts sowie Erstellung der Abbildungen (gemeinsam mit Holger Herlyn)

Transcriptome Data Reveal Syndermatan Relationships and Suggest the Evolution of Endoparasitism in Acanthocephala via an Epizoic Stage

Alexandra R. Wey-Fabrizius^{1,2}, Holger Herlyn^{2,3}, Benjamin Rieger¹, David Rosenkranz², Alexander Witek¹, David B. Mark Welch³, Ingo Ebersberger⁴, Thomas Hankeln^{1*}

1 Institute of Molecular Genetics, Johannes Gutenberg-University Mainz, Mainz, Germany, **2** Institute of Anthropology, Johannes Gutenberg-University Mainz, Mainz, Germany, **3** Josephine Bay Paul Center for Comparative Molecular Biology and Evolution, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, United States of America, **4** Institute for Cell Biology and Neuroscience, Goethe-University Frankfurt am Main, Frankfurt, Germany

Abstract

The taxon Syndermata comprises the biologically interesting wheel animals ("Rotifera": Bdelloidea + Monogononta + Seisonidea) and thorny-headed worms (Acanthocephala), and is central for testing superordinate phylogenetic hypotheses (Platyzoa, Gnathifera) in the metazoan tree of life. Recent analyses of syndermatan phylogeny suggested paraphyly of Eurotatoria (free-living bdelloids and monogononts) with respect to endoparasitic acanthocephalans. Data of epizoic seisonids, however, were absent, which may have affected the branching order within the syndermatan clade. Moreover, the position of Seisonidea within Syndermata should help in understanding the evolution of acanthocephalan endoparasitism. Here, we report the first phylogenomic analysis that includes all four higher-ranked groups of Syndermata. The analyzed data sets comprise new transcriptome data for *Seison spec.* (Seisonidea), *Brachionus manjavacas* (Monogononta), *Adineta vaga* (Bdelloidea), and *Paratenuisentis ambiguus* (Acanthocephala). Maximum likelihood and Bayesian trees for a total of 19 metazoan species were reconstructed from up to 410 functionally diverse proteins. The results unanimously place Monogononta basally within Syndermata, and Bdelloidea appear as the sister group to a clade comprising epizoic Seisonidea and endoparasitic Acanthocephala. Our results support monophyly of Syndermata, Hemirotifera (Bdelloidea + Seisonidea + Acanthocephala), and Pararotatoria (Seisonidea + Acanthocephala), rejecting monophyly of traditional Rotifera and Eurotatoria. This serves as an indication that early acanthocephalans lived epizoically or as ectoparasites on arthropods, before their complex lifecycle with arthropod intermediate and vertebrate definite hosts evolved.

Citation: Wey-Fabrizius AR, Herlyn H, Rieger B, Rosenkranz D, Witek A, et al. (2014) Transcriptome Data Reveal Syndermatan Relationships and Suggest the Evolution of Endoparasitism in Acanthocephala via an Epizoic Stage. PLoS ONE 9(2): e88618. doi:10.1371/journal.pone.0088618

Editor: Jürgen Schmitz, University of Muenster, Germany

Received: February 18, 2013; **Accepted:** January 15, 2014; **Published:** February 10, 2014

Copyright: © 2014 Wey-Fabrizius et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG grant Ha2103/4-3, Priority Project "Deep Metazoan Phylogeny", SPP1174; www.dfg.de). Additional financial support came from the Center for Computational Sciences (SRFN) of Johannes Gutenberg University Mainz (http://www.csm.uni-mainz.de). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: hankeln@uni-mainz.de

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Increasing amounts of sequence data combined with elaborated phylogenomic analyses are constantly refining our view on the metazoan tree of life (e.g. [1–7]). However, some taxonomic groups are still not well represented in terms of taxa and data availability, leaving many open questions concerning their evolutionary relationships and character evolution. Within Protostomia, a crucial question is the monophyly and placement of the hypothetical taxon Platyzoa [8], which unites Platyhelminthes (flatworms) with other mostly microscopic, worm-shaped animals like Gnathifera, and, possibly, Gastrotricha [9]. Hence, this taxon may comprise pseudo- and acoelomate animals, which for the most part develop without metamorphosis. In some groups, however, parasitic lifestyles exist including parasitizing larval stages (Neodermata within Platyhelminthes and Acanthocephala within Gnathifera).

In recent phylogenomic studies only one or at best a few putative platyzoan subtaxa were represented, most of them by only one or two species (e.g. [1–3], [6], [7], [10]). The resulting trees revealed unstable and contradictory positions for individual taxa and did not produce reliable support for or against the Platyzoa hypothesis (see e.g. [2], [3], [5], [11], [12]). Possible reasons included long-branch attraction (LBA) phenomena [2] and significantly deviating amino acid compositions [5], leading to poor leaf stability indices [3] for the corresponding taxa. These shortcomings can hopefully be overcome by increasing taxon and sequence data coverage [13], [14] for putative platyzoan animals, many of which are notoriously difficult to obtain in sufficient amounts.

As a further step towards addressing these superordinate phylogenetic problems, the current study has its focus on resolving the debated internal phylogeny of the taxon Syndermata, which is particularly interesting as a model for the evolution of parasitism.

Syndermata unites Monogononta, Bdelloidea and Seisonidea (traditionally subsumed as “Rotifera”) with the morphologically very distinct Acanthocephala. Other authors subsume Acanthocephala within extended Rotifera [15]. Leaving aside this semantic issue, we join García-Varela and Nadler [16], Min and Park [17], Minelli [18], Gazi et al. [19], Lasek-Nesselquist [20] and refer to bdelloids, monogononts, seisonids, and acanthocephalans as Syndermata. A close relation between these taxa was originally inferred from shared morphological traits such as a syncytial epidermis with an electron dense internal layer and sperm morphology [21–25]. Additional support for a close phylogenetic relationship of acanthocephalans and at least some of the traditional rotiferan taxa came from analyses of single- and multigene molecular data [2], [6], [10–12], [16], [26–33] as well as from analyses of combined molecular and morphological data [34], [35].

While syndermatan monophyly has received strong support, the internal syndermatan phylogeny is still not fully resolved. Morphological characters uniting the three traditional rotiferan taxa Seisonidea, Monogononta, and Bdelloidea are scarce. This is mainly due to their differences in lifestyle, morphology, and reproduction. The four presently described species of Seisonidea live epizoically, partly even ectoparasitically, on marine crustaceans of the leptostracan genus *Nebalia* [36–39]. In contrast, most bdelloids and monogononts are free-living aquatic animals capable of active swimming, employing a ciliated apical structure named the corona or wheel-organ. The wheel-organ in seisonids, however, is reduced or rudimentary [40], [41]. Seisonids are additionally distinguished from monogononts and bdelloids by a specific mastax and trophi structure as well as a protrusible neck [22], [41], all of which might have emerged in the context of nourishment in their epizoic, potentially ectoparasitic lifestyle. The three “rotiferan” taxa also differ with respect to their reproduction: While seisonids are strictly bisexual with well-developed males that co-occur with females throughout the year, bdelloids and monogononts are capable of parthenogenesis and have dwarf (Monogononta) or even no males (Bdelloidea) [42]. The fourth syndermatan taxon, Acanthocephala, comprises worm-like endoparasites with a complicated life cycle including an arthropod intermediate host and a vertebrate definite host. Sexes are separate, with adult females being larger than males, and reproduction is exclusively sexual. As in other parasites, the morphology of acanthocephalans is highly modified. For instance, the mastax and intestinal tract are absent and nutrient uptake occurs via epidermis. Moreover, adult acanthocephalans possess a retractable hooked proboscis for anchoring to the intestinal wall of the host (e.g. [25], [43]).

Phylogenetic investigations based on large data sets have previously addressed taxon relationships within Syndermata, though many questions remain. There is consistent evidence for paraphyly of “Eurotatoria” (Monogononta + Bdelloidea) with respect to Acanthocephala [6], [10], [17], [44], illustrating a non-parsimonious evolution including gains and losses of complex morphological traits during syndermatan evolution [10]. However, the branching order within a putative monophylum comprising Bdelloidea, Seisonidea, and Acanthocephala (“Hemirofiteria”) [35] has remained unresolved. The so-called Lemniscea hypothesis favors a grouping of Acanthocephala and Bdelloidea and refers to potentially synapomorphic proboscis/rostrum and lemnisci/epidermal intrusions in acanthocephalans and bdelloids (Fig. 1A) [45]. However, the homology of the implied synapomorphies was frequently called into question [40], [46–51]. The alternative sister group relationship of seisonids and acanthocephalans (Pararotatoria) was derived from – amongst others – the shared occurrence

of epidermal fibre bundles and so-called dense bodies in the spermatozoa [22], [23]. Monophyletic Pararotatoria additionally received support from analysis of partial 18S rDNA data [26], but were not reproduced in further analyses of 74 morphological characters and 18S rRNA, 28S rRNA, Hist3, and COI data [35], leaving Hemirofiteria as a trifurcation (Fig. 1B). This apparent lack of resolution was most probably due to the small amount of data for Seisonidea, for which only the 18S rRNA sequence and partial sequences of 28S rRNA, hsp82 and COI were available in public databases. Resolving the phylogenetic position of Seisonidea, however, is essential to infer the evolution of acanthocephalan endoparasitism, which could have evolved via an epizoic intermediate stage.

In the present study, we analyze the internal phylogeny of Syndermata on the basis of novel cDNA sequence data for four syndermatan species (Seisonidea: *Seison* spec., Bdelloidea: *Adineta vaga*, Monogononta: *Brachionus manjavacas*, Acanthocephala: *Paratenuisentis ambiguus*) and additional EST data for *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). Our tree reconstructions are based on the first phylogenomic data set for Seisonidea. Moreover, we included twice as many syndermatan species as any previous phylogenetic study in this part of the metazoan tree.

Materials and Methods

Collection of material, RNA extraction, cDNA-synthesis and EST sequencing

Specimens of *P. laevis* were extracted from the gut of barbels (*Barbus barbus*, Teleostei), collected in the Buech River (South of France) in summer 2006. The study was conducted according to relevant international guidelines regarding the care and welfare of fishes and did not involve species that were endangered or protected (The IUCN Red List of Threatened Species v. 2011.1; www.iucnredlist.org). The Buech River is a regulated ‘Natura

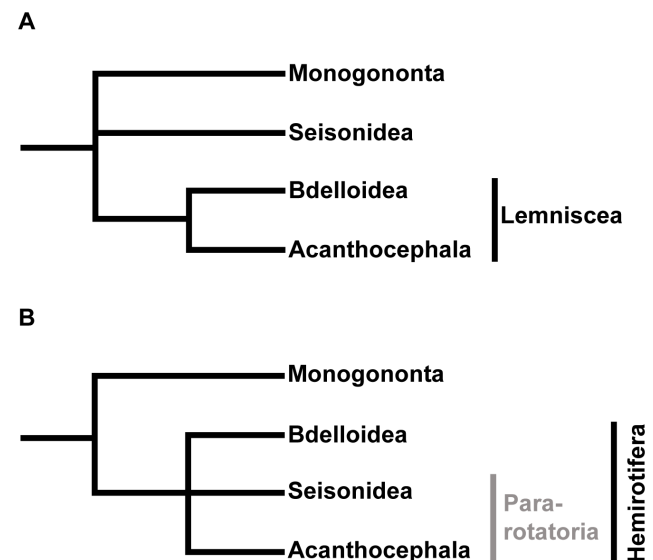


Figure 1. Two alternative hypotheses for the internal syndermatan phylogeny. Alternative hypotheses for the internal syndermatan relationships are (A) the morphology-based Lemniscea hypothesis [45], and (B) the Hemirofiteria hypothesis [35], which is mainly based on molecular data. The latter did not specify the sister group of Acanthocephala. Support for a potential sister group relationship of Acanthocephala and Seisonidea (Pararotatoria) comes from morphological data [22], [23] and analyses of partial 18S rRNA sequences [26]. doi:10.1371/journal.pone.0088618.g001

2000' area (FR9301519) and the permission for collecting fishes was delivered by the Préfecture des Alpes-de-Haute-Provence (N°2006-1259). The fishes were quickly sacrificed using clove oil as anesthetic to minimize suffering. Total RNA was isolated from one frozen adult *P. laevis* specimen to construct a cDNA library (Bio S&T Inc.). Double-stranded (ds) cDNA was directionally cloned into a modified pBluescript vector and transformed into *E. coli* DH10B cells. 10,000 bacterial colonies were randomly picked for single-pass 5'-end Sanger sequencing (Génoscope, Centre National de Séquençage, France). After controlling for quality and vector contamination, 9,374 validated EST sequences were compared to sequences available in the protein and nucleotide GenBank databases (SwissProt, NT and NR) using BLAST [52]. Sequences providing BLAST-matches with e-values $<10^{-15}$ ($n = 571$) were chosen for full-length cDNA sequencing.

Specimens of *Nebalia bipes*, the host of *Seison nebaliae* and *Paraseison* (formerly *Seison*) *annulatus*, were collected in the tidal flats at Roscoff, France. After decapitation of *N. bipes* and removal of the carapax, epizoid *Seison/Paraseison* specimens were collected by stirring them off the gills of their host. About 95% of the sampled specimens belonged to *Seison nebaliae*, the remaining fraction belonged to *Paraseison annulatus*. For reasons of simplicity, we herein refer to the pooled specimens as to the *Seison* spec. sample. Total RNA extraction was performed using the NucleoSpin® RNA XS Kit (Macherey-Nagel) with approximately 100 *Seison* individuals. Specimens of *P. ambiguus* were collected from European eel (*Anguilla anguilla*, Teleostei) in the river Weser near Gimte (Germany). Total RNA extraction was performed using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen) with five individuals. For both, the *P. ambiguus* and *Seison* spec. sample, RNA quality and concentration was checked on a denaturing 1.2% agarose/formaldehyde gel. Synthesis of ds cDNA was performed using the MINT Universal Kit (Evrogen), applying protocol II and 25 PCR cycles for 2nd strand synthesis. Subsequently, ds cDNA was purified using the QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen). The quality of ds cDNA was checked on the BioAnalyzer 2100 (Agilent) using a DNA High Sensitivity Chip. ESTs were sequenced using a Roche 454 Genome Sequencer FLX instrument. Due to the limited number of *Seison* specimens and a consequently small amount of input material for this taxon, we performed two different amplification approaches prior to sequencing. The cDNA used in the first sequencing run was subjected to an amplification step using the GenomePlex® Whole Genome Amplification (WGA) Kit (Sigma-Aldrich) prior to library preparation. For the second sequencing run the cDNA was amplified using the primer binding sites on the adapter molecules of the MINT-Universal Kit (M1-Primer). Sequencing of *P. ambiguus* ESTs was performed in the Max Planck Institute for Plant Breeding Research in Berlin (www.mpipz.mpg.de), sequencing of *Seison* spec. ESTs was performed by GENTERprise Genomics (www.genterprise.de).

For *A. vaga* and *B. manjavacas*, total RNA was isolated from clonal cultures using the RNAqueous Micro Kit (Ambion). *A. vaga* RNA was treated with Terminator 5'-Phosphate Dependent Exonuclease (Epicentre). Synthesis of cDNA with first strand primer 5' CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAT TTT TTT TTT TTT TTT UVN 3' made use of the template switching property of Superscript II (Invitrogen) to incorporate barcoded, biotinylated 5' adapters that matched the "A" sequence primers used in 454 FLX pyrosequencing (5' GCC TCC CTC GCG CCA TCA Gxx xxx GG, where xxxxx is CACTG for *B. manjavacas* and ATCAG for *A. vaga*). To prepare libraries for pyrosequencing (Roche 454 Genome Sequencer FLX), 3–5 µg cDNA was sheared using an Aeromist Nebulizer (Allied Healthcare Products) for 3–4 min at 50psi N2, and the biotinylated 5'

EST ends of the fragmented library were captured with Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen). The captured DNA was end repaired using a Quick Blunt Kit (New England BioLabs) and ligated to a modified 454 FLX "B" adapter (AAG CCT TGC CAG CCC GCT CAG T) following A-tailing with *Taq* polymerase.

EST processing

EST processing and assembly were performed at the Centre for Integrative Bioinformatics Vienna (deep-phylogeny.org) for all 19 species. EST data of four species *Seison* spec., *P. ambiguus*, *A. vaga* and *B. manjavacas* were newly attained in our study. Novel data for *P. laevis* were combined with already published EST data of that species. For the remaining 14 species in the phylogenetic analysis, ESTs were collected from public sequence resources such as the NCBI Trace Archive, dbEST (NCBI) or Gene Index Project and subsequently assembled into contigs as previously described [4], [53].

Processing of EST data included quality clipping, vector and adapter removal, poly-A removal and repeat masking. To this end we combined the programs Cross_match version 0.990329 (www.phrap.org), Lucy [54], SEQCLEAN (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/software/>) and RepeatMasker version open-3.1.6 (<http://www.repeatmasker.org>), in an in-house data processing workflow, using the databases UniVec (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/UniVec.html>) and RepBase [55]. Assembly was performed with MIRA v3.0.3 [56] or TGICL [57]. The results of processing and assembly are summarized in Table S1. Raw sequence data have been deposited in the Sequence Read Archive (SRA) for *Seison* spec., *P. ambiguus*, *A. vaga*, and *B. manjavacas* (accession numbers PRJEB1659, PRJEB1598, SRR800763, and SRR801079, respectively). New EST data of *P. laevis* used for phylogenetic reconstructions were deposited at EMBL under the accession numbers FO680693 - FO681285.

Data set compilation

The collection of datasets used in this study is summarized in Table 1. Further details are provided in Table S2. For ortholog search, we used a pre-defined set of 1,253 ortholog groups [58] (lophotrochozoa_hmmer3, downloaded from <http://www.deep-phylogeny.org/hamstr/download/datasets/hmmer3/>) comprising sequences from the following species: *Schistosoma mansoni*, *Lotia gigantea*, *Helobdella robusta*, *Capitella capitata*, *Caenorhabditis elegans*, *Daphnia pulex* and *Apis mellifera*. We then used HaMStR [58] to extend these ortholog groups with sequences from the remaining species to be studied. We could extend 1,180 ortholog groups by adding sequences from our EST data sets. The orthologs for each protein were aligned with MAFFT [59] and the alignment was post-processed with GBLOCKS [60] using low stringency parameters as pre-defined on the GBLOCKS Server webpage (<http://molevol.cmima.csic.es>). Subsequent concatenation resulted in a supermatrix of 19 taxa and 1,180 genes. To find a subset of genes suitable for phylogenetic reconstructions, we applied MARE v0.1-rc (MAtrix REDuction) [61]. This tool uses quartet mapping with extended geometry mapping to assign information content to a protein sequence. Additionally, data availability is taken into account using matrix reduction (e.g., keeping only genes that are available for at least 4 taxa). Using parameters $t = 2$ and $d = 1.0$, we compiled a reduced matrix "mintax4" (410 genes; Table 1). We also compiled a more stringent data set by only keeping genes for which at least 8 species contributed sequence information ("mintax8"; 272 genes; Table 1). The datasets "mintax4" and "mintax8" contained 51 and 50 ribosomal protein (RP) sequences, respectively. Given the occasionally questioned usefulness of RP

data for phylogenetic analyses (e.g., [5], [62]) we also compiled “non-RP” data sets by deleting all RP sequences, resulting in data sets “mintax4_noRPs” and “mintax8_noRPs” (Table 1). Based on the 410-gene matrix “mintax4”, we eventually compiled a “most purposive subset” (“MPS”; Table 1). Here we selected from “mintax4” only those genes that were represented by at least one sequence in each taxon needed to address the question of internal syndermatan relationships. More precisely, we assigned our species to one of the following five groups: Acanthocephala ($n = 3$), Seisonidea ($n = 1$), Bdelloidea ($n = 2$), Monogononta ($n = 2$) and non-syndermatans ($n = 11$). Again, a modified data set without RP sequences was compiled as well (“MPS_noRPs”; Table 1). To address potential long-branch attraction (LBA) phenomena, we furthermore compiled a data set including only slowly evolving genes from the “mintax4” data set (“mintax4_slow”; Table 1). Evolutionary rates of the genes were approximated as described by Ebersberger et al. [53]. In brief, we used RAXML with the LG +I +G +F model to infer for each gene a maximum likelihood tree using only the primer taxon sequences. The total branch lengths of the resulting trees were then used as a proxy for the evolutionary rate of the corresponding gene. “Fast evolving” genes with values exceeding the 75% quantile were then excluded (see Figure S1).

In a complementary approach to reduce branch lengths, we deleted alignment positions suspected of causing long branches and, correspondingly, LBA artifacts. In detail, we removed two types of positions, (i) where at least one of the aligned sequences exhibited a unique amino acid (private character or “singleton”) and (ii) where at least one pair of sequences shared an amino acid that is different from the amino acid seen in all other sequences (“dingleton”). Gaps were not considered. The goal was to reduce

the lengths of terminal branches representing fast evolving species and, hence, to avoid artifacts from potential LBA. Note that this data modification is rather conservative as true phylogenetic signal can also be erased. Thus, when reproducing results even under these strict conditions, a certain topology can be regarded as robust and not due to LBA. Prior to these alignment modifications we reduced the number of species within Syndermata to one species per syndermatan subgroup, thus avoiding potential effects from unequal subgroup sampling (data set names with extension “4Synd”). For each syndermatan subgroup, we kept the taxon with the highest data coverage in the “mintax4” data set (Table S2).

Determining substitution models and partitions

Best-fitting substitution models for the individual data were determined using ProtTest 2.4 [63] and the Akaike information criterion (AIC) [64]. For the concatenated “MPS” and “MPS_noRPs” data sets, LG [65] and rtREV [66], were determined as the first and second best fitting models of protein evolution, both with modelling invariant sites (option *I*), gamma distributed rate across sites (option *G*) and empirical base frequencies (option *F*). For the data sets with altered taxon sampling and those diminished by deleting “singletons” and “dingletons”, the LG model +*I*+*G*+*F* was selected. For the larger data sets (“mintax4”, “mintax8”, “mintax4_noRPs”, “mintax8_noRPs”, “mintax4_slow”), the best fitting evolutionary models were determined for each single protein alignment. Subsequently, the two best substitution models were extracted for every protein. Depending on their best-fit model the proteins were then assigned to eight different partitions (Blosom62, cpREV, Dayhoff, JTT, LG, rtREV, VT, WAG). Since the LG model was not implemented in MrBayes, the second best-fit models were used for the respective proteins. Hence the data set was subdivided into seven partitions (Blosom62, cpREV, Dayhoff, JTT, rtREV, VT, WAG) for MrBayes analysis. Options *I*, *G*, and *F* were used for all partitions in all subsequent tree reconstructions. For an overview of assigned substitution models and partitions see Table S3.

Phylogenetic analyses

For tree reconstructions, we employed two maximum likelihood based programs (Treefinder [67], RAXML 7.2.8 [68]) and two Bayesian approaches (MrBayes 3.2.1 [69], [70], PhyloBayes 3.2b [71]). Statistical branch support was assessed by rapid bootstrapping [72] in RAXML (100 replicates), by LR-ELW edge support in TreeFinder (local rearrangement expected likelihood weights, approximate bootstrapping; 1,000 replicates) and by the Bayesian posterior probabilities.

For MrBayes analyses, we sampled every 100th out of a total of 1,000,000 generations for data sets <20,000 positions and every 10th out of 100,000 generations for data sets comprising >20,000 positions. Two parallel runs were carried out for all data sets, and we tested for convergence of the results by assessing the standard deviation of the split frequencies (StdDev). StdDev was <0.01 for all analyses except mintax4 (StdDev = 0.02) and mintax8 (StdDev = 0.01). In the MrBayes analyses of the partitioned data sets, all parameters (statefreq, revmat, shape, pinvar) were separately determined for each partition. Overall rate variation was allowed to be different across partitions by setting the ratepr parameter to variable. To allow for burn-in of the tree search, we discarded the first 25% of sampled trees in each analysis.

PhyloBayes analyses employing the CAT model were performed running two or three independent runs, each for a minimum of 16,000 generations. After a pairwise check for convergence using bpcmp from the PhyloBayes package, the

Table 1. Overview of data sets and performed phylogenetic analyses

Data set	# proteins	# aa	analyses*
mintax4	410	76,652	1A, 2A, 3B, 4C
mintax4_noRPs	359	68,645	1A, 2A, 3B, 4C
mintax8	272	49,091	1A, 2A, 3B, 4C
mintax8_noRPs	222	41,296	1A, 2A, 3B, 4C
MPS	101	16,496	1D, 2D, 3E
MPS_noRPs	54	9,350	1D, 2D, 3E
mintax4_slow	307	60,753	1A
mintax4_4Synd	410	76,652	1D
mintax4_4Synd-DS	410	32,341	1D

The phylogenomic data sets mintax4 and mintax8 comprise a broad range of ortholog protein sequences detected using HaMStR and selected using MARE (keeping only genes that are available for at least four or eight taxa, respectively). The most purposive subset (MPS) data set comprises a fraction of the ortholog proteins in the mintax4 data set, that were at least partially covered by at least one representative per syndermatan subgroup plus one non-syndermatan species. Three additional data sets were compiled by excluding ribosomal proteins from the former mentioned protein selections (mintax4_noRPs, mintax8_noRPs, and MPS_noRPs). To account for potential long-branch attraction (LBA) errors, a data set comprising rather slowly evolving genes out of the mintax4 data set was compiled (mintax4_slow). Data set mintax4 was also modified by keeping only one species per syndermatan subgroup (*_4Synd) and subsequently diminished by deleting “singletons” and “dingletons” (*-DS). For each data set, the numbers of protein sequences (“# proteins”) and amino acid positions (“# aa”) are indicated. Performed analyses are encoded by numbers for the used programs (1 = RAXML, 2 = TreeFinder, 3 = MrBayes, 4 = PhyloBayes) and letters for the used substitution models (A = 8 partitions, B = 7 partitions, C = CAT, D = LG+I+G+F, E = rtREV+I+G+F). For details see text and Supporting Information.

doi:10.1371/journal.pone.0088618.t001

consensus tree was built from the two runs with the smallest discrepancy observed across all bipartitions, discarding the first 1,000 trees as burn-in and sampling every second tree.

Results

Broad-scale reconstruction of syndermatan phylogeny

Initially, two different phylogenomic data sets were compiled for the 19 species sampled, containing proteins that were represented by orthologs of at least four or eight species, respectively. These phylogenomic data sets “mintax4” (410 genes, 76,652 positions) and “mintax8” (272 genes spanning 49,091 positions) included sequences of 51 and 50 RPs, respectively (equal to 10–20% of the amino acid positions). The suitability of RPs for phylogenetic reconstructions was lately called into question because of the suspicion of introducing a bias by “relying on a set of markers belonging to a single class of macromolecular complexes” [62] or by a compositional heterogeneity (i.e. deviating amino acid compositions) of RPs for certain taxa [5]. Therefore, two additional data sets were compiled by excluding RP sequences. Using these data sets we investigated whether RP sequences within the larger phylogenomic supermatrices were capable of influencing the resulting tree topologies or statistical support values. The resulting data sets comprised protein sequences for 359 genes (68,645 positions; “mintax4_noRPs”) and 222 genes (41,296 positions; “mintax8_noRPs”), respectively (Table 1). In a third approach we compiled a data set solely composed of proteins available for all taxa, which were central to the most important phylogenetic question at hand (i.e. the relationships of syndermatan subgroups). We thus split the taxa into five groups (Seisonidea, Bdelloidea, Monogononta, Acanthocephala, and non-syndermatans) and identified genes out of the mintax4 data set that were available for at least one member of each group. These genes were compiled into two data sets: a “most purposive subset” (MPS) data set (101 genes, 16,496 amino acid positions) and a “MPS_noRPs” data set lacking all RP sequences (54 genes, 9,350 amino acid positions).

Regardless of the data set and tree reconstruction method used, the consensus trees supported the same syndermatan topology (Fig. 2, Table S4). For the data sets mintax4 and mintax8 (with or without RP sequences included), statistical support strongly suggested a sister group relationship of Seisonidea and Acanthocephala (= Pararotatoria; ML bootstrap/ELW support 99–100%; Bayesian posterior probability 100%; Fig. 2). The analyses further supported paraphyletic Eurotatoria, with Bdelloidea as the sister group of Pararotatoria (= Hemirotrifera; Fig. 2). While support values for Hemirotrifera were high using the mintax4 and mintax8 data sets (with or without RP sequences included; ML bootstrap/ELW support 82–99%; Bayesian posterior probability 100%; Fig. 2), monophyletic Gnathifera (Syndermata + Gnathostomulida) were recovered with only moderate support (ML bootstrap/ELW support 54–91%; Bayesian posterior probability 84–100%; Fig. 2). Analyses of the MPS data sets (with or without RP sequences included) provided weaker support for Pararotatoria (ML bootstrap/ELW support 69–100%; Bayesian posterior probability 100%; Fig. 2) and Hemirotrifera (ML bootstrap/ELW support 47–71%; Bayesian posterior probability 99–100%; Fig. 2) and did not produce monophyletic Gnathifera. Finally, the phylogenetic position of the single gastrotrich species in our analyses, *T. ambronensis*, varied throughout the different tree reconstructions (Table S4). The same was observed for the branching order at the base of the Platyhelminthes clade.

Focusing on slowly evolving proteins and addressing potential LBA

To assess how the exclusion of fast-evolving genes influences our phylogenetical conclusions, we removed the 25% fastest evolving genes from mintax4, resulting in dataset “mintax4_slow” (Figure S1). Notably, we observed the same syndermatan topology and almost identical support values for Pararotatoria, Hemirotrifera, Syndermata and Gnathifera (Fig. 3A and B).

To further account for potential LBA errors in our tree reconstructions, we conducted additional RAXML analyses on a modified mintax4 data set containing only 4 syndermatan species (data set mintax4_4Synd). This was done to create a balanced representation of the 4 syndermatan subgroups, concomitantly maximizing sequence coverage. We then pruned from this alignment all columns containing private characters, unique to one species (“singletons”), and also those where sequence pairs shared a deviating character state (“dingletons”). This was intended to remove sites contributing to long branches and their potential for attracting each other by convergent substitutions. The resulting data set was named mintax4_4Synd-DS. Both approaches (mintax4_4Synd, mintax4_4Synd-DS) recovered the well-supported syndermatan relationships previously seen in the standard analyses (see Fig. 3B and D; see also Table S4). Note, that decreasing taxon sampling within Syndermata (mintax4_4Synd) substantially reduced bootstrap support for nodes of the internal syndermatan topology (Fig. 3C). Interestingly, this effect was counterbalanced by the deletion of “singletons” and “dingletons” (-DS), which resulted in substantially reduced branch lengths, and re-established bootstrap support values >85 for the internal nodes (Fig. 3D). Taken the results of all datasets together, we consistently observed monophyletic Pararotatoria, Hemirotrifera, and Syndermata irrespective of the diverse alignment modifications and tree reconstruction methods used.

Phylogenetic relations beyond Syndermata

Our data was particularly designed for resolving syndermatan phylogeny. Still it is noteworthy, that monophyletic Gnathifera could only be observed with moderate support in all phylogenetic analyses except for those based on the MPS, MPS_noRPs and mintax4_4Synd-DS datasets (Table S4). The position of the gastrotrich species varied throughout the analyses, without affecting syndermatan topology. Finally, evolutionary relationships within Platyhelminthes were stable throughout the analyses and in most parts maximally supported (Figs. 2 and 3). The topology of the platyhelminth subtree agreed with the generally accepted monophyletic origin of the parasitic flatworm groups (i.e. Cestoda, Trematoda and Monogenea; summarized as Neodermata) and a paraphyletic status of free-living “Turbellaria” (see [73] for a detailed discussion about proposed hypotheses). Seriatia appeared as sister group to Neodermata in our trees, whereas the other “turbellarian” species (*Paraplanocera spec.* and *Macrostomum lignano*) split off at the base of the flatworm clade. The only inconsistency within the flatworm clade among our analyses proved to be the variable branching pattern of these two flatworm species (see Table S4).

Discussion

Syndermatan phylogeny and implications for the evolution of parasitism

We have conducted the to-date most comprehensive phylogenomic analysis of syndermatan relationships, for the first time including large-scale molecular data for Seisonidea, and hence for all higher-ranked clades of this animal group. Tree reconstructions

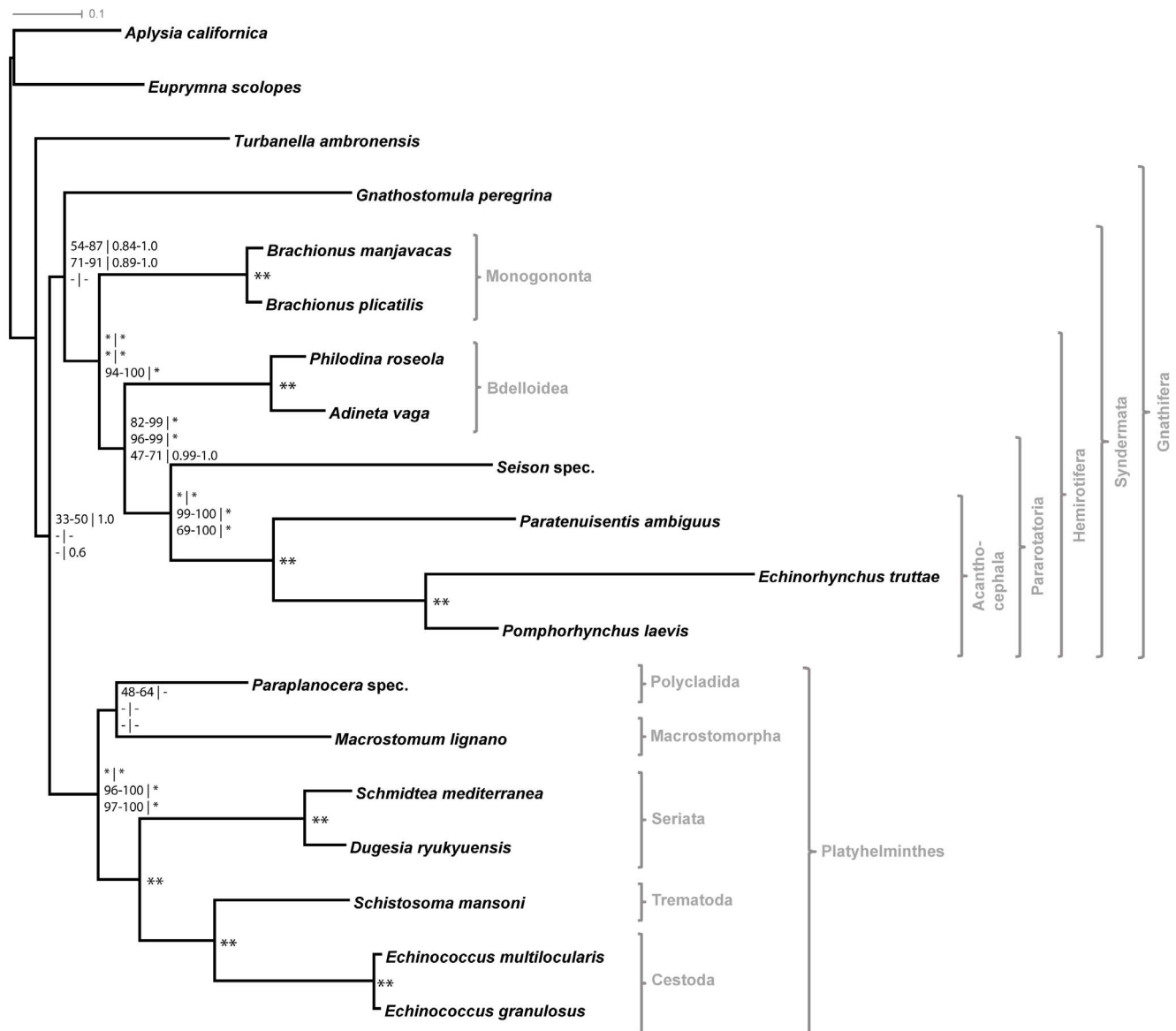


Figure 2. Phylogenetic relationships obtained with different phylogenomic data sets. Tree and branch lengths represent results of the TreeFinder analysis of the partitioned mintax4 data set. Node labels represent minimum and maximum support values of analyses of the phylogenomic data sets (mintax4, mintax8; upper row), phylogenomic data sets without RPs (mintax4_noRPs, mintax8_noRPs; middle row), and most purposive subset (MPS) data sets (with or without RPs; lower row). For further details see Table S4. ML bootstrap and ELW support (RAXML, TreeFinder) | PP values (MrBayes, PhyloBayes). A star denotes maximum support, a double star denotes maximum support in all analyses. doi:10.1371/journal.pone.0088618.g002

on 9 different phylogenomic data sets using 4 different tree reconstruction methods reveal a consistent view on syndermatan phylogeny. The analyses provide strong support for the monophyly of Syndermata (Monogononta + Hemirotifera), Hemirotifera (Bdelloidea + Pararotatoria) and Pararotatoria (Seisonidea + Acanthocephala). Our results thus contradict previous hypotheses of monophyletic Eurotatoria (Bdelloidea + Monogononta) and Lemniscea (Acanthocephala + Bdelloidea). Mapping lifestyles on the newly inferred tree topology, the most parsimonious evolutionary scenario is the following (Fig. 4): the obligate endoparasitism of Acanthocephala evolved from free-living ancestors via an epizoid, possibly even ectoparasitic stage as represented by extant species of Seisonidea. A similar scenario has also been hypothesized for the evolution of parasitism within neodermatan

Platyhelminthes [74–76], where the vast majority of Trematoda and Cestoda are endoparasites while Monogenea exhibit an ectoparasitic lifestyle. Since there is growing molecular evidence for a paraphyletic status of Monogenea [75–78], the most probable scenario for the evolution of parasitism within this flatworm clade is an ectoparasitic neodermatan progenitor and subsequent shifts towards endoparasitism on the trematode/cestode branch [75], [76].

Considering the host spectra of Seisonidea and Acanthocephala and assuming that the situation in Seisonidea represents the ancestral state (see Fig. 4), marine arthropods probably were the hosts of early acanthocephalans. These initial hosts then became intermediate hosts, following the introduction of marine fish-like gnathostomes or vertebrates as additional definitive hosts [26],

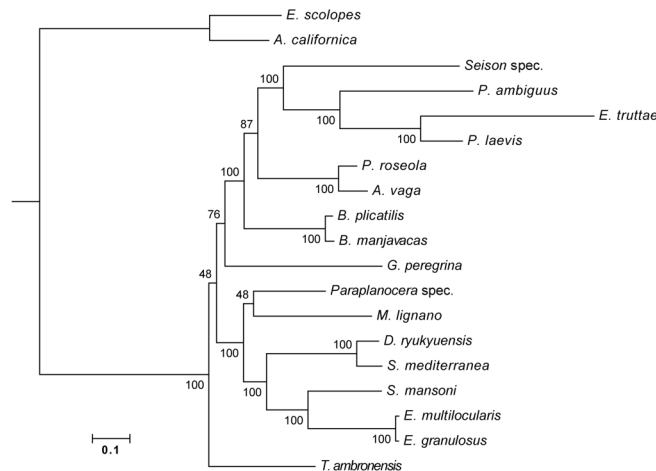
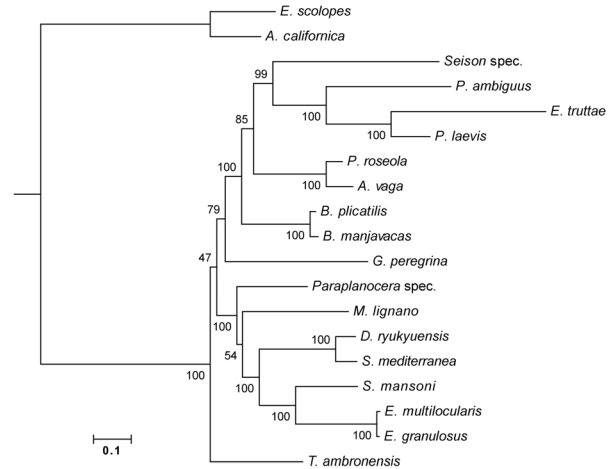
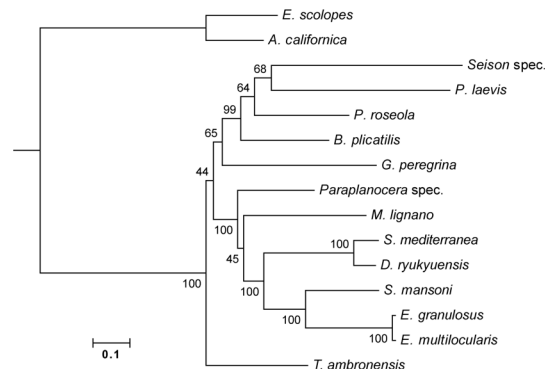
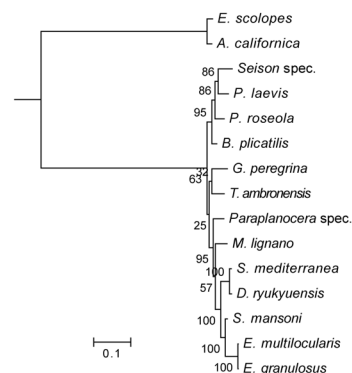
[A] mintax4 (partitioned model)**[B] mintax4_slow (partitioned model)****[C] mintax4_4Synd (LG model)****[D] mintax4_4Synd-DS (LG model)**

Figure 3. Comparison of branch lengths obtained with different data sets. Results of RAxML analyses based on [A] mintax4 data set, [B] mintax4_slow data set, [C] mintax4 data set with reduced taxon sampling within Syndermata (mintax4_4Synd), and [D] mintax4_4Synd data set excluding “singletons” and “dingletons” (mintax4_4Synd-DS).
doi:10.1371/journal.pone.0088618.g003

[79], [80]. With the diversifying evolution of the host-species, acanthocephalans established a broadened host spectrum and extended their distribution to limnic and terrestrial habitats [26], [79], [80]. The successive recruitment of arthropods and gnathostomes/vertebrates as acanthocephalan hosts is in line with principal considerations regarding the evolution of increasingly complex life-cycles, whereupon vertebrates fed on potentially infected arthropods after one-host life cycles were established [81]. Moreover, this scenario implies that the indirect development of acanthocephalans, involving the metamorphosis from a larval stage (acanthor) to a young adult (acanthella; called cystacanth when encysted) within the intermediate host [82], represents an evolutionary novelty of acanthocephalans. It is obvious that morphological traits such as the rostellar apparatus of the acanthor, a proboscis including hooks and specific musculature of infectious acanthella and adults, and a reduced digestive tract throughout all developmental stages are acanthocephalan autapomorphies that most probably evolved in the context of their endoparasitic lifestyle [18], [22], [50], [79], [83] (Fig. 4). We would like to point out that presumed morphological peculiarities of acanthocephalans such as anastomoses between the epidermal rete system and hollow muscle fibres [84] were not observed in follow-up investigations of praesomata of different acanthoceph-

alan species [43] and may therefore not represent a genuine morphological character of acanthocephalans.

Our phylogenetic tree is in line with the proposed ultrastructural autapomorphies of Pararotatoria, i.e. epidermal fibre bundles and dense bodies in the spermatozoa [22], [23]. We further suggest that the last common ancestor of Pararotatoria reproduced strictly sexually, whereas monogononts and bdelloids retained or independently evolved the ability for parthenogenesis (for a more detailed view on character distribution, see Table 13.1 in [85]). The last common ancestor of Pararotatoria may further have had a reduced rotatory organ or corona. This can easily be explained by a reduction of the character after its emergence in the stem lineage of Syndermata [10] (Fig. 4). However, the rotatory or wheel-organ is not the only example of a putative emergence and subsequent loss of complex morphological traits in syndermatan evolution. Weber et al. [44] mapped the occurrence of apical and lateral sense organs in acanthocephalans onto a tree topology obtained from complete mitochondrial genome data and revealed a “come and go” distribution among the acanthocephalan lineages. Finally, a retractable anterior end, whether called rostrum or proboscis, might represent an evolutionary novelty of Hemirotrifera [10] (Fig. 4).

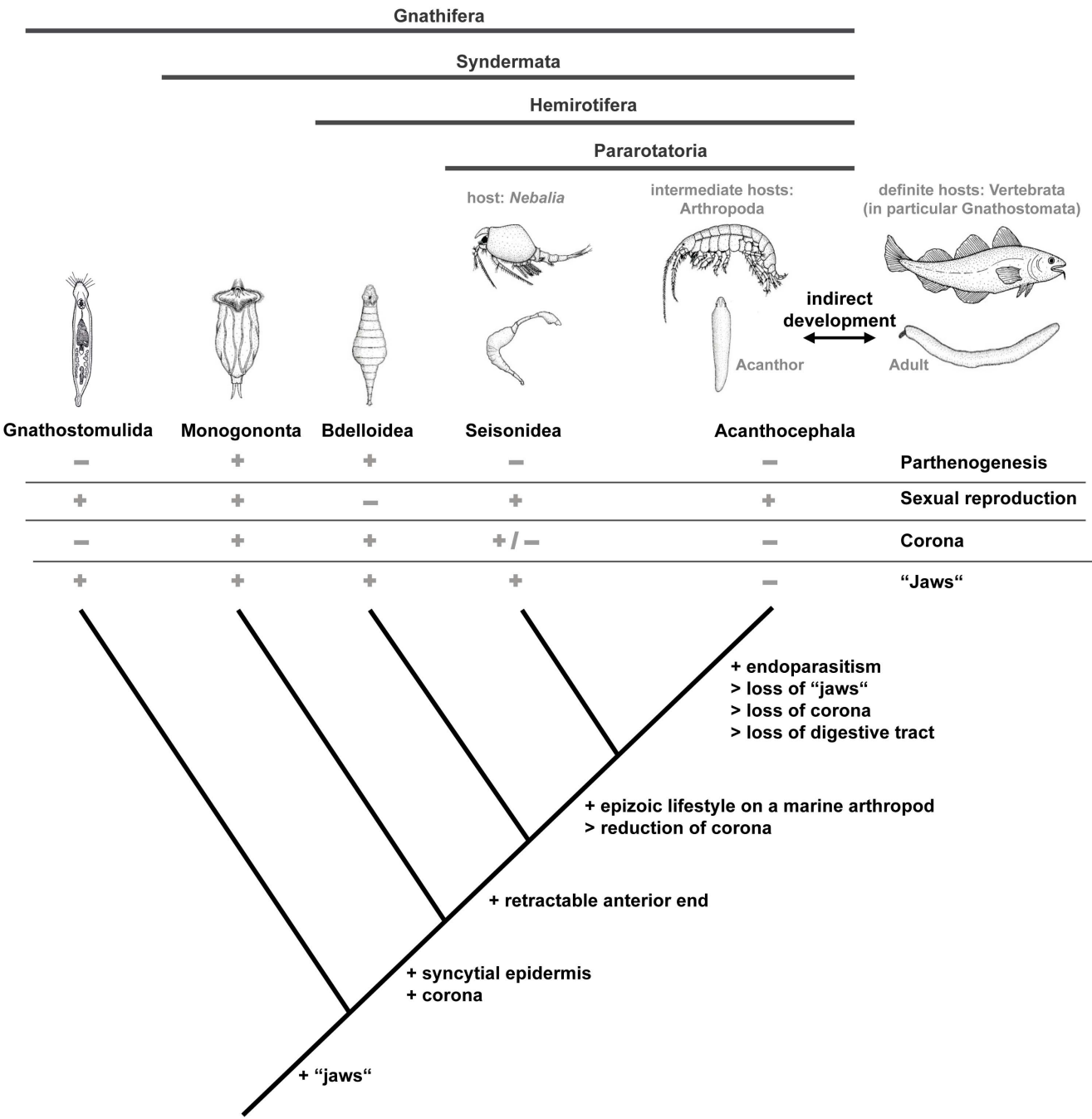


Figure 4. Implications for character evolution in Syndermata. Morphological and biological features of representatives of Syndermata and Gnathostomulida were projected on our phylogenetic tree (see Figs. 2 and 3). Present features are denoted with a plus, absent features are denoted with a minus. The corona in Seisonidea is reduced (denoted with plus/minus). The pictogram of Gnathostomulida has been modified from biodidac.bio.uottawa.ca. Pictograms of other representatives: courtesy of Bernd Baumgart (Göttingen, Germany). doi:10.1371/journal.pone.0088618.g004

Influence of long branches on syndermatan phylogeny

In molecular phylogeny, syndermatan taxa are well known to display long branches, probably caused by fast sequence evolution, which might lead to erroneous tree topologies due to the LBA artifact (e.g., [2], [78], [86]). A substantial reduction of branch lengths and therefore of the potential impact of LBA could be observed when removing "singletons" and "dingletons" from the data set (Fig. 3D). However, deleting those alignment sites not only shortens branch lengths, but also potentially removes positions

containing true phylogenetic signal. Despite this possibility, we observed that this approach resulted in substantially increased support values for Pararotatoria and Hemirotrifera compared to the tree based on the mintax4_4Synd data set (Fig. 3C and D). In summary, the robustness of the branching order within Syndermata irrespective of taxon composition and data set modifications (Figs. 2 and 3, Table S4) lends strong support to the assumption that our tree topology is most likely not heavily compromised by LBA artifacts.

Towards understanding deeper phylogenetic relationships of Syndermata

Together with other small animal taxa (Gnathostomulida, Micrognathozoa and, possibly, Cyclophora), Syndermata hypothetically form the superordinate taxon Gnathifera, which is characterized by pharyngeal hard parts (“jaws”) with particular supportive rods as an eponymous evolutionary novelty (e.g. [22], [87], [88]; see also [89]). Monophyly of Gnathifera was also obtained in molecular phylogenetic studies [2], [6], [31]. In particular, RP sequence data revealed moderate to good statistical support for monophyletic Gnathifera [2], [6]. However, depending on the applied evolutionary model and most probably due to LBA, Gnathifera artificially emerged as part of Ecdysozoa in the study of Hausdorf et al. [2]. Conceivably, such LBA phenomena could have been caused by co-evolution of RPs with rapidly evolving rRNA sequences [62]. Other multi-gene and phylogenomic analyses depicted the few sampled gnathiferan species as unstable and did not support monophyletic Gnathifera [1], [11], [12]. In the present study, some data sets produced moderate support for monophyletic Gnathifera, while others did not (ML bootstrap/ELW support 54–91%; Bayesian posterior probability 84–100%; see Figs. 2 and 3 and Table S4). Thus, LBA might have contributed to previous reports of monophyletic Gnathifera in molecular-phylogenetic reconstructions. Alternatively, the occasional observation of non-monophyletic Gnathifera in the present study (gnathostomulids appeared as sister to gastrotrichs in most of these cases, see Table S4) might be due to the extremely low data coverage of the single gastrotrich taxon, *T. ambronensis*, which amounted to only 8.7% and 13.3% in the phylogenomic data sets mintax4/8 (Table S2). It is well known that such low data coverage, especially in combination with the absence of closely related taxa (here: other gastrotrichs) in the data set, can potentially affect accuracy of molecular phylogenies [14]. This issue, and whether other taxa such as Micrognathozoa and Cyclophora belong to putative Gnathifera as well, will be the subject of future research. This also pertains to the affiliations of putative Gnathifera within the metazoan tree, e.g. the hypothetical super-taxon Platyzoa [9].

The example of syndermatan phylogeny shows that improvements in taxon and data coverage, along with the approach to compile different data sets with variable properties, can lead to stable and reliable solutions for phylogenetic questions, even if long branches are involved. The addition of the species *P. ambiguus* and *Seison* spec. efficiently disrupted the long branch leading to Acanthocephala and made tree reconstructions more reliable compared to previous studies. Also, support values were higher the more syndermatan species were involved (compare Fig. 3A and C). Increasing transcriptome data availability for syndermatan species thus is an initial step towards resolving the Gnathifera and Platyzoa questions. Improved data collection within Gastrotricha and Gnathostomulida has been initiated and will facilitate to reasonably address these deep phylogenetic hypotheses.

Supporting Information

Figure S1 Evolutionary rates of the HaMStR core orthologs and the orthologs contained in the datasets. Box plots depict the median, minimum and maximum evolutionary rates (as calculated from tree lengths) for the gene orthologs, which make up the individual phylogenomic datasets. For definition of these datasets, see Material and Methods. (PDF)

Table S1 Results of EST processing and assembly. For all newly sequenced species, the applied sequencing method, total

number of sequencing reads, number of reads discarded during preprocessing and total number of cleaned ESTs are given. Reads were discarded during pre-processing if they (i) did not exceed the minimum length of 100 bp after adapter and quality trimming, (ii) contained more than 3% of undetermined bases, (iii) were mainly of low complexity, or (iv) other reasons. The cleaned ESTs were assembled using MIRA v3.0.3 or TGICL, the number of contigs, number of single reads as well as the length of the largest contig and N50 size of the assembly are denoted. SC = standard chemistry, TC = Titanium chemistry, n.d. = not determined. (PDF)

Table S2 Dataset coverage of single taxa (% amino acid positions, number of proteins). For the different species used in our study, the values display the percentage to which extent these taxa are covered in terms of amino acid positions and number of proteins used in the concatenated alignments of the phylogenomic datasets. These datasets are further specified in Material and Methods. (PDF)

Table S3 Assignment of substitution models and composition of the phylogenomic datasets. The matrix specifies (i) which ortholog (listed by its ID) is present in which of the phylogenomic datasets and (ii) the best and the second-best substitution model for calculating a respective phylogenetic tree. Ribosomal proteins are denoted by their short designations (e.g. S18) and their corresponding *Caenorhabditis elegans* gene name. The phylogenomic datasets are further specified in Material and Methods. (PDF)

Table S4 Support values for internal nodes, position of Turbanella and position of Paraplanocera spec. and M. lignano obtained by all analyses. Statistical support values as obtained from four different phylogenetic reconstruction programs are given for the phylogenomic datasets, defined in detail in Material and Methods. Taxon abbreviations are: S = *Seison*, A = Acanthocephala, B = Bdelloidea, M = Monogononta, Syn = Syndermata, G = Gnathostomulida, T = *Turbanella ambronensis*. (*) Possible phylogenetic positions for the gastrotrich *Turbanella ambronensis* (= "*Turbanella* ") are: 1 = sister to (Platyhelminthes + Syndermata + Gnathostomulida), 2 = sister to Gnathifera, 3 = trichotomy (Mollusca, *Turbanella*, (Platyhelminthes + Gnathifera)), 4 = sister to Platyhelminthes, 5 = clade (*Turbanella* + *Gnathostomula*) sister to Syndermata, 6 = sister to Syndermata, 7 = clade (*Turbanella* + *Gnathostomula*) sister to Platyhelminthes. (PDF)

Acknowledgments

We would like to thank Drs. Richard Reinhardt and Kurt Stüber (Max Planck Institut für Genetik, Berlin) for carrying out some of the 454 sequencing runs. The authors also gratefully acknowledge the workgroup of Prof. Dr. Arndt von Haeseler (Center for Integrative Bioinformatics Vienna), especially Dr. Sascha Strauss and Peter Schmitzberger, for carrying out EST data processing and assembly for the Deep Metazoan Phylogeny consortium. We further gratefully acknowledge Dr. Andrea Šimková (Department of Zoology and Ecology, Masaryk University) for generously providing specimens of *P. laevis* from the Buech River (France), Dr. Sanja Ramljak (Institute of Clinical Research and Development, Mainz, Germany) for helping with collecting *Seison* specimens and Drs. Yvan Perez (Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie, Marseille), Julie Poulain and Carole Dossat (Genoscope, Évry) for sequencing, processing and generously providing additional *P. laevis* ESTs.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ARWF HH TH. Performed the experiments: ARWF HH. Analyzed the data: ARWF BR DR IE.

References

- Dunn CW, Hejnol A, Matus DQ, Pang K, Browne WE, et al. (2008) Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452: 745–749.
- Hausdorf B, Helmkamp M, Nesnidal MP, Bruchhaus I (2010) Phylogenetic relationships within the lophophorate lineages (Ectoprocta, Brachiopoda and Phoronida). *Mol Phylogenet Evol* 55: 1121–1127.
- Hejnol A, Obst M, Stamatakis A, Ott M, Rouse GW, et al. (2009) Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proc Biol Sci* 276: 4261–4270.
- Meusemann K, von Reumont BM, Simon S, Roeding F, Strauss S, et al. (2011) A phylogenomic approach to resolve the arthropod tree of life. *Mol Biol Evol* 27: 2451–2464.
- Nesnidal MP, Helmkamp M, Bruchhaus I, Hausdorf B (2010) Compositional heterogeneity and phylogenomic inference of metazoan relationships. *Mol Biol Evol* 27: 2095–2104.
- Witek A, Herlyn H, Ebersberger I, Mark Welch DB, Hankeln T (2009) Support for the monophyletic origin of Gnathifera from phylogenomics. *Mol Phylogenet Evol* 53: 1037–1041.
- Struck TH, Fisse F (2008) Phylogenetic position of Nemertea derived from phylogenomic data. *Mol Biol Evol* 25: 728–736.
- Edgecombe GD, Giribet G, Dunn CW, Hejnol A, Neves RC, et al. (2011) Higher-level metazoan relationships: Recent progress and remaining questions. *Org Divers Evol* 11: 151–172.
- Cavalier-Smith T (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc* 73: 203–266.
- Witek A, Herlyn H, Meyer A, Boell L, Bucher G, et al. (2008) EST based phylogenomics of Syndermata questions monophyly of Eurotatoria. *BMC Evol Biol* 8: 345.
- Paps J, Baguna J, Riutort M (2009) Bilaterian phylogeny: a broad sampling of 13 nuclear genes provides a new Lophotrochozoa phylogeny and supports a paraphyletic basal acoelomorpha. *Mol Biol Evol* 26: 2397–2406.
- Paps J, Baguna J, Riutort M (2009) Lophotrochozoa internal phylogeny: new insights from an up-to-date analysis of nuclear ribosomal genes. *Proc Biol Sci* 276: 1245–1254.
- Philippe H, Brinkmann H, Lavrov DV, Littlewood DT, Manuel M, et al. (2011) Resolving difficult phylogenetic questions: why more sequences are not enough. *PLoS Biol* 9: e1000602.
- Wiens JJ (2006) Missing data and the design of phylogenetic analyses. *J Biomed Inform* 39: 34–42.
- Nielsen C (2012) Animal evolution: interrelationships of the living phyla. Oxford; New York: Oxford University Press. 464 p.
- Garcia-Varela M, Nadler SA (2006) Phylogenetic relationships among Syndermata inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* 40: 61–72.
- Min GS, Park JK (2009) Eurotatorian paraphyly: revisiting phylogenetic relationships based on the complete mitochondrial genome sequence of *Rotaria rotatoria* (Bdelloidea: Rotifera: Syndermata). *BMC Genomics* 10: 533.
- Minelli A (2009) Perspectives in animal phylogeny and evolution. Oxford; New York: Oxford University Press.
- Gazi M, Sultana T, Min G-S, Park YC, Garcia-Varela M, et al. (2012) The complete mitochondrial genome sequence of *Oncicola luehei* (Acanthocephala: Archiacanthocephala) and its phylogenetic position within Syndermata. *Parasitol Int* 61: 307–316.
- Lasek-Nesselquist E (2012) A mitogenomic re-evaluation of the bdelloid phylogeny and relationships among the Syndermata. *PLoS One* 7: e43554.
- Ferraguti M, Melone G (1999) Spermiogenesis in *Seison nebaliae* (Rotifera, Seisonidea): further evidence of a rotifer-acanthocephalan relationship. *Tissue Cell* 31: 428–440.
- Ahrlichs WH (1995) Ultrastruktur und Phylogenie von *Seison nebaliae* (Grube 1859) und *Seison annulatus* (Claus 1876) Hypothesen zu phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen innerhalb der Bilateria. Göttingen: Cuvillier Verlag.
- Ahrlichs WH (1997) Epidermal ultrastructure of *Seison nebaliae* and *Seison annulatus*, and a comparison of epidermal structures within the Gnathifera. *Zoomorphology* 117: 41–48.
- Ahrlichs WH (1998) Spermatogenesis and ultrastructure of the spermatozoa of *Seison nebaliae* (Syndermata). *Zoomorphology* 118: 255–261.
- Meyer A (1933) Acanthocephala. In: Bronn HG, editor. Klassen und Ordnungen des Tierreichs 4 (2/2). Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft mbH. pp. 582.
- Herlyn H, Piskurek O, Schmitz J, Ehlers U, Zischler H (2003) The syndermatan phylogeny and the evolution of acanthocephalan endoparasitism as inferred from 18S rDNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 26: 155–164.
- Littlewood D, Telford M, Clough K, Rohde K (1998) Gnathostomulida - an enigmatic metazoan phylum from both morphological and molecular perspectives. *Mol Phylogenet Evol* 9: 72–79.
- Passamaneck Y, Halanych KM (2006) Lophotrochozoan phylogeny assessed with LSU and SSU data: evidence of lophophorate polyphyly. *Mol Phylogenet Evol* 40: 20–28.
- Garey JR, Schmidt-Rhaesa A, Near TJ, Nadler SA (1998) The evolutionary relationships of rotifers and acanthocephalans. *Hydrobiologia* 387/388: 83–91.
- Mark Welch DB (2000) Evidence from a protein-coding gene that acanthocephalans are rotifers. *Invertebr Biol* 119: 17–26.
- Giribet G, Distel DL, Polz M, Sterrer W, Wheeler WC (2000) Triploblastic relationships with emphasis on the acoelomates and the position of Gnathostomulida, Cycliophora, Plathelminthes, and Chaetognatha: a combined approach of 18S rDNA sequences and morphology. *Syst Biol* 49: 539–562.
- Winnepeninckx B, Backeljau T, Mackey LY, Brooks JM, De Wachter R, et al. (1995) 18S rRNA data indicate that Aschelminthes are polyphyletic in origin and consist of at least three distinct clades. *Mol Biol Evol* 12: 1132–1137.
- Giribet G, Sørensen MV, Funch P, Kristensen RM, Sterrer W (2004) Investigations into the phylogenetic position of Micrognathozoa using four molecular loci. *Cladistics* 20: 1–13.
- Zrzavý J (2003) Gastrotricha and metazoan phylogeny. *Zool Scr* 32: 61–81.
- Sørensen MV, Giribet G (2006) A modern approach to rotiferan phylogeny: combining morphological and molecular data. *Mol Phylogenet Evol* 40: 585–608.
- Claus C (1876) Über die Organisation und systematische Stellung der Gattung *Seison* Gr. Wien: K.K. Zoologisch-Botanische Gesellschaft. 12 p.
- Grube E (1861) Ein Ausflug nach Triest und dem Quarnero. Berlin: Nicolaische Verlagsbuchhandlung. 175 p.
- Sørensen MV, Segers H, Funch P (2005) On a new *Seison* Grube, 1861 from coastal waters of Kenya, with a reappraisal of the classification of the Seisonida (Rotifera). *Zool Stud* 44: 34–43.
- Leasi F, Rouse GW, Sørensen MV (2012) A new species of *Paraseison* (Rotifera: Seisonacea) from the coast of California, USA. *J Mar Biol Assoc UK* 92: 959–965.
- Markevich GI (1993) SEM observations on *Seison* and phylogenetic relationships of the Seisonidea (Rotifera). *Hydrobiologia* 255: 513–520.
- Ricci C, Melone G, Sotgia C (1993) Old and new data on Seisonidea (Rotifera). *Hydrobiologia* 255/256: 495–511.
- Marotta R, Leasi F, Uggetti A, Ricci C, Melone G (2010) Dry and survive: morphological changes during anhydrobiosis in a bdelloid rotifer. *J Struct Biol* 171: 11–17.
- Herlyn H, Martini N, Ehlers U (2001) Organisation of the praesoma of *Paratenuisensis ambiguus* (Van Cleave, 1921) (Acanthocephala: Eoacanthocephala), with special reference to the lateral sense organs and musculature. *Syst Parasitol* 50: 105–116.
- Weber M, Wey-Fabrizius AR, Podsiadlowski L, Witek A, Schill RO, et al. (2013) Phylogenetic analyses of endoparasitic Acanthocephala based on mitochondrial genomes suggests secondary loss of sensory organs. *Mol Phylogenet Evol* 66: 182–189.
- Lorenzen S (1985) Phylogenetic aspects of pseudocoelomate evolution. In: S CM, George JD, Gibson R, Platt HM, editors. The origins and relationships of lower invertebrates. Oxford: Clarendon Press. pp. 210–223.
- Ricci C (1998) Are lemnisci and proboscis present in the Bdelloidea? *Hydrobiologia* 387: 93–96.
- Clement P (1993) The phylogeny of rotifers: molecular, ultrastructural and behavioural data. *Hydrobiologia* 255/256: 527–544.
- Nielsen C (1995) Animal evolution: interrelationships of the living phyla (1st Edition). Oxford; New York: Oxford University Press. 476 p.
- Melone G, Ricci C, Segers H, Wallace RL (1998) Phylogenetic relationships of phylum Rotifera with emphasis on the families of Bdelloidea. *Hydrobiologia* 387: 101–107.
- Herlyn H, Ehlers U (2001) Organisation of the praesoma in *Acanthocephalus anguillae* (Acanthocephala, Palaeacanthocephala) with special reference to the muscular system. *Zoomorphology* 121: 13–18.
- Sørensen MV (2002) On the evolution and morphology of the rotiferan trophi, with a cladistic analysis of Rotifera. *J Zool Syst Evol Res* 40: 129–154.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410.
- Ebersberger I, de Matos Simoes R, Kupczok A, Gube M, Kothe E, et al. (2012) A consistent phylogenetic backbone for the fungi. *Mol Biol Evol* 29: 1319–1334.
- Chou HH, Holmes MH (2001) DNA sequence quality trimming and vector removal. *Bioinformatics* 17: 1093–1104.
- Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, et al. (2005) Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet Genome Res* 110: 462–467.
- Chevreaux B, Wetter T, Suhai S. Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information; 1999. pp. 45–56.

57. Perteu G, Huang X, Liang F, Antonescu V, Sultana R, et al. (2003) TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets. *Bioinformatics* 19: 651–652.
58. Ebersberger I, Strauss S, von Haeseler A (2009) HaMStR: profile hidden markov model based search for orthologs in ESTs. *BMC Evol Biol* 9: 157.
59. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 30: 3059–3066.
60. Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 17: 540–552.
61. Meyer B, Misof B (2010) MARE v0.1-rc. <http://mare.zfmk.de>
62. Bleidorn C, Podsiadlowski L, Zhong M, Eeckhaut I, Hartmann S, et al. (2009) On the phylogenetic position of Myzostomida: can 77 genes get it wrong? *BMC Evol Biol* 9: 150.
63. Abascal F, Zardoya R, Posada D (2005) ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21: 2104–2105.
64. Akaike H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle; 1973; Tsahkadsor, Armenian SSR. pp. 267–281.
65. Le SQ, Gascuel O (2008) An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol* 25: 1307–1320.
66. Dimmic MW, Rest JS, Mindell DP, Goldstein RA (2002) rtREV: an amino acid substitution matrix for inference of retrovirus and reverse transcriptase phylogeny. *J Mol Evol* 55: 65–73.
67. Jobb G, von Haeseler A, Strimmer K (2004) TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol Biol* 4: 18.
68. Stamatakis A (2006) RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690.
69. Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
70. Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
71. Lartillot N, Lepage T, Blanquart S (2009) PhyloBayes 3: a Bayesian software package for phylogenetic reconstruction and molecular dating. *Bioinformatics* 25: 2286–2288.
72. Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAXML web servers. *Syst Biol* 57: 758–771.
73. Littlewood TJ, Telford MJ, Bray RA (2004) Protostomes and Platyhelminthes: the worm's turn. In: Cracraft J, Donoghue MJ, editors. *Assembling the tree of life*. Oxford: Oxford University Press. pp. 209–236.
74. Zrzavý J (2001) The interrelationships of metazoan parasites: a review of phylum- and higher-level hypotheses from recent morphological and molecular phylogenetic analyses. *Folia Parasitol (Praha)* 48: 81–103.
75. Park JK, Kim KH, Kang S, Kim W, Eom KS, et al. (2007) A common origin of complex life cycles in parasitic flatworms: evidence from the complete mitochondrial genome of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Platyhelminthes). *BMC Evol Biol* 7: 11.
76. Perkins EM, Donnellan SC, Bertozzi T, Whittington ID (2010) Closing the mitochondrial circle on paraphyly of the Monogenea (Platyhelminthes) infers evolution in the diet of parasitic flatworms. *Int J Parasitol* 40: 1237–1245.
77. Mollaret I, Jamieson BG, Adlard RD, Hugall A, Lecointre G, et al. (1997) Phylogenetic analysis of the Monogenea and their relationships with Digenea and Eucestoda inferred from 28S rDNA sequences. *Mol Biochem Parasitol* 90: 433–438.
78. Podsiadlowski L, Braband A, Struck TH, von Dohren J, Bartolomaeus T (2009) Phylogeny and mitochondrial gene order variation in Lophotrochozoa in the light of new mitogenomic data from Nemertea. *BMC Genomics* 10: 364.
79. Near TJ (2002) Acanthocephalan phylogeny and the evolution of parasitism. *Integr Comp Biol* 42: 668–677.
80. Near TJ, Garey JR, Nadler SA (1998) Phylogenetic relationships of the Acanthocephala inferred from 18S ribosomal DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 10: 287–298.
81. Poulin R (2007) *Evolutionary ecology of parasites*. Princeton, N.J.: Princeton University Press. 332 p.
82. Van Cleave HJ (1947) A critical review of terminology for immature stages in acanthocephalan life histories. *J Parasitol* 33: 118–125.
83. Hehn N, Ehlers U, Herlyn H (2001) Ultrastructure of the acanthella of *Paratenuisentis ambiguus* (Acanthocephala). *Parasitol Res* 87: 467–471.
84. Miller DM, Dunagan TT (1978) Organization of the lacunar system in the acanthocephalan, *Oligacanthorhynchus tortuosa*. *J Parasitol* 64: 436–439.
85. Schmidt-Rhaesa A (2007) *The evolution of organ systems*. Oxford; New York: Oxford University Press. 396 p.
86. Bernt M, Bleidorn C, Braband A, Dambach J, Donath A, et al. (2013) A comprehensive analysis of bilaterian mitochondrial genomes and phylogeny. *Mol Phylogenet Evol* 69: 352–364.
87. Kristensen RM, Funch P (2000) Micrognathozoa: a new class with complicated jaws like those of Rotifera and Gnathostomulida. *J Morphol* 246: 1–49.
88. Herlyn H, Ehlers U (1997) Ultrastructure and function of the pharynx of *Gnathostomula paradoxa* (Gnathostomulida). *Zoomorphology* 117: 135–145.
89. Rieger RM, Tyler S (1995) Sister-group relationship of Gnathostomulida and Rotifera-Acanthocephala. *Invertebr Biol* 114: 186–188.

2.4 Phylogeny of platyzoan taxa based on molecular data

Walter de Gruyter GmbH, Berlin

Buchkapitel in „Deep Metazoan Phylogeny: the backbone of the tree of life“. Herausgeber J. W. Waagele, T. Bartolomaeus. ISBN 978-3-11-027752-4. Seiten 105-126.

2.4.1 Kurzbeschreibung (deutsche Übersetzung)

In diesem Kapitel wird das Platyzoa-Konzept (Platyhelminthes + Gastrotricha + Gnathifera) mit Fokus auf neueste molekular-phylogenetische Evidenzen diskutiert. Neben einer Einführung in die Taxa wird eine aktuelle Zusammenfassung molekular-phylogenetischer Analysen präsentiert sowie die Ergebnisse von Studien innerhalb des DFG-Schwerpunktprogramms 1174 „Deep Metazoan Phylogeny“ herausgestellt. Während verschiedene Aspekte der internen Phylogenien von Untergruppen der Platyzoa (Syndermata, Acanthocephala) erfolgreich bearbeitet werden konnten, wird die Frage nach der Monophylie der Platyzoa weitere Analysen benötigen. In diesem Kontext stellen wir neue Daten von Gastrotrichen vor und diskutieren potentielle Artefakte molekular-phylogenetischer Analysen von Platyzoa-Taxa.

2.4.2 Geleistete Beiträge zu dieser Publikation

- Schreiben von Teilen des Manuskripts
- Erstellung mehrerer Abbildungen

Thomas Hankeln, Alexandra R. Wey-Fabrizius, Holger Herlyn,
Alexander Witek, Mathias Weber, Maximilian P. Nesnidal, and
Torsten H. Struck

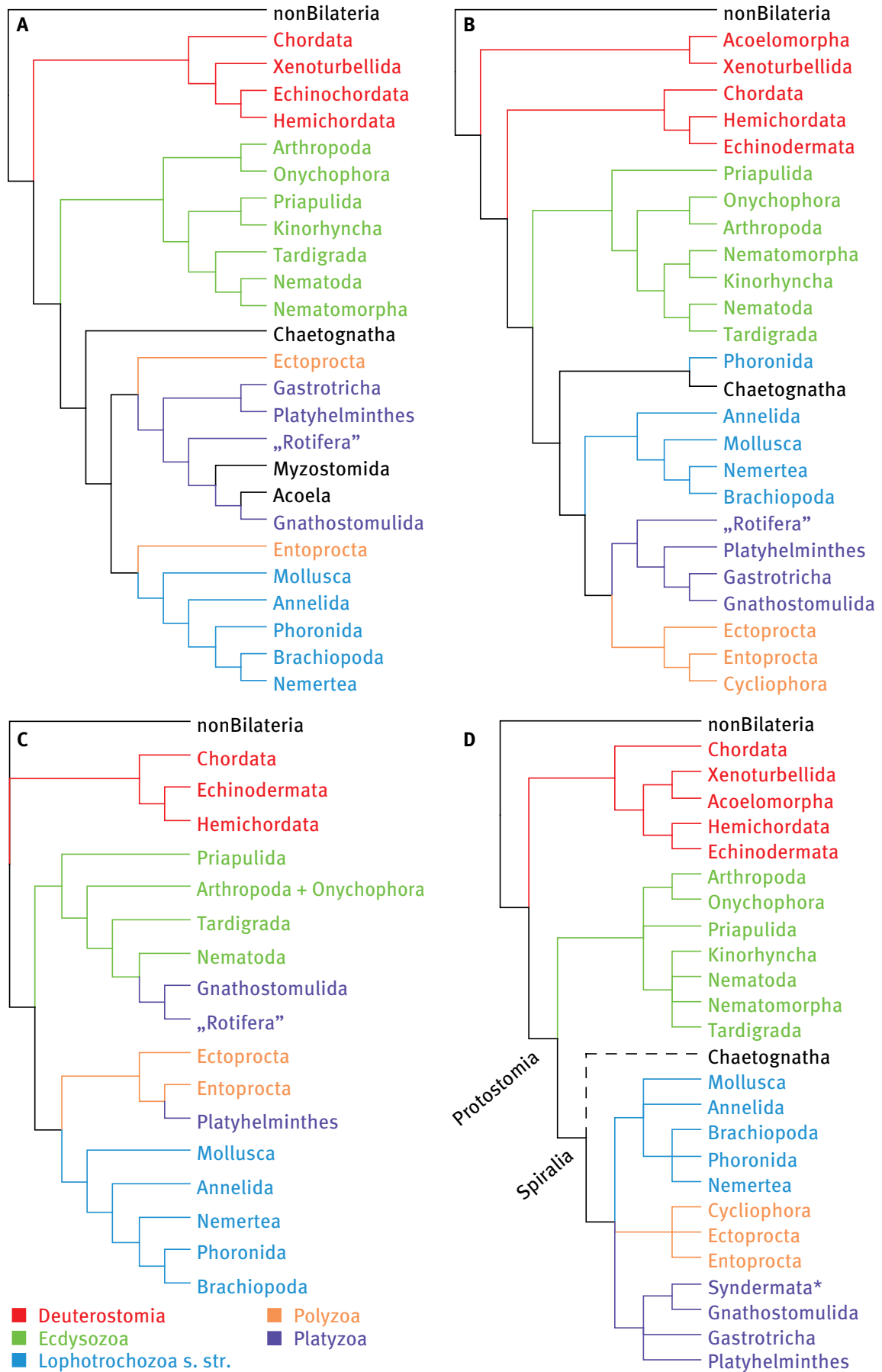
7 Phylogeny of platyzoan taxa based on molecular data

Abstract: In this chapter we discuss the concept of Platyzoa (Platyhelminthes + Gastrotricha + Gnathifera) with a focus on recent molecular phylogenetic evidence. Besides an introduction to the taxa, we present an up-to-date summary of molecular phylogenetic analyses and highlight the results of studies generated within the “Deep Metazoan Phylogeny” priority project 1174 of the German Research Foundation. While several aspects of internal phylogenies of Platyzoan subgroups (Syndermata, Acanthocephala) could already successfully be addressed, the question for monophyly of Platyzoa is awaiting further analysis. In this context, we provide novel data on the position of Gastrotricha and discuss potential long-branch artifacts in molecular phylogenetic analyses of platyzoan taxa.

7.1 Introduction

Molecular data have profoundly changed our view of the metazoan tree of life. For example, within Bilateria three major taxa, Deuterostomia, Ecdysozoa and Lophotrochozoa have been recognized, the latter two essentially unrecognized until the mid-1990s (for review see Halanych, 2004). Lophotrochozoa is defined by the last common ancestor of Annelida, Mollusca and all three lophophorate taxa (Brachiopoda, Phoronida and Ectoprocta), plus all the descendants of that ancestor (Halanych et al., 1995). Lophotrochozoan taxa thus show a wide variety and plasticity in body plans and in developmental, embryonic and morphological characters. The concept of Lophotrochozoa was first proposed based on 18S rRNA data (Halanych et al., 1995) and confirmed by evidence from other single genes as well as by larger-scale expressed sequence tag (EST) data (Dunn et al., 2008; Halanych, 2004; Hausdorf et al., 2007; Passamanek and Halanych, 2006; Struck and Fisse, 2008). Additionally, Cavalier-Smith (1998) proposed Platyzoa as a taxon comprising Platyhelminthes and Acanthognatha, which consisted of Gastrotricha, “Rotifera”, Acanthocephala and Gnathostomulida (Figures 7.1 and 7.2). Lophotrochozoa, in the way defined by Halanych (2004), either contains Platyzoa or, alternatively, Platyzoa is the sister-group to Lophotrochozoa.

Platyzoan taxa are generally direct developers, lack a vascular system, and their worm-shaped body is usually ciliated, flat and unsegmented. However, morphological synapomorphies supporting the monophyly of Platyzoa are lacking (Giribet



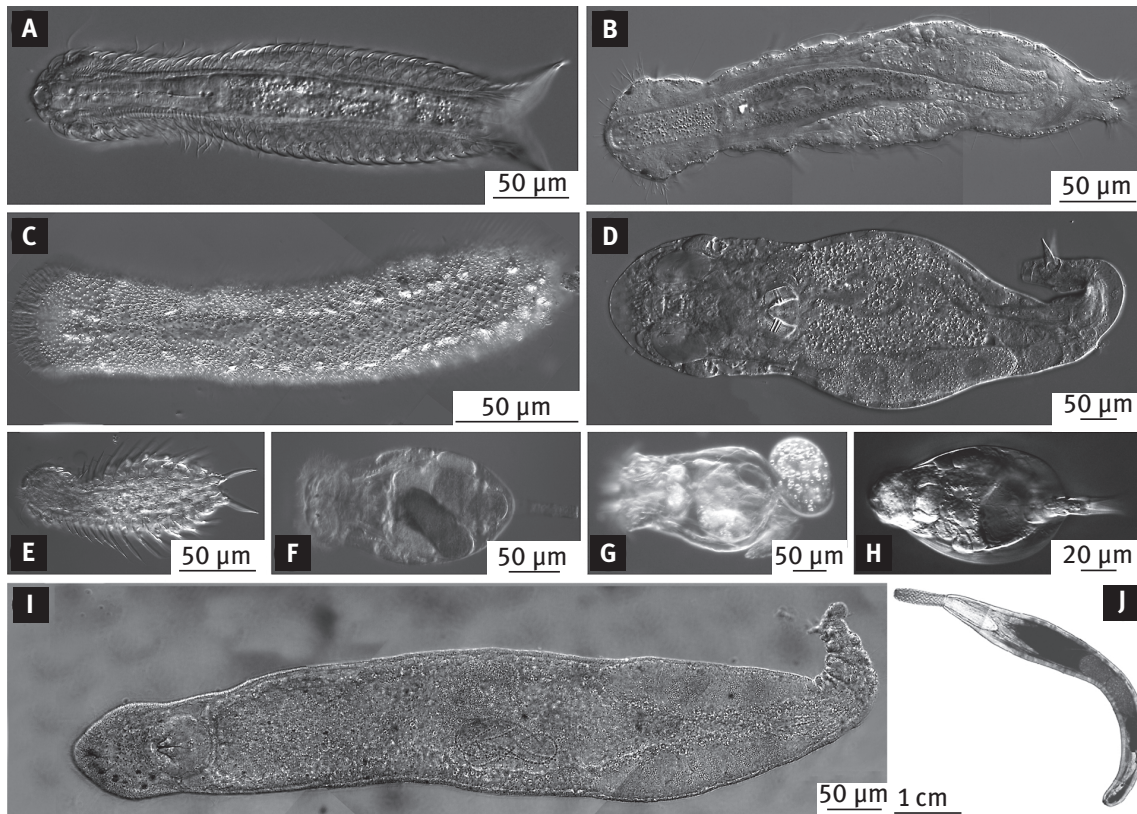


Figure 7.2: Photos of representatives of Gastrotricha, Syndermata and Gnathostomulida. **A.** *Lepidodermella squamata* (Gastrotricha, Chaetonotida). **B.** *Dactylopodola baltica* (Gastrotricha, Macrodasysida). **C.** *Tetranchyroderma megastoma* (Gastrotricha, Macrodasysida). **D.** *Philodina roseola* (Syndermata, Bdelloida). **E.** *Halichaetonotus schromi* (Gastrotricha, Chaetonotida). **F.** *Brachionus calyciflorus* (Syndermata, Monogononta). **G.** *Brachionus plicatilis* (Syndermata, Monogononta). **H.** *Monostyla* sp. (Syndermata, Monogononta). **I.** *Gnathostomula paradoxa* (Gnathostomulida, Bursovaginoidea). **J.** Male *Paratenuisentis ambiguus* (Syndermata, Acanthocephala). For photos A–D and F–I we used a Zeiss Axioskop microscope equipped with an AxioCamMRc5 digital camera. Picture E was obtained with a standard optical microscope and a standard digital camera. Picture J was obtained using a Zeiss Axiophot microscope and an analog camera.

- ◀ **Figure 7.1:** Current views of the metazoan tree of life based on molecular data. Tree topologies are redrawn from the original works of [A] Dunn et al., 2008 (Fig. 1 therein), [B] Hejnol et al., 2009 (Fig. 2 therein) and [C] Hausdorf et al., 2010 (Fig. 1B therein). Part [D] illustrates a consensus view on the metazoan tree. This consensus topology is mainly based on the works mentioned above and built according to the authors' subjective views. The position of Xenoturbellida and Acoelomorpha is derived from the work of Philippe et al. (2011), which is in contrast to most other studies regarding the position of Acoelomorpha. Multifurcations illustrate open questions in metazoan phylogeny. Colors highlight putative monophyla taking the consensus [D] as reference. Asterisk (*) in [D] indicates where the taxon "Rotifera" is replaced with Syndermata ("Rotifera" including Acanthocephala).

2008). Accordingly, most morphological-cladistic and total evidence analyses find platyzoan taxa as paraphyletic or polyphyletic assemblages within Lophotrochozoa or Protostomia, although a few total evidence analyses support monophyletic Platyzoa (Eernisse, Albert and Anderson, 1992; Giribet et al., 2000; Peterson and Eernisse, 2001; Zrzavy, 2003; Zrzavy, Hypsa and Tietz, 2001; Zrzavy et al., 1998). Molecular analyses using single genes were also inconsistent in this respect. Some supported monophyly of Platyzoa, whereas others found these taxa to be paraphyletic within Lophotrochozoa, but always with low support (see Halanych, 2004; Paps, Baguna and Riutort, 2009; Paps, Baguñà and Riutort, 2009; Passamanek and Halanych, 2006). Moreover, additional taxa have been included within Platyzoa as well, namely Micrognathozoa, Cycliophora and Entoprocta (e.g., Halanych, 2004; Kristensen and Funch, 2000; Winnepenninckx, Van de Peer and Backeljau, 1998). Whereas inclusion of Micrognathozoa is substantiated by their anatomical similarities to the other jaw-bearing platyzoan taxa Gnathostomulida and “Rotifera” (e.g., Funch, Sorensen and Obst, 2005; Kristensen and Funch, 2000; Paps, Baguñà and Riutort, 2009; Worsaae and Rouse, 2008), Cycliophora and Entoprocta are possibly more closely related to other lophotrochozoan taxa such as Ectoprocta (e.g., Hausdorf et al., 2007; Hejnol et al., 2009; Helmkampf, Bruchhaus and Hausdorf, 2008; Struck and Fisse, 2008).

Recently several attempts have been made to resolve the phylogeny of Bilateria or Protostomia using phylogenomic approaches based on large scale molecular data sets derived from ESTs (Figure 7.1). Many of these studies included several of the platyzoan taxa so that the monophyly of Platyzoa could be tested at least in part. Some analyses based on up to 79 ribosomal proteins (RP) recovered monophyletic Platyzoa with strong support (Hausdorf et al., 2007; Hausdorf et al., 2010; Helmkampf, Bruchhaus and Hausdorf, 2008; Struck and Fisse, 2008), but others found paraphyletic assemblages of platyzoan taxa (Hausdorf et al., 2007; Witek et al., 2008; 2009) or polyphyletic positions within Protostomia, with Platyhelminthes nested within Lophotrochozoa and “Rotifera”, Acanthocephala and/or Gnathostomulida close to ecdysozoan taxa (Hausdorf et al., 2010; Helmkampf, Bruchhaus and Hausdorf, 2008; Nesnidal et al., 2010; Struck and Fisse, 2008). Thus, with respect to the monophyly of Platyzoa, phylogenies based on RP data are as inconsistent as the analyses of single or only a few genes and likewise depend on the taxon sampling and reconstruction methods used. Other phylogenomic studies with larger, mixed data sets of hundreds of different genes and at least one representative of each platyzoan taxon except for Acanthocephala and Micrognathozoa found monophyletic Platyzoa placed within Lophotrochozoa (Dunn et al., 2008; Hejnol et al., 2009; see Figure 7.1). Unfortunately, platyzoan taxa were among the most unstable taxa in these analyses. Support for the monophyly of Platyzoa as well as their position within Lophotrochozoa was only strong if certain platyzoan taxa such as Gnathostomulida or “Rotifera” were excluded. Moreover, except for Platyhelminthes, gene coverage of platyzoan taxa within data matrices was low throughout these analyses (Dunn et al., 2008; Hejnol et al., 2009). Another reason for the inconsistent results in the molecular analyses and

the low support values for the phylogenetic placements of platyzoan taxa is probably the problem of long-branch attraction as platyzoan taxa are characterized by long branches (Edgecombe et al., 2011). We will discuss this problem in more detail at the end of this chapter.

Likewise, studies using complete mitochondrial (mt) genome data have not yet indicated if Platyzoa are monophyletic or not, because these data are available for only a few of the platyzoan subtaxa (Platyhelminthes, “Rotifera”, and Acanthocephala, respectively). At least the mtDNA results consistently show Platyhelminthes close to Acanthocephala (or “Rotifera” and Acanthocephala, if “Rotifera” was included in the analyses) and therefore suggest monophyletic Platyzoa (Gazi et al., 2012; Min and Park, 2009; Steinauer et al., 2005; Weber et al., 2013). However, this Platyzoa clade is sometimes placed close in Ecdysozoa (probably due to long-branch attraction (LBA) artifacts, see below). Thus, analytic methods to reduce LBA should join the sequencing of more platyzoan mitochondrial genomes in future assessments of the Platyzoa concept. Moreover, the phylogenetic signal of the mitochondrial gene order should also to be taken into account more thoroughly and systematically.

In summary, monophyly of Platyzoa comprising Platyhelminthes, Gastrotricha, Gnathostomulida, Micrognathozoa, “Rotifera” and Acanthocephala has so far gained some support from molecular studies, but this support is still weak and eventually due to long-branch attraction. The same is true for placing Platyzoa either within Lophotrochozoa or as their sister-group. In the following sections, we will discuss the progress in molecular phylogenetic reconstructions of specific platyzoan taxa in more detail.

7.2 The phylogenetic position of Platyhelminthes within Lophotrochozoa is still unresolved

Platyhelminthes are acoelomate worms, which are dorsoventrally flattened and lack an anus and segmentation. Presently about 13,000 living species are described. The vast majority are parasites well known as trematodes or flukes and cestodes or tapeworms, several species of which infest humans or our livestock and pets. Their free-living relatives, paraphyletic “Turbellaria”, occur in all marine and terrestrial habitats. Small interstitial platyhelminths can be as small as 1 mm, whereas some fresh water species can be up to 0.5 m long and parasitic forms can be considerably longer (e.g., the 25 m fish tapeworm, *Diphyllbothrium latum*) (Westheide and Rieger, 1996). Traditionally Platyhelminthes were said to consist of Acoelomorpha, Catenulida and Rhabditophora (Westheide and Rieger, 1996). However, monophyly is not well supported by morphological data, and is sharply refuted by molecular data (e.g., Dunn et al., 2008; Haszprunar, 1996a; 1996b; Hejnol et al., 2009; Ruiz-Trillo et al., 2002; Telford et al., 2003; Zrzavy, 2003). Specifically, the molecular analyses indicate that Acoelomorpha are not closely related to the other Platyhelminthes, but are either

sister to all other bilaterians (e.g., Hejnol et al., 2009; Paps, Baguna and Riutort, 2009; Ruiz-Trillo et al., 1999; Wallberg et al., 2007) or go within deuterostomes (Philippe et al., 2011). Hence, the exclusion of Acoelomorpha from Platyhelminthes is now generally well accepted. For a more detail discussion of relationships within Platyhelminthes see the review by Riutort et al. (2012).

Due to their simple acoelomate body organization, Platyhelminthes once occupied a central role in considerations about the early evolution of Bilateria. Together with Nemertea, which are also generally dorsoventrally flat and show a habitus similar to “turbellarian” flatworms, Platyhelminthes were formerly seen as the sister-group to all other bilaterian taxa (see Brusca and Brusca, 1990; Halanych, 2004; Hyman, 1951). However, both Nemertea and Platyhelminthes show spiral cleavage during their development and, hence, closer affinities to spiralian taxa (Lophotrochozoa) have been proposed for both (Westheide and Rieger, 1996). Within a clade of spiralian taxa, different phylogenetic positions for Platyhelminthes have been put forward based on morphological data. Some authors still maintained a close relationship of Nemertea to Platyhelminthes, based on such similarities as a reduced hyposphere in the larva, the lack of an anus and the shape of the larval ciliary bands (Nielsen, 2001; Nielsen, Scharff and Eibye-Jacobsen, 1996; Sørensen et al., 2000). Several other morphology-based studies placed Platyhelminthes within Platyzoa or at least close to platyzoan taxa such as Gnathostomulida and Gastrotricha (e.g., Ax, 1995; Cavalier-Smith, 1998; Garey et al., 1998; Giribet et al., 2000; Meglitsch and Schram, 1991; Peterson and Eernisse, 2001; Zrzavy et al., 1998), whereas others just placed them within a clade of spiralian taxa like Annelida or Nemertea (e.g., Brusca and Brusca, 2003; Haszprunar, 1996a; 1996b; Rouse and Fauchald, 1995; Zrzavy, 2003; Zrzavy, Hypsa and Tietz, 2001). For a detailed review of these morphological analyses, see Jenner (2004). Molecular data from single nuclear genes or mt genomes so far support only a placement of Platyhelminthes within Lophotrochozoa (see de Rosa et al., 1999; Halanych, 2004; Paps, Baguna and Riutort, 2009; Paps, Baguña and Riutort, 2009; Passamanek and Halanych, 2006; Podsiadlowski et al., 2009). Some of these analyses supported a position within monophyletic Platyzoa, whereas others placed Platyhelminthes as sister to several or all other lophotrochozoan taxa. However, none of these relationships was substantially supported, and none of the analyses found a close relationship of Nemertea and Platyhelminthes.

A phylogenomic study of 60 RP genes as part of the “Deep Metazoan Phylogeny” (DMP) priority project (Struck and Fisse, 2008) found Platyhelminthes either as sister to the other platyzoan taxa, “Rotifera” and Acanthocephala, which were the only other representatives of Platyzoa in that study, or placed them within Lophotrochozoa as part of a basal polytomy. Again, a close relationship to Nemertea was not found and topology testing significantly rejected it. In most subsequent phylogenomic analyses, most with a more comprehensive sampling of genes and platyzoan taxa, Platyhelminthes appeared as part of a monophyletic Platyzoa clade, either as sister to Gastrotricha, to Gnathifera or to Gastrotricha/Gnathostomulida (Dunn et al., 2008; Hausdorf

et al., 2010; Hejnol et al., 2009) or part of a polytomy (Witek et al., 2009). However, nodal support values were low in all cases. Hence, at present, Platyhelminthes have yet to be placed precisely within Lophotrochozoa. Within Lophotrochozoa, they are most likely part of Platyzoa, but this awaits further study.

7.3 Gastrotricha: Phylogenetic case study using four genes

Gastrotricha are members of the marine interstitium and their acoel body is generally slender and dorsoventrally flattened. Gastrotrichs are among the smallest multicellular animals, ranging from only 60 μm to 1.5 mm in length (Brusca and Brusca, 2003). This means that some unicellular eukaryotes are substantially larger than some gastrotrich species. Gastrotricha are split into two major groups, Macrodasysida and Chaetonotida. The Chaetonotida, with a small body size of usually less than 0.5 mm, have amazingly intricate cuticular scales and spines. Though Macrodasysida and Chaetonotida differ in the orientation of their Y-shaped pharyngeal lumen or in the possession of elaborate cuticular structures, several characters support monophyly of Gastrotricha. For example, their cilia, both locomotory and sensory, are entirely covered by the cuticle, which is unique in Bilateria (Westheide and Rieger, 1996). The cuticle also covers the outlet of the duo-gland adhesive system (Todaro et al., 2006). Because gastrotrichs do not possess an anchor cell, the tension during adhesion at sand grains is transmitted via this cuticle (Ruppert, 1991; Tyler and Rieger, 1980). Moreover, all gastrotrichs investigated so far show a ‘muscular double helix’; that is, a muscle arrangement in two spirals similar to the DNA backbone organization (Hochberg and Litvaitis, 2001a; Hochberg and Litvaitis, 2001b; Hochberg and Litvaitis, 2003; Todaro et al., 2006). Studies based on 18S rRNA with a comprehensive taxon sampling consistently recovered monophyly of Gastrotricha (Petrov et al., 2007; Todaro et al., 2006) in line with morphological-cladistic analyses (Kieneke, Riemann and Ahlrichs, 2008).

Traditional morphological studies placed Gastrotricha within a group comprising all taxa with a pseudocoelomate organization; i.e., with Nematoda, Priapulida, Kinorhyncha and “Rotifera” (Hyman, 1951). Or they were joined with Nematoda, Priapulida and others in a group of thread-like worms, the hypothesized Nemathelminthes, which share a two-layered cuticle, cuticle present in the pharynx and esophagus, and a terminal mouth opening (Ax, 2001; Westheide and Rieger, 1996). In more recent morphological studies, Gastrotricha were placed as sister to the ecdysozoan taxon Introverta, comprising Nematoda, Nematomorpha, Priapulida, Kinorhyncha and Loricifera, a topology known as the Cycloneuralia hypothesis (Nielsen, 1995; Nielsen, 2001; Sørensen et al., 2000). This placement is in part congruent with the Pseudocoelomates or Nemathelminthes hypotheses, because all these taxa were also members of Nemathelminthes. Others proposed a sister-group relationship of Gastrotricha to all Ecdysozoa (Peterson and Eernisse, 2001; Schmidt-Rhaesa, 2002; Schmidt-Rhaesa

et al., 1998; Zrzavy, 2003). This gastrotrich-ecdysozoan link was based on such shared traits as a collar-shaped circumpharyngeal brain, lack of an apical organ in developmental stages, Y-shaped cylindrical pharynx and a two-layered cuticle (Zrzavy, 2003).

Alternatively, Gastrotricha has been related to taxa with spiral cleavage like Platyhelminthes, Annelida or Mollusca (e.g., Giribet et al., 2000; Halanych, 2004; Petrov et al., 2007). Based on morphological and/or molecular data, Gastrotricha has been proposed to be sister to all or most other lophotrochozoan taxa or to be within Platyzoa (e.g., Cavalier-Smith, 1998; Giribet et al., 2000; Halanych, 2004; Paps, Baguna and Riutort, 2009; Paps, Baguña and Riutort, 2009; Petrov et al., 2007). More specifically, based on similarities of protonephridial ultrastructure, the presence of monociliated epidermal cells and 18S rRNA data, a sister-group relationship to Gnathostomulida, the Monokonta or Neotrichozoa hypothesis has been suggested (Cavalier-Smith, 1998; Rieger, 1976; Sterrer, Mainitz and Rieger, 1985; Zrzavy, Hypsa and Tietz, 2001; Zrzavy et al., 1998). A total evidence analysis found a sister-group relationship to Platyhelminthes (Giribet et al., 2000) and other studies a sister-group relationship of Gastrotricha to “Rotifera” (Todaro et al., 2006). Finally, Petrov et al. (2007) significantly rejected a closer relationship of Gastrotricha to Ecdysozoa or a basal position of Gastrotricha within Bilateria using topology tests.

To circumvent possible pitfalls associated with 18S rRNA phylogeny in the Gastrotricha case, we conducted a multiple-gene approach based on three additional genes, namely an approximately 3,600 bp fragment of 28S rRNA mimicking Struck et al. (2007; 2008), a 970 or 820 bp fragment of the nuclear protein-coding gene methionine adenylyltransferase (MAT) inspired by Peterson et al. (2004) and a 760 or 676 bp fragment of myosin heavy chain type II (MHC) such as used by Ruiz-Trillo et al. (2002) of four gastrotrich species (two Chaetonotida and two Macrodasyida), three rotifers, and one gnathostomulid (our GenBank numbers are listed on the tree of Figure 7.3). Gene amplification and sequencing generally followed Dordel et al. (2010). After aligning each gene with MUSCLE (Edgar, 2004) and masking ambiguously aligned positions with AliScore (Kück et al., 2010; Misof and Misof, 2009), we used different partitioned maximum likelihood (ML) analyses employing RAxML 7.2.8 (Stamatakis, 2006) to analyze the effect of the following analytical strategies on the phylogenetic results obtained from the same data set: (1) all taxa, all data as nucleotides (6,250 total nt); (2) all taxa, protein-coding genes as amino acids instead of nucleotides (5,063 nt, 457 amino acids); (3) reducing the number of outgroup taxa, and (4) excluding all taxa showing significant heterogeneity in their nucleotide composition based on posterior predictive tests (Lartillot and Philippe, 2004) except for the essential “Rotifera” and/or Gnathostomulida. Finally, we conducted Bayesian inferences (BI) using PhyloBayes 3.2f (Lartillot and Philippe, 2004) with both the time-homogeneous CAT model and the time-heterogeneous Bayesian non-parametric version of the mixture of branch lengths (MBL) model (Kolaczowski and Thornton, 2008; Zhou et al., 2007).

In the partitioned ML analysis of the complete nucleotide data set a clade comprising Platyhelminthes, Gastrotricha and “Rotifera” was recovered with a bootstrap

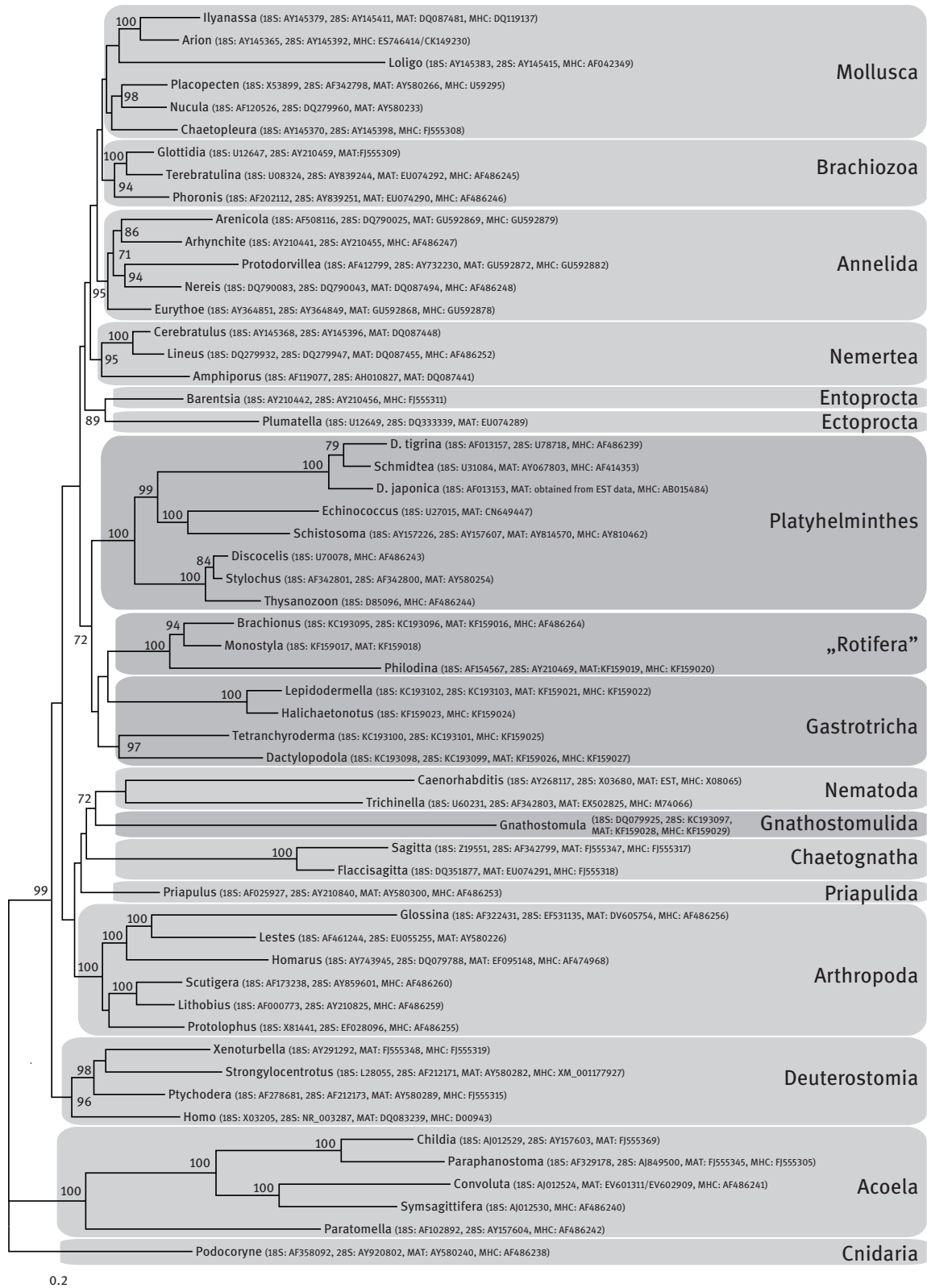
support (BS) of 72, which is equivalent to the taxon Platyzoa without Gnathostomulida (Figure 7.3). Gnathostomulida was found as sister to Nematoda probably due to long-branch attraction (BS = 72). Within the supported clade comprising Platyhelminthes, Gastrotricha and “Rotifera”, Gastrotricha was more closely related to “Rotifera” than to Platyhelminthes (Figure 7.3), but bootstrap support was low. Gastrotricha did not appear as a monophyletic taxon, but formed a paraphyletic assemblage with respect to “Rotifera” (Figure 7.3). The chaetonotidan taxa were more closely related to “Rotifera” than the macrodasyidan taxa. However, bootstrap support for these relationships was again generally low. Monophyly of the gastrotrichan subtaxa Macrodasyida (i.e. *Tetranchyroderma* and *Dactylopodola*) and of Chaetonotida (i.e. *Hali-chaetonotus* and *Lepidodermella*) were always recovered with strong nodal support.

As mentioned above we tried different strategies that eventually reduce the potential impact of LBA on the phylogenetic reconstructions. Excluding long-branched out-group taxa such as the nematodes found a sister-group relationship of Gnathostomulida to the other lophotrochozoan taxa and the relationships of the other platyzoan taxa remained unaltered. Excluding taxa with a heterogeneous base composition such as the nematodes placed Gnathostomulida within the clade of the other platyzoan taxa in Figure 7.3 as sister to Syndermata congruent with the Gnathifera hypothesis. However, in both analyses support for these relationships remained low. Employing time-heterogeneous substitution models in a Bayesian context we were also not able to significantly increase support for the phylogenetic positions of platyzoan taxa.

The topology tests significantly rejected all hypotheses constraining closer relationships of Gastrotricha to ecdysozoan taxa (i.e., the hypotheses Ecdysozoa, Pseudocoelomates, Nemathelminthes and Cycloneuralia) as well as a basal position of Gastrotricha within Bilateria (Table 7.1). An inclusion of Entoprocta within Platyzoa (“Platyzoa expanded”) was rejected. The relationship of Gastrotricha to Gnathostomulida (Monokonta or Neotrichozoa hypothesis) was not quite rejected with the data set comprising all data as nucleotides, but with the data set comprising both nucleotide and amino acid data (Table 7.1). On the other hand, closer relationships of Gastrotricha either to Platyhelminthes or to Gnathifera (Acanthognatha hypothesis) were not rejected. Finally, monophyly of Gastrotricha, inclusion of Gnathostomulida in Lophotrochozoa and monophyly of Gnathifera were not rejected either.

These results obtained with sequences from our four genes strengthen those of past phylogenomic studies, in which Gastrotricha were only represented by the macrodasyidan species *Turbanella ambronensis* and Chaetonotida were unrepresented (Dunn et al., 2008; Hejnol et al., 2009). In those studies, Gastrotricha was sister to Platyhelminthes in Platyzoa, but nodal support for this placement was low, and branch attachment studies by Dunn et al. (2008) showed that high branch attachment frequencies also existed to other platyzoan taxa and, to a low degree, to ecdysozoan taxa. In addition, in these phylogenomic analyses *Turbanella ambronensis* was among the taxa that exhibited only low matrix coverage, because it had only 74 out of 1487 genes present in the supermatrix of Hejnol et al. (2009). Now, con-

sidering all evidence, the morphology-based hypotheses of a relationship of Gastrotricha to ecdysozoan taxa can be refuted, just as the gastrotrich-platyhelminth link is strengthened.



With respect to the evolution of morphological traits, the unrelatedness of gastrotrichs to ecdysozoans has profound impact. Especially, the Y-shaped cylindrical pharynx and collar-shaped circumpharyngeal brain must have evolved independently in Gastrotricha and ecdysozoans. The Y-shaped pharynx is a sucking pharynx and hence similar selection pressures for effective sucking might have resulted in its convergent evolution, which is further supported by the fact that Hirudinea and Pantopoda also

Table 7.1: Testing hypotheses about platyzoan relations that differ from those in the ML tree of Figure 7.3. Results of the approximately unbiased (AU) test (Shimodaira, 2002) for the data sets based on all taxa and all positions as either all nucleotides (AllNuc) or nucleotides for the rRNA and amino acids for protein-coding genes (NucAA). On the right, significant p values are in bold.

Hypothesis	Applied constraint	AllNuc	NucAA
“Rotifera”	(“Rotifera”, Gastrotricha)	0.755	0.907
Monophyly of Gastrotricha	(Gastrotricha)	0.488	0.356
Lophotrochozoa including Gnathostomulida	(Nemertea, Annelida, Mollusca, Brachiozoa, Ectoprocta, Entoprocta, Platyhelminthes, “Rotifera”, Gnathostomulida, Gastrotricha)	0.463	0.284
Platyhelminthes	(Platyhelminthes, Gastrotricha)	0.067	0.228
Gnathifera	(“Rotifera”, Gnathostomulida)	0.118	0.078
Acanthognatha	(“Rotifera”, Gnathostomulida, Gastrotricha)	0.167	0.103
Monokonta	(Gnathostomulida, Gastrotricha)	0.087	0.012
Platyzoa expanded	(Entoprocta, Platyhelminthes, “Rotifera”, Gnathostomulida, Gastrotricha)	0.022	0.018
Basal bilaterians	(Cnidaria, Acoela, Gnathostomulida, Gastrotricha)	0.009	0.004
Ecdysozoa	(Arthropoda, Nematoda, Priapulida, Gastrotricha)	2e-06	2e-07
Pseudocoleomates	(Nematoda, Priapulida, “Rotifera”, Gnathostomulida, Gastrotricha)	6e-06	1e-45
Nemathelminthes	(Nematoda, Priapulida, “Rotifera”, Gastrotricha)	5e-06	0.004
Cycloneuralia	(Nematoda, Priapulida, Gastrotricha)	0.001	9e-61

◀ **Figure 7.3:** Partitioned ML reconstructions of four genes with all taxa included and all genes coded as nucleotides (lnL = -111,893.999, 6,250 positions in total: 1,271 for 18S rRNA, 3,091 for 28S rRNA, 799 for methionine adenylyltransferase (MAT), 472 for myosin heavy chain type II (MHC)). Accession numbers are provided after the genus name. EST = data obtained from expressed sequence tags libraries. Phylogenetic analyses conducted with RAxML 7.2.8 (Stamatakis, 2006) applying the GTR+Γ+I models for each gene and 10 replicates. Bootstrap values (Felsenstein, 1985) were computed from 500 replicates. Values above 70 % are given at branches. Higher taxonomic units are indicated.

show such a Y-shaped pharynx. Moreover, within Gastrotricha it is even not certain if the *inverted* Y-shaped pharynx of Macrodasysida is the plesiomorphic condition or if the upright Y-shaped pharynx of Chaetonotida is (Kieneke, Riemann and Ahlrichs, 2008). Only the latter would support a relationship to ecdysozoan taxa such as Nematoda.

Recent studies showed that the ground pattern of the gastrotrich nervous system consists of a brain with a solid arch-like dorsal commissure with laterally positioned cell somata and a fine ventral commissure as well as a pair of longitudinal, lateroventral nerve cords, which join posteriorly (Rothe and Schmidt-Rhaesa, 2009). Though superficially resembling a ring, the gastrotrich brain is different from the cycloneurialian ring-shaped brain, which consists of a characteristic position of the neuropil between the anterior and posterior pericarya as well as the ventral origin of either paired ventral nerve cords or a single nerve cord (Schmidt-Rhaesa, 2007). The gastrotrich brain is most similar to the nervous system of Acoela (Rothe and Schmidt-Rhaesa, 2009), which could represent the basal-bilaterian line (see above). Thus, this feature of gastrotrichs could conceivably be the primitive state: “Compared to non-bilaterian animals with the net-like plexus and no cerebral ganglion, the acoel brain fits in the probable basal position of this taxon by expressing a certain grade of condensation of the nerve plexus in the anterior end to form a more or less condensed commissural brain” (Rothe and Schmidt-Rhaesa, 2009). However, neither morphological nor molecular data support such a basal-bilaterian position for Gastrotricha (herein, as well as Dunn et al., 2008; Hejnal et al., 2009; Peterson and Eernisse, 2001; Petrov et al., 2007; Schmidt-Rhaesa et al., 1998; Todaro et al., 2006; Zrzavy, 2003) and the few molecular studies based on 18S rRNA data which recovered such a position were clearly affected by LBA problems (e.g., Peterson and Eernisse, 2001). Hence, there are two possibilities regarding the evolution of the organization of the nervous system in Gastrotricha. Either Gastrotricha still exhibit the plesiomorphic condition as it is also found in Acoela (Rothe and Schmidt-Rhaesa, 2009) or the organization was secondarily derived or simplified.

In summary, the phylum Gastrotricha is not closely related to Ecdysozoa (Table 7.1) and we obtained some support for the relation to Rotifera and Platyhelminthes (Figure 7.3). However, their placement within Platyzoa or Lophotrochozoa is not entirely conclusive, in part because our findings misplaced gnathostomulids (see below) and are thus not fully trustworthy. Neither can certain affiliations be rejected by topology tests as shown by the present results for four genes as well as by other molecular studies (e.g., Dunn et al., 2008; Hejnal et al., 2009; Petrov et al., 2007; Todaro et al., 2006). Within the DMP priority project, we have generated deeply covered EST libraries of three macrodasysidan and one chaetonotidan gastrotrichs, increasing both the taxon and data coverage of Gastrotricha. These data are now being analyzed by sophisticated methods that ameliorate the misleading effect of biases such as LBA (see below).

7.4 The Gnathifera concept: Support from phylogenomic data

The taxon Gnathifera originally was assumed to include Gnathostomulida and Syndermata, the latter comprising “Rotifera” and Acanthocephala. The taxon name, which means “jaw-bearing”, is derived from the pharyngeal jaws that all included taxa possess, except for the highly specialized endoparasitic Acanthocephala (Ahlrichs, 1995; Ahlrichs, 1997).

Gnathostomulids were originally regarded as a “turbellarian” and hence platyhelminth subtaxon (Ax, 1956), until being reclassified as a gnathiferan subtaxon (Riedl, 1969). The around 100 described species belong to the meiobenthos. Gnathostomulids are hermaphrodites with a direct development and a monociliary epithelium, which they share with Gastrotricha (Rieger, 1976).

Two other taxa have been assigned to Gnathifera, Micrognathozoa and Cyclophora (see Sørensen, Sterrer and Giribet, 2006 and references therein). Micrognathozoa is an especially good candidate. The only micrognathozoan species described so far (*Limnognathia maerski*; Kristensen and Funch, 2000) has a complicated jaw apparatus showing ultrastructural similarities to the jaws of gnathostomulids, monogononts, bdelloids and seisonids (Kristensen, 2002; Sørensen, 2003). On the other hand, first analyses of molecular data (one mitochondrial and three nuclear loci) could neither confirm nor reject a phylogenetic position of Micrognathozoa within Gnathifera (Giribet et al., 2004). More comprehensive molecular data are thus needed to finally settle the phylogenetic position of Micrognathozoa. Turning to Cyclophora, more recent analyses of molecular data suggest they are closer to Entoprocta than to Gnathifera (Fuchs et al., 2010; Hejnol et al., 2009; Paps, Baguña and Riutort, 2009).

The concept of a close relationship between Gnathostomulida and Syndermata in Gnathifera is based on the likely homology of structures such as supportive rods in gnathostomulid jaws and rotiferan trophi (e.g., Ahlrichs, 1995; Ahlrichs, 1997; Haszprunar, 1996b; Herlyn and Ehlers, 1997; Rieger and Tyler, 1995). However, first analyses of molecular data (single or few loci as well as broad scale EST data) did not support the validity of a monophylum Gnathifera (Dunn et al., 2008; Littlewood et al., 1998; Paps, Baguna and Riutort, 2009; 2009). Our own study within the DMP priority project yielded a more substantiated view: Witek et al. (2009) recovered Gnathifera (Syndermata + Gnathostomulida) based on > 11,000 amino acid positions of RP sequences derived from EST projects, with high support (100 ELW value using TreeFinder, > 89 bootstrap using TreeFinder and PhyML, 0.98 posterior probability using PhyloBayes). Gnathiferan monophyly was subsequently upheld by another study using RP sequences (Hausdorf et al., 2010). On the other hand, several studies questioned the suitability of RP data for phylogenetic reconstructions (e.g., Bleidorn et al., 2009; Nesnidal et al., 2010), and an analysis of broad-scale EST data (a 1,487 gene matrix) recovered Gnathifera as polyphyletic, with Gnathostomulida and Gastrotricha closer to Platyhelminthes than to Syndermata (Hejnol et al., 2009). However, this observed polyphyletic origin of Gnathifera could be a species-specific effect,

because the sister-groups Gnathostomulida and Gastrotricha were represented by just a single species each. To attain a convincing conclusion, a broader taxon and data sampling within the Gnathifera, especially within Gnathostomulida is certainly desirable. To this end, a deeply covered EST library of another gnathostomulid species has been generated as part of this project and is now being analyzed together with new gastrotrich and syndermatan data obtained in this project.

7.4.1 Phylogenomics support monophyletic Syndermata including paraphyletic “Rotifera”

The taxon Syndermata (Ahlrichs, 1997) includes Monogononta, Bdelloidea and Seisonidea (traditionally summarized as “Rotifera” or “wheel animals”) as well as Acanthocephala (“thorny-headed worms”). The name, which means “joined skin”, refers to a characteristic syncytial epidermis (Ahlrichs, 1995) that probably evolved as a novelty in the stem lineage of Syndermata. Other authors conceive Acanthocephala as a subtaxon of “Rotifera” (e.g., Garey et al., 1996). However, due to the absence of a wheel organ in Acanthocephala we prefer the name Syndermata over the alternative “Rotifera”.

The species grouped within Syndermata are very diverse in lifestyle. While most monogononts and bdelloids are free living, seisonids live epizoically on leptostracan crustaceans of the genus *Nebalia*. Finally, acanthocephalans are obligate endoparasites infesting a wide range of arthropod intermediate- and vertebrate definite-hosts (Ax, 2003). These different lifestyles go along with differing morphological features. The wheel organ, for instance, is well developed in free-living monogononts and bdelloids, where it enables swimming and feeding. A homologous structure might furthermore be present in the epizoically living seisonids (Nielsen, 2012; see also Leasi, Rouse and Sørensen, 2011), but is absent from the endoparasitic Acanthocephala. Acanthocephalans are characterized by a retractable and hooked proboscis with specific musculature, which anchors the animal to the host’s intestine wall (Herlyn and Ehlers, 2001; and references therein). Most strikingly, acanthocephalans lack a digestive tract and therefore also the pharyngeal hard parts representing the eponymous evolutionary novelty of Gnathifera (see, e.g., Schmidt-Rhaesa, 2007).

The phylogenetic relationships between acanthocephalans and the other syndermatan subgroups are still a matter of debate (Figure 7.4; see Witek et al., 2008 and references therein), partly due to the disputed homology of diverse morphological characters (see Clement, 1993; Markevich, 1993; Melone et al., 1998; Ricci, 1998; Sørensen, 2002). Within the DMP priority project, major progress has been made on this question (Weber et al., 2013; Wey-Fabrizius et al., submitted; Witek et al., 2008; 2009). Thus, Witek et al. (2008) could for the first time provide significant support for the paraphyly of Eurotatoria on the basis of ESTs encoding 79 RPs. That is, the results consistently supported Figure 7.4A; a closer relationship of Bdelloidea and Acanthocephala to each other than each of the groups had to Monogononta, with

moderate support values (76 ELW support using TreeFinder, 78 % bootstrap support using PhyML, 0.83 posterior probability using PhyloBayes; Figure 7.5A). This topology conflicts with three of the debated hypotheses which favor a sister-group relationship of Monogononta and Bdelloidea (Figure 7.4B–D). Other authors meanwhile upheld the paraphyly of Eurotatoria on the basis of complete mt genome data from one monogonont, one bdelloid and up to two acanthocephalan species (Figure 7.5B1, B2; Gazi et al., 2012; Min and Park, 2009), but with regards to the scarce taxon sampling in all these studies, paraphyly of Eurotatoria was still not conclusively settled. Major improvements in terms of taxon sampling within Syndermata allowed for a more reliable analysis of mt genome data, again revealing paraphyletic Eurotatoria (Figure 7.5B3; Weber et al., 2013).

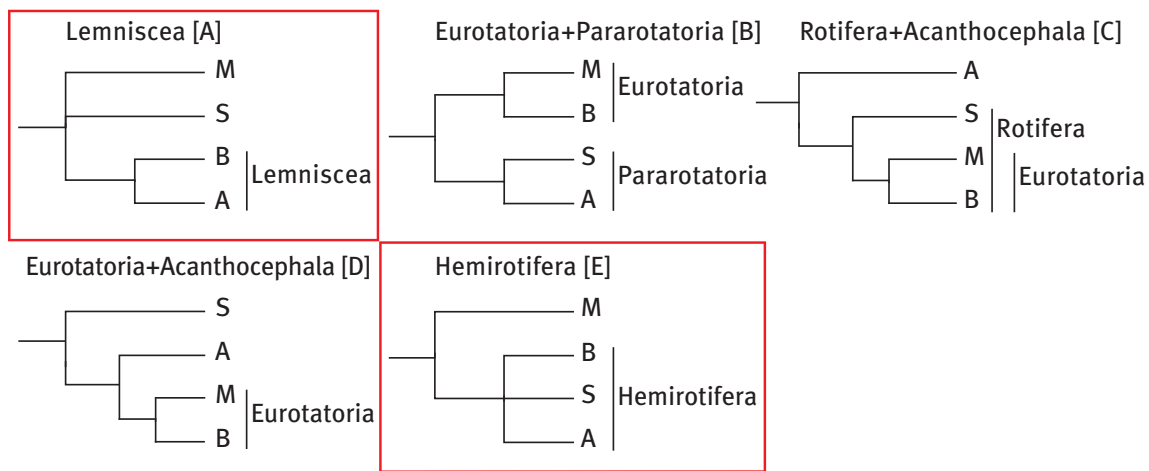


Figure 7.4: Competing hypotheses on the internal phylogeny of Syndermata, as discussed in the literature. Recent molecular analyses favor topologies showing paraphyletic Eurotatoria (see red boxes). A = Acanthocephala, B = Bdelloidea, M = Monogononta, S = Seisonidea.

[A] Lemniscea hypothesis. The hypothesis is primarily based on the hypothesized homology of paired epidermal intrusions in the neck region of bdelloids and acanthocephalans (called lemnisci in the latter; Lorenzen, 1985: 210-223), and supported by molecular studies using 16S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNA, histone *H3* and *cox1* sequences (García-Varela and Nadler, 2006; Garey et al., 1996; 1998; Giribet et al., 2000; 2004; Mallatt, Craig and Yoder, 2012).

[B] Eurotatoria + Pararotatoria hypothesis. The proposed synapomorphy of Eurotatoria is the highly developed wheel organ, while Pararotatoria share spermatozoa with “dense bodies” (Ahlrichs, 1995; Ahlrichs, 1997; Ahlrichs, 1998).

[C] “Rotifera” + Acanthocephala hypothesis. This traditional hypothesis is derived from morphological data including nervous system, toes, sensory and masticatory organs (Melone et al., 1998). Support comes from analyses of 18S rRNA data (García-Varela et al., 2000).

[D] Eurotatoria + Acanthocephala hypothesis. The hypothesis is derived from *hsp82* sequences (Mark Welch, 2000). The lack of acrosomal structures has been proposed as a potential synapomorphy of Eurotatoria and Acanthocephala (Sørensen et al., 2000).

[E] Hemirotifera hypothesis. This hypothesis was established by analyzing a combination of four molecular loci (18S rRNA, 28S rRNA, histone *H3* and *cox1* sequences) and 74 morphological characters (Sørensen and Giribet, 2006).

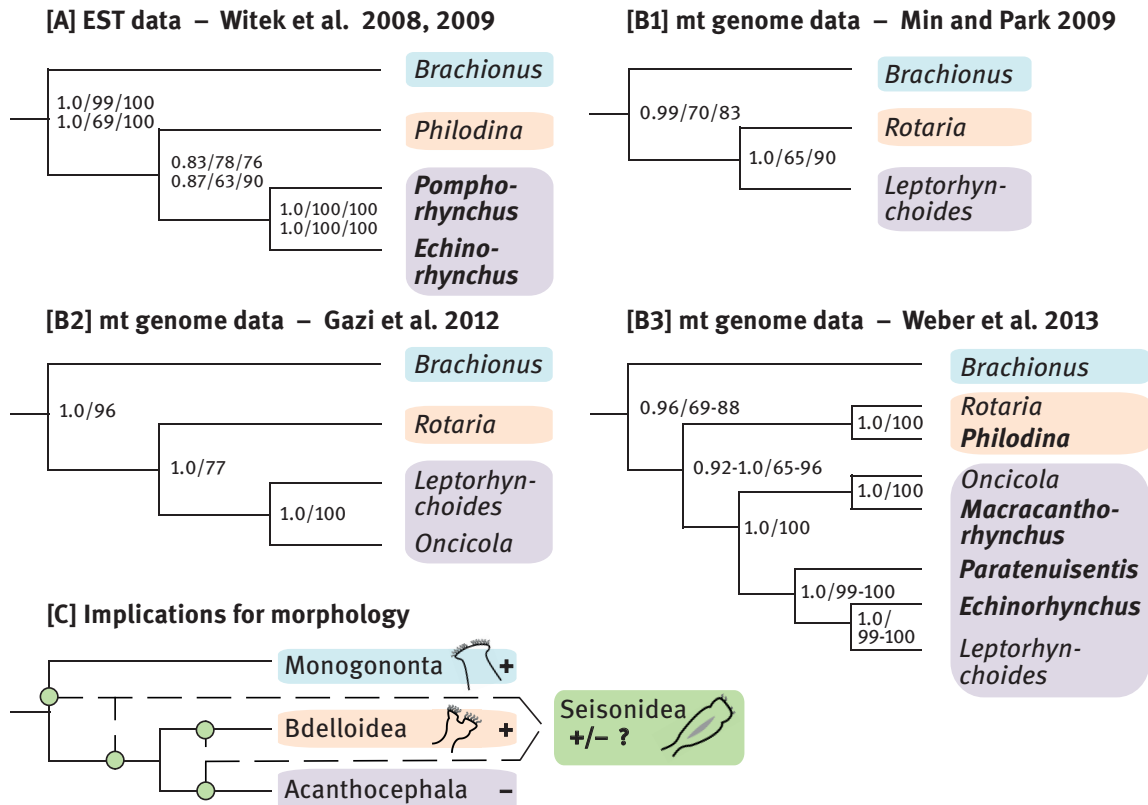


Figure 7.5: Paraphyletic Eurotatoria as derived from broad-scale molecular data sets. Box colors indicate taxa belonging to Monogononta (blue), Bdelloidea (orange) or Acanthocephala (purple). Paraphyletic Eurotatoria with Bdelloidea+Acanthocephala was obtained based on analyses of EST data [A] and mt genome data [B1–3]. Topologies and support values are redrawn from original studies. Support values represent Bayesian posterior probabilities (PP), bootstrap support (BS) and, if applicable, expected likelihood weights (ELW) in the given order (support values part [A]: upper row = Witek et al., 2008; lower row = Witek et al., 2009; BS support part [D]: only minimum and maximum BS values of the analyses are denoted as described in the original work). Data of the taxa in bold were introduced by DMP funded studies. Implications for the evolution of the wheel organ within Syndermata are illustrated in [C]. Pictograms illustrate the degree of wheel organ development: fully developed in Bdelloidea and Monogononta (+), reduced or absent in Seisonidea (+/- ?), absent in Acanthocephala (-). The position of Seisonidea within the tree has not yet been determined based on broad-scale molecular data. Green dots illustrate probable branching points of Seisonidea as derived from morphological and small-scale molecular analyses (see Witek et al., 2008 and references therein). Molecular evidence for monophyletic Pararotatoria (Seisonidea + Acanthocephala) is provided by analyses of 18S rRNA (Herlyn et al., 2003), 18S rRNA + *hsp82* data (Zrzavý, 2001) as well as by EST data (Wey-Fabrizius et al., submitted).

Paraphyly of Eurotatoria raises the question of how the wheel organ evolved within Syndermata (Figure 7.5C). The most likely alternatives are (i) the wheel organ emerged in the syndermatan stem lineage followed by a partial or complete reduction of the trait within Seisonidea and Acanthocephala, or (ii) the convergent evolution of a wheel organ in the stem lineages of monogononts, bdelloids and possibly also seisonids. The situation was additionally complicated by the unsettled position of

Seisonidea within Syndermata (Figure 7.5C), though ultrastructural (Ahlrichs, 1997) as well as first molecular data (Herlyn et al., 2003) suggest a sister-group relation of Seisonidea and Acanthocephala. A recent phylogenomic study within the DMP priority project for the first time included broad data for Seisonidea and corroborates this proposed sister-group relation of Seisonidea and Acanthocephala (=Pararotatoria) with maximum support values (Wey-Fabrizius et al., submitted). Such a topology implies that the acanthocephalan endoparasitism evolved via an epizootic stage and that early acanthocephalans parasitized arthropods before a host change to arthropod intermediate- and vertebrate definite-hosts evolved (Herlyn et al., 2003; see also Near, 2002). Paraphyly of Eurotatoria is maintained in that study, with Bdelloids being more closely related to Pararotatoria. The wheel organ most likely evolved once on the syndermatan stem lineage and was reduced during the establishment of biological interactions with hosts in the pararotatorian ancestor resulting in a complete loss during the evolution of endoparasitism in Acanthocephala.

7.4.2 Phylogeny of Acanthocephala – from mitochondrial genes to morphology

As mentioned above, acanthocephalans are obligate endoparasites with highly derived morphological characters. The more than 1,000 described species infest a wide range of aquatic and terrestrial arthropod (intermediate hosts) and vertebrate species (definite and paratenic hosts), including human food sources such as commercial poultry, fish and pigs.

Four higher-ranked taxa are currently distinguished within Acanthocephala, namely Archiacanthocephala, Eoacanthocephala, Palaeacanthocephala and Polyacanthocephala (Amin, 1987; Garcia-Varela et al., 2002). Analyses of 18S rRNA, 28S rRNA and COI sequences suggest monophyletic Archiacanthocephala as the sister-group to the remaining Acanthocephala (García-Varela and Nadler, 2006; García-Varela et al., 2000; Near, 2002; Near, Garey and Nadler, 1998). Polyacanthocephala appeared as sister to monophyletic Eoacanthocephala, together building the sister-group to monophyletic Palaeacanthocephala (Garcia-Varela et al., 2002; García-Varela and Nadler, 2006). In contrast to these findings, other 18S rRNA-based findings questioned the monophyly of Palaeacanthocephala, in particular of the palaeacanthocephalan subtaxon Echinorhynchida (Garcia-Varela et al., 2002; Herlyn et al., 2003; Near, 2002; Verweyen, Klimpel and Palm, 2011), and an analysis of 138 morphological characters suggested archiacanthocephalans was a paraphyletic assembly at the base of the acanthocephalan clade (Monks, 2001). As far as the above-mentioned molecular studies are concerned, it is very likely that scarce taxon representation and scarce gene coverage hampered the resolution of the phylogenetic relationships within Acanthocephala (e.g., Fontaneto and Jondelius, 2011; Gazi et al., 2012; Herlyn et al., 2003; Verweyen, Klimpel and Palm, 2011).

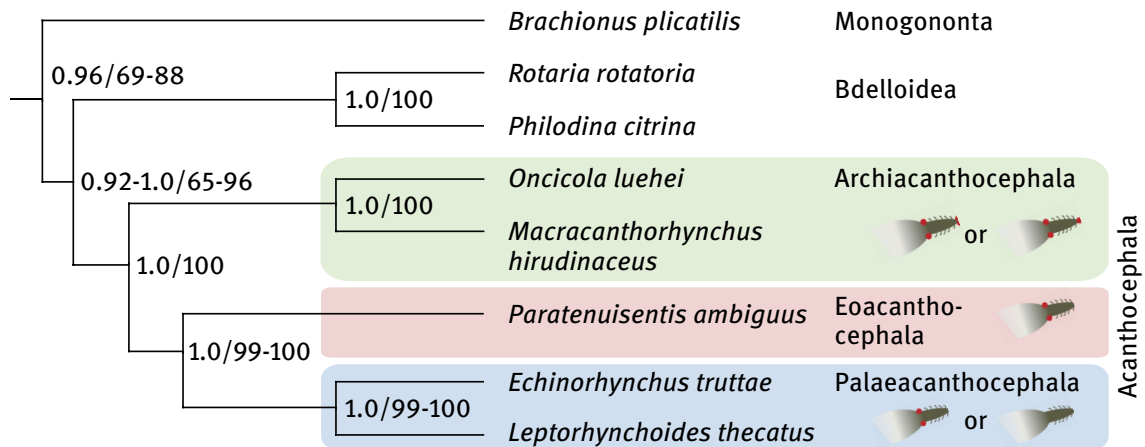


Figure 7.6: Phylogeny within Acanthocephala as inferred from complete mt genome data (Weber et al., 2013). Topology and support values are redrawn from the original work (support values represent Bayesian posterior probabilities (PP) and bootstrap support (BS); only minimum and maximum BS values of the analyses are denoted as described in the original work). Pictograms illustrate body and hooked proboscis of an acanthocephalan. The distribution of apical and lateral sensory organs is indicated by red dots on the proboscis (dots on apical proboscis = apical sensory organs, dots on basal proboscis: lateral sensory organs).

Our analyses within the DMP framework helped to answer some of the questions regarding relationships within Acanthocephala. Based on complete mt genomes of 26 species including those of four newly sequenced syndermatans (Weber et al., 2013), we recovered the expected paraphyly of Eurotatoria and moreover obtained a highly robust topology within Acanthocephala. According to these data, monophyletic Archiacanthocephala represents the sister taxon to a clade uniting at least monophyletic Eo- and Palaeacanthocephala (Figure 7.6). Polyacanthocephala, though not sampled in the present study, most probably are the sister-group to Eoacanthocephala (see Garcia-Varela et al., 2002).

Taking sensory organs as an example, we demonstrated that the character distribution within Acanthocephala does not necessarily follow a parsimonious pattern, but rather involved gain and loss events (Weber et al., 2013). This is shown on the right side of Figure 7.6. In particular, the obtained monophyly of Palaeacanthocephala implies a loss of lateral sensory organs (which are absent in some Palaeacanthocephala) shortly after their emergence in the acanthocephalan stem lineage. Moreover, the observed topology suggests that apical sensory organs evolved once within Acanthocephala, on the stem lineage of Archiacanthocephala.

Questions remain about relations within Syndermata. Besides the phylogenetic positions of Seisonidea and Polyacanthocephala, future studies should focus on the monophyly of Archi-, Eo- and Palaeacanthocephala. All these aspects require a denser taxon sampling.

7.5 Platyzoan taxa and the long-branch problem

Increased substitution rates, displayed by long branches in phylogenetic reconstructions, may result in artificial taxon groupings through “long-branch attraction” (Felsenstein, 1978). The theoretical and methodical aspects of the so-called “long-branch attraction” are discussed in more detail by Kück and Wägele (this book). In molecular phylogenetic reconstructions, many platyzoan taxa exhibit long branches, as do a few other lophotrochozoans (e.g., Myzostomida) and some Ecdysozoa (e.g., Nematoda). This poses a severe problem in phylogenetic reconstructions including these taxa. An example is seen in the four-gene analyses presented here (Figure 7.3): Considering that so much morphological and molecular data support an inclusion of Gnathostomulida within Gnathifera (e.g., Ahlrichs, 1997; Witek et al., 2009), the deviating association of Gnathostomulida with nematodes in the tree most likely represents such a long-branch artifact. In line with this, topology testing (Table 7.1) does not reject the inclusion of Gnathostomulida in Gnathifera.

Besides Gnathostomulida, endoparasitic Acanthocephala and Platyhelminthes also exhibit comparatively long branches in most molecular phylogenetic analyses. First analyses of the newly sequenced gastrotrich EST data (see above) revealed long-branched species within Gastrotricha, as well. Hence, it might even be that monophyly of Platyzoa as well as their phylogenetic position within Lophotrochozoa (e.g., Dunn et al., 2008; Hejnol et al., 2009; Struck and Fisse, 2008) is just an artifact resulting from LBA (Edgecombe et al., 2011). On the other hand, it cannot be excluded that increased substitution rates are an apomorphic feature of a true clade Platyzoa.

To overcome the LBA problem and to explore whether Platyzoa is an artificial group or a monophyletic taxon, some important points have to be considered. First, the selection of the data set seriously influences the results of phylogenetic reconstructions. The mt genome data, for example, provide congruent and highly supported trees within lower-order clades, such as the internal phylogeny of Syndermata and Acanthocephala (Figures 7.5, 7.6, and Weber et al., 2013), Cestoda (Waeschenbach, Webster and Littlewood, 2012), or birds (Pacheco et al., 2011), but exhibit severe LBA artifacts when reconstructing high-order metazoan-wide trees (Bernt et al., 2013; Gazi et al., 2012; Perseke et al., 2013). Moreover, certain categories of nuclear genes such as RP data can introduce bias in phylogenetic reconstructions (e.g., Bleidorn et al., 2009). Therefore, to address the Platyzoa question, extracting and combining a broad range of different genes obtained by transcriptome sequencing would be the preferred approach.

Second, different methodological strategies to address the LBA problem have to be applied. Several methods for detecting and attenuating LBA artifacts have been proposed, and they also alleviate other misleading signals in the data such as compositional biases, heterogeneous rates of certain substitutions, or mutational saturation (Foster, 2004; e.g., Foster and Hickey, 1999; Kubatko and Degnan, 2007; Whelan, 2008). Such methods include separate partition analyses, long-branch extraction, out-

group removal, adding artificial LB sequences, parametric simulation, spectral analyses, different compositional vectors along the tree, and a temporal hidden Markov model (for reviews see Bergsten, 2005; Foster, 2004; Whelan, 2008). Altogether, these approaches should be able to reveal the phylogenetic signal within phylogenomic data sets, although some of the methods are still computationally intensive. Despite their promise, depending on the specific data set, these methods can sometimes fail. For example, in our four-gene analyses (Figure 7.3), we employed time-heterogeneous substitution models or excluded certain taxa in order to reduce the potential impact of LBA on the phylogenetic reconstructions. However, none of these approaches effectively increased the support for a specific topology.

Finally, improved taxon sampling and data coverage will be crucial in platyzoan phylogeny. The importance of thorough taxon coverage is already well documented. For example, the EST study of Struck and Fisse (2008) found that including the long-branched ecdysozoan taxa Tardigrada and Nematoda makes Platyzoa become sister to these taxa, while excluding them results in a more reasonable sister-group relationship of Platyzoa with Lophotrochozoa. In the EST-based study of Dunn et al. (2008) Platyzoa strangely contained Acoelomorpha and Myzostomida, but increasing the taxon sampling and data coverage of acoelomorphan taxa lead to Acoelomorpha branching off first in the bilaterian tree and positioned Myzostomida as part of the annelid radiation (Hejnol et al., 2009). The examples illustrate the findings of Philippe et al. (2004), that a more complete representation of the biodiversity of a taxon promises to generate a more reliable placement of that taxon by breaking up long branches (see also Bergsten, 2005 for review).

In Platyzoa, some taxa such as cestodes (Platyhelminthes) are currently well represented in larger phylogenomic studies with respect to the numbers of genes, but other platyzoans such as gastrotrichs and gnathostomulids are still heavily underrepresented (Hejnol et al., 2009). Furthermore, several candidate platyzoan groups are so far only represented by a single species such as *Turbanella ambronensis* for Gastrotricha or *Gnathostomula peregrina* for Gnathostomulida. Traditionally, the generation of EST libraries for Gastrotricha, “Rotifera” or Gnathostomulida has been cumbersome due to their small body size (see Figure 7.2) and their usually patchy habitat distribution. However, novel sequencing technologies, (“next generation sequencing”, NGS; see, e.g., Metzker, 2010) promise to make substantial progress in sequence data acquisition, even when only limited amounts of DNA or RNA are available (Ramsköld et al., 2012). Within the DMP priority project, we were able to generate additional NGS libraries of two turbellarian platyhelminths, four gastrotrichs, one gnathostomulid, and eight syndermatans, with some of the data yet unpublished and currently being analyzed. This broader coverage of taxa and sequences already enabled us to address phylogenetic questions within platyzoan subgroups and, more importantly, will facilitate examination of the yet unanswered question of the monophyly of Platyzoa and the phylogenetic position of such a monophylum.

Acknowledgments

The authors gratefully thank the German Research Foundation (DFG) for generous funding of the priority project 1174 “Deep Metazoan Phylogeny” (Ha-2103/4-1, Ha-2103/4-3, STR-683/3-1, Pu-84/5-1, STR-683/5-2).

2.5 Platyzoan paraphyly based on phylogenomic data supports a non-coelomate ancestry of Spiralia

Im Druck bei Molecular Biology and Evolution

2.5.1 Kurzbeschreibung (deutsche Übersetzung)

Innerhalb der Bilateria wurden basierend auf molekularen Daten drei Hauptstämme erkannt: Deuterostomia, Ecdysozoa und Spiralia. Innerhalb der Spiralia wurden jüngst kleine und einfach organisierte Tiere wie Plattwürmer, Gastrotrichen und Gnathostomuliden zu den Platyzoa zusammen gruppiert. Jedoch waren die putativ zu den Platyzoa gehörenden Taxa in den betreffenden molekular-phylogenetischen Arbeiten in Bezug auf Taxon-Anzahl und Menge der Sequenzdaten nur gering vertreten. Weiterhin bestand durch die erhöhten Substitutionsraten in Taxa der Platyzoa die Möglichkeit, dass monophyletische Platyzoa ein Artefakt resultierend aus „long-branch attraction“ sind. Um solche Probleme zu überwinden, haben wir einen phylogenomischen Ansatz genutzt und dadurch eine substantielle Erhöhung i) der Anzahl der untersuchten Spezies innerhalb der Platyzoa und ii) der Spezies-spezifischen Sequenzabdeckung in Datensätzen mit bis zu 82.162 Aminosäure-Positionen erreicht. Mit etablierten und neuen Messmethoden (long-branch score) haben wir das phylogenetische Signal von irreführenden Effekten wie long-branch attraction befreit. Die mit diesen Methoden durchgeführten phylogenomischen Analysen zeigten keinen monophyletischen Ursprung der Platyzoa-Taxa, sondern diese erschienen als paraphyletisch in Bezug auf die anderen Spiralia. Platyhelminthes und Gastrotricha bilden ein Monophylum, welches wir Rousphozoa nennen. Unter Ausschluss der Gnathifera bilden die Rousphozoa mit allen anderen Spiralia eine monophyletische Gruppe, die wir Platyrochozoa nennen. Die Paraphylie der Platyzoa legt nahe, dass der letzte gemeinsame Vorfahre der Spiralia ein Organismus mit einfachem Körperbau und ohne coelomische Räume, Segmentierung und komplexe Hirnstrukturen war und dass komplexere Tiere wie Anneliden sich aus diesem einfach organisierten Vorfahren entwickelt haben. Diese Schlussfolgerung widerspricht alternativen evolutionären Szenarien, die einen Anneliden-ähnlichen Vorfahren der Bilateria und Spiralia sowie mehrere unabhängige sekundäre Reduzierungen vorschlagen.

2.5.2 Geleistete Beiträge zu dieser Publikation

- Durchführung der RNA-Extraktionen für *M. hirudinaceus* und *R. rotatoria*
- Betreuung der Laborarbeiten für *L. inermis* (Diplomarbeit Sabrina Klebow, Mainz 2011)
- Editierung und Assemblierung der Sequenzdaten für *M. hirudinaceus* und *R. rotatoria*
- Manuelle Durchsicht der 577 uneditierten Alignments nach „rare genomic changes“ (RGCs)
- Beteiligung am Schreiben des Manuskripts

Platyzoan paraphyly based on phylogenomic data supports a non-coelomate ancestry of Spiralia

Torsten H. Struck^{a,b,*}, Wey-Fabrizius, Alexandra R.^c, Golombek, Anja^a, Hering, Lars^d, Weigert, Anne^e, Bleidorn, Christoph^e, Klebow, Sabrina^c, Iakovenko, Nataliia^{f,g}, Hausdorf, Bernhard^h, Petersen, Malte^a, Kück, Patrick^a, Herlyn, Holgerⁱ, Hankeln, Thomas^c

^a Zoological Research Museum Alexander Koenig; Adenauerallee 160; 53113 Bonn; Germany

^b University of Osnabrück; FB05 Biology/Chemistry; AG Zoology; Barbarastr. 11; 49069 Osnabrück; Germany

^c Johannes Gutenberg University; Institute of Molecular Genetics, Biosafety Research and Consulting; Johann-Joachim-Becher-Weg 30A, 55099 Mainz; Germany

^d University of Leipzig; Institute for Biology II; Animal Evolution and Development; Talstr. 33; 04103 Leipzig; Germany

^e University of Leipzig; Institute of Biology; Molecular Evolution and Systematics of Animals; Talstr. 33; 04103 Leipzig; Germany

^f Department of Biology and Ecology; Ostravian University in Ostrava; Chittussiho 10; 71000, Ostrava; Czech Republic

^g Department of Invertebrate Fauna and Systematics; Schmalhausen Institute of Zoology NAS of Ukraine; Bogdana Khmel'nitskogo str. 15; 01601 Kyiv; Ukraine

^h Zoological Museum, University of Hamburg, Martin-Luther-King-Platz 3, 20146 Hamburg, Germany

ⁱ Johannes Gutenberg University; Institute of Anthropology; Anselm-Franz-von-Bentzel-Weg 7; 55099 Mainz; Germany

* **Corresponding author:** E-mail: torsten.struck.zfmk@uni-bonn.de.

Abstract

Based on molecular data three major clades have been recognized within Bilateria: Deuterostomia, Ecdysozoa and Spiralia. Within Spiralia, small-sized and simply organized animals such as flatworms, gastrotrichs and gnathostomulids have recently been grouped together as Platyzoa. However, the representation of putative platyzoans was low in the respective molecular phylogenetic studies, in terms of both, taxon number and sequence data. Furthermore, increased substitution rates in platyzoan taxa raised the possibility that monophyletic Platyzoa represents an artefact due to long-branch attraction. In order to overcome such problems, we employed a phylogenomic approach, thereby substantially increasing i) the number of sampled species within Platyzoa and ii) species-specific sequence coverage in datasets of up to 82,162 amino acid positions. Using established and new measures (long-branch score) we disentangled phylogenetic signal from misleading effects such as long-branch attraction. In doing so, our phylogenomic analyses did not recover a monophyletic origin of platyzoan taxa that, instead, appeared paraphyletic with respect to the other spiralian. Platyhelminthes and Gastrotricha formed a monophylum, which we name Rousphozoa. To the exclusion of Gnathifera, Rousphozoa and all other spiralian represent a monophyletic group, which we name Platytrichozoa. Platyzoan paraphyly suggests that the last common ancestor of Spiralia was a simple-bodied organism lacking coelomic cavities, segmentation and complex brain structures, and that more complex animals such as annelids evolved from such a simply organized ancestor. This conclusion contradicts alternative evolutionary scenarios proposing an annelid-like ancestor of Bilateria and Spiralia and several independent events of secondary reduction.

Introduction

Molecular data have profoundly changed the view of the bilaterian tree of life by recognizing three major clades: Deuterostomia, Ecdysozoa and Spiralia (Halanych 2004; Edgecombe et al. 2011). The term Spiralia is occasionally used as a synonym for Lophotrochozoa (Halanych 2004). However, the term Lophotrochozoa is actually reserved for all descendants of the last common ancestor of Annelida, Mollusca and the three lophophorate taxa (Halanych 2004), while the more comprehensive taxon Spiralia includes all animals with spiral cleavage and, hence, also Platyhelminthes (Edgecombe et al. 2011). Herein we use Spiralia in the terms of the more inclusive definition.

Previous results of the molecular phylogenetic analyses initiated a still on-going debate about the evolution of complexity in Bilateria. It was proposed that the last common ancestor of Deuterostomia, Ecdysozoa and Spiralia had a segmented and coelomate body organization resembling that of an annelid, and that morphologically more simply organized taxa like nematodes or flatworms (Platyhelminthes) evolved by secondary reductions (Brinkman and Philippe 2008; De Robertis 2008; Couso 2009; Tomer et al. 2010; Chesebro et al. 2013). This is in stark contrast to the traditional “acoeloid-planuloid” hypothesis favouring evolution of Bilateria from a simple body organization towards more complex forms with a last common ancestor resembling a

flatworm without segmentation and coelomic cavities (Hyman 1951; Halanych 2004; Hejnol et al. 2009). Unravelling the phylogenetic relationships within Bilateria is crucial to resolve this controversy (Halanych 2004; Edgecombe et al. 2011).

While recent phylogenomic studies recovered most of the relations of the major branches within Deuterostomia and Ecdysozoa, the internal phylogeny of Spiralia is still unclear (Edgecombe et al. 2011). Indeed, spiralian animals exhibit a wide variety and plasticity in development and morphology including body organization (Nielsen 2012) which gave rise to the distinction of two major taxa: Lophotrochozoa and Platyzoa (Halanych 2004; Edgecombe et al. 2011). As mentioned above, Lophotrochozoa comprises at least annelids (ringed worms), lophophorates and molluscs (Halanych 2004) and hence animals with a more complex morphology. In contrast, Platyzoa subsumes more simple appearing taxa such as flatworms, hairy backs (Gastrotricha), wheel animals (classical Rotifera), thorny-headed worms (Acanthocephala), and jaw worms (Gnathostomulida) (Cavalier-Smith 1998). While some authors regard Platyzoa as sister to Lophotrochozoa (Edgecombe et al. 2011), others place Platyzoa within Lophotrochozoa, thus rendering Spiralia synonymous with Lophotrochozoa (Halanych 2004). Importantly, unique morphological autapomorphies supporting the monophyly of Platyzoa are lacking (Giribet 2008) and phylogenetic analyses of nuclear and mitochondrial data failed to resolve the question as well (Paps et al. 2009a; Paps et al. 2009b; Bernt et al. 2013). Nevertheless, there seems to be a tendency for a weakly supported monophylum Platyzoa as long as larger datasets were analysed (Halanych 2004; Hausdorf et al. 2007; Struck and Fisse 2008; Hejnol et al. 2009; Paps et al. 2009a; Witek et al. 2009). However, across all these analyses placement of platyzoan taxa appeared unstable, probably due to low data and taxa coverage (Edgecombe et al. 2011). Moreover, parallel evolution of character states on long branches (also known as long branch attraction, LBA) might also have confounded these analyses (Edgecombe et al. 2011). In summary, monophyly of Platyzoa and the phylogenetic positions of the platyzoan taxa within Spiralia are still contentious although their positions have major implications for bilaterian evolution. In particular, monophyly of Platyzoa and a placement within Lophotrochozoa would be in line with the theory of a more complex ancestry (Brinkman and Philippe 2008), whereas paraphyletic Platyzoa with respect to Lophotrochozoa would support the “acoeloid-planuloid” hypothesis.

Results and Discussion

To address the major outstanding issues of bilaterian phylogeny with respect to spiralian and more specifically platyzoan relationships, we applied a phylogenomic approach, generating transcriptome sequence data for 10 putative platyzoan and two nemertean species using second-generation sequencing technology and a modified RNA amplification method, which allowed the generation of sequencing libraries from as few as 10 specimens of microscopic species of Gnathostomulida, Gastrotricha and classical Rotifera (Supplementary Table S1). These data were complemented with transcriptomic or genomic data of 53 other spiralian and ecdysozoan species, including additional representatives of Platyzoa (Supplementary Table S2). Hereby, the taxon coverage of Platyzoa increased 3.5-fold and for individual platyzoan taxa like Syndermata (wheel animals and thorny-headed worms) and Gastrotricha even 5-fold in comparison to previous large-scale analyses of spiralian relationships (Dunn et al. 2008; Hejnol et al. 2009). After orthology assignment (Ebersberger et al. 2009) the data were further screened for sequence redundancy (Kvist and Siddall 2013), potentially paralogous sequences (Struck 2013a) and contamination (Struck 2013a) resulting in a pruning of about 7% of sequence data (Supplementary Tables S3-S8).

Brute-force approach: more taxa and data.

Phylogenetic reconstructions based on the largest datasets d01 with 82,162 amino acid positions and 38.3% sequence coverage (Supplementary Table S9) recovered monophyly of both Platyzoa and Lophotrochozoa with strong bootstrap support (BS) of 99 for both (Fig. 1). Within Platyzoa, monophyly of Platyhelminthes, of Syndermata as well as of Gnathostomulida was maximally supported, whereas monophyly of Gastrotricha was not recovered. The chaetonotid gastrotrich *Lepidodermella squamata* appeared as sister to Platyhelminthes (BS 46), whereas the macrodasyidan gastrotrichs formed a monophylum (BS 74) as sister to all other platyzoan taxa (BS 68). Finally, Gnathostomulida was sister to Syndermata (BS 61) consistent with the Gnathifera hypothesis (Ahlrichs 1997; Herlyn and Ehlers 1997).

To study the influence of unstable taxa, leaf stability analyses were performed. With a leaf stability index of 0.876 the gastrotrich *L. squamata* was the most unstable species within the sampled platyzoans, followed by the two gnathostomulid species (0.941) and the macrodasyidan gastrotrich *Dactylopodola baltica* (0.969) (Fig. 2, Supplementary Table S10). Excluding these four platyzoan taxa from dataset d01 and conducting a

new phylogenetic reconstruction did not influence the remaining topology, but led to an increased BS value of 99 for a clade uniting Platyhelminthes and Syndermata and decreased values for the monophyly of both Platyzoa and Lophotrochozoa (BS 82 & 86, [Table 1](#)). Thus, the four unstable taxa

showed some influence on support for the phylogenetic placement of other platyzoan taxa. Therefore, we excluded these four taxa from the following analyses, which addressed the potential role of LBA on platyzoan phylogeny in more detail.

Table 1. Bootstrap support for monophyly and paraphyly of Platyzoa as well as monophyly of Rousphozoa.

^a Excl. = excluded, ^b # pos. = number of positions, ^c # taxa = number of taxa, ^d LB = long branched taxa, *: support values are part of the 70% confidence set, **: support values are part of the 95% confidence set.

Dataset	Excl. taxa ^a	# pos. ^b	# taxa ^c	Platyzoa		Rousphozoa
				mono.	para.	mono.
d01	None	82,162	65	99**	0	3
(all data)	unstable	82,162	61	82*	1	1
	LB ^d	82,162	34	3	95**	96**
	unstable	36,513	61	3	86*	84*
d02	unstable	36,513	61	3	86*	84*
(high coverage)	LB ^d	36,513	34	0	100**	93*
	unstable	37,907	61	19	75*	71*
d07	Unstable	37,907	61	19	75*	71*
(low base frequency heterogeneity)	LB ^d	37,907	34	0	100**	97**
	unstable	29,133	61	18	72*	76*
d08	unstable	29,133	61	18	72*	76*
(low branch length heterogeneity)	LB ^d	29,133	34	10	50	54

LBA accounts for monophyly of Platyzoa.

Monophyletic Platyzoa as sister to Lophotrochozoa gained strong support in the analyses described above. However, thorough inspection of the topology ([Fig. 1](#)) revealed considerable branch length heterogeneity, with long branches in the analysed platyzoan lineages and rather short branches in lophotrochozoan and ecdysozoan lineages. Hence, the observed strong support for monophyletic Platyzoa might originate from artificial rather than phylogenetic signal ([Bergsten 2005](#); [Edgecombe et al. 2011](#); [Kück et al. 2012](#)). For the tree derived from dataset d01 and shown in [Fig. 1](#) the LB scores showed a bimodal distribution with a minimum between the two highest optima at a LB score value of 0 ([Fig. 2B](#)). Putative platyzoan species had generally higher LB score values than lophotrochozoan and ecdysozoan species ([Fig. 2](#), [Supplementary Table S11](#)). Only the LB scores inferred for *Stylochoplana* and *Paraplanocera* within Platyhelminthes, the two *Brachionus* species and *Lecane* in Syndermata, and *Megadasys* and *Macrodasy* in Gastrotricha approximated those of most lophotrochozoans and ecdysozoans. On the other hand, *Symbion* (Cycliophora), *Alcyonidium* and *Tubulipora* (Ectoprocta) showed values > 0, resembling those of most of the platyzoan species sampled ([Fig. 2](#)).

To assess the effect of long branches on tree reconstruction, all species with LB scores above 0 were excluded from dataset d01 (82,162 positions). Interestingly, monophyly of Platyzoa was no longer recovered ([Fig. 3](#)). Gastrotricha now emerged as sister to Platyhelminthes (BS 96,

[Table 1](#)), and this clade was sister to monophyletic Lophotrochozoa (BS 95, [Table 1](#)), while Syndermata was sister to all other spiralian taxa. Thus, exclusion of long-branched species had a tremendous effect on the analyses rendering a strongly supported monophyly of Platyzoa with BS values above 95 into a paraphyletic assemblage, in which the clade consisting of Gastrotricha + Platyhelminthes and Lophotrochozoa obtained strong support with a BS value of 95.

Biases causing monophyletic Platyzoa.

To gain further insights into the issue of mono- vs. paraphyletic Platyzoa we analyzed the data with respect to the different properties of individual genes. In detail, we studied the effect of gene-specific proportions of hydrophobic amino acids and missing data, base composition and branch length heterogeneity, and evolutionary rates on tree reconstruction. A common procedure is to choose one of these properties as the most influential one either based *a priori* on literature or *a posteriori* on the obtained results (e.g., [Brinkman and Philippe 2008](#); [Simmons 2012b](#); [Nesnidal et al. 2013](#); [Nosenko et al. 2013](#); [Roure et al. 2013](#); [Salichos and Rokas 2013](#)). Herein we used another procedure based on the variability exhibited in the data itself prior to analyses of alternative datasets reflecting different degrees of data reduction. According to the principal component analysis ([Alexe et al. 2008](#)) the first principal component explained 31.0% of the variance between the different genes. It was mainly derived from the proportion of missing data and base composition heterogeneity with eigenvectors pointing into

opposite directions (Supplementary Fig. S3 & Table S12). Branch length heterogeneity and evolutionary rate were the largest factors in the second component, which explained 26.8% of the variance. Correlation analyses showed that in our

case evolutionary rate, which is often used as a proxy for branch length heterogeneity (Brinkman and Philippe 2008), did not correlate with actual measurements of branch length heterogeneity ($R^2 = 0.0324$ and 0.0635 , Supplementary Fig. S4).

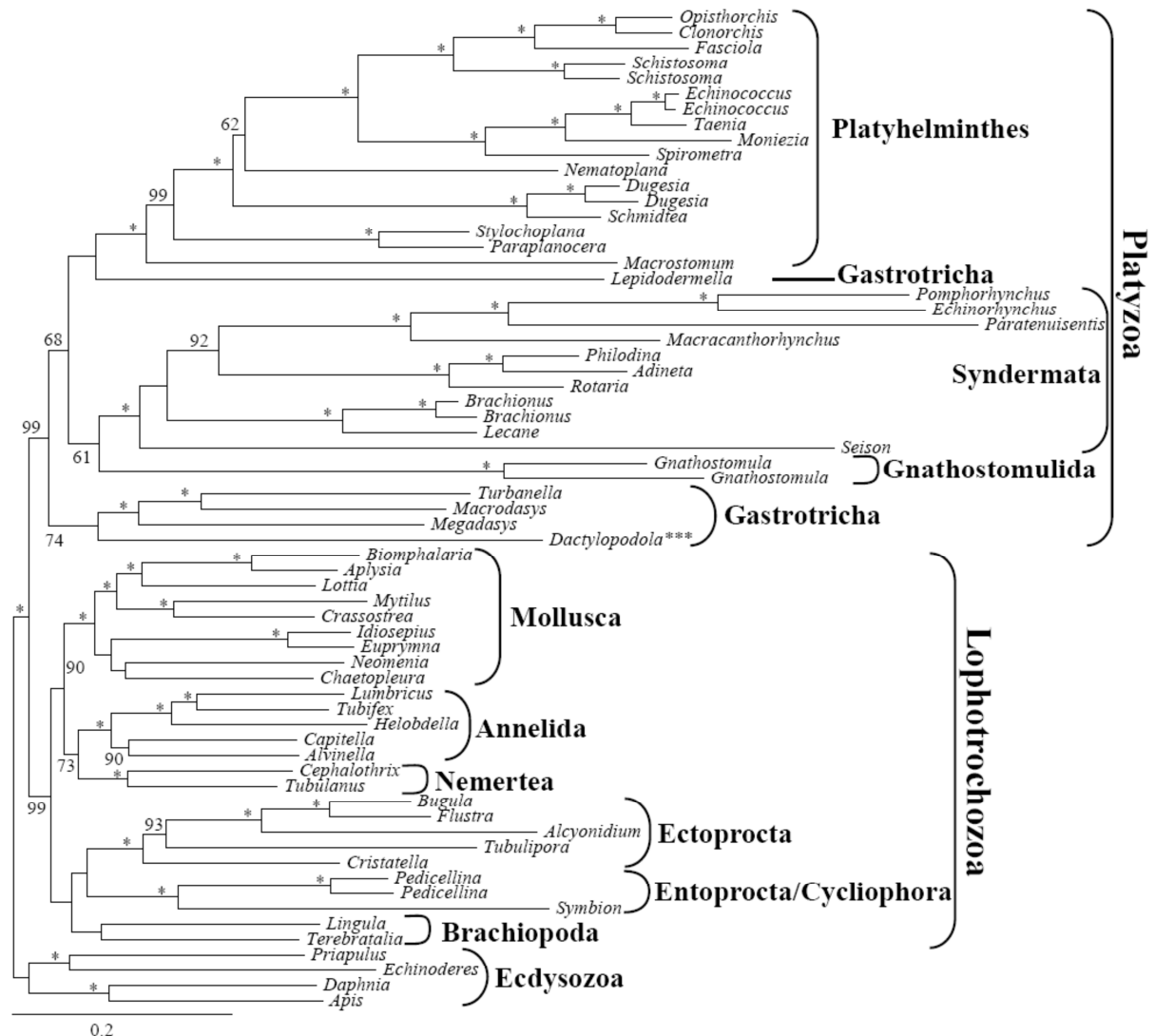


Fig. 1. Maximum Likelihood (ML) tree obtained by analysis of dataset d01 with 65 taxa and 82,162 amino acid positions.

Only bootstrap support (BS) values ≥ 50 are shown at the branches, * indicates maximal support of 100. Higher taxonomic units are indicated.

As we wanted to test for LBA we used the direct measurement of branch length heterogeneity instead of evolutionary rate. Thus, we generated datasets with either different degrees of missing data (d02-d06), proportion of low base composition heterogeneity (d07) or low branch length heterogeneity (d08) as well as genes being part of the 70% or 95% confidence intervals of the first two principal components (d09 & d10) (Supplementary Tables S9 & S13). Based on the results of the principal component analysis we present in detail the results of three datasets d07 (low base composition heterogeneity), d08 (low

branch length heterogeneity) and d02. The latter combines a low degree of missing data with a high number of positions.

Analyses of these three datasets excluding the four above-mentioned unstable platyzoan taxa consistently resulted in paraphyletic Platyzoa (Fig. 4, Table 1) as observed before when excluding long branched taxa from the large dataset d01. Once more, Platyhelminthes was sister to Gastrotricha (BS 76, 84 & 71, Rousphozoa in Table 1) and Lophotrochozoa was recovered as a monophyletic group (BS 98, 47 & 95). The clade of Gastrotricha/Platyhelminthes was sister to

Lophotrochozoa (BS 72, 86 & 75, Table 1) and Syndermata was sister to the all other spiralian taxa again. Thus, either by increasing the coverage (d02) or decreasing base composition or branch length heterogeneity (d07 & d08) paraphyletic

Platyzoa was recovered (Table 1), as a clade comprising Gastrotricha, Platyhelminthes and Lophotrochozoa gained strong branch support exceeding values of 70.

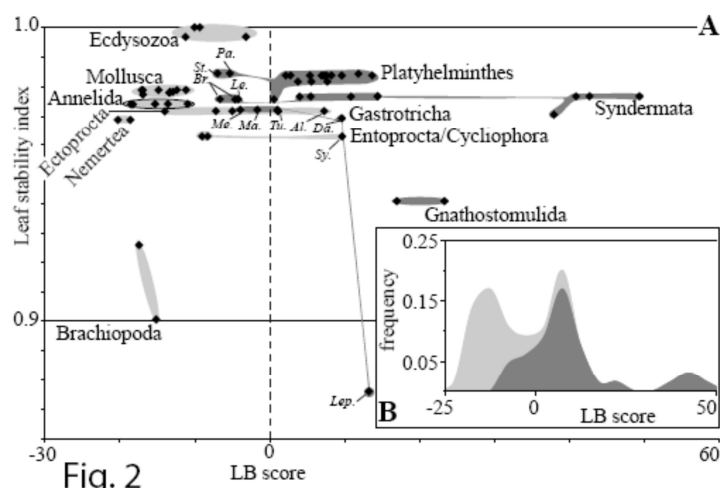


Fig. 2. Leaf stability indices and LB scores based on the ML analysis of dataset d01 with 65 taxa and 82,162 amino acid positions.

(A) Plot of leaf stability indices against LB scores. (B) Distribution of LB scores. The dashed line in A indicates LB score = 0. Shades distinguish ecdysozoan and lophotrochozoan species (light grey) from putative platyzoan species (dark grey). Some species are also labelled: Pa= Paraplanocera, St= Stylochoplana, Br= Brachionus, Le= Lecane, Me= Megadasys, Ma= Macrodasys, Da= Dactylopodola, Lep= Lepidodermella, Sy= Symbion, Tu= Tubulipora, Al= Alcyonidium.

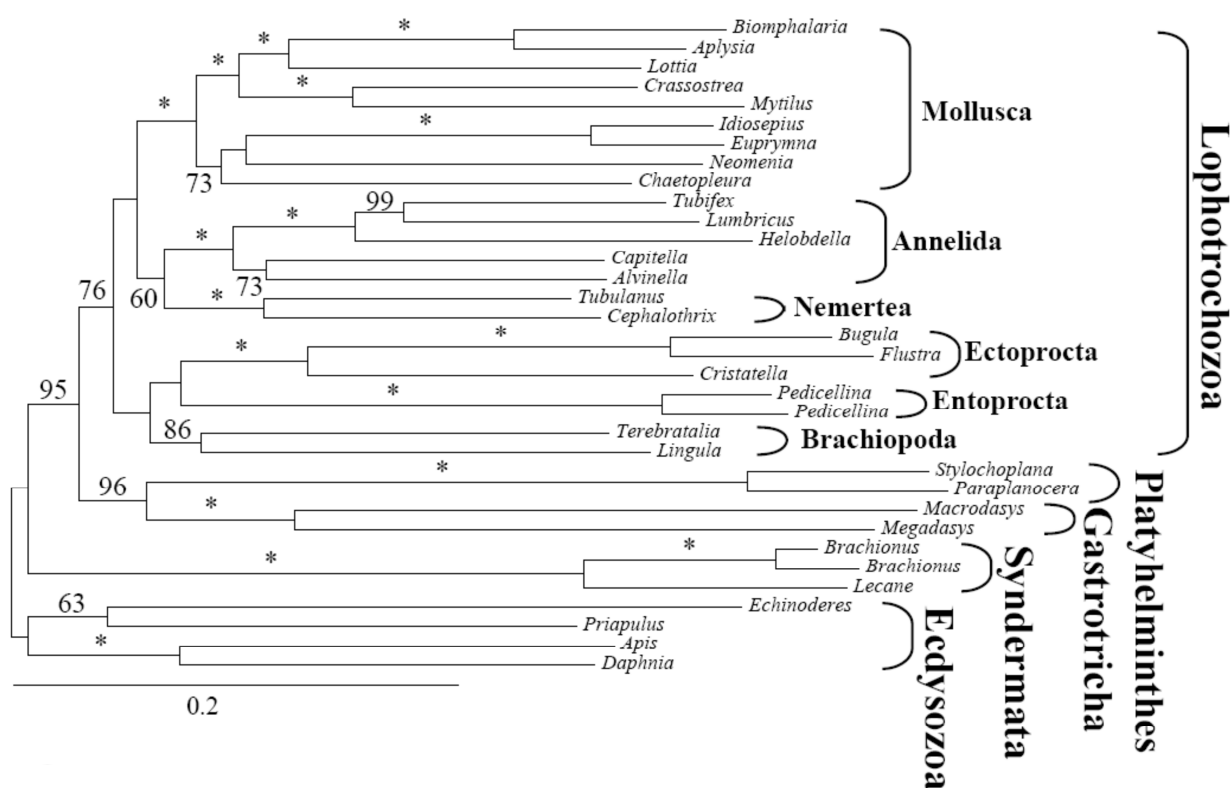


Fig. 3. ML tree obtained by analysis of dataset d01 with 34 taxa and 82,162 amino acid positions.

All taxa exceeding LB scores > 0 in tree of Fig. 1 were excluded. Only BS $\geq$ 50 are shown at the branches, * indicates maximal support of 100. Higher taxonomic units are indicated.

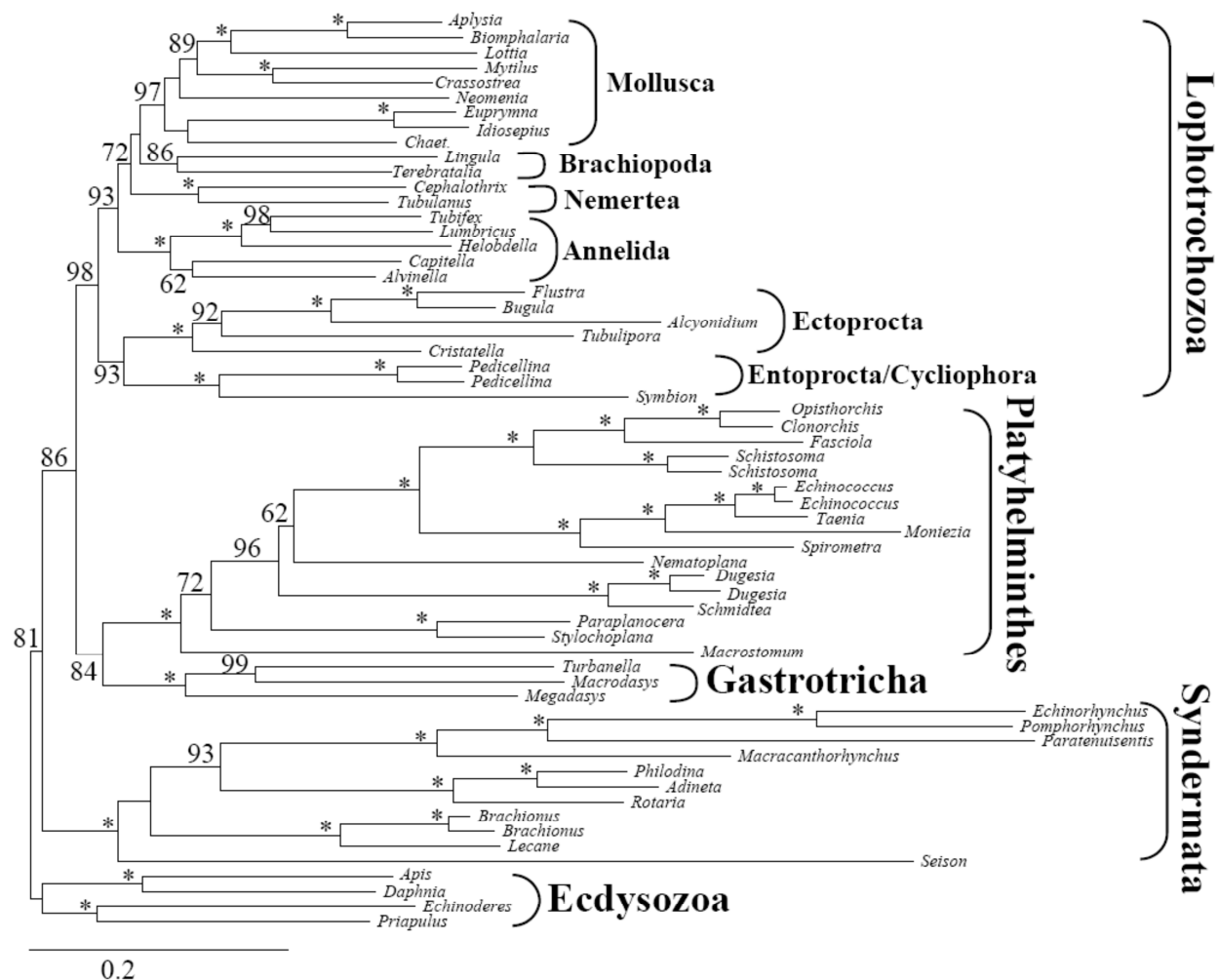


Fig. 4. ML tree obtained by analysis of dataset d02 with 61 taxa and 36,513 amino acid positions.

Only partitions with low to medium up to low degrees of missing data were included and the four unstable taxa (*L. squamata*, *D. baltica* and the two Gnathostomulida species) were excluded. Only BS ≥ 50 are shown at the branches, * indicates maximal support of 100. Higher taxonomic units are indicated.

Additional exclusion of long-branched species (Figs. 2 & 3) reproduced paraphyly of Platyzoa in all analyses, even with maximum bootstrap support in some analyses. Again Platyhelminthes was sister to Gastrotricha (BS 93, 97 & 54, Fig. 5, Rousphozoa in Table 1) and both were more closely related to the lophotrochozoan taxa than to Syndermata (BS 100, 100 & 50, Fig. 5, Rousphozoa in Table 1). Moreover, comparing the trees without longbranched species (Figs. 3 & 5) to the one with all species (Fig. 1) shows that now similar branch lengths lead to the “platyzoan” and lophotrochozoan species (Figs. 3 & 5). Additionally, the standard deviation of the species-specific LB scores for the trees shown in Figs. 3 & 5 are 10.3 and 9.3, respectively, and, hence, lower than the standard deviation of 15.4 for the tree of Fig. 1. This means that the latter exhibits much stronger branch length heterogeneity across all taxa than the former two. Similarly, the standard deviations for the classical tip-to-root distances are lower for the trees of

Figs. 3 & 5 with 0.054 and 0.143 than for the tree of Fig. 1 with 0.202.

We also used a Bayesian approach with the GTR+CAT model, as this is known to be more robust towards long-branch attraction than classical ML models such as LG (Lartillot et al. 2007). Due to computational time restrictions and high memory requirements we were not able to use the large dataset d01 (82,162 positions). Instead, we chose dataset d02 (low to medium-low degree of missing data; 36,513 positions; 46.1% coverage; Supplementary Table S9) as the principal component analysis indicated coverage as the most influential property in the first component. Importantly, the Bayesian approach did not recover monophyletic Platyzoa, but instead a clade including Gastrotricha+Platyhelminthes and monophyletic Lophotrochozoa (posterior probability (PP) = 1.00, Fig. 6) and again Gnathostomulida+Syndermata was sister to this clade (PP=1.00, Fig.6).

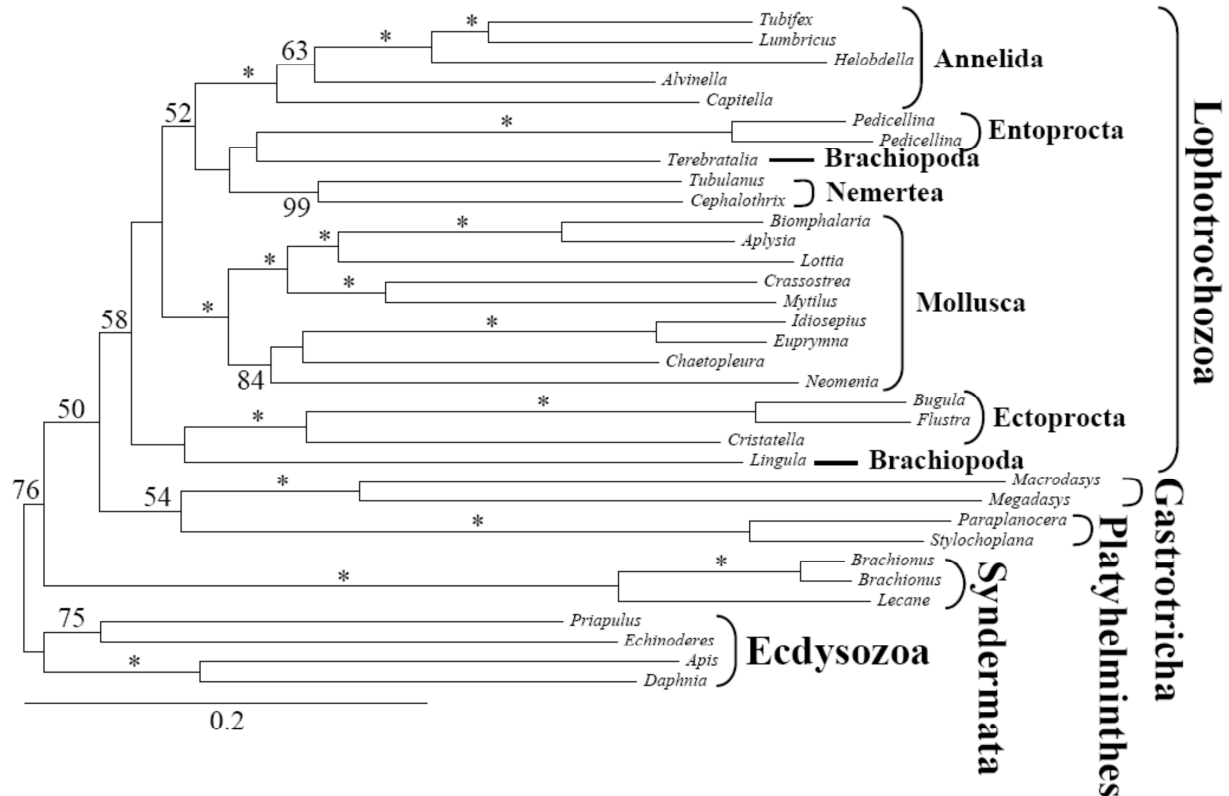


Fig. 5. ML tree obtained by analysis of dataset d08 with 34 taxa and 29,133 amino acid positions.

Only partitions with low degrees of branch length heterogeneity were included and all taxa exceeding LB scores > 0 in tree of Fig. 1 were excluded. Only BS ≥ 50 are shown at the branches, * indicates maximal support of 100. Higher taxonomic units are indicated.

Thus, combining Bayesian and Maximum Likelihood analyses with different data and taxa exclusion strategies could not recover monophyletic Platyzoa in contrast to analyses using only large numbers of data (Figs. 1, 3-6, Table 1). Considering all 10 datasets (i.e., d01 to d10) bootstrap support for monophyletic Platyzoa substantially increased with additional amino acid positions (dark grey line in Fig. 7A), while support for paraphyly decreased (black line in Fig. 7A). In contrast, support for monophyly of Lophotrochozoa was not strongly affected by the number of positions analysed (light grey line in Fig. 7A). It is a well-known phenomenon of LBA that it is positively misleading; that is, with increasing numbers of positions the artificial group is more robustly recovered (Felsenstein 1978; Huelsenbeck 1997; Bergsten 2005). On the other hand, excluding long-branched species from analyses did not lead to such correlations. In particular, support for the monophyly of Platyzoa remained low irrespective of the number of alignment positions (dark grey line in Fig. 7B).

Additionally, we determined for each dataset the number of single-gene trees supporting

monophyly or paraphyly of Platyzoa. Across all datasets the percentage of single genes supporting platyzoan paraphyly ranged from 8.6% to 11.7% and, thus, was higher than the percentage supporting monophyletic Platyzoa, ranging from 0.5% to 3.2% (Table 2). Interestingly, decreasing the degree of missing data (i.e., d01-d06) and, hence, increasing the number of taxa per gene, the ratio of the percentage of trees supporting paraphyly relative to the percentage of trees supporting monophyly strongly increased (black line in Fig. 7C). Directly addressing biases in the data such as base or branch length heterogeneity did not have such an effect on the ratio. In the case of LBA only strategies as used herein, which are able to attenuate its misleading effect by excluding either biased data or species or by increasing taxon coverage per gene, can reveal whether or not an assembly of long branched taxa is artificially grouped together (Bergsten 2005). In conclusion, our analyses support platyzoan paraphyly, while recovery of monophyletic "Platyzoa" is most probably due to LBA.

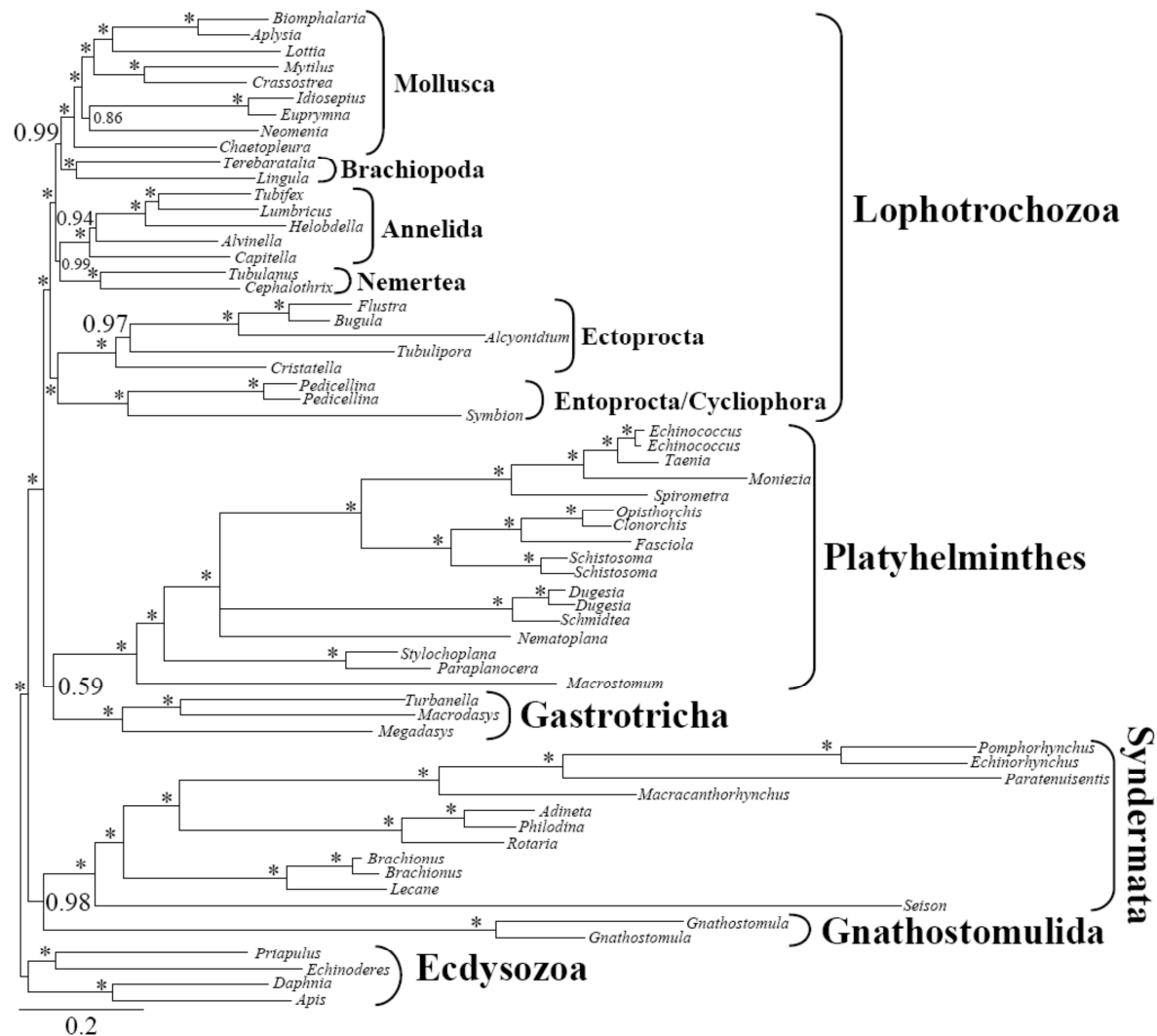


Fig. 6. Bayesian Inference (BI) tree obtained by analysis of dataset d02 with 63 taxa and 36,513 amino acid positions.

Only partitions with low to medium up to low degrees of missing data were included and only the two unstable gastrotrich taxa *L. Squamata* and *D. baltica* were excluded. Only posterior probabilities (PP) ≥ 0.50 are shown at the branches, * indicates maximal support of 1.00. Higher taxonomic units are indicated.

Position of Gnathostomulida.

In addition to LBA, the inference of a stable topology was hampered by the inclusion of Gnathostomulida and the two gastrotrichs *Lepidodermella* and *Dactylopodola*. In order to elucidate the phylogenetic position of Gnathostomulida within Spiralia we re-included the two formerly excluded gnathostomulid species into different datasets. Importantly, their inclusion did not alter the topology with respect to platyzoan paraphyly in any tree reconstruction (e.g., compare Figs. 4 & 8). Analysis of dataset d07 excluding unstable taxa except Gnathostomulida (i.e., *Lepidodermella* and *Dactylopodola*) and of dataset d02 excluding all long-branched taxa, recovered Gnathostomulida as part of a clade with Gastrotricha and Platyhelminthes (Table 3). However, all other analyses placed Gnathostomulida as sister to Syndermata with BS

values of up to 91, even though overall bootstrap support remained low (Fig. 8, Table 3). Moreover, the Bayesian analysis also recovered a sistergroup-relationship of Gnathostomulida and Syndermata with strong support (PP=0.98, Fig. 6). This position of Gnathostomulida as sister to Syndermata is consistent with the Gnathifera hypothesis (Ahlrichs 1997; Herlyn and Ehlers 1997). Monophyly of Gnathifera has also been found in previous studies based on ribosomal protein data (Witek et al. 2009; Hausdorf et al. 2010) and is also strongly supported by the likely homology of gnathostomulidan jaws and rotiferan trophi (Rieger and Tyler 1995; Haszprunar 1996; Ahlrichs 1997; Herlyn and Ehlers 1997; Jenner 2004a). For a thorough analysis of the phylogenetic relations within Syndermata and the implication for their evolution we refer to a recent transcriptome-based study (Wey-Fabrizius et al. 2014).

A novel view on spiralian phylogeny.

In summary, our analyses support the monophyly of Lophotrochozoa and of a clade combining Gastrotricha and Platyhelminthes. Gnathifera is sister to a clade comprising the aforementioned taxa (Fig. 9). No morphological apomorphy is known to date supporting either a monophyletic origin of Platyhelminthes and Gastrotricha or of Platyhelminthes, Gastrotricha and Lophotrochozoa (Jenner 2004a; Rothe and Schmidt-Rhaesa 2009) and, hence, could be used for naming these two clades. However, whereas most of the other spiralian taxa exhibit additional structures for food gathering in their ground pattern (e.g. palps in annelids, proboscis in nemerteans, filter feeding apparatuses in lophophorates, entoprocts, and cycliophorans, as well as jaw-like elements in rotifers, gnathostomulids and molluscs), gastrotrichs and most flatworm species ingest food without such extra-structures, just by dilating their rather simple pharynx. The respective pharynx simplex is part of the ground pattern of Platyhelminthes and enables the swallowing of prey by either sucking action or engulfment (Doe 1981). Gastrotricha possess a Y-shaped or inverted Y-shaped sucking pharynx (Kieneke et al. 2008). Although gathering food by sucking is not necessarily an autapomorphy of these two taxa, this common characteristic can nonetheless be utilised for naming the clade. We therefore suggest the name Rouphezoa (derived from the Greek word *rouphao* for ingesting by sucking) to define the last common ancestor of Platyhelminthes and Gastrotricha and all its descendants. The clade of Rouphezoa + Lophotrochozoa can be named Platytrchozoa, reflecting that it comprises Platyhelminthes and taxa with a trochophore larva and all extant descendants of the last common ancestor of Platyhelminthes and Lophotrochozoa. Spiralia then comprises Gnathifera (Syndermata+Gnathostomulida) and Platytrchozoa.

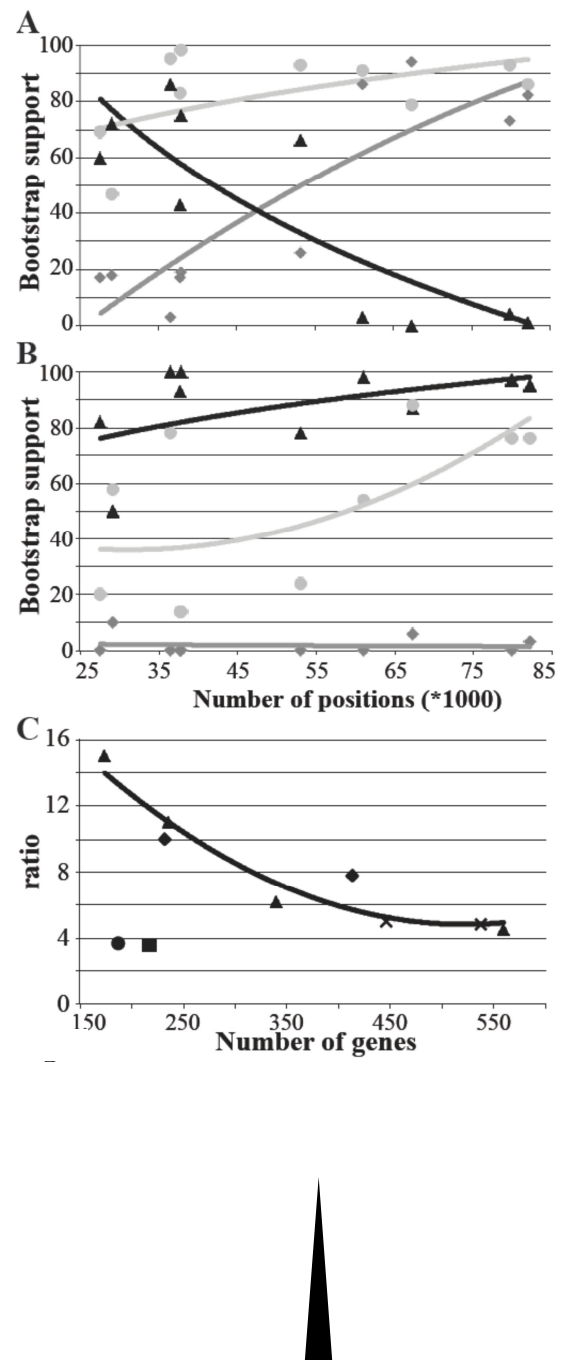


Fig. 7. Bootstrap support and the ratio of single-genes supporting parphyly over monophyly relative to the number of alignment positions or genes.

(A, B) Bootstrap support for monophyly and parphyly of Platyzoa as well as monophyly of Lophotrochozoa relative to the number of positions. (A) Analyses based on 61 taxa, from which the four unstable taxa (*L. squamata*, *D. baltica* and the two Gnathostomulida species) were excluded. (B) Analyses based on 34 taxa, from which all taxa exceeding LB scores > 0 in tree of Fig. 1 were excluded. Light grey = monophyly of Lophotrochozoa, dark grey = monophyly of Platyzoa, black = parphyly of Platyzoa. Best-fitting trend lines generated by Excel are also shown in the same colours. (C) Ratio of the percentage of single-gene trees supporting parphyly of Platyzoa to the percentage of single-gene trees supporting monophyly of Platyzoa relative to the number of genes. Diamonds = datasets d02 & d03 with reduced missing data; triangles = datasets d01, d04-d06 generated using MARE; circle = dataset d07 with reduced base heterogeneity; square = dataset d08 with reduced branch length heterogeneity; crosses = datasets d09 & d10 based on confidence intervals of PCA. The bestfitting trend line generated by Excel for the datasets d01-d06 with decreasing degrees of missing data is shown in black.

Table 2. Percentage of single-genes supporting monophyly or paraphyly of Platyzoa.

^a # genes = number of genes in dataset, ^b % mono. = percentage of single-gene trees supporting monophyly of Platyzoa, ^c % para. = percentage of single-gene trees supporting paraphyly of Platyzoa, ^d % lack = percentage of single-gene trees lacking resolution regarding this question, ^e para./mono. = ratio of the percentage of single-gene trees supporting paraphyly of Platyzoa to the percentage of single-gene trees supporting monophyly of Platyzoa, ^f PCA = principal component analysis.

Dataset	degree of missing data						heterogeneity		PCA	
	d01	d02	d03	d04	d05	d06	d07	d08	d09	d10
# genes ^a	559	232	413	340	235	174	217	187	446	537
% mono. ^b	2.1	0.9	1.2	1.5	0.9	0.6	3.2	3.2	2.0	2.0
% para. ^c	9.7	8.6	9.4	9.1	9.4	8.6	11.5	11.8	10.1	9.9
% lack ^d	88.2	90.5	89.3	89.4	89.8	90.8	85.3	85.0	87.9	88.1
Para./mono. ^e	4.5	10	7.8	6.2	11	15	3.6	3.7	5	4.8

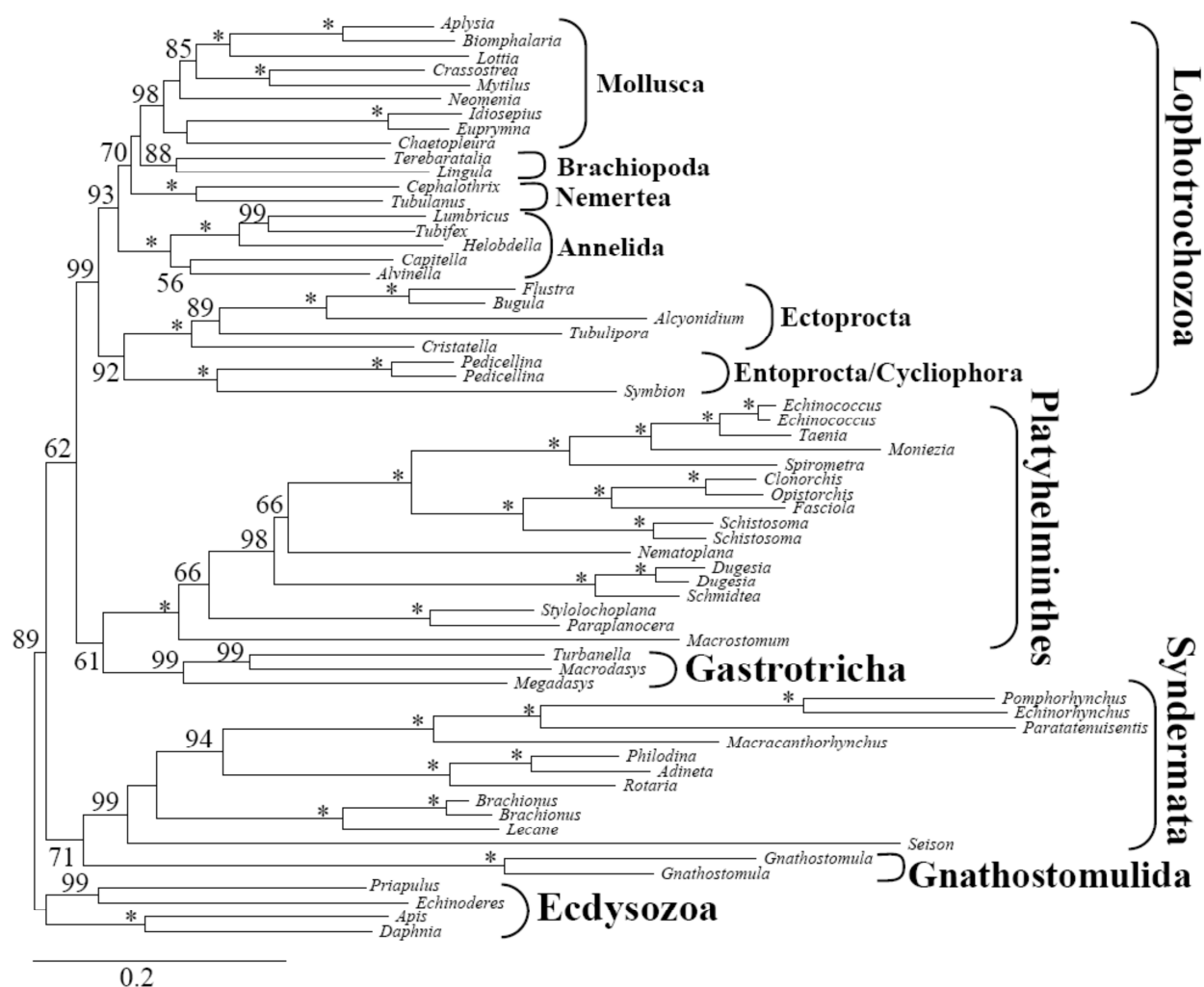


Fig. 8. ML tree obtained by analysis of dataset d02 with 63 taxa and 36,513 amino acid positions.

Only partitions with low to medium up to low degrees of missing data were included and only the two unstable gastrotrich taxa *L. squamata* and *D. baltica* were excluded. Only BS ≥ 50 are shown at the branches, * indicates maximal support of 100. Higher taxonomic units are indicated.

Table 3. Bootstrap support for monophyly of Gnathifera.

^a Excl. = excluded (same as in Table 1 except for Gnathostomulida), ^b # taxa. = number of taxa, ^c LB = long branched taxa, ^d Gnathostomulida not placed as sister to Syndermata in the ML tree, but in a clade with Gastrotricha and Platyhelminthes. * Support values are part of the 70% confidence set.

Dataset	Excl. taxa ^a	# taxa ^b	Gnathifera
d01	None	65	61
(all data)	unstable	63	91*
	LB ^c	36	67
d02	unstable	63	71*
(high coverage)	LB ^c	36	10 ^d
d07	Unstable	63	48 ^d
(low base frequency heterogeneity)	LB ^c	36	86*
d08	unstable	63	24
(low branch length heterogeneity)	LB ^c	36	12

Implications for bilaterian evolution.

The paraphyly of Platyzoa with respect to Lophotrochozoa is more in line with the traditional “acoeloid-planuloid” hypothesis than with the scenario of a last common ancestor of Deuterostomia, Ecdysozoa and Spiralia with a segmented and coelomate body organization resembling an annelid. Within Spiralia the non-coelomate, small-sized taxa successively branch off first (Fig. 9). Both Gnathostomulida and Gastrotricha comprise small interstitial organisms with an acoelomate body organization and less than 4 or 2 mm of length, respectively (Nielsen 2012). Within Syndermata only the highly modified, parasitic Acanthocephala are larger than a few millimeters and all exhibit a pseudocoelomate organization (Herlyn and Röhrig 2003; Nielsen 2012). Similarly, in Platyhelminthes the ancestral condition is also a small-sized, acoelomate organization as seen today in Catenulida and Macrostomorpha, which are less than 5 mm in length (Nielsen 2012). Within Spiralia, animals with a coelomate body organization are, according to our analyses, only found in Lophotrochozoa (Fig. 9). Thus, it is epistemologically more parsimonious to assume that the last common ancestor of Spiralia was an animal lacking a coelomic body cavity. Although many relationships within Lophotrochozoa are still unresolved in our study and warrant further investigations, our analyses suggest that within Spiralia coelomic cavities with a lining epithelium might have originated at the earliest in the stem lineage of Lophotrochozoa. Additionally, recent investigations of development and formation of

coelomic cavities using a comparative anatomical approach revealed considerable differences between Annelida and Panarthropoda already in the earliest steps of coelomogenesis (for review see Koch et al. 2014). Hence, segmental coeloms in annelids and arthropods are not necessarily homologous structures (Koch et al. 2014). In addition, the developmental origins of coelomic cavities in deuterostomes differ from those in lophotrochozoans and panarthropods (Nielsen 2012). Considering these differences and our results, it is more probable that coelomic cavities evolved independently within the major bilaterian clades Deuterostomia, Ecdysozoa and Spiralia. Clearly, further analyses of the underlying genetic regulatory networks in coelom formation across a wide variety of coelomate and non-coelomate taxa are necessary to substantiate or reject this conclusion.

The position of coelomate Chaetognatha within Bilateria is also of interest in this aspect, but still enigmatic based on both molecular and morphological data. Deuterostome as well as protostome affinities including a sistergroup relationship to Spiralia have been proposed (Marletaz et al. 2006; Matus et al. 2006; Dunn et al. 2008; Perez et al. 2014). Moreover, Chaetognatha possess a unique type of coelom formation, heterocoely, which exhibits no strong similarities to the other types of coelom formation (Kapp 2000; Perez et al. 2014) and, hence, might be indicative of a convergent evolution of coelomic cavities in Chaetognatha. However, ultrastructural studies of coelom formation are lacking at the moment (Perez et al. 2014).

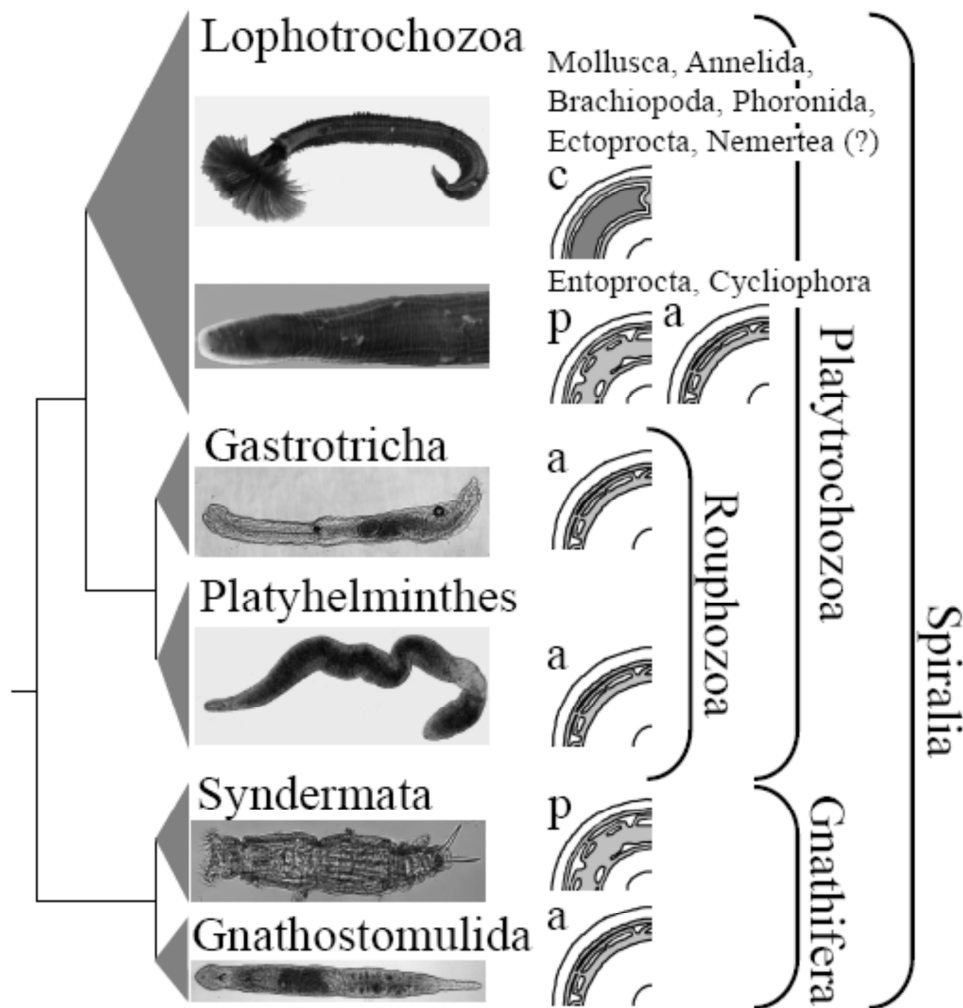


Fig. 9. Proposed phylogeny of Spiralia.

Higher taxonomic units and names are given. Drawings depict the acoelomate (= a), pseudocoelomate (= p) and coelomate (= c) body organization. Picture of *Rotaria neptunoida* (Syndermata) was courtesy of Michael Plewka. (?) means that it is still discussed if the lateral vessels of the nemertean circulatory system are homologous to coelomic cavities of other lophotrochozoan taxa (Turbeville 1986).

The alternative scenario whereupon evolution progressed from complex to simple in Bilateria is mainly based on similarities in segmentation in vertebrates, arthropods and annelids (De Robertis 2008; Couso 2009; Chesebro et al. 2013). However, in our analyses Annelida was always deeply nested within Lophotrochozoa. Thus, similar to the evolution of coelomic cavities, a segmented ancestry of Spiralia would imply several independent losses of this organization, which we regard as less parsimonious. Moreover, Annelida and Arthropoda exhibit high plasticity in segmentation and, on the other hand, other spiralian and ecdysozoan taxa exhibit varying degrees of repetitive organization in organ systems. This includes Kinorhyncha, Monoplacophora and Polyplacophora, Eucestoda and other platyhelminths, some nematodes and nematomorphs, and a nemertean (Hannibal and Patel 2013; Struck 2013b). In addition,

segmentation is mostly restricted to tissue derived from the ectoderm in arthropods, from the mesoderm in vertebrates, and from both germ layers in annelids (Nielsen 2012). A possible explanation for similarities in segment formation including developmental pathways like the *notch* oscillation could be that these gene regulatory networks have been co-opted from ancestral networks involved in the organization of repetitive organ systems (Davidson and Erwin 2006; Chipman 2010). However, this hypothesis cannot be conclusively proven due to a current lack of data on developmental gene pathways in taxa with such repetitive organ systems (Chesebro et al. 2013). Nonetheless, the spiralian phylogeny derived herein provides additional support for the hypothesis that segmentation evolved independently within Deuterostomia, Ecdysozoa and Spiralia.

Support for a complex bilaterian ancestor also arose from the observation of neuronal structures called mushroom bodies that were consistently present in arthropods and some annelids, as well as similar gene expression patterns noted in these bodies and in the vertebrate pallium (Heuer et al. 2010; Tomer et al. 2010). However, within annelids, mushroom bodies occur exclusively in five families of the subgroup Errantia, which are all characterized by a high vagility (Heuer et al. 2010; Struck et al. 2011), while they are not known for any other annelid or spiralian taxa (Rothe and Schmidt-Rhaesa 2009; Heuer et al. 2010; Nielsen 2012; Loesel 2014). Thus, if such distinct higher brain centres are taken as an ancestral condition of a complex last common spiralian ancestor (Heuer et al. 2010), several losses within Spiralia, including even several ones within Annelida, have to be assumed. On the other hand, the gastrotrich nervous system consists of a brain with a solid arch-like dorsal commissure with laterally positioned cell somata and a fine ventral commissure as well as a pair of longitudinal, lateroventral nerve cords joining posteriorly (Rothe and Schmidt-Rhaesa 2009). This organization is similar to the organization of the nervous system of Acoelomorpha. Hence, in comparison to the net-like plexus without a cerebral ganglion in non-bilaterian animals, both Gastrotricha and Acoelomorpha express a certain degree of condensation at the anterior end to form a more or less condensed commissural brain, but to a lesser degree than other bilaterian taxa (Rothe and Schmidt-Rhaesa 2009). Thus, Gastrotricha might still exhibit the ancestral bilaterian condition indicative that also the last common ancestor of Spiralia showed that characteristic. Moreover, also, for example, platyhelminths, syndermatans, gnathostomulids, or entoprocts show anterior condensations of the central nervous system, but not to the same degree as in elaborate brains, which can be found in some molluscs or annelids (Northcutt 2012; Loesel 2014). Such a condensation is in general agreement with a small-sized, non-coelomate ancestor for Spiralia showing no complex body organization. On the other hand, the observed similarities in the expression profiles of mushroom bodies of arthropods and annelids as well as the vertebrate pallium support the view that the evolution of more complex brain centres occurred early on in Bilateria (Heuer et al. 2010; Tomer et al. 2010). However, all three organs are part of the olfaction system. Analyses of these expression profiles in the brains of other bilaterian taxa are lacking in the moment. Hence, instead of being indicative of elaborative morphological structures the observed similar expression profiles could be part of ancestral gene regulatory

networks involved in the integration of chemosensory input in clusters of cells of more simply organized brains. However, developmental biological studies of the olfaction system of other bilaterian taxa such as Gastrotricha or Platyhelminthes are required to substantiate either hypothesis.

In conclusion, paraphyly of "Platyzoa" with respect to Lophotrochozoa and the spiralian phylogeny presented herein provide support for the view that the last common ancestor of Spiralia was an organism without coelomic cavity, segmentation and elaborate brain structures, which probably inhabited the marine interstitial realm. This implies that evolution in Bilateria progressed most likely from a simple ancestor to more complex descendants independently within the three major bilaterian clades. However, we cannot rule out that miniaturization or a progenetic origin of the discussed taxa lead to loss of their morphological complexity. Several such examples are known from annelids and arthropods as in these cases it was more parsimonious to assume secondary simplification than convergent evolution (Jenner 2004b; Bleidorn 2007). However, the above discussion also shows that besides a robust phylogeny of Spiralia and Bilateria developmental biological studies of gene regulatory networks and expression profiles beyond the few standard model organisms are necessary to understand the evolution of Spiralia.

Material and Methods

Data generation.

Supplementary Table S1 lists species (four gastrotrich, two flatworms, two wheel animals, one acanthocephalan, one gnathostomulid, as well as two nemertean species) collected for this study. As deeply sequenced transcriptome libraries were lacking for nemerteans we additionally constructed them for representatives of this taxon. Upon collection, samples were either snap-frozen at -80°C or stored in RNAlater. Total RNA was isolated using the NucleoSpin RNA XS Kit (Macherey-Nagel) for *Rotaria rotatoria* and *Lecane inermis* (both Syndermata, classical Rotifera), the peqGOLD MicroSpin Total RNA kit (peqlab) for *Gnathostomula paradoxa* (Gnathostomulida), *Megadasys* sp., *Macrodasys* sp., *Dactylopodola baltica* and *Lepidodermella squamata* (all Gastrotricha) or the peqGOLD Total RNA kit (peqlab) for *Tubulanus polymorphus*, *Cephalothrix linearis* (both Nemertea), *Nematoplanea coelogyneporoides* and *Stylochoplana maculata* (both Platyhelminthes) and *Macracanthorhynchus hirudinaceus* (Syndermata, Acanthocephala).

For all species, except the nemerteans, total RNA was reverse-transcribed to doublestranded cDNA with the MINT UNIVERSAL cDNA synthesis kit (Evrogen) to produce amplified cDNA libraries. For *R. rotatoria*, Gnathostomulida and Gastrotricha a modified amplification protocol, which included an *in-vitro* transcription step, had been used. For this protocol the cDNA synthesis was modified to contain 1 mM T7-PlugOligo (5'-C AATT GTAA TAC GAC TCA CTA TAGG GAGAACGGGGG-3') comprising a T7 promotor sequence instead of 1 mM PlugOligo-3M in combination with CDS-3M adapter for the 1st strand synthesis and 0.1 mM T7-primer (5'-AATT GTAA TAC GAC TCA CTA TAGG -3') plus 0.1 mM M1-primer instead of 0.2 mM M1-primer for the 2nd strand synthesis. Amplified cDNA was purified using the peqGOLD Cycle-Pure Kit (peqlab), digested with *Sfil* and sizefractionated using CHROMA SPIN-1000 (Clontech). Purified cDNA was vacuum-concentrated to 15.5 µl and 13 µl were used for the generation of mRNA by *in vitro*-transcription (over night; 37°C) employing T7 RNA polymerase (reaction conditions: 40 µl with 0.075 mM of each NTP, 1 u/µl RNase inhibitor, 0.5 mM DTT and 5u/µl T7 RNA polymerase (Invitrogen)). Messenger RNA was purified using peqGOLD Total RNA kit (peqlab).

The amplified cDNA libraries prepared from platyhelminths and *L. inermis* were sequenced by GENTERprise GmbH (Mainz) or the Max Planck Institute for Molecular Genetics (Berlin) by 454 pyrosequencing using standard protocols. Illumina sequencing libraries for Nemertea, Gnathostomulida and Gastrotricha were prepared with double indices following the protocol described by Meyer and Kircher (2010) and Kircher et al (2011) starting either with totalRNA (Nemertea) or amplified mRNA (Gnathostomulida and Gastrotricha) as described by Hering et al (2012). The libraries were sequenced at the Max Planck Institute of Evolutionary Anthropology (Leipzig), using an Illumina Genome Analyzer IIx (GAIIx) with 76 cycles paired end. Total RNA of *M. hirudinaceus* and amplified mRNA of *R. rotatoria* were sequenced using an Illumina HiSeq 2000 (100 bp paired end) at the Institute of Molecular Genetics, Johannes Gutenberg University (Mainz). The sequencing library of *M. hirudinaceus* was additionally run on an Illumina MiSeq machine (150 bp paired end) by GENTERprise GmbH (Mainz). Publically available transcriptomes (ESTs and RNA-Seq) and genomic data from 49 spiralian species complemented these data (Supplementary Table S2). For the choice of outgroup taxa different considerations have to be taken into account given that platyzoan taxa are eventually affected by long-branch attraction. First of all, the outgroup taxa should not introduce additional long branches

themselves (Bergsten 2005). Hence, distantly related outgroup taxa should be avoided as well as outgroups exhibiting increased substitution rates (Milinkovitch et al. 1996; Philippe et al. 2011). Therefore, we used only representatives of Ecdysozoa, the sister group of Spiralia, and did not consider nematodes and nematomorphs, which are known to possess long branches themselves. Moreover, more than a single outgroup taxon should be used and the diversity of outgroup taxa should be reflected (Milinkovitch et al. 1996; Bergsten 2005). Thus, we chose representative species of priapulids, kinorhynchs, and pancrustaceans as it has been previously shown that three to four outgroup taxa are sufficient to resolve difficult phylogenies when one also takes into account the computational limitations of phylogenomic studies (Rota-Stabelli and Telford 2008). Finally, the properties of the outgroup taxa sequence data should be similar to the ones of the ingroup taxa (Rota-Stabelli and Telford 2008) and in the case of long branch attraction being more similar to short branched ingroup taxa than to the long branched ones. The LB scores show that the chosen ecdysozoan species are similar to the short-branched spiralian taxa (Fig. 2). For other properties, such as proportion of missing data and especially base composition heterogeneity, ecdysozoan taxa are similar to the ingroup taxa (Supplementary Fig. S5).

Data assembly.

Processing of *M. hirudinaceus* and *R. rotatoria* data was performed using the FastX toolkit and included trimming of (I) 12 base pairs at the 5'-end, (II) adapter sequences and (III) low quality bases (cutoff 25). Reads longer than 20 base pairs after trimming were sorted into intact pairs and singletons using a custom perl script and were subsequently assembled using the CLC Genomics Workbench 5.5 (CLC Bio).

For the GAIIX data bases were called with IBIS 1.1.2 (Kircher et al. 2009), adaptor and primer sequences removed and reads with low complexity as well as mispaired indices discarded. Raw data of all libraries were trimmed, discarding all reads with more than 5 bases below a quality score of 15. For 454 pyrosequencing data, sequences were thinned and quality filtered as implemented by Roche. In contrast to those data that were retrieved from the NCBI nr database (i.e., *Moniezia expansa*) as well as the genomic data present in the lophotrochozoan core ortholog set of HaMStR (i.e., *Schistosoma mansoni*, *Lottia gigantea*, *Helobdella robusta*, *Capitella teleta* and *Apis mellifera*) the other data were further trimmed, quality-filtered and assembled as described in either Hausdorf et al (2007) or in Riesgo et al (2012) using the CLC

Genomics Workbench with 0.05 as the limit for thinning and the scaffolding option in the assembly.

Sets of orthologous genes were determined using a profile hidden Markov model-based, reciprocal hit triangulation search using a modified version of HaMStR version 8 (Ebersberger et al. 2009) (called HaMStRad and the modified files are available at <https://github.com/mptksen/HaMStRad>). As a core set we used the Lophotrochozoa set of 1,253 genes derived from the Inparanoid database (<http://inparanoid51.sbc.su.se>) for the primer-taxa *Capitella teleta*, *Helobdella robusta*, *Lottia gigantea*, *Schistosoma mansoni*, *Daphnia pulex*, *Apis mellifera*, and *Caenorhabditis elegans*. Modifications of HaMStR included the usage of Exonerate (Slater and Birney 2005) instead of Genewise (Birney et al. 2004) to provide frame shift-corrected, corresponding nucleotide sequences. We used the representative option with all primer taxa, the relaxed option and a cutoff e value of e^{-05} . Using the representative option might result in the assignment of the same sequence into different sets of orthologous genes. Such redundantly assigned sequences were removed using custom perl scripts, and the responsible bug in HaMStR fixed for future analyses. Each set of orthologous genes was individually aligned using MAFFT-Linsi (Katoh et al. 2005) followed by the determination of questionably aligned positions with AliScore (Kück et al. 2010) and masking with AliCut using default parameters. The 1,253 genes were concatenated into a super-matrix using FASconCAT (Kück and Meusemann 2010) and the super-matrix was reduced based on the phylogenetic signal in a gene by assessing the tree-likeness by quartetmapping using extended geometry mapping as implemented in MARE (Meusemann et al. 2010). We excluded the species of the core ortholog set *Schistosoma mansoni*, *Lottia gigantea*, *Helobdella robusta*, *Capitella teleta*, *Daphnia pulex*, and *Apis mellifera* prior to matrix reduction and used a d value of 0.5 generating the large dataset d01 (Supplementary Fig. S6).

Paralogy and contamination screening.

The 559 genes present in dataset d01 were further screened for paralogous sequences and contamination within single-gene datasets. For this purpose, a screening based on bootstrap Maximum Likelihood (ML) analyses of the individual genes (Philippe et al. 2011; Struck 2013a) was conducted using TreSpEx (www.annelida.de). Initially, ML analyses were conducted for the unmasked individual genes (Supplementary Fig. S6). All bipartitions supported

by a bootstrap value equal to or larger than 95 were extracted from the resulting topologies. As a first step all bipartitions congruent with clades for which independent *a priori* evidence of monophyly exist were masked for the following steps (Struck 2013a). The columns “group” and “subgroup” in Supplementary Table S2 as well as genera with more than one representative indicate these *a priori* clades. To be conservative, only sequences of bipartitions that exhibited a conflict with these *a priori* clades were pruned (Supplementary Tables S4 & S5). A conflict in this case meant that species of an *a priori* clade as well as other species were present in both groups of the bipartition. For example, Platyhelminthes was such an *a priori* clade and, if in a bipartition platyhelminth as well as other spiralian and/or ecdysozoan species were present in both clades of the bipartition, this was regarded as a strong conflict. Thus, there was a strong conflict in these cases regarding the monophyly of a clade with *a priori* independent evidence of monophyly. At the group level all, but one clade fulfilled this criterion, i.e. showed strong conflicts. The single exception was a clade comprising only all gnathiferan species in that dataset eventually reflecting true phylogenetic signal. Previous studies have shown that such a pattern is characteristic for phylogenies of paralogous sequences reflecting the gene tree rather than the species tree (Rodríguez-Ezpeleta et al. 2007; Philippe et al. 2009; Philippe et al. 2011; Struck 2013a). However, other sources of artificial signal like shared missing data, compositional biases, contamination, or LBA (Bergsten 2005; Lemmon et al. 2009; Simmons and Freudenstein 2011; Simmons 2012a, b; Struck 2013a) can also result in such a pattern. In any case, potentially strong misleading signal with significant bootstrap support in single gene analyses has been masked by this procedure.

The paralogy screening was followed by a screening procedure for contamination in the libraries of our study. Therefore, the 18S rRNA sequence of *Lineus bilineatus* (DQ279932) was blasted against each assembled library (Supplementary Fig. S6) using blastn and a cutoff value of e^{-20} . All detected contigs were then blasted against the NCBI nr database using blastn. If the best hit represented a species from a different supra-specific taxon with the traditional rank of a phylum than the query species, this was taken as an indication of possible contamination (Supplementary Table S6). For example, for some of the contigs of the *Alvinella pompejana* (Annelida) library, blast searches resulted in best hits linking the query sequence to the nematod *Tripyrella* sp., the arthropod *Ptinus fur* or an uncultured acaulosporan fungus. To prune

eventually contaminated sequences from the sets of 559 genes, reference databases were specifically generated for each affected species based on the blast results against the NCBI database. For the *Alvinella* example, a reference database consisted of the non-redundant proteome information retrieved from the genomes of *Apis mellifera* (Arthropoda), *Caenorhabditis elegans* (Nematoda), *Schizosaccharomyces cerevisiae* (Fungi), and the transcriptome of *Daphnia pulex* (Arthropoda) as negative references as well as from the genomes of *Capitella teleta*, *Helobdella robusta* (Annelida), *Lottia gigantea* (Mollusca) and *Schmidtea mediterranea* (Platyhelminthes) as positive references. Each of the 559 genes present for that species (e.g., *A. pompejana*) was blasted against this species-specific reference database. Three pruning strategies were tested: a sequence was pruned when (I) the best hit was a negative reference sequence, (II) the best hit was a negative reference sequence and in addition the E value was at least one order of a magnitude better than that of the best hit for a positive reference, or (III) the best hit was a negative reference sequence and in addition the E value was at least four orders better than that of the best hit for a positive reference. As ML analyses of the dataset d01 with 65 taxa and 82,162 amino acid positions using the three different pruning strategies resulted in no significant differences of the topologies inferred we chose the most conservative first pruning strategy for subsequent analyses. Custom Perl scripts were written for all these steps.

Phylogenetic analyses.

The most appropriate substitution model was LG+I+Γ as determined using the ProteinModelSelection script for RAxML (Stamatakis 2006). Before the time-consuming Bayesian Inference (BI) we conducted a series of ML analyses as part of the sensitivity analyses and screening procedures (see [Supplementary Fig. S6](#)). In total, 1,129 ML analyses were conducted with RAxML 7.3 (Stamatakis 2006) using 300 and 100 bootstrap replicate searches for concatenated and individual gene datasets, respectively. The bootstrap searches were followed by a search of the best tree. Preliminary analyses using the automatic bootstrapping option (Pattengale et al. 2009) (-# autoMRE) in RAxML obtained a maximum of 240 bootstrap replicates for different tested concatenated datasets and, hence, we used 300 replicates for all analyses for reasons of comparability. Moreover, these preliminary analyses showed that a bootstrap search followed by a best tree search always found a tree with an equal or better likelihood score than independent searches for the best tree using 100 replicate

searches starting from randomized maximum parsimony trees.

For the BI analysis we used PhyloBayes MPI 1.4f (Lartillot and Philippe 2004; Lartillot et al. 2013) using the GTR+CAT model and the dataset d02 generated by excluding genes with high degrees of missing data (see sensitivity analyses below). For the analysis four chains ran in parallel for 13,669 cycles on average (ranging from 12,164 to 14,217). Convergence of likelihood values, alpha parameter, and tree length of the four chains was assessed using Tracer v1.5 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>). Upon convergence the average standard deviation of split frequencies was below 0.1 with a value of 0.055. The first 6,000 cycles of each chain were discarded as burnin and the majority rule consensus tree containing the posterior probabilities was calculated from the remaining trees of the chain with the best average likelihood score sampling every 2nd tree.

Sensitivity analyses.

Leaf stability indices of species were determined using Phyutility (Smith and Dunn 2008) and the bootstrap trees of ML analyses of the dataset d01 comprising all species sampled. To assess the branch length heterogeneity we used the herein newly developed LB score (see main text) using TreSpEx (www.annelida.de), which we also used to calculate classical tip-to-root distances. Taxa were excluded from the datasets d01-d10 in accordance with these results and the phylogenetic reconstructions repeated.

To objectively assess the branch length heterogeneity in a tree we developed a new tree-based measurement, which we call the LB score. The score utilizes patristic distances (PD), i.e. the distance between two taxa based on the connecting branches, and is based on the mean pairwise PD of a taxon *i* to all other taxa in the tree relative to the average pairwise PD over all taxa (a):

$$LB_i = \left(\frac{\overline{PD}_i}{\overline{PD}_a} - 1 \right) * 100$$

In specific, the score measures for each taxon the percentage deviation from the average and is independent of the root of the tree. The latter is also the reason for not using the traditional tip-to-root distance (Bergsten 2005). When using tip-to-root distances the recognition of long-branched taxa heavily depends on the root of the tree. For example, in the reconstruction of the individual gene with the ID 111427 in our analyses below the ecdysozoan outgroup species are not monophyletic. Whereas tip-to-root distances based on an *Apis*-rooted tree and LB scores indicate the

same taxa as long-branched, rooting the tree with either *Echinoderes* or *Priapulid* some of these species would be indicated as short-branched (Supplementary Fig. S1). Given the automatic process pipelines in phylogenomic analyses due to the vast amount of genes detection of long-branched taxa should be robust against changes in the root of the tree. Moreover, in the search for the best tree in phylogenetic reconstructions only unrooted trees are used and rooting is an *a posteriori* procedure. Thus, notwithstanding that outgroup species might be long-branched the artificial grouping of species due to LBA in phylogenetic reconstructions is not directly due to the root by itself (Bergsten 2005). Hence, detection of LBA should be independent of the root. Fortunately, either using the large dataset d01 in our analyses below or the 559 individual genes of this dataset LB scores and tip-to-root distances are highly and positively correlated with a R^2 value of 0.91543 or an average R^2 of 0.85684, respectively (Supplementary Fig. S2).

For data partitioning we analyzed the 559 genes of the dataset d01 generated with the MARE setting “all taxa included” and a d value of 0.5. We determined both alignment- and tree-based properties. Using BaCoCa (Kück and Struck 2014), the proportion of hydrophobic and polar amino acids, the proportion of missing data as well as the compositional heterogeneity as measured by the RCFV values (Zhong et al. 2011) were determined from the pruned and masked alignments across all species in each gene (Supplementary Fig. S6). ML trees from these alignments were used to determine the evolutionary rate for each gene, calculated as the average pairwise patristic distance between two species in the tree, as well as the mean of the upper quartile of LB scores (i.e., the upper 25% of all LB scores) and the standard deviation of all LB scores as measurements of branch length heterogeneity with the aid of TreSpEx (www.annelida.de). Correlation studies of these properties were conducted in Excel (Supplementary Fig. S2 & S4). Principal component analyses were conducted in R with scaled values (Supplementary Fig. S3). The determination of the branch length heterogeneity within a gene was based on either the mean of the upper quartile of LB scores or the standard deviation of all LB scores within a gene. However, both approaches led to a strong linear correlation ($R^2 = 0.8363$, Supplementary Fig. S4) and, thus, we used solely the standard deviation of LB scores as a measure of branch length heterogeneity in the principal component analysis. Similarly, the proportions of hydrophobic and polar amino acids were also strongly correlated ($R^2 = 0.6481$, Supplementary

Fig. S4) and, hence, we excluded the proportion of polar amino acids.

Genes with either high degrees of missing data or high base composition heterogeneity were excluded based on the results of heat map analyses in combination with hierarchical clustering without scaling the values in R (Baptiste et al. 2005; Susko et al. 2006). Four clusters of proportion of missing data were found ranging from low to high degrees of missing data (Supplementary Fig. S7). From dataset d01 with 559 genes belonging to the groups with medium-high to high degrees of missing data were excluded to generate dataset d02 characterized by only low degrees of missing data. We also generated a dataset d03, where we excluded only high degrees of missing data from dataset d01. Alternatively, the dataset d01 was condensed using MARE (Meusemann et al. 2010) with d values of 1.0, 1.5 or 2.0 instead of 0.5 used above resulting in the datasets d04, d05 and d06, respectively.

For compositional heterogeneity the heatmap revealed three clusters with low, medium and high compositional heterogeneity (Supplementary Fig. S8). Only genes, which were part of the cluster with low compositional heterogeneity, were kept for dataset d07. The tree-based property branch length heterogeneity was ranked and divided into three equal parts. To generate dataset d08 only the genes from the third with the lowest heterogeneity values were not excluded (Supplementary Fig. S6 and Table S9). Moreover, we excluded all genes from dataset d01, which were not part of the 70% or 95% confidence interval of the first two principal components (Supplementary Fig. S3) resulting in datasets d09 and d10, respectively. Finally, for each dataset we determined the number of single-gene trees, which find a monophyletic or paraphyletic Platyzoa using custom perl scripts. For the latter at least one platyzoan taxon (i.e., Platyhelminthes, Gastrotricha, Gnathostomulida or Syndermata) had to be placed more closely to the outgroup than at least one other platyzoan taxon.

Supplementary Material

Supplementary figures S1-S8 and tables S1-S13 are available at *Molecular Biology and Evolution* online (<http://www.mbe.oxfordjournals.org/>).

Acknowledgements

This work was supported by the priority program “Deep Metazoan Phylogeny” of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG-STR 683/5-2 and DFG-STR 683/8-1 to T.H.S., DFG-Ha2103/4 to T.H.,

DFG-HA 2763/5 to B.H., DFG-BL 787/5-1 to C.B.). T.H. wishes to thank the Center for Computational Sciences Mainz (CSM) for additional financial support. T.H.S. also acknowledges the support of the Regional Computing Centre of Cologne (RRZK) by, among others, providing access to the HPC cluster CHEOPS for the parallel PhyloBayes analyses. The authors gratefully acknowledge Edyta Fialkowska (Institute of Environmental Sciences, Jagiellonian University, Poland) for providing *Lecane* specimens, László Sugár (Faculty of Animal Science, Kaposvár University, Hungary) for collecting and providing *Macracanthorhynchus* specimens, Sanja Ramljak (Institute of Clinical Research and Development, Mainz, Germany) for helping with collecting *Seison* specimens and Michael Plewka (<http://plingfactory.de/>) for the picture of *Rotaria neptunoida*. We also thank Birgit Nickel and Matthias Meyer (Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology, Leipzig, Germany) for their assistance in sequencing using Illumina GAIIx and Steffen Rapp (Institute of Molecular Genetics (Johannes Gutenberg University, Mainz) for operating the Illumina HiSeq 2000. Sequence data have been deposited in the NCBI short read archive. All other data and trees used in this study are available at DataDryad (<http://dx.doi.org/???.????/dryad.?????>).

References

- Ahlrichs WH. 1997. Epidermal ultrastructure of *Seison nebaliae* and *Seison annulatus*, and a comparison of epidermal structures within Gnathifera. *Zoomorphology* 117: 41-48.
- Alexe G, Vijaya Satya R, Seiler M, Platt D, Bhanot T, Hui S, Tanaka M, Levine AJ and Bhanot G. 2008. PCA and Clustering reveal alternate mtDNA phylogeny of N and M clades. *J Mol Evol* 67: 465-487.
- Baptiste E, Susko E, Leigh J, MacLeod D, Charlebois RL and Doolittle WF. 2005. Do orthologous gene phylogenies really support tree-thinking? *BMC Evol Biol* 5: 33.
- Bergsten J. 2005. A review of long-branch attraction. *Cladistics* 21: 163-193.
- Bernt M, Bleidorn C, Braband A, et al. 2013. A comprehensive analysis of bilaterian mitochondrial genomes and phylogeny. *Mol Phylogenet Evol* 69: 352-364.
- Birney E, Clamp M and Durbin R. 2004. GeneWise and Genomewise. *Genome Res* 14: 988-995.
- Bleidorn C. 2007. The role of character loss in phylogenetic reconstruction as exemplified for the Annelida. *J Zool Syst Evol Res* 45: 299-307.
- Brinkman H and Philippe H. 2008. Animal phylogeny and large-scale sequencing: progress and pitfalls. *J Syst Evol* 46: 274-286.
- Cavalier-Smith T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev* 73: 203-266.
- Chesebro JE, Pueyo JI and Couso JP. 2013. Interplay between a *Wnt*-dependent organiser and the *Notch* segmentation clock regulates posterior development in *Periplaneta americana*. *Biol Open* 2: 227-237.
- Chipman AD. 2010. Parallel evolution of segmentation by co-option of ancestral gene regulatory networks. *Bioessays* 32: 60-70.
- Couso JP. 2009. Segmentation, metamerism and the Cambrian explosion. *Int J Dev Biol* 53: 1305-1316.
- Davidson EH and Erwin DH. 2006. Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science* 311: 796-800.
- De Robertis EM. 2008. The molecular ancestry of segmentation mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16411-16412.
- Doe D. 1981. Comparative ultrastructure of the pharynx simplex in turbellaria. *Zoomorphology* 97: 133-193.
- Dunn CW, Hejnol A, Matus DQ, et al. 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452: 745-750.
- Ebersberger I, Strauss S and von Haeseler A. 2009. HaMStR: Profile hidden markov model based search for orthologs in ESTs. *BMC Evol Biol* 9: 157.
- Edgecombe G, Giribet G, Dunn C, Hejnol A, Kristensen R, Neves R, Rouse G, Worsaae K and Sørensen M. 2011. Higher-level metazoan relationships: recent progress and remaining questions. *Org Divers Evol* 11: 151-172.
- Felsenstein J. 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst Zool* 27: 401-410.
- Giribet G. 2008. Assembling the lophotrochozoan (=spiralian) tree of life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 1513-1522.
- Halanych KM. 2004. The new view of animal phylogeny. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 35: 229-256.
- Hannibal R and Patel N. 2013. What is a segment? *EvoDevo* 4: 35.
- Haszprunar G. 1996. Plathelminthes and Plathelminthomorpha - paraphyletic taxa. *J Zool Syst Evol Res* 34: 41-48.
- Hausdorf B, Helmkamp M, Meyer A, Witek A, Herlyn H, Bruchhaus I, Hankeln T, Struck TH and Lieb B. 2007. Spiralian phylogenomics supports the resurrection of Bryozoa comprising Ectoprocta and Entoprocta. *Mol Biol Evol* 24: 2723-2729.
- Hausdorf B, Helmkamp M, Nesnidal MP and Bruchhaus I. 2010. Phylogenetic relationships within the lophophorate lineages (Ectoprocta,

- Brachiopoda and Phoronida). *Mol Phylogenet Evol* 55: 1121-1127.
- Hejnol A, Obst M, Stamatakis A, et al. 2009. Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proc R Soc B: Biol Sci* 276: 4261-4270.
- Hering L, Henze MJ, Kohler M, et al. 2012. Opsins in Onychophora (velvet worms) suggest a single origin and subsequent diversification of visual pigments in arthropods. *Mol Biol Evol* 29: 3451-3458.
- Herlyn H and Ehlers U. 1997. Ultrastructure and function of the pharynx of *Gnathostomula paradoxa* (Gnathostomulida). *Zoomorphology* 117: 135.
- Herlyn H and Röhrig H. 2003. Ultrastructure and overall organization of ligament sac, uterine bell, uterus and vagina in *Paratenuisentis ambiguus* (Acanthocephala, Eoacanthocephala) – the character evolution within the Acanthocephala. *Acta Zool* 84: 239–247.
- Heuer C, Muller C, Todt C and Loesel R. 2010. Comparative neuroanatomy suggests repeated reduction of neuroarchitectural complexity in Annelida. *Front Zool* 7: 13.
- Huelsenbeck JP. 1997. Is the Felsenstein zone a fly trap? *Syst Biol* 46: 69-74.
- Hyman LH. 1951. *The Invertebrates*, Vol. 2, Platyhelminthes and Rhynchocoela: The Acoelomate Bilateria. New York: McGraw-Hill.
- Jenner RA. 2004a. Towards a phylogeny of the Metazoa: evaluating alternative phylogenetic positions of Platyhelminthes, Nemertea, and Gnathostomulida, with a critical reappraisal of cladistic characters. *Cont Zool* 73: 3-163.
- Jenner RA. 2004b. When molecules and morphology clash: reconciling conflicting phylogenies of the Metazoa by considering secondary character loss. *Evol Devel* 6: 372-378.
- Kapp H. 2000. The unique embryology of Chaetognatha. *Zool Anz* 239: 263-266.
- Katoh K, Kuma K-i, Toh H and Miyata T. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* 33: 511-518.
- Kieneke A, Riemann O and Ahlrichs WH. 2008. Novel implications for the basal internal relationships of Gastrotricha revealed by an analysis of morphological characters. *Zool Scr* 37: 429-460.
- Kircher M, Sawyer S and Meyer M. 2011. Double indexing overcomes inaccuracies in multiplex sequencing on the Illumina platform. *Nucleic Acids Res* 2011: 1–8.
- Kircher M, Stenzel U and Kelso J. 2009. Improved base calling for the Illumina Genome Analyzer using machine learning strategies. *Genome biology* 10: R83.
- Koch M, Quast B and Bartolomaeus T. 2014. Coeloms and nephridia in annelids and arthropods. In: Wägele JW, Bartolomaeus T, editors. *Deep Metazoan Phylogeny: The backbone of the Tree of Life -New insights from analyses of molecules, morphology, and theory of data analysis*. Berlin: De Gruyter. p. 173-284.
- Kück P, Mayer C, Wägele J-W and Misof B. 2012. Long branch effects distort Maximum Likelihood phylogenies in simulations despite selection of the correct model. *PLoS ONE* 7: e36593.
- Kück P and Meusemann K. 2010. FASconCAT: Convenient handling of data matrices. *Mol Phylogenet Evol* 56: 1115-1118.
- Kück P, Meusemann K, Dambach J, Thormann B, von Reumont BM, Wägele JW and Misof B. 2010. Parametric and non-parametric masking of randomness in sequence alignments can be improved and leads to better resolved trees. *Front Zool* 7: 10.
- Kück P and Struck TH. 2014. BaCoCa -A heuristic software tool for the parallel assessment of sequence biases in hundreds of gene and taxon partitions. *Mol Phylogenet Evol* 70: 94–98.
- Kvist S and Siddall ME. 2013. Phylogenomics of Annelida revisited: a cladistic approach using genome-wide expressed sequence tag data mining and examining the effects of missing data. *Cladistics* 29: 435–448.
- Lartillot N, Brinkmann H and Philippe H. 2007. Suppression of long-branch attraction artefacts in the animal phylogeny using a site-heterogeneous model. *BMC Evol Biol* 7: S4.
- Lartillot N and Philippe H. 2004. A Bayesian mixture model for across-site heterogeneities in the amino-acid replacement process. *Mol Biol Evol* 21: 1095-1109.
- Lartillot N, Rodrigue N, Stubbs D and Richer J. 2013. PhyloBayes MPI: Phylogenetic reconstruction with infinite mixtures of profiles in a parallel environment. *Syst Biol* 62: 611–615.
- Lemmon AR, Brown JM, Stanger-Hall K and Lemmon EM. 2009. The effect of ambiguous data on phylogenetic estimates obtained by Maximum Likelihood and Bayesian Inference. *Syst Biol* 58: 130-145.
- Loesel R. 2014. Brain complexity in protostomes. In: Wägele JW, Bartolomaeus T, editors. *Deep Metazoan Phylogeny: The backbone of the Tree of Life -New insights from analyses of molecules, morphology, and theory of data analysis*. Berlin: De Gruyter. p. 79-91.
- Marletaz F, Martin E, Perez Y, et al. 2006. Chaetognath phylogenomics: a protostome

- with deuterostome-like development. *Curr Biol* 16: R577-R578.
- Matus DQ, Copley RR, Dunn CW, Hejnol A, Eccleston H, Halanych KM, Martindale MQ and Telford MJ. 2006. Broad taxon and gene sampling indicate that chaetognaths are protostomes. *Curr Biol* 16: R575-R576.
- Meusemann K, von Reumont BM, Simon S, et al. 2010. A phylogenomic approach to resolve the arthropod Tree of Life. *Mol Biol Evol* 27: 2451-2464.
- Meyer M and Kircher M. 2010. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harbor protocols* 2010: pdb prot5448.
- Milinkovitch MC, LeDuc RG, Adachi J, Farnir F, Georges M and Hasegawa M. 1996. Effects of character weighting and species sampling on phylogeny reconstruction: A case study based on DNA sequence data in Cetaceans. *Genetics* 144: 1817-1833.
- Nesnidal M, Helmkampf M, Meyer A, et al. 2013. New phylogenomic data support the monophyly of Lophophorata and an Ectoproct-Phoronid clade and indicate that Polyzoa and Kryptrochozoa are caused by systematic bias. *BMC Evol Biol* 13: 253.
- Nielsen C. 2012. *Animal Evolution - Interrelationships of the Living Phyla*. New York: Oxford University Press Inc. Northcutt RG. 2012. Evolution of centralized nervous systems: Two schools of evolutionary thought. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 10626-10633.
- Nosenko T, Schreiber F, Adamska M, et al. 2013. Deep metazoan phylogeny: When different genes tell different stories. *Mol Phylogenet Evol* 67: 223-233.
- Paps J, Baguna J and Riutort M. 2009a. Bilaterian Phylogeny: A Broad Sampling of 13 Nuclear Genes Provides a New Lophotrochozoa Phylogeny and Supports a Paraphyletic Basal Acoelomorpha. *Mol Biol Evol* 26: 2397-2406.
- Paps J, Baguña J and Riutort M. 2009b. Lophotrochozoa internal phylogeny: new insights from an up-to-date analysis of nuclear ribosomal genes. *Proc R Soc B: Biol Sci* 276: 12451254.
- Pattengale ND, Alipour M, Bininda-Emonds ORP, Moret BME and Stamatakis A. 2009. How many bootstrap replicates are necessary? In: Batzoglou S, editor. *RECOMB 2009*, LNCS 5541. Berlin Heidelberg Springer-Verlag. p. 184-200.
- Perez Y, Müller CHG and Harzsch S. 2014. The Chaetognatha: An anarchistic taxon between Protostomia and Deuterostomia. In: Wägele JW, Bartolomeaus T, editors. *Deep Metazoan Phylogeny: The backbone of the Tree of Life - New insights from analyses of molecules, morphology, and theory of data analysis*. Berlin: De Gruyter. p. 49-77.
- Philippe H, Brinkmann H, Lavrov DV, Littlewood DTJ, Manuel M, Wörheide G and Baurain D. 2011. Resolving difficult phylogenetic questions: Why more sequences are not enough. *PLoS Biology* 9: 3.
- Philippe H, Derelle R, Lopez P, et al. 2009. Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. *Curr Biol* 19: 706-712.
- Rieger RM and Tyler S. 1995. Sister-group relationship of Gnathostomulida and Rotifera-Acanthocephala. *Invertebr Biol* 114: 186-188.
- Riesgo A, Andrade SC, Sharma P, Novo M, Perez-Porro A, Vahtera V, Gonzalez V, Kawachi G and Giribet G. 2012. Comparative description of ten transcriptomes of newly sequenced invertebrates and efficiency estimation of genomic sampling in non-model taxa. *Front Zool* 9: 33.
- Rodríguez-Ezpeleta N, Brinkmann H, Burger G, Roger AJ, Gray MW, Philippe H and Lang BF. 2007. Toward resolving the eukaryotic tree: The phylogenetic positions of jakobids and cercozoans. *Curr Biol* 17: 1420-1425.
- Rota-Stabelli O and Telford MJ. 2008. A multi criterion approach for the selection of optimal outgroups in phylogeny: Recovering some support for Mandibulata over Myriochelata using mitogenomics. *Mol Phylogenet Evol* 48: 103-111.
- Rothe B and Schmidt-Rhaesa A. 2009. Architecture of the nervous system in two *Dactylopodola* species (Gastrotricha, Macrotrichida). *Zoomorphology* 128: 227-246.
- Roure B, Baurain D and Philippe H. 2013. Impact of missing data on phylogenies inferred from empirical phylogenomic data sets. *Mol Biol Evol* 30: 197-214.
- Salichos L and Rokas A. 2013. Inferring ancient divergences requires genes with strong phylogenetic signals. *Nature* 497: 327-331.
- Simmons MP. 2012a. Misleading results of likelihood-based phylogenetic analyses in the presence of missing data. *Cladistics* 28: 208-222.
- Simmons MP. 2012b. Radical instability and spurious branch support by likelihood when applied to matrices with non-random distributions of missing data. *Mol Phylogenet Evol* 62: 472-484.
- Simmons MP and Freudenstein JV. 2011. Spurious 99% bootstrap and jackknife support for unsupported clades. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 177-191.

- Slater G and Birney E. 2005. Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics* 6: 31.
- Smith SA and Dunn CW. 2008. Phyutility: a phyloinformatics tool for trees, alignments and molecular data. *Bioinformatics* 24: 715-716.
- Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690.
- Struck TH. 2013a. The impact of paralogy on phylogenomic studies – A case study on annelid relationships. *PLoS ONE* 8: e62892.
- Struck TH. 2013b. Phylogeny. In: Westheide W, Purschke G, editors. *Handbook of Zoology Annelida*. Berlin: DeGruyter.
- Struck TH and Fisse F. 2008. Phylogenetic position of Nemertea derived from phylogenomic data. *Mol Biol Evol* 25: 728-736.
- Struck TH, Paul C, Hill N, et al. 2011. Phylogenomic analyses unravel annelid evolution. *Nature* 471: 95–98.
- Susko E, Leigh J, Doolittle WF and Baptiste E. 2006. Visualizing and Assessing Phylogenetic Congruence of Core Gene Sets: A Case Study of the γ -Proteobacteria. *Mol Biol Evol* 23: 1019-1030.
- Tomer R, Denes AS, Tessmar-Raible K and Arendt D. 2010. Profiling by image registration reveals common origin of annelid mushroom bodies and vertebrate pallium. *Cell* 142: 800-809.
- Turbeville JM. 1986. An ultrastructural analysis of coelomogenesis in the hoplonemertine *Prosorhochmus americanus* and the polychaete *Magelona* sp. *J Morphol* 187: 51-60.
- Wey-Fabrizius AR, Herlyn H, Rieger B, Rosenkranz D, Witek A, Welch DBM, Ebersberger I and Hankeln T. 2014. Transcriptome data reveal syndermatan relationships and suggest the evolution of endoparasitism in Acanthocephala via an epizoic stage. *PLoS ONE* 9: e88618.
- Witek A, Herlyn H, Ebersberger I, Mark Welch DB and Hankeln T. 2009. Support for the monophyletic origin of Gnathifera from phylogenomics. *Mol Phylogenet Evol* 53: 1037-1041.
- Zhong M, Hansen B, Nesnidal MP, Golombek A, Halanych KM and Struck TH. 2011. Detecting the symplesiomorphy trap: A multigene phylogenetic analysis for terebelliform annelids. *BMC Evol Biol* 11: 369.

2.6 Bisher unpublizierte Daten

2.6.1 Die Phylogenie der Syndermata basierend auf den Sequenzdaten ribosomaler Proteine

Ausgehend von den im Rahmen des Kapitels 2.3 aus den Rohdaten (reads) erstellten zusammenhängenden Sequenzen (Contigs) wurden weitere Analysen der Syndermata-Phylogenie basierend auf den Sequenzdaten ribosomaler Proteine (RPs) durchgeführt. Dieser Ansatz erlaubte die Analyse der Auswirkung eines erweiterten Taxon-samplings innerhalb der Syndermata im Vergleich zu früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe (Witek et al., 2008; Witek et al., 2009) sowie die generelle Überprüfung der Eignung ribosomaler Proteine für phylogenetische Rekonstruktionen vor dem Hintergrund der von Nesnidal et al. (Nesnidal et al., 2010) festgestellten Heterogenität in der Aminosäurekomposition einiger dieser Proteine.

Methodik

Für jedes der 19 in den Analysen enthaltenen Taxa wurden die für ribosomale Proteine kodierenden EST-Contigs per tBlastN-Suche (Altschul et al., 1990) identifiziert. Als Suchsequenzen dienten die entsprechenden humanen Proteinsequenzen, die zuvor aus der „Ribosomal Protein Gene Database“ (RPG; Nakao et al., 2004) extrahiert wurden. Dabei diente die Variante rps4x als Repräsentant für das rps4 Protein. Treffer mit einem E-Value $< e^{-10}$ wurden extrahiert, es folgte eine manuelle Korrektur von Leserasterverschiebungen. Da die ersten 76 Aminosäuren der humanen Proteine rps27a und rps40 identisch sind und die Treffer der Blast-Suche teilweise nur diesen Bereich der Proteinsequenzen abdeckten, konnte keine eindeutige Zuordnung der entsprechenden Contigs erfolgen. Um die dadurch mögliche Zuordnung von Proteinsequenzen zu falschen Orthologen-Gruppen zu vermeiden, wurden diese beiden Proteine daher von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Das Protein rpl41 wurde ebenfalls verworfen, da für dieses nur von wenigen Taxa Sequenzinformationen vorhanden waren. Für alle anderen RPs ($n = 76$) wurde je ein Alignment mittels MAFFT (Katoh et al., 2005; Katoh und Toh, 2008) sowie eine Editierung des Alignments mittels GBlocks (Castresana, 2000) durchgeführt. Die GBlocks Parameter wurden nach dem Vorbild der Seite des GBlocks Web Server (<http://molevol.cmima.csic.es>) auf niedrige Stringenz eingestellt. Die so editierten Alignments wurden konkateniert, der finale Datensatz umfasste 76 Proteine von 19 Taxa und erstreckte sich über eine Länge von 10.698 Aminosäure-Positionen („RP76“). Ein weiterer Datensatz entstand aus diesem durch Entfernung von 38 RPs, für die Evidenzen bestehen, dass ihre Aminosäure-Komposition innerhalb der Metazoa stark schwankt (Nesnidal et al., 2010). Dieser Datensatz beinhaltete demnach nur noch 38 RPs und erstreckte sich über eine Länge von 5.187 Aminosäure-Positionen („RP38“).

Die per ProtTest 2.4 (Abascal et al., 2005) bestimmten geeignetsten Modelle für die Sequenzevolution für beide Datensätze waren LG (Le und Gascuel, 2008) und rtREV (Dimmic et al., 2002), jeweils mit einem Anteil invariabler Positionen (+I), einer Gamma-Distribution

der Substitutionsraten (+G) und empirisch ermittelten Basenfrequenzen (+F). Die phylogenetischen Rekonstruktionen wurden mit verschiedenen Maximum Likelihood-Programmen (TreeFinder, RAxML 7.2.8, PhyML 3.0; Jobb et al., 2004; Stamatakis, 2006; Guindon et al., 2010) sowie einer Bayes'schen Methode (Mr.Bayes 3.1.2; Huelsenbeck und Ronquist, 2001; Ronquist und Huelsenbeck, 2003) durchgeführt. Die statistische Unterstützung der Topologien wurde mittels „non-parametric bootstrap“ (PhyML, 100 Replikate), „rapid bootstrap“ (RAxML, 100 Replikate), „LR-ELW edge support“ (TreeFinder, 1.000 Replikate) oder posteriorer Wahrscheinlichkeit („pWSK“; Mr.Bayes) bemessen. Bei der Bayes'schen Analyse mit Mr.Bayes wurden zwei parallele Läufe gestartet, um eine Konvergenzprüfung anhand der Standardabweichungen der Verzweigungs-Frequenzen („standard deviation of split frequencies“, StdDev) durchführen zu können. StdDev lag bei beiden Analysen unter 0,01. Aus insgesamt 1 Millionen Generationen wurde jeder hundertste Baum gespeichert, vor der Summierung wurden die ersten 25 % dieser Bäume als „burn-in“ verworfen.

Ergebnisse

In nahezu allen Bäumen, die auf Grundlage von RP-Sequenzen berechnet wurden, erschienen sowohl die Gnathifera als auch die Syndermata als monophyletische Gruppierungen (ABBILDUNG 10; ABBILDUNG 11). Während die Gnathifera nur in den Bayes'schen Analysen gute Unterstützungswerte erhielten (ML bootstrap/ELW Unterstützung 41-76 %; Bayes'sche pWSK 91-100 %), wurden die Syndermata in allen Rekonstruktionen gut bis sehr gut unterstützt (ML bootstrap/ELW Unterstützung 84-100 %; Bayes'sche pWSK 100 %). Weiterhin wurde in allen Analysen ein Schwestergruppenverhältnis von Seisonidea und Acanthocephala unterstützt (Pararotatoria; ML bootstrap/ELW Unterstützung 89-100 %; Bayes'sche pWSK 100 %). Die interne Phylogenie der Syndermata unterschied sich jedoch je nach zugrundeliegendem Datensatz. Die Analysen des RP76-Datensatzes zeigten ein Schwestergruppenverhältnis der Bdelloidea und Monogononta, wenn auch mit eher geringen Unterstützungswerten (ML bootstrap/ELW Unterstützung 41-76 %; Bayes'sche pWSK 91-100 %; ABBILDUNG 10). Diese monophyletischen Eurotatoria bildeten die Schwestergruppe zu den Pararotatoria. Die Analysen des RP38-Datensatzes hingegen ergaben die sowohl von früheren RP-basierten Rekonstruktionen (Witek et al., 2008; Witek et al., 2009) als auch von den auf phylogénomischen Datensätzen basierenden Datensätzen (Kapitel 2.3) bekannte Topologie mit paraphyletischen Eurotatoria (ABBILDUNG 11). Die Bdelloidea sind dabei näher mit den Acanthocephala bzw. Pararotatoria verwandt als mit den Monogononta. Die Monophylie der Gruppierung aus Seisonidea, Acanthocephala und Bdelloidea (= Hemirotifera) wurde in den vorliegenden Analysen gut bis sehr gut unterstützt (ML bootstrap/ELW Unterstützung 80-91 %; Bayes'sche pWSK 100 %; ABBILDUNG 11). Es wurden AU Tests mit beiden Datensätzen durchgeführt (implementiert im Programm Treefinder, unter Anwendung des LG+I+G+F Modells), jedoch konnte dadurch weder die Eurotatoria- noch die Hemirotifera-Hypothese signifikant abgewiesen werden.

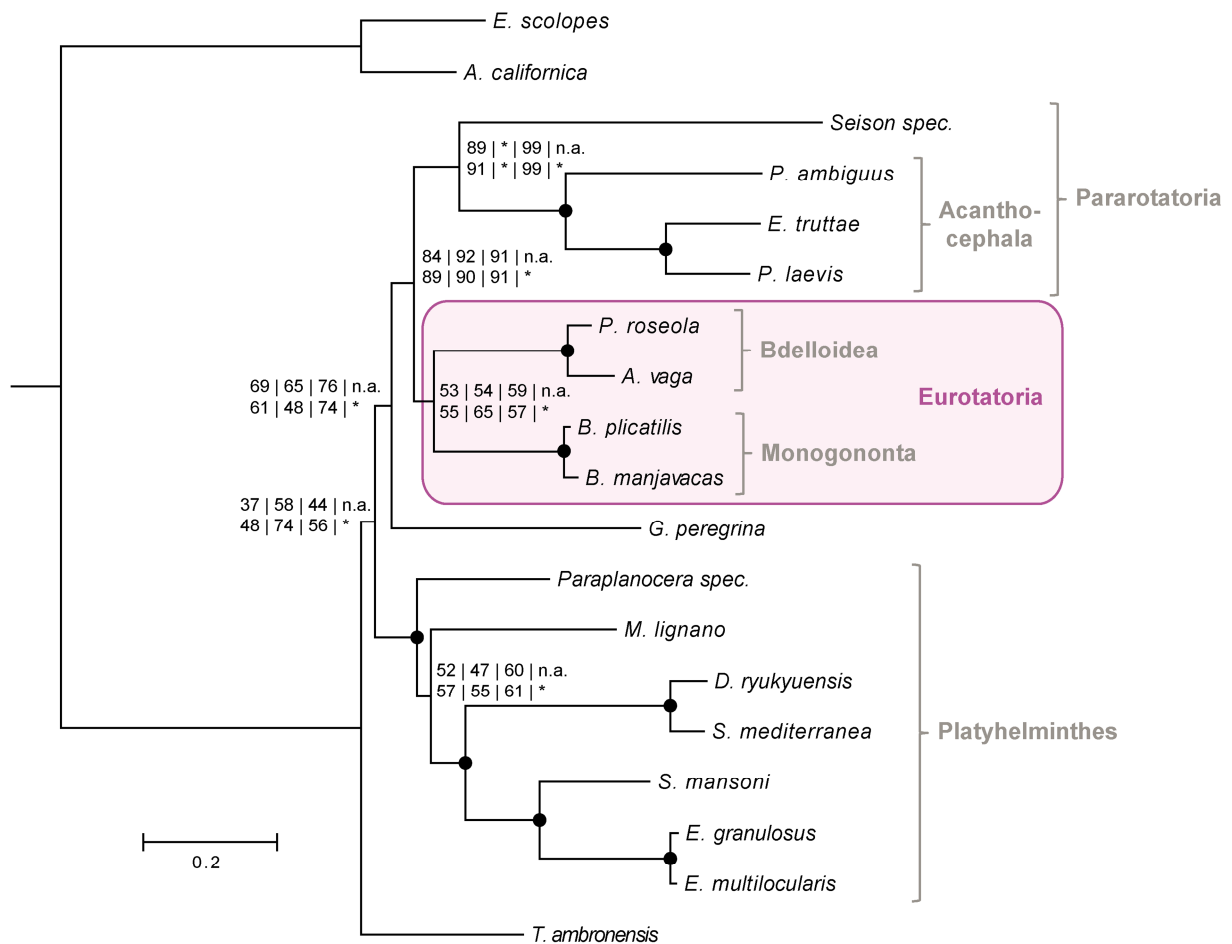


ABBILDUNG 10 – Ergebnisse der Analysen des „RP76“ Datensatzes

Topologie und Astlängen entsprechen der RAXML-Analyse des „RP76“ Datensatzes unter dem LG-Modell. Die statistische Unterstützung der verschiedenen Analysen ist in der Reihenfolge RAXML | PhyML | Treefinder | Mr.Bayes angegeben, ein „*“ symbolisiert dabei maximale Unterstützung (100 %). Die Unterstützungswerte der Analysen mit dem Substitutionsmodell LG finden sich in der oberen Reihe, die der Analysen mit dem Modell rtREV in der unteren. Eine Analyse mit Mr.Bayes unter dem LG-Modell wurde nicht durchgeführt („n.a.“). Ein schwarzer Punkt symbolisiert maximale Unterstützung für den Knoten in allen durchgeführten Analysen.

Topologische Unterschiede zeigten sich weiterhin an den basalen Verzweigungen innerhalb der Platyhelminthes. Während die RP76-Analysen *Paraplanocera spec.* und *Macrostomum lignano* als paraphyletische Gruppierung an der Basis der Plattwürmer zeigten (ABBILDUNG 10), bildeten diese beiden Spezies in den RP38-Analysen eine monophyletische Gruppierung als Schwestertaxon zu den restlichen Platyhelminthes (ABBILDUNG 11). In beiden Fällen waren die Unterstützungswerte jedoch eher schlecht (ML bootstrap/ELW Unterstützung 47-70 %; Bayes'sche pWSK 81-100 %).

Die Position der Gastrotrichen-Spezies *Turbanella ambronensis* war, wie schon bei den in Kapitel 2.3 beschriebenen phylogenomischen Analysen, nicht aufzulösen. In 7 der 16 RP-basierten Bäume war *T. ambronensis* Teil einer Trichotomie aus Außengruppe, *T. ambronensis* und einer Gruppierung aus Platyhelminthes und Gnathifera. In anderen Bäumen zweigte die Spezies basal der Gnathifera (wie in ABBILDUNG 11) oder basal einer Gruppierung aus Platyhelminthes und Gnathifera (wie in ABBILDUNG 10) ab.

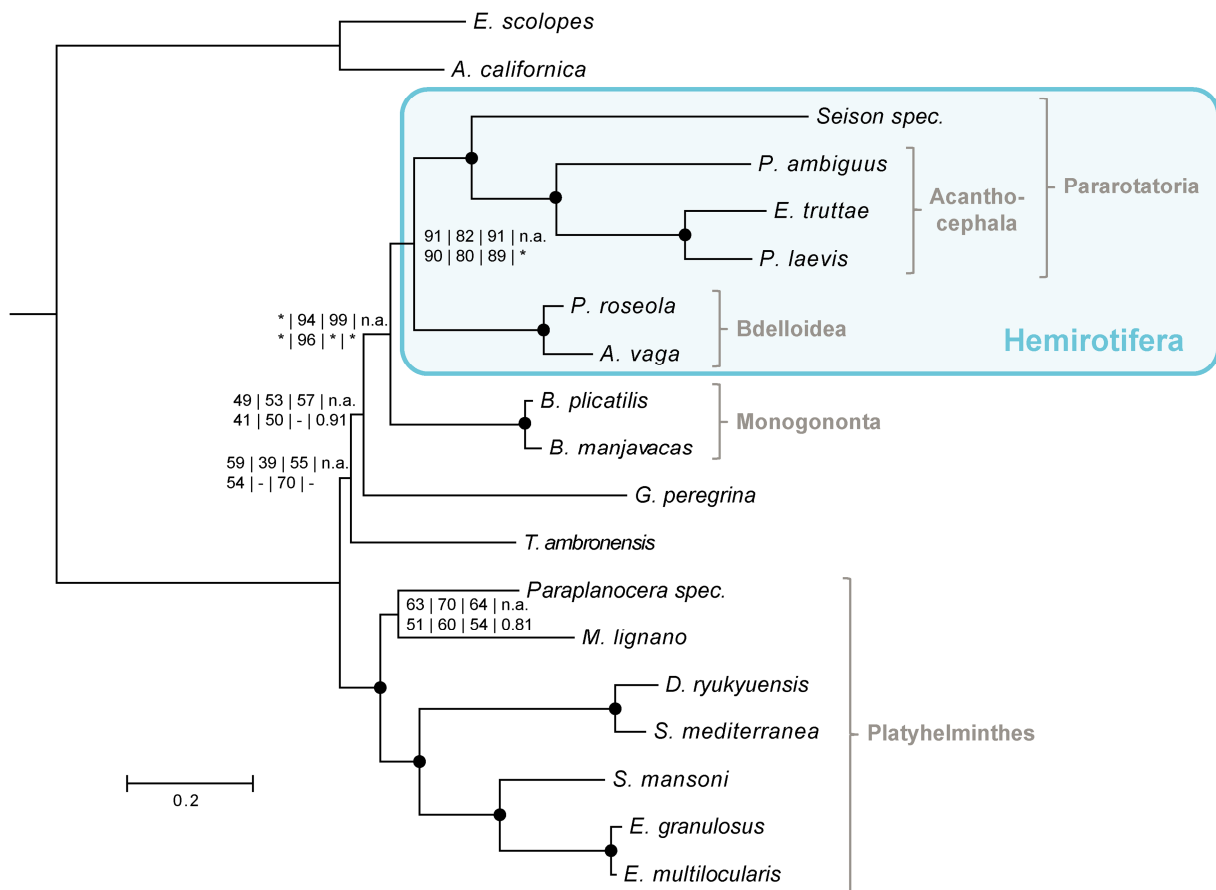


ABBILDUNG 11 – Ergebnisse der Analysen des „RP38“ Datensatzes

Topologie und Astlängen entsprechen der RAXML-Analyse des „RP38“ Datensatzes unter dem LG-Modell. Die statistische Unterstützung der verschiedenen Analysen ist in der Reihenfolge RAXML | PhyML | Treefinder | Mr.Bayes angegeben, ein „*“ symbolisiert dabei maximale Unterstützung (100 %). Die Unterstützungswerte der Analysen mit dem Substitutionsmodell LG finden sich in der oberen Reihe, die der Analysen mit dem Modell rtREV in der unteren. Eine Analyse mit Mr.Bayes unter dem LG-Modell wurde nicht durchgeführt („n.a.“). Ein schwarzer Punkt symbolisiert maximale Unterstützung für den Knoten in allen durchgeführten Analysen.

Im weiteren Verlauf der Analysen wurde besonderes Augenmerk auf die interne Phylogenie der Syndermata gelegt. Die auf Grundlage des RP76-Datensatzes beobachtete Monophylie der Eurotatoria (ABBILDUNG 10) widersprach den Ergebnissen früherer molekularer Studien zur Syndermata-Phylogenie. Witek et al. (2008; 2009) erhielt unter Verwendung eines kompletten RP-Datensatzes paraphyletische Eurotatoria. Ein wesentlicher Unterschied zwischen diesen und den hier beschriebenen Analysen liegt in der Taxon-Anzahl innerhalb der Syndermata – diese war bei Witek et al. vergleichsweise spärlich. Zur Überprüfung der Hypothese, dass die Taxon-Auswahl die topologischen Veränderungen hervorruft, wurden alle „neuen“ Syndermata Taxa (*Adineta vaga*, *Brachionus manjavacas*, *Paratenuisentis ambiguus*, *Seison spec.*) aus den beiden RP-Datensätzen entfernt. Mit dieser auch in den Witek-Arbeiten genutzten Taxon-Auswahl wurden paraphyletische Eurotatoria rekonstruiert (TABELLE 1), die Ergebnisse von Witek et al. wurden damit also bestätigt. Weiterhin zeigt das Ergebnis, dass sich das augenscheinlich vorhandene widersprüchliche phylogenetische Signal in RP-Datensätzen (vergleiche ABBILDUNG 10 und ABBILDUNG 11) je nach Taxon-Auswahl unterschiedlich stark ausprägen und auf die Topologie auswirken kann.

TABELLE 1 – Ergebnisse phylogenetischer Rekonstruktionen nach Taxon-Exklusion

Untersucht wurde der Einfluss der Taxon-Auswahl auf die interne Syndermata-Topologie innerhalb der Syndermata. Die phylogenetischen Rekonstruktionen wurden mit Treefinder unter Verwendung des LG Modells durchgeführt. Die Tabelle führt den jeweiligen Datensatz (RP76, RP38), die entfernten Taxa (Ava = *A. vaga*, Bma = *B. manjavacas*, Pam = *P. ambiguus*, Seison = *Seison spec.*) sowie den Status der Eurotatoria (M = monophyletisch, P = paraphyletisch) im resultierenden Baum auf.

Datensatz	Entfernte Spezies	Eurotatoria
RP76	Keine	M
	Ava, Bma, Pam, Seison	P
	Ava + Bma	M
	Ava	M
	Bma	M
	Seison + Pam	P
	Seison	P
	Pam	M
RP38	keine	P
	Ava, Bma, Pam, Seison	P
	Seison	P
	Pam	P

Um genauer zu untersuchen, welche der vier neuen Spezies die voneinander abweichenden Topologien verursacht, wurden weitere Bäume unter Ausschluss nur einer oder zwei der neuen Spezies aus dem RP76-Datensatz berechnet. Wurde die Bdelloidea-Spezies *A. vaga* und/oder die Monogononta-Spezies *B. manjavacas* entfernt, erhielt man monophyletische Eurotatoria (TABELLE 1). Der Ausschluss von *Seison spec.* oder der Kombination aus *Seison spec.* und dem Acanthocephalen *P. ambiguus* hingegen resultierte in paraphyletischen Eurotatoria (TABELLE 1), was auf einen stärkeren Einfluss dieser beiden Spezies auf die Baumtopologie schließen lässt. Wurde nur *P. ambiguus* aus dem Datensatz entfernt, erschienen wiederum monophyletische Eurotatoria. Die beiden Spezies mit dem meisten Einfluss auf die Topologie (*P. ambiguus* und *Seison spec.*) wurden ebenfalls individuell aus dem RP38-Datensatz entfernt, dabei blieben paraphyletische Eurotatoria erhalten.

2.6.2 Die mitochondrialen Genome der Monogononta

Zur Untersuchung der mitochondrialen Genome dreier Monogononta-Spezies wurde genomische DNA aus diesen Spezies extrahiert und mittels „Next generation sequencing“-Verfahren sequenziert. Nach Prozessierung der erhaltenen Rohdaten (reads), konnten diese zu längeren, zusammenhängenden Sequenzen (Contigs) assembliert und daraufhin nach mitochondrialen Bestandteilen durchsucht werden. Alle verwendeten Sequenzdaten (Primer-Sequenzen, Rohdaten und editierte Daten aller Sequenzierungen, Contig- und Konsensus-Sequenzen) sowie die Ergebnisse der MITOS-Annotationen finden sich im elektronischen Anhang.

Datengewinnung

Für das zu untersuchende Monogononta-Taxon *Lecane inermis* wurden Probenaufbereitung und Sequenzierung selbst durchgeführt. Hierzu wurde genomische DNA aus einem Pool von ca. 500 *Lecane* Individuen mittels des Quick Genomic DNA Prep (Huang et al., 2009) präpariert. Qualität und Konzentration der Probe wurden auf einem 1 %igen Agarosegel sowie per NanoDrop bestimmt. 1,3 µg genomische DNA wurden per Covaris für 180 Sekunden bei Intensität 5 geschert. Die anschließende Präparation der Sequenzier-library erfolgte mittels des NEBNext DNA sample Prep Kits (New England Biolabs). Die zwischengeschalteten Aufreinigungsschritte wurden dabei mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) durchgeführt. Zur Größenselektionierung der zu sequenzierenden DNA-Fragmente wurde die DNA auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt, die Fragmente im Bereich 300-500 bp wurden ausgeschnitten und mittels des GenElute Gel Extraction Kits (Sigma) zurückgewonnen. Die abschließende Qualitätskontrolle erfolgte per BioAnalyzer (High Sensitivity DNA Assay). Die Sequenzierung der Fragmente erfolgte von beiden Seiten („paired end“) auf einem Illumina HiSeq Gerät (Leseweite je Richtung: 100 bp) und lieferte 2x 9.724.113 reads. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit dem FastX Toolkit¹ prozessiert und bereinigt (Trimmen der ersten 5 Basenpaare am 5'-Ende, Entfernen von Adaptersequenzen und Basen mit Qualitätswerten < 25). Die Ergebnisse wurden per FASTQC² überprüft. Nach der Prozessierung verblieben 9.172.707 vorwärts und 9.147.234 rückwärts gerichtete Sequenzierungen. Diese verbliebenen Daten wurden mittels eines von Dipl. Biol. Mathias Weber entwickelten Perl-Skripts (fastq_pese_sort.pl, siehe elektronischer Anhang) in intakte Sequenzpaare (n = 8.680.981) und Einzelreads (n = 957.979) sortiert. Die fertig prozessierten Daten wurden mit dem *de novo* assembly-Algorithmus der CLC Genomics Workbench (CLC Bio) zu Contigs assembliert. Die Distanz der paired end reads wurde als 1-300 bp angegeben, die Einstellungen der restlichen Parameter wurden nicht verändert. Es ergaben sich 147.730 Contig-Sequenzen (N50-Wert³: 492 bp), welche mittels BlastN-Suchen mit dem bereits publizierten mt Genom von *B. plicatilis* verglichen wurden. Dadurch konnten drei mitochondriale Contigs identifiziert werden (TABELLE 2).

¹ http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html

² <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

³ Der N50-Wert einer Assemblierung gibt eine Contig-Länge an. 50% der gesamten Assemblierung liegt in Contigs von mindestens dieser Länge vor.

Zur Untersuchung der mt Genome der beiden Brachionidae-Arten *Brachionus manjavacas* und *B. calyciflorus* stellte unser Kooperationspartner David Mark Welch Sequenzen genomischer DNA zur Verfügung. Diese Sequenzen wurden durch 454 Sequenzierung hergestellt, die Assemblierung sowie die Identifizierung der mitochondrialen Contigs per Blast-Suche erfolgten ebenfalls im Kooperations-Labor. Dabei wurden drei bzw. sieben mitochondriale Contigs für *B. manjavacas* bzw. *B. calyciflorus* gefunden (TABELLE 2).

TABELLE 2 – Mitochondriale Contigs der drei untersuchten Monogononta-Spezies

Contigs, die mitochondriale Sequenzinformationen enthalten, wurden per BlastN Suche identifiziert. Für jeden Contig ist die Contig-Bezeichnung, die Länge des Contigs in Basenpaaren (bp) sowie die Anzahl der reads, die im jeweiligen Contig zusammen assembliert wurden, angegeben. Weiterhin gibt die Tabelle Auskunft darüber, mit welchem Subgenom von *Brachionus plicatilis* (*Bpl*) signifikante Blast-Treffer erzielt wurden sowie ob im Bereich der Treffer für *Bpl* größere Gene annotiert sind.

	Contig Nr.	Länge des Contigs	Anzahl reads	BlastN Treffer (<i>Bpl</i>)	
				Subgenom	Größere Gene im Trefferbereich
<i>B. manjavacas</i>	00805	7.813	4.731	II	COX1, ND6, ND4L, ND4, ND5, COX2, COX3, ND3
	01144	6.258	6.593	I	12S rRNA, ND2, ND1, ATP6, 16S rRNA, CYTB
	02857	3.860	6.322	I + II	Keine (NCR-Region)
<i>B. calyciflorus</i>	3	439	2.019	I	12S rRNA
	4	4.506	6.444	II	ND4L, ND4, ND5
	5	1.692	2.824	II	COX1
	6	1.510	1.063	II	COX2, COX3
	12	835	6.195	I + II	Keine (NCR-Region)
	13	1.355	3.454	I	CYTB
	14	4.660	13.103	I	12S rRNA, ND2, ND1, ATP6, 16S rRNA
<i>L. inermis</i>	813	7.489	6.587	I	16S rRNA, 12S rRNA, ATP6
	3247	5.844	2.284	II	COX2, COX3, ND3, ND5, ND4
	12621	4.939	1.612	I II	CYTB, ND1, ND2 COX1

Das mitochondriale Genom von *Brachionus manjavacas*

Die drei per BlastN-Suche als mitochondrial identifizierten Contigs wurden mit dem Programm MITOS¹ (Bernt et al., 2013b) in erster Näherung annotiert. Dabei wurden die Erwartungen aus den Blast-Ergebnissen (TABELLE 2) bestätigt. Im Contig00805 wurden alle Gene des *B. plicatilis* Subgenoms II in entsprechender Reihenfolge gefunden. Im Contig01144 konnten mit default-Einstellungen fast alle Gene des *B. plicatilis* Subgenoms I identifiziert werden. Einzige Ausnahme war das 16S rRNA Gen, das jedoch durch Einschränkung der MITOS-Suche auf rRNA Gene an erwarteter Stelle identifiziert werden konnte. Im Contig02857, der bei den BlastN-Suchen Treffer in den nicht-kodierenden Bereichen der

¹ <http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>, Version vom 12.03.2013

beiden *B. plicatilis* Subgenomen lieferte, identifizierte MITOS erwartungsgemäß¹ lediglich putative tRNA-Gene.

Aufgrund der Annotations-Ergebnisse lag die Vermutung nahe, dass *B. manjavacas* die gleiche Organisation des mt Genoms aufweist wie *B. plicatilis*. Die Hypothese lautete, dass die beiden Gen-enthaltenden Contigs Teile zweier Subgenome darstellen und dass die im Contig02857 vorhandene nicht-kodierende Region (NCR) beiden Subgenomen gemein ist, wie bereits für *B. plicatilis* beschrieben (Suga et al., 2008). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden an den Enden der Gen-enthaltenden Contigs 00805 und 01144 Primer designt, um die fehlenden Teile der beiden putativen Subgenome per LongRange-PCR (LR-PCR) zu amplifizieren. Die Primer befanden sich jeweils in Genbereichen (ND3 und COX1 für Contig00805; CYTB und 12S rRNA für Contig01144; siehe ABBILDUNG 12 und ABBILDUNG 13), die Benennung mit „forward“ und „reverse“ erfolgte entsprechend der Genorientierung. Die LR-PCRs wurden mit der LongAmp® Taq-Polymerase (New England Biolabs) durchgeführt und lieferten Produkte von jeweils ca. 5 kb Größe. Abzüglich der Längen der bereits bekannten Sequenzen von den Primern bis zum Ende der jeweiligen Contigs ergab dies für die fehlenden Teile eine zu erwartende Größe von ca. 4,2 kb. Zur Überprüfung der Identität der LR-PCR-Amplifikate wurden diese mittels ExoSAP (Bell, 2008) aufgereinigt und anschließend von beiden Enden per Sanger-Verfahren sequenziert.

Sequenzen, die mit den jeweiligen forward-Primern gemacht wurden, zeigten einen Überlapp von 490 bp bzw. 526 bp mit dem NCR-Contig02857 (ABBILDUNG 12 und ABBILDUNG 13). Dieser Überlapp war jeweils identisch mit der Sequenz des Contig02857. Die beiden reverse-Sequenzierungen zeigten keinen Überlapp mit Contig02857, waren aber ab dem Ende der bekannten Sequenzen der Contigs 00805 und 01144 untereinander identisch. Der Contig02857 enthielt also offenbar nicht die vollständige NCR der beiden Subgenome, eine Vermutung, die durch den Vergleich der Länge des Contigs02857 (3,8 kb) mit der durch LR-PCR grob bestimmten Größe der Sequenzlücken (4,2 kb) unterstützt wurde. Nachfolgende PCR- und Sequenzierungsreaktionen konnten diese Hypothese beweisen und die Sequenzlücke schließen (ABBILDUNG 12 und ABBILDUNG 13). Somit konnten vollständige Sequenzen der beiden mt Subgenome von *B. manjavacas* erstellt werden, die Assemblierung der Contig-Sequenzen mit den Sanger-Sequenzierungen sowie die Extraktion der Konsensus-Sequenzen erfolgte dabei mit dem Programm SeqMan (DNASTar). Die Größen der Subgenome I und II betragen 11.061 bp und 12.615 bp und sind damit denen der Subgenome von *B. plicatilis* (11.153 bp und 12.672 bp) sehr ähnlich.

¹ MITOS ist auf die Annotation kompletter mt Genome ausgelegt. Das Programm versucht daher immer, möglichst viele mitochondriale Gene in der vorliegenden Sequenz zu finden. Da tRNA-Gene sehr kurz und durch Sekundärstrukturbildung der Genprodukte gekennzeichnet sind, können sie gerade in Sequenzbereichen, die wie die NCR-Regionen zu Sekundärstruktur-Bildungen neigen, fälschlich annotiert werden (vor allem dann, wenn der wahre Gen-Ort nicht auf dem aktuellen Contig zu finden ist).

B. plicatilis Subgenom I



B. manjavacas



Sequenzierungen

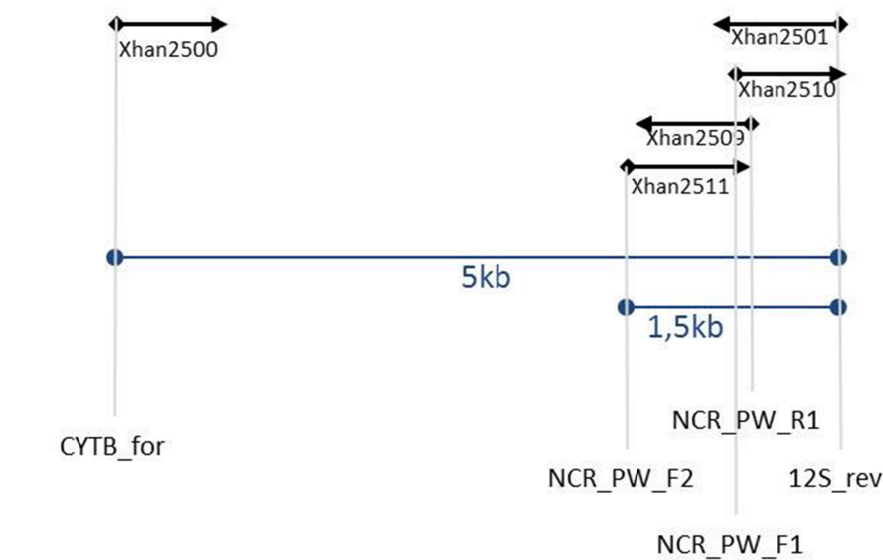


ABBILDUNG 12 – Mitochondriales Genom von *Brachionus manjavacas*: Subgenom I

Die von David Mark Welch zur Verfügung gestellten 454-Contigs von *B. manjavacas* wurden unter die entsprechenden Bereiche des *B. plicatilis* Subgenoms I platziert. Die zur Vervollständigung der Sequenzen durchgeführten PCR- und Sequenzierungsreaktionen sowie die dazu verwendeten Primer sind eingezeichnet.

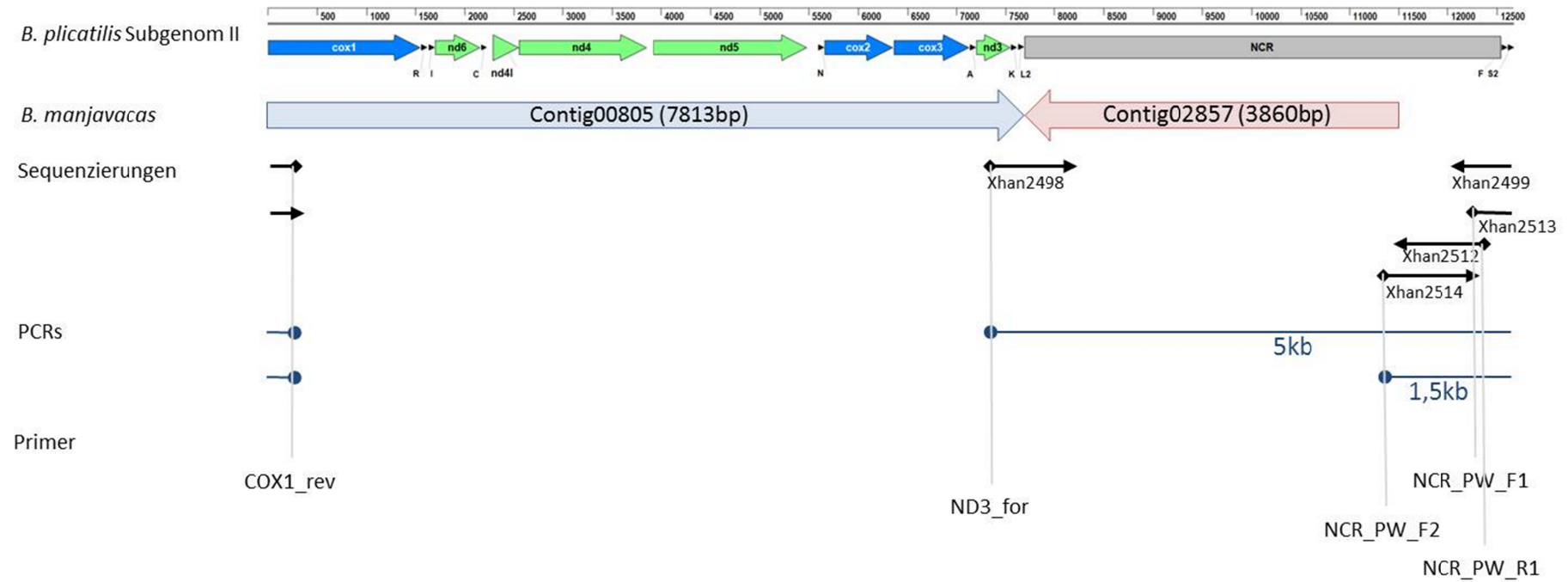


ABBILDUNG 13 – Mitochondriales Genom von *Brachionus manjavacas*: Subgenom II

Die von David Mark Welch zur Verfügung gestellten 454-Contigs von *B. manjavacas* wurden unter die entsprechenden Bereiche des *B. plicatilis* Subgenoms II platziert. Die zur Vervollständigung der Sequenzen durchgeführten PCR- und Sequenzierungsreaktionen sowie die dazu verwendeten Primer sind eingezeichnet.

Für *B. plicatilis* wurde eine ungleiche Kopienzahl der beiden Subgenome berichtet (Suga et al., 2008). Ob dies auch bei *B. manjavacas* der Fall ist, soll per quantitativer RealTime-PCR (qPCR) überprüft werden, diese Analyse steht jedoch noch aus. Es wurden bereits drei Primerpaare erstellt, die ein Subgenom I-spezifisches, Subgenom II-spezifisches oder NCR-spezifisches (und damit ein auf beiden Subgenomen zu findendes) Amplifikat erzeugen (TABELLE 3). Um die Spezifität der Primer zu testen, wurden Standard-PCRs auf genomische DNA von *B. manjavacas* mit der TrueStart™ Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific) durchgeführt. Die Amplifikate wurden auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt und zeigten die erwarteten Größen).

TABELLE 3 – Primer zur Kopienzahl-Bestimmung der *B. manjavacas* mt Subgenome

Für die Bestimmung der relativen Kopienzahlen der beiden mt Subgenome von *B. manjavacas* per qPCR wurden drei Primerpaare designt. Für jedes Primerpaar sind Bindestelle im mt Genom, Primer-Sequenzen sowie Amplikongröße angegeben.

Subgenom (Gen)	Forward-Primer [5'-3']	Reverse-Primer [5'-3']	Amplikon-größe
I (CYTB)	CTAGGTTCTACTGTAGTTGAGTG	AGAATAACTAGAGCTGTCACCAG	119 bp
II (COX1)	TATCACGCAGGAGTATCTGTAG	CATAGCATTAGTGGCAAACGATC	152 bp
I + II	ACCTACCTATAGCAGACTTCAC	TAATGGAGATAGTATTTATTCCACAC	170 bp

Das mitochondriale Genom von *Brachionus calyciflorus*

Die per BlastN-Suche als mitochondrial identifizierten Contigs wurden mit dem Programm MITOS¹ (Bernt et al., 2013b) in erster Näherung annotiert. Die Annotationen entsprachen den Erwartungen aus den Blast-Ergebnissen (TABELLE 2). Gene, die sich bei *B. plicatilis* auf Subgenom I befinden, wurden in den Contigs 3, 13 und 14 annotiert. In den Contigs 4, 5 und 6 hingegen wurden Gene annotiert, die sich bei *B. plicatilis* auf Subgenom II befinden. Im putativen NCR enthaltenden Contig12 wurden erwartungsgemäß nur tRNA-Gene annotiert.

Bei Contigs, die mehrere Gene enthielten, war die Reihenfolge selbiger fast immer identisch mit der Genreihenfolge der entsprechenden Abschnitte in den Subgenomen von *B. plicatilis* und *B. manjavacas* (ausgenommen einige tRNA-Gene). Eine Auffälligkeit zeigte sich jedoch bei der Annotation des Contig4: hier wurden dem ND5-Gen nachfolgend zwei tRNA-Gene (N, A), dann das ND3-Gen und anschließend wieder ein tRNA-Gen (K) annotiert. Verglichen mit *B. plicatilis* entspricht dies der Genreihenfolge auf dessen Subgenom II ohne die Gene COX2 und COX3 (siehe ABBILDUNG 14), was eine mögliche Translokation dieser beiden Gene vermuten lässt. Diese Hypothese wird sich jedoch erst nach Vervollständigung der mt Genomsequenzen bestätigen oder widerlegen lassen können. Für die weitere Analyse des mt Genoms von *B. calyciflorus* wurden bereits Primer designt (ABBILDUNG 14), da jedoch kein ausreichendes DNA-Material von *B. calyciflorus* zur Verfügung stand, konnten die geplanten PCR- und Sequenzierungsreaktionen bisher nicht erfolgreich durchgeführt werden.

¹ <http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>, Version vom 12.03.2013

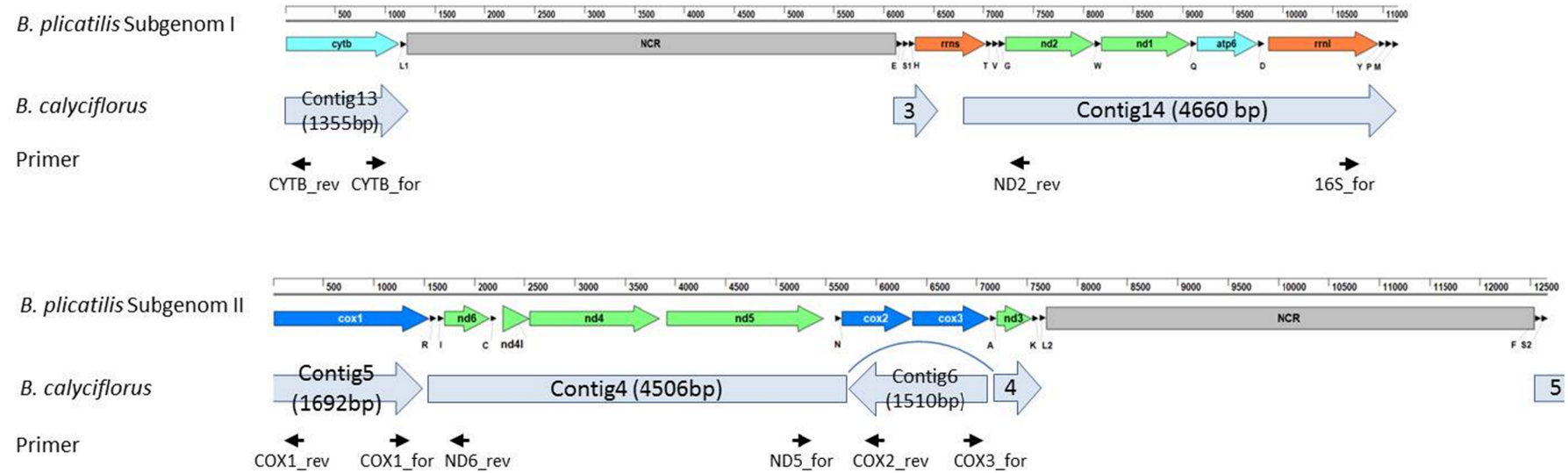


ABBILDUNG 14 – Mitochondriales Genom von *Brachionus calyciflorus*

Die von David Mark Welch zur Verfügung gestellten 454-Contigs von *B. calyciflorus* wurden unter die entsprechenden Bereiche der beiden *B. plicatilis* Subgenome platziert. Die zur Vervollständigung der Sequenzen designten Primer sind eingezeichnet.

Das mitochondriale Genom von *Lecane inermis*

Die per BlastN-Suche als mitochondrial identifizierten Contigs wurden mit dem Programm MITOS¹ (Bernt et al., 2013b) in erster Näherung annotiert. Die Annotationen entsprachen weitgehend den Erwartungen aus den Blast-Ergebnissen (TABELLE 2). In Contig813 wurden hauptsächlich Gene annotiert, die sich bei *B. plicatilis* auf Subgenom I finden (Ausnahmen: tRNA-Gene), in Contig3247 hingegen nur Gene, die bei *B. plicatilis* auf Subgenom II zu finden sind. Die Genreihenfolge innerhalb dieser Contigs unterscheidet sich jedoch deutlich von jener, die bei den Brachionidae zu finden ist (ABBILDUNG 15). Auch zeigt die Annotation des Contigs12621 hintereinander liegende Gene, die bei den beiden vollständigen Brachionidae mt-Genomen auf unterschiedlichen Subgenomen liegen (CYTB und COX1, siehe ABBILDUNG 15). Primer für weitere Analysen wurden bisher noch nicht designt.

Contig813	I	V	R	E	S	H	F	12S rRNA	T	Q	D	16S rRNA	Y	ATP6	K	L	L	M	P	N
Contig3247	I	ND6	ND4L	ND4	COX2	COX3	A	ND3	ND5											
Contig12621	G	ND2	W	ND1	CYTB	S	COX1	C	L											

ABBILDUNG 15 – Annotation der mitochondrialen Contigs von *Lecane inermis*

Die durch MITOS annotierten Genreihenfolgen auf den drei durch Blast-Suchen identifizierten mitochondrialen Contigs von *L. inermis*. Die farbliche Kodierung unterhalb der Gene indiziert deren Lage im Subgenom I (blau) oder Subgenom II (grün) von *B. plicatilis*. Syntene¹ Bereiche wurden durch das Entfernen der Trennlinien innerhalb der Farbfelder gekennzeichnet. tRNA-Gene, die die Translation von Leucin-Codons vermitteln („L“), kommen auf beiden Subgenomen von *B. plicatilis* vor und sind daher nur farblich gekennzeichnet, wenn sie in syntänen Bereichen der *L. inermis* Contigs vorkommen.

¹ Syntenie = Gemeinsamkeiten in der Genreihenfolge beim genomischen Vergleich zweier Spezies

3. DISKUSSION UND AUSBLICK

3.1 Die interne Phylogenie der Syndermata - Implikationen für die Evolution klassisch-biologischer Merkmale

3.1.1 Morphologische Merkmalsevolution

Die in den Kapiteln 2.1 und 2.3 beschriebenen Ergebnisse legen nahe, dass es während der Evolution der Syndermata mehrfach zu sekundären Verlusten sogenannter „komplexer morphologischer Merkmale“ kam (siehe hierzu auch Kapitel 3.1.4). Dies betrifft beispielsweise die Ausprägung des Räderorgans (Corona), welches bei Monogononta und Bdelloidea meist deutlich, in Seisonidea nur rudimentär und in Acanthocephala gar nicht vorhanden ist.

Es ist bekannt, dass die Morphologie und das Ausmaß der Ausbildung des Räderorgans (Corona) stark mit der Lebensweise der jeweiligen Rotifera-Art korreliert (Melone & Ricci 1995). Den freilebenden Bdelloidea und Monogononta wird im Allgemeinen eine ausgeprägte Corona zugesprochen. So haben beispielsweise Tiere der Bdelloidea-Subtaxa Habrotrichidae und Philodinidae deutlich ausgebildete Zilien in distinkten spezialisierten Bereichen aufzuweisen (ABBILDUNG 16 A) und nutzen ihre Corona simultan zum Sammeln von Nahrungspartikeln und zum Schwimmen (Melone und Ricci, 1995). Doch gibt es auch Beispiele von freilebenden Arten, deren Corona nur schwach ausgebildet ist. Beispielsweise ist der Zilienbesatz der Corona der Adinetidae eher schwach und unspezialisiert (ABBILDUNG 16 B) und befähigt die Tiere weder zu aktivem Schwimmen noch zur Erzeugung von Wasserströmungen zur Mundöffnung hin (Melone und Ricci, 1995). Die Tiere gleiten auf dem Substrat dahin und nutzen ihre Zilien um Nahrungspartikel aus selbigem zu lösen, welche dann mittels spezialisierter Strukturen um die Mundöffnung herum (sogenannter „rakes“, also „Rechen“) eingesammelt werden. Noch weniger stark ausgeprägt ist die Corona bei den Philodinavidae (ABBILDUNG 16 C; Melone und Ricci, 1995; Ricci und Melone, 1998). Auch diese Tiere sind des Schwimmens nicht mächtig und ernähren sich grasend (die Nahrungspartikel werden hier jedoch anders als bei den Adinetidae nicht mit Hilfe von „Rechen“, sondern durch Herausstrecken der Trophi zugeführt).

Auch die Zilien der rudimentären Corona der rezenten Seisonidea ermöglichen den Tieren zwar kein aktives Schwimmen, sind aber dennoch durchaus funktionstüchtig und dienen vermutlich dem Sammeln von Nahrungspartikeln oder zumindest der Bewegung selbiger zur Mundöffnung hin (Ricci et al., 1993). Illgen (1916) beschreibt gar eine „lebhafteste Strömung“, die durch den Wimpernschlag der Seisonidea hervorgerufen wird. Dennoch sind die Bezeichnungen „reduziert“ und „rudimentär“ für die Corona der Seisonidea durchaus angebracht, da der Zilienbesatz auch im Vergleich zu sehr schwach ausgebildeten Räderorganen der Bdelloidea nochmals deutlich reduziert ist (ABBILDUNG 16 D).

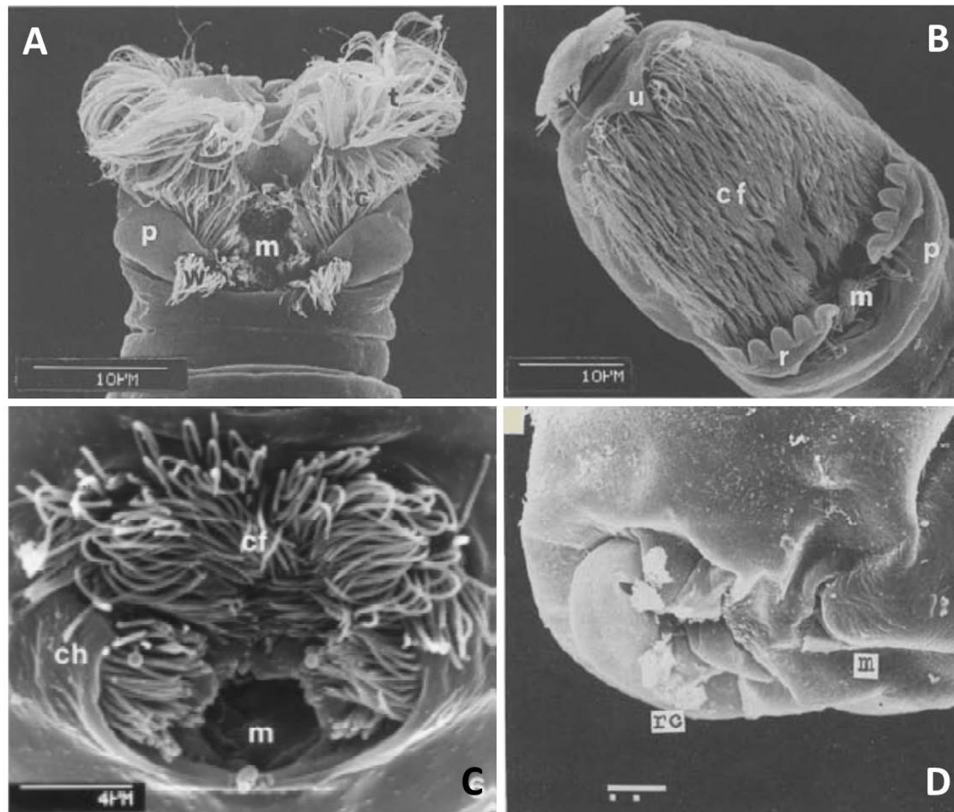


ABBILDUNG 16 – Ausprägung der Corona bei Bdelloidea und Seisonidea

Abgebildet sind verschiedene Ausprägungen des Zilienbesatzes der Corona bei Taxa der Bdelloidea (A - C; Melone und Ricci, 1995; Ricci und Melone, 1998) und Seisonidea (D; Markevich, 1993). (A) Der Zilienbesatz bei *Habrotrocha tranquilla* (Habrotrochidae) ist stark ausgeprägt und ermöglicht den Tieren aktives Schwimmen. Die Zilien werden verschiedenen spezialisierten Bereichen (t, c, w) zugeordnet. (B) Bei *Adineta vaga* (Adinetidae) ist ein recht großes jedoch unspezialisiertes Zilienfeld ausgeprägt, die Nahrungsaufnahme erfolgt mit Hilfe der „Rechen“. (C) Der Zilienbesatz bei *Philodinavus paradoxus* (Philodinavidae) erstreckt sich über ein deutlich kleineres Zilienfeld. (D) Der Zilienbesatz bei *Seison nebaliae* (Seisonidea) ist nur rudimentär ausgebildet. ■ = 10 µm; c = Cingulum; cf = Zilienfeld (ciliated field); ch = cheek; m = Mundöffnung (mouth); p = Cingulum Pad; r = „Rechen“ (rake); rc = rudimentäre Corona (rudimentary corona); t = Trochus; u = Oberlippe (upper lip); w = „Barthaar“ (whisker).

Auf Basis der Ergebnisse der phylogenomischen Untersuchungen der *Seison spec.* ESTs (Kapitel 2.3) gibt es zur Erklärung der Merkmalsevolution bezogen auf die Corona zwei Möglichkeiten (ABBILDUNG 17):

- (1) Die Corona ist in den Taxa Monogononta, Bdelloidea und Seisonidea konvergent (unabhängig voneinander) in unterschiedlichen Ausprägungen entstanden.
- (2) Die Corona ist einmalig auf dem Stammbaum der Syndermata entstanden, es erfolgte eine Reduktion auf dem Stammbaum der Pararotatoria und ein Verlust auf dem Stammbaum der Acanthocephala.

Trotz mannigfaltiger Beispiele für die konvergente Evolution komplexer morphologischer Merkmale (McGhee, 2011; ABBILDUNG 2) innerhalb der Metazoa scheint es unwahrscheinlich, dass in einer unbestritten monophyletischen Taxon-Gruppe auf drei von vier Ästen das gleiche Merkmal unabhängig voneinander entstanden ist. Geht man hingegen davon aus,

dass ursprüngliche Rädertiere eine Corona besaßen, ergibt sich das Szenario, dass sich die Ausprägung der Corona mit der Etablierung biologischer Interaktionen zu Wirten und der damit einhergehenden Änderung der Lebensweise bei Seisonidea und Acanthocephala reduziert hat. Die epizoische Lebensweise der rezenten Seisonidea sowie des letzten gemeinsamen Vorfahren von Seisonidea und Acanthocephala ermöglichte den Tieren große Mobilität ohne eigene aktive Bewegung, wodurch eine starke Ausprägung der Zilien an Nutzen verlor. Auf dem Stammast der Acanthocephalen verschwand das Organ im Zuge der Evolution des Endoparasitismus gänzlich (siehe Kapitel 3.1.2), wohingegen die Corona der Seisonidea in einer rudimentären Ausbildung mitsamt ihrer Ernährungsfunktion erhalten blieb.

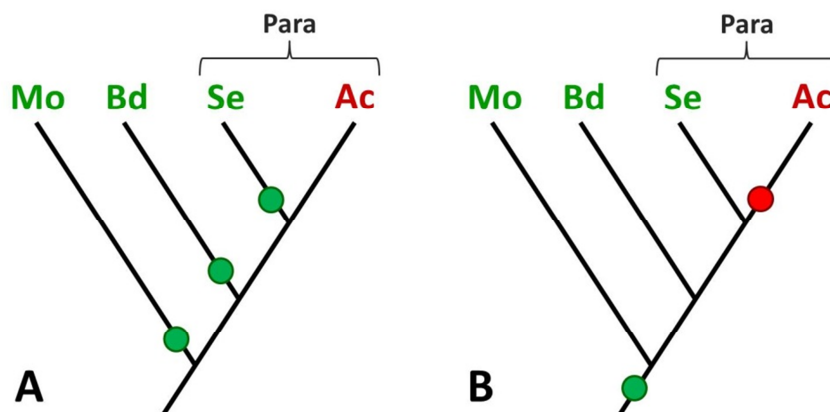


ABBILDUNG 17 – Hypothesen zur Evolution der Corona innerhalb der Syndermata

Basierend auf der in dieser Arbeit beschriebenen Topologie der Syndermata kann die Evolution der Corona auf zwei Wegen beschrieben werden. Grüne Punkte symbolisieren die Entstehung von Corona und Retrozerebralorgan, rote Punkte den Verlust selbiger Merkmale. Die Merkmalsverteilung in den rezenten Subtaxa wird ebenfalls durch die Farben grün (Merkmale vorhanden) und rot (Merkmale nicht vorhanden) symbolisiert. [A] Dreifache konvergente Evolution in den Stammlinien der Monogononta, Bdelloidea und Seisonidea. [B] Entstehung der Merkmale auf dem Stammast der Syndermata sowie Verlust selbiger auf dem Stammast der Acanthocephala. Da Corona und Retrozerebralorgan vermutlich ko-evolviert sind, ist der in Abbildungsteil B beschriebene evolutionäre Weg der wahrscheinlichere. Ac = Acanthocephala, Bd = Bdelloidea, Mo = Monogononta, Para = Pararotatoria, Se = Seisonidea.

Weitere Hinweise auf eine Entstehung der Corona in der Stammlinie der Syndermata liefert das Retrozerebralorgan. Dieses Organ findet man ebenso wie die Corona sowohl in Monogononta und Bdelloidea als auch in Seisonidea (Ricci et al., 1993; Wallace, 2001). Es befindet sich nahe dem Hirn und beinhaltet paarige Drüsen sowie Gänge, die am apikalen Ende der Tiere, also an der Corona, enden. Die Funktion des Retrozerebralorgans ist derzeit nicht geklärt, jedoch wird unter anderem eine Funktion des Drüsensekrets als Schmiermittel für die Zilien des Räderorgans vermutet (Wallace und Snell, 2010). Ist dies der Fall, so muss das Retrozerebralorgan zusammen mit der Corona entstanden sein und eine dreifache konvergente Evolution beider Merkmale ist äußerst unwahrscheinlich. Somit muss für beide Merkmale von einem einmaligen Verlust-Ereignis auf dem Stammast der Acanthocephala ausgegangen werden (ABBILDUNG 17).

Auch innerhalb der Acanthocephala findet sich ein Beispiel für den sekundären Verlust eines komplexen morphologischen Merkmals. Es handelt sich hierbei um die lateralen sensorischen Organe (LSOs) der Acanthocephala. Dies sind paarige, subepidermale Strukturen am Nacken der Tiere, welche dendritische Zellendungen sensorischer Nerven, eingebettet in die röhrigen Fortsätze einer großen, multinukleären Stützzelle, beinhalten (Herlyn et al., 2001). Die Anzahl der Nuklei der Stützzelle, die also in Wahrheit ein Synzytium und keine einzelne Zelle darstellt, variiert taxonspezifisch zwischen zwei und fünf und scheint mit der Anzahl der röhrigen Fortsätze zu korrelieren (Herlyn et al., 2001). Die Funktion der sensorischen Organe ist bis heute nicht vollständig geklärt. Vermutet wurden neben einer taktilen oder chemischen Rezeption auch bereits eine Funktion als Drüse bzw. dass die Organe Überbleibsel des Verdauungstraktes darstellen (Miller und Dunagan, 1985). Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Struktur der Organe deuten jedoch sowohl für die (nur bei Archiacanthocephala vorkommenden) apikalen als auch für die lateralen sensorischen Organe in Richtung sensorische Funktion (Dunagan und Schmitt, 1995; Herlyn et al., 2001).

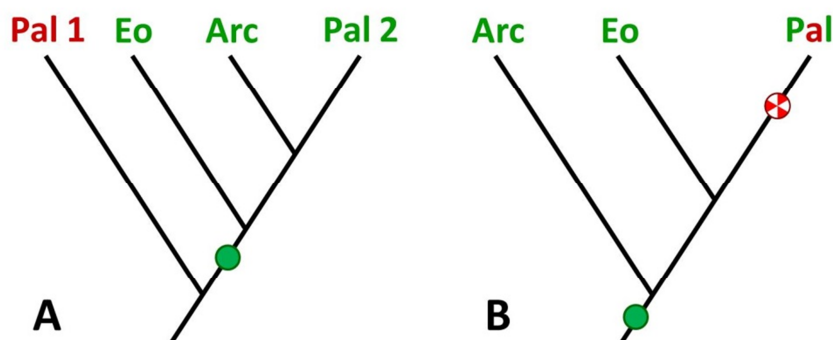


ABBILDUNG 18 – Hypothesen zur Evolution der lateralen sensorischen Organe innerhalb der Acanthocephala

In Abhängigkeit von der zugrunde gelegten Topologie ergeben sich verschiedene Szenarien für die Entstehung und den möglichen sekundären Verlust der lateralen sensorischen Organe (LSOs) der Acanthocephala. Die Merkmalsverteilung in den rezenten Subtaxa (Arc = Archiacanthocephala, Eo = Eoacanthocephala, Pal = Palaeacanthocephala) wird durch die Farben grün (LSOs vorhanden) und rot (LSOs nicht vorhanden) symbolisiert. Analog symbolisieren die Farben der Punkte die Entstehung (grün) bzw. den Verlust (rot) der LSOs. [A] Laut Herlyn et al. (2003) stellen die Palaeacanthocephala eine paraphyletische Gruppierung dar (Pal1, Pal2). Jene Palaeacanthocephala ohne LSOs (Pal 1) sind demnach die Schwestergruppe zu allen anderen Acanthocephala, wodurch ein einziges Entstehungsereignis die Merkmalsverteilung der LSOs erklären würde. [B] Legt man die im Rahmen dieser Arbeit beschriebene Topologie mit monophyletischen Palaeacanthocephala zugrunde, ergibt sich ein Szenario mit einem singulären Entstehen der LSOs auf dem Stammast der Acanthocephala sowie multiplen Verlustereignissen in Subtaxa der Palaeacanthocephala.

Die LSOs findet man in nahezu allen Acanthocephala, jedoch sind sie in einigen Vertretern der Palaeacanthocephala, beispielsweise in *Brentisentis uncinus*, *Plagiorhynchus cylindraceus* und *Acanthocephalus anguillae*, nicht vorhanden (Herlyn und Ehlers, 2001; Monks, 2001). Die Interpretation dieses Verteilungsmusters variiert erheblich je nach zugrunde gelegter Topologie (ABBILDUNG 18). Im Falle einer Paraphylie der Palaeacanthocephala, wie sie eine phylogenetische Analyse von 18S rDNA nahelegte (Herlyn et al., 2003), ließe sich das

Verteilungsmuster der LSOs relativ einfach erklären. Demnach würden die Acanthocephalen ohne LSOs die Schwestergruppe zu den restlichen Acanthocephala bilden und die LSOs wären somit nicht auf der Stammlinie aller Acanthocephala entstanden (ABBILDUNG 18 A). Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Dissertation entstanden sind (Kapitel 2.1), zeigen jedoch deutlich eine Monophylie der Palaeacanthocephala. Somit ist davon auszugehen, dass LSOs ein synapomorphes Merkmal aller Acanthocephalen darstellen und innerhalb der Palaeacanthocephala konvergente sekundäre Verluste der LSOs aufgetreten sind (ABBILDUNG 18 B). Dieses Beispiel illustriert auf beeindruckende Weise, wie stark unser Verständnis morphologischer Evolution von robusten und verlässlichen Phylogenien abhängt.

3.1.2 Die Evolution von Reproduktionsstrategien

Die Parthenogenese gilt als die ursprünglichste Art der Vermehrung, während sich der komplizierte Mechanismus der Meiose vermutlich erst in etwa zeitgleich mit dem Ur-Eukaryoten entwickelte und so fortan die sexuelle Fortpflanzung ermöglichte (Cavalier-Smith, 2002). Da die sexuelle Fortpflanzung durch die Möglichkeit der Neu-Kombination genetischer Informationen klare evolutionäre Vorteile brachte, hat sich diese Art der Vermehrung trotz des immensen Mehraufwands verglichen mit asexueller Fortpflanzung in den Metazoa durchsetzen können (West-Eberhard, 2003; de Meeûs et al., 2007; Lehtonen et al., 2012; Nielsen, 2012). Jedoch ist die Parthenogenese bei vielen rezenten Tierarten, meist als Alternative zur sexuellen Fortpflanzung, anzutreffen (siehe Tabelle 1 in de Meeûs et al., 2007), beispielsweise bei Tardigrada (Bärtierchen), Nematoda (Fadenwürmer), Osteichthyes (Knochenfische), Acarina (Milben), Hexapoda (Sechsfüßer) und Squamata (Schuppenkriechtiere).

Auf Basis der Ergebnisse der phylogenomischen Untersuchungen der *Seison spec.* ESTs (Kapitel 2.3) gibt es zur Erklärung der Verteilung der Reproduktionsstrategien innerhalb der Syndermata nun wiederum verschiedene mögliche evolutionäre Szenarien. Das erste besteht im konvergenten Auftreten der Parthenogenese in den Stammlinien der Monogononta und Bdelloidea; diese Hypothese erscheint vor dem oben geschilderten Hintergrund der weiten Verbreitung dieser Fähigkeit im Tierreich durchaus plausibel. Eine Alternative zu diesem Szenario stellt hingegen das Auftreten von Parthenogenese bereits im gemeinsamen Vorfahren aller Syndermata sowie der erneute Verlust dieser Fähigkeit auf dem Stammast der Pararotatoria (Acanthocephala + Seisonidea) dar. Der letzte gemeinsame Vorfahre der Seisonidea und Acanthocephala lebte vermutlich epizoisch (Kapitel 2.3) und wies dadurch im Vergleich zu den freilebenden Syndermata einen verminderten aktiven Bewegungsradius auf. Daher würde man zunächst vermuten, dass die Partnersuche und somit die sexuelle Fortpflanzung deutlich erschwert war und der Verlust der Fähigkeit zur Parthenogenese einen evolutionären Nachteil dargestellt hätte. Die Plausibilität des Szenarios wird jedoch bei genauerer Betrachtung der rezenten Pararotatoria deutlich. Seisonidea sind nicht völlig immobil sondern können sich kriechend fortbewegen, was wichtig zur Besiedlung von Wirt-Jungtieren und vermutlich auch für den Transfer der Seisonidea während der Häutung ihrer Wirte ist (Ricci et al., 1993). Außerdem findet man

Tiere beider Geschlechter auf dem gleichen Wirtsindividuum (siehe ABBILDUNG 4 D). Die Partnersuche kann für Seisonidea also sogar deutlich einfacher sein als für ihre freilebenden Verwandten, die sich mitunter in den Weiten eines Gewässers finden müssten. Auch bei Acanthocephalen finden sich Individuen beider Geschlechter im Darm eines Wirts-individuums (Crompton, 1985). Ein Verzicht auf Parthenogenese bedeutet also bei beiden Pararotatoria-Taxa nicht zwangsläufig auch einen verminderten Fortpflanzungserfolg und ist daher evolutionär durchaus plausibel.

3.1.3 Die Evolution des Endoparasitismus der Acanthocephala

Im Stammbaum der Tiere finden sich viele parasitische Spezies und nicht selten sind die Parasiten innerhalb einer gegebenen Taxon-Gruppe dabei polyphyletischen Ursprungs, stammen also nicht von einem nur ihnen gemeinsamen Vorläufer ab. Beispielsweise gibt es innerhalb der Nematoda vermutlich bis zu vier unabhängige Entwicklungen hin zum Parasitismus (Blaxter, 2003), eine zweifache konvergente Entwicklung findet man bei Läusen (Poulin, 2007). Der Endoparasitismus aller Acanthocephala hingegen ging von einem einzigen gemeinsamen parasitischen Vorfahren aus.

Damit sich eine parasitische Lebensweise etablieren kann, müssen mehrere Voraussetzungen gegeben sein. Zunächst müssen der werdende Wirt und der werdende Parasit in Kontakt kommen, ohne sich gegenseitig zu schaden. Weiterhin muss der werdende Parasit bereits über Anpassungen verfügen, die ihm Leben, Fressen und Reproduktion auf oder in dem Wirt ermöglichen (Rothschild und Clay, 1952). Außerdem wird der Parasitismus nur dann etabliert, wenn das Nutzen des Wirtes dem werdenden Parasiten einen Fitness-Vorteil bietet.

Im Falle der Acanthocephala deutet die in dieser Arbeit postulierte Topologie der Syndermata auf einen epizoisch lebenden gemeinsamen Vorfahren der Seisonidea und Acanthocephala hin. Solch eine Lebensweise kann sich beispielsweise aus einer phoretischen Beziehung ableiten, in der der spätere Wirt zunächst nur als temporäres Transportmittel zur besseren und schnelleren Verbreitung verwendet wird. Phoresie scheint ein gängiger Zwischenschritt auf dem Weg zur Etablierung von Parasitismus zu sein, beispielsweise findet man bei Milben und Nematoden sowohl phoretische als auch parasitische Spezies und vermutet daher, dass sich letztere aus phoretischen Vorläufern entwickelt haben (Poulin, 2007). Sowohl das temporäre als auch das später dauerhafte Leben auf einem freischwimmenden Arthropoden war für den Vorläufer der Pararotatoria vermutlich nur möglich, da er Zementdrüsen besaß, wie man sie bei allen Syndermata findet (siehe Kapitel 1.2). Das Sekret dieser Drüsen ermöglicht eine Anhaftung der Tiere an Substrate und sicherte dem Vorläufer der Pararotatoria somit ein dauerhaftes Verbleiben auf dem Wirt. Mögliche Fitness-Vorteile für den Vorfahren der Pararotatoria durch die Assoziation mit einem Arthropoden könnten die vereinfachte Partnersuche durch den flächenmäßig

beschränkten Lebensraum (siehe Kapitel 3.1.2) sowie eine vereinfachte Futtersuche¹ und eventuell auch ein erhöhter Schutz vor Fressfeinden durch das Leben auf einem größeren und schnelleren Tier gewesen sein.

Während auf der Linie der Seisonidea dieser epizoische Lebensstil erhalten blieb, wanderte der Vorläufer der Acanthocephala in seinen Wirt ein. Ein ähnliches Szenario der Entstehung von Endoparasitismus über ein ektoparasitisches Zwischenstadium wurde bereits für die Platyhelminthes postuliert (Zrzavý, 2001; Park et al., 2007; Perkins et al., 2010). Die im weiteren Verlauf der Acanthocephalen-Evolution stattgefundene Etablierung eines Lebenszyklus mit zwei Wirten lässt sich durch das Vorhandensein der Fressfeinde des Arthropoden-Wirtes erklären. Diejenigen Parasiten, die Mutationen trugen, die ein Überleben oder gar eine Fortpflanzung im Darm des Fressfeindes des ursprünglichen Wirtes ermöglichten, hatten letztlich einen evolutionären Vorteil (Parker et al., 2003). Bei dieser sogenannten „aufwärts gerichteten Eingliederung neuer Wirte“ wird aus dem ehemals einzigen Wirt (hier: Arthropode) der Zwischen- und aus dessen Fressfeind (hier beispielsweise ein Fisch) der Endwirt. Daraus entstand letztlich der bei rezenten Acanthocephala zu beobachtende Lebenszyklus, wobei sich die Parasiten neben weiteren aquatischen auch terrestrisch lebende Wirte erschlossen (Herlyn et al., 2003). Da der grundlegende Lebenszyklus in allen Acanthocephala zu finden ist, wurde dieser sehr wahrscheinlich auf dem Stammast aller Acanthocephalen etabliert.

Mit den geschilderten Veränderungen des Lebensstils der Vorfahren der Acanthocephala gingen massive morphologische Anpassungen und Innovationen einher, beispielsweise der Verlust des gesamten Ernährungsapparates inklusive Corona und Trophi (stattdessen wurde eine Ernährung über die Epidermis etabliert) sowie die Entstehung der rückziehbaren und mit Haken besetzten Proboscis mitsamt der assoziierten Muskulatur. Auch mussten die Acanthocephalen als Endoparasiten zum erfolgreichen Beenden eines Lebenszyklus dem Immunsystem der Zwischenwirte entgehen können (Loker, 1994). Dazu haben sie Mechanismen zur Unterdrückung der Immunantwort der Wirte entwickelt, die bisher nicht vollständig geklärt werden konnten (Lackie und Holt, 1989; Dezfuli et al., 2008; Cornet et al., 2009). Zwar kann der Ursprung der Syndermata und Acanthocephala derzeit nicht datiert werden, jedoch ist davon auszugehen, dass sich all diese Veränderungen in einer vergleichsweise kurzen Zeitspanne zugetragen haben (siehe Kapitel 1.2.1). Die beschleunigte Evolution in Acanthocephalen spiegelt sich ebenfalls auf Sequenzebene wider. Sichtbar wird eine solch erhöhte Evolutionsrate durch die vergleichsweise langen Äste in phylogenetischen Stammbaumrekonstruktionen, wie Sie auch in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu beobachten sind (siehe z.B. Kapitel 2.5).

¹ Beispielsweise findet sich *Nebalia*, der Wirt der rezenten Seisonidea, oftmals inmitten sich zersetzenden organischen Materials, was ideale Ernährungs-Bedingungen für die epizoisch lebenden Seisonidea darstellt.

3.1.4 Konvergenz und sekundärer Verlust – warum morphologische Merkmale in die Irre führen können

Immer wieder liefern phylogenetische Untersuchungen molekularer Daten Ergebnisse, die mit denen morphologisch basierter Bäume in Konflikt stehen. Die Gründe für diese Konflikte sind ebenso vielfältig wie die Lösungsansätze. Molekulare Stammbäume können durch systematische Fehler, lange Äste (long-branch attraction, LBA, siehe Kapitel 1.1.4), das „Genbaum vs. Speziesbaum“-Problem (siehe Kapitel 1.1.2), Probenkontaminationen oder gar durch das Sequenzieren und Analysieren eines der falschen Spezies zugeordneten Individuums falsche Ergebnisse liefern. Doch ebenso können „starke morphologische Beweise“ in die Irre führen, da beispielsweise aufgrund ähnlicher Selektionsdrücke selbst komplexe Merkmale konvergent entstehen können (siehe das Beispiel „Articulata“ in Kapitel 1.1.3 sowie die Diskussion in den Kapiteln 2.5 und 3.3.2). Ebenso können morphologische und entwicklungsbiologische Merkmale sekundär verloren gehen oder stark variiert werden, prominentes Beispiel ist die Spiralfurchung, die innerhalb der Spiralia bei einigen Mollusken und Plattwürmern sowie bei Bryozoa, Gastrotricha, Brachiopoda und anderen nicht zu finden ist (siehe Hejnol, 2010 für eine detaillierte Diskussion zur Evolution der Spiralfurchung). Häufig finden sich Diskrepanzen zwischen morphologischen und molekularen Stammbäumen bei Taxa, bei denen im Vergleich zu verwandten Taxa eine Veränderung der Lebensweise und/oder des Habitats vorliegt, denn diese Veränderungen gehen meist mit morphologischen Anpassungen einher, welche eine Analyse der Phylogenie basierend auf morphologischen Merkmalen erschweren und fehlleiten können.

Diese Problematik betrifft beispielsweise Parasiten: zur Anpassung an das Leben auf oder in einem Wirtsorganismus sind meist massive morphologische und entwicklungsbiologische Modifikationen nötig, und nicht selten beinhalten diese auch einen Verlust von Merkmalen (beispielsweise der Verdauungsapparat der Acanthocephalen, siehe Kapitel 2.3). Das abgeleitete (apomorphe) Fehlen von Merkmalen wiederum stellt eine Schwierigkeit für morphologisch basierte Phylogenien dar, denn in den meisten dieser Arbeiten werden die Merkmale in binären Matrizen kodiert. Ein Merkmal ist in diesen Matrizen entweder vorhanden (1) oder nicht vorhanden (0) und der Zustand „0“ wird dabei in der Regel gleichgesetzt mit „phylogenetisch nicht informativ“ bzw. einem plesiomorphen Zustand. Das apomorphe Fehlen eines Merkmals, also der sekundäre Verlust, kann nur dann erkannt werden, wenn genügend vorhandene Merkmale die entsprechende Topologie unterstützen. Da diese aber oft nicht in ausreichender Menge vorhanden sind (siehe das Beispiel Placozoa in Kapitel 1.1.5), kann alternativ das einfache in Betracht ziehen sekundärer Verlustereignisse auf morphologischer Ebene zum Auflösen bestehender phylogenetischer Konflikte zwischen morphologisch basierten und molekularen Stammbäumen helfen (Jenner, 2004b).

Beispiel für einen der oben genannten Konflikte im Bereich von Parasiten ist die Position der Pentastomida (Zungenwürmer; obligate Parasiten der Atmungsorgane verschiedener Vertebraten). Molekulare Phylogenien, basierend auf den Sequenzen mitochondrialer und

nukleärer ribosomaler RNAs, platzieren die Pentastomiden innerhalb des Arthropoden-Taxons Crustacea (Krebstiere), meist als nahe Verwandte der ebenfalls parasitischen Branchiura (Fischläuse) (Abele et al., 1989; Giribet und Ribera, 2000; Møller et al., 2008). Auch die Analyse mitochondrialer (mt) Genome (Proteinsequenzen sowie Genanordnung) und transkriptomischer Daten ergab diese Position für das Taxon (Lavrov et al., 2004; Oakley et al., 2013). In morphologisch basierten Arbeiten hingegen wurden sie meist als Teil der sogenannten „Pro-Arthropoden“, einer Linie von Tieren, die sich vor der Evolution der eigentlichen (Eu-)Arthropoden abspaltet, angesehen (Maas und Waloszek, 2001; Chesunov, 2002). Den Pentastomiden fehlen einige Merkmale aus dem Grundmuster der Arthropoden wie zum Beispiel die Segmentierung, das erste Tagma (Caput, Kopf) und die Nephridien (Walossek und Müller, 1998; Waloszek, 2003), was diese „basale“ Position in den morphologischen Arbeiten erklären könnte. Zieht man die Möglichkeit in Betracht, dass oben genannte Merkmale sekundär verloren gingen, ließen sich Morphologie und molekularer Stammbaum in Übereinstimmung bringen.

Derzeit scheinen viele Wissenschaftler dazu zu neigen, eher den molekularen als den morphologischen Stammbäumen zu vertrauen (z. B. Scotland et al., 2003; Wiens et al., 2010; Hirano et al., 2014). Da die Wissenschaft jedoch nach wie vor weit davon entfernt ist, molekulare Phylogenien fehlerlos rekonstruieren zu können (siehe das Beispiel Mollusca in Kapitel 1.1.4), ist es wichtig, diese stets mit morphologisch basierten Stammbäumen als eine Art „Realitätscheck“ zu vergleichen (Wiens, 2004), oder, wie Jenner (2004a) es ausdrückt: „eine gleichberechtigte Beziehung zwischen molekularer und morphologischer Phylogenetik ist die beste Wahl für zukünftige Fortschritte“. Für jede postulierte Gruppierung sollte es im Idealfall also mehrere Evidenzen in Balance zwischen Morphologie und molekularen Daten geben:

- 1) morphologische Synapomorphien (unter Beachtung potentieller sekundärer Verluste sowie Konvergenzen)
- 2) unabhängige sequenzbasierte Bäume
- 3) Charaktere des Genoms (RGCs)

Erst wenn all diese Evidenzen ein stimmiges Bild von der Phylogenie einer Gruppe geben (und andere Hypothesen glaubhaft widerlegt werden können), kann man die Phylogenie einer Gruppe vorsichtig als „gelöst“ betrachten. Doch selbst in diesen Fällen ist es möglich, dass sich durch das Auffinden eines bisher unbekannten Fossils, durch die Hinzunahme weiterer Taxa oder anderer Gene in molekulare Datensätze, durch Änderung der Parameter bei der phylogenetischen Rekonstruktion oder durch eine Reihe weiterer denkbarer Umstände eine ganz neue Sichtweise ergibt.

Im geschilderten Fall der Pentastomiden erhalten die molekularen Stammbäume, respektive die Hypothese, dass Pentastomiden den Crustacea zugeordnet werden können, Unterstützung durch putative Homologien in der Spermienmorphologie der Pentastomida und Branchiura (Fischläuse) (Wingstrand, 1972; Riley et al., 1978). Jedoch gibt es keine weiteren morphologischen Apomorphien, auch nicht in den Larvalstadien, die diese

Positionierung unterstützen, wodurch die Phylogenie der Pentastomiden nach wie vor in der Diskussion steht (siehe Waloszek, 2006 für eine detaillierte Darstellung der Hypothesen und Evidenzen).

Auch die in der vorliegenden Arbeit implizierten sekundären Verlustereignisse (Coronotrophi) innerhalb der Syndermata hängen mit einer Änderung der Lebensweise zusammen. Die Schwestergruppenbeziehung von Seisonidea und Acanthocephala (= Pararotatoria) wird dabei von unabhängigen sequenzbasierten Datensätzen unterstützt: sowohl ribosomale Proteine (Kapitel 2.6.1; Witek et al., 2008; Witek et al., 2009) als auch gemischte Datensätze (Kapitel 2.3) zeigen diese Verwandtschaft. Eine Monophylie der Pararotatoria scheint in Bezug auf die Entwicklung des Endoparasitismus der Acanthocephala sinnvoll (siehe Kapitel 3.1.3) und wird zudem von morphologischen Merkmalen unterstützt (epidermale Filamente und dichte Körperchen (dense bodies) im Flagellum der Spermien von Acanthocephala und Seisonidea, siehe Kapitel 1.2.3). Jedoch muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass das Taxon *Seison spec.* in den Analysen transkriptomischer Daten in Kapitel 2.5 konstant eine andere Position im Stammbaum der Syndermata annimmt: in diesen Analysen spalten sich die Seisonidea als erste Linie innerhalb der Syndermata ab. Wodurch diese abweichende Position zustande kommt, muss durch weitere Analysen geklärt werden (s.u.).

Die Paraphylie der Eurotatoria wird in Rahmen dieser Arbeit von nahezu allen molekularen Bäumen unterstützt: neben den Datensätzen aus ribosomalen Proteinen (Kapitel 2.6.1; Witek et al., 2008; Witek et al., 2009) und gemischten phylogenomischen Datensätzen (Kapitel 2.3 und 2.5) sprechen auch die Analysen von Sequenzen mitochondrialer Genome (Kapitel 2.1) für eine solche Topologie. Morphologische Merkmale, die für eine Gruppierung der Bdelloidea mit den Acanthocephala bzw. Pararotatoria sprechen, sind jedoch schwer zu finden. Einzig das Vorhandensein eines rückziehbaren anterioren Körperendes (Rostrum in Bdelloidea und Seisonidea, Proboscis in Acanthocephala) wird derzeit als mögliche evolutionäre Neuerung auf dem Stammbaum der Hemirotrifera diskutiert (siehe Kapitel 2.3).

Die dritte Art der Evidenz, Charaktere des Genoms, kann für die interne Phylogenie der Syndermata derzeit nicht erbracht werden, da bisher nur ein einziges Syndermata-Genom vollständig sequenziert wurde (Flot et al., 2013). Auch eine Beurteilung der Genreihenfolge der mt Genome als phylogenetisch informatives Kriterium wird erst mit der Sequenzierung weiterer mt Genome der Monogononta sowie Seisonidea möglich sein. Die Genreihenfolge der bisher sequenzierten mt Genome ist aufgrund deren aberranter Struktur innerhalb der Monogononta in einem phylogenetischen Kontext schwierig zu beurteilen, jedoch liefert die kaum veränderte Reihenfolge der proteinkodierenden Gene zwischen Bdelloidea und Acanthocephala (Kapitel 2.1 und 2.2) einen ersten weiteren Hinweis für die Validität von paraphyletischen Eurotatoria.

Nach derzeitigem Kenntnisstand waren Hypothesen zu monophyletischen Eurotatoria also teilweise fehlgeleitet durch „starke morphologische“ Evidenzen wie der Ausprägung des Räderorgans. Weiterhin stellte die Unterstützung paraphyletischer Eurotatoria kein Artefakt bedingt durch die Abwesenheit von Daten für die Seisonidea dar, da sie auch bei

Hinzunahme dieses Taxons bestehen blieb. Die Position der Seisonidea als Schwestertaxon zu den restlichen Syndermata in den phylogenomischen Analysen zur Platyzoa-Frage (Kapitel 2.5) stellt in Anbetracht der mit mehreren unabhängigen molekularen Datensätzen erzielten Ergebnisse (monophyletische Pararotatoria; Kapitel 2.3 und 2.6.1) möglicherweise ein Artefakt dar. Die „basale“ Position der Seisonidea wird dabei eventuell hervorgerufen durch den in diesen Analysen enorm langen Ast von *Seison spec.* (Kapitel 2.5). Durch die starken morphologischen Modifikationen der Acanthocephala ist das Finden morphologischer Merkmale zur Unterstützung der Gruppierungen Pararotatoria und Hemirotifera enorm erschwert, daher wird die endgültige Klärung der internen Phylogenie der Syndermata wahrscheinlich von zukünftigen molekularen Arbeiten abhängen. Sobald vollständig sequenzierte Genome aller Subtaxa der Syndermata vorhanden sind, wird die Bewertung von Charakteren des Genoms hoffentlich eine weitere Annäherung an die wahre evolutionäre Geschichte dieser außergewöhnlichen Tiere ermöglichen.

3.2 Methodische Aspekte der Phylogenomik

3.2.1 Die Analyse transkriptomischer Daten von Nicht-Modellorganismen – Probleme und Möglichkeiten

Im Zuge der rasanten Entwicklung der Sequenzierungstechnologien und den dadurch stetig sinkenden Kosten pro sequenzierter Base wurden bereits etliche Referenzgenome von Eukaryoten veröffentlicht. Beispielsweise finden sich in der „Genomes Online Database“¹ derzeit 314 komplette eukaryotische Genome (143 Pilze, 36 Pflanzen, 50 Protisten, 1 Schwamm sowie 84 Metazoa), über 6.500 noch unvollständig und/oder gerade in Bearbeitung befindliche Genome sowie weitere 366 geplante Genomprojekte (Stand 27.02.2014). Im Bereich der Metazoa existieren insbesondere für Modellorganismen wie Maus, Ratte, Zebrafisch und *Drosophila* verlässliche und gut annotierte Datengrundlagen, die man zur Analyse transkriptomischer Daten dieser Spezies nutzen kann. Die sequenzierten Genschnipsel („reads“) werden dabei mittels speziellen Programmen („Mapping“-Programme) an die Referenz aligniert, aus den überlappenden reads pro Lokus können dann die Transkriptsequenzen abgelesen werden (Martin und Wang, 2011). Die Prüfung und Bewertung von Authentizität und Güte der reads ist somit relativ einfach zu bewerkstelligen. Bei der Analyse transkriptomischer Daten von Organismen, für die keine oder keine qualitativ hochwertigen Referenzsequenzen existieren, werden die reads nicht gemappt sondern „*de novo*“ zu zusammenhängenden Sequenzen (Contigs) assembliert. Diese Art der Assemblierung ist insbesondere dann schwierig, wenn die sequenzierten Genschnipsel sehr kurz sind („short reads“; Góngora-Castillo und Buell, 2013). Bei initialen Transkriptom-Assemblierungen ist aber genau das meist der Fall. Technologien und Geräte, die längere reads liefern können, sind aus verschiedenen Gründen (z.B. zu erwartende Sequenzmenge, Kosten pro Base oder Fehlerraten) oft nicht erste Wahl (Góngora-Castillo und Buell, 2013). Erschwerend hinzu kommt die Tatsache, dass alle reads durch die Anwendung verschiedener

¹ www.genomesonline.org

Verfahren zur Qualitätsprüfung vor der Assemblierung zusätzlich gekürzt werden („Trimming“), was die Verlässlichkeit der Assemblierungsergebnisse weiter herabsetzen kann. Diese Prozessierung ist jedoch unbedingt notwendig, da bei einem Großteil der Programme zur Assemblierung von Transkriptomen aus short reads die Qualitätswerte der Basen nicht berücksichtigt werden (Góngora-Castillo und Buell, 2013).

De novo-Assemblierungen von short reads werden meist unter Anwendung des de Bruijn-Graphen erstellt (Compeau et al., 2011; Martin und Wang, 2011). Diese Vorgehensweise hat bei der Analyse von großen Mengen an short reads gegenüber den klassischen „overlap layout consensus“-Methoden (OLC) erhebliche Vorteile bezüglich Akkuratessse und computertechnischer Effizienz (Li et al., 2012; Góngora-Castillo und Buell, 2013). Während bei OLC-Methoden alle reads paarweise verglichen werden, um nach Überlappungen zu suchen, werden die reads bei der de Bruijn-Graph Methode in Subsequenzen der Länge k , sogenannte „ k -mers“ zerlegt, welche sich innerhalb eines reads stets um $k-1$ Basen überlappen (ABBILDUNG 19). Mit steigender Sequenziertiefe und daher Anzahl der reads werden jedoch auch de Bruijn-Assemblierungen computertechnisch enorm aufwändig und je nach den gegebenen Limitationen von Hard- und Software müssen die Daten aufgeteilt und iterativ assembliert werden (Martin und Wang, 2011; Góngora-Castillo und Buell, 2013).

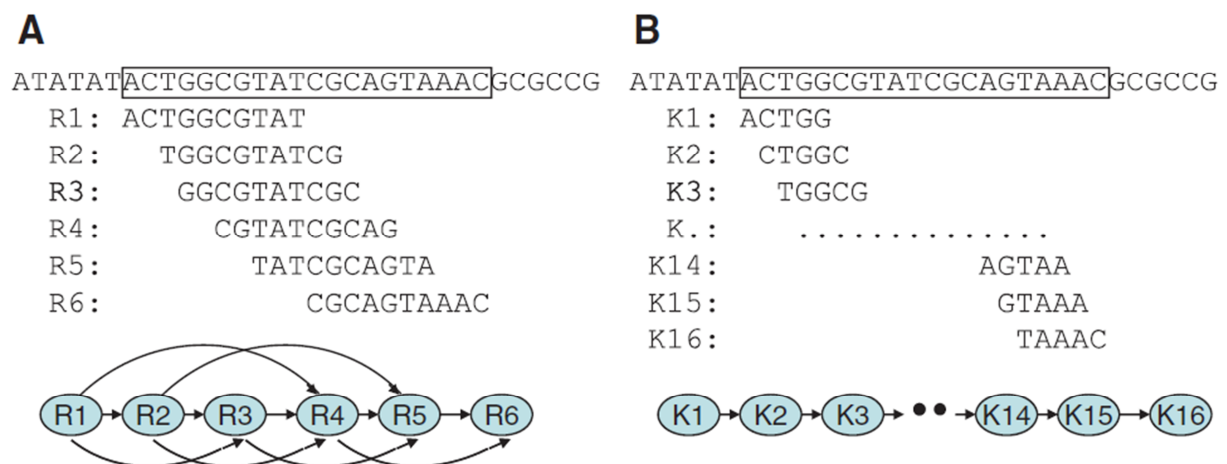


ABBILDUNG 19 – Darstellung der Unterschiede zwischen OLC-Methode und de Bruijn-Graph

In diesem Beispiel sollen sechs fiktive reads (R1-R6) von jeweils 10 bp Länge assembliert werden. Blaue Ovale symbolisieren reads bzw. k -mers (= Knoten), die durch Pfeile (= Überlappungen) miteinander zu einem Pfad (= Konsensussequenz oder Contig) verbunden werden. Abbildung aus Li et al. (2012). [A] Bei der OLC-Methode werden die reads paarweise verglichen um Überlappungen zwischen ihnen zu erkennen. Als minimale Überlappungslänge wurden 5 bp vorgegeben. Bei dieser Vorgehensweise hat fast jeder Knoten mehr als einen ein- oder ausgehenden Pfeil. Während die Anzahl der Knoten also linear mit der Anzahl der reads wächst, steigert sich die Anzahl der Verbindungen zwischen den Knoten logarithmisch. [B] Beim de Bruijn-Graphen werden zunächst alle möglichen k -mers (hier: $k = 5$ bp) der reads gebildet. Dabei kann jedes k -mer in mehr als einem read vorkommen und die Überlappung zur Bildung des Graphen muss $k-1$ betragen. Die Knoten des entstehenden Graphen haben daher meist nur einen ein- und einen ausgehenden Pfeil. Die Anzahl der Knoten ist unabhängig von der Sequenziertiefe (also der Anzahl der reads), wenn der Parameter k so gewählt wird, dass jedes k -mer nur einmal vorkommt.

Die Länge der k -mers hat starken Einfluss auf die Länge und Anzahl der resultierenden Contigs. Neben diesem Parameter kann auch die Angabe der Distanz zwischen paired end reads¹ entscheidenden Einfluss auf die Assemblierung nehmen. Neben der Frage nach den richtigen Parameter-Einstellungen ergibt sich jedoch vor allem die Problematik der Gütebewertung von *de novo*-Assemblierungen. Allgemeine Kriterien wie Anzahl und N50-Wert der Contigs sollten dabei sicherlich betrachtet werden, jedoch kann man diese Werte natürlich am besten dann beurteilen, wenn man eine ungefähre Schätzung von Gen- bzw. Transkriptanzahl und durchschnittlicher Transkriptlänge der betreffenden Spezies zum Vergleich heranziehen kann. Ist dieses Vorwissen nicht vorhanden, kann eine erste grobe Einschätzung der zu erwartenden Zahlen anhand der Daten möglichst nah verwandter Taxa vorgenommen werden. Für die in der vorliegenden Arbeit analysierten Syndermata-Transkriptome wurden die Genanzahlen der Platyhelminthen-Taxa *Schistosoma mansoni* und *S. japonicum* als grobe Richtschnur herangezogen, da diese die nächsten Verwandten der Syndermata darstellen, für die Referenzgenome existierten. Die Genanzahlen dieser Taxa liegen zwischen 10.000 und 14.000 Genen (Berriman et al., 2009; *Schistosoma japonicum* genome sequencing and functional analysis consortium, 2009; Protasio et al., 2012), für die Transkriptome der Syndermata wurden in erster Näherung ähnliche Zahlen erwartet. Zwar sind pro Gen mehrere verschiedene Transkripte und damit Contigs zu erwarten, je nach Sequenziertiefe können aber auch nicht alle Transkripte rekonstruiert werden.

Weiterhin können Contigs aus transkriptomischen *de novo*-Assemblierungen nach bereits bekannten Transkripten der sequenzierten oder einer nah verwandten Spezies oder des spezifischen Gewebes durchsucht werden, um die Authentizität der Daten zu prüfen. Jedoch benötigt auch dieses Vorgehen ein gewisses Maß an Vorwissen (Góngora-Castillo und Buell, 2013) und wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht angewandt. Können keinerlei Erwartungswerte definiert werden, bleibt noch das Abgleichen der Contig-Sequenzen gegen Sequenzdatenbanken via Blast. Die Anzahl der signifikanten Blast-Treffer wird hierbei in der Regel positiv mit der Güte der Assemblierung korrelieren. Bei der Auswertung von Blast-Ergebnissen ist aber in jedem Fall darauf zu achten, aus welchen Taxa die getroffenen Datenbankeinträge stammen, um eventuelle Kontaminationen der Probe vor oder während der Sequenzierung (Cross-Kontaminationen) zu erkennen.

Auch in der vorliegenden Arbeit stellte die Bewertung der *de novo*-Assemblierungen aufgrund des Fehlens von Referenzgenomen oder –transkriptomen eine Herausforderung dar. Das einzige bisher publizierte Genom einer Syndermata-Art (*Adineta vaga*, Bdelloidea; siehe Flot et al., 2013) erschien zeitlich erst nach den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen. Im Falle von *Seison spec.* (Kapitel 2.3) wurden die etwa 120.000 transkriptomischen reads mittels Pyrosequenzierung hergestellt und hatten eine durchschnittliche Länge von 300 bp. Die Assemblierung dieser langen reads erfolgte vergleichend mit den beiden OLC-Assemblern MIRA (Chevreux et al., 1999) und NGen (DNASar) im Rahmen der Diplomarbeit von Benjamin Rieger (Mainz, 2010). Während die

¹ die Genschnipsel werden von beiden Seiten aus sequenziert, die Informationen zu Abstand und Orientierung der zusammengehörenden reads werden während des Assemblierungsprozesses genutzt

Anzahl der Contigs und die Anzahl der signifikanten Blast-Treffer das Ergebnis der MIRA-Assemblierung leicht favorisierten, sprachen der höhere N50-Wert und die höhere Anzahl an insgesamt assemblierten reads für die NGen-Assemblierung (TABELLE 4). Die letztendliche Entscheidung für die MIRA-Assemblierung fiel erst nach der Auswertung der BLAST-Ergebnisse bezüglich der Anzahl gefundener Gene für ribosomale Proteine, da diese in späteren phylogenetischen Arbeiten genutzt werden sollten (Kapitel 2.6.1).

TABELLE 4 – Assemblierungsergebnisse *Seison spec.* 454 reads

Ca. 120.000 transkriptomische reads (durchschnittliche read-Länge: 300 bp) wurden vergleichend mit zwei verschiedenen Overlap-layout-consensus-Programmen assembliert. Der Blast wurde mittels des BlastX-Algorithmus gegen die „non redundant“ Datenbank durchgeführt. Als signifikante Treffer wurden alle Treffer mit einem E-Value $< e^{-6}$ gewertet.

	MIRA Version 3.0 Accurate mode	NGen (DNASTar) High quality mode
Anzahl assemblierte reads	97.752	99.945
Anzahl Contigs	9.339	8.399
Durchschnittliche Contig-Länge [bp]	304	346
N50-Wert [bp]	255	306
Anzahl signifikanter Blast-Treffer	3.233	2.618
Anzahl via Blast gefundener RPs	57	55

Als Beispiel für die *de novo*-Assemblierung von short reads sollen an dieser Stelle die per Illumina-Sequenzierung hergestellten Daten von *Macracanthorhynchus hirudinaceus* dienen (Kapitel 2.5). Nach Prozessierung verblieben etwa 2x 50 Millionen reads (paired end) mit Längen von 20 bp bis 89 bp. Die Assemblierung der Daten erfolgte mit dem *de novo*-assembly-Algorithmus der CLC Genomics Workbench. Der Algorithmus basiert auf einem de Bruijn-Graphen, wobei die *k*-mer Länge vom Programm automatisch anhand der zu assemblierenden Datenmenge festgelegt wird. Die beiden durchgeführten Assemblierungen unterschieden sich somit lediglich im Parameter der paired end-Distanz (TABELLE 5). Bei Assemblierung mit der zunächst gewählten paired end-Distanz von 150-300 bp überstieg die Anzahl der Contigs (knapp 23.000) deutlich die aufgrund der Werte der Platyhelminthen erwartete Genanzahl von 10-14.000. Dies könnte zwar als eine hohe Anzahl sequenzierter alternativer Transkripte pro Gen aufgrund der Sequenziertiefe gedeutet werden, jedoch waren weiterhin lediglich 2 Millionen reads so assembliert, dass der putative forward- und reverse-read desselben Sequenzschnipsels im selben Contig und innerhalb des angegebenen Abstandes zueinander assembliert wurden (= „reads in pairs“; TABELLE 5). Wurden hingegen auch geringere Abstände zwischen den paired reads zugelassen (paired end-Distanz 1-300 bp), erhöhte sich die Anzahl der reads in pairs um das sechsfache, der N50-Wert stieg an und die Anzahl der Contigs lag im Rahmen der Erwartungen bezüglich der Genanzahl (TABELLE 5).

TABELLE 5 – Assemblierungsergebnisse *M. hirudinaceus* Illumina reads

Ca. 2x50 Millionen short reads (Längen von 20 bp bis 89 bp) wurden mittels des *de novo*-Assemblierungs-Algorithmus der CLC Genomics Workbench unter Angabe verschiedener paired end-Distanzen (PE-Distanz) assembliert. Der Blast wurde mittels des BlastX-Algorithmus gegen die „non redundant“ Datenbank durchgeführt. Als signifikante Treffer wurden alle Treffer mit einem E-Value $< e^{-10}$ gewertet.

	PE-Distanz 150-300 bp	PE-Distanz 1-300 bp
Anzahl Contigs	22.822	13.608
Durchschnittliche Contig-Länge [bp]	725	1.048
N50-Wert [bp]	1.227	1.483
Anzahl reads in pairs	2 Mio.	12 Mio.
Anzahl signifikanter Blast-Treffer	~ 5.000	~5.000

Inzwischen wurden weitere Genome verschiedener Platyhelminthes sequenziert und veröffentlicht, wobei die Genanzahl meist konstant zwischen 10.000 und 14.000 Genen liegt (Tsai et al., 2013; Zheng et al., 2013). Eine Ausnahme bildet der freilebende Plattwurm *Schmidtea mediterranea*, für den bis zu 20.000 Gene vermutet werden (Adamidi et al., 2011). Andere Taxa der Spiralia wie Anneliden und Mollusken weisen nochmals deutlich höhere Genanzahlen von bis zu 33.000 Genen auf (z. B. Simakov et al., 2013). Bemerkenswert ist die Genanzahl von knapp 50.000 im kürzlich erschienenen Genom des Bdelloidea-Taxons *Adineta vaga* (Flot et al., 2013). Diese Anzahl beinhaltet die verschiedenen Haplotypen des degeneriert tetraploiden Genoms, dennoch übersteigt sie die der meisten Metazoa-Taxa und vor allem jene, die vor dieser Publikation für Syndermata erwartet wurde (s. o.). Im Einklang mit solche einer hohen Genanzahl innerhalb der Bdelloidea steht die Tatsache, dass bei der Assemblierung der neuen transkriptomischen Daten von *Rotaria rotatoria* (Bdelloidea) eine Contig-Anzahl von über 30.000 erreicht wurde (Kapitel 2.5). Die Gründe für die hohe Genanzahl liegen neben der einzigartigen Genomstruktur auch in der Expansion mehrerer Genfamilien sowie der Aquisition vieler Gene via horizontalem Gentransfer in Bdelloidea (siehe Kapitel 1.2.1 sowie Gladyshev et al., 2008; Flot et al., 2013). Da solche Phänomene für die anderen Taxa der Syndermata bisher nicht beschrieben wurden, sind diese Zahlen jedoch nicht übertragbar. Die „typische“ Genanzahl in den Genomen der restlichen Syndermata bleibt daher nach wie vor fraglich, jedoch deuten die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse auf Werte ähnlich denen der parasitären Plattwürmer hin (s.o.). Derzeit sind verschiedene Genomprojekte für weitere Taxa der Syndermata im Gange (z. B. für *Brachionus calyciflorus* als Vertreter der Monogononta), so dass man sich der Antwort auf diese Frage in Zukunft deutlich nähern wird. In jedem Fall konnte durch die im Rahmen dieser Dissertation erzielte massive Erhöhung der verfügbaren molekularen Daten für Taxa der Syndermata bereits eine deutliche Verbesserung bezüglich der Bewertung von *de novo*-Transkriptomassemblierungen erzielt werden. Zukünftige Transkriptom-Projekte von Syndermata-Taxa werden eine verbesserte Gütebewertung anhand der Anzahl mittels Blast-Suchen getroffener Syndermata-Sequenzen ausführen können.

3.2.2 Mehr Taxa + mehr Daten = bessere Bäume?

In Zeiten des Next Generation Sequencing werden die Datensätze, die zur Rekonstruktion von Verwandtschaftsverhältnissen genutzt werden, beständig größer. Dies betrifft sowohl die Anzahl der Taxa als auch die Anzahl der analysierten Alignment-Positionen. Mehr Taxa scheinen dabei generell zuträglich zu sein (Pollock et al., 2002; Zwickl und Hillis, 2002), selbst wenn diese eine nur geringe Datensatzabdeckung haben (Wiens, 2005; Wiens und Tiu, 2012). Werden hingegen ganze Taxon-Gruppen durch lediglich eine oder zwei Spezies repräsentiert, führt dies in der Regel zu langen Stammästen und somit zu potentiellen LBA-Artefakten. Weiterhin haben einige Taxa mehr Einfluss auf die Topologie als andere (Mariadassou et al., 2012). Ein Beispiel hierfür findet sich in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen der RP-Datensätze (Kapitel 2.6.1). Während Witek et al. (2008; 2009) mit kompletten RP-Datensätzen paraphyletische Eurotatoria rekonstruierte, führte die Hinzunahme weiterer Syndermata-Taxa, darunter ein Vertreter der zuvor nicht abgedeckten Seisonidea, zu einer monophyletischen Gruppierung der Eurotatoria (ABBILDUNG 10). Diese Monophylie konnte jedoch sowohl durch das Entfernen der neuen Taxa als auch durch die Deletion von kompositionell heterogenen RPs aus dem Datensatz wieder aufgelöst werden (TABELLE 1, ABBILDUNG 11) und stellt somit vermutlich ein Artefakt dar. Das in den RP-Daten vorhandene widersprüchliche phylogenetische Signal wirkt sich demnach je nach Taxon-Auswahl unterschiedlich stark auf die Topologie aus. Jede Änderung der Taxon-Auswahl kann also eine erneute Überprüfung der Eignung eines Datensatzes notwendig machen. Auch aus anderen Gründen sollte die Taxon-Auswahl wohl überlegt sein. So kann die Wahl der Außengruppe entscheidenden Einfluss auf die Topologie nehmen (Rosenfeld et al., 2012). Generell wird die Hinzunahme langästiger Taxa in die Analyse oftmals vermieden, um LBA-Artefakte zu unterbinden. Problematisch ist diese Vorgehensweise natürlich dann, wenn wie in den in der vorliegenden Arbeit genau diese langästigen Taxa (Syndermata, Platyzoa) untersucht werden sollen.

Ebenfalls stellen sich „mehr Daten“ im Sinne einer Erhöhung der Anzahl der analysierten Gene bzw. Alignment-Positionen nicht in jedem Fall als hilfreich heraus. Gerade wenn mögliche negative Beeinflussungen der Rekonstruktionen (zum Beispiel durch langästige Taxa oder eine einseitige Genauswahl, siehe hierzu auch Kapitel 3.2.3) oder systematische Fehler vorliegen, kann ein „Mehr“ an Daten dazu führen, dass die falsche Topologie nur umso besser unterstützt wird (Jeffroy et al., 2006; Aleshin et al., 2007). Auch hierfür finden sich Beispiele in der vorliegenden Arbeit: so wurden mit dem größeren RP-Datensatz „RP76“ in Kapitel 2.6.1 monophyletische Eurotatoria rekonstruiert, wohingegen die Analysen des aufgrund von kompositioneller Heterogenität reduzierten RP-Datensatzes „RP38“ (sowie aller gemischten transkriptomischen Datensätze aus Kapitel 2.3) konstant paraphyletische Eurotatoria zeigten. Auch in den Analysen zur Überprüfung des Taxons Platyzoa (Kapitel 2.5) zeigte einzig der größte Datensatz (d01) monophyletische Platyzoa, während mit allen modifizierten (und damit kleineren) Datensätzen paraphyletische Platyzoa rekonstruiert wurden. Die Modifikationen dienten dabei zur Beseitigung verschiedener potentiell

fehlleitender Einflüsse: z. B. wurden langästige Taxa oder Gene mit geringer Abdeckung entfernt oder die Heterogenität der Basenzusammensetzung und Astlängen reduziert.

Die reine Größe eines Datensatzes ist demnach kein Kriterium für die Korrektheit der daraus abgeleiteten Topologie und jeder Datensatz sollte in Bezug auf verschiedene Parameter überprüft und gegebenenfalls modifiziert werden, um die Validität der Ergebnisse zu testen.

3.2.3 Die Qual der Wahl: Welche Marker für tiefe Phylogenien?

Molekulare Marker für phylogenetische Rekonstruktionen müssen verschiedene Kriterien erfüllen (Bernt et al., 2013a): beispielsweise sollten die ausgewählten Gene in möglichst vielen zu untersuchenden Taxa grundsätzlich verfügbar sein. Hierfür kommen insbesondere klassische Haushaltsgene in Betracht: diese werden unabhängig von Zelltyp und Zeitpunkt (konstitutiv) exprimiert und kodieren meist Strukturmoleküle und Proteine, die mit grundsätzlichen Funktionen in Zellen zusammenhängen. Zur Rekonstruktion von Speziesbäumen ist weiterhin die Orthologie der Gensequenzen entscheidend (siehe Kapitel 1.1.1).

Sowohl RP-Gene als auch mitochondriale proteinkodierende Gene erfüllen die beiden oben genannten Kriterien für molekulare Marker. Die Genprodukte sind für grundlegende Aufgaben in der Zelle zuständig (Translation und Zellatmung), daher werden sie konstitutiv und in großen Mengen exprimiert (z. B. Hsiao et al., 2001; Janssens et al., 2004; Thorrez et al., 2008; Timmermans et al., 2008). Genduplikationen für die RP-Gene sind selten, was die Wahrscheinlichkeit für das versehentliche Vergleichen paraloger Sequenzen herabsetzt (Hughes et al., 2006; Longhorn et al., 2007). Bei mitochondrialen Genen muss dieser Vorteil im Hinblick auf nicht-funktionelle Kopien der Gene im Kerngenom, sogenannte „numts“, eingeschränkt werden (Richly und Leister, 2004). Bei Analysen, die einige mitochondriale Sequenzen von *Seison spec.* (abgeleitet aus den im Rahmen dieser Dissertation hergestellten transkriptomischen Daten) enthielten, wurden die Seisonidea als Schwestergruppe zu den Monogononta platziert (persönliche Korrespondenz mit Erica Lasek-Nesselquist). Da diese Topologie allen anderen molekular-phylogenetischen Ergebnissen für die Position der Seisonidea widerspricht (siehe Kapitel 1.2.3), könnten diese sequenzierten Genschnipsel „numts“ darstellen und die Rekonstruktionen beeinflusst haben. Liegen jedoch komplette mitochondriale Genome als Datengrundlage vor, kann die versehentliche Verwendung solcher Genkopien unterbunden werden.

Ein weiterer Vorteil bei der Nutzung mitochondrialer Gene besteht in der großen Anzahl an Taxa, für die Sequenzen bereits verfügbar sind. In der Datenbank des NCBI¹ befinden sich derzeit allein 3.981 Einträge kompletter mt Genome der Metazoa (Stand 31.03.2014). Dazu kommen unzählige Sequenzen einzeln sequenzierter mitochondrialer Gene. Aufgrund einiger Besonderheiten der mtDNA ist bei ihrer Verwendung für phylogenetische Rekonstruktionen dennoch Vorsicht geboten. So ist die Wahl des richtigen

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/OrganelleResource.cgi?taxid=33208>

Substitutionsmodells bei der Baumrekonstruktion ein sehr entscheidender Punkt um Artefakte in den Topologien durch z. B. den „GC-skew“¹ zu vermeiden (Jones et al., 2007; Kjer und Honeycutt, 2007). Auch eignen sich die mitochondrialen Sequenzen wegen der vergleichsweise hohen Mutationsrate in mt Genomen (Brown et al., 1979; Curole und Kocher, 1999) oft nicht zur Analyse tieferer Phylogenien, sogar dann, wenn statt der DNA die über lange evolutionäre Zeitspannen hinweg konservierteren abgeleiteten Proteinsequenzen genutzt werden. Als Beispiel sei hier die bisher umfangreichste Metazoa-weite mt-basierte Analyse von Bernt et al. (2013a) genannt, bei der unbestritten monophyletische Großgruppen wie Arthropoda und Mollusca als polyphyletische Gruppierungen erschienen, jedoch auch langästige Taxa ohne gemeinsamen evolutionären Ursprung vielfach aufgrund von long-branch attraction zusammengruppierten. Auch bei etwas „flacheren“ Phylogenien finden sich Beispiele, in denen Analysen von mt Daten Ergebnisse lieferten, die mit denen von nukleären und morphologischen Markern in Widerspruch stehen. Innerhalb der Arthropoden lieferten Analysen von mt Daten wiederholt Hinweise auf eine Paraphylie der Hexapoda (Sechsfüßer) und somit auf eine konvergente Evolution der hexapoden Körperorganisation (Nardi et al., 2003; Carapelli et al., 2005; Carapelli et al., 2007; Simon und Hadrys, 2013). Im Gegensatz dazu unterstützen molekular-phylogenetische Arbeiten, welche auf nukleären Markern basierten, monophyletische Hexapoda (Timmermans et al., 2008; Meusemann et al., 2010; Regier et al., 2010; Sasaki et al., 2013) und stehen damit im Einklang mit morphologischen Annahmen zur Evolution der Arthropoda (siehe Giribet und Edgecombe, 2012 für einen aktuellen Überblick). Die hier zu erkennende beschränkte Vertrauenswürdigkeit von mt-basierten Topologien in bestimmten Bereichen des Stammbaums der Metazoa macht nochmals deutlich, wie wichtig es ist, stets mit unabhängigen molekularen Datensätzen kongruente Ergebnisse zu erzeugen (siehe hierzu auch Kapitel 3.1.4).

RP-Gene zeigen im Vergleich zu mitochondrialen Genen moderate Evolutionsraten und sind daher grundsätzlich auch für die Auflösung tieferer Phylogenien geeignet. Dennoch stehen auch sie bezüglich ihrer Nutzbarkeit und Akkuratess für phylogenetische Rekonstruktionen in der Kritik. Die Proteindomänen sind funktionell gekoppelt, und insbesondere Aminosäuren an oder nahe den tRNA-Bindestellen der Ribosomen zeigen Zeichen von Koevolution (Yeang und Haussler, 2007; Timmermans et al., 2008). Mehrere Studien der letzten Jahre vermuteten eine Verfälschung phylogenetischer Studien durch die alleinige oder hauptsächliche Verwendung von RP-Sequenzen. Beispielsweise sahen Bleidorn et al. (2009) die Nutzung einer einzigen Klasse von Proteinen generell als kritisch an. Nesnidal et al. (2010) untersuchten konkret die Sequenzzusammensetzungen von RPs verschiedener Taxa und detektierten deutliche kompositionelle Abweichungen in der Hälfte der Proteine. Das von Nesnidal et al. beschriebene widersprüchliche phylogenetische Signal in verschiedenen RP-Sequenzen konnte auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand

¹ Der GC-skew ist eine Maßzahl für die ungleiche Häufigkeit von Guanin bzw. Cytosin auf den beiden Strängen des mitochondrialen Genoms.

unterschiedlicher Topologien nach Nutzung aller oder nur ausgewählter RPs beobachtet werden (vergleiche die Topologien in ABBILDUNG 10 und ABBILDUNG 11).

Zusammenfassend sind also sowohl mitochondriale Daten als auch ribosomale Proteine nicht uneingeschränkt zur Klärung phylogenetischer Fragestellungen geeignet. Eine Mischung aus funktionell unterschiedlichen und unabhängig evolvierenden Sequenzen kann eine Lösung sein, jedoch müssen hier Aspekte wie Orthologiebestimmung, Datensatzabdeckung und Akkuratess der Substitutionsmodelle bedacht werden. Somit müssen optimale (oder zumindest geeignete) Marker für jede Fragestellung neu bestimmt werden. Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Syndermata wurden sowohl mitochondriale (Kapitel 2.1) als auch „gemischte“ nukleäre Marker (Kapitel 2.3 und 2.6.1) verwendet. Zur Untersuchung der Position der Syndermata innerhalb der Metazoa wurden hingegen nur nukleäre Marker verwendet (Kapitel 2.5), da die Analysen von mt Sequenzen aufgrund der Ergebnisse von Bernt et al. (2013a; s. o.) keinen Erfolg versprachen. Ergänzend wurden für diese Fragestellung RGCs in Form von Indels in den Aminosäure-Alignments gesucht (siehe hierzu Kapitel 3.3.2 sowie den elektronischen Anhang).

3.3 Das DFG Schwerpunktprogramm 1174 „Deep Metazoan Phylogeny“ – Fortschritt und offene Fragestellungen

3.3.1 Architektur der mitochondrialen Genome der Syndermata

Im Rahmen des DFG Schwerpunktprogramms „Deep Metazoan Phylogeny“ (DMP) konnten insgesamt vier mt Genome der Syndermata vollständig sowie drei weitere unvollständig sequenziert und analysiert werden (TABELLE 6). Neben den dadurch möglichen phylogenetischen Analysen, insbesondere innerhalb der Acanthocephala (Kapitel 2.1), konnte auch die Architektur dieser Genome betrachtet werden. Diese ist insbesondere in der Gruppe der Monogononta interessant, da die beiden bisher publizierten mt Genome dieses Taxons (*B. plicatilis* und *B. koreanus*) in je zwei Subgenomen organisiert sind und eine im Vergleich zu anderen Syndermata-Taxa stark abgewandelte Genreihenfolge zeigen (Kapitel 2.1, 2.2 und 2.6.2; Suga et al., 2008; Hwang et al., 2014).

TABELLE 6 – Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sequenzierte und analysierte mitochondriale Genome
Ein Stern markiert unvollständig sequenzierte mt Genome.

Taxon	Taxon-Gruppe	Sequenziert von	Erstmals untersucht in
<i>Brachionus calyciflorus</i> *	Monogononta	David Mark Welch	unpubliziert
<i>Brachionus manjavacas</i>	Monogononta	David Mark Welch	unpubliziert
<i>Echinorhynchus truttae</i> *	Palaeacanthocephala	AG Hankeln (DMP)	Weber et al. 2013
<i>Lecane inermis</i> *	Monogononta	AG Hankeln (DMP)	unpubliziert
<i>Macracanthorhynchus hirudinaceus</i>	Archiacanthocephala	AG Hankeln (DMP)	Weber et al. 2013
<i>Paratenuisentis ambiguus</i>	Eoacanthocephala	AG Hankeln (DMP)	Weber et al. 2013
<i>Philodina citrina</i>	Bdelloidea	AG Hankeln (DMP)	Weber et al. 2013

Die vorläufigen Ergebnisse der Analysen mitochondrialer Genome weiterer Monogononta (Kapitel 2.6.2) zeigen verschiedene Syndermata-typische Eigenschaften der untersuchten mt Genomsequenzen (vergleiche Kapitel 2.2). So befinden sich alle Gene auf nur einem der beiden DNA-Stränge, und bei keiner Spezies wurde ein ATP8-Gen annotiert. Die annotierten tRNAs falten sich, wie bei *B. plicatilis* aber im Gegensatz zu vielen tRNAs der Bdelloidea und Acanthocephala, größtenteils zu vollständigen Kleeblatt-Strukturen. Die Ergebnisse legen weiterhin nahe, dass die Organisation in zwei Subgenomen sowie die Genreihenfolge inklusive der tRNA-Gene innerhalb der Brachionidae weitgehend konserviert ist. Eine Vervollständigung des mt Genoms von *B. calyciflorus* wäre jedoch sinnvoll um diese Behauptung zu verifizieren, denn die beiden Arten, deren mt Genome vollständig sequenziert sind (*B. plicatilis*, *B. manjavacas*), sind sehr nah miteinander verwandt: *B. manjavacas* ist eine kryptische Spezies innerhalb des *B. plicatilis* Spezies-Komplexes (Fontaneto et al., 2007). *B. calyciflorus* hingegen zeigt eine deutlich entferntere Position innerhalb der Brachionidae (siehe z. B. Yoshinaga et al., 2004). Das detektierte putative Translokations-Ereignis im Vergleich zu den vollständigen mt Genomen von *B. plicatilis* und *B. manjavacas* (siehe ABBILDUNG 14) ist ein erster Hinweis auf mögliche Änderungen der Genreihenfolge innerhalb der Brachionidae. Unterstützt wird diese Annahme durch die kürzlich veröffentlichte Sequenz des mt Genoms von *B. koreanus*: diese Spezies ist innerhalb der Brachionidae ebenfalls entfernter verwandt zu *B. plicatilis* als *B. manjavacas* (Hwang et al., 2013) und zeigt eine leicht veränderte Genreihenfolge im Vergleich zu den beiden vorgenannten (Hwang et al., 2014).

Die Organisation des mt Genoms des einzigen untersuchten Nicht-Brachionidae-Taxons *L. inermis* ist weitgehend unklar. Die summierte Größe der nicht-überlappenden mitochondrialen Contigs von *L. inermis* beträgt 18,2 kb, weiterhin fehlen in den Annotationen noch vier größere Gene sowie die bisher bei allen Monogononta-Taxa recht großen nicht-kodierenden Regionen. Vor dem Hintergrund, dass die mt Genome der Syndermata in der Regel 14-16 kb lang sind, wenn sie aus einem Zirkel bestehen (Kapitel 2.2), impliziert dies, dass bei *L. inermis* eine Aufteilung des mt Genoms in zwei Subgenome vorliegen könnte, wie sie bei den beiden vollständig sequenzierten Brachionidae-Taxa zu finden ist (die summierten Genomgrößen der beiden Subgenome ergeben sowohl bei *B. plicatilis* als auch bei *B. manjavacas* ca. 23,7 kb). Trotz putativ gleicher Organisation wird sich das mt Genom von *L. inermis* jedoch von jenen der Brachionidae in Bezug auf die Genreihenfolge deutlich unterscheiden (siehe ABBILDUNG 15).

Je mehr mt Genome unterschiedlicher Monogononta-Spezies in Zukunft sequenziert werden, desto klarer sollte sich das Bild der Evolution dieser Genome zeichnen lassen. Interessante Spezies für zukünftige Arbeiten wären solche, die weitere der zahlreichen Subtaxa der Ploimida abdecken (z. B. Asplanchnidae, Lepadellidae, Proalidae). Äußerst erstrebenswert wäre natürlich auch die Sequenzierung des mt Genoms eines Taxons außerhalb der Ploimida (Flosculariacea). Durch eine solche Ausweitung der Taxon-Abdeckung könnte abgeleitet werden, ob die aberrante Organisation des mt Genoms in zwei Subgenomen auf dem Stammast aller Monogononta, dem Stammast der Ploimida oder erst

innerhalb der Ploimida entstanden ist. Offen bleibt weiterhin die Frage nach der Architektur des mt Genoms der Seisonidea. Sowohl die Organisation und Genreihenfolge eines solchen mt Genoms als auch die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen könnten zur Überprüfung der Pararotatoria-Hypothese (Kapitel 2.3) herangezogen werden.

3.3.2 Die Frage nach den Gnathifera und der Platyzoa-Hypothese

Die Monophylie der Gnathifera (Syndermata + Gnathostomulida; siehe Kapitel 1.2.4) konnte in der vorliegenden Arbeit weitgehend bestätigt werden. Sowohl die Analysen breiter transkriptomischer Datensätze (Kapitel 2.3 und 2.5) als auch die Analyse von RP-Daten (Kapitel 2.6.1) zeigten diese Gruppierung. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die Gnathostomulida sowie einige der Syndermata-Taxa zu den Taxa mit den höchsten LB-Scores (= lange Äste) im größten Datensatz aus Kapitel 2.5 zählten und daher aus den meisten weiteren Datensätzen entfernt wurden. Zwar wurden bei einer Re-Inklusion der Gnathostomulida in verschiedene modifizierte Datensätze meist monophyletische Gnathifera rekonstruiert, jedoch lagen die Unterstützungswerte für diese Taxon-Gruppe nur in der Hälfte dieser Fälle über 70% (siehe Tabelle 3 in Kapitel 2.5). Auch die Unterstützungswerte in den transkriptomischen Analysen aus Kapitel 2.3 waren nicht optimal. Während bei Rekonstruktionen mit den größeren Datensätzen mintax4 und mintax8 (mit oder ohne RPs) noch Unterstützungswerte zwischen 54 und 100 % für die Gnathifera erreicht wurden, konnte bei Einschränkung des Datensatzes auf die Kernfrage der internen Syndermata-Phylogenie (MPS-Datensätze) sowie bei starker Verkürzung der Äste durch Exklusion von „Singletons“ und „Dingletons“ kein Schwestergruppenverhältnis von Syndermata und Gnathostomulida rekonstruiert werden. Trotz der frappierenden ultrastrukturellen Ähnlichkeiten der „Kiefer“ in den Taxa Syndermata und Gnathostomulida bleibt die Frage nach einer Monophylie der Gnathifera also weiterhin offen. Die Monophylie der Gruppe in molekular-phylogenetischen Studien könnte Long-branch attraction-Artefakten geschuldet sein, während die putativen morphologischen Synapomorphien in Wahrheit Konvergenzen darstellen könnten. Hinweise auf paraphyletische Gnathifera fanden sich bereits in früheren molekular-phylogenetischen Studien (Dunn et al., 2008; Hejnol et al., 2009). Ob die Gnathifera eine valide taxonomische Gruppierung darstellen, werden also zukünftige Arbeiten zeigen müssen. Dazu sollte die Datenverfügbarkeit innerhalb der Gnathostomulida stark erhöht werden. Ebenfalls kann die Inklusion transkriptomischer Daten der möglicherweise ebenfalls den Gnathifera zugehörigen Micrognathozoa weitere Aufschlüsse liefern.

Die von Cavalier-Smith postulierte Gruppierung Platyzoa (Platyhelminthes + Gastrotricha + Syndermata/Gnathifera) konnte aufgrund mangelnder Datenverfügbarkeit für die kritischen Taxa bisher von nur wenigen molekular-phylogenetischen Studien untersucht werden. Im Rahmen des DMP-Programms der DFG wurden neue transkriptomische Daten von insgesamt 17 putativen Platyzoa-Taxa sequenziert und analysiert (TABELLE 7). Die daraus entstandenen Analysen sind bezüglich des Taxon-Samplings innerhalb der Platyzoa umfassender und

ausgeglichener als alle vorherigen molekular-phylogenetischen Analysen. Die in Kapitel 2.3 beschriebenen Analysen waren jedoch auf phylogenetische Fragestellungen innerhalb der Syndermata ausgerichtet und das gewählte Taxon-Sampling war zur Adressierung der Platyzoa-Frage ungeeignet. Die in Kapitel 2.5 beschriebenen Analysen hingegen waren sowohl bezüglich der Expansion der verfügbaren Taxa innerhalb der relevanten Taxon-Gruppen (Syndermata, Gnathostomulida, Gastrotricha und Platyhelminthes) als auch durch die Wahl der weiteren Taxa im Datensatz auf die Klärung der Platyzoa-Frage ausgerichtet. Die Auswirkungen potentieller inhärenter Artefakte auf den Status der Platyzoa-Taxa wurden in diesen Analysen mit verschiedenen methodischen Ansätzen und Datensatzmodifikationen untersucht, um zu einer verlässlichen Aussage kommen zu können. Die Ergebnisse legen nahe, dass Platyzoa eine artifizielle, nicht monophyletische Gruppierung darstellt, hervorgerufen unter anderem durch long-branch attraction-Artefakte. Lediglich der unmodifizierte (und gleichzeitig größte) Datensatz d01 zeigte monophyletische Platyzoa. Verschiedene Modifikationen des Datensatzes, die verfälschende Signale in den Daten beseitigen sollten, führten alle zu einer paraphyletischen Gruppierung der Platyzoa-Taxa. Dies betrifft sowohl die Entfernung von Taxa mit hohen LB-Werten (= lange Äste als auch die Eingrenzung des Datensatzes auf gut abgedeckte Gene oder solche mit geringer Heterogenität in der Basenzusammensetzung. In diesen Bäumen bildete eine Gruppierung aus Platyhelminthes und Gastrotricha (Rouphozoa) die Schwestergruppe zu den Lophotrochozoa, während die Gnathifera Schwestergruppe zu allen vorgenannten Spiralia-Taxa waren.

TABELLE 7 – Im Rahmen des DMP-Programms hergestellte transkriptomische Daten von „Platyzoa“-Taxa

Ein Stern markiert Taxa, für die bereits transkriptomische Daten in den Datenbanken verfügbar waren (= Erweiterung der Datenverfügbarkeit). Ein Plus markiert Taxa, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation neu sequenziert und/oder analysiert wurden.

Taxon	Taxon-Gruppe	Sequenziert von	Erstmals untersucht in
<i>Adineta vaga</i> ⁺	Bdelloidea	David Mark Welch	Wey-Fabrizius et al. 2014
<i>Brachionus manjavacas</i> ⁺	Monogononta	David Mark Welch	Wey-Fabrizius et al. 2014
<i>Brachionus plicatilis</i> [*]	Monogononta	AG Hankeln (DMP)	Witek et al. 2008
<i>Dactylopodola baltica</i>	Gastrotricha	AG Struck (DMP)	Struck et al. 2014
<i>Echinorhynchus truttae</i>	Palaeacanthocephala	AG Hankeln (DMP)	Witek et al. 2008
<i>Gnathostomula paradoxa</i>	Gnathostomulida	AG Struck (DMP)	Struck et al. 2014
<i>Lecane inermis</i> ⁺	Monogononta	AG Hankeln (DMP)	Struck et al. 2014
<i>Lepidodermella squamata</i>	Gastrotricha	AG Struck (DMP)	Struck et al. 2014
<i>Macracanthorhynchus hirudinaceus</i> ⁺	Archiacanthocephala	AG Hankeln (DMP)	Struck et al. 2014
<i>Macrodasy spec.</i>	Gastrotricha	AG Struck (DMP)	Struck et al. 2014
<i>Megadasy spec.</i>	Gastrotricha	AG Struck (DMP)	Struck et al. 2014
<i>Nematoplana coelognoporoides</i>	Platyhelminthes	AG Struck (DMP)	Struck et al. 2014
<i>Paratenuisentis ambiguus</i> ⁺	Eoacanthocephala	AG Hankeln (DMP)	Wey-Fabrizius et al. 2014
<i>Pomphorhynchus laevis</i>	Palaeacanthocephala	AG Hankeln (DMP)	Witek et al. 2008
<i>Rotaria rotatoria</i> ⁺	Bdelloidea	AG Hankeln (DMP)	Struck et al. 2014
<i>Seison spec.</i> ⁺	Seisonidea	AG Hankeln (DMP)	Wey-Fabrizius et al. 2014
<i>Stylochoplanea maculata</i>	Platyhelminthes	AG Struck (DMP)	Struck et al. 2014

Auch die Ergebnisse der Untersuchung der Einzelgen-Alignments aus den in Kapitel 2.5 beschriebenen Datensätzen auf „rare genomic changes“ (RGCs) sprechen nicht für monophyletische Platyzoa. Zwar konnten in den Alignments verschiedene Aminosäure-Indels der Länge 2 - 4 gefunden werden, die spezifisch für Taxon-Gruppen wie Acanthocephala, Bdelloidea oder Neodermata (parasitische Platyhelminthes) waren, jedoch konnte kein einziger RGC ausgemacht werden, der eine Monophylie der Platyzoa-Taxa unterstützt hätte (Ergebnisse im elektronischen Anhang).

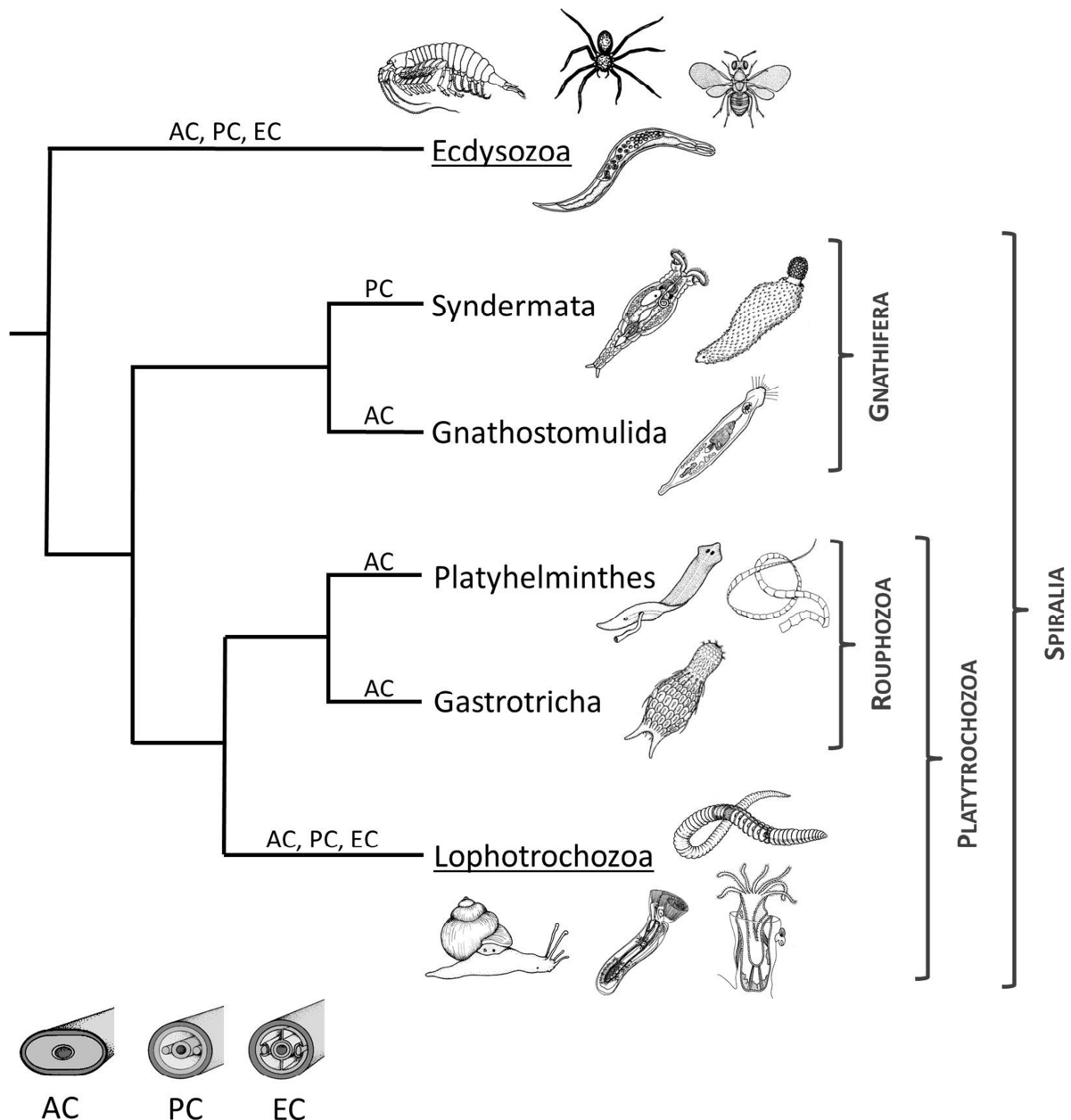


ABBILDUNG 20 – Phylogenie der Protostomia

Phylogenie der Protostomia basierend auf den Ergebnissen der phylogenomischen Analysen von Struck et al. (Kapitel 2.5). Taxa, in denen Segmentierung vorkommt, sind unterstrichen. AC = acoelomatisch, PC = pseudocoelomatisch, EC = eucoelomatisch.

Die beschriebenen sorgsamsten Analysen verschiedener möglicher Einflüsse auf die Topologie und deren Ergebnisse mahnen zur Vorsicht bei großen Datensätzen (siehe Kapitel 3.2.2). Die ermittelte Topologie erlaubt weiterhin die Formulierung von Hypothesen zur Evolution von Coelom-Organisation und Segmentierung innerhalb der Metazoa. Diese beiden morphologischen Merkmale waren ehemals sehr entscheidende Faktoren bei der Zuordnung von Taxa (siehe Kapitel 1.1.3). Vor dem Hintergrund molekular-phylogenetischer Arbeiten und der damit einhergehenden massiven Umstrukturierung des Stammbaumes der Metazoa (siehe ABBILDUNG 2) musste die Evolution dieser Faktoren neu betrachtet werden: beide mussten entweder mehrfach konvergent entstanden sein oder gingen sekundär verloren. Auf Basis der in unseren Analysen errechneten Topologie der Spiralia (ABBILDUNG 20) kann für beide Merkmale eher von einer konvergenten Entwicklung als von multiplen sekundären Verlustereignissen ausgegangen werden. Sowohl echte Coelomräume als auch Segmentierung finden sich innerhalb der Spiralia nur in der Gruppe der Lophotrochozoa, zudem sind sie in verschiedenen Ecdysozoa vorhanden. Wären diese Merkmale während der Evolution nur einmal entstanden und somit bereits auf dem Stammast der Spiralia vorhanden gewesen, so hätten sie mindestens zweimal unabhängig voneinander verloren gehen müssen: auf dem Stammast der Gnathifera und auf dem Stammast der Rouphozoa. Neben der geringen Wahrscheinlichkeit für das geschilderte Szenario wird die Hypothese einer konvergenten Entstehung beider Merkmale zusätzlich durch Unterschiede in der Coelomogenese (Koch et al., 2014) sowie die meist unterschiedliche Herkunft der von Segmentierung betroffenen Gewebe in Spiralia-Taxa auf der einen und Ecdysozoa-Taxa auf der anderen Seite unterstützt (detaillierte Diskussion in Kapitel 2.5).

4. ZUSAMMENFASSUNG

Zentrales Thema der Arbeit war die Aufklärung von Verwandtschaftsverhältnissen im „Tree of Life“ der vielzelligen Tiere (Metazoa) unter Einsatz großer DNA-Sequenzdatensätze und phylogenomischer Methoden. Zur Untersuchung der internen Phylogenie der Syndermata (= meist freilebende Rädertiere („Rotifera“) + endoparasitische Kratzwürmer (Acanthocephala)) sowie ihrer Position im Metazoen-Stammbaum wurden insgesamt sieben neue mitochondriale (mt) Genome sowie neue Transkriptom-Sequenzdaten von sieben verschiedenen Syndermata-Spezies generiert und/oder analysiert. Die Stammbaumrekonstruktionen auf Grundlage dieser sowie orthologer Sequenzen anderer Spezies in Form von phylogenomischen Datensätzen mit bis zu 82.000 Aminosäurepositionen ergaben folgende Aussagen zur Evolution:

- (i) Innerhalb der Acanthocephala bilden monophyletische Palaeacanthocephala das Schwestertaxon zu den Eoacanthocephala. Die Archiacanthocephala sind Schwestertaxon zu allen vorgenannten.
- (ii) Innerhalb der Syndermata bilden die epizoisch lebenden Seisonidea das Schwestertaxon zu den endoparasitischen Acanthocephala (= Pararotatoria), die Bdelloidea sind das Schwestertaxon zu den Pararotatoria (= Hemirotifera) und die Monogononta das Schwestertaxon zu den Hemirotifera. Die klassischen Eurotatoria (= Bdelloidea + Monogononta) sind demnach paraphyletisch.
- (iii) Innerhalb der Metazoa bilden die Syndermata gemeinsam mit den Gnathostomulida die Gnathifera. Diese sind die Schwestergruppe zu allen anderen Spiralia-Taxa, welche sich in Rousphozoa (= Platyhelminthes + Gastrotricha) sowie die Lophotrochozoa aufspalten. Die Platyzoa (= Gnathifera + Platyhelminthes + Gastrotricha) sind demnach paraphyletisch.

Diese phylogenetischen Hypothesen wurden im Hinblick auf ihre Implikationen für die Evolution morphologischer und ökologischer Merkmale interpretiert. Demnach sind während der Evolution dieser Tiergruppen mehrfach sekundäre Verlustereignisse von komplexen morphologischen Merkmalen aufgetreten (laterale sensorische Organe innerhalb der Acanthocephala und das Räderorgan (Corona) innerhalb der Syndermata), was die Verwendung dieser Merkmale im Sinne einer klassisch-morphologischen Phylogenetik kritisch erscheinen lässt. Der Endoparasitismus der Acanthocephala hat sich wahrscheinlich über ein epizoisches Zwischenstadium, wie man es heute noch bei den Seisonidea findet, entwickelt. Der letzte gemeinsame Vorfahre der Spiralia war vermutlich klein und unsegmentiert und besaß keine echte Leibeshöhle (Coelom). Demnach hätten sich Segmentierung und Coelome innerhalb der Metazoa mehrfach unabhängig voneinander (konvergent) entwickelt.

Die Arbeit beinhaltete folgende weitere, zum Teil methodische Aspekte: (i) die Analyse der Architektur der mt Genome der Monogononta bestätigte die aberrante Organisation in zwei Subgenomen für die Brachionidae. (ii) Eine Prüfung der Tauglichkeit ribosomaler Proteine für molekular-phylogenetische Arbeiten ergab das Vorhandensein widersprüchlicher phylogenetischer Signale in diesen speziellen Proteinsequenzen. (iii) Es konnte nachgewiesen werden, dass systematische Fehler wie „long-branch attraction“ bei der Positionierung der Syndermata im Stammbaum der Metazoa eine große Rolle spielen und adressiert werden müssen.

SUMMARY

Main subject of the thesis was the clarification of relationships in the “Tree of Life” of multicellular animals (Metazoa) by using large DNA-sequence datasets and phylogenomic methods. To investigate the internal phylogeny of Syndermata (= mostly free-living wheel animals (“Rotifera”) + endoparasitic thorny-headed worms (Acanthocephala)) and their position in the metazoan tree, a total of seven new mitochondrial (mt) genomes and new transcriptomic data of seven different Syndermata species were generated and/or analyzed. Tree reconstructions were based on these as well as orthologous sequences of other species in the form of phylogenomic datasets comprising up to 82,000 amino acid positions and resulted in the following statements concerning evolution:

- (i) Within Acanthocephala, monophyletic Palaeacanthocephala are sister taxon to Eoacanthocephala. Archiacanthocephala are sister taxon to all former mentioned taxa.
- (ii) Within Syndermata, epizoid Seisonidea are sister taxon to endoparasitic Acanthocephala (= Pararotatoria), Bdelloidea are sister taxon to Pararotatoria (= Hemirotifera) and Monogononta are sister taxon to Hemirotifera. Hence, classical Eurotatoria (= Bdelloidea + Monogononta) are paraphyletic.
- (iii) Within Metazoa, Syndermata and Gnathostomulida constitute Gnathifera. This taxon is sister taxon to all other taxa of the Spiralia, which split up into Rousphozoa (= Platyhelminthes + Gastrotricha) and Lophotrochozoa. Hence, Platyzoa (= Gnathifera + Platyhelminthes + Gastrotricha) are paraphyletic.

These phylogenetic hypotheses were interpreted concerning their implications for the evolution of morphological and ecological features. Accordingly, several secondary loss events of complex morphological traits (lateral sensory organs within Acanthocephala and the wheel organ (corona) within Syndermata) occurred during the evolution of these animal groups. Therefore the usability of these traits in terms of classic morphological phylogenetic analyses appears to be critical. Acanthocephalan endoparasitism probably evolved via an epizoid intermediate stage, a lifestyle that can still be observed today in Seisonidea. The last common ancestor of Spiralia presumably was small and unsegmented and was lacking a true body cavity (coelom). Thus, segmentation and coeloms evolved several times independently (convergent) within Metazoa.

The thesis furthermore included the following, partly methodological aspects: (i) analysis of the architecture of monogonont mt genomes confirmed the aberrant organization in two sub-genomes for Brachionidae. (ii) The suitability of ribosomal proteins for molecular-phylogenetic analyses was tested and the existence of conflicting phylogenetic signals in these special protein sequences was observed. (iii) It could be demonstrated that systematic errors like “long-branch attraction” play a major role in placing Syndermata in the metazoan tree and have to be addressed.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Abascal, F., Zardoya, R. und Posada, D., 2005. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21, 2104-2105.
- Abele, L., Kim, W. und Felgenhauer, B., 1989. Molecular evidence for inclusion of the phylum Pentastomida in the Crustacea. *Molecular Biology and Evolution* 6, 685.
- Adamidi, C., Wang, Y., Gruen, D., Mastrobuoni, G., You, X., Tolle, D., Dodt, M., Mackowiak, S.D., Gogol-Doering, A., Oenal, P., Rybak, A., Ross, E., Alvarado, A.S., Kempa, S., Dieterich, C., Rajewsky, N. und Chen, W., 2011. *De novo* assembly and validation of planaria transcriptome by massive parallel sequencing and shotgun proteomics. *Genome Research* 21, 1193-1200.
- Ahlrichs, W.H., 1995. Ultrastruktur und Phylogenie von *Seison nebaliae* (Grube 1859) und *Seison annulatus* (Claus 1876) Hypothesen zu phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen innerhalb der Bilateria. Cuvillier Verlag, Göttingen, 320 Seiten.
- Ahlrichs, W.H., 1997. Epidermal ultrastructure of *Seison nebaliae* and *Seison annulatus*, and a comparison of epidermal structures within the Gnathifera. *Zoomorphology* 117, 41-48.
- Ahlrichs, W.H., 1998. Spermatogenesis and ultrastructure of the spermatozoa of *Seison nebaliae* (Syndermata). *Zoomorphology* 118, 255-261.
- Aleshin, V.V., Konstantinova, A.V., Mikhailov, K.V., Nikitin, M.A. und Petrov, N.B., 2007. Do we need many genes for phylogenetic inference? *Biochemistry (Moscow)* 72, 1313-1323.
- Aloo, P.A. und Dezfuli, B.S., 1997. Occurrence of cystacanths of *Polyacanthorhynchus kenyensis* larvae (Acanthocephala) in four teleostean fishes from a tropical lake, Lake Naivasha, Kenya. *Folia Parasitologica* 44, 233-238.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.
- Amemiya, C.T., Alföldi, J., Lee, A.P., Fan, S., Philippe, H., MacCallum, I., Braasch, I., Manousaki, T., Schneider, I., Rohner, N., Organ, C., Chalopin, D., Smith, J.J., Robinson, M., Dorrington, R.A., Gerdol, M., Aken, B., Biscotti, M.A., Barucca, M., Baurain, D., Berlin, A.M., Blatch, G.L., Buonocore, F., Burmester, T., Campbell, M.S., Canapa, A., Cannon, J.P., Christoffels, A., De Moro, G., Edkins, A.L., Fan, L., Fausto, A.M., Feiner, N., Forconi, M., Gamielien, J., Gnerre, S., Gnirke, A., Goldstone, J.V., Haerty, W., Hahn, M.E., Hesse, U., Hoffmann, S., Johnson, J., Karchner, S.I., Kuraku, S., Lara, M., Levin, J.Z., Litman, G.W., Mauceli, E., Miyake, T., Mueller, M.G., Nelson, D.R., Nitsche, A., Olmo, E., Ota, T., Pallavicini, A., Panji, S., Picone, B., Ponting, C.P., Prohaska, S.J., Przybylski, D., Saha, N.R., Ravi, V., Ribeiro, F.J., Sauka-Spengler, T., Scapigliati, G., Searle, S.M.J., Sharpe, T., Simakov, O., Stadler, P.F., Stegeman, J.J., Sumiyama, K., Tabbaa, D., Tafer, H., Turner-Maier, J., van Heusden, P., White, S., Williams, L., Yandell, M., Brinkmann, H., Volff, J.-N., Tabin, C.J., Shubin, N., Schartl, M., Jaffe, D.B., Postlethwait, J.H., Venkatesh, B., Di Palma, F., Lander, E.S., Meyer, A. und Lindblad-Toh, K., 2013. The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. *Nature* 496, 311-316.

- Amin, O.M., 1987. Key to the families and subfamilies of Acanthocephala, with the erection of a new class (Polyacanthocephala) and a new order (Polyacanthorhynchida). *Journal of Parasitology* 73, 1216-1219.
- Amin, O.M., 2013. Classification of the Acanthocephala. *Folia Parasitologica* 60, 273-305.
- Amin, O.M. und Dezfuli, B.S., 1995. Taxonomic notes on *Polyacanthorhynchus kenyensis* (Acanthocephala: Polyacanthorhynchidae) from Lake Naivasha, Kenya. *Journal of Parasitology* 81, 76-79.
- Arndt, H., 1993. Rotifers as predators on components of the microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates) - a review. *Hydrobiologia* 255-256, 231-246.
- Asaolu, S.O., 1980. Morphology of the reproductive system of female *Moniliformis dubius* (Acanthocephala). *Parasitology* 81, 433-446.
- Avery, O.T., MacLeod, C.M. und McCarty, M., 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *Journal of Experimental Medicine* 79, 137-158.
- Baele, G. und Lemey, P., 2013. Bayesian evolutionary model testing in the phylogenomics era: matching model complexity with computational efficiency. *Bioinformatics* 29, 1970-1979.
- Baguñà, J., Martinez, P., Paps, J. und Riutort, M., 2008. Back in time: a new systematic proposal for the Bilateria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363, 1481-1491.
- Bell, J., 2008. A simple way to treat PCR products prior to sequencing using ExoSAP-IT®. *BioTechniques* 44, 834.
- Berenji, F., Fata, A. und Hosseinienejad, Z., 2007. A case of *Moniliformis moniliformis* (Acanthocephala) infection in Iran. *Korean Journal of Parasitology* 45, 145-148.
- Bergsten, J., 2005. A review of long-branch attraction. *Cladistics* 21, 163-193.
- Bernt, M., Bleidorn, C., Braband, A., Dambach, J., Donath, A., Fritzsche, G., Golombek, A., Hadrys, H., Jühling, F., Meusemann, K., Middendorf, M., Misof, B., Perseke, M., Podsiadlowski, L., von Reumont, B., Schierwater, B., Schlegel, M., Schrödl, M., Simon, S., Stadler, P.F., Stöger, I. und Struck, T.H., 2013a. A comprehensive analysis of bilaterian mitochondrial genomes and phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69, 352-364.
- Bernt, M., Donath, A., Jühling, F., Externbrink, F., Florentz, C., Fritzsche, G., Pütz, J., Middendorf, M. und Stadler, P.F., 2013b. MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Epub 2012-09-06, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2012.08.023>.
- Berriman, M., Haas, B.J., LoVerde, P.T., Wilson, R.A., Dillon, G.P., Cerqueira, G.C., Mashiyama, S.T., Al-Lazikani, B., Andrade, L.F., Ashton, P.D., Aslett, M.A., Bartholomeu, D.C., Blandin, G., Caffrey, C.R., Coghlan, A., Coulson, R., Day, T.A., Delcher, A., DeMarco, R.,

Djikeng, A., Eyre, T., Gamble, J.A., Ghedin, E., Gu, Y., Hertz-Fowler, C., Hirai, H., Hirai, Y., Houston, R., Ivens, A., Johnston, D.A., Lacerda, D., Macedo, C.D., McVeigh, P., Ning, Z., Oliveira, G., Overington, J.P., Parkhill, J., Perte, M., Pierce, R.J., Protasio, A.V., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Sajid, M., Salzberg, S.L., Stanke, M., Tivey, A.R., White, O., Williams, D.L., Wortman, J., Wu, W., Zamanian, M., Zerlotini, A., Fraser-Liggett, C.M., Barrell, B.G. und El-Sayed, N.M., 2009. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 460, 352-358.

Bininda-Emonds, O., 2011. Inferring the Tree of Life: chopping a phylogenomic problem down to size? *BMC Biology* 9, 59.

Bininda-Emonds, O.R.P., 2004. The evolution of supertrees. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 315-322.

Blaxter, M.L., 2003. Nematoda: genes, genomes and the evolution of parasitism. In: Baker, J.R., Muller, R., Rollinson, D. (Eds.), *The evolution of parasitism - a phylogenetic perspective*. Elsevier Ltd., Essex, Cornwall, Seiten 102-197.

Bleidorn, C., Podsiadlowski, L., Zhong, M., Eeckhaut, I., Hartmann, S., Halanych, K. und Tiedemann, R., 2009. On the phylogenetic position of Myzostomida: can 77 genes get it wrong? *BMC Evolutionary Biology* 9, 150.

Boch, J. und Supperer, R., 2006. *Veterinärmedizinische Parasitologie*. Parey in MVS Medizinverlage Stuttgart, Stuttgart, 785 Seiten.

Bourlat, S., Rota-Stabelli, O., Lanfear, R. und Telford, M., 2009. The mitochondrial genome structure of *Xenoturbella bocki* (phylum Xenoturbellida) is ancestral within the deuterostomes. *BMC Evolutionary Biology* 9, 107.

Bradley, B.J., 2008. Reconstructing phylogenies and phenotypes: a molecular view of human evolution. *Journal of Anatomy* 212, 337-353.

Brinkmann, H., Venkatesh, B., Brenner, S. und Meyer, A., 2004. Nuclear protein-coding genes support lungfish and not the coelacanth as the closest living relatives of land vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 4900-4905.

Brown, W.M., George, M. und Wilson, A.C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 1967-1971.

Bush, A.O., Fernández, J.C., Esch, G.W. und Seed, J.R., 2001. *Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites*. Cambridge University Press, Cambridge, UK; New York, NY, 580 Seiten.

Caprioli, M., Santo, N. und Ricci, C., 2002. Enhanced stress resistance of dormant bdelloids (Rotifera). *Journal of gravitational physiology* 9, 235-236.

Carapelli, A., Lio, P., Nardi, F., van der Wath, E. und Frati, F., 2007. Phylogenetic analysis of mitochondrial protein coding genes confirms the reciprocal paraphyly of Hexapoda and Crustacea. *BMC Evolutionary Biology* 7, S8.

- Carapelli, A., Nardi, F., Dallai, R., Boore, J.L., Liò, P. und Frati, F., 2005. Relationships between hexapods and crustaceans based on four mitochondrial genes. *Crustacean Issues* 16, 295.
- Castenholz, R.W., 1969. Thermophilic blue-green algae and the thermal environment. *Bacteriological Reviews* 33, 476-504.
- Castresana, J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17, 540-552.
- Cavalier-Smith, C., 2002. Origins of the machinery of recombination and sex. *Heredity* 88, 125-141.
- Cavalier-Smith, T., 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews* 73, 203-266.
- Cézilly, F., Thomas, F., Médoc, V. und Perrot-Minnot, M.-J., 2010. Host-manipulation by parasites with complex life cycles: adaptive or not? *Trends in Parasitology* 26, 311-317.
- Chan, C.X. und Ragan, M., 2013. Next-generation phylogenomics. *Biology Direct* 8, 3.
- Chesunov, A.V., 2002. A case of tongueworms (Pentastomida): a specific problem in context of the modern phylogenetics. *Zhurnal obshchei biologii* 63, 209-226.
- Chevreur, B., Wetter, T. und Suhai, S., 1999. Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information. *German Conference on Bioinformatics GCB '99*, pp. 45-56.
- Compeau, P.E.C., Pevzner, P.A. und Tesler, G., 2011. How to apply de Bruijn graphs to genome assembly. *Nature Biotechnology* 29, 987-991.
- Cornet, S., Franceschi, N., Bauer, A., Rigaud, T. und Moret, Y., 2009. Immune depression induced by acanthocephalan parasites in their intermediate crustacean host: Consequences for the risk of super-infection and links with host behavioural manipulation. *International Journal for Parasitology* 39, 221-229.
- Crompton, D.W.T., 1985. Reproduction. In: Crompton, D.W.T., Nickol, B.B. (Eds.), *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, Cambridge, Seiten 213-272.
- Crompton, D.W.T. und Nickol, B.B., 1985. *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, Cambridge; New York, 519 Seiten.
- Cuore, J.P. und Kocher, T.D., 1999. Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes. *Trends in Ecology & Evolution* 14, 394-398.
- Darwin, C., 1859. *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. John Murray, 502 Seiten.
- de Beauchamp, P.M., 1907. Morphologie et variations de l'appareil rotateur dans la série des Rotifères. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale* 6, 1-29.

- de Meeûs, T., Prugnolle, F. und Agnew, P., 2007. Asexual reproduction: Genetics and evolutionary aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64, 1355-1372.
- de Mendoza, A. und Ruiz-Trillo, I., 2011. The mysterious evolutionary origin for the GNE gene and the root of bilateria. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2987-2991.
- de Queiroz, A. und Gatesy, J., 2007. The supermatrix approach to systematics. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 34-41.
- De Smet, W.H., 2002. A new record of *Limnognathia maerski* Kristensen & Funch, 2000 (Micrognathozoa) from the subantarctic Crozet Islands, with redescription of the trophi. *Journal of Zoology* 258, 381-393.
- Delsuc, F., Brinkmann, H. und Philippe, H., 2005. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nature Reviews Genetics* 6, 361-375.
- Dezfuli, B.S., Simoni, E., Duclos, L. und Rossetti, E., 2008. Crustacean-acanthocephalan interaction and host cell-mediated immunity: parasite encapsulation and melanization. *Folia Parasitologica (Praha)* 55, 53-59.
- Dimmic, M.W., Rest, J.S., Mindell, D.P. und Goldstein, R.A., 2002. rtREV: an amino acid substitution matrix for inference of retrovirus and reverse transcriptase phylogeny. *Journal of Molecular Evolution* 55, 65-73.
- Dobell, C., 1958. Antony van Leeuwenhoek and his "Little animals"; being some account of the father of protozoology & bacteriology and his multifarious discoveries in these disciplines. Russell & Russell, New York, 435 Seiten.
- Dohrmann, M. und Wörheide, G., 2013. Novel scenarios of early animal evolution - is it time to rewrite textbooks? *Integrative and Comparative Biology*, Epub 2013-03-28, <http://dx.doi.org/10.1093/icb/ict008>.
- Donner, J., 1965. Ordnung Bdelloidea (Rotatoria, Rädertiere). In: d'Aguilar, J., Beier, M., Franz, H., Raw, F. (Eds.), *Bestimmungsbücher zur Bodenfauna Europas*. Akademie-Verlag, Berlin, 297 Seiten.
- Dunagan, T.T. und Miller, D.M., 1986. A review of protonephridial excretory systems in Acanthocephala. *Journal of Parasitology* 72, 621-632.
- Dunagan, T.T. und Schmitt, S., 1995. Structural evidence for sensory function in the apical organ of *Macracanthorhynchus hirudinaceus* (Acanthocephala). *Journal of the Helminthological Society of Washington* 62, 35-38.
- Dunn, C.W., Hejnal, A., Matus, D.Q., Pang, K., Browne, W.E., Smith, S.A., Seaver, E., Rouse, G.W., Obst, M., Edgecombe, G.D., Sørensen, M.V., Haddock, S.H.D., Schmidt-Rhaesa, A., Okusu, A., Kristensen, R.M., Wheeler, W.C., Martindale, M.Q. und Giribet, G., 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452, 745-749.
- Ebersberger, I., de Matos Simoes, R., Kupczok, A., Gube, M., Kothe, E., Voigt, K. und von Haeseler, A., 2012. A consistent phylogenetic backbone for the fungi. *Molecular Biology and Evolution* 29, 1319-1334.

Edgecombe, G., Giribet, G., Dunn, C., Hejnol, A., Kristensen, R., Neves, R., Rouse, G., Worsaae, K. und Sørensen, M., 2011. Higher-level metazoan relationships: recent progress and remaining questions. *Organisms Diversity & Evolution* 11, 151-172.

Fedurek, P. und Slocombe, K.E., 2011. Primate vocal communication: a useful tool for understanding human speech and language evolution? *Human Biology* 83, 153-173.

Felsenstein, J., 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Biology* 27, 401-410.

Ferraguti, M. und Melone, G., 1999. Spermiogenesis in *Seison nebaliae* (Rotifera, Seisonidea): further evidence of a rotifer-acanthocephalan relationship. *Tissue & Cell* 31, 428-440.

Flot, J.-F., Hespeels, B., Li, X., Noel, B., Arkhipova, I., Danchin, E.G.J., Hejnol, A., Henrissat, B., Koszul, R., Aury, J.-M., Barbe, V., Barthelemy, R.-M., Bast, J., Bazykin, G.A., Chabrol, O., Couloux, A., Da Rocha, M., Da Silva, C., Gladyshev, E., Gouret, P., Hallatschek, O., Hecox-Lea, B., Labadie, K., Lejeune, B., Piskurek, O., Poulain, J., Rodriguez, F., Ryan, J.F., Vakhrusheva, O.A., Wajnberg, E., Wirth, B., Yushenova, I., Kellis, M., Kondrashov, A.S., Mark Welch, D.B., Pontarotti, P., Weissenbach, J., Wincker, P., Jaillon, O. und Van Doninck, K., 2013. Genomic evidence for ameiotic evolution in the bdelloid rotifer *Adineta vaga*. *Nature* 500, 453-457.

Fontaneto, D., De Smet, W.H. und Ricci, C., 2006. Rotifers in saltwater environments, re-evaluation of an inconspicuous taxon. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 86, 623-656.

Fontaneto, D., Giordani, I., Melone, G. und Serra, M., 2007. Disentangling the morphological stasis in two rotifer species of the *Brachionus plicatilis* species complex. *Hydrobiologia* 583, 297-307.

Foster, P.G. und Hickey, D.A., 1999. Compositional bias may affect both DNA-based and protein-based phylogenetic reconstructions. *Journal of Molecular Evolution* 48, 284-290.

García-Varela, M., Cummings, M.P., de Leon, G.P.P., Gardner, S.L. und Laclette, J.P., 2002. Phylogenetic analysis based on 18S ribosomal RNA gene sequences supports the existence of class Polyacanthocephala (Acanthocephala). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23, 288-292.

García-Varela, M. und Nadler, S.A., 2006. Phylogenetic relationships among Syndermata inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40, 61-72.

García-Varela, M., Pérez-Ponce de León, G., de la Torre, P., Cummings, M.P., Sarma, S.S. und Laclette, J.P., 2000. Phylogenetic relationships of Acanthocephala based on analysis of 18S ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Molecular Evolution* 50, 532-540.

Garey, J.R., Near, T.J., Nonnemacher, M.R. und Nadler, S.A., 1996. Molecular evidence for Acanthocephala as a subtaxon of Rotifera. *Journal of Molecular Evolution* 43, 287-292.

- Garey, J.R., Schmidt-Rhaesa, A., Near, T.J. und Nadler, S.A., 1998. The evolutionary relationships of rotifers and acanthocephalans. *Hydrobiologia* 387/388, 83-91.
- Giribet, G., Distel, D.L., Polz, M., Sterrer, W. und Wheeler, W.C., 2000. Triploblastic relationships with emphasis on the acoelomates and the position of Gnathostomulida, Cyclophora, Plathelminthes, and Chaetognatha: a combined approach of 18S rDNA sequences and morphology. *Systematic Biology* 49, 539-562.
- Giribet, G. und Edgecombe, G.D., 2012. Reevaluating the arthropod tree of life. *Annual Review of Entomology* 57, 167-186.
- Giribet, G. und Ribera, C., 2000. A Review of arthropod phylogeny: new data based on ribosomal DNA sequences and direct character optimization. *Cladistics* 16, 204-231.
- Giribet, G., Sørensen, M.V., Funch, P., Kristensen, R.M. und Sterrer, W., 2004. Investigations into the phylogenetic position of Micrognathozoa using four molecular loci. *Cladistics* 20, 1-13.
- Gladyshev, E. und Meselson, M., 2008. Extreme resistance of bdelloid rotifers to ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 5139-5144.
- Gladyshev, E.A. und Arkhipova, I.R., 2010. Genome structure of bdelloid rotifers: shaped by asexuality or desiccation? *Journal of Heredity* 101, S85-S93.
- Gladyshev, E.A., Meselson, M. und Arkhipova, I.R., 2008. Massive horizontal gene transfer in bdelloid rotifers. *Science* 320, 1210-1213.
- Gogarten, J.P., Kibak, H., Dittrich, P., Taiz, L., Bowman, E.J., Bowman, B.J., Manolson, M.F., Poole, R.J., Date, T., Oshima, T. und et al., 1989. Evolution of the vacuolar H⁺-ATPase: implications for the origin of eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 6661-6665.
- Góngora-Castillo, E. und Buell, C.R., 2013. Bioinformatics challenges in de novo transcriptome assembly using short read sequences in the absence of a reference genome sequence. *Natural Product Reports* 30, 490-500.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. und Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59, 307-321.
- Haffner, K.v., 1950. Organisation und systematische Stellung der Acanthocephalen. *Zoologischer Anzeiger* 145:, 243–274.
- Halanych, K.M., 2004. The new view of animal phylogeny. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35, 229-256.
- Halanych, K.M., Bacheller, J.D., Aguinaldo, A.M., Liva, S.M., Hillis, D.M. und Lake, J.A., 1995. Evidence from 18S ribosomal DNA that the lophophorates are protostome animals. *Science* 267, 1641-1643.

- Hausdorf, B., Helmkampf, M., Meyer, A., Witek, A., Herlyn, H., Bruchhaus, I., Hankeln, T., Struck, T.H. und Lieb, B., 2007. Spiralian phylogenomics supports the resurrection of Bryozoa comprising Ectoprocta and Entoprocta. *Molecular Biology and Evolution* 24, 2723-2729.
- Hausdorf, B., Helmkampf, M., Nesnidal, M.P. und Bruchhaus, I., 2010. Phylogenetic relationships within the lophophorate lineages (Ectoprocta, Brachiopoda and Phoronida). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55, 1121-1127.
- Hejnol, A., 2010. A twist in time - the evolution of spiral cleavage in the light of animal phylogeny. *Integrative and Comparative Biology* 50, 695-706.
- Hejnol, A., Obst, M., Stamatakis, A., Ott, M., Rouse, G.W., Edgecombe, G.D., Martinez, P., Baguñà, J., Bailly, X., Jondelius, U., Wiens, M., Müller, W.E.G., Seaver, E., Wheeler, W.C., Martindale, M.Q., Giribet, G. und Dunn, C.W., 2009. Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276, 4261-4270.
- Helluy, S., 2013. Parasite-induced alterations of sensorimotor pathways in gammarids: collateral damage of neuroinflammation? *Journal of Experimental Biology* 216, 67-77.
- Helmkampf, M., Bruchhaus, I. und Hausdorf, B., 2008. Phylogenomic analyses of lophophorates (brachiopods, phoronids and bryozoans) confirm the Lophotrochozoa concept. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275, 1927-1933.
- Herlyn, H. und Ehlers, U., 1997. Ultrastructure and function of the pharynx of *Gnathostomula paradoxa* (Gnathostomulida). *Zoomorphology* 117, 135-145.
- Herlyn, H. und Ehlers, U., 2001. Organisation of the praesoma in *Acanthocephalus anguillae* (Acanthocephala, Palaeacanthocephala) with special reference to the muscular system. *Zoomorphology* 121, 13-18.
- Herlyn, H., Martini, N. und Ehlers, U., 2001. Organisation of the praesoma of *Paratenuisentis ambiguus* (Van Cleave, 1921) (Acanthocephala: Eoacanthocephala), with special reference to the lateral sense organs and musculature. *Systematic Parasitology* 50, 105-116.
- Herlyn, H., Piskurek, O., Schmitz, J., Ehlers, U. und Zischler, H., 2003. The syndermatan phylogeny and the evolution of acanthocephalan endoparasitism as inferred from 18S rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26, 155-164.
- Hillis, D. und Bull, J., 1991. Of genes and genomes. *Science* 254, 528.
- Hirano, T., Kameda, Y., Kimura, K. und Chiba, S., 2014. Substantial incongruence among the morphology, taxonomy, and molecular phylogeny of the land snails *Aegista*, *Landouria*, *Trishoplita*, and *Pseudobuliminus* (Pulmonata: Bradybaenidae) occurring in East Asia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 70, 171-181.
- Hochberg, R. und Litvaitis, M., 2000. Functional morphology of the muscles in *Philodina* sp. (Rotifera: Bdelloidea). *Hydrobiologia* 432, 57-64.
- Hsiao, L.-L., Dangond, F., Yoshida, T., Hong, R., Jensen, R.V., Misra, J., Dillon, W., Lee, K.F., Clark, K.E., Haverty, P., Weng, Z., Mutter, G.L., Frosch, M.P., MacDonald, M.E., Milford, E.L.,

- Crum, C.P., Bueno, R., Pratt, R.E., Mahadevappa, M., Warrington, J.A., Stephanopoulos, G., Stephanopoulos, G. und Gullans, S.R., 2001. A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiological Genomics* 7, 97-104.
- Huang, A.M., Rehm, E.J. und Rubin, G.M., 2009. Quick preparation of genomic DNA from *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Protocols*, Epub <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot5198>.
- Hudson, C.T. und Gosse, P.H., 1886. *The Rotifera; or wheel-animalcules, both British and foreign*. Longmans, Green, London, 250 Seiten.
- Huelsenbeck, J.P. und Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754-755.
- Hughes, J., Longhorn, S.J., Papadopoulou, A., Theodorides, K., de Riva, A., Mejia-Chang, M., Foster, P.G. und Vogler, A.P., 2006. Dense taxonomic EST sampling and its applications for molecular systematics of the Coleoptera (beetles). *Molecular Biology and Evolution* 23, 268-278.
- Hur, J.H., Van Doninck, K., Mandigo, M.L. und Meselson, M., 2009. Degenerate tetraploidy was established before bdelloid rotifer families diverged. *Molecular Biology and Evolution* 26, 375-383.
- Hwang, D.-S., Dahms, H.-U., Park, H. und Lee, J.-S., 2013. A new intertidal *Brachionus* and intrageneric phylogenetic relationships among *Brachionus* as revealed by allometry and CO1-ITS1 gene analysis. *Zoological Studies* 52, 1-10.
- Hwang, D.-S., Suga, K., Sakakura, Y., Park, H.G., Hagiwara, A., Rhee, J.-S. und Lee, J.-S., 2014. Complete mitochondrial genome of the monogonont rotifer, *Brachionus koreanus* (Rotifera, Brachionidae). *Mitochondrial DNA* 25, 29-30.
- Illgen, H., 1916. Zur Kenntnis der Biologie und Anatomie der parasitischen Rotatorienfamilie der Seisoniden. *Zoologischer Anzeiger* 47, 1-9.
- Iwabe, N., Kuma, K., Hasegawa, M., Osawa, S. und Miyata, T., 1989. Evolutionary relationship of Archaeobacteria, Eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 9355-9359.
- Janečka, J.E., Miller, W., Pringle, T.H., Wiens, F., Zitzmann, A., Helgen, K.M., Springer, M.S. und Murphy, W.J., 2007. Molecular and genomic data identify the closest living relative of primates. *Science* 318, 792-794.
- Janssens, N., Janicot, M., Perera, T. und Bakker, A., 2004. Housekeeping genes as internal standards in cancer research. *Molecular Diagnosis* 8, 107-113.
- Jeffroy, O., Brinkmann, H., Delsuc, F. und Philippe, H., 2006. Phylogenomics: the beginning of incongruence? *Trends in Genetics* 22, 225-231.
- Jenner, R.A., 2004a. Accepting partnership by submission? Morphological phylogenetics in a molecular millennium. *Systematic Biology* 53, 333-359.

- Jenner, R.A., 2004b. When molecules and morphology clash: reconciling conflicting phylogenies of the Metazoa by considering secondary character loss. *Evolution & Development* 6, 372-378.
- Jobb, G., von Haeseler, A. und Strimmer, K., 2004. TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology* 4, 18.
- Jones, M., Gantenbein, B., Fet, V. und Blaxter, M., 2007. The effect of model choice on phylogenetic inference using mitochondrial sequence data: Lessons from the scorpions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43, 583-595.
- Katoh, K., Kuma, K.-i., Toh, H. und Miyata, T., 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 33, 511-518.
- Katoh, K. und Toh, H., 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9, 286-298.
- Kennedy, C.R., 1999. Post-cyclic transmission in *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). *Folia Parasitologica* 46, 111-116.
- Kennedy, C.R., 2006. Ecology of the Acanthocephala. Cambridge University Press, Cambridge; New York, 260 Seiten.
- King, C.E. und Serra, M., 1998. Seasonal variation as a determinant of population structure in rotifers reproducing by cyclical parthenogenesis. *Hydrobiologia* 387, 361-372.
- Kjer, K. und Honeycutt, R., 2007. Site specific rates of mitochondrial genomes and the phylogeny of eutheria. *BMC Evolutionary Biology* 7, 8.
- Klopfstein, S. und Ronquist, F., 2013. Convergent intron gains in hymenopteran elongation factor-1 α . *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67, 266-276.
- Koch, M., Quast, B. und Bartolomaeus, T., 2014. Coeloms and nephridia in annelids and arthropods. In: Wägele, J.W., Bartolomaeus, T. (Eds.), *Deep Metazoan Phylogeny: The Backbone of the Tree of Life - New insights from analyses of molecules, morphology, and theory of data analysis*. de Gruyter, Berlin, Boston, Seiten 173–284.
- Kocot, K.M., Cannon, J.T., Todt, C., Citarella, M.R., Kohn, A.B., Meyer, A., Santos, S.R., Schander, C., Moroz, L.L., Lieb, B. und Halanych, K.M., 2011. Phylogenomics reveals deep molluscan relationships. *Nature* 477, 452-456.
- Kotani, T., Ozaki, M., Matsuoka, K., Snell, T.W. und Hagiwara, A., 2001. Reproductive isolation among geographically and temporally isolated marine *Brachionus* strains. *Hydrobiologia* 446-447, 283-290.
- Kristensen, R.M. und Funch, P., 2000. Micrognathozoa: a new class with complicated jaws like those of Rotifera and Gnathostomulida. *Journal of Morphology* 246, 1-49.
- Kumar, S., Filipski, A.J., Battistuzzi, F.U., Kosakovsky Pond, S.L. und Tamura, K., 2012. Statistics and truth in phylogenomics. *Molecular Biology and Evolution* 29, 457-472.

- Lackie, A.M. und Holt, R., 1989. Immunosuppression by larvae of *Moniliformis moniliformis* (Acanthocephala) in their cockroach host (*Periplaneta americana*). *Parasitology* 98, 307-314.
- Lagroe, C., Güvenatam, A. und Bollache, L., 2013. Manipulative parasites may not alter intermediate host distribution but still enhance their transmission: field evidence for increased vulnerability to definitive hosts and non-host predator avoidance. *Parasitology* 140, 258-265.
- Lartillot, N., Rodrigue, N., Stubbs, D. und Richer, J., 2013. PhyloBayes MPI: phylogenetic reconstruction with infinite mixtures of profiles in a parallel environment. *Systematic Biology* 62, 611-615.
- Lavrov, D.V., Brown, W.M. und Boore, J.L., 2004. Phylogenetic position of the Pentastomida and (pan)crustacean relationships. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271, 537-544.
- Le, S.Q. und Gascuel, O., 2008. An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1307-1320.
- Leasi, F., Rouse, G.W. und Sørensen, M.V., 2012. A new species of *Paraseison* (Rotifera: Seisonacea) from the coast of California, USA. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 92, 959-965.
- Lehtonen, J., Jennions, M.D. und Kokko, H., 2012. The many costs of sex. *Trends in Ecology & Evolution* 27, 172-178.
- Li, Z., Chen, Y., Mu, D., Yuan, J., Shi, Y., Zhang, H., Gan, J., Li, N., Hu, X., Liu, B., Yang, B. und Fan, W., 2012. Comparison of the two major classes of assembly algorithms: overlap–layout–consensus and de-bruijn-graph. *Briefings in Functional Genomics* 11, 25-37.
- Liang, D., Shen, X.X. und Zhang, P., 2013. One thousand two hundred ninety nuclear genes from a genome-wide survey support lungfishes as the sister group of tetrapods. *Molecular Biology and Evolution* doi:10.1093/molbev/mst072.
- Littlewood, D., Telford, M., Clough, K. und Rohde, K., 1998. Gnathostomulida - an enigmatic metazoan phylum from both morphological and molecular perspectives. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9, 72-79.
- Loker, E.S., 1994. On being a parasite in an invertebrate host: a short survival course. *The Journal of Parasitology* 80, 728-747.
- Longhorn, S.J., Foster, P.G. und Vogler, A.P., 2007. The nematode–arthropod clade revisited: phylogenomic analyses from ribosomal protein genes misled by shared evolutionary biases. *Cladistics* 23, 130-144.
- Maas, A. und Waloszek, D., 2001. Cambrian derivatives of the early arthropod stem lineage, pentastomids, tardigrades and lobopodians - an 'Orsten' perspective. *Zoologischer Anzeiger* 240, 451-459.
- Maddison, W.P., 1997. Gene trees in species trees. *Systematic Biology* 46, 523-536.

- Makarewicz, J.C. und Likens, G.E., 1979. Structure and function of the zooplankton community of Mirror Lake, New Hampshire. *Ecological Monographs* 49, 109-127.
- Mallatt, J., Craig, C.W. und Yoder, M.J., 2012. Nearly complete rRNA genes from 371 Animalia: Updated structure-based alignment and detailed phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 64, 603-617.
- Mariadassou, M., Bar-Hen, A. und Kishino, H., 2012. Taxon influence index: assessing taxon-induced incongruities in phylogenetic inference. *Systematic Biology* 61, 337-345.
- Mark Welch, D.B., 2000. Evidence from a protein-coding gene that acanthocephalans are rotifers. *Invertebrate Biology* 119, 17-26.
- Mark Welch, D.B., Mark Welch, J.L. und Meselson, M., 2008. Evidence for degenerate tetraploidy in bdelloid rotifers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 5145-5149.
- Markevich, G.I., 1993. SEM observations on *Seison* and phylogenetic relationships of the Seisonidea (Rotifera). *Hydrobiologia* 255, 513-520.
- Marotta, R., Leasi, F., Uggetti, A., Ricci, C. und Melone, G., 2010. Dry and survive: Morphological changes during anhydrobiosis in a bdelloid rotifer. *Journal of Structural Biology* 171, 11-17.
- Martin, J.A. und Wang, Z., 2011. Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews Genetics* 12, 671-682.
- May, L., 1989. Epizoic and parasitic rotifers. *Hydrobiologia* 186-187, 59-67.
- McGhee, G., 2011. Convergent evolution: limited forms most beautiful. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA, 322 Seiten.
- Melone, G., 1998. The rotifer corona by SEM. *Hydrobiologia* 387-388, 131-134.
- Melone, G. und Ricci, C., 1995. Rotatory apparatus in bdelloids. *Hydrobiologia* 313-314, 91-98.
- Metzker, M.L., 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews Genetics* 11, 31-46.
- Meusemann, K., von Reumont, B.M., Simon, S., Roeding, F., Strauss, S., Kück, P., Ebersberger, I., Walz, M., Pass, G., Breuers, S., Achter, V., von Haeseler, A., Burmester, T., Hadrys, H., Wägele, J.W. und Misof, B., 2010. A phylogenomic approach to resolve the arthropod tree of life. *Molecular Biology and Evolution* 27, 2451-2464.
- Meyer, A. und Dolven, S., 1992. Molecules, fossils, and the origin of tetrapods. *Journal of Molecular Evolution* 35, 102-113.
- Miller, D.M. und Dunagan, T.T., 1985. Functional morphology. In: Crompton, D.W.T., Nickol, B.B. (Eds.), *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, Cambridge, Seiten 73-124.

- Min, G.S. und Park, J.K., 2009. Eurotatorian paraphyly: revisiting phylogenetic relationships based on the complete mitochondrial genome sequence of *Rotaria rotatoria* (Bdelloidea: Rotifera: Syndermata). *BMC Genomics* 10, 533.
- Miyamoto, M.M. und Fitch, W.M., 1995. Testing species phylogenies and phylogenetic methods with congruence. *Systematic Biology* 44, s64-76.
- Møller, O.S., Olesen, J., Avenant-Oldewage, A., Thomsen, P.F. und Glenner, H., 2008. First maxillae suction discs in Branchiura (Crustacea): Development and evolution in light of the first molecular phylogeny of Branchiura, Pentastomida, and other "Maxillopoda". *Arthropod Structure & Development* 37, 333-346.
- Monks, S., 2001. Phylogeny of the Acanthocephala based on morphological characters. *Systematic Parasitology* 48, 81-115.
- Monteiro, C.M., Amato, J.F.R. und Amato, S.B., 2006. A new species of *Andracantha* Schmidt (Acanthocephala, Polymorphidae) parasite of Neotropical cormorants, *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin) (Aves, Phalacrocoracidae) from southern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 23, 807-812.
- Nakao, A., Yoshihama, M. und Kenmochi, N., 2004. RPG: the Ribosomal Protein Gene database. *Nucleic Acids Research* 32, D168-170.
- Nardi, F., Spinsanti, G., Boore, J.L., Carapelli, A., Dallai, R. und Frati, F., 2003. Hexapod origins: monophyletic or paraphyletic? *Science* 299, 1887-1889.
- Near, T.J., 2002. Acanthocephalan phylogeny and the evolution of parasitism. *Integrative and Comparative Biology* 42, 668-677.
- Near, T.J., Garey, J.R. und Nadler, S.A., 1998. Phylogenetic relationships of the Acanthocephala inferred from 18S ribosomal DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10, 287-298.
- Nei, M. und Kumar, S., 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford; New York, 352 Seiten.
- Nesnidal, M.P., Helmkampf, M., Bruchhaus, I. und Hausdorf, B., 2010. Compositional heterogeneity and phylogenomic inference of metazoan relationships. *Molecular Biology and Evolution* 27, 2095-2104.
- Newsham, K.K., Maslen, N.R. und McInnes, S.J., 2006. Survival of Antarctic soil metazoans at -80°C for six years. *Cryo-Letters* 27, 291-294.
- Niehuis, O., Hartig, G., Grath, S., Pohl, H., Lehmann, J., Tafer, H., Donath, A., Krauss, V., Eisenhardt, C., Hertel, J., Petersen, M., Mayer, C., Meusemann, K., Peters, Ralph S., Stadler, Peter F., Beutel, Rolf G., Bornberg-Bauer, E., McKenna, Duane D. und Misof, B., 2012. Genomic and morphological evidence converge to resolve the enigma of Strepsiptera. *Current Biology* 22, 1309-1313.
- Nielsen, C., 2012. *Animal evolution: interrelationships of the living phyla*. Oxford University Press, Oxford; New York, 402 Seiten.

- Nosenko, T., Schreiber, F., Adamska, M., Adamski, M., Eitel, M., Hammel, J., Maldonado, M., Müller, W.E.G., Nickel, M., Schierwater, B., Vacelet, J., Wiens, M. und Wörheide, G., 2013. Deep metazoan phylogeny: when different genes tell different stories. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67, 223-233.
- Oakley, T.H., Wolfe, J.M., Lindgren, A.R. und Zaharoff, A.K., 2013. Phylotranscriptomics to bring the understudied into the fold: monophyletic Ostracoda, fossil placement, and pancrustacean phylogeny. *Molecular Biology and Evolution* 30, 215-233.
- Osigus, H.-J., Eitel, M. und Schierwater, B., 2013. Chasing the urmetazoon: striking a blow for quality data? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66, 551-557.
- Page, R.D.M. und Charleston, M.A., 1997. From gene to organismal phylogeny: reconciled trees and the gene tree/species tree problem. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7, 231-240.
- Page, R.D.M. und Holmes, E.C., 2008. *Molecular evolution: a phylogenetic approach*. Blackwell Science, Oxford, 346 Seiten.
- Paps, J., Baguñà, J. und Riutort, M., 2009a. Bilaterian phylogeny: a broad sampling of 13 nuclear genes provides a new Lophotrochozoa phylogeny and supports a paraphyletic basal Acoelomorpha. *Molecular Biology and Evolution* 26, 2397-2406.
- Paps, J., Baguñà, J. und Riutort, M., 2009b. Lophotrochozoa internal phylogeny: new insights from an up-to-date analysis of nuclear ribosomal genes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276, 1245-1254.
- Park, J.-K., Kim, K.-H., Kang, S., Kim, W., Eom, K. und Littlewood, D.T.J., 2007. A common origin of complex life cycles in parasitic flatworms: evidence from the complete mitochondrial genome of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Platyhelminthes). *BMC Evolutionary Biology* 7, 1-13.
- Parker, G.A., Chubb, J.C., Ball, M.A. und Roberts, G.N., 2003. Evolution of complex life cycles in helminth parasites. *Nature* 425, 480-484.
- Passamaneck, Y. und Halanych, K.M., 2006. Lophotrochozoan phylogeny assessed with LSU and SSU data: Evidence of lophophorate polyphyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40, 20-28.
- Patterson, C., 1985. Molecules and morphology in evolution: conflict or compromise? In: Patterson, C. (Ed.), *3rd International congress of systematic and evolutionary biology*. Cambridge University Press, University of Sussex, p. 231.
- Patterson, C., Williams, D.M. und Humpries, C.J., 1993. Congruence between molecular and morphological phylogenies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24, 153-188.
- Pejler, B., 1995. Relation to habitat in rotifers. *Hydrobiologia* 313-314, 267-278.
- Perkins, E.M., Donnellan, S.C., Bertozzi, T. und Whittington, I.D., 2010. Closing the mitochondrial circle on paraphyly of the Monogenea (Platyhelminthes) infers evolution in the diet of parasitic flatworms. *International Journal for Parasitology* 40, 1237-1245.

- Perrot-Minnot, M.-J. und Cézilly, F., 2013. Investigating candidate neuromodulatory systems underlying parasitic manipulation: concepts, limitations and prospects. *Journal of Experimental Biology* 216, 134-141.
- Perseke, M., Hankeln, T., Weich, B., Fritzsche, G., Stadler, P., Israelsson, O., Bernhard, D. und Schlegel, M., 2007. The mitochondrial DNA of *Xenoturbella bocki*: genomic architecture and phylogenetic analysis. *Theory in Biosciences* 126, 35-42.
- Philippe, H., Brinkmann, H., Copley, R.R., Moroz, L.L., Nakano, H., Poustka, A.J., Wallberg, A., Peterson, K.J. und Telford, M.J., 2011. Acoelomorph flatworms are deuterostomes related to *Xenoturbella*. *Nature* 470, 255-258.
- Podsiadlowski, L., Braband, A. und Mayer, G., 2008. The complete mitochondrial genome of the onychophoran *Epiperipatus biolleyi* reveals a unique transfer RNA set and provides further support for the Ecdysozoa hypothesis. *Molecular Biology and Evolution* 25, 42-51.
- Podsiadlowski, L., Braband, A., Struck, T., von Dohren, J. und Bartolomaeus, T., 2009. Phylogeny and mitochondrial gene order variation in Lophotrochozoa in the light of new mitogenomic data from Nemertea. *BMC Genomics* 10, 364.
- Poinar, G.O. und Ricci, C., 1992. Bdelloid rotifers in Dominican amber: Evidence for parthenogenetic continuity. *Experientia* 48, 408-410.
- Pollock, D.D., Zwickl, D.J., McGuire, J.A. und Hillis, D.M., 2002. Increased taxon sampling is advantageous for phylogenetic inference. *Systematic Biology* 51, 664-671.
- Pouchkina-Stantcheva, N.N. und Tunnacliffe, A., 2005. Spliced Leader RNA-mediated trans-splicing in phylum Rotifera. *Molecular Biology and Evolution* 22, 1482-1489.
- Poulin, R., 2007. Origins of parasitism and complex life cycles. *Evolutionary ecology of parasites*. Princeton University Press, New Jersey, USA, Seiten 8-40.
- Poulin, R. und Morand, S., 2000. Testes size, body size and male-male competition in acanthocephalan parasites. *Journal of Zoology* 250, 551-558.
- Protasio, A.V., Tsai, I.J., Babbage, A., Nichol, S., Hunt, M., Aslett, M.A., De Silva, N., Velarde, G.S., Anderson, T.J., Clark, R.C., Davidson, C., Dillon, G.P., Holroyd, N.E., LoVerde, P.T., Lloyd, C., McQuillan, J., Oliveira, G., Otto, T.D., Parker-Manuel, S.J., Quail, M.A., Wilson, R.A., Zerlotini, A., Dunne, D.W. und Berriman, M., 2012. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS neglected tropical diseases* 6, e1455.
- Rauque, C.A., Semenas, L.G. und Viozzi, G.P., 2002. Post-cyclic transmission in *Acanthocephalus tumescens* (Acanthocephala: Echinorhynchidae). *Folia Parasitologica* 49, 127-130.
- Regier, J.C., Shultz, J.W., Zwick, A., Hussey, A., Ball, B., Wetzer, R., Martin, J.W. und Cunningham, C.W., 2010. Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. *Nature* 463, 1079-1083.

- Ricci, C., 1998. Anhydrobiotic capabilities of bdelloid rotifers. *Hydrobiologia* 387-388, 321-326.
- Ricci, C., 2001. Dormancy patterns in rotifers. *Hydrobiologia* 446, 1-11.
- Ricci, C. und Melone, G., 1998. The Philodinavidae (Rotifera Bdelloidea): a special family. *Hydrobiologia* 385, 77-85.
- Ricci, C., Melone, G. und Sotgia, C., 1993. Old and new data on Seisonidea (Rotifera). *Hydrobiologia* 255-256, 495-511.
- Richardson, D.J. und Abdo, A., 2011. Postcyclic Transmission of *Leptorhynchoides thecatus* and *Neoechinorhynchus cylindratus* (Acanthocephala) to Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*). *Comparative Parasitology* 78, 233-235.
- Richly, E. und Leister, D., 2004. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. *Molecular Biology and Evolution* 21, 1081-1084.
- Rieger, R.M. und Tyler, S., 1995. Sister-group relationship of Gnathostomulida and Rotifera-Acanthocephala. *Invertebrate Biology* 114, 186-188.
- Riley, J., Banaja, A.A. und James, J.L., 1978. The phylogenetic relationships of the Pentastomida: The case for their inclusion within the Crustacea. *International Journal for Parasitology* 8, 245-254.
- Rokas, A. und Holland, P.W.H., 2000. Rare genomic changes as a tool for phylogenetics. *Trends in Ecology & Evolution* 15, 454-459.
- Rokas, A., Williams, B.L., King, N. und Carroll, S.B., 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* 425, 798-804.
- Ronquist, F. und Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-1574.
- Rosenfeld, J.A., Payne, A. und DeSalle, R., 2012. Random roots and lineage sorting. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 64, 12-20.
- Rothschild, M. und Clay, T., 1952. Fleas, flukes & cuckoos: a study of bird parasites. Collins, London, 305 Seiten.
- Sanderson, M.J. und Shaffer, H.B., 2002. Troubleshooting molecular phylogenetic analyses. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33, 49-72.
- Sasaki, G., Ishiwata, K., Machida, R., Miyata, T. und Su, Z.-H., 2013. Molecular phylogenetic analyses support the monophyly of Hexapoda and suggest the paraphyly of Entognatha. *BMC Evolutionary Biology* 13, 236.
- Schistosoma japonicum* genome sequencing and functional analysis consortium, T., 2009. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. *Nature* 460, 345-351.

- Schmidt, G.D., 1971. Acanthocephalan infections of man, with two new records. *Journal of Parasitology* 57, 582-584.
- Schmidt, G.D., 1985. Development and lifecycles. In: Crompton, D.W.T., Nickol, B.B. (Eds.), *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, Cambridge, Seiten 273-306.
- Schmidt, G.D. und Edmonds, S.J., 1989. *Australiformis semoni* (Linstow, 1898) n. gen., n. comb. (Acanthocephala: Moniliformidae) from Marsupials of Australia and New Guinea. *Journal of Parasitology* 75, 215-217.
- Schröder, T., 2005. Diapause in monogonont rotifers. *Hydrobiologia* 546, 291-306.
- Schulze, F.E., 1883. *Trichoplax adhaerens*, nov. gen., nov. spec. *Zoologischer Anzeiger* 6, 92-97.
- Scotland, R.W., Olmstead, R.G. und Bennett, J.R., 2003. Phylogeny reconstruction: the role of morphology. *Systematic Biology* 52, 539-548.
- Segers, H., 2007. Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. *Zootaxa* 1564, 1-104.
- Segers, H., 2008. Global diversity of rotifers (Rotifera) in freshwater. *Hydrobiologia* 595, 49-59.
- Shan, Y. und Gras, R., 2011. 43 genes support the lungfish-coelacanth grouping related to the closest living relative of tetrapods with the Bayesian method under the coalescence model. *BMC Research Notes* 4, 49.
- Simakov, O., Marletaz, F., Cho, S.J., Edsinger-Gonzales, E., Havlak, P., Hellsten, U., Kuo, D.H., Larsson, T., Lv, J., Arendt, D., Savage, R., Osoegawa, K., de Jong, P., Grimwood, J., Chapman, J.A., Shapiro, H., Aerts, A., Otillar, R.P., Terry, A.Y., Boore, J.L., Grigoriev, I.V., Lindberg, D.R., Seaver, E.C., Weisblat, D.A., Putnam, N.H. und Rokhsar, D.S., 2013. Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes. *Nature* 493, 526-531.
- Simon, S. und Hadrys, H., 2013. A comparative analysis of complete mitochondrial genomes among Hexapoda. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69, 393-403.
- Skuballa, J., Taraschewski, H., Petney, T., Pfäffle, M. und Smales, L., 2010. The avian acanthocephalan *Plagiorhynchus cylindraceus* (Palaeacanthocephala) parasitizing the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) in Europe and New Zealand. *Parasitology Research* 106, 431-437.
- Smales, L.R., Sasal, P. und Taraschewski, H., 2007. *Acanthocephalus reunionensis* n. sp. (Acanthocephala: Echinorhynchidae), a parasite of *Anguilla* species (Anguillidae) from Reunion Island. *Parasite* 14, 131-134.
- Smith, S.A., Wilson, N.G., Goetz, F.E., Feehery, C., Andrade, S.C.S., Rouse, G.W., Giribet, G. und Dunn, C.W., 2011. Resolving the evolutionary relationships of molluscs with phylogenomic tools. *Nature* 480, 364-367.

- Sørensen, M.V., 2003. Further structures in the jaw apparatus of *Limnognathia maerski* (Micrognathozoa), with notes on the phylogeny of the Gnathifera. *Journal of Morphology* 255, 131-145.
- Sørensen, M.V. und Giribet, G., 2006. A modern approach to rotiferan phylogeny: combining morphological and molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40, 585-608.
- Springer, M.S., Cleven, G.C., Madsen, O., de Jong, W.W., Waddell, V.G., Amrine, H.M. und Stanhope, M.J., 1997. Endemic African mammals shake the phylogenetic tree. *Nature* 388, 61-64.
- Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688-2690.
- Stamatakis, A., Hoover, P. und Rougemont, J., 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic Biology* 57, 758-771.
- Stanhope, M.J., Waddell, V.G., Madsen, O., de Jong, W., Hedges, S.B., Cleven, G.C., Kao, D. und Springer, M.S., 1998. Molecular evidence for multiple origins of Insectivora and for a new order of endemic African insectivore mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9967-9972.
- Starling, J.A., 1985. Feeding, nutrition and metabolism. In: Crompton, D.W.T., Nickol, B.B. (Eds.), *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, Cambridge, Seiten 125-212.
- Steinauer, M., Nickol, B., Broughton, R. und Ortí, G., 2005. First sequenced mitochondrial genome from the phylum Acanthocephala (*Leptorhynchoides thecatus*) and its phylogenetic position within Metazoa. *Journal of Molecular Evolution* 60, 706-715.
- Stevens, J.R. und Schofield, C.J., 2003. Phylogenetics and sequence analysis - some problems for the unwary. *Trends in Parasitology* 19, 582-588.
- Strona, G., Palomares, M.L.D., Bailly, N., Galli, P. und Lafferty, K.D., 2013. Host range, host ecology, and distribution of more than 11 800 fish parasite species. *Ecology* 94, 544-544.
- Struck, T.H. und Fisse, F., 2008. Phylogenetic position of Nemertea derived from phylogenomic data. *Molecular Biology and Evolution* 25, 728-736.
- Sudzuki, M., 1988. Comments on the antarctic Rotifera. *Hydrobiologia* 165, 89-96.
- Suga, K., Mark Welch, D.B., Tanaka, Y., Sakakura, Y. und Hagiwara, A., 2008. Two circular chromosomes of unequal copy number make up the mitochondrial genome of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1129-1137.
- Sullivan, J. und Joyce, P., 2005. Model selection in phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36, 445-466.
- Sures, B., 2004. Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. *Trends in Parasitology* 20, 170-177.

- Takezaki, N., Figueroa, F., Zaleska-Rutczynska, Z., Takahata, N. und Klein, J., 2004. The phylogenetic relationship of tetrapod, coelacanth, and lungfish revealed by the sequences of forty-four nuclear genes. *Molecular Biology and Evolution* 21, 1512-1524.
- Telford, M.J., 2006. Animal phylogeny. *Current Biology* 16, R981-R985.
- Thomas, F., Poulin, R. und Brodeur, J., 2010. Host manipulation by parasites: a multidimensional phenomenon. *Oikos* 119, 1217-1223.
- Thorrez, L., Van Deun, K., Tranchevent, L.-C., Van Lommel, L., Engelen, K., Marchal, K., Moreau, Y., Van Mechelen, I. und Schuit, F., 2008. Using ribosomal protein genes as reference: a tale of caution. *PLoS ONE* 3, e1854.
- Timmermans, M.J.T.N., Roelofs, D., Mariën, J. und Straalen, N.M., 2008. Revealing pancrustacean relationships: Phylogenetic analysis of ribosomal protein genes places Collembola (springtails) in a monophyletic Hexapoda and reinforces the discrepancy between mitochondrial and nuclear DNA markers. *BMC Evolutionary Biology* 8, 1-10.
- Tsai, I.J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcíarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K.L., Tracey, A., Bobes, R.J., Fragoso, G., Sciutto, E., Aslett, M., Beasley, H., Bennett, H.M., Cai, J., Camicia, F., Clark, R., Cucher, M., De Silva, N., Day, T.A., Deplazes, P., Estrada, K., Fernandez, C., Holland, P.W.H., Hou, J., Hu, S., Huckvale, T., Hung, S.S., Kamenetzky, L., Keane, J.A., Kiss, F., Koziol, U., Lambert, O., Liu, K., Luo, X., Luo, Y., Macchiaroli, N., Nichol, S., Paps, J., Parkinson, J., Pouchkina-Stantcheva, N., Riddiford, N., Rosenzvit, M., Salinas, G., Wasmuth, J.D., Zamanian, M., Zheng, Y., Cai, X., Soberon, X., Olson, P.D., Lactette, J.P., Brehm, K. und Berriman, M., 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496, 57-63.
- van Cleave, H.J., 1932. Eutely or cell constancy in its relation to body size. *The Quarterly Review of Biology* 7, 59-67.
- van Dijk, M.A.M., Madsen, O., Catzeflis, F., Stanhope, M.J., de Jong, W.W. und Pagel, M., 2001. Protein sequence signatures support the African clade of mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 188-193.
- Verweyen, L., Klimpel, S. und Palm, H.W., 2011. Molecular phylogeny of the Acanthocephala (Class Palaeacanthocephala) with a paraphyletic assemblage of the orders Polymorphida and Echinorhynchida. *PLoS ONE* 6, e28285.
- von Haeseler, A., 2012. Do we still need supertrees? *BMC Biology* 10, 13.
- Waggoner, B.M. und Poinar, G.O., Jr., 1993. Fossil habrotyrochid rotifers in Dominican amber. *Experientia* 49, 354-357.
- Wahl, G.M. und Sparkes, T.C., 2012. Egg dispersal in the acanthocephalan *Acanthocephalus dirus*: field data. *Journal of Parasitology* 98, 894-896.
- Wallace, R.L., 1980. Ecology of sessile rotifers. *Hydrobiologia* 73, 181-193.
- Wallace, R.L., 2001. Rotifera. eLS. John Wiley & Sons, Ltd.

Wallace, R.L., 2002. Rotifers: exquisite metazoans. *Integrative and Comparative Biology* 42, 660-667.

Wallace, R.L. und Snell, T.W., 2010. Rotifera. In: Thorp, J.H., Covich, A.P. (Eds.), *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*. Academic Press, London, Burlington, Sna Diego, Seiten 173-235.

Wallace, R.L., Snell, T.W., Ricci, C. und Nogrady, T., 2006. Rotifera, Part 1: Biology, ecology and systematics, Backhuys, 299 Seiten.

Walossek, D. und Müller, K.J., 1998. Cambrian 'Orsten'-type arthropods and the phylogeny of Crustacea. In: Fortey, R.A., Thomas, R.H. (Eds.), *Arthropod Relationships*. Springer Netherlands, Seiten 139-153.

Waloszek, D., 2003. The 'Orsten' window — a three-dimensionally preserved Upper Cambrian meiofauna and its contribution to our understanding of the evolution of Arthropoda. *Paleontological Research* 7, 71-88.

Waloszek, D.R.J.E.M.A., 2006. A new Late Cambrian pentastomid and a review of the relationships of this parasitic group. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh: Earth Sciences* 96, 163-176.

West-Eberhard, M.J., 2003. *Developmental plasticity and evolution*. Oxford University Press, New York, 794 Seiten.

Whitfield, P.J., 1970. The egg sorting function of the uterine bell of *Polymorphus minutus* (Acanthocephala). *Parasitology* 61, 111-126.

Wiens, J.J., 2004. The role of morphological data in phylogeny reconstruction. *Systematic Biology* 53, 653-661.

Wiens, J.J., 2005. Can incomplete taxa rescue phylogenetic analyses from long-branch attraction? *Systematic Biology* 54, 731-742.

Wiens, J.J., Kuczynski, C.A., Townsend, T., Reeder, T.W., Mulcahy, D.G. und Sites, J.W., 2010. Combining phylogenomics and fossils in higher-level squamate reptile phylogeny: molecular data change the placement of fossil taxa. *Systematic Biology* 59, 674-688.

Wiens, J.J. und Tiu, J., 2012. Highly incomplete taxa can rescue phylogenetic analyses from the negative impacts of limited taxon sampling. *PLoS ONE* 7, e42925.

Wingstrand, K.G., 1972. Comparative spermatology of a pentastomid, *Raillietiella hemidactyli*, and a branchiuran crustacean, *Argulus foliaceus*, with a discussion of pentastomid relationships. Mungsgaard, 72 Seiten.

Witek, A., Herlyn, H., Ebersberger, I., Mark Welch, D.B. und Hankeln, T., 2009. Support for the monophyletic origin of Gnathifera from phylogenomics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53, 1037-1041.

- Witek, A., Herlyn, H., Meyer, A., Boell, L., Bucher, G. und Hankeln, T., 2008. EST based phylogenomics of Syndermata questions monophyly of Eurotatoria. *BMC Evolutionary Biology* 8, 345.
- Woese, C.R. und Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5088-5090.
- Woese, C.R., Kandler, O. und Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 4576-4579.
- Wulfken, D. und Ahlrichs, W.H., 2012. The ultrastructure of the mastax of *Filinia longiseta* (Flosculariaceae, Rotifera): Informational value of the trophi structure and mastax musculature. *Zoologischer Anzeiger* 251, 270-278.
- Yang, Z. und Rannala, B., 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews Genetics* 13, 303-314.
- Yeang, C.-H. und Haussler, D., 2007. Detecting coevolution in and among protein domains. *PLoS Computational Biology* 3, e211.
- Yoshinaga, T., Minegishi, Y., Rumengan, I.F.M., Kaneko, G., Furukawa, S., Yanagawa, Y., Tsukamoto, K. und Watabe, S., 2004. Molecular phylogeny of the rotifers with two Indonesian *Brachionus* lineages. *Coastal Marine Science* 29, 45-56.
- Zheng, H., Zhang, W., Zhang, L., Zhang, Z., Li, J., Lu, G., Zhu, Y., Wang, Y., Huang, Y., Liu, J., Kang, H., Chen, J., Wang, L., Chen, A., Yu, S., Gao, Z., Jin, L., Gu, W., Wang, Z., Zhao, L., Shi, B., Wen, H., Lin, R., Jones, M.K., Brejova, B., Vinar, T., Zhao, G., McManus, D.P., Chen, Z., Zhou, Y. und Wang, S., 2013. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nature Genetics* 45, 1168-1175.
- Zrzavý, J., 2001. The interrelationships of metazoan parasites: a review of phylum-and higher-level hypotheses from recent morphological and molecular phylogenetic analyses. *Folia Parasitologica (Praha)* 48, 81-103.
- Zrzavý, J., 2003. Gastrotricha and metazoan phylogeny. *Zoologica Scripta* 32, 61-81.
- Zwickl, D.J. und Hillis, D.M., 2002. Increased taxon sampling greatly reduces phylogenetic error. *Systematic Biology* 51, 588-598.

6. DANKSAGUNG

Ich danke den Gutachtern dieser Arbeit sowie allen, die mich während meiner Zeit als Doktorandin begleitet und unterstützt haben.

Allen Co-Autoren und Kooperationspartnern besonderen Dank für das Vorantreiben der Publikationen und für hilfreiche Kommentare und Verbesserungen.

Danke an Familie, Freunde, Mitstreiter und Diplomanden für Zuarbeit, Zuspruch und Zusammenhalt! Insbesondere danke an meinen Mann, ohne den die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

7. LEBENS LAUF

Aus
Datenschutzgründen
gelöscht

Aus
Datenschutzgründen
gelöscht

8. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt wurde. Die Dissertation, oder Teile davon, habe ich bei keiner anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich vorgelegt, weder im In- noch im Ausland. Ich habe bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet.

Mainz, 22.April 2014

(Alexandra R. Wey-Fabrizius)