



Konflikte in phylogenetischen Analysen: die verflixten „deep nodes“ im Stammbaum der Insekten

Conflicts in phylogenetic analyses: the challenging deep nodes of the insect tree

GÜNTHER PASS, NIKOLA SZUCSICH & ALEXANDER BÖHM

Abstract: Conflicts in phylogenetic analyses: the challenging deep nodes of the insect tree. We report three test cases of our research on the origin and the early splits of insects to exemplify conflicts in phylogenetic reconstruction. (i) The „Entognatha-problem“: Since the support of the taxon Entognatha by morphological data has always been on shaky ground, high hopes were placed in the molecular approach. The first analyses with single genes consistently led to an unprecedented sister group relationship between Protura and Diplura (the new taxon was later termed Nonoculata). Strangely, however, the first comprehensive transcriptomic analyses even questioned the monophyly of Entognatha. While it might look like a merry-go-round of phylogenetic hypotheses, each new analysis helped us to find out some of the deeper causes of these conflicts. Still, the Entognatha-problem has to be considered as not yet solved. (ii) Brain anatomy: The evolution of the fan shaped body, a highly differentiated substructure of the central complex, is very difficult to explain irrespective on which tree it is mapped. This makes this topic a case example for the pitfalls when we are over-confident in our intuitive prioritization and polarization of morphological characters. (iii) DNA barcoding in Protura: the introduction of this identification tool serves as a positive example of how morphological and molecular approaches can complement each other in unexpected harmony. In summary, we are fortunate to nowadays have two a priori independent approaches in phylogenetic research, which can mutually check each other. In the future, phylogenetic trees will be primarily generated from molecular data, but morphological data will still have an important role as a plausibility check. In the case of conflicts between the two independently generated trees, further research must be carried out on both approaches. In the end it is not the tree itself which counts, but the versatile ways of evolution.

Citation: PASS G., SZUCSICH N. & BÖHM A. 2020: Konflikte in phylogenetischen Analysen: die verflixten „deep nodes“ im Stammbaum der Insekten. – Entomologica Austriaca 27: 233–254

Vorbemerkung: Der nachfolgende Text ist die gekürzte Fassung eines Vortrags im Rahmen des ÖEG-Fachgesprächs 2019 „Diskrepanzen in morphologischen und molekularbiologisch basierten Stammbäumen – Erkenntnisapparat im Notstand“. Der Vortrag wurde als Erfahrungsbericht unserer Arbeitsgruppe konzipiert. Das erklärt die Auswahl der Beispiele, die persönlichen Bezüge sowie den narrativen Duktus des Beitrags, der in der Verschriftlichung beibehalten wurde.

1. Einleitung

Je tiefer man zu den Wurzeln des Stammbaums einer Tiergruppe vordringt, umso schwieriger wird es, zuverlässige Aussagen über Verwandtschaftsbeziehungen zu machen. DNA-Sequenzen, aber auch morphologische Merkmale, die über Hunderte von Millionen Jahre derart konserviert geblieben sind, dass sie für phylogenetische Analysen verwendet werden können, sind rar. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass bei unseren Forschungen zum Ursprung und den frühen Stammbaumverzweigungen der Insekten – Ereignissen die mehr als 400 Millionen Jahre zurückliegen (MISOFF ET AL. 2014) – Konflikte ein zentrales Thema sind. Dabei geht es nicht nur um Konflikte zwischen morphologischen und molekularen Datensätzen (die haben uns tatsächlich weniger Probleme bereitet), sondern auch um Konflikte zwischen morphologischen und vor allem zwischen molekularen Datensätzen, mit denen wir uns intensiv beschäftigt haben. Es soll im Folgenden aber nicht nur von den Konflikten und Schwierigkeiten der phylogenetischen Forschung die Rede sein, sondern auch von den enormen Fortschritten, die in den letzten Dekaden erzielt worden sind. Um diese Erfolge besser sichtbar zu machen, wollen wir mit einer Rückblende beginnen.

2. Von anfänglicher Skepsis zur phylogenetischen Forschung bei den „Ur-Insekten“: eine persönliche Retrospektive

Als ich (G.P.) im Jahre 1968 an der Wiener Universität Zoologie zu studieren begann, war das Biologiestudium „stammbaumfrei“. Es war selbstverständlich klar, dass sich die Evolution der Organismen in Stammbäumen abbilden lässt. Man hat uns auch den berühmten von Ernst Haeckel gezeigt, dazu allerdings angemerkt, dass die dort gezeigten Aufzweigungen sicher nicht den tatsächlichen Verhältnissen entsprechen. Aktuelle Hypothesen oder Diskussionen über die Verwandtschaftsverhältnisse der verschiedenen Tiergruppen wurden uns nicht vermittelt mit dem Hinweis, dass das alles noch völlig unausgegoren sei. Insgesamt wurde ein Bild von Phylogenetik präsentiert in dem es nicht nur viele Kontroversen gibt, sondern auch viel Spekulation und Subjektivität, also – überspitzt gesagt – eine Disziplin in einem vorwissenschaftlichen Stadium. Mag sein, dass die Wiener Zoologie in dieser Hinsicht besonders verpöft war, aber eine gewisse „Stammbaumphobie“ war damals – zumindest im deutschen Sprachraum – weitverbreitet. Das zeigt sich auch darin, dass in den damals verwendeten Lehrbüchern der Zoologie kein einziger Stammbaum zu finden ist. Das gilt sowohl für den „kleinen Kühn“ (KÜHN 1967) als auch für das hochgeschätzte Lehrbuch der Speziellen Zoologie von Alfred Kaestner, der damaligen „Bibel der Zoologie“ (KAESTNER, 5 Bände mit insgesamt rund 2800 Seiten; erschienen 1964 bis 1972). Möglicherweise waren Stammbäume durch ihre Verwendung in der nationalsozialistischen Vererbungslehre und Rassenhygiene (WEINGART ET AL. 1992, FUCHS 2003) so verpöft und belastet, dass man sie einfach ausgeblendet hat, um ja nicht mit Nazi-Ideologie in Verbindung gebracht werden zu können. Von der Genetik ist ja bekannt, dass sie in Deutschland nach dem Ende des Dritten Reiches nur mühsam wieder Fuß fassen konnte (COTTEBRUNE 2008), in der Stammbaumforschung wäre das ein Forschungsthema, das es noch aufzuarbeiten gilt.

Das damals heftig diskutierte Thema Monophylie vs. Polyphylie der Arthropoden soll im Folgenden die damalige Situation der Phylogenetik exemplarisch illustrieren. Während

des Studiums war das Problem nicht thematisiert worden und auch im „Kaestner“ findet sich dazu nur ein knapper, kleingedruckter Hinweis: „... lässt sich nicht entscheiden, ob die Gliederfüßler als mono- oder polyphyletisch entstanden zu denken sind“ (KAESTNER 1964, Bd 1, p. 624). Das haben wir damals als junge Studenten wohl überlesen und ich kann mich noch gut erinnern, dass mich später die Entdeckung dieser Kontroversen recht verunsichert hat. Hatte ich da etwas versäumt? Mein Erstaunen war groß, als ich zur Klärung dieser Frage im bekannten englischsprachigen Lehrbuch „Invertebrate Zoology“ von Barnes (1968) die Polyphylye als aktuell allgemein gültige Hypothese präsentiert fand. Das hat mich schon recht skeptisch gemacht, aber als ich dann noch registrierte, dass es bei diesem Thema eine Spaltung der Scientific Community nach nationalen bzw. Sprachgrenzen gibt („Mantonians“ nahezu ausschließlich im englischsprachigen Raum, „Traditionalists“ in Deutschland und im übrigen Kontinentaleuropa), verstand ich sehr gut die zurückhaltende Haltung meiner Lehrer gegenüber der Phylogenetik nach dem Motto „Wovon man nicht sprechen kann, darüber muss man schweigen“ (WITTGENSTEIN 1922). Damals habe ich für mich beschlossen: niemals werde ich Phylogenetiker! Das Forschungsthema, das ich mir ausgesucht hatte, war dann die Funktionsmorphologie und Physiologie von Kreislauforganen der Insekten. Die Entdeckung, dass die sogenannten akzessorischen Kreislauforgane bei verschiedenen Insekten sehr unterschiedlich gebaut sind, brachte mich später zur Evolutionsmorphologie und dazu braucht man natürlich zur richtigen Interpretation gut abgesicherte Stammbäume. Sie sind das „Rückgrat der Evolutionsforschung“ und jeder, der in der Biologie vergleichend forscht, kommt letztendlich nicht um die Beschäftigung mit phylogenetischen Fragen herum. Als sich dann auch noch herausstellte, dass wir mit unseren Untersuchungen Merkmale gefunden hatten, die für die Phylogenetische Systematik brauchbar waren (PASS et al. 2006), war der Bann gebrochen. Nachdem ich Nikola Szucsich und einige andere kompetente ZoologInnen für die Mitarbeit in einem phylogenetischen Projekt gewinnen konnte, wagten wir den Start in dieses für uns neue Forschungsfeld (N.S. arbeitet an diesem Projekt bis heute mit; er hat sich zunächst mit seiner morphologischen und theoretischen Expertise eingebracht, später aber auch tief in die Analyse molekularer Daten eingearbeitet). Da es sich bei den meisten akzessorischen Kreislauforganen um evolutionäre Neuheiten handelt, die an der Basis des Stammbaums der Insekten entstanden sind, setzten wir unseren Fokus auf den Ursprung und die frühen Stammbaumverzweigungen der Insekten (PASS 2000, PASS et al. 2015). Die Datenlage war in diesem Bereich noch recht unbefriedigend und durch die Arbeit von NARDI et al. (2003) war die spannende Frage der Mono- oder Paraphylie der Insekten aufgeworfen worden. Die primär flügellosen Insekten, die sogenannten „Ur-Insekten“¹, sind vielen Zoologen, ja sogar so manchem

¹ In der phylogenetischen Community hat sich in letzter Zeit der Terminus Hexapoda für das Taxon Ectognatha + Entognatha eingebürgert; „Insecta“ soll nach dieser Terminologie an Stelle von Ectognatha verwendet werden. Das führt natürlich immer wieder zu Verwirrungen und Missverständnissen. So sehr terminologische Hygiene wichtig ist, so sollten wir im Sinne von erleichterter Kommunikation auch zwischen dem wissenschaftlichen Terminus und der umgangssprachlichen Bezeichnung von Tiergruppen unterscheiden. So verwenden wir in unserem Text den Terminus Insekten (mit umgangssprachlicher Wortendung!) und meinen damit die Hexapoda. Auch die Verwendung des Begriffs „Ur-Insekten“ ist natürlich streng genommen nicht richtig, aber wenn wir korrekterweise von „primär flügellosen Hexapoden“ sprechen, dann wissen selbst viele Zoologen nicht, welche Tiere wir damit meinen. Generell sollten alle Termini erlaubt sein, wenn sie durch Gänsefüßchen gekennzeichnet werden, so wie das bei paraphyletischen Taxa oft üblich ist.

Entomologen, nicht genauer bekannt. An der Wiener Universität waren sie den Studierenden der Zoologie hingegen sehr wohl vertraut, da unsere damaligen Lehrer Kühnelt und Schaller renommierte Bodenzooologen waren und uns diese Tiere bei Exkursionen und in Praktika immer wieder vorgestellt wurden. In Wien gibt es im Übrigen eine lange Tradition der „Ur-Insekten“-Forschung (CHRISTIAN 2003, SCHALLER 2003), die bis ins 19. Jahrhundert zurückreicht: Friedrich Brauer, Professor für Zoologie an der Universität Wien und später auch Direktor des Naturhistorischen Museums, hat als erster die primäre Flügellosigkeit dieser Insekten erkannt und 1885 zwei Subklassen der Classis Insecta unterschieden, die Apterygogenea und Pterygogenea (1888 von Lang in Apterygota und Pterygota umbenannt). Sein Schüler Rudolf Stummer von Traunfels hat dann 1891 das Taxon Entognatha als Zusammenfassung der Collembolen und Dipluren eingeführt (die Proturen wurden erst 1907 entdeckt: siehe PASS & SZUCSICH 2011).

Im Folgenden drei Fallbeispiele aus unserer Forschungsarbeit bei den primär flügellosen Insekten. Es geht um Konflikte und zwar auf allen Ebenen: zwischen Morphologie vs. Morphologie, Moleküle vs. Moleküle und Morphologie vs. Moleküle.

3. Das Entognatha-Problem: ein hartnäckiges „Konflikt-Karussell“

Drei Gruppen der primär flügellosen Insekten besitzen entognathe Mundwerkzeuge: die Protura, die Collembola und die Diplura. Bei ihnen befinden sich die Mandibeln und Maxillen in röhrenartigen Kiefertaschen innerhalb der Kopfkapsel, in denen die eingeschlürfte Nahrung verarbeitet wird. Die drei entognathen Gruppen der Insekten sind durch zahlreiche Autapomorphien gekennzeichnet, ihre verwandtschaftlichen Beziehungen untereinander, aber auch zu den anderen Insekten, werden allerdings kontroversiell beurteilt.

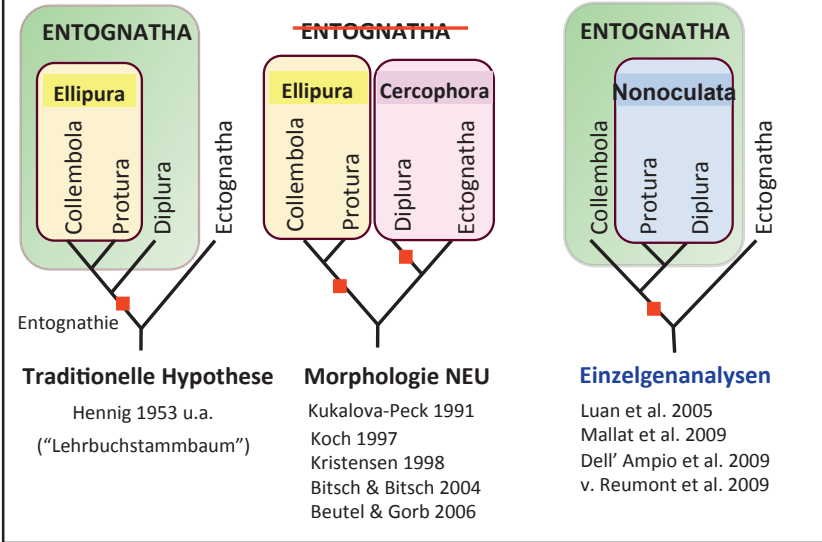
3.1. Morphologie: konkurrierende Hypothesen auf wackeligen Beinen

HENNIG (1969, Abb. 1A) hat die Entognatha als monophyletisches Taxon angesehen, wobei er die entognathe Ausbildung des Mundwerkzeugkomplexes als entscheidende Synapomorphie angesehen hat. Weitere potentielle Synapomorphien betreffen die teilweise oder vollständige Reduktion der Komplexaugen und der Malpighischen Schläuche, alles Merkmale die natürlich auch als konvergente Anpassung an die Lebensweise im Boden bzw. Miniaturisierung des Körpers entstanden sein könnten. Als weiteres monophyletisches Taxon hat Hennig das Taxon Ellipura (BÖRNER 1910) gewertet. Als Synapomorphie dieses Taxons gilt die Linea ventralis, eine kutikuläre Grube, die bei Collembolen die Sekrete der Labialnieren zum Collophor im Abdomen transportiert, wo sie dann offenbar freigesetzt werden; bei den Proturen reicht die Linea ventralis allerdings nur bis zum Hinterhaupt und eine Homologie dieser Gruben erscheint somit recht fraglich.

Durch neuere morphologische Untersuchungen wurde die Monophylie der Entognatha allerdings in Frage gestellt. Eine erneute Analyse des Mundwerkzeugkomplexes primär flügelloser Insekten führte zur Schlussfolgerung, dass die Entognathie bei diesen Tieren offenbar konvergent entstanden ist (KOCH 1997). Als besonders gewichtig wurde dabei angesehen, dass die Mandibeln und Maxillen bei den Ellipura in getrennten Kiefertaschen liegen, während sie sich bei den Diplura in einer gemeinsamen Kiefertasche befinden. Darüber hinaus wurden auch potentielle Synapomorphien der Diplura mit den

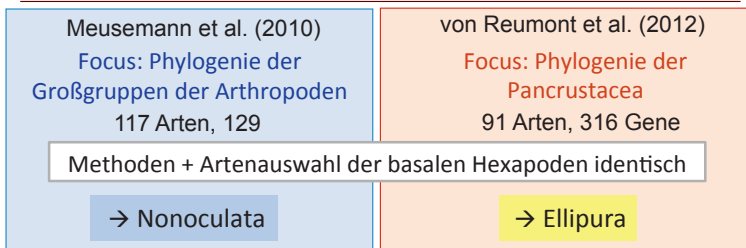
A

Drei konkurrierende Verwandtschaftshypothesen



B

Völlig unerwartete Konflikte bei Mehrgenanalysen



Suche nach den Gründen für die unterschiedlichen Ergebnisse

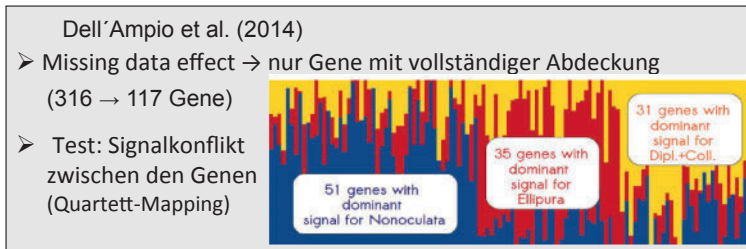


Abb. 1: A) Konkurrierende Hypothesen zur Verwandtschaft der entognathen Insekten. Links und Mitte: Hypothesen, die auf morphologischen Merkmalen basieren; die Hypothese rechts basiert auf molekularen Daten. **B)** Anfängliche Konflikte bei Mehrgenanalysen: die Studie von MEUSEMANN et al. (2010) favorisiert die Nonoculata-Hypothese, die Studie von VON REUMONT et al. (2012) die Ellipura-Hypothese. Eine vertiefte Analyse der Daten zeigt, dass die bei der Analyse verwendeten Gene zwischen den Taxa ungünstig verteilt sind, sodass alle drei denkbaren Gruppierungen der entognathen Insekten gut unterstützt werden (DELL'AMPIO et al. 2014).

Ectognatha entdeckt: paarige Krallen an den Laufbeinen (z. B. KRISTENSEN 1998), das Muster der Mikrotubuli im Axonema der Spermien (DALLAI et al. 2011), Unterschiede in der Entwicklung der Embryonalhüllen (SEKIYA & MACHIDA 2011) sowie das Fehlen von Temporalorganen, den sogenannten Tömösvary'schen Organen. Das entsprechende Taxon Diplura + Ectognatha wurde von WILLMANN (2003) Cercophora genannt, also „Cercus-Träger“, im Gegensatz zur Schwestergruppe Ellipura (was übersetzt „ohne Schwanzanhänge“ bedeutet). In der Folge haben sich alle morphologisch arbeitenden Phylogenetiker dieser Hypothese (Fig. 1A) angeschlossen (KRISTENSEN 1998, BITSCH & BITSCH 2004, BEUTEL & GORB 2006).

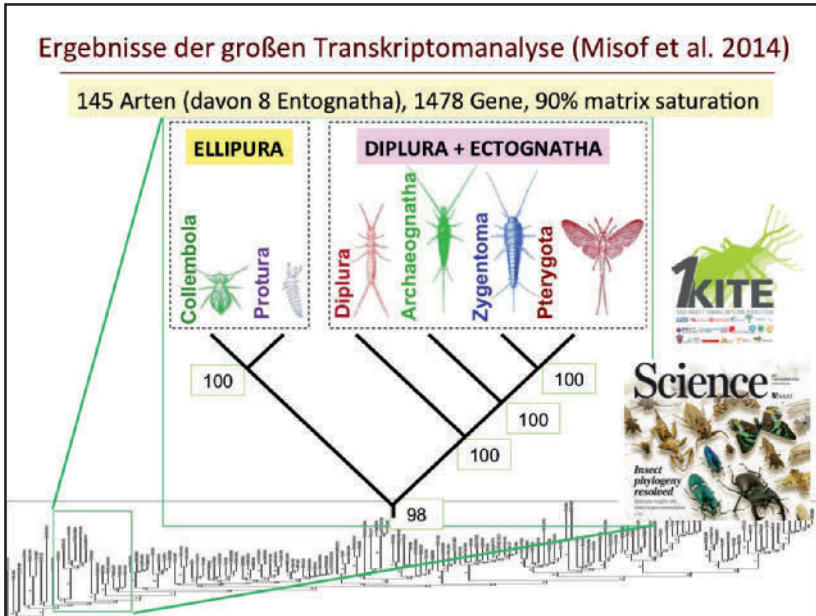
Nachuntersuchungen haben allerdings zur einer Neuinterpretation und Neubewertung einzelner Merkmale geführt. Bei der Erstellung einer morphologischen Datenmatrix für eine phylogenetische Analyse der primär flügellosen Insekten traten mehrfach Probleme bei der Zuordnung einzelner Arten auf. Als Beispiel sei hier die Situation bei der Ausbildung des Prätarsus geschildert: bei Collembola und Protura kann die gekrümmte Spitze des Prätarsus eindeutig dem Zustand „unpaar“, bei Archaeognatha und Pterygota dagegen dem „gepaarten“ Zustand zugeordnet werden. Probleme gibt es jedoch bei *Lepisma* (*Zygentoma*) und *Cataglyphis* (*Diplura*), die drei klauenartige Strukturen an der Spitze jedes Beines haben: (i) ein Paar spornartiger lateraler Krallen, die durch eine Membranregion von der Prätarsalbasis getrennt sind; und (ii) der Prätarsus selbst, der sich zu einer gekrümmten und spitzen Mittelspitze verjüngt. Das Vorhandensein von drei krallenartigen Strukturen spiegelt sich in der traditionellen Kodierung jedoch nicht wider. Durch die binäre Kodierung wird eine direkte Transformation von unpaaren zu paarigen Klauen oder umgekehrt impliziert, was nach der oben beschriebenen Analyse nicht zutreffen kann (SZUCSICH & PASS 2008a, b). Darüber hinaus hat eine akribische Nachuntersuchung der Kopfanatomie primär flügelloser Insekten gezeigt, dass die Mandibeln und Maxillen nicht nur bei den Collembolen, sondern auch bei den Dipluren in getrennten Kiefertaschen liegen, die bei Letzteren allerdings im anterioren Bereich verschmelzen (BLANKE & MACHIDA 2016). Damit wird die Annahme einer Konvergenz der Entognathie dieser Gruppen wieder in Frage gestellt. Also vielleicht: „Vorwärts, zurück zur traditionellen Entognatha-Hypothese?“

Generell sollte man sich immer vor Augen halten, dass in der Phylogenie auch die wahrscheinlichste Hypothese noch durchaus schlecht unterstützt sein kann. Bekanntlich ist der Einäugige König unter den Blinden. Aus gerade diesem Grund sollte man in der Phylogenetik immer nach unabhängiger Unterstützung für Hypothesen suchen.

3.2. Moleküle: nach der kurzen Regierung der „Kein-Äugigen“ zurück zur klassischen Hypothese

Die neue Sicht auf die Schwestergruppenbeziehung der Insekten war eines der ersten revolutionären Resultate der molekularen Phylogenetik. Zunächst ziemlich umstritten, fand sie später als Pancrustacea (= Tetraconata)-Hypothese breite Akzeptanz (Reviews: GIRIBET & EDGEcombe 2013, 2019). Im krassen Gegensatz dazu blieben die Beziehungen zwischen den entognathen Insektengruppen Collembola, Diplura und Protura, lange Zeit unbeachtet. In den Fokus kamen sie erst durch die bahnbrechende Arbeit von NARDI et al. (2003), in der auf Grund der Analyse mitochondrialer Gene die Monophylie der

A



B

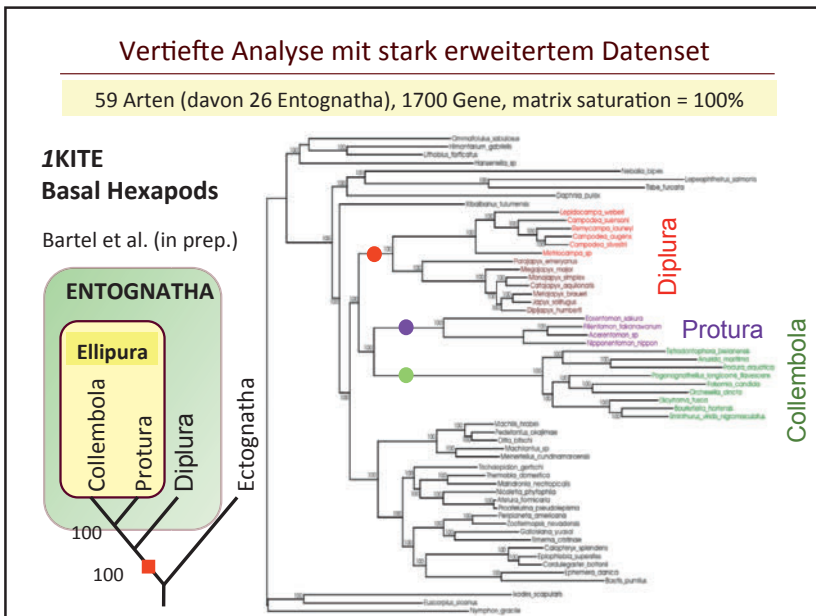


Abb. 2: A) Ergebnis der ersten großen Rekonstruktion des Insektenstammbaums im Rahmen des Projekts 1KITE (MISOFF ET AL. 2014): Infragestellung der Monophylie der Entognatha, die Ellipura sind monophyletisch. **B)** Unveröffentlichte Ergebnisse eines erweiterten Datensatzes (24 Arten der entognathen Gruppen gegenüber 8 Arten bei Misof et al. 2014): die Monophylie der Entognatha wird unterstützt, die Ellipura bleiben monophyletisch.

Insekten in Frage gestellt wurde. Demnach sollen die Collembolen eine eigene Stammlinie repräsentieren, die im Stammbaum der Pancrustacea tiefer wurzelt als mehrere Crustaceengruppen. Eine erneute Analyse desselben Datensatzes mit anderen Methoden bestätigte allerdings die Monophylie der Insekten (DELSUC et al. 2003). Kurz darauf wurde klar, dass mitochondriale Gene offenbar nicht ausreichen, um die Beziehungen zwischen Entognatha, Ectognatha und den Crustacea aufzuklären (CAMERON et al. 2004).

Zu diesem Zeitpunkt haben wir uns entschlossen in die Thematik einzusteigen und zwar mit einem kombinierten Forschungsansatz, d. h. sowohl mit molekularen als auch mit morphologischen Methoden. Im molekularen Bereich hatte sich schon damals abgezeichnet, dass eine kleine Arbeitsgruppe mit ihren begrenzten finanziellen und personellen Ressourcen bald nicht mehr kompetitiv forschen kann. Wir haben deshalb von Beginn an internationale Kooperationen gesucht und zunächst mit der Arbeitsgruppe Frati von der Universität Siena gefunden, die die ersten molekularen Daten von entognathen Insekten generiert hatte. Kurze Zeit später erfuhren wir durch Zufall, dass die Arbeitsgruppe von Bernhard Misof an der Universität Bonn ein vergleichbares Projekt zur Aufklärung der Verwandtschaftsverhältnisse der primär flügellosen Insekten plant. Wir haben daraufhin unsere Vorhaben koordiniert und es entwickelte sich in der Folge eine außerordentlich fruchtbare und harmonische Kooperation, die bis heute andauert.

Begonnen haben die molekularen Analysen bei den entognathen Insekten mit den damals für die Analyse tiefer Knoten häufig verwendeten ribosomalen Kerngenen 18S und 28S. Die Ergebnisse stellten die traditionelle Sicht der Beziehungen zwischen Collembola, Diplura und Protura sofort in Frage: in allen Analysen wurde nämlich nicht die Ellipura bevorzugt, sondern ein Schwestergruppenverhältnis von Diplura und Protura, eine Gruppierung die von Morphologen zuvor noch nie in Betracht gezogen worden war (Abb. 1A; für einen Review siehe DELL'AMPIO ET AL. 2011). Die einzige potenzielle Synapomorphie, die sich für das neue Taxon finden ließ, ist das Fehlen von Augen und dementsprechend wurde es „Nonoculata“ getauft (LUAN et al. 2005).

Die Weiterentwicklung der Methoden in der molekularen Phylogenetik erfolgte enorm schnell, und nach den Einzel- und Mehrgenanalysen kam bald die Ära der Phylogenomik. Bei den Insekten wurde dazu die interdisziplinäre Initiative 1KITE (1K Insect Transcriptome Evolution) gestartet, an der heute über 80 WissenschaftlerInnen aus 11 Nationen beteiligt sind. Primäres Ziel dieses Großprojekts war es, Transkriptome von mindestens 1000 (1K) Insekten zu generieren (<https://www.1kite.org>). Zusammen mit der Arbeitsgruppe von Bernhard Misof und dem japanischen Team von Ryuichiro Machida haben wir das Subprojekt über die primär flügellosen Insekten betreut. Der erste transkriptombasierte Ansatz, der eine Aufklärung der Verwandtschaftsbeziehungen der Großgruppen der Arthropoden zum Ziel hatte, brachte für die entognathen Insekten eine Bestätigung der Einzelgenanalysen: sowohl die Monophylie der Entognatha als auch der Nonoculata-Hypothese wurden sehr gut unterstützt (Abb. 1B; MEUSEMANN et al. 2010). Eine nachfolgende Studie, die auf eine engere Pancrustacea-Perspektive fokussierte, brachte jedoch ein völlig anderes Ergebnis: nicht die Nonoculata, sondern die Ellipura wurden mit hohen Bootstrap-Werten unterstützt (Abb. 1B; VON REUMONT et al. 2012). Dieser Konflikt war zunächst völlig unverständlich, da die beiden Untersuchungen mit

denselben Analysemethoden und einer praktisch identischen Taxon-Stichprobe innerhalb der entognathen Gruppen durchgeführt worden waren (ein einziges Collembola-Transkriptom wurde hinzugefügt!). Diese Ergebnisse boten eine außergewöhnlich günstige Möglichkeit, die tieferen Gründe für diese Konflikte herauszufinden. In einer weiteren Studie konnten wir schließlich zeigen, dass eine ungleiche Verteilung von fehlenden Gensequenzen zusammen mit einer ungünstigen Verteilung von Genen die Ursache von solchen Konflikten sein können (Abb. 1B; DELL'AMPIO et al. 2014). Fazit: auch mit 100 % Bootstrap-Werten unterstützte Bäume können falsch sein! Als entscheidende Konsequenz dieser Untersuchung sollten bei Transkriptomanalysen in Zukunft generell immer nur optimierte Datensätze mit hoher Sättigung, d. h. mit möglichst vollständigen Gensätzen bei allen untersuchten Arten, verwendet werden („decisive datasets“). Ein solcher Datensatz war dann die Grundlage der ersten umfangreichen 1KITE-Studie mit 144 Taxa aus allen Großgruppen der Insekten (Abb. 2A; MISOF et al. 2014). Die Ellipura blieben die präferierte Hypothese, allerdings wurde die Monophylie der Entognatha in Frage gestellt. Die Dipluren bildeten die Schwestergruppe der ectognathen Insekten, was der bereits von Morphologen diskutierten Cercophora-Hypothese entspricht. Mittlerweile wurden im Rahmen von 1KITE die Transkriptome von insgesamt 1400 Insektenarten sequenziert und assembliert. Damit liegt der mit Abstand größte molekulare Datensatz für phylogenetische Analysen bei Eukaryoten vor. Bisher wurde nur ein kleiner Teil der gesamten Sequenzen publiziert und die Forschung geht nun in den einzelnen taxonomischen Subgruppen, aber auch am gesamten Datenset, weiter. Bei den primär flügellosen Insekten unterstützen Analysen eines erweiterten Datensatzes mit einem größeren Artenspektrum zu unserer Verwunderung (und Frustration!) wiederum die Monophylie der Entognatha (Abb. 2B). Zurzeit scheint es, dass wir die Anzahl möglicher Bäume wohl auf zwei Alternativen einschränken können, in denen die Ellipura entweder die Schwestergruppe der Cercophora oder aber die Schwestergruppe der Diplura bilden (die Nonoculata-Hypothese tauchte bei keiner Analyse mit optimiertem Datensatz auf und kann wohl ad acta gelegt werden). Für die tieferen Gründe dieses Konflikts haben wir bereits erste Ansätze für Erklärungen gefunden, benötigen aber noch eine Reihe weiterer Analysen mit Datensets, bei denen einzelne Taxa ausgeschlossen werden.

Vor kurzem ist in der molekularen Phylogenetik der Insekten auch die Genomische Ära angebrochen. Mit i5k wurde eine internationale Initiative gestartet, bei der die Genome von 5000 Arthropoden sequenziert werden sollen (<http://i5k.github.io/>). Wir sind auch an diesem Projekt beteiligt und es gibt bereits vollständige Genome von mehreren entognathen Insektenarten. Die bisherigen phylogenetischen Analysen (THOMAS et al. 2019, MANNI et al. 2020) lassen allerdings noch keine klaren Rückschlüsse auf die von uns untersuchten Fragestellungen zu. Zusammenfassend kann man feststellen, dass das „Entognatha“-Problem ein besonders hartnäckiger und scheinbar fast unlösbarer Fall in der Phylogenetik zu sein scheint. Trotzdem sollten wir das Potenzial, das in völlig optimierten und kompletten molekularen Datensätzen und der Weiterentwicklung der Analysemethoden liegt, nicht unterschätzen.

4. Fallbeispiel: Der Zentralkomplex der Insekten – das alte Lied vom Problem mit den Ähnlichkeiten

Bei diesem neuroanatomischen Thema geht es primär nicht um Konflikte zwischen morphologischen und molekularen Datensätzen, sondern vielmehr um die Schwierigkeiten der Interpretation morphologischer Ähnlichkeiten in phylogenetischen Kontexten und um die Gefahren, die in der Priorisierung einzelner Merkmalskomplexe liegen. Die Neuroanatomie wird in der phylogenetischen Forschung gerne als diejenige Disziplin angesehen, die vor allem für die Analyse der Verwandtschaftsbeziehungen der Großgruppen die härtesten morphologischen Fakten liefert. Zum einen sind die Merkmale strukturell recht komplex, zum anderen weisen sie sowohl alte, konservative Elemente als auch zahlreiche Modifikationen und Innovationen auf. Außerdem ist das methodische Spektrum, das bei neuroanatomischen Untersuchungen zur Anwendung kommt, sehr breit: neben den klassischen morphologischen Techniken sind auch die Immunzytochemie zur Charakterisierung neuroaktiver Substanzen von großer Bedeutung. Durch die enorme Weiterentwicklung dieser Techniken zusammen mit der Einführung der Konfokalen Laser-Rastermikroskopie (CLSM) haben neuroanatomische Untersuchungen in den letzten Dekaden einen enormen Aufschwung erlebt. Um die besonderen Vorzüge neuroanatomischer Daten hervorzuheben, wurde sogar ein eigener Terminus kreiert, nämlich „Neurophylogenie“ (siehe HARZSCH 2006, LOESEL & RICHTER 2014); ein bisschen PR kann auch in der Wissenschaft nicht schaden.

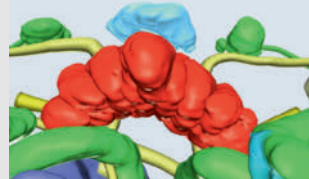
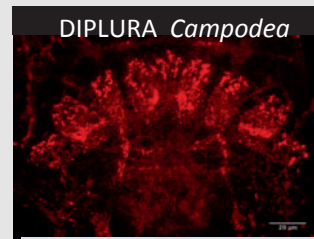
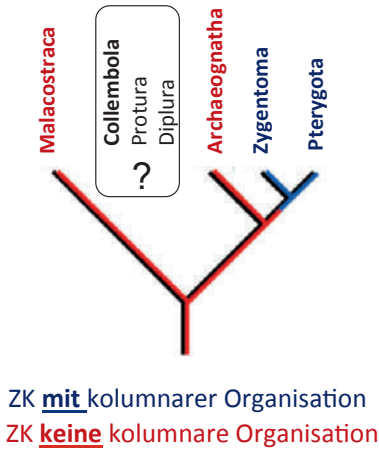
Der Zentralkomplex ist ein anatomisch stark differenzierter Bereich des Protocerebrums und eine der obersten Schaltstellen im Gehirn der Insekten, „the brain in the brain“ wie STRAUSFELD (2012) treffend schreibt. Obwohl wir die Funktion der einzelnen Teile noch nicht gut verstehen, konnte in einer Reihe von diffizilen Untersuchungen gezeigt werden, dass in diesen Zentren multimodale sensorische Inputs zusammengeführt, orchestriert und mit motorischen Aktionen verknüpft werden (Reviews: PFEIFFER & HOMBERG 2014, TURNER-EVANS & JAYARAMAN 2016). Hier werden also offenbar Entscheidungen getroffen, wie ein Tier z. B. seine Extremitäten koordiniert und gerichtet bewegt. Besonders gut untersucht sind die Zusammenhänge zwischen visuellem Input und lokomotorischen Aktivitäten. Neben der Steuerung der Orientierung eines Insekts im Raum sind auch räumliche Gedächtnisleistungen in diesen Zentren lokalisiert, die mit modulatorischen Einflüssen, z. B. Tageszeiten, Hunger oder sexuellem Status verknüpft werden können.

Der Zentralkomplex besteht bei den pterygoten Insekten aus vier gut abgrenzbaren Neuropilbezirken, die untereinander stark vernetzt sind (Reviews: STRAUSFELD 2012, 2019, LOESEL ET AL. 2013). Im phylogenetischen Kontext dieses Vortrags wollen wir nur auf die Struktur des Zentralkörpers fokussieren und hier wiederum auf den sogenannten Fächerkörper. Dieser weist eine außerordentlich komplexe Organisation in 8 bis 9 säulenartige synaptische Kompartimente auf, sogenannte Kolumnen, die in mehreren Schichten organisiert sind. Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass in der fächerartigen Struktur dieses Hirnzentrums die Räumlichkeit der Umgebung wie auf einer Landkarte festgelegt ist. Offenbar kommt diesem Teil des Zentralkörpers eine wichtige Rolle bei der Orientierung dieser Tiere zu (PFEIFFER & HOMBERG 2014).

A

Evolution des Zentralkörpers (ZK) bei Pancrustacea

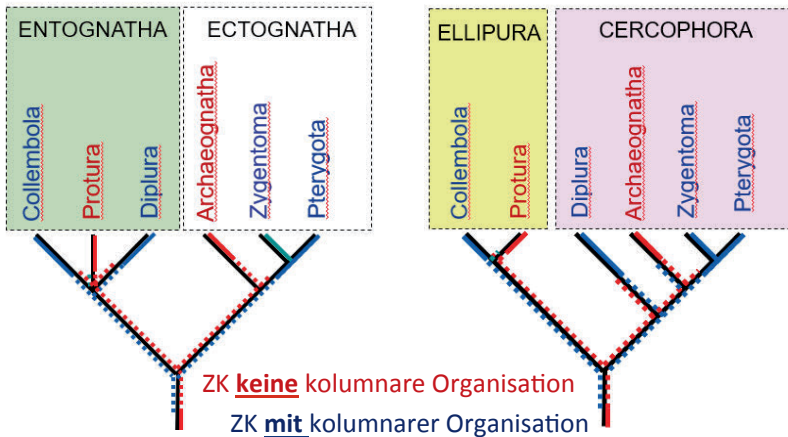
Ausgangslage (Strausfeld 2009):



kolumnar organisierter ZK
 („Fächerkörper“)
 (Böhm et al. 2012)

B

Szenarien: Evolution des Zentralkörpers (ZK) bei Hexapoda



Welches ist die plesiomorphe Merkmalszustand?
 bei Außengruppe Remipedia → keine kolumnare Organisation

Abb. 3: A) Evolution des Zentralkörpers im Protocerebrum der Pancrustacea. Links: Zunächst wurde angenommen, dass die fächerartige Organisation dieses Assoziationszentrums eine Apomorphie der Dicondylia ist. Rechts: Diplura haben einen ganz ähnlichen, fächerartig differenzierten Zentralkörper mit kolumnarer Organisation. **B)** Nicht-kolumnare und kolumnare Ausbildung des Zentralkörpers an der Basis des Stammbaums der Insekten. Links: Evolutionsszenario unter Annahme der Entognatha-Hypothese, rechts: unter Annahme Cercophora-Hypothese. Keines der beiden Szenarien ist parsimonischer und verlangt eine mehrfache konvergente Entstehung bzw. Reduktion der kolumnaren Organisation.

Ein komplex organisierter Fächerkörper war bei den Insekten zunächst nur von den Pterygota und den Zygentoma bekannt. Bei den Archaeognathen ist der entsprechende Neuropilbereich nicht vergleichbar strukturiert, sie gleichen darin vielen Crustaceen. Deshalb wurde ein einfach gebauter Zentralkörper als plesiomorphe Merkmalsausbildung angesehen und der Fächerkörper als Synapomorphie der Dicondylia gewertet (STRAUSFELD 2009). Bei dieser Interpretation fehlte allerdings noch die Kenntnis der Anatomie des Zentralkörpers der entognathen Gruppen. Zunächst wurde bei Collembolen ein fächerartig organisierter Zentralkörper beschrieben (KOLLMANN ET AL. 2011). Daraufhin haben wir in unserer Arbeitsgruppe die Gehirne von Vertretern der beiden Subgruppen der Dipluren untersucht. Bei beiden Arten konnte ein sehr gut ausgebildeter Fächerkörper mit kolumnarer Organisation nachgewiesen werden (Abb. 3A; BÖHM et al. 2012). Beim winzigen Gehirn der Proturen war es nicht möglich immunzytochemische Methoden anzuwenden, aber TEM Untersuchungen legen nahe, dass der Zentralkörper bei diesen Insekten nicht fächerartig organisiert ist. Die Merkmalsverteilung bezüglich der Struktur des Zentralkörpers ist demnach an der Basis des Stammbaums der Insekten sehr eigenartig (Abb. 3B). Bei beiden alternativen phylogenetischen Hypothesen ist die logische Konsequenz entweder eine mehrfache konvergente Entwicklung der kolumnaren Struktur oder deren mehrfache Reduktion, eine äußerst unparsimonische Situation. Bezüglich der Außengruppe, die wir für eine Rekonstruktion des plesiomorphen Zustands benötigen, war lange Zeit unklar, welche Gruppe innerhalb der Crustaceen die Schwestergruppe der Insekten ist. Dies wiederum ist gerade im vorliegenden Fall besonders wichtig, da der Zentralkörper bei den Crustaceen anatomisch recht unterschiedlich ausgebildet ist (STEGNER et al. 2014, THOEN et al. 2017). In letzter Zeit hat sich jedoch immer klarer herauskristallisiert, dass mit großer Wahrscheinlichkeit die Remipedia die Schwestergruppe der Insekten sind (VON REUMONT et al. 2012, SCHWENTNER et al. 2018, GIRIBET & EDGEcombe 2019). Der Zentralkörper der Remipedia ist relativ einfach gebaut und weist keine dem Fächerkörper der Insekten vergleichbare Struktur auf (FANENBRUCK et al. 2004, FANENBRUCK & HARZSCH 2005, STEMME et al. 2012). Zahlreiche Eumalacostraca haben jedoch einen Zentralkörper mit einer komplexeren Organisation und insbesondere die Fangschreckenkrebsse (Stomatopoda) besitzen einen Fächerkörper, der dem der Insekten außerordentlich ähnlich ist (THOEN et al. 2017). Bemerkenswerterweise findet sich im Protocerebrum der Stomatopoden auch noch eine Struktur, die dem Pilzkörper der Insekten verblüffend ähnelt (WOLFF et al. 2017). Nach dem aktuellen Stand der phylogenetischen Verhältnisse sind die Insekten und die Stomatopoden jedoch an weit voneinander entfernten Ästen des Stammbaums der Pancrustacea angesiedelt (OAKLEY et al. 2013, SCHWENTNER et al. 2018, GIRIBET & EDGEcombe 2019). Ob es sich bei den verblüffenden Ähnlichkeiten in der Architektur des Protocerebrums bei Stomatopoden und Insekten um konvergente Bildungen handelt oder doch um eine homologe uralte Grundorganisation des Zentralkörpers, die mehrfach reduziert worden ist, wird heftig diskutiert (siehe dazu auch die ausführlichen Gutachterkommentare und Stellungnahmen der AutorInnen, die als elektronischer Anhang der Publikation WOLFF et al. 2017 publiziert wurden).

In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass die Stomatopoden im Vergleich zu den anderen verwandten Krebsen durch hochentwickelte Augen mit differenziertem

Farbensehen, sowie besonders komplexe Bewegungen der Extremitäten und Lokomotionsformen auffallen. Darin sind sie in gewisser Weise den Insekten vergleichbar und die differenzierte Ausbildung des Zentralkörpers könnte ganz generell die Konsequenz einer sehr mobilen Lebensform und außergewöhnlicher Sinnes- und Körperleistungen sein. Dazu würde auch passen, dass blinde Formen mit relativ stereotypen Körperbewegungen, wie die Remipedia, nur einen kleinen und einfach organisierten Zentralkörper haben oder ein solcher sogar völlig fehlt, wie bei den Cephalocarida und den Cirripedia (STEGNER & RICHTER 2015). Wenn wir die Verhältnisse bei den primär flügellosen Insekten dagegenhalten, so ist die Situation dort genau umgekehrt: die Dipluren mit dem komplexen Fächerkörper sind blind, während die Archaeognathen mit dem einfach gebauten Zentralkörper gut entwickelte Komplexaugen haben. Der Fächerkörper der Dipluren muss also in einem nicht-visuellen sensorischen Funktionskreis von Bedeutung sein. Archaeognathen haben darüber hinaus eigenartigerweise auch als einzige Insekten keine Pilzkörper. Funktionelle Hinweise für das Fehlen dieser wichtigen Hirnstrukturen finden sich in den Lebens- und Leistungsfunktionen dieser Tiere jedoch nicht. Dabei ist das Schwestergruppenverhältnis zwischen den Archaeognatha und den Dicondylia sowohl durch morphologische als auch molekulare Daten gut gesichert.

Es ist sehr unwahrscheinlich, dass der Zentralkomplex mit seinen lebenswichtigen Funktionen bei den Arthropoden mehrfach unabhängig entstanden ist. Dies betrifft allerdings nur die Grundstrukturen dieses Gehirnzentrums. Inwieweit jedoch die kolumnare Organisation des Fächerkörpers bei Stomatopoden und Insekten homologe oder konvergent entstandene Strukturen darstellen, bleibt eine offene Frage. Die phylogenetisch nur schwer erklärbaren Verhältnisse in der Neuroanatomie dieser Hirnzentren an der Basis des Stammbaums der Insekten verdient auf jeden Fall größere Beachtung. Weiteren Untersuchungen bei den primär flügellosen Insekten könnte bei der Aufklärung der spannenden Evolutionsgeschichte der Gehirne bei den Pancrustacea sogar eine Schlüsselrolle zukommen.

5. DNA-Barcoding bei Protura: molekulare und morphologische Daten in unerwarteter Harmonie

Bei diesem Beispiel geht es primär nicht um Phylogenetik, sondern um die Identifizierung von Arten. Wir haben es ausgewählt, um exemplarisch aufzuzeigen, welche entscheidenden Fortschritte in der biologischen Systematik durch die Verwendung molekularer Methoden in Kombination mit traditioneller Morphologie möglich sind.

Die Proturen gehören zu den ältesten rezenten Insektengruppen und sind damit natürlich in phylogenetischen Kontexten ein Schlüsseltaxon (MISOFF et al. 2014). Trotzdem sind sowohl ihre Anatomie, als auch viele Aspekte ihrer Biologie noch weitgehend unerforscht (PASS & SZUCSICH 2011). Die Proturen sind winzig – ihre Körperlänge liegt bei etwa einem Millimeter – und morphologisch sehr uniform. Sie kommen auf allen Kontinenten vor und es wurden bisher ca. 800 Arten von Proturen beschrieben (GALLI et al. 2018). Die Artidentifizierung ist außerordentlich schwierig, da es nur wenige und sehr diffizile Differentialmerkmale gibt. Deshalb gibt es weltweit tatsächlich nur eine Handvoll Spezialisten, die Proturen verlässlich bestimmen können und das auch nur nach langjähriger Einarbeitung.

Beim IKITE Projekt standen wir bei den Proturen vor folgendem kniffligen Problem: für die Artidentifizierung muss ein aufgehelltes Totalpräparat gemacht werden, dann kann man allerdings keine molekulare Analyse mehr durchführen. Umgekehrt werden für molekulare Analysen die Tiere normalerweise zerquetscht und dann ist natürlich eine morphologische Determination nicht mehr möglich. Die Lösung des Problems war die Entwicklung einer nicht destruktiven DNA-Extraktionsmethode, bei der das herausgelöste Gewebe für DNA-Barcoding verwendet werden kann, die Kutikula aber für eine morphologische Identifizierung in der Regel erhalten bleibt (BÖHM et al. 2011).


Als Testfall der Brauchbarkeit dieser Methode bot sich am Standort Wien eine außerordentlich spannende Fragestellung an: am Leopoldsberg befindet sich nämlich der weltweite Biodiversitäts-Hotspot dieser Tiere! CHRISTIAN & SZEPTYCKI (2004) konnten an diesem Standort in vier Bodenproben (entnommen an den Ecken eines Quadrats mit 2 Meter Seitenlänge) insgesamt 23 Arten von Proturen nachweisen. Eine Koexistenz von so vielen Arten auf engstem Raum scheint allen ökologischen Regeln zu widersprechen und man fragt sich natürlich: handelt es sich hier tatsächlich um unterschiedliche Arten? Diese Fragestellung untersuchten wir mit unserem neu entwickelten methodischen Barcoding-Tool. In unserem Labor wurde die molekulare Aufarbeitung durchgeführt, während Julia Shrubovych von der Universität Krakau die morphologische Determination durchführte (Abb. 4A). Das Ergebnis dieses Doppelblindversuchs war verblüffend: beide Barcode-Marker (COI und 28S rDNA) trennten die untersuchten Proturen in hoch kongruente Cluster und diese wiederum spiegeln exakt die in den morphologischen Untersuchungen identifizierten Arten und Gattungen wider (Abb. 4B; RESCH et al. 2013). DNA-Barcoding kann somit als sehr verlässliches Identifikationstool für Proturen angesehen werden. Mit Hilfe dieser Methodik können nun endlich auch diese kryptischen kleinen Bodeninsekten, die in ökologischen Bodenuntersuchungen bisher praktisch immer undeterminiert geblieben sind, ohne großen Aufwand und ohne Beiziehen von morphologisch arbeitenden Spezialisten auf die Art bestimmt werden. Die Meta-Barcoding-Methode ermöglicht darüber hinaus in einem einzigen Analyseschritt eine Aussage darüber, welches Artenspektrum von Proturen in einer Bodenprobe enthalten ist.

6. Resümee und Ausblick

Ein Vergleich des aktuellen Stands der Phylogenetik mit dem vor 50 Jahren zeigt eindrucksvoll die enormen Fortschritte: die anfänglich weitgehend intuitiv arbeitende Disziplin forscht heute auf epistemologisch gut fundierten Grundlagen und wird als solide naturwissenschaftliche Disziplin anerkannt. Entscheidend war dabei die Einführung molekularer Methoden zusätzlich zu den herkömmlichen morphologischen Untersuchungen. Damit stehen zwei a priori unabhängige Forschungsansätze zur Verfügung, was die Möglichkeit eröffnet die Ergebnisse wechselseitig kritisch zu überprüfen. Der anfängliche Argwohn und das Gegeneinander von Morphologen und Molekularbiologen ist im Lauf der letzten Dekaden zu einem Miteinander geworden. Heute ist es in der phylogenetischen Forschung gängige Praxis, dass multidisziplinäre Teams aus Molekularbiologen, Morphologen und Bioinformatikern zusammenarbeiten (so wie wir es im Rahmen des IKITE Projekts so positiv erleben durften!). Damit steigt das gegenseitige Verständnis

A

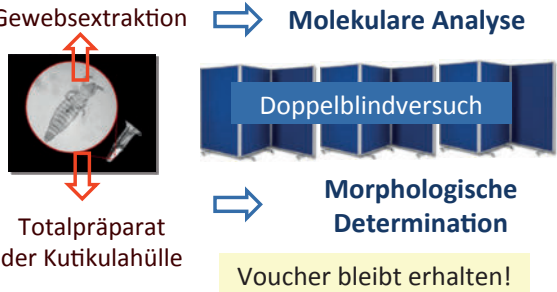
Das Problem für molekulare Analysen bei Protura:



- für Artdetermination muss Totalpräparat gemacht werden (-> dann keine molekulare Analyse mehr möglich!)
- für molekulare Analyse werden die Tiere zerquetscht (-> dann keine morphologische Analyse mehr möglich!)

Die Lösung: nicht-destruktive DNA-Extraktion


Gewebsextraktion → Molekulare Analyse




Doppelblindversuch

Morphologische Determination

Voucher bleibt erhalten!



Daniela Bartel
Carol Resch



Julia Shrubovych

B

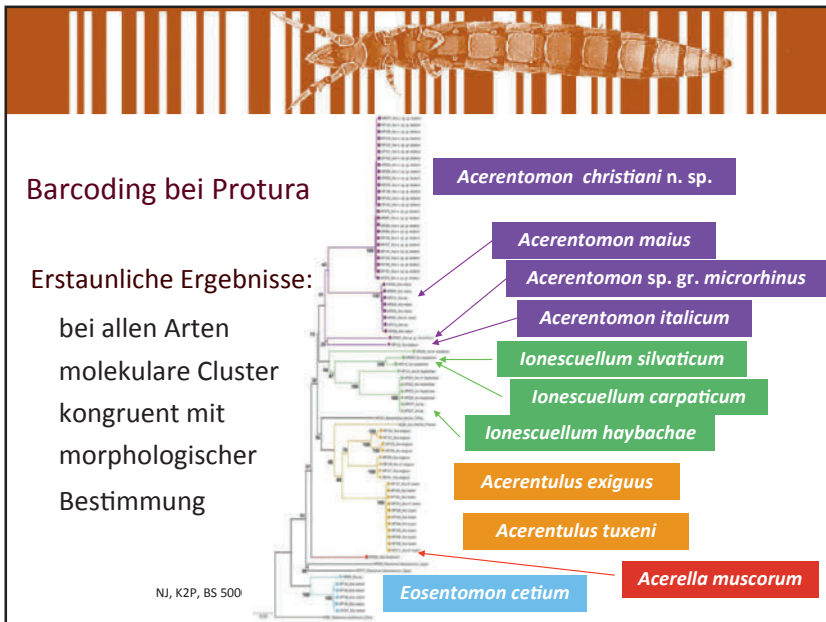


Abb. 4: A) Herausforderungen molekularer Methoden beim Arbeiten mit kleinen Organismen wie den Protura. B) Kongruenz von DNA-Barcoding und morphologischer Identifikation bei Proturenarten.

der Stärken und Schwächen, aber auch der Fehlerquellen und Grenzen des Erklärungspotenzials der beiden Forschungsansätze. Unter Phylogenetikern bemerkt man immer wieder, dass Konflikte in phylogenetischen Analysen eher unter den Teppich gekehrt und in den Veröffentlichungen ausgeklammert werden. Genau das Gegenteil sollte der Fall sein: Konflikte müssen als willkommene Chance zum Testen von Hypothesen gesehen werden. Nur so können wir die Probleme der beiden Forschungsansätze erkennen und diese eliminieren bzw. die Analysefähigkeit optimieren.

Trotz der großen Erfolge der phylogenetischen Forschung, gibt es noch immer viele Unklarheiten und Konflikte im Stammbaum der Tiere, die problematischen Bereiche werden aber laufend eingengt und weniger. Die Auflösung einzelner Knoten im Stammbaum, aber auch von Verwandtschaftsbeziehungen ganzer Tiergruppen, erweist sich eigenartigerweise als extrem schwierig, so sind z. B. die Myriapoden (SZUCSICH et al. in prep.) oder die im Vortrag vorgestellten primär flügellosen Hexapoden besonders hartnäckige Kandidaten. Über die tieferen Hintergründe und Ursachen der Probleme bei diesen Taxa lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur spekulieren. Dass wir hier in einem unlösbaren Erkenntnisnotstand sind, können wir aber nicht glauben. Bei beiden Forschungsansätzen gibt es noch „Luft nach oben“. Verbesserungen in der Qualität der Datensätze, aber auch neue Methoden, haben sich immer wieder als Schlüssel zur Weiterentwicklung phylogenetischer Analysen erwiesen und so wird es wohl auch in diesen Fällen sein. Molekular basierte Stammbäume sind mittlerweile recht leicht und kostengünstig generierbar und in der genomischen Ära sind noch weitere Fortschritte in der Vollständigkeit der Gensequenzen und Verbesserungen der Testmethoden zu erwarten. Aber auch in der Morphologie gab es in den letzten Dekaden wichtige technische Innovationen (CLSM, Micro-CT, computerbasierte 3D Rekonstruktion von Schnittserien etc.) und weitere Optimierungen, z. B. Automatisierungen in der Bildanalyse, werden die Arbeit erleichtern und damit umfangreichere vergleichende Untersuchungen ermöglichen, an denen es oft noch mangelt.

Wagen wir einen Blick in die Zukunft: die Phylogenetik ist und bleibt eine zentrale Aufgabe der Evolutionsforschung. Für die Rekonstruktion der Phylogenese müssen selbstverständlich alle brauchbaren Informationsquellen genutzt werden, um in einem integrativen Ansatz möglichst widerspruchsfreie Hypothesen zur Verwandtschaft der Tiere entwickeln zu können. Dabei dürfen molekulare und morphologische Daten wegen unterschiedlicher Grundannahmen des Evolutionsverlaufs nicht vermischt werden, wie etwa in „total evidence“ Verfahren (TAUTZ 2007). Aus den oben genannten Gründen wird die Morphologie in der Generierung von neuen Stammbäumen immer mehr an Bedeutung verlieren. Dessen ungeachtet bleibt die Morphologie in der Phylogenetik ein unverzichtbarer Prüfstein für die molekularen Analysen (SUDHAUS 2007; WANNINGER 2015). Wo Konflikte bestehen, muss sowohl molekular als auch morphologisch weitergeforscht werden!

Danksagung

Wir danken Ulrike Aspöck für die Einladung zu diesem Vortrag. Besten Dank auch an die übrigen Mitglieder des Wiener Teams, die bei diesen Forschungen mitgewirkt haben

(Daniela Bartel, Branka Bruvo, Emiliano Dell’Ampio, Barbara-Amina Gereben-Krenn, Max Hable, Markus Pennerstorfer, Carol Resch, Arno Steinacher und Manfred Walzl), sowie dem gesamten IKITE Team. Die Forschungsarbeiten wurden dankenswerterweise durch die Projekte P17038, P20497 und P23251 des Wissenschaftsfonds FWF finanziell unterstützt.

Literatur

- BARNES R. D. 1968: *Invertebrate Zoology*. 2nd ed. Saunders: Philadelphia
- BEUTEL R. G. & GORB S. N. 2006: A revised interpretation of attachment structures in Hexapoda with special emphasis on Mantophasmatodea. *Arthropod Systematics & Phylogeny* 64(1): 3–25.
- BITSCH J. & BITSCH C. 2004: The phylogenetic position of early hexapod lineages: morphological data contradict molecular data. *Systematic Entomology* 29(4): 433–440.
- BLANKE A. & MACHIDA R. 2016: The homology of cephalic muscles and endoskeletal elements between Diplura and Ectognatha (Insecta). *Organisms Diversity & Evolution* 16(1): 241–257.
- BÖHM A., BARTEL D., SZUCSICH N. U. & PASS G. 2011: Confocal imaging of the exo- and endoskeleton of Protura after nondestructive DNA extraction. *Soil Organisms* 83(3): 335–345.
- BÖHM A., SZUCSICH N. U. & PASS G. 2012: Brain anatomy in Diplura (Hexapoda). *Frontiers in Zoology* 9(1): 26.
- BÖRNER C. 1910: Die phylogenetische Bedeutung der Protura. *Biologisches Zentralblatt* 30: 633–641.
- BRAUER F. M. 1885: Systematisch-zoologische Studien. Sitzungberichte der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien. Mathematisch – naturwissenschaftliche Klasse 91(1): 237–413.
- 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(6): 534–557.
- CHRISTIAN E. 2003: Schaller in der Unterwelt – Sechs Jahrzehnte Bodenzologie. *Schriften Verein zur Verbreitung naturwissenschaftlicher Kenntnisse* 141: 17–27.
- CHRISTIAN E. & SZEPTYCKI A. 2004: Distribution of Protura along an urban gradient in Vienna. *Pedobiologia* 48: 445–452.
- COTTEBRUNE A. 2008: *Der planbare Mensch: die Deutsche Forschungsgemeinschaft und die menschliche Vererbungswissenschaft, 1920 – 1970*. Steiner: Stuttgart
- 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 Structure & Development* 40(1): 77–92.

- DELL'AMPIO E., SZUCSICH N. U. & PASS G. 2011: Protura and molecular phylogenetics: status quo of a young love. *Soil Organisms* 83(3): 347–358.
- DELL'AMPIO E., MEUSEMANN K., SZUCSICH N. U., PETERS R. S., MEYER B., BORNER J., PETERSEN M., ABERER A. J., STAMATAKIS A., WALZL M. G., MINH B. Q., VON HAESELER A., EBERSBERGER I., PASS G. & MISOF B. 2014: Decisive data sets in phylogenomics: lessons from studies on the phylogenetic relationships of primarily wingless insects. *Molecular Biology and Evolution* 31(1): 239–249.
- DELSUC F., PHILLIPS M. J. & PENNY D. 2003: Comment on „Hexapod origins: monophyletic or paraphyletic?“. *Science* 301: 1482d.
- FANENBRUCK M., HARZSCH S. & WÄGELE J. W. 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(11): 3868–3873.
- FANENBRUCK M. & HARZSCH S. 2005: A brain atlas of *Godzilliognomus frondosus* Yager, 1989 (Remipedia, Godzilliidae) and comparison with the brain of *Speleonectes tulumensis* Yager, 1987 (Remipedia, Speleonectidae): implications for arthropod relationships. *Arthropod Structure & Development* 34(3): 343–378.
- FUCHS B. 2003: „Rasse“, „Volk“, Geschlecht. Anthropologische Diskurse in Österreich 1850–1960. Campus: Frankfurt, New York
- HARZSCH S. 2006: Neurophylogeny: architecture of the nervous system and a fresh view on arthropod phylogeny. *Integrative and Comparative Biology* 46(2): 162–194.
- GALLI L., SHRUBOVYCH J., BU Y. & ZINNI M. 2018: Genera of the Protura of the World: diagnosis, distribution, and key. *ZooKeys* 772: 1–45.
- GIRIBET G. & EDGECOMBE G. D. 2013: The Arthropoda: a phylogenetic framework. In: MINELLI A., BOXSHALL G. & FUSCO G. (eds.), *Arthropod Biology and Evolution*. Springer Berlin Heidelberg: 17–40.
- GIRIBET G. & EDGECOMBE G. D. 2019: The phylogeny and evolutionary history of arthropods. *Current Biology* 29(12): R592–R602.
- HENNIG W. 1969: Die Stammesgeschichte der Insekten. Frankfurt am Main, Kramer. pp. 436.
- KAESTNER A. 1964 -1972: Lehrbuch der Speziellen Zoologie, 5 Bde. Fischer: Stuttgart
- KOCH M. 1997: Monophyly and phylogenetic position of the Diplura (Hexapoda). *Pedobiologia* 41: 9–12.
- KOLLMANN M., HUETTEROTH W. & SCHACHTNER J. 2011: Brain organization in Collembola (springtails). *Arthropod Structure & Development* 40(4): 304–316.
- KRISTENSEN N. P. 1998: The groundplan and basal diversification of the hexapods. In: FORTEY R. A. & THOMAS R. H. (eds.), *Arthropod relationships*. London, Chapman & Hall. 55: 281–293.

- KÜHN A 1967: Grundriß der Allgemeinen Zoologie. 16. Auflage. Thieme: Stuttgart
- LANG A. 1888: Lehrbuch der vergleichenden Anatomie. Jena, Gustav Fischer. 1197 pp.
- LOESEL R. & RICHTER S. 2014: Neurophylogeny—from description to character analysis. In: WÄGELE J. W. & BARTHOLOMÄUS T. (eds) Deep metazoan phylogeny: the backbone of the tree of life. De Gruyter, Berlin, 505–514
- LOESEL R., WOLF H., KENNING M., HARZSCH S. & SOMBKE A. 2013: Architectural principles and evolution of the arthropod central nervous system. In: MINELLI A., BOXSHALL G. & FUSCO G. (eds.) Arthropod Biology and Evolution. Springer Berlin Heidelberg: 299–342.
- LUAN Y.-X., MALLATT J. M., XIE R.-D., YANG Y.-M. & YIN W.-Y. 2005: The phylogenetic positions of three basal-hexapod groups (Protura, Diplura, and Collembola) based on ribosomal RNA gene sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22(7): 1579–1592.
- MANNI M., SIMAO F. A., ROBERTSON H. M., GABAGLIO M. A., WATERHOUSE R. M., MISOF B., NIEHUIS O., SZUCSICH N. U. & ZDOBNOV E. M. 2020: The genome of the blind soil-dwelling and ancestrally wingless dipluran *Campodea augens*: a key reference hexapod for studying the emergence of insect innovations. *Genome Biology and Evolution* 12(1): 3534–3549.
- 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 HAESLER A., BURMESTER T., HADRY S. H., WÄGELE J. W., & MISOF B. 2010: A phylogenomic approach to resolve the arthropod tree of life. *Molecular Biology and Evolution* 27(11): 2451–2464.
- MISOF B., LIU S., MEUSEMANN K., PETERS R. S., DONATH A., MAYER C., FRANSEN P. B., WARE J., FLOURI T., BEUTEL R. G., NIEHUIS O., PETERSEN M., IZQUIERDO-CARRASCO F., WAPPLER T., RUST J., ABERER A. J., ASPÖCK U., ASPÖCK H., BARTEL D., BLANKE A., BERGER S., BÖHM A., BUCKLEY T. R., CALCOTT B., CHEN J., FRIEDRICH F., FUKUI M., FUJITA M., GREVE C., GROBE P., GU S., HUANG Y., JERMIIN L. S., KAWAHARA A. Y., KROGMANN L., KUBIAK M., LANFEAR R., LETSCH H., LI Y., LI Z., LI J., LU H., MACHIDA R., MASHIMO Y., KAPLI P., MCKENNA D. D., MENG G., NAKAGAKI Y., NAVARRETE-HEREDIA J. L., OTT M., OU Y., PASS G., PODSIADLOWSKI L., POHL H., VON REUMONT B. M., SCHUTTE K., SEKIYA K., SHIMIZU S., SLIPINSKI A., STAMATAKIS A., SONG W., SU X., SZUCSICH N. U., TAN M., TAN X., TANG M., TANG J., TIMELTHALER G., TOMIZUKA S., TRAUTWEIN M., TONG X., UCHIFUNE T., WALZL M. G., WIEGMANN B. M., WILBRANDT J., WIPFLER B., WONG T. K., WU Q., WU G., XIE Y., YANG S., YANG Q., YEATES D. K., YOSHIKAWA K., ZHANG Q., ZHANG R., ZHANG W., ZHANG Y., ZHAO J., ZHOU C., ZHOU L., ZIESMANN T., ZOU S., LI Y., XU X., ZHANG Y., YANG H., WANG J., WANG J., KJER K. M. & ZHOU X. 2014: Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* 346(6210): 763–767.
- NARDI F., SPINSANTI G. & BOORE J. L. 2003: Hexapod origins: monophyletic or paraphyletic? *Science* 299: 1887–1889.

- OAKLEY T. H., WOLFE J. M., LINDGREN A. R. & ZAHAROFF A. K. 2012: Phylotranscriptomics to bring the understudied into the fold: monophyletic Ostracoda, fossil placement and pancrustacean phylogeny. *Molecular Biology and Evolution* 30: 215–233.
- PASS G. 2000: Accessory pulsatile organs: evolutionary innovations in insects. *Annual Review of Entomology* 45: 495–518.
- PASS G., GEREKEN-KRENN B. A., MERL M., PLANT J., SZUCSICH N. U. & TÖGEL M. 2006: Phylogenetic relationships of the orders of Hexapoda: Contributions from the circulatory organs for a morphological data matrix. *Arthropod Systematics & Phylogeny* 64(2): 165–203.
- PASS G. & SZUCSICH N. U. 2011: 100 years of research on the Protura: many secrets still retained. *Soil Organisms* 83(3): 309–334.
- PASS G., TÖGEL M., KRENN H. W. & PAULULAT A. 2015: The circulatory organs of insect wings: Prime examples for the origin of evolutionary novelties. *Zoologischer Anzeiger – A Journal of Comparative Zoology* 256: 82–95.
- PFEIFFER K. & HOMBERG U. 2015: Organization and functional roles of the central complex in the insect brain. *Annual Review of Entomology* 59: 165–184.
- RESCH C., SHRUBOVYCH J., BARTEL D., SZUCSICH N. U., TIMELTHALER G., BU Y. & PASS G. 2014: DNA barcoding in Protura: Where subtle morphological differences are perfectly mirrored by huge genetic distances. *PLOS ONE* 9(3): e90653
- SCHALLER F. 2003: Geschichte der Bodenarthropoden-Kunde in Österreich. *Denisia* 8: 63–73.
- SCHWENTNER M., RICHTER S., ROGERS D. C. & GIRIBET G. 2018: Tetraconatan phylogeny with special focus on Malacostraca and Branchiopoda: highlighting the strength of taxon-specific matrices in phylogenomics. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 285(1885): e20181524.
- SEKIYA K. & MACHIDA R. 2011: Formation of the entognathy of Dicellurata, *Occasjapyx japonicus* (Enderlein, 1907) (Hexapoda: Diplura, Dicellurata). *Soil Organisms* 83(3): 399–404.
- STEGNER M. E. J., FRITSCH M. & RICHTER S. 2014: The central complex in Crustacea. In: WÄGELE J. W. & BARTOLOMAEUS T. (eds) *Deep Metazoan Phylogeny: The Backbone of the Tree of Life*. Berlin/ Boston, Walter de Gruyter: 361–384.
- STEGNER M. E. J. & RICHTER S. 2015: Development of the nervous system in Cephalocarida (Crustacea): early neuronal differentiation and successive patterning. *Zoomorphology* 134(2): 183–209.
- STEMME T., ILIFFE T., BICKER G., HARZSCH S. & KOENEMANN S. 2012: Serotonin immunoreactive interneurons in the brain of the Remipedia: new insights into the phylogenetic affinities of an enigmatic crustacean taxon. *BMC Evolutionary Biology* 12(1): 168.

- STRAUSFELD N. J. 2009: Brain organization and the origin of insects: an assessment. *Proceedings of the Royal Society B* 276, 1929–1937
- STRAUSFELD N. J. 2012: *Arthropod brains: evolution, functional elegance, and historical significance*. Cambridge, MA, Harvard University Press. 848 pp.
- STRAUSFELD N. J. 2019: The divergent evolution of arthropod brains: Ground pattern organization and stability through geological time. In: BYRNE J. H. (ed.) *The Oxford Handbook of Invertebrate Neurobiology*. Part I, 67 pp.
- STUMMER-TRAUNFELS R. R. v. 1891: Vergleichende Untersuchungen über die Mundwerkzeuge der Thysanuren und Collembolen. *Sitzungsberichte der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften, Wien, mathematisch-naturwissenschaftliche Classe* 100(1): 216–236.
- SUDHAUS W. 2007: Die Notwendigkeit morphologischer Analysen zur Rekonstruktion der Stammesgeschichte. *Species, Phylogeny and Evolution* 1: 17–32
- SZUCSICH N. U., BARTEL D., BLANKE A., BÖHM A., DONATH A., FUKUI M., LIU S., MACEK O., MACHIDA R., MISOF B., NAKAGAKI Y., PODSIADLOWSKI L., SEKIYA K., TOMIZUKA S., VON REUMONT B., WATERHOUSE R., WALZL M., MENG G., ZHOU X., PASS G. & MEUSEMANN K. (in prep.) Back to the roots: Four myriapod friends but who are the sisters. *bioRxiv*
- SZUCSICH N. U. & PASS G. 2008a: Incongruent phylogenetic hypotheses and character conflicts in morphology: The root and early branches of the hexapodan tree. *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie* 16: 415–429.
- SZUCSICH N. U. & PASS G. 2008b: Clues from claws: Inconsistency between observations and coding habits (Hexapoda). *Journal of Morphology: Proceedings of the 1st International Congress on Invertebrate Morphology (Copenhagen)* 269(12): 1496.
- TAUTZ D. 2007: Morphologie versus DNA-Sequenzen in der Phylogenie-Rekonstruktion. *Species, Phylogeny and Evolution* 1: 9–16
- THOEN H. H., MARSHALL J., WOLFF G. H. & STRAUSFELD N. S. 2017: Insect-like organization of the stomatopod central complex: functional and phylogenetic implications. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 11(12).
- THOMAS G. W. C., DOHMEN E., HUGHES D. S. T., MURALI S. C., POELCHAU M., GLASTAD K., ANSTEAD C. A., AYOUN N. A., BATTERHAM P., BELLAIR M., BINFORD G. J., CHAO H., CHEN Y. H., CHILDERS C., DINH H., DODDAPANENI H. V., DUAN J. J., DUGAN S., ESPOSITO L. A., FRIEDRICH M., GARB J., GASSER R. B., GOODISMAN M. A. D., GUNDERSEN-RINDAL D. E., HAN Y., HANDLER A. M., HATAKEYAMA M., HERING L., HUNTER W. B., IOANNIDIS P., JAYASEELAN J. C., KALRA D., KHILA A., KORHONEN P. K., LEE C. E., LEE S. L., LI Y., LINDSEY A. R. I., MAYER G., MCGREGOR A. P., MCKENNA D. D., MISOF B., MUNIDASA M., MUNOZ-TORRES M., MUZNY D. M., NIEHUIS O., OSUJI-LACY N., PALLI S. R., PANFILIO K. A., PECHMANN M., PERRY T., PETERS R. S., POYNTON H. C., PRPIC N.-M., QU J., ROTENBERG D., SCHAL C.,

- SCHOVILLE S. D., SCULLY E. D., SKINNER E., SLOAN D. B., STOUTHAMER R., STRAND M. R., SZUCSICH N. U., WIJERATNE A., YOUNG N. D., ZATTARA E. E., BENOIT J. B., ZDOBNOV E. M., PFRENDER M. E., HACKETT K. J., WERREN J. H., WORLEY K. C., GIBBS R. A., CHIPMAN A. D., WATERHOUSE R. M., BORNBERG-BAUER E., HAHN M. W. & RICHARDS S. 2019: Gene content evolution in the arthropods. bioRxiv 382945; doi: <https://doi.org/10.1101/382945>.
- TURNER-EVANS D. B. & JAYARAMAN V. 2016: The insect central complex. *Current Biology* 26: R455–R460
- VON REUMONT B. M., JENNER R. A., WILLS M. A., DELL'AMPIO E., PASS G., EBERSBERGER I., MEYER B., KOENEMANN S., ILIFFE T. M., STAMATAKIS A., NIEHUIS O., MEUSEMANN K. & MISOF B. 2012: Pancrustacean phylogeny in the light of new phylogenomic data: support for Remipedia as the possible sister group of Hexapoda. *Molecular Biology and Evolution* 29(3): 1031–1045.
- WANNINGER A. 2015: Morphology is dead – long live morphology! Integrating MorphoEvoDevo into molecular EvoDevo and phylogenomics. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3, 54. doi:10.3389/fevo.2015.00054.
- WEINGART P., KROLL J. & BAYERTZ K. 2001: Blut und Gene. Geschichte der Eugenik und Rassenhygiene in Deutschland. 3. Aufl. Suhrkamp: Frankfurt am Main
- WILLMANN R. 2003: Die phylogenetischen Beziehungen der Insecta: Offene Fragen und Probleme. *Verhandlungen Westdeutscher Entomologentag 2001*: 1–64.
- WITTGENSTEIN L. 1922: *Tractatus logico-philosophicus*. Kegan Paul, Trench, Trubner & Co.: London
- WOLFF G. H., THOEN H. H., MARSHALL J., SAYRE M. E. & STRAUSFELD N. S. 2017: An insect-like mushroom body in a crustacean brain. *eLife* 6: e29889.

Anschrift der Verfasser

Günther Pass, Alexander Böhm, Department für Integrative Zoologie der Universität Wien, UZAI, Althanstraße 14, 1090 Wien. E-Mail: guenther.pass@univie.ac.at

Nikola Szucsich, 3. Zoologische Abteilung, Naturhistorisches Museum Wien, Burgring 7, 1010 Wien.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Entomologica Austriaca](#)

Jahr/Year: 2020

Band/Volume: [0027](#)

Autor(en)/Author(s): Pass Günther, Szucsich Nikolaus U., Böhm Alexander

Artikel/Article: [Konflikte in phylogenetischen Analysen: die verflochtenen „deep nodes“ im Stammbaum der Insekten. Conflicts in phylogenetic analyses: the challenging deep nodes of the insect tree 233-254](#)