

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/288817813>

Atti Accademia Nazionale Entomologia

Conference Paper · May 2011

CITATIONS

0

READS

214

1 author:



[Antonio Carapelli](#)

University of Siena

216 PUBLICATIONS 2,956 CITATIONS

SEE PROFILE

LA FILOGENESI DEGLI ESAPODI BASALI, ASPETTI CONTROVERSI E RECENTI ACQUISIZIONI

ANTONIO CARAPELLI (*) - FRANCESCO NARDI (*) - ROMANO DALLAI (*) - FRANCESCO FRATI (*)

(*) *Dipartimento di Biologia Evolutiva, Università di Siena, via A. Moro 2, 53100 Siena, Italia.*

Lettura tenuta durante la Giornata culturale «Evoluzione ed adattamenti degli Artropodi – Contributi di base alla conoscenza degli insetti». Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 13 maggio 2011.

The phylogeny of basal hexapods, new data and controversial results

The application of novel techniques in molecular phylogenetics has opened to the study and critical reevaluation of the phylogenetic relationships among many and different animal groups, including arthropods. Such studies have sometimes produced reconstructions that are in conflict with well supported morphological phylogenies and have seldom lead to a reevaluation and/or dismission of phylogenetic hypotheses widely supported in the past.

In this contribution, the most important results of molecular phylogenetics on the phylogeny of hexapods are presented, with special reference to the relationships among basal hexapod groups. Special attention is given to supra-ordinal relationships and monophyly of five relevant groups (the “apterygotes”: Protura, Collembola, Diplura, Microcoryphia e Zygentoma), that constitute some among the most hotly debated issues in arthropod phylogeny. Areas of consensus/conflict between phylogenies obtained based on molecular and morphological data are further identified.

KEY WORDS: basal hexapods, Entognatha, molecular phylogenetics.

BACKGROUND MORFOLOGICO

Nonostante il grande numero di data set morfologici, paleontologici e molecolari che sono stati prodotti e i numerosi metodi di analisi applicati a questi, le relazioni filogenetiche fra i diversi gruppi di esapodi basali ed il problema della monofilia stessa degli esapodi *tout court* rimangono temi controversi (NARDI *et al.*, 2003a,b; DELSUC *et al.*, 2003; CAMERON *et al.*, 2004; GIRIBET *et al.*, 2004; BITSCH *et al.*, 2004; LUAN *et al.*, 2005; CARAPELLI *et al.*, 2007; REGIER *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2011).

I cinque gruppi di esapodi basali (Protura, Collembola, Diplura, Microcoryphia e Zygentoma), in passato inclusi nel taxon “Apterygota” oggi non più considerato valido (HENNIG, 1981; BITSCH & BITSCH, 1998, 2000; BRUSCA & BRUSCA 1990), sono tradizionalmente classificati in base alla struttura del loro apparato boccale. Tuttavia scenari evolutivi diversi sono stati proposti riguardo alle loro relazioni filogenetiche. La visione tradizionale (HENNIG, 1981; Kristensen, 1981) interpreta la presenza di pieghe della capsula cefalica che racchiudono le mandibole e le prime mascelle (condizione entotrofica) come il carattere sinapomorfico più importante per raggruppare Protura, Collembola e Diplura nel taxon Entognatha. Nel contesto degli Entognatha, Protura e Collembola sono in genere considerati come sister-groups, andando a formare il taxon Ellipura. Questi due ordini condividono numerosi

caratteri presumibilmente sinapomorfi, quali l'assenza di cerci (da qui il nome Ellipura), una condizione entotrofica maggiormente pronunciata, la presenza di unghie impari nel pretarso (KRISTENSEN, 1981) e la *linea ventralis* (un solco cuticolare ventrale che si estende longitudinalmente dal labium al torace). I Collembola sono probabilmente uno dei più antichi gruppi di artropodi terrestri, visto che sono stati ritrovati resti di esemplari dell'ordine risalenti al Devoniano (circa 400 milioni di anni fa) (HIRST & MAULIK, 1926). I collemboli, diversamente dai veri insetti presentano solamente 6 segmenti addominali e mancano di Tubuli Malpighiani per cui l'escrezione è affidata all'intestino medio, al tessuto adiposo e al tegumento il quale continua ad essere periodicamente sostituito anche negli esemplari adulti. I caratteri morfologici distintivi dei collemboli sono due organi peculiari: la furca ed il colloforo. La furca è un organo saltatorio che consente a questi esapodi basali di compiere brevi balzi per sfuggire ad un predatore; il colloforo o “tubo ventrale” è invece implicato nello scambio di liquidi con l'ambiente ed è funzionale nell'adesione al substrato. La furca e il tubo ventrale sono autoapomorfie: caratteri distintivi esclusivi di questo taxon. Sistematicamente i Collembola vengono classificati nei 3 sottordini Arthropleona, Symphypleona e Neelipleona, a seconda della morfologia corporea.

I proturi sono indubabilmente uno dei gruppi di esapodi più atipici e mostrano molteplici carat-

teri unici, quali: lo sviluppo anamorfico, l'assenza di antenne, la presenza di 12 segmenti addominali negli adulti, la posizione delle aperture genitali fra l'11^{mo} ed il 12^{mo} segmento addominale, oltre a peculiarità nella struttura dell'assonema spermatico (DALLAI, 1980, 1994) e nella segregazione del mesoderma (MACHIDA & TAKAHASHI, 2003). Essendo privi di antenne, il primo paio di zampe (anteriori) supplisce alla funzione sensoriale, mentre le altre quattro zampe sono utilizzate per la locomozione. Inoltre, lo sviluppo anamorfico è una condizione che i Protura condividono con alcuni miriapodi, mentre risulta una modalità di sviluppo unica fra gli esapodi. Viste le particolarità della loro morfologia, la monofilia degli Ellipura e la posizione dei Protura, nel contesto degli esapodi, rimangono controverse (DALLAI, 1980, 1989; BITSCH & BITSCH, 1998; D'HAESE, 2002; GIRIBET *et al.*, 2004).

L'ordine Diplura è formato da tre linee evolutive, Campodeoidea, Japygoidea e Projapygoidea. Alle caratteristiche comuni e distintive dei dipluri (cerci sull'ultimo segmento addominale, assenza di occhi, ecc.) sono contrapposte alcune evidenti differenze morfologiche tra le famiglie dell'ordine (ad es: forma dei cerci filiformi o a pinza; morfologia degli spermi e struttura degli ovari).

Negli ultimi vent'anni, le caratteristiche morfologiche condivise da Protura, Collembola e Diplura, *in primis* il tipo di apparato boccale (entognato) con pezzi inclusi in pliche cefaliche, sono state reinterpretate da diversi autori (KOCH, 1997; KRAUS, 1997; vedi più avanti nel paragrafo). Le nuove analisi morfologiche hanno quindi portato a non considerare più gli Entognatha come un gruppo monofiletico, in quanto la condizione entotrofica osservata in proturi, collemboli e dipluri potrebbe rappresentare un carattere convergente (BITSCH, 1994), che si è originato parallelamente anche in una grande varietà di altri artropodi non-esapodi, quali: chilopodi, pauropodi, diplopodi e onicofori (DALLAI, 1980; BITSCH, 1994; KRAUS, 1997). Nella visione tradizionale (HENNIG, 1981) gli Entognatha sono comunque considerati il sister-taxon degli Ectognatha (=Insecta *sensu stricto*; KRISTENSEN, 1981), altresì definiti dalla presenza di pezzi boccali, mandibole e mascelle, esposti (condizione ectotrofica) (KRISTENSEN, 1997; KLASS & KRISTENSEN, 2001, WHEELER *et al.*, 2001).

I due restanti gruppi di atterigoti, Microcoryphia e Zygentoma, noti anche come Thysanura *s.l.*, sono inclusi fra gli Ectognatha, insieme agli Pterygota. I Microcoryphia sono caratterizzati da un'articolazione delle mandibole monocondila e sono considerati il gruppo più basale fra gli Ectognatha, sister-group di Zygentoma+Pterygota. Questi ultimi condividono invece un'articolazione delle mandi-

bole dicondila, e pertanto prendono il nome di Dicondylia.

Fenomeni di convergenza evolutiva, dovuti ad adattamenti funzionali paralleli, possono rendere lo studio comparativo dei caratteri anatomici problematico e hanno portato, in alcuni casi, alla definizione di filogenesi non affidabili. Come già detto, fra gli atterigoti, l'entognatia di Protura, Collembola e Diplura è stata considerata dalla maggior parte degli autori del passato un buon carattere tassonomico a supporto della loro affinità, mentre si considera oggi una condizione acquisita indipendentemente, associata al particolare tipo di alimentazione di questi gruppi. A questo proposito, MANTON (1973, 1977) ha mostrato che il tipo di entognatia che caratterizza Protura, Collembola e Diplura è fondamentalmente diverso, suggerendo che questa condizione potrebbe essere stata acquisita indipendentemente nei tre gruppi. Questo tema è stato ripreso da KUKALOVÁ-PECK (1987) che, descrivendo la condizione semi-entotrofica (con mandibole e mascelle solo parzialmente esposte) nel dipluro japygide fossile *Testajapyx thomasi*, interpreta la condizione entognata dei moderni Diplura come un'acquisizione secondaria, parallela, ma indipendente da quella che caratterizza gli Ellipura. L'autrice altresì suggerisce il riposizionamento dei Diplura come sister taxon degli Ectognatha, con conseguente dismissione della monofilia degli Entognatha. In aggiunta a questa interpretazione sistematica di *Testajapyx thomasi*, che è stata peraltro messa ripetutamente in discussione (BITSCH, 1994; BOURGOIN, 1996), altre indicazioni a supporto della non monofilia degli Entognatha sono state proposte da KRAUS (1997) e KOCH (1997). Questi autori interpretano l'epimorfosi, cioè la condizione che vede tutti i segmenti addominali già presenti a partire dal primo stadio giovanile, come un carattere sinapomorfico di Diplura ed Ectognatha. Tuttavia anche i Collembola, fra gli Ellipura, mostrano un tipico sviluppo epimorfico mentre, come già detto, l'anamorfosi, cioè l'acquisizione di segmenti addominali aggiuntivi durante lo sviluppo che caratterizza anche alcuni miriapodi, potrebbe altresì essere una condizione plesiomorfa conservata dai Protura. Un'ulteriore potenziale sinapomorfia di Diplura+Ectognatha è la perdita dell'organo temporale (KOCH, 1997). Inoltre, alcuni caratteri ultrastrutturali legati ai tubuli accessori dell'assonema dello spermatozoo sono stati interpretati a supporto del posizionamento dei Diplura sulla linea evolutiva degli Ectognatha (DALLAI & AFZELIUS, 1999; DALLAI *et al.*, 2011), suggerendo ancora una volta la dismissione del taxon Entognatha. Infatti la presenza di tubuli accessori potrebbe essere considerata una condizione sinapomorfica di Diplura+Insecta *s.s.*, originatasi a partire

dal ramo evolutivo principale degli esapodi solo dopo la diversificazione di Protura e Collembola, che di tubuli accessori sono privi. Inoltre, entrambi i gruppi principali di dipluri, Campodeina e Japygina, mostrano tubuli accessori con 13 protofilamenti, a supporto della monofilia dei Diplura.

STYS & BILINSKI (1990), studiando l'apparato riproduttore femminile dei Diplura nel contesto degli esapodi basali, hanno inoltre ipotizzato che i Diplura (Japygina+Campodeina) potrebbero rappresentare un gruppo parafiletico, con i Campodeina posizionati come sister-taxon degli Ellipura, con cui condividono la presenza di ovarioli meroistici, indipendentemente degli Japygina che sono caratterizzati da una condizione panoistica. Gli ovari dei Protura sono, infatti, meglio interpretabili come secondariamente panoistici, cioè evolutisi a partire da una condizione iniziale di ovari meroistici politrofici. Inoltre, gli ovari di Protura, Collembola e Campodeina sono sacciformi, mentre quelli degli Japygina sono composti da ovarioli primariamente panoistici disposti in maniera segmentale, osservazione che ha portato STYS & BILINSKI (1990) ad ipotizzare per gli Japygina una condizione basale fra gli Entognatha. Nonostante queste osservazioni, la maggioranza degli autori supporta tuttora la monofilia dei Diplura. Riguardo alla loro posizione filogenetica, KRISTENSEN (1997), pur accettandone la monofilia, sostiene che non esistano evidenze sufficienti per risolvere la tricotomia basale fra Ellipura, Diplura e Ectognatha, idea che verrà ripresa anche in seguito da WHEELER *et al.* (2001).

Un ulteriore punto conteso riguardo alla filogenesi degli atterigoti è la supposta monofilia degli Zygentoma. Fra questi i Lepidotrichidae, infatti, rappresentati dalla specie fossile *Lepidotrix pilifera* e dalla sola specie vivente *Tricholepidion gertschi*, mostrano caratteristiche della mandibola interpretabili a supporto di una loro collocazione come gruppo basale dei Dicondylia (KRISTENSEN, 1981; STANICZEK, 2000; BEUTEL & GORB, 2001), implicando la condizione parafiletica degli Zygentoma.

NATURA DEI DATI MOLECOLARI

Il disaccordo fra le ipotesi filogenetiche proposte da diversi autori su base morfologica ha stimolato l'acquisizione di data set alternativi e l'applicazione di metodi nuovi e più accurati per l'analisi dei dati. In questo contesto, l'analisi di dati molecolari, da soli o insieme a quelli morfologici, ha fornito nuovi e promettenti sistemi di caratteri indipendenti per studiare le relazioni filogenetiche a diversi livelli all'interno degli artropodi.

I data set molecolari possono essere classificati secondo schemi che ne mettono in luce le diverse caratteristiche: secondo il genoma da cui derivano (nucleare o mitocondriale), il tipo di gene (codificante per proteina o per RNA), o secondo la natura del dato analizzato (sequenze nucleotidiche o aminoacidiche, oppure dati strutturali, quali la posizione dei geni o la distribuzione degli introni). Ogni diverso marcatore molecolare ha le sue caratteristiche e peculiarità, che saranno qui descritte brevemente, che influenzano gli approcci metodologici all'analisi delle sequenze, nonché la loro applicabilità a problemi filogenetici diversi. Negli studi di relazioni filogenetiche "profonde", come nel caso di quelle fra i gruppi di esapodi basali, è appropriato l'uso di marcatori che evolvono lentamente (SIMON *et al.*, 1994) ed è necessaria una certa cautela quando si lavora con sequenze, o parti di sequenze, che sono molto divergenti. I geni che codificano per RNA ribosomali, presenti sia nel genoma nucleare (5.8S, 18S e 28S rDNA) che mitocondriale (12S e 16S rDNA), sono generalmente composti da un mosaico di regioni molto conservate intercalate da altre ipervariabili (SIMON *et al.*, 1994). Mentre queste ultime, che generalmente sono caratterizzate da eventi di sostituzione multipla e da indels (inserzioni e delezioni) di lunghezza variabile, sono problematiche sul fronte dell'allineamento (vedi sotto), le regioni più conservate possono contenere informazioni utili per la risoluzione di eventi filogenetici antichi. Rispetto ai geni in singola copia codificanti per subunità proteiche, i geni per rRNA nucleari sono generalmente più facili da amplificare mediante PCR, dal momento che sono presenti in centinaia di copie sul genoma. Un simile vantaggio tecnico si riscontra anche per i geni per rRNA mitocondriali, dal momento che copie multiple del genoma mitocondriale si trovano in ciascuna cellula. Come conseguenza di questi vantaggi tecnici, i geni ribosomali (da soli o in combinazione con dati morfologici) sono fra le prime sequenze ad essere state estensivamente applicate allo studio delle relazioni filogenetiche dei grandi gruppi di artropodi, includendo anche rappresentati dei taxa di atterigoti (WHEELER, 1989; FRIEDRICH & TAUTZ, 1995; WHITING *et al.*, 1997; GIRIBET & RIBERA, 1998, 2000; WHEELER *et al.*, 2001; D'HAESE, 2002; KJER, 2004; MALLATT *et al.*, 2004; LUAN *et al.*, 2005). L'affidabilità delle analisi filogenetiche basate su geni ribosomali è comunque fortemente influenzata dalla qualità dell'allineamento, un fattore critico in molti studi di questo tipo (Swofford *et al.*, 1996). A differenza dei geni codificanti per proteine, dove la definizione dell'omologia fra posizioni nucleotidiche è guidata dall'organizzazione delle sequenze in codoni, l'allineamento di geni per rRNA risulta più critico, e informazioni di natura strutturale sono

state talvolta utilizzate per migliorarlo, spesso con risultati promettenti (SIMON *et al.*, 1994; HICKSON *et al.*, 2000; PAGE, 2000, CARAPPELLI *et al.*, 2004; KJER, 2004).

I geni codificanti per proteine (protein coding genes, PCGs) forniscono un set di dati di sequenza diverso e indipendente. L'allineamento è in genere più affidabile, in quanto l'organizzazione in codoni, insieme alla possibilità di confrontare anche le relative traduzioni aminoacidiche, forniscono una guida per la definizione dell'allineamento. Una limitazione tecnica dei PCGs nucleari è che questi sono presenti nel genoma in singola copia, complicando talvolta la loro amplificazione mediante PCR. Inoltre, nei genomi diploidi, queste sequenze si possono trovare in forma eterozigote, anche se questo non è in genere un problema sostanziale quando si studiano relazioni filogenetiche antiche. Un terzo potenziale problema nell'utilizzo di PCGs è la possibile presenza di introni, variabili sia come numero che come lunghezza (ad esempio la sequenza codificante del gene EF-1 α nei collemboli è interrotta da 2-3 introni di medie dimensioni; Carapelli *et al.*, 2000) che complica l'amplificazione del gene a partire da DNA genomico. Questo problema può essere aggirato applicando la tecnica della RT-PCR su un isolato di mRNA (REGIER & SHULTZ, 1997). Tuttavia, se l'amplificazione del gene intero a partire da DNA genomico risulta possibile, la stessa presenza/assenza degli introni può essere interpretata in termini filogenetici e fornire un ulteriore set di dati potenzialmente informativo (CARAPPELLI *et al.*, 2000). Fino a poco tempo fa, solo un numero limitato di geni nucleari codificanti per proteine era stato applicato allo studio della filogenesi degli artropodi: gli Elongation Factor 1a e 2, la RNA polymerase II, gli istoni H3, U2 ed i geni *Hox* (REGIER & SHULTZ, 1997; COLGAN *et al.*, 1998; SHULTZ & REGIER, 2000; REGIER *et al.*, 2004, 2005; COOK *et al.*, 2001; GIRIBET *et al.*, 2004). Recentemente, grazie al consolidamento delle tecniche di amplificazione di sequenze retrotrascritte da RNA messaggeri (EST), è stato possibile ottenere un gran numero di dati di "filogenomica", basati sull'analisi dei trascrittomi, in grado di definire le relazioni filogenetiche tra le principali linee evolutive di artropodi in maniera più accurata (REGIER *et al.*, 2008; REGIER *et al.*, 2010; MEUSEMANN *et al.*, 2010; GIRIBET & EDGEcombe, 2012). In alcune di queste analisi sono state incluse anche sequenze provenienti da esapodi basali, sebbene in tutti i casi l'obiettivo degli autori era maggiormente indirizzato verso la ricostruzione delle ipotesi evolutive fra i gruppi principali di artropodi.

Un terzo marcatore molecolare, molto utilizzato per la ricostruzione di relazioni filogenetiche in diversi gruppi, inclusi gli artropodi, è il genoma mito-

condriale (BOORE, 1999). Alcune caratteristiche del DNA mitocondriale, quali la presenza di un gran numero di molecole per cellula, la generale assenza di ricombinazione, l'eredità esclusivamente matrilineare e la presunta ortologia dei geni nell'ambito dei Metazoa hanno fatto sì che questo marcatore sia stato largamente utilizzato per studiare le relazioni filogenetiche a molteplici livelli tassonomici (BALLARD *et al.*, 1992; SIMON *et al.*, 1994; CUROLE & KOCHER, 1999). La presenza sul genoma mitocondriale di un set conservato di geni (13 PCGs, 2 geni per rRNA e 22 per tRNA) e le sue dimensioni limitate (tipicamente 16-18 Kb), insieme alla disponibilità di approcci tecnici specifici al sequenziamento di questa molecola, hanno permesso la determinazione di un certo numero di sequenze complete di genomi mitocondriali in una varietà di taxa animali (BOORE, 1999). I tipi di informazione rilevanti in termini filogenetici estrapolabili da genomi mitocondriali completi sono le sequenze nucleotidiche dei geni per proteine e per RNA, le sequenze aminoacidiche dei PCGs ed il posizionamento dei geni sulla molecola. Le sequenze nucleotidiche o aminoacidiche di specifici PCGs possono essere analizzate individualmente o concatenate con lo scopo di migliorare la risoluzione e la robustezza dell'analisi (CAO *et al.*, 1994; GARCIA-MACHADO *et al.*, 1999). Grazie al sequenziamento di alcuni genomi mitocondriali completi in rappresentati dei taxa atterigoti, diversi data set multigenici che includono specie di esapodi basali sono disponibili per l'analisi (NARDI *et al.*, 2001; 2003a; NEGRISOLO *et al.*, 2004; CAMERON *et al.*, 2004; CARAPPELLI *et al.*, 2005; COOK *et al.*, 2005; CARAPPELLI *et al.*, 2007). Inoltre i geni mitocondriali sono talvolta usati in combinazione con sequenze nucleari e caratteri morfologici (GIRIBET *et al.*, 2001, 2004; PISANI *et al.*, 2004), permettendo lo sviluppo di data set di maggiori dimensioni. Per quanto siano generalmente più difficili da ottenere, tali data set multigenici generalmente migliorano sia la qualità che la robustezza delle analisi filogenetiche (SAVOLAINEN *et al.*, 2000; BAPTESTE *et al.*, 2002).

Un ulteriore tipo di carattere legato al genoma mitocondriale, e potenzialmente molto interessante per lo studio di filogenesi profonde, è l'ordine con cui i 37 geni sono disposti lungo la molecola, il "gene order" (BOORE, 1999). Essendo le traslocazioni di geni mitocondriali sulla molecola eventi rari e presumibilmente indipendenti, queste sono considerate essere meno suscettibili a cambiamenti omoplastici (convergenti) di altri tipi di mutazioni, e quindi sembrano in grado di fornire un segnale filogenetico potenzialmente più robusto ed affidabile. Un esempio paradigmatico si trova in BOORE *et al.* (1995, 1998), che hanno interpretato la traslocazione di un gene per tRNA come un forte supporto all'ipotesi di una

stretta relazione fra insetti e crostacei (Pancrustacea), portando alla dismissione della monofilia, tradizionalmente accettata, degli Atelocerata (Insecta+Myriapoda).

CONTRIBUTO DEI DATI MOLECOLARI PER LA FILOGENESI DEGLI ESAPODI

L'uso di dati molecolari ha portato negli ultimi due decenni ad una profonda rivisitazione delle ipotesi filogenetiche tradizionali relative alla collocazione dei diversi gruppi di esapodi basali. Tuttavia, nonostante la crescente quantità e qualità delle informazioni disponibili, molti dei risultati ottenuti risultano in disaccordo fra loro e anche in contrasto con alcune ipotesi sull'evoluzione degli esapodi basali largamente accreditate su base morfologica (BITSCH *et al.*, 2004; GIRIBET *et al.*, 2004).

Per tutti gli anni '90 ed oltre, le analisi condotte su dati molecolari non erano mirate specificamente allo studio degli esapodi basali e, con poche eccezioni (CARAPPELLI *et al.*, 2000; WHEELER *et al.*, 2001; GIRIBET *et al.*, 2004; LUAN *et al.*, 2005), qualche rappresentante degli esapodi basali veniva incluso solo sporadicamente in data set più ampi, con un campionamento di questi ultimi del tutto non uniforme (FRIEDRICH & TAUTZ, 1995; REGIER & SHULTZ, 1997, 2001; GIRIBET & RIBERA, 1998, 2000; GIRIBET & WHEELER, 1999; EDGEcombe *et al.*, 2000; SHULTZ & REGIER, 2000; COOK *et al.*, 2001; Giribet *et al.*, 2001; LAVROV *et al.*, 2004; MALLATT *et al.*, 2004; REGIER *et al.*, 2005).

In seguito agli studi di NARDI *et al.* (2001, 2003a), la possibile non monofilia degli esapodi viene per la prima volta proposta e, successivamente alla discussione che da questi è emersa (DELSUC *et al.*, 2003; NARDI *et al.*, 2003b), una attenzione maggiore è stata dedicata allo studio delle relazioni filogenetiche fra i diversi gruppi di esapodi basali e alla rivalutazione della monofilia di questi e degli Hexapoda *tout court* (BITSCH *et al.*, 2004; CAMERON *et al.*, 2004; GIRIBET *et al.*, 2004; KJER, 2004; NEGRISOLO *et al.*, 2004; REGIER *et al.*, 2004, 2005; CARAPPELLI *et al.*, 2007; MEUSEMANN *et al.*, 2010; REGIER *et al.*, 2010). A questo proposito, uno degli aspetti più discussi riguarda la supposta monofilia dei cinque ordini in cui gli esapodi basali vengono tradizionalmente divisi (Protura, Collembola, Diplura, Microcoryphia e Zygentoma). Questa è stata specificamente messa in discussione in passato per i Diplura (STYS & BILINSKI, 1990) e gli Zygentoma (KRISTENSEN, 1997; BITSCH & BITSCH, 2000; STANICZEK, 2000; BEUTEL & GORB, 2001). Al contrario, anche se la maggior parte degli studi disponibili ha preso in considerazione solo un numero limitato di specie in ciascuna linea evolu-

tiva, la monofilia di Protura, Collembola e Microcoryphia risulta ben corroborata dalla maggioranza delle analisi molecolari. I proturi sono probabilmente il taxon per cui esistono meno informazioni, seppure i pochi studi in cui siano state analizzate più sequenze hanno supportato la monofilia del gruppo (GIRIBET *et al.*, 2004; Kjer *et al.*, 2004; LUAN *et al.*, 2005). La monofilia dei Microcoryphia è similmente ben supportata, sia in base a dati solo molecolari che in data set combinati (GIRIBET *et al.*, 2004; KJER *et al.*, 2004). Eccezioni sono lo studio di COLGAN *et al.* (1998) su dati molecolari, anche se la monofilia del gruppo risulta supportata se questi vengono analizzati in combinazione con dati morfologici (EDGEcombe *et al.*, 2000), e quello di GIRIBET & RIBERA (2000), in cui le relazioni fra tre specie di Microcoryphia risultano instabili e la monofilia del gruppo dipende essenzialmente dai parametri usati nell'analisi.

I Collembola sono probabilmente il gruppo di esapodi basali per il quale si hanno dati molecolari più abbondanti. Tutte le analisi in cui sono stati inclusi gli otto genomi completi disponibili posizionano le specie dell'ordine nello stesso clade, indipendentemente dal numero di geni utilizzato, dal tipo di dati e dal metodo di analisi (NARDI *et al.*, 2003a,b; DELSUC *et al.*, 2003; LAVROV *et al.*, 2004; NEGRISOLO *et al.*, 2004; CAMERON *et al.*, 2004; CARAPPELLI *et al.*, 2005; CARAPPELLI *et al.*, 2007). La monofilia dei Collembola è stata inoltre supportata dall'analisi delle sequenze di 18S+28S rRNA (Giribet & RIBERA, 2000; Wheeler *et al.*, 2001; LUAN *et al.*, 2005), di un data set di 5 geni concatenati (GIRIBET *et al.*, 2004), del 18S rRNA (KJER *et al.*, 2004) e dei geni nucleari EF-1 α , EF-2 e POLII (SHULTZ & REGIER, 2000; REGIER *et al.*, 2004, 2005). Queste evidenze, insieme alle numerose caratteristiche morfologiche condivise dai collemboli (KRISTENSEN, 1981; BITSCH & BITSCH, 2000; D'HAESE, 2003), supportano fortemente la monofilia dell'ordine.

Molto più controversa risulta invece essere la monofilia dei Diplura, sia dal punto di vista delle evidenze morfologiche (STYS & BILINSKI, 1990), che molecolari. Le analisi di SHULTZ & REGIER (2000) e GIRIBET *et al.* (2001), che includono rappresentanti delle principali linee evolutive dell'ordine (Campodeina e Japygina), non supportano la monofilia dei Diplura. Nell'analisi combinata dei geni EF-1 α e Pol II, SHULTZ & REGIER (2000) presentano due ricostruzioni (basate su massima parsimonia e maximum likelihood) dove i Diplura risultano parafiletici, con le due specie *Eumesocampa frigidis* e *Metajapyx subterraneus* collocate rispettivamente vicino ai Collembola ed ai Microcoryphia, anche se la monofilia dei Diplura viene potenzialmente recuperata con l'aggiunta del gene EF-2 in un'analisi combinata (REGIER *et al.*, 2004). GIRIBET *et al.* (2001), usando un approccio

di “total evidence”, similmente supportano la non monofilia dei Diplura, con un inaspettato collocamento dei Japygidae vicino ai Balanidae (Crustacea). D'altra parte, le analisi di data set alternativi basati su 18S e 28S rRNA (GIRIBET & RIBERA, 2000; WHEELER *et al.*, 2001; KJER, 2004) o altri geni (GIRIBET *et al.*, 2004; CARAPELLI *et al.*, 2007; REGIER *et al.*, 2008; MEUSEMANN *et al.*, 2010; REGIER *et al.*, 2010) trovano supporto per la monofilia dei Diplura, lasciando la questione irrisolta.

Un ulteriore aspetto dibattuto risulta essere la monofilia degli Zygentoma, in alternativa al posizionamento di *Tricholepidion gertschi* (Lepidotrichidae) come sister-group dei rimanenti Dicondylia e conseguente parafila degli Zygentoma (nella loro accezione comune) rispetto agli Pterygota. Questo punto è stato specificamente analizzato da GIRIBET *et al.* (2004) utilizzando il più ampio campionamento di Zygentoma allora disponibile (5 specie da 3 famiglie, incluso *T. gertschi*). La monofilia degli Zygentoma (come peraltro quella dei Microcoryphia) è supportata dall'analisi dei dati molecolari mitocondriali (COMANDI *et al.*, 2009). D'altra parte, l'analisi combinata di dati molecolari e morfologici suggerisce un posizionamento alternativo di *T. gertschi* o alla base dei rimanenti Dicondylia (utilizzando il set di parametri più congruente) o insieme agli altri Zygentoma (applicando set di parametri sub-ottimali), seppur di nuovo con basso supporto statistico per i nodi chiave. L'analisi complessiva delle sequenze del 18S rRNA di KJER (2004), che include *T. gertschi* insieme ad altri due rappresentanti degli Zygentoma, similmente suggerisce la non monofilia degli Zygentoma, con *Lepisma* sp. + *Thermobia domestica* collocati in posizione basale agli altri Dicondylia e *T. gertschi* inaspettatamente posizionato fra gli Pterygota. Le notevoli incongruenze fra queste ricostruzioni riguardo alla posizione ed alla monofilia degli Zygentoma suggeriscono la necessità di raccogliere dati aggiuntivi e di migliorare il campionamento del gruppo.

Oltre alla monofilia dei singoli ordini, alcuni aspetti fra i più dibattuti ed interessanti nel contesto della filogenesi degli esapodi basali sono altresì rappresentati dalla relazioni filogenetiche fra ordini e dalla validità di alcuni raggruppamenti sopra-ordinali come gli Ellipura, gli Entognatha, i Dicondylia, e così degli stessi Hexapoda.

GIRIBET & RIBERA (2000) affrontano questo problema con uno studio ad ampio spettro delle relazioni fra gruppi di artropodi in cui si utilizza un'analisi combinata del gene completo del 18S e parziale del 28S rRNA da 139 taxa. Tuttavia la procedura di “direct optimization” applicata non supporta molti dei raggruppamenti tradizionali, quali Hexapoda, Entognatha ed Ellipura, e lascia molte domande

aperte. In un'analisi successiva, mirata allo studio delle relazioni filogenetiche degli esapodi e migliorata dall'aggiunta di marcatori molecolari e dati morfologici aggiuntivi, GIRIBET *et al.* (2004) trovano, invece, un certo supporto per la relazione fra Protura e Diplura, con conseguente dismissione degli Ellipura. Inaspettatamente il cluster Protura+Diplura si colloca in maniera stabile al di fuori di un gruppo costituito da Collembola, Ectognatha e alcuni Crustacea, negando quindi allo stesso tempo la monofilia di Entognatha ed Hexapoda. Anche se il supporto statistico della relazione fra Protura e Diplura è moderato, e i risultati dell'analisi sono condizionati in maniera determinante dai dati molecolari visto che l'albero basato su dati morfologici supporterebbe un posizionamento alternativo dei Diplura fra gli Ectognatha, questo studio ha l'indubitabile merito di aver incluso il più numeroso campionamento dai gruppi di esapodi basali disponibile fino ad allora. La relazione di sister-group fra Protura e Diplura ha trovato tuttavia supporto anche in altre analisi molecolari, come in GIRIBET & RIBERA (2000), KJER (2004), LUAN *et al.*, (2005), MEUSEMANN *et al.* (2010). L'analisi Bayesiana del data set di 18S rRNA presentata da KJER (2004), che include un cospicuo numero di specie per ciascun ordine, ha prodotto una ricostruzione filogenetica alternativa e ben supportata, dove gli Entognatha risultano monofiletici e Protura+Diplura si collocano come sister-group dei Collembola. In alternativa, una relazione fra Protura e Collembola è stata ottenuta, mediante un'analisi di “total evidence” basata su sequenze di 18S, 28S e dati morfologici, in WHEELER *et al.* (2001). Anche se il supporto statistico (Bremer support) risulta fortemente condizionato dai dati morfologici, ed in effetti nessuno dei nodi rilevanti per i gruppi di entognati risulta supportato dai soli dati molecolari, la monofilia degli Entognatha viene rifiutata, con i Diplura sister-group degli Ectognatha. D'altra parte, un raggruppamento di Diplura+Collembola è stato proposto da CARAPELLI *et al.* (2000) in base alla comune perdita di un introne nel gene per l'EF-1 α . L'analisi combinata dei geni EF-1 α , Pol II e EF-2 (REGIER *et al.*, 2004, 2005) supporta di nuovo la relazione fra Diplura e Collembola, anche se, in alcune circostanze, il raggruppamento alternativo di Diplura+Insecta non può essere escluso e, vista l'assenza di dati per i Protura, non è possibile in questo contesto testare la validità degli Ellipura. Dalla stessa analisi emerge anche una controversa relazione di sister group fra Microcoryphia e Zygentoma, che suggerirebbe una rivisitazione del gruppo Thysanura *sensu lato*, largamente rifiutato in tempi recenti. Da notare che, anche se forse non sufficienti per rivedere la posizione correntemente accettata sulla non monofilia dei Thysanura *sensu*

lato, alcuni studi recenti sulla morfologia delle mandibole in questi gruppi hanno messo in discussione l'utilità di alcuni caratteri tradizionali a supporto della monofilia dei Dicondylia (KOCH, 2001), suggerendo una certa cautela. Tuttavia tutte le altre analisi molecolari e combinate, con la sola eccezione di alcune proposte in WHEELER *et al.* (2001), supportano la visione largamente accettata che vede i Microcoryphia come il sister group dei Dicondylia (GIRIBET *et al.*, 2004; KJER, 2004; CARAPPELLI *et al.*, 2007; REGIER *et al.*, 2010).

Contemporaneamente a questi studi incentrati sugli esapodi basali, altri autori hanno affrontato in maniera più diretta il problema della filogenesi degli artropodi focalizzando la loro attenzione sull'uso della genomica mitocondriale, con lo scopo di ottenere nuovi dati e produrre una solida ricostruzione delle relazioni a livello di classi (BOORE *et al.*, 1995, 1998; GARCIA-MACHADO *et al.*, 1999; WILSON *et al.*, 2000; HWANG *et al.*, 2001; LAVROV *et al.*, 2004; NEGRISOLO *et al.*, 2004). Notevoli sforzi sono stati fatti per includere anche rappresentanti dei gruppi di atterigoti, portando all'ottenimento di 21 genomi completi (o quasi completi) da esapodi basali. Tali mitogenomi sono stati analizzati comparando sia le sequenze primarie che il "gene order". Incidentalmente, vista la velocità con cui questi genomi aggiuntivi sono stati sequenziati, nessuna delle analisi prodotte ha incluso tutte le sequenze disponibili. Inoltre, nessuna sequenza di genomi mitocondriali da rappresentanti dei Protura è stata disponibile fino a tempi più recenti.

Nonostante alcune aspettative ottimistiche (NARDI *et al.*, 2001), le traslocazioni geniche non sembrano essere informative per le relazioni filogenetiche fra ordini. Tutte le specie di atterigoti sequenziate ad oggi mostrano differenze limitate, rispetto al pattern considerato plesiomorfo per i Pancrustacea, e nessuno dei riarrangiamenti riportati sembra essere condiviso da rappresentanti di linee evolutive diverse. E' tuttavia degno di nota che i due collemboli appartenenti alla famiglia degli Onychiuridae, per i quali si ha informazione, condividono la stessa traslocazione del gene per il tRNA-SerUCN, suggerendo che, nei Collembola, il "gene order" mitocondriale potrebbe essere informativo ad un livello tassonomico più basso.

I genomi mitocondriali completi dei collemboli *Tetradontophora bielaniensis* e *Gomphiocephalus hodgsoni*, insieme a quello dello Zygentoma *Tricholepidion gertschi*, sono stati inizialmente analizzati in NARDI *et al.* (2001, 2003a) insieme ad altre specie di artropodi per le quali la sequenza completa del genoma mitocondriale era allora disponibile. Gli autori, seguendo un approccio conservativo, analizzano le sequenze aminoacidiche dei soli quattro

PCGs più conservati (*cytochrome oxidase I-III*, e *cytochrome b*) che potevano essere allineati in maniera non ambigua. L'analisi, sia secondo un principio di maximum likelihood che Bayesiano, supporta la non monofilia degli Hexapoda (Fig. 1A). Mentre la posizione basale di *T. gertschi* all'interno degli Ectognatha risulta in accordo con la visione accreditata su base morfologica, i due collemboli appaiono collocati, insieme, al di fuori di un gruppo composto da Ectognatha+Crustacea. In questa ricostruzione, seppur la monofilia dei Pancrustacea risulta supportata, gli Hexapoda, nella loro accezione comune, risultano difiletici piuttosto che monofiletici. Questi risultati hanno sollevato un certo scetticismo, che ha portato DELSUC *et al.* (2003) a rianalizzare il data set originale di NARDI *et al.* (2003a) ricodificando i nucleotidi in purine e pirimidine con lo scopo, nelle parole dell'autore, di "estrarre un segnale storico utile" usando un modello più realistico di evoluzione delle sequenze e ridurre, allo stesso tempo, gli effetti negativi della saturazione, dell'eterogeneità nella composizione in basi e dei diversi tassi di sostituzione fra siti. L'analisi Bayesiana sviluppata da DELSUC *et al.* (2003) recupera gli Hexapoda come monofiletici (con i Collembola sister-group degli Ectognatha), anche se con basso supporto statistico. Con lo scopo di chiarire questo aspetto maggior dettaglio, NARDI *et al.* (2003b) applicando un modello di variazione dei tassi di sostituzione secondo una distribuzione Γ , hanno analizzato di nuovo i dati in forma di sequenze aminoacidiche. Questa ulteriore analisi produce lo stesso risultato riportato in NARDI *et al.* (2003a), con gli Hexapoda difiletici ed un valore di likelihood maggiore della ricostruzione di DELSUC *et al.* (2003), indipendentemente dai taxa inclusi. L'ipotesi della non monofilia degli Hexapoda è stata in seguito supportata da NEGRISOLO *et al.* (2004) che, utilizzando tutti i geni mitocondriali e una varietà di metodi di analisi, ottengono di nuovo i Collembola esterni ad un gruppo di Crustacea+Entognatha, anche se con supporto moderato. L'ipotesi proposta in NARDI *et al.* (2003a,b) riguardo alla posizione dei Collembola viene successivamente criticata da CAMERON *et al.* (2004) in un lavoro mirato alla descrizione del genoma mitocondriale di un ulteriore esapode basale, *Nesomachilis australica* (Microcoryphia). Tuttavia, in nessuna delle analisi proposte, utilizzando sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche di 12/13 PCGs mitocondriali e numerosi raggruppamenti di taxa, outgroups e metodi di analisi, gli Hexapoda vengono effettivamente recuperati da questi autori come monofiletici. Il posizionamento dei Collembola risulta comunque raramente risolto e spesso soggetto ad alcuni aspetti tecnici riguardanti il trattamento dei dati, la selezione dei geni e l'outgroup

utilizzato, portando gli autori a concludere che, mentre l'aggiunta di nuove sequenze potrebbe portare a ricostruzioni filogenetiche più corroborate, i dati di genomi mitocondriali da soli potrebbero anche essere insufficienti a risolvere in maniera non ambigua le relazioni filogenetiche fra gli esapodi basali.

Il problema della monofilia degli Hexapoda è stato inoltre affrontato da GIRIBET *et al.* (2004), le cui analisi favoriscono, nella maggior parte delle combinazioni di parametri, una collocazione dei Collembola fuori dal gruppo Crustacea+Insecta s.s. L'analisi di "consensus network" proposta in seguito da Holland *et al.* (2005), indica altresì che la posizione dei Collembola nel contesto delle relazioni filogenetiche degli esapodi dipende dal marcatore molecolare applicato. Le sequenze nucleotidiche mitocondriali sembrano infatti supportare la monofilia degli Hexapoda, mentre le sequenze aminoacidiche corrispondenti ne suggeriscono la parafilia. Dati recenti basati su analisi di filogenomica (REGIER *et al.*, 2008; TIMMERMANS *et al.*, 2008; MEUSEMANN *et al.*, 2010; REGIER *et al.*, 2010), nonostante includano un numero limitato di esapodi basali, sono invece in aperto contrasto con quelli ottenuti da studi di mitogenomica, supportando la visione "tradizionale" che vede tutti gli esapodi inclusi in un taxon monofiletico (Fig. 1B). Tale conclusione viene raggiunta anche da recenti interpretazioni di analisi combinate (data set basati su caratteri morfologici, reperti fossili e sequenze molecolari) (EDGEcombe, 2010; GIRIBET & EDGEcombe, 2012).

Con lo scopo di utilizzare i dati di genomica mitocondriale per studiare la collocazione dei Diplura, seppur nel difficile contesto di relazioni a livello di ordine, CARAPPELLI *et al.* (2005) determinano la sequenza completa del genoma del dipluro *Japyx solifugus* ed analizzano la sequenza aminoacidica dei quattro geni più conservati (come in NARDI *et al.*, 2003a,b). L'analisi Bayesiana di questo data set, supportata da test statistici sugli alberi, suggerisce che anche i Diplura, come già i Collembola, potrebbero collocarsi all'esterno di un gruppo Crustacea+Ectognatha, richiamando i risultati di GIRIBET *et al.* (2004). CARAPPELLI *et al.* (2007) effettuano un'analisi comprensiva di un cospicuo numero di mitogenomi tra i Pancrustacea, includendo anche 3 specie di dipluri. I risultati ottenuti supportano la monofilia dei Diplura ed un posizionamento dell'ordine (come nel caso dei Collembola) lontano dal clade degli Ectognatha (Fig. 1A). L'analisi Bayesiana incentrata sulla filogenesi degli artropodi proposta da COOK *et al.* (2005), utilizzando tutti i PCGs mitocondriali in un data set che include anche 4 Collembola e 2 Zygentoma, suggerisce di nuovo con un certo supporto che Crustacea ed Hexapoda

potrebbero essere mutualmente parafiletici. In questo studio, entrambi i gruppi di atterigoti considerati risultano monofiletici, con i Collembola ancora vicini ad alcuni Crustacea (Malacostraca) e gli Zygentoma come sister group degli Pterygota.

Un'ulteriore analisi, basata sull'uso di sequenze ribosomali nucleari 18S e 28S per risolvere le relazioni fra Protura, Collembola e Diplura, viene effettuata da Luan *et al.* (2005) includendo una buona rappresentanza di atterigoti (10 Protura, 12 Diplura, 10 Collembola, un Microcoryphia e un Zygentoma). I risultati principali di questo studio riguardano la monofilia di Protura, Collembola e Diplura e la relazione di sister-group fra Protura e Diplura, con l'esclusione dei Collembola.

Nonostante la quantità di dati raccolti, di analisi condotte e il numero cospicuo di rappresentanti dei gruppi basali di esapodi inclusi nelle analisi, il tema della monofilia degli Hexapoda e delle relazioni fra i cinque gruppi rimane tuttora controverso e dibattuto.

Recentemente, l'analisi di filomitogenomica è stata arricchita con la sequenza dell'intero mtDNA della specie di proturo *Sinentomon erythranum* (CHEN *et al.*, 2011), appartenente all'ultimo gruppo di "atterigoti" per il quale non erano conosciute informazioni sul genoma mitocondriale. L'mtDNA di *S. erythranum* presenta un cospicuo numero di caratteristiche molecolari inusuali, non riscontrabili nella maggioranza degli Hexapoda. Difatti, oltre ad essere relativamente corto (è composto da soli 14.491 nucleotidi, caratteristica che negli artropodi è stata osservata solo in ragni ed acari; MASTA & BOORE, 2004), esso presenta un elevato contenuto (52,4%) di basi T sul filamento sul quale sono orientati la maggior parte dei geni (nell'mtDNA dei metazoi, frequentemente, i 37 geni sono codificati da entrambi i filamenti). Inoltre, 18/22 geni codificanti per RNA di trasferimento degli aminoacidi (tRNA) hanno una struttura a quadrifoglio troncata, con alcuni "bracci" ridotti o addirittura completamente assenti. L'mtDNA di *S. erythranum* presenta anche alcune rilevanti differenze in termini di «gene order» (traslocazioni di geni sullo stesso filamento nucleotidico o fra eliche diverse) rispetto al modello basale riscontrato negli esapodi. Tuttavia, la caratteristica molecolare più interessante, in termini filogenetici, è rappresentata dalla posizione di uno dei due geni codificanti per l'aminoacido Leucina (Fig. 1C). Difatti, il *trnL(uaa)* si trova localizzato tra i geni *rrnL* e *nad1*, in posizione adiacente a *trnL(uag)*. Questo contrasta con il modello basale tipico di esapodi e crostacei, dove il *trnL(uaa)* si trova fra *cox1* e *cox2*, mentre è affine alla condizione osservata in miriapodi e chelicerati e più in generale al «gene order» considerato ancestrale per gli artropodi. Infatti, mentre la trasloca-

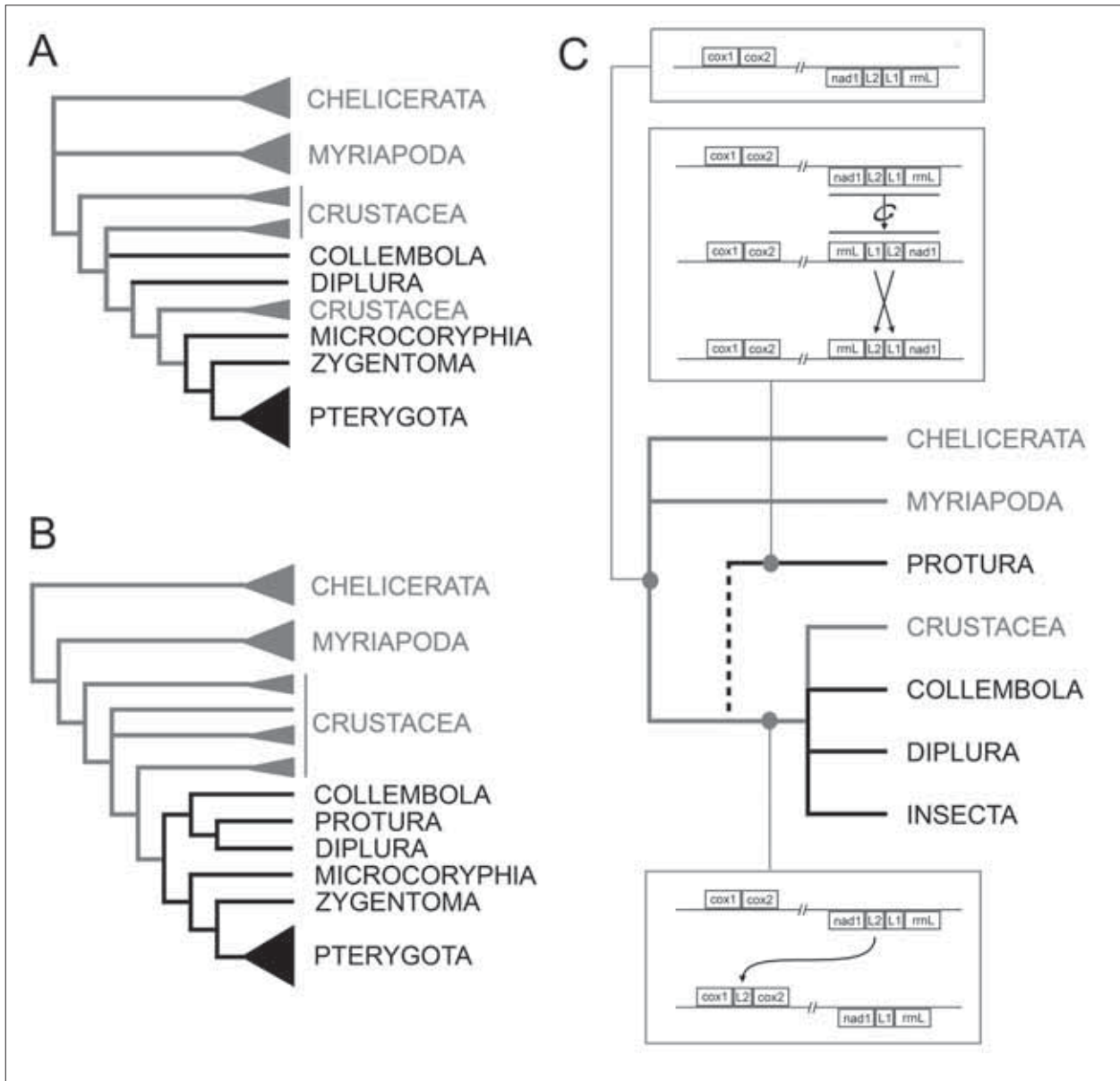


Fig. 1

Ipotesi filogenetiche alternative delle principali linee di Hexapoda (linee scure) nel contesto evolutivo degli Arthropoda. A: modificato da CARAPPELLI *et al.* (2007); B: modificato da GIRIBET & EDGEcombe 2012; C: modificato da CHEN *et al.* (2011), in basso è mostrata una possibile sequenza di cambiamenti nel “gene order”.

zione di *trnL(uaa)* (da *trnL(uag)-trnL(uaa)-rrnL* a *cox1-trnL(uaa)-cox2*) è considerata un’importante sinapomorfia dei Pancrustacea, presumibilmente apparsa nell’antenato comune di esapodi e crostacei (BOORE *et al.*, 1998), in *S. erythranum* *trnL(uaa)* si trova nella posizione originaria (anche se ha scambiato di posto con *trnL(uag)*), suggerendo la possibilità che i Protura potrebbero effettivamente risultare estranei ai Pancrustacea.

Purtroppo, le sequenze codificanti per proteine di *S. erythranum* (in precedenza usate per ricostruire le relazioni filogenetiche intra- ed interordinali degli esapodi basali), dato l’estremo sbilanciamento in composizione nucleotidica di gran parte di questi

geni, non possono essere usate per un’analisi filogenetica comparativa tra taxa di artropodi, in quanto danno origine ad alberi filogenetici chiaramente influenzati dal ben noto fenomeno del “long branch attraction” (CHEN *et al.*, 2011). In ogni caso, i dati relativi al «gene order» sembrano mettere in dubbio la collocazione dei proturi alla base degli esapodi e, contestualmente, la monofilia stessa di quest’ultimo taxon. Inoltre, se confermate, le conclusioni proposte da CHEN *et al.* (2011) suggerirebbero scenari alternativi rispetto alle relazioni filogenetiche tradizionali dei proturi nei confronti degli altri ordini di esapodi basali e dei principali gruppi di artropodi.

CONCLUSIONI

Come appare in maniera evidente dalla revisione di quasi venti anni di lavoro nel campo della filogenesi molecolare applicate al problema delle relazioni fra gli esapodi basali, ancora ci sono molti punti oscuri e molti ambiti di conflitto, o inconsistenze, fra dati molecolari e morfologici, fra diversi data set molecolari e fra diversi metodi di analisi (vedi anche: BITSCH *et al.*, 2004). Tuttavia, l'accumularsi di evidenze molecolari ha, se non altro, indotto la comunità dei sistematici a rimettere in discussione e riconsiderare alcune ipotesi largamente accettate su base morfologica (HWANG *et al.*, 2001; NARDI *et al.*, 2003a; GIRIBET *et al.*, 2004).

Mentre la monofilia di ciascun ordine di atterigoti è quasi sempre ben supportata, con la possibile eccezione dei Diplura (GIRIBET *et al.*, 2001) e degli Zygentoma (GIRIBET *et al.*, 2004; KJER, 2004), le relazioni fra ordini sono ancora largamente incerte. Anche se solo pochi studi ad oggi hanno incluso rappresentanti dei Protura, e i primi genomi sono stati sequenziati solo di recente, la maggior parte delle analisi sembra supportare una loro relazione con i Diplura, che implicherebbe la dismissione degli Ellipura. Ulteriori dati di mitogenomica, da famiglie di proturi il cui mtDNA non è afflitto dai livelli di sbilanciamento nucleotidico osservati in *S. erythranum*, potrebbero aiutare a risolvere questo problema filogenetico così importante per ricostruire i "primi passi" dell'evoluzione degli Hexapoda.

In generale, un buon supporto si trova per gli Ectognatha, mentre il taxon Entognatha, già messo largamente in discussione su base morfologica, si ritrova raramente nelle analisi basate su dati molecolari. Inoltre, i dati di mitogenomica indicherebbero che alcuni gruppi di esopodi basali (quali i proturi) potrebbero anche non rappresentare linee.

Lo scenario evolutivo eventualmente risultante dalla non monofilia degli Hexapoda implicherebbe che la condizione esapode e la tagmosi tipica di questi potrebbero essersi originate indipendentemente due o più volte in linee evolutive diverse di Pancrustacea. Lo stesso si può dire per la terrestrializzazione, come discusso in NEGRISOLO *et al.* (2004), con il complesso dei numerosi adattamenti legati a questa condizione che potrebbero avere determinato l'evoluzione convergente di caratteristiche morfologiche simili.

Tuttavia, la mancanza di supporto per la monofilia degli Hexapoda in un certo set di dati (come in CAMERON *et al.*, 2004) non deve necessariamente essere interpretata come un'indicazione della non monofilia del gruppo, specialmente se non ci sono

scenari alternativi fortemente supportati (ma vedi NARDI *et al.*, 2003a, b; NEGRISOLO *et al.*, 2004; GIRIBET *et al.*, 2004) e se la maggior parte dei dati morfologici e di filogenomica effettivamente supportano la monofilia del gruppo (KRISTENSEN, 1981; BITSCH *et al.*, 2004; GIRIBET *et al.*, 2004; REGIER *et al.*, 2008; TIMMERMANS *et al.*, 2008; MEUSEMANN *et al.*, 2010; REGIER *et al.*, 2010). L'unica conclusione ragionevole che è possibile pertanto formulare oggi è che altro lavoro sarà necessario prima di raggiungere una soluzione soddisfacente del problema. A questo proposito sarà fondamentale l'utilizzo di nuovi marcatori molecolari ed un campionamento maggiore dei taxa atterigoti sia per geni nucleari che mitocondriali (GIRIBET *et al.*, 2004), oltre all'analisi ed all'approfondimento di sistemi di caratteri morfologici vecchi e nuovi. Inoltre un ruolo determinante sarà rappresentato dallo sviluppo di metodi migliori di analisi dei dati insieme ad una rivalutazione dettagliata e critica dei metodi correntemente applicati.

Con nessuna intenzione da parte nostra di affermare la superiorità di un tipo di dati sugli altri (molecolari *vs* morfologici), la disponibilità di più dati, insieme ad una migliore valutazione dell'affidabilità dei metodi di analisi applicati, non potrà che determinare un passo più in avanti nella produzione di uno scenario evolutivo più robusto per questi gruppi.

RIASSUNTO

Le nuove tecniche di filogenesi molecolare hanno permesso di studiare e rivalutare criticamente le relazioni filogenetiche fra molti e diversi gruppi animali, inclusi gli artropodi. Questi studi hanno talvolta prodotto ricostruzioni filogenetiche che sono in conflitto con quelle basate su dati morfologici e hanno portato ad una rivalutazione e/o dismissione di ipotesi largamente accettate in passato.

In questa comunicazione si descrivono i maggiori contributi alla filogenesi degli esapodi provenienti dall'analisi molecolare, con particolare riferimento al genoma mitocondriale ed alle relazioni fra i gruppi basali degli esapodi. In particolare ci si sofferma sulle relazioni e la monofilia stessa dei cinque gruppi interessati (gli "atterigoti": Protura, Collembola, Diplura, Microcoryphia e Zygentoma), che sono uno dei temi più dibattuti nel contesto della filogenesi degli artropodi. Si identificano inoltre le aree di consenso/conflitto fra le filogenesi prodotte su base molecolare e morfologica.

BIBLIOGRAFIA

- BALLARD J.W.O., OLSEN G.J., FAITH D.P., ODGERS W.A., ROWELL D.M., ATKINSON P.W., 1992 – *Evidence from 12S ribosomal RNA sequences that onychophorans are modified arthropods*. – *Science*, 258: 1345-1348.
BAPTESTE E., BRINKMANN H., LEE J.A., MOORE D.V., SENSE, C.V., GORDON P., DURUFLE L., GAASTERLAND T., LOPEZ P., MULLER M., PHILIPPE H., 2002 – *The analysis*

- of 100 genes supports the grouping of three highly divergent amoebae: Dictyostelium, Entamoeba, and Mastigamoeba. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 99: 1414-1419.
- BEUTEL R.G., GORB S.N., 2001 – *Ultrastructure of attachment specializations of hexapods (Arthropoda): evolutionary patterns inferred from a revised ordinal phylogeny.* - J. Zool. Syst. Evol. Research, 39: 177-207.
- BITSCH J., 1994 – *The morphological groundplan of Hexapoda: critical review of recent concepts.* - Ann. Soc. Entomol. Fr., 30: 103-129.
- BITSCH C., BITSCH J., 199. – *Internal anatomy and phylogenetic relationships among apterygote insects clades (Hexapoda).* - Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.), 34: 339-363.
- BITSCH C., BITSCH J., 2000 – *The phylogenetic interrelationships of the higher taxa of apterygote hexapods.* Zool. Scripta, 29: 131-156.
- BITSCH J., BITSCH C., BOURGOIN T., D'HAESE C.A., 2004 – *The phylogenetic position of early hexapod lineages: morphological data contradict molecular data.* - Syst. Entomol., 29:433-440.
- BOORE J.L., COLLINS T.M., STANTON D., DAHLER L.L., BROWN W.M., 1995 – *Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements.* – Nature, 376: 163-165.
- BOORE J.L., LAVROV D.V., BROWN W.M., 1998 – *Gene translocation links insects and crustaceans.* – Nature, 392: 667-668.
- BOORE J.L., 1999 – *Animal mitochondrial genomes.* - Nucl. Acid Res., 27: 1767-1780.
- BOURGOIN T., 1996 – *Phylogenie des Hexapodes. La recherche des synapomorphies ne fait pas toujours le cladisme!* - Bull. Soc. Fr., 121: 5-20.
- BRUSCA R.C., BRUSCA G.J., 1990 – *Invertebrates.* Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland Massachusetts.
- CAMERON S.L., MILLER K.B., D'HAESE C.A., WHITING M.F., BARKER S.C., 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.
- CAO Y., ADACHI J., JANKE A., PÄÄBO S., HASEGAWA M., 1994 – *Phylogenetic relationships among eutherian orders estimated from inferred sequences of mitochondrial proteins: instability of a tree based on a single gene.* - J. Mol. Evol., 39: 519-527.
- CARAPPELLI A., FRATI F., NARDI F., DALLAI R., SIMON C., 2000 – *Molecular phylogeny of the apterygoten insects based on nuclear and mitochondrial genes.* - Pedobiologia, 44: 361-373.
- CARAPPELLI A., SOTO-ADAMES F.N., SIMON C., FRATI F., NARDI F., DALLAI R., 2004 – *Secondary structure, high variability and conserved motifs for domain III of 12S rRNA in the Arthropoda (Hexapoda; Collembola).* - Insect Mol. Biol., 13: 659-670.
- CARAPPELLI A., NARDI F., DALLAI R., BOORE J.L., LIÒ P., FRATI F., 2005 – *Relationships between hexapods and crustaceans based on four mitochondrial genes. Volume 16.* - Edited by Koenemann S. & Jenner R.A. Boca Raton (FL; USA): CRC Press, Taylor and Francis Group; Crust. Issues; pp. 295-306.
- CARAPPELLI A., LIÒ 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 Evol. Biol. 7 (suppl 2), S8.
- CHEN W.J., BU Y., CARAPPELLI A., DALLAI R., LI S., YIN W.Y., LUAN Y.X., 2011 – *The mitochondrial genome of Sinentomon erythranum (Arthropoda: Hexapoda: Protura): an example of highly divergent evolution.* - BMC Evol. Biol., 11: 315.
- COLGAN D.J., McLAUCHLAN A., WILSON G.D.F., LIVINGSTON S., MACARANAS J., EDGECOMBE G.D., CASSIS G., GRAY M.R., 1998 – *Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution.* - Aust. J. Zool., 46: 419-437.
- COMANDI S., CARAPPELLI A., PODSIADLOWSKI L., NARDI F., FRATI F., 2009 – *The complete mitochondrial genome of Atelura formicaria (Hexapoda: Zygentoma) and the phylogenetic relationships of basal insects.* – Gene. 439: 25-34.
- COOK, C.E., SMITH, M.L., TELFORD, M.J., BASTIANELLO, A., AKAM, M., 2001 – *Hox genes and the phylogeny of the arthropods.* - Curr. Biol., 11: 759-763.
- COOK C.E., YUE Q., AKAM M., 2005 – *Mitochondrial genomes suggest that hexapods and crustaceans are mutually paraphyletic.* - Proc. R. Soc. B., 272: 1269-1304.
- CUROLE J.P., KOCHER T.D., 1999 – *Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes.* - Trends Ecol. Evol., 14: 394-398.
- DALLAI R., 1980 – *Considerations on Apterygota phylogeny.* - Boll. Zool., 47: 35-48.
- DALLAI R., 1989 – *Are Protura really insects?* In: Simonetta, A.M., Morris, S.C. (Eds.), The early evolution of Metazoa and the significance of the problematic taxa. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 263-269.
- DALLAI R., 1994 – *Recent findings on apterygotan sperm structure.* - Acta Zool. Fennica, 195: 23-27.
- DALLAI R., AFZELIUS B., 1999 – *Accessory microtubules in insect spermatozoa: structure, function and phylogenetic significance.* In: Cagnon, C. (Ed.), The male gamete: from basic knowledge to clinical applications. Cache River Press, Vienna, IL, pp. 333-350.
- DALLAI R., MERCATI D., CARAPPELLI A., NARDI F., MACHIDA R., SEKIYA K., FRATI F., 2011 – *Sperm accessory microtubules suggest the placement of Diplura as the sister-group of Insecta s.s.* - Arthropod Struct. & Dev., 40: 77-92.
- DELSUC F., PHILLIPS M.J., PENNY D., 2003 – *Comment on "Hexapod Origins: Monophyletic or Paraphyletic?"* – Science, 301: 1482d.
- D'HAESE C.A., 2002 – *Were the first springtails semi-aquatic? A phylogenetic approach by means of 28S rDNA and optimization alignment.* - Proc. R. Soc. Lond. B., 269: 1143-1151.
- D'HAESE C.A., 2003 – *Morphological appraisal of Collembola phylogeny with special emphasis on Poduromorpha and a test of the aquatic origin hypothesis.* - Zool. Scri., 32: 563-586.
- EDGECOMBE G.D., WILSON G.D.F., COLGAN D.J., GRAY M.R., CASSIS G., 2000 – *Arthropod cladistics: combined analysis of Histone H3 and U2 snRNA sequences and morphology.* – Cladistics, 16: 155-203.
- EDGECOMBE G.D., 2010 – *Arthropod phylogeny: an overview from the perspectives of morphology, molecular data and fossil record.* . - Arthropod Struct. & Dev., 39: 74-87.
- FRIEDRICH M., TAUTZ D., 1995 – *Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods.* – Nature, 376: 165-167.
- GARCIA-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.* - J. Mol. Evol., 49: 142-149.

- GIRIBET G., RIBEIRA C., 1998 – *The position of arthropods in the animal kingdom: a search for a reliable outgroup for internal arthropod phylogeny*. - Mol. Evol. Phylogenet., 9: 481-488.
- GIRIBET G., WHEELER W.C., 1999 – *The position of arthropods in the animal kingdom: Ecdysozoa, islands, trees and the 'parsimony ratchet'*. - Mol. Phylogenet. Evol., 10: 1-5.
- 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., EDGECOMBE G.D., WHEELER W.C., 2001 – *Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology*. - Nature, 413: 157-161.
- GIRIBET G., EDGECOMBE G.D., CARPENTER J.M., D'HAESE C.A., WHEELER W.C., 2004 – *Is Ellipura monophyletic? A combined analysis of basal hexapod relationships with emphasis on the origin of insects*. - Org. Div. Evol., 4: 319-340.
- GIRIBET G., EDGECOMBE G.D., 2012 – *Reevaluating the arthropod tree of life*. - Annu. Rev. Entomol., 57: 167-186.
- HENNIG W., 1981 – *Insect phylogeny*. John Wiley and Sons, New York.
- HICKSON R.E., SIMON, C., PERREY S.W., 2000 – *The performance of several multiple-alignment programs in relation to secondary-structure features for an rRNA sequence*. - Mol. Biol. Evol., 17: 530-539.
- HIRST S., MAULIK, S., 1926 – *On same arthropod remains from the Rhynie chert (Old Red Sandstone)*. - Geological Magazine, 63: 69-71.
- HOLLAND B.R., DELSUC F., MOULTON V., 2005 – *Visualizing conflicting evolutionary hypotheses in large collections of trees: using consensus networks to study the origins of placentals and hexapods*. - Syst. Biol., 54: 66-76.
- HWANG U.W., FRIEDRICH M., TAUTZ D., PARK C.J., KIM W., 2001 – *Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates*. - Nature, 413: 154-157.
- KJER K.M., 2004 – *Aligned 18S and insect phylogeny*. - Syst. Biol., 53: 506-514.
- KLASS K.D., KRISTENSEN N.P., 2001 – *The ground plan and affinities of hexapods: recent progress and open problems*. - Ann. Soc. Entomol. Fr., 37: 265-298.
- KOCH M., 1997 – *Monophyly and phylogenetic position of the Diplura (Hexapoda)*. - Pedobiol., 41: 9-12.
- KOCH M., 2001 – *Mandibular mechanisms and the evolution of hexapods*. - Ann. Soc. Entomol. Fr., 37: 129-174.
- KRAUS O., 1997 – *Phylogenetic relationships between higher taxa of tracheate arthropods*. Arthropod Relationships, Systematic Association special volume series 55, R.A. Fortey and R.H. Thomas, Chapman & Hall, London, pp. 295-303.
- KRISTENSEN N.P., 1981 – *Phylogeny of insect orders*. - Ann. Rev. Entomol., 26: 135-157.
- KRISTENSEN N.P., 1997 – *The groundplan and basal diversification of the hexapods*. Arthropod Relationships, Systematic Association special volume series 55, R.A. Fortey and R.H. Thomas, Chapman & Hall, London, pp. 281-293.
- KUKALOVÁ-PECK J., 1987 – *New Carboniferous Diplura, Monura and Thysanura, the hexapod groundplan, and the role of thoracic side lobes in the origin of wings (Insecta)*. - Can. J. Zool., 65: 2327-2345.
- LAVROV D., BROWN W.M., BOORE J.L., 2004 – *Phylogenetic position of the Pentastomida and (pan)crustacean relationships*. - Proc. R. Soc. Lond. B., 271: 537-544.
- LUAN Y., MALLATT J.M., 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*. - Mol. Biol. Evol., 22: 1579-1592.
- MACHIDA R., TAKAHASHI, I., 2003 – *Embryonic development of a proturan Baculentulus densus (Imadaté): Reference to some developmental stages (Hexapoda: Protura, Acerentomidae)*. - Proc. Arthropod Embryol. Soc. Jpn. 38, 13-17.
- MALLATT J., GAREY J.R., SHULTZ J.W., 2004 – *Ecdysozoan phylogeny and Bayesian inference: first use of nearly complete 28S and 18S rRNA gene sequences to classify the arthropods and their kin*. - Mol. Phylogenet. Evol., 31: 178-191.
- MANTON S.M., 1973 – *The evolution of arthropodan locomotory mechanisms. Part 10. Locomotory habits, morphology and evolution of the hexapod classes*. - Zool. J. Linn. Soc., 51: 203-400.
- MANTON S.M., 1977 – *The Arthropoda: habits, functional morphology and evolution*. Clarendon Press, Oxford, pp. 494.
- MASTA S.E., BOORE J.L., 2004 – *The complete mitochondrial genome of the spider Habronattus oregonensis reveals rearranged and extremely truncated tRNAs*. - Mol. Biol. Evol., 21: 893-902.
- MEUSEMANN K., VON REUMONT B.M., SIMON S., ROEDING F., STRAUSS S., KÜCK, P., EBERSBERGER, I., WALZL, M., PASS G., BREUERS S., ACHTER V., VON HAESELER A., BURMESTER T., HADRY S. H., WÄGELE J.W., MISOF, B., 2010 – *A phylogenomic approach to resolve the arthropod tree of life*. - Mol. Biol. Evol., 27: 2451-2464.
- NARDI F., CARAPPELLI A., FANCIULLI P.P., DALLAI R., FRATI F., 2001 – *The complete mitochondrial DNA sequence of the basal hexapod Tetrodontophora bielanensis: evidence for heteroplasmy and tRNA*. - Mol. Biol. Evol., 18: 1293-1304.
- NARDI F., SPINSANTI G., BOORE J.L., CARAPPELLI A., DALLAI R., FRATI F., 2003a – *Hexapod Origins: Monophyletic or Paraphyletic?* - Science, 299: 1887-1889.
- NARDI F., SPINSANTI G., BOORE J.L., CARAPPELLI A., DALLAI R., FRATI F., 2003b – *Response to Comment on "Hexapod Origins: Monophyletic or Paraphyletic?"* - Science, 301: 1482e.
- NEGRISOLO E., MINELLI A., VALLE G., 2004 – *The mitochondrial genome of the house centipede Scutigera and the monophyly versus paraphyly of myriapods*. - Mol. Biol. and Evol., 21: 770-780.
- PAGE R.D.M., 2000 – *Comparative analysis of secondary structure of insect mitochondrial small subunit ribosomal RNA using maximum weighted matching*. - Nucl. Acids Res., 28: 3839-3845.
- PISANI D., POLIG L.L., LYONS-WEILER M., HEDGES S.B., 2004 – *The colonization of land animals: molecular phylogeny and divergence times among arthropods*. - BMC Biology 2:1.
- REGIER J.C., SHULTZ J.W., 1997 – *Molecular phylogeny of the major arthropod groups indicates polyphyly of crustaceans and a new hypothesis for the origin of hexapods*. - Mol. Biol. Evol., 14: 902-913.
- REGIER J.C., SHULTZ J.W., 2001 – *Elongation Factor-2: a useful gene for arthropod phylogenetics*. Mol. Phylogenet. Evol., 20: 136-148.
- Regier J.C., Shultz J.W., Kambic R.E., 2004 – *Phylogeny of basal hexapod lineages and estimates of divergence times*. - Ann. Entomol. Soc. Am., 97: 411-419.
- REGIER J.C., SHULTZ J.W., KAMBIC R.E., 2005 – *Pancrustacean phylogeny: hexapods are terrestrial crusta-*

- ceans and maxillopods are not monophyletic.* - Proc. R. Soc. B., 272: 395-401.
- REGIER J.C., SHULTZ J.W., GANLEY A.R.D., HUSSEY A., SHI D., BALL ZWICK, B., STAJICH J.E., CUMMINGS M.P., MARTIN J.W., CUNNINGHAM W., 2008 – *Resolving arthropod phylogeny: exploring phylogenetic signal within 41 kb of protein-coding nuclear gene sequence.* - Syst. Biol., 57: 920-938.
- REGIER J.C., SHULTZ J.W., ZWICK A., HUSSEY A., BALL B., WETZER JOEL, R., MARTIN W., CUNNINGHAM C.W., 2010 – *Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences.* - Nature, 463: 1079-1083.
- SAVOLAINEN V., CHASE M.W., HOOT S.B., MORTON C.M., SOLTIS D.E., BAYER C., FAY M.F., DE BRUIJN A.Y., SULLIVAN S., QIU Y.L., 2000 – *Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid atpB and rbcL gene sequences.* - Syst. Biol., 49: 306-362.
- SHULTZ J.W., REGIER J.C., 2000 – *Phylogenetic analysis of arthropods using two nuclear protein-encoding genes supports a crustacean + hexapod clade.* - Proc. R. Soc. Lond. B., 267: 1011-1019.
- SIMON C., FRATI F., BECKENBACH A., CRESPI B., LIU H., FLOOK P., 1994 – *Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved Polymerase Chain Reaction primers.* - Ann. Ent. Soc. of America, 87: 651-701.
- STANICZEK A.H., 2000 – *The mandible of silverfish (Insecta: Zygentoma) and mayflies (Ephemeroptera): Its morphology and phylogenetic significance.* - Zool. Anz., 239: 147–178.
- STYS P., BILINSKI S., 1990 – *Ovariole types and the phylogeny of hexapods.* - Biol. Rev., 65: 401-429.
- SWOFFORD D.L., OLSEN G.J., WADDELL P.J., HILLIS D.M., 1996 – *Phylogenetic inference.* In: Hillis D.M., Moritz C., and Mable B.K. (Eds.), Molecular systematics. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, pp. 407-514.
- TIMMERMANS M.J.T.N., ROELOFS D., MARIËN J., VAN 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 Evol. Biol., 8: 83.
- WHITING M.F., CARPENTER J.C., WHEELER Q.D., WHEELER W.C., 1997 – *The Strepsiptera problem: phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology.* - Syst. Biol., 46: 1-168.
- WHEELER W.C., 1989 – *The systematics of insect ribosomal DNA.* In B. Fernholm et al. (eds.), The Hierarchy of Life. Molecules and Morphology in Phylogenetic Analysis. Amsterdam. Elsevier. 307-321.
- WHEELER W.C., WHITING M., WHEELER Q.D., CARPENTER J.M., 2001 – *The phylogeny of the extant hexapod orders.* – Cladistics, 17: 113-169.
- WHEELER W.C., GLADSTEIN D.S., DELAET J., 2002 – *POY version 3.0.* Program and documentation available at <ftp.amnh.org/pub/molecular/poy>.
- WILSON K., CAHILL V., BALLMENT E., BENZIE J., 2000 – *The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean Peneaus monodon: are malacostracan crustaceans more closely related to insects than branchiopods.* Mol. Biol. Evol. 17, 863-874.