

De kreeftachtige oorsprong van de insecten

Louis Boumans

TREFWOORDEN

fylogenie, Insecta, Hexapoda, Pancrustacea-hypothese, Atelocerata, Tracheata, Mandibulata, Crustacea, kreeftachtigen, Branchiopoda, geleedpotigen, Arthropoda

Entomologische Berichten 68(3): 83-97

Al in de 19^e eeuw dachten geleerden dat de insecten afstammen van kreeftachtige voorouders. In het grootste deel van de 20^e eeuw echter domineerden theorieën die de duizend- en miljoenpoten aanwezen als de nauwste verwanten van de insecten. Vrijwel al het moleculaire onderzoek dat vanaf eind jaren tachtig van de vorige eeuw is verricht ondersteunt evenwel weer het oude idee dat insecten en kreeftachtigen elkaars nauwste verwanten zijn. Ook op het gebied van de morfologie zijn nieuwe argumenten voor deze hypothese gevonden. Hierbij is een belangrijke rol weggelegd voor technieken waarmee de embryonale ontwikkeling op het niveau van individuele cellen en genen kan worden bestudeerd. Dit artikel is een samenvatting van een uitgebreid literatuuronderzoek naar de huidige kennis over de oorsprong van de insecten.

Inleiding

De recente ontdekking dat *Homo erectus* (Dubois) en *H. habilis* Leakey et al. deels tijdgenoten zijn geweest (Spoor et al. 2007) haalde wereldwijd de dagbladen en nieuwsuitzendingen. Hoe anders is het met de insecten! Terwijl ieder nieuwtje over de prehistorie van de mensachtigen breed uitgemeten wordt, gaat zelfs een radicaal veranderd perspectief op de oorsprong van alle insecten aan het grote publiek voorbij. En dat terwijl de meeste landdieren toch insecten zijn! Vrijwel alle moleculaire en morfologische informatie die de afgelopen decennia beschikbaar is gekomen wijst erop dat de insecten de naaste verwanten zijn van de kreeftachtigen. Toch toont menig natuurhistorisch museum en menig recent niet-specialistisch boek nog de duizendpootachtigen als zustergroep van de insecten. Om dit nieuwe en belangrijke inzicht te helpen verbreiden geef ik hier een literatuuroverzicht van het DNA-onderzoek naar de oorsprong van insecten, en de belangrijkste nieuwe gegevens op het gebied van de morfologie.

De geleedpotigen

Dat de geleedpotigen (Arthropoda) een monofyletische groep vormen (zie kader 1), is steeds aangenomen op grond van morfologische eigenschappen, zoals de gelede poten en het verharde exoskelet (Lankester 1904, Snodgrass 1938), al meende Manton (1977) dat deze lichaamskenmerken meermalen onafhankelijk waren geëvolueerd uit wormachtige voorouders. De fluweelwormen (Onychophora) en beerdijtjes (Tardigrada) zijn de naaste verwanten van de Arthropoda, en samen vormen ze de Panarthropoda.

Tot voor kort werd gedacht dat de Panarthropoda het meest verwant zouden zijn met de gelede wormen (Annelida, waaronder de regenwormen), waarmee ze de gesegmenteerde lichaamsbouw gemeen hebben. Moleculaire studies bevestigen de monofylie van de Arthropoda en Panarthropoda, maar plaatsen de Panarthropoda doorgaans dichter bij de rondwormen (Nematoda, 'aaltjes'), in een groep van dieren die vervellen om te groeien, de Ecdysozoa (Aguinaldo et al. 1997, Schmidt-Rhaesa et al. 1998,

Dopazo & Dopazo 2005, Mallatt & Giribet 2006). Andere Ecdysozoa zijn wormvormige dieren die vooral in zee voorkomen: Kinorhyncha, Priapulida en Nematomorpha. De laatste jaren verschijnen overigens ook weer studies die het Ecdysozoa-concept ondergraven (o.a. Rogozin et al. 2007, Zheng et al. 2007).

Binnen de Arthropoda worden vier hoofdgroepen onderscheiden: a) Chelicerata of spinachtigen, waartoe de spinnen, mijten, schorpioenen en degenkrabben behoren; b) Crustacea, de kreeftachtigen; c) Myriapoda of duizendpootachtigen, waaronder de duizend- en miljoenpoten; en d) Hexapoda, zespotigen, waartoe de insecten behoren samen met de springstaarten, franjestaarten en enkele minder bekende groepen.

Deze vier groepen worden algemeen erkend, maar hun onderlinge verwantschap is steeds onderwerp van meningsverschil geweest. Bijna alle denkbare relaties tussen de Chelicerata, Crustacea, Myriapoda en Hexapoda zijn wel voorgesteld (figuur 1). Voor de oorsprong van insecten zijn de Mandibulata, de Atelocerata en de Pancrustacea de belangrijkste concepten. De Mandibulata-hypothese veronderstelt een monofyletische groep die de dieren met kaken omvat, dat wil zeggen de kreeftachtigen, de duizendpoten en de insecten. De concepten Atelocerata en Pancrustacea vertegenwoordigen twee alternatieve hypothesen over de zustergroep van de insecten.

In de tweede helft van de 20^e eeuw overheerste het idee dat de Myriapoda en Hexapoda elkaars nauwste verwanten zijn. Samen vormen zij de groep Atelocerata (in de literatuur ook Tracheata, Antennata of Uniramia genoemd). De Atelocerata-hypothese steunt op een aantal morfologische overeenkomsten tussen de zespotigen en de duizendpootachtigen. De hypothese werd verspreid door invloedrijke handboeken (o.a. Snodgrass 1938, Manton 1977) en was breed geaccepteerd onder paleontologen. Er zijn echter argumenten om te denken dat deze kenmerken meermaals ontstaan zijn (zie verderop).

Hypothesen die de insecten in de buurt van de kreeftachtigen plaatsen waren gangbaar vanaf het einde van de negentiende tot de tweede helft van de twintigste eeuw. Deze hypothesen steunden onder andere op overeenkomsten in de anatomie van de monddelen (Hansen 1893), de ogen (Hanström

Kader 1

Systematiek en fylogenie

De taxonomie houdt zich bezig met de naamgeving van organismen. De term *taxon* (meervoud *taxa*) wordt gebruikt voor een groep organismen die verondersteld wordt af te stammen van een gemeenschappelijke voorouder. Taxa worden gerangschikt in hiërarchische verbanden: ondersoort, soort, geslacht, familie, orde, enzovoort. Dit wordt grafisch weergegeven in de vorm van een stamboom met takken (*clades*). Deze ordening impliceert een hypothese over hun ontstaansgeschiedenis. Het onderzoek naar de evolutionaire relaties tussen organismen is het onderwerp van de fylogenetische systematiek.

Systematici streven naar een indeling in *monofyletische taxa*: een monofyletische groep omvat alle individuen die afstammen van een bepaalde voorouder (plus die voorouder). Vermeden worden *parafyletische* groepen: deze omvatten weliswaar afstammelingen van één voorouder, maar niet alle bekende afstammelingen. Een *polyfyletische* groep bevat individuen die van verschillende voorouders afstammen; dit is in de systematiek al even ongewenst.

Uiterlijke overeenkomsten zijn een eerste indicatie voor verwantschap. Toonaangevend binnen de systematiek is tegenwoordig de zogenaamde cladistiek. Dit is een benadering die alleen waarde hecht aan gedeelde, afgeleide overeenkomsten, de zogeheten *synapomorfieën*. Een synapomorfie identificeert een taxon juist omdat diens voorouders dit kenmerk niet hadden. Vleugels zijn bijvoorbeeld een synapomorfie van de Pterygota, een groep die bijna alle insecten omvat. Hun voorouders hadden geen vleugels. Het ontbreken van vleugels is een overeenkomst tussen zilversvisjes, springstaarten en spinnen, maar dit zegt niets over hun verwantschap. Vleugelloosheid is hier een *plesiomorf* kenmerk.

Als hetzelfde kenmerk zich onafhankelijk in twee of meer taxa ontwikkelt, spreekt men van *homoplasie*. Homoplasie suggereert ten onrechte gedeelde afstamming. *Convergente evolutie* van taxa kan leiden tot een reeks van homoplastische kenmerken. Dit gebeurt bijvoorbeeld wanneer verschillende taxa zich aanpassen aan een ander milieu, zoals mariene dieren die het land koloniseren, of andersom.

Vergelijkbare termen zijn *homologie* en *analogie*: homologe structuren hebben een gedeelde evolutionaire oorsprong

(de vier ledematen van zoogdieren en vogels); analoge structuren zijn ontstaan door convergente evolutie (de vleugels van vleermuizen en vogels).

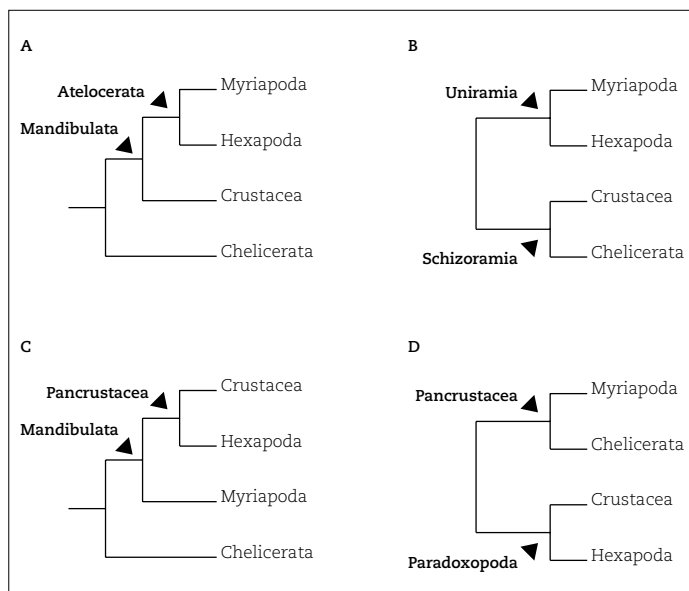
Om aan te kunnen tonen dat twee of meer taxa een monofyletische groep vormen, moet een studie ook taxa bevatten die erbuiten vallen: de *outgroup* ('buitengroep'). Outgroup taxa zijn ook van belang om bij leden van de 'ingroup' onderscheid te maken tussen voorouderlijke (*plesiomorfe*) en afgeleide (*apomorfe*) kenmerken.

Moleculaire taxonomie

Traditioneel zijn vooral morfologische kenmerken gebruikt om stambomen te reconstrueren. De laatste decennia nemen DNA- en aminozuursequenties een steeds belangrijker rol in. Sterk gelijkende sequenties worden verondersteld homogoloog te zijn, hoewel convergentie ook op dit niveau een rol kan spelen.

Iedere base en ieder aminozuur is in principe een kenmerk. Het is relatief makkelijk om heel veel kenmerken te scoren, maar het aantal mogelijk verschillende toestanden per kenmerk is zeer beperkt, want er zijn maar vier verschillende basen en twintig aminozuren (zie kader 2). Dit maakt dat moleculaire data bij uitstek geschikt zijn voor wiskundige modellen van evolutie, waarbij computers zeer gecompliceerde berekeningen uitvoeren.

Omdat er maar vier verschillende basen zijn, is de kans groot dat twee taxa puur toevallig hetzelfde kenmerk delen, bijvoorbeeld 'A op positie 234'. Ook is er een grote kans op homoplasie: door opeenvolgende mutaties ontstaat hetzelfde kenmerk opnieuw. Bijvoorbeeld een taxon heeft base A op positie 234 en het zustertaxon heeft op die positie T; vervolgens vindt in een van de nakomelingen van het zustertaxon een terugmutatie plaats van T naar A. Op basis van dit ene kenmerk zou je de afstamming verkeerd reconstrueren. (Dit probleem treedt minder snel op bij de twintig aminozuren.) Voor deze nadelen wordt gecompenseerd door heel veel basen te vergelijken, al gauw duizenden. Om het probleem van homoplasie te beperken, is het zaak DNA-regio's te kiezen die niet te snel muteren. Wat 'te snel' is, hangt natuurlijk af van de ouderdom van de onderzochte verwantschappen.



1. De belangrijkste hypothesen aangaande de relaties tussen de vier groepen geleedpotigen: (A) de klassieke Mandibulata, dieren met kaken gevormd door het tweede paar ledematen achter de mondopening, worden onderscheiden van de Chelicerata; (B) Uniramia (= Atelocerata) versus Schizoramia: clades met onvertakte, respectievelijk vertakte ledematen; (C) de nieuwe Mandibulata als Pancrustacea + Myriapoda: in tegenstelling tot de klassieke Mandibulata zijn de Hexapoda nu de zustergroep van de Crustacea; (D) Chelicerata + Myriapoda versus Crustacea + Hexapoda. Figuur op basis van Mallatt et al. (2004).

1. Major hypotheses on the relationships among the arthropods: (A) classical Mandibulata, animals with jaws formed by the second pair of appendages behind the mouth opening, are distinguished from the Chelicerata; (B) Uniramia (= Atelocerata) versus Schizoramia: clades with unramified versus ramified appendages; (C) new Mandibulata comprising Pancrustacea + Myriapoda: unlike in the classical concept the Hexapoda are now the sister group of the Crustacea; (D) Chelicerata + Myriapoda versus Crustacea + Hexapoda. Figure redrawn after Mallatt et al. (2004).

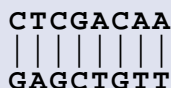
Kader 2

DNA en moleculaire evolutie

DNA

De erfelijke eigenschappen van dieren en andere organismen zijn opgeslagen in grote moleculen van de stof desoxyribonucleïnezuur (DNA). Alle erfelijke informatie van een organisme samen wordt het *genoom* genoemd. Het DNA bestaat uit een lange streng (*sequentie*) van basen, ook wel *nucleotiden* genoemd. Er komen vier verschillende basen voor: adenine (A), cytosine (C), guanine (G) en thymine (T).

In de cel is het DNA opgeslagen als een dubbele streng die spiraalvormig is gedraaid: de 'dubbele helix'. Hierbij staan steeds twee verschillende basen tegenover elkaar: A paart met T, en C met G ('*baseparing*'). Beide strengen zijn als het ware elkaars spiegelbeeld en bevatten dezelfde informatie. Een voorbeeldstukje DNA ziet er schematisch zo uit:



Bij celdeling wordt het DNA gekopieerd. Hierbij ontstaan soms afwijkingen: *mutaties*. Eén enkele base kan veranderen in een andere (*substitutie*), maar het komt ook voor dat kleine of grote stukken ontbreken, dan wel zijn ingevoegd, verdubbeld of verplaatst. Als de mutatie plaatsvindt in een cel die een voorloper is van sperma- of eicellen, dan dragen de hieruit voortkomende nakomelingen de mutatie in al hun cellen. Naarmate meer generaties voorbijgaan, vinden er meer mutaties plaats die afstammelingen van dezelfde voorouder onderscheiden. Hierdoor is het mogelijk om DNA-sequenties te gebruiken om verwantschappen te reconstrueren. De technieken voor het bepalen van de basenvolgorde (*sequenzen*) zijn de laatste decennia verregaand geautomatiseerd. Computers en speciale computerprogramma's maken het mogelijk om grote gegevensbestanden te analyseren.

Een (groot) deel van het genoom heeft geen functie voor het organisme. Functionele delen van de DNA-streng worden *genen* genoemd. Dit zijn ketens van honderden tot duizenden basen die de informatie bevatten voor andere nuttige moleculen. Het totale genoom van de mens en andere dieren, voor zover bekend, ligt in de orde van grootte van een paar honderd miljoen tot enkele miljarden baseparen, en bevat zo'n tien- tot dertigduizend genen.

Wanneer een gen wordt afgelezen, worden de twee strengen van de dubbele helix plaatselijk geopend. Een van de twee strengen vormt het origineel voor een enkelstrengs 'negatieve' kopie van het gen. Deze is van een iets afwijkende stof: ribonucleïnezuur (RNA), waarbij de base thymine (T) bovendien vervangen wordt door uracil (U).

Eiwitten

Het meest bekend zijn de genen die coderen voor *eiwitten*. De RNA-kopie van het gen, in dit geval messenger RNA (*mRNA*) genoemd, gaat in de cel naar een complex enzym, het *ribosoom*. Ribosomen

zijn de 'eiwitfabriekjes' van de cel. Als het mRNA langs het ribosoom schuift, wordt het vertaald in een keten van *aminozuren*: het eiwit.

Er zijn twintig verschillende aminozuren. Een serie van drie basen, een *codon*, is nodig om te coderen voor een aminozuur dat in het eiwit wordt ingebouwd. Bijvoorbeeld de sequentie GUU codeert voor het aminozuur valine, en GUUCCG staat voor de korte keten valine-proline. De genetische code is vrijwel identiek in alle levensvormen, maar er zijn kleine variaties bekend, met name van de mitochondriën van dieren.

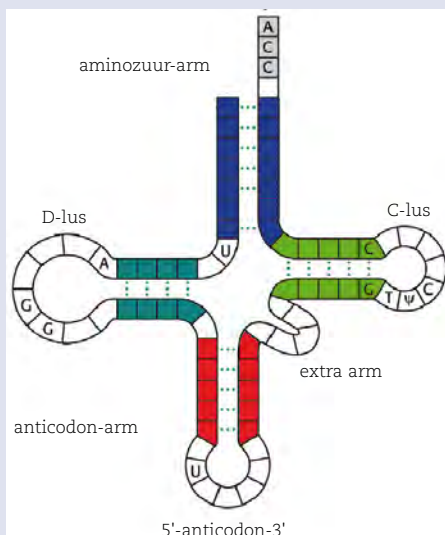
Met drie basen op een rij kunnen $4 \times 4 \times 4 = 64$ verschillende combinaties worden gevormd, terwijl er maar 20 aminozuren zijn. Als gevolg hiervan zijn er meerdere codons voor hetzelfde aminozuur. GUU, GUC, GUA, en GUG bijvoorbeeld coderen alle voor valine. Net als in dit voorbeeld is met name de laatste base van het codon vaak vrij te kiezen.

Een substitutie die hetzelfde aminozuur oplevert (bijvoorbeeld GTT → GTA), heeft nauwelijks consequenties voor het organisme. Men spreekt van een *neutrale mutatie*. Wanneer echter een ander aminozuur wordt ingebouwd (bijvoorbeeld als GTT → CTT), dan kan dit het functioneren van het resulterende eiwit ernstig beïnvloeden. Een insertie (CTT → GTTT) of deletie (GTT → GT) zal vrijwel altijd het hele eiwit vernietigen. Natuurlijke selectie wist de meeste van zulke mutaties uit.

Voor de reconstructie van verwantschappen is het van belang om onderscheid te maken tussen substituties die wel en niet leiden tot een ander aminozuur. De eerste categorie is veel zeldzamer. Wanneer een gemeenschappelijke voorouder van organismen in een ver verleden moet worden gezocht, kan het beter zijn om aminozuursequenties te vergelijken in plaats van basenvolgorde. Naarmate meer substituties hebben plaatsgevonden, neemt de kans toe dat overeenkomsten tussen twee taxa toevallig zijn, in plaats van duiden op een gedeelde afstamming (door *homoplasië*, zie kadertekst Systematiek). Met name de derde positie in het codon raakt snel *verzadigd* met opeenvolgende neutrale substituties.

RNA-moleculen

Naast genen waarvan de RNA-kopie in een eiwit wordt vertaald, zijn er genen waarvan het RNA-product zelf een functie in de cel vervult. Voorbeelden hiervan zijn ribosomaal RNA (*rRNA*) en



K2-1. Schema van een tRNA-molecuul met de secundaire structuur. De aminozuur-arm bindt aan een bepaald aminozuur, en het anticodon bindt aan een codon op het mRNA. De lussen en stammen bepalen de driedimensionale structuur van het molecuul.

K2-1. Scheme of a tRNA molecule with its secondary structure. The amino acid arm binds a specific amino acid, the anticodon binds to a codon on the mRNA. The loops and stems determine the molecule's three-dimensional structure. Adapted from Wikimedia Commons under the conditions of the GNU Free Documentation License.

transport-RNA (tRNA), die beide een centrale rol vervullen in de productie van eiwitten. rRNA-moleculen vormen, samen met enkele eiwitten, de ribosomen. Het genoom bevat vele identieke kopieën van de genen voor rRNA. De basenvolgorde is daardoor relatief makkelijk te bepalen, en deze genen worden dan ook veel gebruikt voor fylogenetische reconstructies. tRNA-moleculen zijn in de eiwitsynthese de schakel tussen de aminozuren en de codons op het mRNA. Een tRNA-keten bindt aan één type aminozuur, en geeft dit af aan een ribosoom op het moment dat daar het juiste codon op het mRNA passeert.

De RNA-moleculen zijn, in tegenstelling tot het DNA van de chromosomen, enkelstrengs. rRNA- en tRNA-moleculen worden echter 'opgevouwen' alvorens ze kunnen functioneren. Daarbij binden korte stukjes van hetzelfde molecuul aan elkaar door middel van 'baseparing'. Hierdoor ontstaat een structuur van gepaarde regio's (*stammen*) en ongepaarde (*lussen*). Een mutatie in de stam-regio van het gen verstoort de baseparing en heeft daardoor een groot effect op de driedimensionale structuur van het molecuul en de functionaliteit ervan. Dit verklaart waarom we in de lussen veel meer genetische variatie vinden dan in de stamregio's. Het is gebleken dat bij een mutatie in een stam-regio het tegenoverliggende, complementaire deel van de stam vaak ook een mutatie heeft, die de baseparing weer herstelt. Geavanceerde evolutiemodellen voor RNAs maken onderscheid tussen stammen en lussen. Nog geavanceerdere modellen houden er zelfs rekening mee dat mutaties van tegenoverliggende basen in dezelfde stam niet onafhankelijk van elkaar zijn.

Mitochondriën

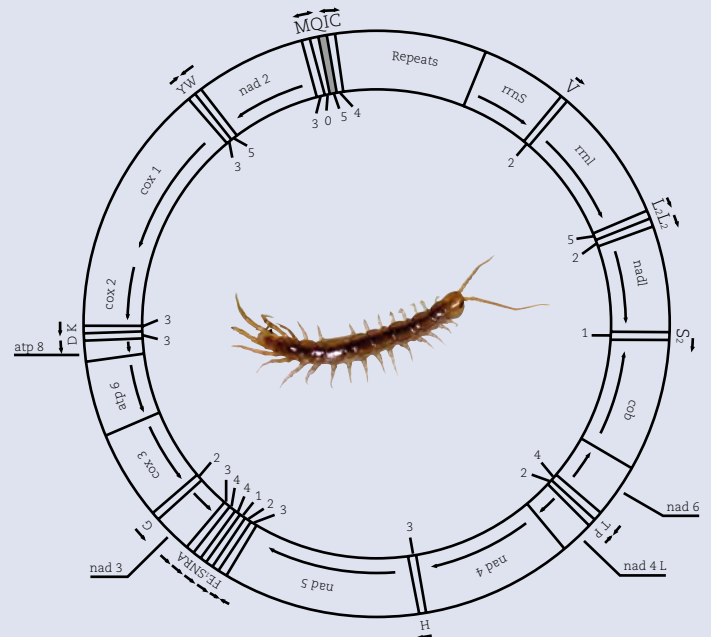
Mitochondriën zijn orgaanjes in de cel die zorgen voor de energievoorziening. Alle eukaryoten, waaronder alle planten, schimmels en dieren, hebben mitochondriën. Het aantal varieert van één tot miljoenen per cel, afhankelijk van de energiebehoefte. Het mitochondrion is ontstaan uit een oorspronkelijk vrijlevende bacterie, die als endosymbiont in een gastheercel is gaan leven.

Het mitochondrion bevat een klein eigen genoom, bestaande uit één cirkelvormige chromosoom, waarop bij dieren meestal 37 genen liggen. Van belang is verder dat dieren en planten de mitochondriën in de regel alleen via de vrouwelijke lijn doorgeven aan hun nageslacht.

1926) en de hersenen (Hanström 1928). Aan het eind van de twintigste eeuw, vanaf eind jaren tachtig, heeft moleculair onderzoek deze hypothese weer nieuw leven ingeblazen. De groep die de Hexapoda en Crustacea omvat is door Zrzavý en Štys (1997) 'Pancrustacea' genoemd. Mogelijk zijn de Hexapoda en Crustacea zuster groepen binnen de Pancrustacea, maar het kan ook zijn dat sommige kreeftachtigen dichter bij de insecten staan dan andere en dat de Crustacea een parafyletische groep vormen. Ook de monofylie van de Hexapoda is enigszins omstreden, met name de positie van de springstaarten.

Moleculaire fylogenetica

Verwantschapsrelaties die ver teruggaan in de tijd, zoals die tussen de insecten en de andere geleedpotigen, kunnen worden gereconstrueerd aan de hand van DNA-moleculen die relatief weinig verandering hebben ondergaan in de loop van de evolutie. Het meest gebruikt zijn de genen in de celkern die coderen voor het ribosomaal RNA (rRNA), bekend als 18S en 28S, en de genen van het mitochondrion (kader 2). Een enkele cel bevat vele mitochondriën en vele kopieën van de rDNA genen (die



K2-2. Genenkaart van het chromosoom van het mitochondrion van de gewone duizendpoot *Lithobius forficatus* (Linnaeus). *rns* en *rnl* coderen voor ribosomaal RNA, genen voor transport-RNA zijn met letters aangegeven, de overige genen coderen voor eiwitten. Pijlen geven de richting aan waarin het gen wordt afgeschreven. Slechts één gen, tRNA I (gearceerd) heeft een andere plaats in het genoom dan bij de degenkrab, die de oorspronkelijke organisatie van de geleedpotigen lijkt te hebben. Bron: Lavrov et al. (2000). Foto: Pieter Jan Nellestijn.

K2-2. Gene map of the mitochondrial chromosome of the common centipede *Lithobius forficatus* (Linnaeus). *rns* and *rnl* code for ribosomal RNA, letters indicate genes for transfer RNA, the remaining genes code for proteins. Arrows indicate the direction of transcription. Only one gene, tRNA I (shaded) has a different location than in the genome of the horseshoe crab, which appears to have the primitive organization of the arthropods. Reprinted from Lavrov et al. (2000), by permission from the authors and the National Academy of Sciences of the United States of America.]

coderen voor rRNA). Hierdoor is het relatief eenvoudig de basenvolgorde van deze moleculen te bepalen.

Ribosomaal RNA verandert in de loop van de evolutie relatief langzaam, omdat deze moleculen in alle organismen onmisbaar zijn. Een ander kenmerk van deze genen is dat er zowel variabele als zeer stabiele regio's in voorkomen. Hierdoor geeft hetzelfde gen informatie over zowel zeer oude als relatief recente verwantschappen.

Mitochondriaal (mt) DNA is geliefd bij taxonomen vanwege de constante omvang en inhoud: bij vrijwel alle dieren worden dezelfde 37 genen aangetroffen. Mitochondriaal DNA muteert veel sneller dan DNA uit de celkern, maar dit geldt alleen voor de zogenaamde synonieme substituties, die geen consequenties hebben voor het uiteindelijke genproduct (Saccone et al. 1999). Omdat het mt genoom zo klein is, is het mogelijk allerlei aspecten in detail te bestuderen, zoals de volgorde van de genen, het aandeel van elk van de vier basen en de gebruikte codons. Deze details kunnen extra fylogenetische informatie opleveren (Boore 1999).

De resultaten van fylogenetische analyses zijn enerzijds afhankelijk van de beschikbare gegevens, en anderzijds van de

Tabel 1. Overzicht van fylogenetische studies op basis van rDNA genen die van belang zijn voor de reconstructie van de oorsprong van insecten. De sequenties betreffen delen van het gen. DO = 'direct optimization', een omstreden methode om homologe sequenties op te lijnen; ML = maximum likelihood, MP = maximum parsimony.

Table 1. Overview of the phylogenetic studies based on rRNA genes that are pertinent to the reconstruction of the origin of the insects. Sequences are parts of the entire genes. DO = direct optimization, a contentious method for the alignment of homologous sequences; ML = maximum likelihood, MP = maximum parsimony.

gesteunde hypothese	focus	sequentie(s)	algoritme	zustergroep Hexapoda	Hexapoda monofyletisch	referentie
Pancrustacea	Metazoa	18S rRNA	afstand	onbepaald	onbepaald	Field et al. (1988)
Pancrustacea	Chelicerata	18S rRNA	afstand, MP	onbepaald	onbepaald	Turbeville et al. (1991)
Pancrustacea	Metazoa	18S rRNA	MP	Branchiopoda	onbepaald	Adoutte & Philippe (1993)
onbepaald	Arthropoda	18S rDNA	MP (DO)	onbepaald	onbepaald	Wheeler et al. (1993)
Pancrustacea	Arthropoda	18S + 28S rDNA	afstand, MP, ML	ja	ja	Friedrich & Tautz (1995)
Pancrustacea	Panarthropoda	18S rDNA	afstand; MP	onbepaald	onbepaald	Giribet et al. (1996)
Tracheata	Arthropoda	18S + 28S rDNA + ubiquitine	MP (DO)	onbepaald	onbepaald	Wheeler (1998a)
Pancrustacea	Arthropoda	18S + 28S rDNA	MP (DO)	onbepaald	onbepaald	Wheeler (1998b)
(Pancrustacea)	Crustacea	18 S rDNA	MP	onbepaald	onbepaald	Spears & Abele (1998)
Pancrustacea	Arthropoda	12S, 16S, 18S, 28S, 5.8S rDNA + ubiquitine	MP	Branchiopoda	ja	Zrzavý et al. (1998)
(Pancrustacea)	Arthropoda	18S, 28S rDNA	MP (DO)	onbepaald	onbepaald	Giribet & Ribera (2000)
Pancrustacea	Arthropoda	18S + 28S rDNA	afstand, MP, ML	Branchiopoda	ja	Friedrich & Tautz (2001)
Pancrustacea	Metazoa	18S rDNA	MP	onbepaald	onbepaald	Peterson & Eernisse (2001)
Pancrustacea	Hexapoda	18S + 28S rRNA + histone H3 + 16S rRNA + COI	MP (DO)	Protura, Diplura (Ectognatha (Crustacea (Collembola)))	nee	Giribet et al. (2004)
Pancrustacea	Hexapoda	18S rDNA	Bayes	Crustacea	ja	Kjer (2004)
Pancrustacea	Bilateria	18S rDNA	Bayes	onbepaald	onbepaald	Telford et al. (2005)
Pancrustacea	Hexapoda	18S, 28S	afstand, MP, ML, Bayes	onbepaald	onbepaald	Luan et al. (2005)
Pancrustacea	Ecdysozoa	18S, 28S rDNA	afstand, MP, ML, Bayes	Branchiopoda	ja	Mallatt et al. (2004), Mallatt & Giribet (2006)

gebruikte methoden. Hierdoor kunnen ook moleculaire studies onjuiste en tegenstrijdige resultaten opleveren. Voor het afleiden van een afstammingsboom uit de vergeleken DNA-sequenties bestaan verschillende rekenmethoden. Vier methoden zijn tot nu toe het meest gebruikt: afstandsanalyse, maximale parsimonie (MP), maximale waarschijnlijkheid (ML) en Bayesiaanse statistiek. Binnen deze categorieën bestaan weer diverse varianten. Het geeft vertrouwen indien verschillende onderzoekers met verschillende methoden en datasets toch tot dezelfde conclusies komen.

Verwantschap op basis van rDNA

Sinds eind jaren 1980 zijn er diverse fylogenetische studies op basis van rDNA gepubliceerd die van belang zijn voor de reconstructie van de oorsprong van de insecten (tabel 1). Dit betreft delen van de genen uit de celkern (18S en 28S, soms ook 5.8S) en in enkele gevallen ook het rDNA uit de mitochondriën (12S en 16S). In sommige studies zijn de rDNA sequenties gecombineerd met die van eiwit-coderende genen.

De verschillende studies concentreren zich op de relaties binnen de Arthropoda, dan wel binnen hogere taxa, zoals de dieren die groeien door te vervellen (Ecdysozoa) of alle meercellige dieren (Metazoa), dan wel één van de vier hoofdgroepen van de Arthropoda, waarbij representanten van de andere drie als outgroup in de studie zijn opgenomen.

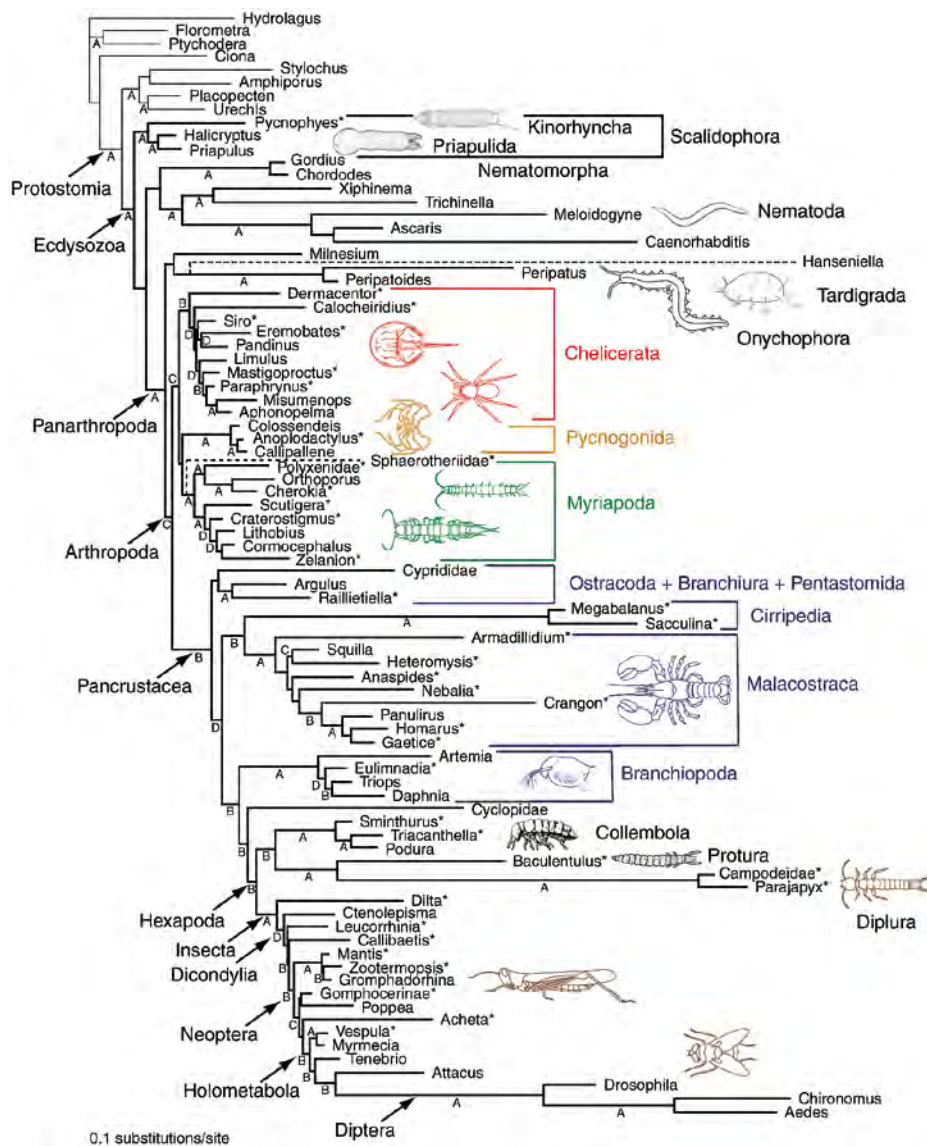
Al met al zijn er minimaal elf onafhankelijke rDNA-studies die eenduidig de Pancrustacea-hypothese ondersteunen. Hieronder zijn ook de nieuwste studies met de meest geavanceerde modellen voor moleculaire evolutie en de meest complete steekproeven uit de geleedpotigen (Kjer 2004, Luan et al. 2005, Mallatt & Giribet 2006) (figuur 2). Een methodologische verijning vinden we bij Telford et al. (2005). Zij passen als eerste een model toe dat er rekening mee houdt dat bepaalde regio's van het RNA-molecuul aan elkaar binden en daardoor de 'stammen'

vormen (zie kader 2). Drie andere studies verlenen aarzelend steun aan de Pancrustacea, en alleen de analyse van rDNA tezamen met het nucleaire gen dat codeert voor ubiquitine steunt de Tracheata (Wheeler 1998a). Eerder bleken deze ubiquitine-sequenties alleen tot fylogenetische reconstructies te leiden die eufemistisch als 'zeer onorthodox' worden aangeduid (Wheeler et al. 1993). (Ubiquitine is een eiwit dat veel voorkomt in de cel; het markeert mislukte en kapotte eiwitten die moeten worden afgebroken.)

Ribosomaal DNA wijst over het algemeen op monofylie van de Hexapoda (Spears & Abele 1998, Kjer 2004). De meeste studies plaatsen de Branchiopoda (zie kader 3), zoals het pekelkreeftje *Artemia* en de watervlo *Daphnia*, dicht bij de insecten dan de Malacostraca. (In de studie van Luan et al. (2005) komt *Artemia* uit tussen de basale groepen van Hexapoda, maar de auteurs beschouwen dit als een artefact.) In de oudere publicaties zijn vaak maar weinig groepen van Crustacea vertegenwoordigd, maar de data van Mallatt & Giribet (2006) omvatten meerdere representanten van de Branchiopoda, Maxillopoda, Ostracoda en Malacostraca. Ook in deze studie zijn de Branchiopoda de zustergroep van de Hexapoda. De analyses van rRNA geven evenwel geen uitsluitel over de positie van de klassen Remipedia en Cephalocarida. Deze zijn namelijk alleen vertegenwoordigd in de analyse van 18S rDNA van Spears en Abele (1998), waarin de relaties binnen de Pancrustacea niet werden opgehelderd.

Verwantschap op basis van eiwit-coderende genen uit de celkern

Een kleiner aantal studies betreft genen uit de celkern die coderen voor eiwitten (tabel 2). Het meest uitgebreid zijn de opeenvolgende studies naar RNA polymerase II en *elongation factor* (EF)-1 α en EF-2. RNA polymerase II is een enzym zorgt voor de transcriptie van DNA naar messenger-RNA (mRNA). Elongation



2. Stamboom van de Ecdysozoa volgens Mallatt & Giribet (2006). De letters A tot en met D markeren clades met afnemende statistische onderbouwing; clades zonder letter waren volgens geen enkele gebruikte reconstructiemethode significant.

2. Ecdysozoa tree of Mallatt & Giribet (2006). The letters A to D mark clades with decreasing statistical support; clades without a letter were not significant in any of the reconstruction methods used.

© 2006 reprinted with permission from Elsevier.

factors spelen een rol bij de vertaling van mRNA naar eiwitten. Regier en Shultz hebben de basenvolgorde van delen van deze drie genen op uiteenlopende wijzen geanalyseerd – gezamenlijk en apart, al dan niet vertaald naar aminozuursequenties, en met verschillende algoritmes – met over het algemeen overeenkomende resultaten. Zij gebruiken de beste outgroup-taxa, namelijk beerdiertjes en fluweelwormen, waarvan algemeen wordt erkend dat deze het meest verwant zijn aan de geleedpotigen. De steun voor de Pancrustacea-hypothese en voor de monofylie van de Hexapoda is zeer sterk in deze studies. Hun meest recente publicatie (Regier *et al.* 2005) geeft evidentie dat de kreeftachtigen parafyletisch zijn, en dat de zespotigen het meest verwant zijn aan de Branchiopoda, de Cephalocarida en de Remipedia.

Hoxgenen

De hoxgenen zijn bekend vanwege hun centrale rol in de bepaling van de identiteit van de lichaamssegmenten en de ontwikkeling van de ledematen. Cook *et al.* (2001) reconstrueerden de stamboom van de Panarthropoda op basis van hoxgenen, die de Hexapoda met de Crustacea clustert en de Myriapoda met de Chelicerata. Bovendien vormen de Hexapoda in hun dataset (een springstaart, een kever en een vlieg) een monofyletische groep. Een beperking van deze studie is dat hij slechts tien taxa omvat.

Hemocyaninen

Net als hele organismen ondergaan ook individuele genen (en de eiwitten waarvoor ze coderen) een evolutie waardoor verschillende eiwitten ontstaan met verschillende chemische eigenschappen en functies. Binnen hetzelfde organisme vinden we verschillende eiwitten die afstammen van een zelfde ‘voorouderewit’. Het onderzoek naar hemocyaninen en aanverwante eiwitten richt zich in eerste instantie op de relaties tussen de eiwitten zelf.

Hemocyaninen zijn koperhoudende eiwitten die in verschillende geleedpotigen betrokken zijn bij het zuurstoftransport in de hemolymfe. Ze vinden hun oorsprong in fenoloxidasen, die in alle geleedpotigen voorkomen en een rol spelen bij de uitharding van het skelet (Burmester 2001). Hemocyaninen zijn het best bekend van kreeftachtigen en spinachtigen, en pas recentelijk gevonden in duizendpoten en insecten. Een andere groep eiwitten, hexamerinen genaamd, is uit hemocyaninen ontstaan (Burmester *et al.* 1998). Hexamerinen zijn al langer bekend van insecten, waar ze een opslagfunctie vervullen.

Moleculair-fylogenetische analyse van hemocyaninen en aanverwante eiwitten ondersteunt duidelijk een Pancrustacea-taxon (Sánchez *et al.* 1998, Burmester 2001, Kusche & Burmester 2001) (figuur 3). Structureigenschappen van deze eiwitten suggereren dat de Myriapoda en Chelicerata zusterata zijn (Burmester 2002). Van de kreeftachtigen zijn tot nog toe alleen de hemocyanine-sequenties van de Malacostraca bekend. Deze studies laten daarom niet zien of de insecten met sommige Crustacea meer verwant zijn dan met een andere.

Kader 3

Indeling Crustacea

Er worden traditioneel zes klassen van Crustacea onderscheiden: **Branchiopoda** (kieuwpootkreeftjes) zijn een groep kleine kreeftachtigen die voornamelijk in zoet water voorkomen. Hiertoe behoren onder andere *Triops* (figuur K3-1), watervlooien als *Daphnia* en pekelkreeftjes als *Artemia*. Ze worden beschouwd als primitieve kreeftachtigen die in het mariene milieu grotendeels zijn verdwenen toen zich daar meer geavanceerde concurrenten en predatoren ontwikkelden. Veel soorten kunnen zich niet handhaven in water met vissen, maar kunnen wel tijdelijke opdroging van hun biotoop overleven. Ze gaan dan over in een inactief stadium. De eitjes van *Artemia* kunnen droog bewaard worden, daarom wordt dit dier veel gebruikt in laboratoria en verhandeld als voer voor vislarven.

Remipedia (ladderkreeften) zijn blinde, wormachtige bewoners van diepe grotten die in verbinding staan met de zee, onder andere bij de Kanarische eilanden. Ze zijn van fossielen bekend, maar recente soorten zijn pas sinds 1979 ontdekt. Door hun relatief eenvoudige lichaamsbouw met weinig gedifferentieerde segmenten worden ook Remipedia als primitieve kreeftachtigen beschouwd.

Cephalocarida (strijkboutkreeftjes) zijn twee tot vier millimeter lange diertjes die in de zeebodem leven. Er zijn slechts enkele soorten van bekend. Deze worden eveneens als primitieve kreeftachtigen beschouwd.

Maxillopoda is een verzamelnaam voor zeer diverse groepen kreeftachtigen, waaronder allerlei parasieten van gewervelde en ongewervelde dieren. Bekendere vertegenwoordigers zijn de zeepokken, eendenmosselen, karperluizen en roeipootkreeftjes. Alle moleculaire gegevens wijzen erop dat de Maxillopoda een parafyletische groep vormen.

Ostracoda (mosselkreeftjes) zijn 0,2 tot 30 mm kleine diertjes die worden gekenmerkt door twee grote schalen die het lichaam



K3-1. De kieuwpootkreeft *Triops cancriformis* (Bosc) komt in West-Europa nog op enkele plaatsen in het wild voor. Hij wordt ook als huisdier gehouden. De eieren worden droog bewaard en op internet te koop aangeboden. Foto: Roy van Grunsven.

K3-1. The branchiopod *Triops cancriformis* (Bosc) occurs in the wild in several locations Western Europe. It is also a popular pet animal. Dry eggs are offered for sale on internet.

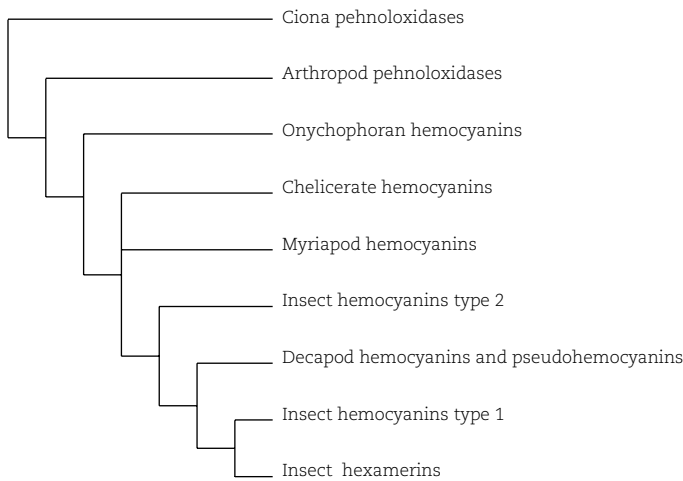
omvatten. Een groot aantal soorten leeft als plankton of als benthos. Geologen gebruiken de fossiele skeletjes van Ostracoda in afzettingen voor reconstructies van het klimaat in de prehistorie.

Malacostraca ('hogere kreeften'). Hiertoe behoren alle bekende grotere kreeftachtigen, zoals de tienpotigen (kreeften, krabben, garnalen), pissebedden en zeekomma's, en nog een groot aantal minder bekende ordes.

Tabel 2. Overzicht van fylogenetische studies op basis van eiwit-coderende genen uit de celkern die van belang zijn voor de reconstructie van de oorsprong van insecten.

Table 2. Overview of the phylogenetic studies based on protein coding nuclear genes which are relevant to the reconstruction of the origin of the insects.

gesteunde hypothese	focus	sequentie(s)	algoritme	zustergroep Hexapoda	Hexapoda monofyletisch	referentie
onbepaald	Arthropoda	histone H3 RNA U2	MP	onbepaald	onbepaald	Colgan et al. (1998)
Pancrustacea	Arthropoda	EF-1 α , EF-2, RNA Polymerase II	afstand, MP, ML	onbepaald	ja	Regier & Shultz (1997, 1998, 2001), Shultz & Regier (2000)
Pancrustacea	Arthropoda + Onychophora	hoxgenen	ML	onbepaald	ja	Cook et al. (2001)
Pancrustacea	Arthropoda	hemocyaninen	Afstand, MP	onbepaald	onbepaald	Sánchez et al. (1998)
Pancrustacea	Arthropoda	fenoloxidasen, hemocyaninen, hexamerinen	afstand, MP, ML	onbepaald	onbepaald	Burmester (2001, 2002), Kusche & Burmester (2001)
Pancrustacea	Myriapoda	G3PDH, enolase, + 7 nucleaire + 15 mt genen	afstand, MP, ML, Bayes	onbepaald	onbepaald	Pisani et al. (2004)
Pancrustacea	Hexapoda	EF-1 α , EF-2, RNA Polymerase II	MP, ML, Bayes	Branchiopoda + (Cephalocarida + Remipedia)	ja	Regier et al. (2004, 2005)
Pancrustacea	Metazoa	EST 150 genen	ML, Bayes	Branchiopoda	onbepaald	Dunn et al. (2008)
Pancrustacea	Ecdysozoa	EST 48 proteïncoderende genen	MP, ML, Bayes	Branchiopoda	ja	Timmermans et al. (2008)



3. Stamboom van hemocyaninen en aanverwante eiwitten van geleedpotigen. Phenoloxidasen van het manteldier *Ciona* vormen de outgroup. Bron: Burmester (2004, p. 122).

3. Genetic tree of hemocyanines and related arthropod proteins. Phenoloxidasen of the tunicate *Ciona* form the outgroup. From: Burmester (2004, p. 122).

© 2004, reprinted with permission from Elsevier.

Expressed Sequence Tags

De meeste studies tot nog toe richten zich op een of enkele tevoren geselecteerde genen. De onderzoekers verzamelen en analyseren dan homologe sequenties van hetzelfde gen bij een mogelijk groot aantal taxa. Een heel andere methode is het in kaart brengen (sequenzen) van het complete genoom van een aantal taxa, om vervolgens te bekijken welke delen bruikbaar zijn voor fylogenetische analyse. Op dit moment is nog maar voor een heel klein aantal organismen het complete genoom bekend. Een tussenoplossing die nu in opkomst is, is het gebruik van Expressed Sequence Tags (ESTs). ESTs zijn DNA-sequenties die zijn afgeleid van de mRNA-moleculen (kader 2), die in de cellen van een bepaald weefsel aanwezig zijn. Hierbij worden niet vooraf bepaalde genen geselecteerd en het gevolg is dat een verzameling ESTs vooral kopieën bevat van de genen die veel worden gebruikt, de zogenaamde huishoudgenen die betrokken zijn bij de stofwisseling en bouwstenen van de ribosomen (kader 2).

Twee publicaties op basis van ESTs zijn van belang voor de oorsprong van de insecten. De eerste is die van Dunn *et al.* (2008). Zij analyseerden fragmenten van 150 genen afkomstig van 77, merendeels meercellige, dieren (Metazoa). De andere werd gepubliceerd door onderzoekers van de Vrije Universiteit in Amsterdam (Timmermans *et al.* 2008). Dit onderzoek, dat in Nederland veel publiciteit heeft gekregen, richtte zich op de Ecdysozoa, en omvatte 35 taxa uit deze groep. Timmermans *et al.* selecteerden uit hun EST-database 48 genen die coderen voor eiwit-bouwstenen van de ribosomen. Deze studie omvat ook ESTs van twee springstaarten, en de belangrijkste bijdrage van deze studie is dan ook de sterke onderbouwing van de monofylie van de Hexapoda.

De data van beide EST-studies ondersteunen de Pancrustacea-hypothese en wederom blijken de insecten meer verwant aan de Branchiopoda dan aan de Malacostraca (andere Crustacea ontbreken). Dunn *et al.* (2008) hebben ook een duizendpoot in hun dataset en interessant is dat ook deze studie wijst op een monofyletische groep van Myriapoda en Chelicerata.

Verwantschap op basis van eiwitcoderende genen van het mitochondrion

Mitochondriën van dieren hebben een klein genoom met meestal dezelfde 37 genen, waarvan er dertien coderen voor eiwitten, twee voor rRNA moleculen en 22 voor transport-RNA (tRNA).

Fylogenetische reconstructies op basis van alle dertien eiwitcoderende genen of een deel daarvan steunen stevast de Pancrustacea-hypothese. Ook is in deze reconstructies evidentie te vinden voor een Chelicerata + Myriapoda-taxon (Hwang *et al.* 2001). In de loop der jaren wordt van steeds meer diersoorten het complete mitochondriale genoom bekend en de latere studies zijn dan ook op meer data gebaseerd. Tabel 3 vat de studies op basis van mitochondriale genen samen.

De relaties binnen de Pancrustacea worden hiermee echter niet opgelost. De verschillende studies neigen naar een para-fyletische groep Crustacea, waarbij afwisselend de Malacostraca, de Branchiopoda of Malacostraca + Branchiopoda de zuster-groep van de Insecta vormen. Ook de positie van de springstaarten is problematisch; sommige analyses suggereren dat de insecten en de springstaarten onafhankelijk van elkaar uit de kreeftachtigen zijn ontstaan.

De recentste publicatie met het meest geavanceerde evolutie-model en de beste dataset levert een stamboom op die op belangrijke punten in strijd is met gangbare reconstructies op basis van morfologie of celkern-DNA (Carapelli *et al.* 2007). De insecten met een volledige metamorfose vormen hierin bijvoorbeeld geen monofyletische groep (zie ook Cameron *et al.* 2004, Cook *et al.* 2005). De resultaten zijn in het algemeen instabiel en blijken voornamelijk afhankelijk van de dataset en methodologische keuzes, waaronder de analyse van DNA-sequenties dan wel de vertaling hiervan in aminozuursequenties, en de keuze van de ingroup en outgroup taxa (Delsuc *et al.* 2003, Cameron *et al.* 2004). Een complicatie bij de vertaling van de basenvolgorde naar aminozuursequenties is, dat er juist in de mitochondriën van geleedpotigen variatie bestaat in de genetische code. Zo staat het codon AGG in sommige soorten voor lysine en in andere voor serine (Abascal *et al.* 2006). De eerste studie die hier rekening mee houdt, zij het op een indirecte manier, is die van Carapelli *et al.* (2007).

Artefacten in de fylogenetische reconstructie worden verder veroorzaakt door een oververtegenwoordiging van de nucleotiden adenine en thymine bij verschillende, niet nauw verwante geleedpotigen, en doordat het mitochondriaal DNA bij sommige taxa veel sneller is geëvolueerd dan bij andere. Dit laatste kan weer het gevolg zijn van plotselinge, ingrijpende veranderingen in de organisatie van het genoom (Hassanin 2006, Xu *et al.* 2006), zoals een verandering van de volgorde van de genen (zie hieronder).

In het licht van de methodologische problemen moeten we voornamelijk sceptisch zijn ten aanzien van de resultaten op basis van mitochondriale genen, waar het gaat om de basale relaties tussen de geleedpotigen en vooral die binnen de Pancrustacea. Het is de vraag of in de toekomst veel betere resultaten behaald kunnen worden. Van veel geleedpotigen is het volledige mitochondriaal genoom inmiddels bekend. Verbeteringen kunnen worden gezocht in de rekenmodellen voor de evolutie van mitochondriale eiwitten (cf. Abascal *et al.* 2007). Ook kan het nog helpen de sequenties van de mitochondriale genen die coderen voor (ribosomaal) RNA in de analyse te betrekken. Die zijn tot nu toe buiten beschouwing gelaten omdat die erg variabel zijn.

Tabel 3. Overzicht van fylogenetische studies op basis van eiwit-coderende genen van het mitochondrion die van belang zijn voor de reconstructie van de oorsprong van insecten.

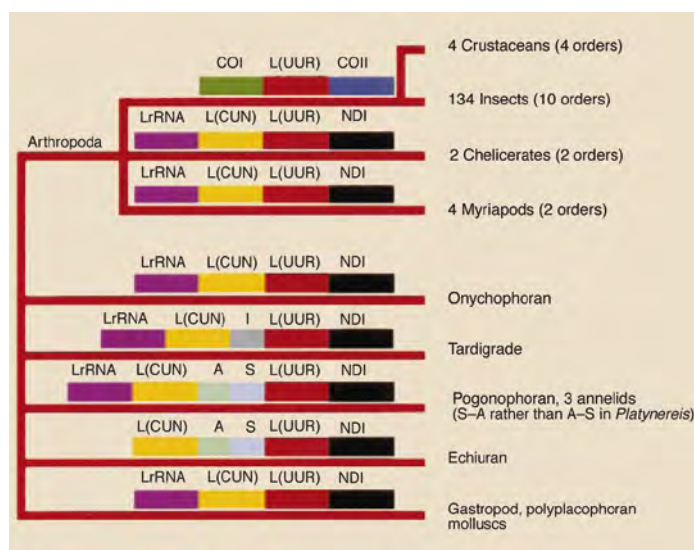
Table 3. Overview of the phylogenetic studies base don protein coding mitochondrial genes that are relevant to the reconstruction of the origin of the insects.

gesteunde hypothese	focus	sequentie(s)	algoritme	zustergroep Hexapoda	Hexapoda monofyletisch	referentie
Pancrustacea	Insecta + Crustacea	7 mt eiwit genen	afstand, MP	Malacostraca	onbepaald	García-Machado et al. (1999)
Pancrustacea	Insecta + Crustacea	13 mt eiwit genen	afstand, MP, ML	Malacostraca	onbepaald	Wilson et al. (2000)
Pancrustacea	Arthropoda	12 mt eiwit genen	afstand, MP, ML	Malacostraca	onbepaald	Hwang et al. (2001)
Pancrustacea	Hexapoda	12 mt eiwit genen	MP, ML	Collembola (Branchiopoda (Malacostraca + Insecta))	nee	Nardi et al. (2001, 2003)
onbepaald	Hexapoda	13 mt eiwit genen	MP, Bayes	onbepaald	onbepaald	Cameron et al. (2004)
Pancrustacea	Pentastomida	12 mt eiwit genen	afstand, ML	onbepaald	onbepaald	Lavrov et al. (2004)
Pancrustacea	Pancrustacea	12 mt eiwit genen	ML, Bayes	(Collembola, some Maxillopoda) + (Insecta, Branchiopoda, Malacostraca))	nee	Cook et al. (2005)
Pancrustacea	Arthropoda	6 mt eiwit genen	MP, ML, Bayes	onbepaald	onbepaald	Hassanin (2006)
Pancrustacea	Pancrustacea	13 mt eiwit genen	Bayes, mtArt toegepast	Klassen Crustacea en Hexapoda sterk gemengd	nee	Carapelli et al. (2007)
Pancrustacea	Ecdysozoa	11 mt eiwit genen	MP, ML, Bayes	Malacostraca	onbepaald	Podsiadlowski et al. (2007)

De volgorde van de genen in het mitochondriaal genoom

Boore et al. (1995, 1998) wezen als eersten op een synapomorfie (kader 1) van de Insecta + Crustacea in de vorm van een verandering in de volgorde van de 37 genen op het chromosoom van het mitochondrion. Een van de twee genen voor tRNA voor het aminozuur leucine, L(UUR), heeft bij insecten en kreeftachtigen een andere positie in het genoom dan bij duizendpoten, spinachtigen, fluweelwormen en beerdierjes (figuur 4).

Dit is op het eerste gezicht een ijzersterk argument tegen de Atelocerata-hypothese en voor de Pancrustacea. Naarmate van meer dieren het volledige mitochondriaal genoom bekend werd, is echter gebleken dat variaties in de volgorde van de genen bij ongewervelden minder zeldzaam zijn dan gedacht. Met name tRNA-genen blijken tamelijk mobiel (Saccone et al. 1999, Cook et al. 2005).



4. De relatieve positie van het mitochondriale gen L(UUR) dat codeert voor leucine transport RNA in geledpotigen en enkele outgroup soorten. Bron: Boore et al. (1998).

4. The relative position of the mitochondrial gene L(UUR) which codes for leucine transfer RNA in arthropods and some outgroup species. Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Boore et al. (1998), © 1998.

Hierbij is een verrassende paradox aan het licht gekomen. Enerzijds delen zeer uiteenlopende dieren dezelfde, kennelijk voorouderlijke, volgorde van genen, zoals bijvoorbeeld insecten en kreeftachtigen van diverse ordes. Het verschil tussen deze volgorde en die van de degenkrab (*Limulus*, behorend tot de Chelicerata – de naam ‘krab’ is misleidend) betreft slechts de positie van één tRNA-gen. De duizendpoot *Lithobius* verschilt van de degenkrab slechts in de positie van één ander tRNA-gen (Lavrov et al. 2000, Hwang et al. 2001). Hier staat tegenover dat binnen elk van de vier hoofdgroepen van geledpotigen voorbeelden gevonden zijn van een, soms volstrekt, afwijkende genenvolgorde. Dit duidt er op dat de organisatie van het mitochondriaal genoom tijdens het ontstaan van de hoofdgroepen van geledpotigen stabiel was, en pas bij de vorming van sommige lagere taxa veranderlijk werd.

De grote variatie in de genvolgorde is reden om te twijfelen aan het nut van dit soort kenmerken voor diepere fylogenetische relaties (Schram & Hof 1998). Niettemin staat de hypothese dat de door insecten en kreeftachtigen gedeelde genvolgorde een synapomorfie is van de Pancrustacea nog steeds overeind. Er is geen tegenvoorbeeld gemeld van een insect of kreeftachtige met de volgorde die kenmerkend is voor duizendpoten of spinachtigen, noch van een duizendpoot of spinachtige met een Pancrustacea-volgorde.

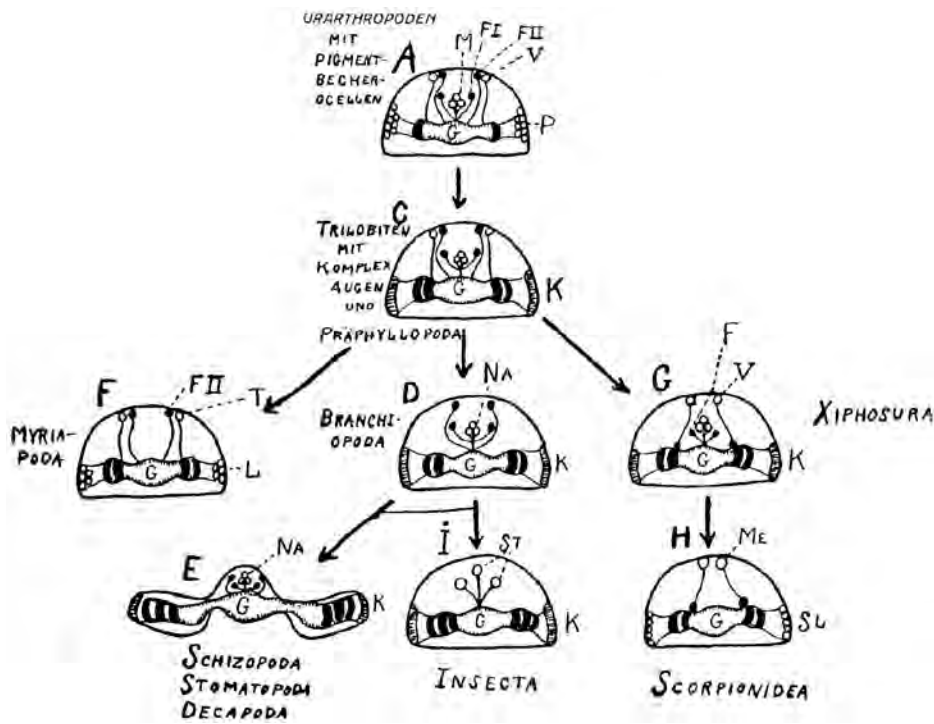
Verwantschap op basis van morfologie

Van de uitgebreide literatuur over de vergelijkende morfologie van de geledpotigen wil ik hier slechts enkele saillante punten naar voren brengen die licht werpen op het vraagstuk van de oorsprong van de insecten.

Kritiek op de argumenten voor de Atelocerata

Er is kritiek op de klassieke morfologische argumenten die de Hexapoda aanwijzen als zustergroep van Myriapoda (Averof & Akam 1995, Dohle 1998). De gemeenschappelijke morfologische kenmerken die deze twee groepen onderscheiden van de Crustacea en Chelicerata zijn wellicht geen echte synapomorfieën, maar het resultaat van convergente evolutie, bijvoorbeeld als aanpassing aan het leven op land.

Tracheën bijvoorbeeld zijn meermaals onafhankelijk van



5. Aan het begin van de 20^e eeuw zag Hanström al een nauwe verwantschap tussen kreeftachtigen en insecten op basis van de anatomie van de hersenen. Bron: Hanström (1926).

5. At the beginning of the 20th century, Hanström recognised a close relationship between crustaceans and insects on the basis of the anatomy of the brain.

elkaar ontstaan in allerlei landbewonende geleedpotigen, alleen in de Myriapoda al drie of vier keer (Dohle 1998, Kraus 2001). Hetzelfde geldt voor de buisjes van Malpighi, die bij insecten en duizendpootachtigen afvalstoffen uit de hemolymfe verzamelen en afvoeren naar de darm. Waterdieren hebben deze organen niet nodig, want ze scheiden hun afval door de kieuwen aan het water af. De homologie van de buisjes van Malpighi in duizendpoten en insecten is niet vastgesteld, en dergelijke structuren zijn ook meerdere malen ontstaan in landbewonende Chelicerata (Dohle 1998).

Springstaarten hebben net als diverse groepen Myriapoda zogenaamde post-antennale organen, of organen van Tömösváry, die wellicht geluid of vochtigheid waarnemen. Ook hier bestaat meningsverschil of deze structuren een gemeenschappelijke oorsprong hebben (Kristensen 1998), dan wel apart zijn ontstaan in de voorouders van de Myriapoda en de Collembola (Averof & Akam 1995, Dohle 1998).

Crustacea hebben een tweede antennepaar op het segment tussen de eerste antennen en de mandibels. Het ontbreken van het tweede antennepaar bij Myriapoda en Hexapoda is een zwak argument voor de Atelocerata-hypothese: als de oergeleedpotige deze aanhangsels had, kan het verlies ervan in insecten en duizendpoten heel goed onafhankelijk van elkaar zijn opgetreden. Als de oergeleedpotige deze aanhangsels niet had, is de afwezigheid geen synapomorfie voor de Atelocerata.

Geleedpotigen in het water (trilobieten, spinachtigen en kreeftachtigen) hebben vertakte poten en monddelen, terwijl de landbewonende duizendpoten en insecten onvertakte ledematen hebben. Dit was voor Manton (1964, 1977) een van de overwegingen om het fylum Uniramia te postuleren, dat de Onychophora (fluweelwormen), Hexapoda en Myriapoda omvatte. De paleontologe Kukalová-Peck (1992) wijst er op dat bij Myriapoda en Hexapoda rudimentaire vertakte ledematen te vinden zijn, zoals fossiele insecten laten zien, en ook de antennes van de hedendaagse pauropoden. In elk geval had de oergeleedpotige vertakte aanhangsels, en is de onvertakte vorm een afgeleide conditie en wellicht een aanpassing aan het leven op land (Averof & Akam 1995). Het verlies van een voorouderlijk kenmerk is in het algemeen geen sterk argument voor een gemeenschappelijke afstamming.

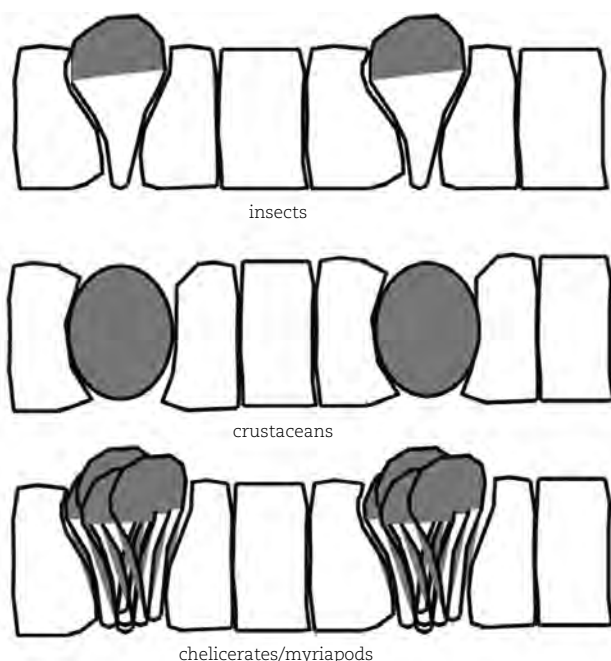
Een terugkerend thema in de discussie over de fylogenie van de Arthropoda was de bouw van de monddelen. Aan het eind van de negentiende eeuw zag Hansen (1893) sterke overeenkomsten tussen de monddelen van primitieve Hexapoda als franjestaarten en Pecarida (Crustacea Malacostraca), die volgens hem wezen op een kreeftachtige oorsprong van de insecten.

In de twintigste eeuw ontstond onenigheid over het snijvlak van de kaken. Volgens Snodgrass (1938, 1950) werd bij Crustacea, Myriapoda en Hexapoda het snijvlak gevormd door slechts het basale segment van de kaakledematen, wat bij Crustacea onmiskenbaar het geval is. Manton (1964, 1977) echter meende dat bij Hexapoda en Myriapoda de kaak gevormd wordt uit de hele ledemaat. Dit was een argument voor de Atelocerata-hypothese.

Gedetailleerde embryologische studies hebben het pleit beslecht in het voordeel van Snodgrass. Het product van het hoxgen *Distalless* (*Dll*) is nodig voor de ontwikkeling van de distale segmenten van de ledematen. Dit gen komt slechts kortdurend tot uitdrukking in de ontwikkeling van de kaken van duizendpoten en in het geheel niet in de kaken van insecten, terwijl het wel tot uitdrukking komt in de antennen en maxillae (Popadić et al. 1998, Scholtz et al. 1998). Bij Crustacea is het ingewikkelder. Hier komt *Dll* wel tot uitdrukking in de kaken van larvale stadia en in aanhangsels van de kaakledematen, maar die vormen niet het snijvlak (Panganiban et al. 1995).

Overeenkomsten van Hexapoda met Crustacea

Op het gebied van de ogen en het zenuwstelsel zijn er opvallende morfologische overeenkomsten tussen insecten en bepaalde groepen kreeftachtigen. Hierover heeft Hanström begin 20^e eeuw al veel gepubliceerd (figuur 5). De overeenkomsten met insecten zijn met name gevonden bij de best onderzochte groepen, de Branchiopoda en Malacostraca. Enkele punten worden hieronder uitgelicht. Uitgebreide en rijk geïllustreerde overzichten zijn gepubliceerd door Harzsch et al. (2005) en Harzsch (2006). Deze onderzoekers zien in verschillende onderdelen van het zenuwstelsel een algemene evolutionaire trend van een groot en variabel aantal zenuwcellen in de Chelicerata naar een



6. Neurogenese in geleedpotigen. Bij insecten en kreeftachtigen ontwikkelt het zenuwstelsel zich uit een klein aantal voorlopercellen. Bij insecten komen de voorlopercellen los van het neuroectoderm, bij kreeftachtigen niet. Bij spinachtigen en duizendpoten ontstaan groepjes voorlopercellen die naar de binnenkant van het embryo instulpen en loskomen van het neuroectoderm. Bron: Stollewerk & Chipman (2006).

6. Neurogenesis in arthropods. In insects and crustaceans, the nervous system develops from a small number of single neural precursor cells. In insects, but not in crustaceans, the precursors delaminate from the neuroectoderm. In chelicerates and myriapods groups of precursors are selected that eventually invaginate and detach from the surface of the neuroectoderm.

Reprinted by permission from the Society for Integrative and Comparative Biology, Stollewerk & Chipman (2006), © 2006.

beperkt en vast aantal in Crustacea en Hexapoda. De Myriapoda nemen daarbij een tussenpositie in. Hetzelfde geldt voor de bouw van de ogen. Neurologische gegevens zijn daarom het meest in overeenstemming met een taxon Pancrustacea binnen Mandibulata (figuur 1c). Nieuwe morfologische analyses waarin deze neurologische kenmerken zijn meegewogen ondersteunen dan ook eerder de Pancrustacea- dan de Atelocerata-hypothese (Giribet et al. 2005).

De ogen

Het gaat hier om de structuur van het enkelvoudig oog (ommatidium) dat onderdeel is van het laterale, samengestelde oog. Bij insecten, springstaarten en kreeftachtigen is ieder ommatidium opgebouwd uit twee hoornvliesvormende cellen (homoloog aan de twee primaire pigmentcellen in insecten), vier kristallijne kegelcellen, acht fotoreceptorcellen (retinula) en een variabel aantal pigmentcellen (Paulus 1979, 2000). Binnen de insecten en kreeftachtigen komen variaties op dit basisplan voor, maar de homologie van deze complexe structuur is onmiskenbaar, en strekt zich uit tot de neurale anatomie van de ogen. De ogen van de duizendpootachtigen zijn volstrekt anders: ieder enkelvoudig oog is samengesteld uit een veel groter aantal cellen (Nilsson & Osorio 1998, Harzsch et al. 2005).

Op grond van deze overeenkomst heeft Dohle (2001) de naam Tetraconata (= met vier kegelcellen) voorgesteld voor het fyllum dat insecten en kreeftachtigen omvat. Dit is een wat ongelukkige keuze, aangezien één groep duizendpoten, de Scutigermorpha, ook ommatidia met vier kegelcellen heeft (Paulus 2000, Müller et al. 2003).

Als de Atelocerata-hypothese juist is, moet het ommatidium van de insecten en kreeftachtigen aanwezig zijn geweest in het bouwplan van de Mandibulata, en bij de duizendpoten verloren gegaan zijn. Müller et al. (2003) stellen voor dat het ommatidium van de Scutigermorpha de voorouderlijke staat van de Mandibulata representeert. De meest eenvoudige verklaring is evenwel dat het ommatidium van de insecten en kreeftachtigen een synapomorfie is van de Pancrustacea. Ook de manier waarop het oog en de ommatidia groeien is bij Pancrustacea anders dan bij de overige geleedpotigen. Zo blijven de individuele ommatidia bij de insecten en kreeftachtigen niet doorgroeien nadat ze gevormd zijn; bij de andere geleedpotigen doen ze dat wel (Harzsch 2006).

Het zenuwstelsel

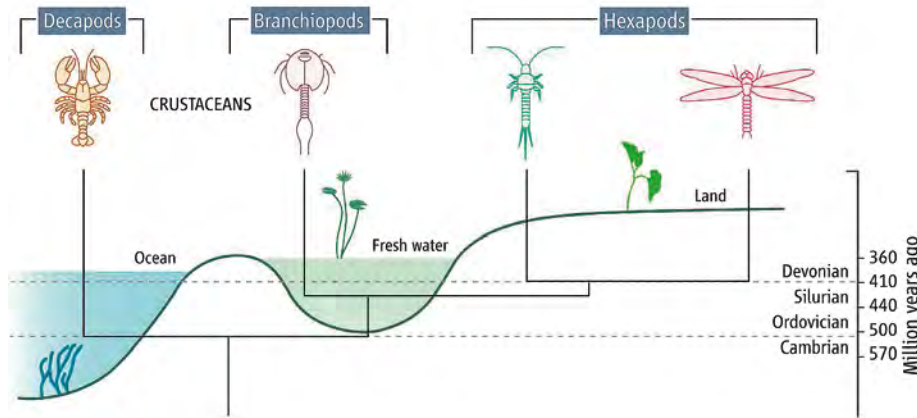
De hersens van Hexapoda vertonen veel overeenkomsten met die van Malacostraca (Osorio et al. 1995, Dohle 1998). De optische lob bijvoorbeeld bestaat uit drie zuilvormige zenuwknoepen (ganglia) verbonden door elkaar overlappende zenuwbanden (chiasmata). De hersens van de Branchiopoda en de Maxillopoda hebben een andere organisatie; de optische lob bestaat uit de twee buitenste ganglia verbonden door rechte zenuwstrengen (Nilsson & Osorio 1998, Strausfeld 2005). De hersens van de Remipedia lijken het meest op die van de Malacostraca en Hexapoda (Fanenbruck et al. 2004). De hersenstructuur van andere groepen Crustacea is minder goed bekend.

Ook vertonen insecten en kreeftachtigen overeenkomsten in de embryonale ontwikkeling van het zenuwstelsel die niet worden gedeeld met de duizendpootachtigen (Whittington 1996, Dohle 1998). De ontwikkeling en anatomie van de centrale, ventrale zenuwstreng gaat bij alle insecten op dezelfde manier en individuele homologe zenuwcellen (neuronen) kunnen worden geïdentificeerd in uiteenlopende diersoorten. Deze neuronenvormen ontstaan uit voorlopercellen (neuroblasten) in het ectoderm, waarvan er per segment aan iedere zijde 29 tot 31 zijn. Hier zijn gedetailleerde overeenkomsten vastgesteld met diverse soorten Decapoda (Malacostraca). De ontwikkeling van het zenuwstelsel van duizendpoten is anders, en lijkt meer op die van de spinachtigen (Nilsson & Osorio 1998, Whittington & Bacon 1998). In plaats van dertig individuele cellen vormen zich bij Myriapoda en Chelicerata per half segment zo'n dertig clusters van voorlopercellen in het ectoderm, die na hun differentiatie instulpen naar de binnenkant van het embryo om het zenuwstelsel te vormen (Dove & Stollewerk 2003, Kadner & Stollewerk 2004, Harzsch et al. 2005, Stollewerk & Chipman 2006) (zie figuur 6).

Verdere evidentie voor de homologie van het zenuwstelsel van insecten, springstaarten en kreeftachtigen komt van de ontwikkelingsgenen *Even-skipped* en *Engrailed* (Duman-Scheel & Patel 1999). Deze genen komen tijdens de embryonale ontwikkeling in bepaalde neuronenvormen tot expressie, hetgeen bijdraagt aan de herkenning van de individuele cellen. Duman-Scheel & Patel (1999) vonden hierdoor één neuron dat alleen bij insecten en Collembola aanwezig is, en niet bij Malacostraca of Branchiopoda; een nieuw argument voor de monofylie van de Hexapoda.

Discussie en conclusie

De moleculaire evidentie voor een nauwe verwantschap van de insecten met de kreeftachtigen is eigenlijk overweldigend, gezien de convergentie van zulke verschillende datasets: ribosomaal RNA en diverse eiwitcoderende genen van de celkern en het mitochondrion. Tel hierbij op de translocatie van het mitochondriale tRNA-gen in kreeftachtigen en hexapoden, en de gedetailleerde morfologische overeenkomsten in de anatomie van de ommatidia en het zenuwstelsel. Als gevolg van het



7. Schematische voorstelling van de evolutie van insecten uit kreeftachtige voorouders en de aanpassing van het leven op land. Bron: Glenner et al. (2006).

7. Schematic representation of the evolution of insects from a crustacean ancestor and adaptation to terrestrial life. Reprinted from Glenner et al. © (2006) with permission from AAAS.

nieuwe neurologische onderzoek neigen tegenwoordig ook de studies op basis van louter morfologische kenmerken naar de Pancrustacea-hypothese.

De Atelocerata-hypothese is gebaseerd op ideeën die deels onjuist zijn gebleken, zoals Mantons idee dat de kaken van Myriapoda en Hexapoda uit het volledige ledemaat zijn gevormd. Belangrijke, misschien wel alle, veronderstelde synapomorfieën van de Atelocerata kunnen verklaard worden als het resultaat van convergente evolutie en aanpassing aan het leven op land.

Bij dit alles vraag ik me af waarom niet breder wordt aangenomen dat de insecten zijn voortgekomen uit de kreeftachtigen. Vooral paleontologen tonen zich terughoudend. In hun prachtboek *The Evolution of Insects* merken Grimaldi en Engel zuinig op dat “the Pancrustacea is supported by some molecular analyses” (2005, p. 107), wat ook een paar jaar geleden beslist een understatement was. Het Koninklijk Natuurhistorisch Museum in Brussel, door mij bezocht in april 2007, stelt de oorsprong van de insecten nog ouderwets voor als “regenworm → duizendpoot → insect”, in plaats van “rondworm → kreeftachtige → insect”. De ijzeren stamboom van Naturalis in Leiden toont de indeling van de geleedpotigen als een onopgeloste vierdeling (Chelicerata + Myriapoda + Crustacea + Insecta). Ook tot de serie *Nederlandse Fauna* is de Pancrustacea-hypothese nog niet doorgedrongen (cf. van Achterberg & Peeters 2004, p.19).

Zeker, als een studie op basis van DNA-sequenties de traditionele stamboom overhoop haalt, is wantrouwen geboden. Er zijn allerlei methodologische uitdagingen, die we langzamerhand ontdekken en proberen te beantwoorden. Sommige resultaten van moleculair fylogenetisch onderzoek zijn onmiskenbaar onjuist. Maar de kreeftachtige oorsprong van de insecten komt niet uit de lucht vallen. Tot de tweede helft van de 20^e eeuw was dit een verbreide opvatting in de Duits- en Franstalige literatuur (e.g. Hansen 1893, Hanström 1926, 1928, Vandel 1949, meer referenties in Deuve 2001) (figuur 5). De morfologische argumenten voor de Pancrustacea waren deels al lang bekend, maar raakten ondergesneeuwd door gezaghebbende handboeken (bijvoorbeeld Snodgrass 1938, Manton 1977), die lange tijd de standaardreferentie waren voor de fylogenetische relaties van de geleedpotigen.

Zijn de Hexapoda monofyletisch? Hier gaat het om de positie van de Collembola en andere ‘Entognatha’. De eerste moleculaire studies verleenden in het algemeen maar matige steun aan een taxon Collembola + Insecta, of plaatsten de springstaarten apart van de insecten als zustergroep van een (andere) klasse van kreeftachtigen. De recentste en uitgebreidste studies op basis van nucleair DNA ondersteunen de Hexapoda echter ondubbelzinnig (o.a. Regier et al. 2005, Mallatt & Giribet 2006, Timmermans et al. 2008). Samen met de morfologische eviden-

tie geeft dit veel vertrouwen in de monofylie van deze groep.

Zijn de Hexapoda met sommige Crustacea meer verwant dan met andere? Meer in het algemeen is nog veel onzeker over de fylogenetische relaties binnen de Crustacea. Van de geleedpotigen zijn de Crustacea morfologisch het meest divers, en daarom moeilijk als groep te definiëren: “If one accepts the Mandibulata concept, it is really difficult to discern crustaceans” (Wägele 1993, p. 280). Tegen deze achtergrond is het goed mogelijk dat de Hexapoda ergens tussen de Crustacea thuis horen.

De compleetste studie van eiwit-coderende genen toont een monofyletische groep die Hexapoda + Branchiopoda + (Remipedia + Cephalocarida) omvat; de relaties tussen deze drie groepen zijn nog onopgelost (Regier et al. 2005). De belangrijkste andere studies wijzen de Branchiopoda aan als de zustergroep van de Hexapoda, maar missen sequentiedata van Remipedia en Cephalocarida. Een uitzondering is de studie op basis van 18S van Spears & Abele (1998), die geen eenduidige conclusies opleverde. Analyses van mitochondriale eiwitcoderende sequenties wijzen vaak de Malacostraca aan als zustergroep van de insecten. Hieraan kunnen we echter niet veel belang hechten, gezien de onmiskenbare problemen met deze data. Morfologische studies hebben vooral overeenkomsten van Hexapoda met Malacostraca aangetoond, maar dit komt mede doordat andere kreeftachtigen minder onderzocht zijn. Opmerkelijk is wel dat de bouw van de hersenen van de Hexapoda lijkt op zowel die van de Malacostraca als die van de Remipedia.

Het is dus waarschijnlijk dat de Crustacea parafyletisch zijn, maar welke kreeftachtigen het meest met de Hexapoda verwant zijn is nog onduidelijk. Op dit moment hebben de Branchiopoda, dan wel de groep bestaande uit de Remipedia en Cephalocarida, de beste papieren.

Een interessante eigenschap van Branchiopoda is dat ze voornamelijk van zoetwater bekend zijn. De oudst bekende fossielen die lijken op moderne Branchiopoda dateren van het begin van het Devoon, circa 410 miljoen jaar geleden (Glenner et al. 2006). Dat is ongeveer even oud als de oudste fossiele Hexapoda, die al kort na de vaatplanten het land koloniseerden. Er is kort geleden een mogelijke mariene voorloper van de Hexapoda gevonden in de Hunsrück in Rijnland-Palts (Haas et al. 2003), maar de interpretatie van dit fossiel is omstreden (Willmann 2005). Indien de Branchiopoda inderdaad de zustergroep van de Hexapoda blijken te zijn, is het waarschijnlijk dat hun gemeenschappelijke voorouder in zoetwater leefde. Dit zou de afwezigheid van oudere mariene fossielen van deze groepen verklaren (Glenner et al. 2006) (figuur 7).

Wat de Myriapoda betreft, die komen in moleculair onderzoek meestal naar voren als de zustergroep van de Chelicerata. Dit betekent dat ook de Mandibulata-hypothese (Crustacea +

Myriapoda + Hexapoda) wordt ondergraven. Dit is een resultaat dat niemand op morfologische gronden verwacht had. Ook de nieuwe gegevens over de bouw van het zenuwstelsel en de ogen duiden op de Pancrustacea als zustergroep van de duizendpootachtigen. Voor een hypothetisch taxon Myriapoda + Chelicerata zijn de namen Paradoxopoda (Mallatt et al. 2004) en Myriochelata (Pisani et al. 2004) voorgesteld. In één recente moleculaire studie (Mallatt & Giribet 2006) zien we echter de steun voor de Mandibulata, in de zin van Myriapoda + Pancrustacea, weer toenemen, zodat het laatste woord hierover nog niet is gezegd.

Door technologische vooruitgang zal het binnen enkele decennia mogelijk zijn om de meeste nog onopgehelderde verwantschapsrelaties met een grote mate van betrouwbaarheid te identificeren. De technieken om DNA-sequenties te bepalen worden grootschaliger en verder geautomatiseerd, waardoor steeds sneller en steeds goedkoper van steeds meer organismen

het volledige genoom bekend wordt. In de nieuwste generatie fylogenetische studies werkt men niet meer met één of enkele genen. In plaats daarvan wordt het hele genoom uitgekamd op zoek naar geschikte genen, zodat de reconstructie op veel meer data kan worden gebaseerd. Daarnaast kunnen allerlei aspecten van de organisatie van het genoom ('rare genomic events') in de analyse betrokken worden, zoals nu al veel gedaan wordt met de kleine mitochondriale genomen.

Dankwoord

Many thanks to Steffen Harzsch for helping me find the drawing of Hanström, and to Dennis Lavrov and all other copyright holders for their permission to reprint art work. Roy van Grunsven, Pieter Jan Nellestijn en Joke en Gerard van Erkelens stelden hun foto's beschikbaar.

Literatuur

- Abascal F, Posada D, Knight R & Zardoya R 2006. Parallel evolution of the genetic code in arthropod mitochondrial genomes. *PLoS Biology* 4: 711-718.
- Abascal F, Posada D & Zardoya R 2007. MtArt: A new model of amino acid replacement for Arthropoda. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1-5.
- Adoutte A & Philippe H 1993. The major lines of metazoan evolution: summary of the traditional evidence and lessons from ribosomal RNA sequence analysis. In: *Comparative Molecular Neurobiology* (Pichon Y, Ed.): 1-30. Birkhauser.
- Aguinaldo AMA, Turbeville JM, Linford LS, Rivera MC, Garey JR, Raff RA & Lake JA 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387: 489-492.
- Averof M & Akam M 1995. Insect-crustacean relationships: insights from comparative developmental and molecular studies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 347: 293-303.
- Boore JL 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27: 1767-1780.
- Boore JL, Collins TM, Stanton D, Daehler LL & Brown WM 1995. Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. *Nature* 376: 163-164.
- Boore JL, Lavrov DV & Brown WM 1998. Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature* 392: 667-668.
- Burmester 2002. Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *Journal of Comparative Physiology B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 172: 95-107.
- Burmester T 2001. Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily. *Molecular Biology and Evolution* 18: 184-195.
- Burmester T 2004. Evolutionary history and diversity of arthropod hemocyanins. *Micron* 35: 121-122.
- Burmester T, Massey J, Holman C., Zakharkin SO & Benes H 1998. The evolution of hexamerins and the phylogeny of insects. *Journal of Molecular Evolution* 47: 93-108.
- Cameron S, Miller K, D'Haese C, Whiting M & Barker S 2004. Mitochondrial genome data alone are not enough to unambiguously resolve the relationships of Entognatha, Insecta and Crustacea sensu lato (Arthropoda). *Cladistics* 20: 534-557.
- Carapelli A, Lio P, Nardi F, van der Wath E & Frati F 2007. Phylogenetic analysis of mitochondrial protein coding genes confirms the reciprocal paraphyly of Hexapoda and Crustacea. *BMC Evolutionary Biology* 7: Suppl 2 S8.
- Colgan DJ, McLauchlan A, Wilson GDF, Livingston SP, Edgecombe GD, Macaranas JM, Cassis G & Gray MRV 1998. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Australian Journal of Zoology* 46: 419-438.
- Cook C, Yue Q & Akam M 2005. Mitochondrial genomes suggest that hexapods and crustaceans are mutually paraphyletic. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272: 1295-1304.
- Cook CE, Smith ML, Telford MJ, Bastianello A & Akam M 2001. Hox genes and the phylogeny of the arthropods. *Current Biology* 11: 759-763.
- Delsuc F, Phillips M & Penny D 2003. Comment on hexapod origins: monophyletic or paraphyletic? *Science* 301: 1482.
- Deuve T 2001. Foreword. *Annales de la Société Entomologique de France* 37: 7-10.
- Dohle W 1998. Myriapod-insect relationships as opposed to an insect-crustacean sister-group relationship. In: *Arthropod relationships* (Fortey RA & Thomas RH, Eds): 305-315. Chapman & Hall.
- Dohle W 2001. Are the insects terrestrial crustaceans? A discussion of some new facts and arguments and the proposal of the proper name 'tetraconata' for the monophyletic unit Crustacea. *Annales de la Société Entomologique de France* 37: 85-104.
- Dopazo H & Dopazo J 2005. Genome-scale evidence of the nematode-arthropod clade. *Genome Biology* 6: R41.
- Dove H & Stollewerk A 2003. Comparative analysis of neurogenesis in the myriapod *Glomeris marginata* (Diplopoda) suggests more similarities to chelicerates than to insects. *Development* 130: 2161-2171.
- Duman-Scheel M & Patel NH 1999. Analysis of molecular marker expression reveals neuronal homology in distantly related arthropods. *Development* 126: 2327-2334.
- Dunn CW, Hejnol A, Matus DQ, Pang K, Browne WE, Smith SA, Seaver E, Rouse GW, Obst M, Edgecombe GD, Sorensen MV, Haddock SHD, Schmidt-Rhaesa A, Okusu A, Kristensen RM, Wheeler WC, Martindale MQ & Giribet G 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452: 745-749.
- Fanenbruck M, Harzsch S & Wägele JW 2004. The brain of the Remipedia (Crustacea) and an alternative hypothesis on their phylogenetic relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 3868-3873.
- Field KG, Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Ghiselin MT, Raff EC, Pace NR & Raff RA 1988. Molecular phylogeny of the animal kingdom. *Science* 239: 748-753.
- Friedrich M & Tautz D 1995. Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods. *Nature* 376: 165-167.
- Friedrich M & Tautz D 2001. Arthropod rDNA phylogeny revisited: A consistency analysis using Monte Carlo simulation. *Annales de la Société Entomologique de France* 37: 21-40.
- García-Machado E, Pempera M, Dennebouy N, Oliva-Suarez M, Mounolou J-C & Monnerot M 1999. Mitochondrial genes collectively suggest the paraphyly of Crustacea with respect to Insecta. *Journal of Molecular Evolution* 49: 142-149.
- Giribet G, Carranza S, Baguna J, Riutort M & Ribera C 1996. First molecular evidence for the existence of a Tardigrada + Arthropoda clade. *Molecular Biology and Evolution* 13: 76-84.
- Giribet G, Edgecombe GD, Carpenter JM, D'Haese CA & Wheeler WC 2004. Is Ellipura monophyletic? A combined analysis of basal hexapod relationships with emphasis on the origin of insects. *Organisms Diversity & Evolution* 4: 319-340.
- Giribet G & 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, Richter S, Edgecombe GD & Wheeler WC 2005. The position of crustaceans within Arthropoda-Evidence from nine molecular loci and morphology. *Crustacean Issues* 16: 307-352.
- Glenner H, Thomsen P, Hebsgaard M, Sorensen M & Willerslev E 2006. The origin of insects. *Science* 314: 1883.
- Grimaldi DA & Engel MS 2005. *Evolution of the insects*. Cambridge University Press.
- Haas F, Waloszek D & Hartenberger R 2003. *Devonohexapodus bocksbergensis*, a new marine hexapod from the Lower Devonian Hunsrück Slates, and the origin of Atelocerata and Hexapoda. *Organisms, Diversity & Evolution* 3: 39-54.
- Hansen HJ 1893. Zur Morphologie der Gliedmassen und Mundtheile bei Crustaceen und Insekten. *Zoologischer Anzeiger* 16: 193-198, 201-212.
- Hanström B 1926. Eine genetische Studie über die Augen und Sehzentren von

- Turbelliden, Anneliden und Arthropoden (Trilobiten, Xiphosuren, Euryptiden, Arachnoiden, Myriapoden, Crustaceen und Insekten). Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar 4: 1-176.
- Hanström B 1928. Vergleichende Anatomie des Nervensystems der wirbellosen Tiere unter Berücksichtigung seiner Funktion. Springer.
- Harzsch S 2006. Neurophylogeny: Architecture of the nervous system and a fresh view on arthropod phylogeny. *Integrative and Comparative Biology* 46: 162.
- Harzsch S, Müller C & Wolf H 2005. From variable to constant cell numbers: cellular characteristics of the arthropod nervous system argue against a sister-group relationship of Chelicerata and 'Myriapoda' but favour the Mandibulata concept. *Development Genes and Evolution* 215: 53-68.
- 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. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 100-116.
- Hwang UW, Friedrich M, Tautz D, Park CJ & Kim W 2001. Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates. *Nature* 413: 154-156.
- Kadner D & Stollewerk A 2004. Neurogenesis in the chilopod suggests more similarities to chelicerates than to insects. *Development Genes and Evolution* 214: 367-379.
- Kjer KM 2004. Aligned 18S and Insect Phylogeny. *Systematic biology* 53: 506-514.
- Kraus O 2001. 'Myriapoda' and the ancestry of the Hexapoda. *Annales de la Société Entomologique de France* 37: 105-128.
- Kristensen NP 1998. The groundplan and basal diversification of the hexapods. In: *Arthropod Relationships* (Fortey RA & Thomas RH, Eds): 281-303. Chapman & Hall.
- Kukalová-Peck J 1992. The 'Uniramia' do not exist: The ground plan of the Pterygota as revealed by permian Diaphanopteroidea from Russia (Insecta: Paleodictyopteroidea). *Canadian Journal of Zoology* 70: 236-255.
- Kusche K & Burmester T 2001. Diplopod hemocyanin sequence and the phylogenetic position of the Myriapoda. *Molecular Biology and Evolution* 18: 1566-1573.
- Lankester ER 1904. The structure and classification of the Arthropoda. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 38: 523-582.
- Lavrov D, Brown W & Boore J 2004. Phylogenetic position of the Pentastomida and (pan) crustacean relationships. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 271: 537-544.
- Lavrov DV, Brown WM & Boore JL 2000. A novel type of RNA editing occurs in the mitochondrial tRNAs of the centipede *Lithobius forficatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 13738-13742.
- Luan Y, Mallatt J, Xie R, Yang Y & Yin W 2005. The phylogenetic positions of three basal-hexapod groups (Protura, Diplura, and Collembola) based on ribosomal RNA gene sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22: 1579-1592.
- Mallatt J & Giribet G 2006. Further use of nearly complete 28S and 18S rRNA genes to classify Ecdysozoa: 37 more arthropods and a kinorhynch. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 772-794.
- Mallatt JM, Garey JR & Shultz JW 2004. Ecdysozoan phylogeny and Bayesian inference: first use of nearly complete 28S and 18S rRNA gene sequences to classify the arthropods and their kin. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 178-191.
- Manton SM 1964. Mandibular mechanisms and the evolution of arthropods. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B* 247: 1-183.
- Manton SM 1977. *The Arthropoda: Habits, functional morphology, and evolution*. Clarendon Press.
- Müller CHG, Rosenberg J, Richter S & Meyer-Rochow VB 2003. The compound eye of *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758) (Chilopoda: Notostigmophora): an ultrastructural reinvestigation that adds support to the Mandibulata concept. *Zoomorphology* 122: 191-209.
- Nardi F, Carapelli A, Fanciulli PP, Dallai R & Frati F 2001. The complete mitochondrial DNA sequence of the basal hexapod *Tetrodonthophora bielaniensis*: evidence for heteroplasmy and tRNA translocations. *Molecular Biology and Evolution* 18: 1293-1304.
- Nardi F, Spinsanti G, Boore JL, Carapelli A, Dallai R & Frati F 2003. Hexapod origins: monophyletic or paraphyletic? *Science* 299: 1887-1889.
- Nilsson D-E & Osorio D 1998. Homology and parallelism in arthropod sensory processing. In: *Arthropod Relationships* (Fortey RA & Thomas RH, Eds): 333-347. Chapman & Hall.
- Osorio D, Averof M & Bacon JP 1995. Arthropod evolution: great brains, beautiful bodies. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 449-454.
- Panganiban G, Sebring A, Nagy L & Carroll S 1995. The development of crustacean limbs and the evolution of arthropods. *Science* 270: 1363-1366.
- Paulus HF 1979. Eye structure and the monophyly of the Arthropoda. In: *Arthropod Phylogeny* (Gupta AP, Ed.): 299-383. Van Nostrand Reinhold.
- Paulus HF 2000. Phylogeny of the Myriapoda - Crustacea - Insecta: a new attempt using photoreceptor structure. *Journal of Zoological Systematics & Evolutionary Research* 38: 189-208.
- Peterson KJ & Eernisse DJ 2001. Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: inferences from morphology and 18S rDNA gene sequences. *Evolution & Development* 3: 170-205.
- Pisani D, Poling L, Lyons-Weiler M & Hedges S 2004. The colonization of land by animals: molecular phylogeny and divergence times among arthropods. *BMC Biology* 2: 1.
- Podsiadlowski L, Braband A & Mayer G 2007. 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*: (MBE Advance Access published on October 13).
- Popadić A, Panganiban G, Rusch D, Shear WA & Kaufman TC 1998. Molecular evidence for the gnathobasic derivation of arthropod mandibles and for the appendicular origin of the labrum and other structures. *Development Genes and Evolution* 208: 142-150.
- Regier J, Shultz J & Kambic R 2004. Phylogeny of basal hexapod lineages and estimates of divergence times. *Annals of the Entomological Society of America* 97: 411-419.
- Regier J, Shultz J & Kambic R 2005. Pancrustacean phylogeny: hexapods are terrestrial crustaceans and maxillopods are not monophyletic. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272: 395-401.
- Regier JC & Shultz JW 1997. Molecular phylogeny of the major arthropod groups indicates polyphyly of crustaceans and a new hypothesis for the origin of hexapods. *Molecular Biology and Evolution* 14: 902-913.
- Regier JC & Shultz JW 1998. Evolutionary relationships of metazoan phyla: advances, problems, and approaches - molecular phylogeny of arthropods and the significance of the Cambrian 'explosion' for molecular systematics. *American Zoologist* 38: 918-928.
- Regier JC & Shultz JW 2001. Elongation factor-2: a useful gene for arthropod phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20: 136-148.
- Rogozin I, Wolf Y, Carmel L & Koonin E 2007. Ecdysozoan clade rejected by genome-wide analysis of rare amino acid replacements. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1080.
- Saccone C, De Giorgi C, Gissi C, Pesole G & Reyes A 1999. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238: 195-209.
- Sánchez D, Ganfornina M, Gutiérrez G & Bastiani M 1998. Molecular characterization and phylogenetic relationships of a protein with potential oxygen-binding capabilities in the grasshopper embryo. A hemocyanin in insects? *Molecular Biology and Evolution* 15: 415-426.
- Schmidt-Rhaesa A, Bartolomeaus T, Lemburg C, Ehlers U & Garey JR 1998. The position of the Arthropoda in the phylogenetic system. *Journal of Morphology* 238: 263-286.
- Scholtz G, Mittmann B & Gerberding M 1998. The pattern of Distal-less expression in the mouthparts of crustaceans, myriapods and insects: New evidence for a gnathobasic mandible and the common origin of Mandibulata. *The International Journal of Developmental Biology* 42: 801-810.
- Schram FR & Hof CHJ 1998. Fossils and the interrelationships of major crustacean groups. In: *Arthropod Fossils and Phylogeny* (Edgecombe GD, Ed.): 233-302. Columbia University Press.
- Shultz JW & Regier JC 2000. Phylogenetic analysis of arthropods using two nuclear protein-coding genes supports a crustacean + hexapod clade. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 267: 1011-1019.
- Snodgrass RE 1938. Evolution of Annelida, Onychophora and Arthropoda. *Smithsonian Miscellaneous Collections* 97: 1-159.
- Snodgrass RE 1950. Comparative studies on the jaws of mandibulate arthropods. *Smithsonian Miscellaneous Collections* 116: 1-85.
- Spears T & Abele LG 1998. Crustacean phylogeny inferred from 18S rDNA. In: *Arthropod Relationships* (Fortey RA & Thomas RH, Eds): 169-187. Chapman & Hall.
- Spoor F, Leakey MG, Gathogo PN, Brown FH, Anton SC, McDougall I, Kiarie C, Manthi FK & Leakey LN 2007. Implications of new early Homo fossils from Ileret, east of Lake Turkana, Kenya. *Nature* 448: 688-691.
- Stollewerk A & Chipman A 2006. Neurogenesis in myriapods and chelicerates and its importance for understanding arthropod relationships. *Integrative and Comparative Biology* 46: 195.

- Telford MJ, Wise MJ & Gowri-Shankar V 2005. Consideration of RNA secondary structure significantly improves likelihood-based estimates of phylogeny: Examples from the Bilateria. *Molecular Biology and Evolution* 22: 1129-1136.
- Timmermans MJTN, Roelofs S, Marien J & van Straalen NM 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: 83 (provisional electronic publication).
- Turbeville JM, Pfeifer D, Field KG & Raff RA 1991. The phylogenetic status of arthropods, as inferred from 18S rRNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 8: 669-686.
- van Achterberg C & Peeters TMJ 2004. Naamgeving, verwantschappen en diversiteit. In: *De wespen en mieren van Nederland* (Reemer M, van Loon AJ & Peeters TMJ, Eds). KNNV Uitgeverij/EIS Nedeland.
- Vandel A 1949. Généralités composition de l'embranchement. In: *Traité de Zoologie. Anatomie, systématique, biologie. Tome VI: onychophores tardigrades arthropodes trilobitomorpes chélicerates* (Grassé P-P, Ed.): 79-158. Mason.
- Wägele JW 1993. Rejection of the «Uniramia» hypothesis and implications of the Mandibulata concept. With 6 figures. *Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere* 120: 253-288.
- Wheeler WC 1998a. Molecular systematics and arthropods. In: *Arthropod Fossils and Phylogeny* (Edgecombe GD, Ed.): 9-32. Columbia University Press.
- Wheeler WC 1998b. Sampling, groundplans, total evidence and the systematics of arthropods. In: *Arthropod Relationships* (Fortey RA & Thomas RH, Eds): 87-96. Chapman & Hall.
- Wheeler WC, Cartwright P & Hayashi CY 1993. Arthropod phylogeny - a combined approach. *Cladistics* 9: 1-39.
- Whittington PM 1996. Evolution of neural development in the arthropods. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 7: 605-614.
- Whittington PM & Bacon JP 1998. The organization and development of the arthropod ventral nerve cord: insights into arthropod relationships. In: *Arthropod Relationships* (Fortey RA & Thomas RH, Eds): 349-367. Chapman & Hall.
- Willmann R 2005. Reinterpretation of an alleged marine hexapod stem-group representative. *Organisms Diversity & Evolution* 5: 199-202.
- Wilson K, Cahill V, Ballment E & Benzie J 2000. The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon*: Are malacostracan crustaceans more closely related to insects than to branchiopods? *Molecular Biology and Evolution* 17: 863-874.
- Xu W, Jameson D, Tang B & Higgs P 2006. The relationship between the rate of molecular evolution and the rate of genome rearrangement in animal mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution* 63: 375-392.
- Zheng J, Rogozin IB, Koonin EV & Przytycka TM 2007. Support for the Coelomata clade of animals from a rigorous analysis of the pattern of intron conservation. *Molecular Biology and Evolution* 24: 2583-2592.
- Zrzavý J, Hypša V & Vlášková M 1998. Arthropod phylogeny: taxonomic congruence, total evidence and conditional combination approaches to morphological and molecular data sets. In: *Arthropod Relationships* (Fortey RA & Thomas RH, Eds): 97-107. Chapman & Hall.
- Zrzavý J & Štys P 1997. The basic body plan of arthropods: insights from evolutionary morphology and developmental biology. *Journal of Evolutionary Biology* 10: 353.

Ontvangen: 31 maart 2006
Geaccepteerd: 21 april 2008

Summary

The crustacean origin of insects

Already in the 19th century scientists suggested that insects descend from crustaceans. During the larger part of the 20th century, however, theories prevailed that indicated the myriapods as their closest relatives. Molecular studies, starting in the 1980s, almost unequivocally support the old hypothesis of a crustacean origin. In addition, recent morphological studies give further support to this hypothesis, thanks to new techniques allowing the identification of individual cells and gene activity during embryonic ontogenesis. This paper summarises an extensive review of the current knowledge of the origin of insects.

Louis Boumans

Universiteit van Amsterdam
Zoölogisch Museum Amsterdam
Mauritskade 61
1092 AD Amsterdam
lboumans@science.uva.nl

