

Filogenija koljena Porifera

Gabud, Tea

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:612485>

Rights / Prava: [In copyright/Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

SEMINARSKI RAD

FILOGENIJA KOLJENA PORIFERA *PHYLOGENY OF PHYLUM PORIFERA

Studentica: Tea Gabud

Studij: Preddiplomski studij molekularne biologije

*Undergraduate Study of Molecular Biology

Mentorica: doc. dr. sc. Tatjana Bakran-Petricioli

Zagreb, 2012.

Sadržaj

1. Uvod	<u>2</u>
2. Spužve op enito	<u>4</u>
2.1. Morfološke karakteristike kao temelj za sistematiku	<u>4</u>
2.2. Citologija otvara nove mogu nosti.....	<u>6</u>
2.3. Okretanje molekularnoj filogeniji i neriješena pitanja	<u>9</u>
2.4. Položaj koljena Porifera u odnosu na ostale Metazoa	<u>12</u>
3. Zaklju ak	<u>14</u>
4. Literatura	<u>15</u>
5. Sažetak	<u>16</u>
6. Summary	<u>17</u>

1. Uvod

Istaknuti genetičar i evolucijski biolog Theodosius Grigorjevič Dobzhansky, poznat po svom doprinosu u formiranju moderne sinteze evolucije, napisao je između ostalog esej pod naslovom "Nothing in Biology Makes Sense Except in the Light of Evolution" („Ništa u biologiji nema smisla osim u svjetlu evolucije“; www.evolution.berkeley.edu/evolibrary/article/_0/history_20). U tom kontekstu razumljiva je težnja biologa da riješi filogeniju živog svijeta kojeg poznajemo. Cilj ovog seminara je prikazati recentnu razinu spoznaje jednog malog segmenta filogenetskog stabla (koljeno Porifera - spužve), dinamiku kojom se ovo područje istražuje, ključne probleme s kojima se znanstvenici susreću u unatoč pojavi novih metoda istraživanja i potencijalna rješenja.

Prema definiciji, filogenetika je znanstveno proučavanje odnosa među skupinama organizama temeljeno na matricama molekularnog sekvencioniranja i morfoloških parametara. Filogenomika je grana filogenetike koja se koristi genomskim podacima (sekvencama tj. setovima gena - eng. gene datasets). Kao informacijski set, ovi se koriste 18S rDNA i 28S rDNA kao djelomične ili cijelovite sekvence, te CO1 (citokrom oksidaza – 1) mitohondrijskog genoma (mtDNA). Uz kontrolu određenih parametara, konačni rezultat obrade podataka je filogenetsko stablo. Filogenetsko stablo tip je kladograma koji prikazuje evolucijske odnose između različitih vrsta ili viših kategorija uz predočenje grananja (zajedničkog pretka). Prema tipu, ono može biti aktivno stablo (kada duljina grana odgovara evolucijskoj udaljenosti - obično u milijunima godina) ili ultrametrijsko stablo (kod kojeg su svi terminalni vrhovi jednakim udaljenim od baze i ne odgovaraju vremenskoj skali) (Philippe i sur., 2011). Filogenija je, u užem smislu, evolucijska povijest taksonomske skupine: razreda, porodica, rođe... (www.bioinformatika.hr). U ovom seminaru obraćena je samo sistematika i filogenija recentnih vrsta spužvi (opisano je oko 7000 vrsta, a najmanje dvostruko toliko ih je izumrlo; Hooper i van Soest, 2002). Doprinos paleontologije bitan je, osim kod skupine Porifera, i kod ostalih fosiliziranih organizama i to na svim razinama klasifikacije živog svijeta, međutim ovo područje svojom kompleksnošću nadilazi opseg seminara.

Povijesno gledaju i, intenzivan rad na sistematici spužvi zapo eo je 80-ih godina 19. stolje a. Mnogi su znanstvenici od po etaka do današnjeg dana izdvajali spužve kao osobito problemati no podru je istraživanja. Isprva je to bilo zbog op enitih poteško a u radu s podmorskim organizmima (otežan pristup uzorcima) i jednostavne morfologije organizama kroz koju je teško razlu iti ancestralne od odvedenih karakteristika. Današnji problemi vezani su za nove metode koje još uvijek nisu dale jedinstveno rješenje. Koljeno Porifera veliki je znanstveni izazov unato injenici da su ovi organizmi slijepa grana relativno ranog odvajanja na evolucijskom stablu. Za spužve možemo re i da su grani ni slu aj višestani nosti. Ona je nedvojbena, ali organizacija i koordinacija ovog sustava je unato tome zadržana na razini stanice (složenije razine organizacije i koordinacije podrazumijevaju tkiva i organe). Izgleda da upravo u jednostavnosti leži korijen problema. Slikovito re eno, znamo rasporediti vrste u „ladice“ (klade) pomo u etikete „boje“, ali spužve su u tom slu aju „šarene“. Još je ve i izazov iscertati njihovu filogenijsku poveznicu. U modernoj filogeniji najviše problema predstavljaju odnosi Porifera i Metazoa, te unutar Porifera razred Demospongia (kremenorožnja e), stoga je na ova podru ja istraživanja u seminaru stavljen naglasak. Iako su Porifera samo segment živog svijeta, izazovi na koje se nailazi u tom podru ju istraživanja primjenjivi su na druga podru ja bioloških istraživanja. Isto vrijedi i za metode koje e biti razra ene kroz seminar. Kroz seminar u pokušati odgovoriti na pitanje da li su spužve zaista organizmi toliko zahtjevni za istraživanje? Da li su metode i pristupi koji se danas koriste na spužvama jednostavno neprimjereni? Koja potencijalna rješenja nude suvremena znanstvena istraživanja?

2. Spužve op enito

Spužve su (uz Placozoa) prema organizaciji tijela najjednostavnije višestani ne životinje. Stanice su kod njih zadržale visok stupanj nezavisnosti. Skupina je dobila ime zbog prisutnosti mnoštva otvora (pora) na tijelu koje prema veličini možemo podijeliti na manje i brojnije - pore, ostije; i velike, manje zastupljene - oskula. Spužve se hrane filtracijom. Voda s esticama ulazi kroz pore, prolazi kroz niz cjevica, komora i proširenja, te izlazi kroz oskula. Protok vode koristi se i za disanje i razmnožavanje, a omogućju ga hoanocite (u većih spužvi protok doseže 100 L morske vode dnevno; Matonić i sur., 1988). Hoanocite su specijalizirane bivaliste stanice koje oblažu unutrašnje prostore spužve. Njihov rad nije sinkroniziran stoga ih se ne može uspoređivati s optjecajnim sustavom ostalih životinja. Spužve su kao odrasle sjedilački organizmi, a ljudi inke su im pokretne. Žive u moru uz iznimku porodice *Spongiliidae* koja je slatkovodna. Varijabilnih su veličina, boja i simetrije (najčešće su asimetrične), a morfološke karakteristike su nerijetko ovisne o samom supstratu na kojem rastu. Spužve imaju tri osnovna tipa građe: askon, sikon i leukon koji odražavaju stupanj nabiranja stjenke tijela (za detaljniji morfološki opis - tipovi stanica i složenije strukture, konzultirati Matonić i sur., 1988).

2.1. Morfološke karakteristike kao temelj za sistematiku

Elementi skeleta spužvi (spikule i cjelokupna morfologija skeleta) odigrali su najvažniju ulogu u prvim klasifikacijama ovih organizama, a njihov se značaj nipošto ne smije zanemariti danas. Osnovna funkcija skeleta u spužvi je zadržavanje oblika tijela uslijed hidrostatskog tlaka i strujanja vode. Funkcija skeleta izraženija je kod spužvi većih dimenzija i u takvih primjeraka je skelet obično složenije strukture. Prema sastavu, skelet može biti građen od silikatnih ili karbonatnih spikula ili proteina spongina. U jednoj spužvi mogu se naći ili silicijske ili karbonatne spikule, (gotovo) nikad zajedno, jer proces dobivanja pojedinog tipa spikule zahtjeva drastične razlike u metabolizmu (iznimke su pronađene kod pojedinih vrste razreda Demospongiae). Na karakteristikama spikula temelji se i determinacija vrste. Proučavajući karakteristike spikula, može se reći da pokazuju vrlo veliku

varijabilnost. Autori s kraja 19. st. pažljivo bi izdvajali spikule, razvrstavali ih, opsežno opisivali, te prilagali skice i crteže u svrhu opisa ili determinacije. Još vrlo rano u povijesti istraživanja spužvi primije ene su dvije velike skupine odijeljene prema sastavu spikula: *Calcispongia* (Johnston, 1842) i *Silicea* (Gray, 1867), a unutar *Silicea* tako er i skupina s triaksonim spikulama *Hexactinellida* (Laurent, 1844). Godine 1885. Sollas uvodi novu skupinu *Demospongiae* kao zajedni ki naziv za spužve koje ne pripadaju ni *Calcispongia* ni *Hexactinellida*. *Demospongiae* etimološki zna i „obi ne spužve“, a kasnije se u hrvatskom jeziku ova skupina naziva kremenorožnja e. Za ilustraciju opisa ovog razreda, Sollas navodi male hoanocitne stanice, spikule od spongina ili silicija ili prisutnost oba elementa, te megasklere koje nikad nisu triaksone. Spužve bez skeleta bile su izdvojene iz skupine *Demospongiae* pod nazivom *Myxospongiae* (Zittel, 1978), me utim i tada je bilo autora koji nisu prihvatili podjelu na ovoj razini (npr. poznati francuski spongiolog Emile Topsent, 1928.). Ovo razilaženje u mišljenju kasnije poprima dalekosežne razmjere. Sedamdesetih godina 20. stolje a prona ene su spužve s hiperkalcificiranim skeletom u spiljama Mediterana, u Indijskom oceanu i na Karibima (Vacelet, Goreau, Hartman; autori su do pronalaska novog tipa spužve zapravo došli simultano istražuju i na razli itim podru jima). Thomas Goreau i Willard Hartman, novootkrivene spužve uvrstili su novi razred *Sclerospongiae* u svom radu iz 1970. godine, smatraju i je monofiletskom skupinom, ali uz napomenu da imaju razloga za sumnju u ovo taksonomsко izdvajanje. Jean Vacelet ubrzo morfološkim i citološkim dokazima odbacuje ovu skupinu uz tvrdnju da je hiperkalcifikacija homoplasti na karakteristika koja se javila u više porodica *Demospongiae* i nekoliko porodica *Calcispongiae*. Homoplazija je sli nost odre ene karakteristike dvaju ili više organizama koja je posljedica konvergencije (naj eš e zbog prilago avanja sli nim okolišnim uvjetima), a ne stvarne evolucijske srodnosti. Vaceletova je klasifikacija kasnije potvr ena molekularnim analizama (Engeser i sur., 1986; Wood, 1989, 1990; Chombard i sur., 1997).

Unutarnja klasifikacija razreda *Demospongiae* formirana je kroz dva pristupa. Situacija do koje je došlo uslijed nedostizanja konsenzusa u znanstvenoj literaturi na razini reda ima utjecaj i danas. Tako:

1. po Sollasu, Lendenfeldu, Vosmaeru i Topsentu pri klasifikaciji porodica i redova daje se prioritet megasklerama. *Demospongiae* se dijele na *Tetraxonida* i *Monaxonida*;
2. po Dendyu koji prioritet daje mikrosklerama, *Demospongiae* se dijele na *Astrotraxonida* i *Sigmatotetraplexida*.

Dendyev pristup ima kao vrlo očit nedostatak smještanje vrsta s tetraksonim megasklerama u dvije različite linije. Naknadno je ustanovljeno da je zvjezdoliki oblik mikrosklera - aster - tako da je homoplasti na karakteristika što je dodatni nedostatak Dendyevog pristupa.

Skupine Hexactinellida i Calcispongia pojavljuju se na vrstima temeljima. Definirane krajem 19. stoljeća su i danas, te je njihova konzistentnost potvrđena novijim filogenetskim metodama. Ovo je ujedno i dokaz kako se klasifikaciju na temelju morfologije ne smije smatrati zastarjelim, već značajnom za određene skupine kao i za multidisciplinarni pristup. Mnogi recentni autori u potpunosti napuštaju morfološke karakteristike kao kriterij, što bi mogla biti jedna od potencijalnih pogrešaka u suvremenim istraživanjima spužvi (Boury-Esnault, 2006). Razdoblje u kojem je morfologija imala centralnu ulogu zaključeno je de Laubenfelsom revizijom iz 1936. godine. Sistematika u tom radu teži pojednostavljenju i donekle je ciljano odmaknuta od stvarnih filogenetskih odnosa među tada poznatim spužvama, stoga djelo nije imalo dalekosežnu uporabnu vrijednost. Glavna prepreka u razdoblju klasične filogenije spužvi zapravo je bila nemogućnost uspostavljanja jasnih odnosa elemenata skeleta i njihove organizacije sa stvarnom filogenijom organizma, te pouzdano razlikovanje ancestralnih od odvedenih morfoloških karakteristika.

2.2. Citologija otvara nove mogućnosti

Francuski spongiolog Claude Levi prvi je 1956. godine odlučio primijeniti embriološke karakteristike za rješavanje pitanja sistematike spužvi (prema Boury-Esnault, 2006). Naglašavajući kako su embriologija i citologija zanemarivane u istraživanju spužvi, ističe neophodnost multidisciplinarnog pristupa, te važnost raspolažanja svježim uzorcima i opisivanja staništa u kojem su životinje nađene (Boury-Esnault, 2006). Do ovog perioda znanstvenicima su bili dostupni isključivo uzorci u sušenom obliku ili konzervirani na neki od uobičajenih načina. Levi ujedno prvi u službi spužvi pridaje pažnju na inu razmnožavanja (viviparnost ili oviparnost). Na temelju toga vrši podjelu razreda Demospongiae na oviparne Tetractinomorpha i viviparne Ceractinomorpha što se u određenoj mjeri poklapa s prethodno spomenutom Sollasovom podjelom (na Tetraxonida i Monaxonida).

Period druge polovice 20. stoljeća donio je nekoliko tehničkih otkrića koja su znatno utjecala na mogućnosti istraživanja spužvi. Pojava SCUBA (eng. self-contained underwater breathing apparatus) ronjenja 70-ih godina, osim što je opnenito povećala interes za podmorje,

omoguila je proučavanje spužvi *in situ* i istraživanje do tada teže dostupnih staništa (kao što su podvodne spilje). Iznimno, zanimanje za spužve u tom periodu je zapravo manje u odnosu na prethodno stoljeće. Tada se smatra da su spužve jednostavne i u velikom opsegu istražene. Sredinom 20. st. TEM (eng. transmission electron microscope), a malo kasnije i SEM (eng. scanning electron microscope) ulaze u komercijalnu upotrebu. TEM i SEM tipovi su elektronskog mikroskopa koji se razlikuju u načinu korištenja i bilježenja snopa elektrona u svrhu vizualizacije uzorka. Ova znanstvena otkrića usmjerila su znanstveni svijet prema nanometarskom redu veličine. Logično, zbog toga se povećava broj citoloških istraživanja na spužvama (Boury-Esnault, 2006).

Citološka istraživanja od najvećeg su znajući kod vrsta spužvi koje ne posjeduju skelet, ali svakako ih se može primijeniti i na ostale vrste s obzirom na mnogobrojne razlikovne mogućnosti. Bez obzira na nedostatak tkiva, u spužvama su zastupljene specijalizirane stanice (hoanocite, apopilarne st., arheocite, amebocite, kontraktilne st., kolenocite, lofocite, sklerocite, spongocite...). Opisano je najmanje 8 tipova specijaliziranih stanica spužvi (Boury-Esnault, 2006), a kod Demospongiae taj broj raste na 12 (Simpson, 1984). Nažalost, mnogi tipovi stanica nemaju velik potencijal za otkrivanje filogenetskih podataka, jer su prisutni u svim spužvama u sljedećoj morfološkoj i citološkoj formi. Najviše filogenetski korisnih informacija crpilo se iz analize hoanocita (tip stanice, tip komore, brojnost, volumen, prisutnost bivali i periflagelarnog rukavca, broj mikrovila na ovratniku...), egzopinakocita, apopilarnih stanica, ekstenzija u hoanocitne komore, staničnih inkluzija i gustoća mezohila. Na primjer, analiza hoanocita ukazala je da vrste smještene u red Keratosa nemaju jedinstveno zajedničko porijeklo (Vacelet i sur., 1989).

Sekundarni metaboliti kod spužvi također su bili istraživani, te se pomoću njih pokušavalo odgovoriti na neka filogenetska pitanja. Uz izolirane uspješne slučajeve, veliki je problem ovog pristupa mnogobrojnost i raznolikost endosimbionata spužvi (prvenstveno jednostanični algi - poput Zoocyanellae, Zooxantellae, Zoothiorellae, te bakterija). Endosimbionti su najčešći smješteni u mezenhimu u amebocitnim stanicama. Naime, obično je teško ili nemoguće sa sigurnošću razliti koji metaboliti potječu iz stanic spužve.

Postoje i primjeri komparativnih citoloških istraživanja koja su dala informacije do kojih se s takvom pouzdanošću u molekularnom filogenijom nije moglo doći. Osim toga, ponekad je skelet dviju porodica toliko sličan da ga se ne može koristiti kao diferencijalnu

karakteristiku. Jedan takav primjer je ujedno prvo službeno citološko uspore ivanje 6 vrsta porodica Chalinidae i Callyspongiidae (Haplosclerida) S. Pomponi iz 1976. godine (prema Boury-Esnault, 2006). Ona je predložila stani ne inkruzije sferulocita kao mogu nastati razlikovanja ove dvije porodice. Sferulocite su stanice koje sudjeluju u eliminaciji metaboli kog otpada (Vacelet, 1967) i pohrani bioaktivnih tvari (Thompson i sur., 1983). Veći dio citoplazme kod njih zauzima sferi na ili jajolika inkruzija sa spomenutim sadržajem. Ovakvih je primjera razlikovanja na razini porodice mnogo. Nicole Boury-Esnault kroz svoje radove naglašava i mogu u primjeni histoloških analiza mezohila uz dodatak opisa sustava kanali a. Ovakav pristup još uvek nije uključen u praksi, a kao glavni problem se navode poteškoće sa standardizacijom ovog postupka i otežana interpretacija elektronsko-mikroskopskih snimaka i histoloških prereza. Svaki pristup sa sobom nosi određene prednosti i nedostatke, a odabir optimalne kombinacije pristupa treba prilagoditi specifičnom problemu (tablica 1.)

Tablica 1. Pregledni prikaz poteškoća vezanih za pojedine tehnike prikupljanja podataka o spužvama (Boury-Esnault, 2006)

	kontaminacija uzorka	artefakti	utrošak vremena	finansijski trošak	potrebitno iskustvo
SPIKULE	+	-	-	-	+
SKELET	-	-	+	-	+
CITOLOGIJA	-	+	+	-	+
MOLEKULARNA BIOLOGIJA	+	+	+	+	+
KEMIJA	+	+	+	+	+

Problemi s kojima se znanstvenici susreću kad je potrebno razlikovanje ancestralne od odvedene karakteristike, srodni su nepoznavanju homolognih karakteristika. U pokušajima korištenja kladistike u filogeniji spužvi, ovi nedostaci u znanju dolaze do izražaja. Nomenklatura spikula, koja je uspostavljena vrlo rano u istraživanju spužvi nije povezana i ne ukazuje na homologiju. Uz brojne slučajeve homoplazije, praktički je nemoguće ustvrditi primarnu homologiju kroz promatranje. U ovoj situaciji ne pomaže ni paleontologija, jer je vrlo siromašna informacijama ovog tipa. Dodatne probleme stvara sekundarni gubitak karakteristika. Kao primjer može poslužiti rod *Penares* kod kojeg nedostatak sterastera nije primarno stanje, već evolucijski izgubljena karakteristika (Chombard i sur., 1989). Mnogi

autori pokušali su pristupiti ovoj problematici, među kojima je prvi i vjerojatno najistaknutiji van Soest s nizom radova nastalih između 1984. i 1990. godine.

2.3. Okretanje molekularnoj filogenije i neriješena pitanja

Molekularna filogenija se u istraživanju spužvi počela koristiti 1990-ih godina. Senzacija primjene novih metoda ponukala je spogoljoge da pomisle kako je njihovim dugogodišnjim nedoumicama napokon došao kraj. S tim ciljem, molekularna filogenija se opsežno koristila od početka 1990-ih pri rješavanju pitanja vanjskih vorišta filogenetskog stabla gotovo jednako kao i dubljih vorišta (rana evolucijska grananja na razini redova, kao i samog koljena Porifera).

Najčešće korištene metode proučavale su i usporedivale 18S i 28S rDNA u svojoj cjelokupnoj ili parcijalnoj sekvenci. Prva istraživanja ovog tipa unijela su mnogo pomutnje u sistematiku Porifera. Prema Lafay i sur. (1992) Porifera uopće nisu monofiletska skupina, te su Calcispongia srodnije Eumetazoa nego Demospongiae. Tako je, klasi ne definirane Demospongiae nisu monofiletska skupina (Borchiellini i sur., 2004).

Parcijalno sekvinciranje rDNA, te odabiranje pojedinih domena kao relevantnih za istraživanje (C1, C2, D1-D7), ovisilo je o autorima i varira kroz niz istraživanja. Posljedica je ovog neuniformiranog pristupa nemoguće nost usporedivanja podataka. Velika količina sekvenca koje su na ovaj način definirane i pohranjene u bazu podataka u većini slučajeva su nekomparabilne i stoga u ovom trenutku beskorisne (Boury-Esnault, 2006). S druge strane, parcijalne sekvence su ponekad bile dovoljne u okviru pojedinačnih istraživanja.

Borchiellini i sur. (2004) uspoređuju cjelovitu 18S rDNA vrsta koje pripadaju u 13 od 14 redova do tada svrstavačih u Demospongiae. Rezultati dokazuju polifiliju razreda Demospongiae. Kladus koji obuhvaća 24 vrste posljedno je nazvan Demospongiae *sensu stricto* kako bi se razlikovao od tradicionalno definiranih Demospongiae. Rezultati takođe jasno odbacuju klasičnu podjelu na podrazrede Tetractinomorpha i Ceractinomorpha prema Levi-ju kako je već ranije ukazivao rad van Soesta (1991). Realno uopće ne postoji potreba za taksonomskom kategorijom podrazreda u spužvi. Isti rad ukazuje na četiri jasno razdvojena klada (reda) unutar razreda Demospongiae:

1. Keratosa (obuhva a Dictyoceratida i Dendroceratida)
2. Myxospongiae (obuhva a Chondrosida, Halisarcida i Verongida)
3. morske Haplosclerida
4. ostale

Recentni rezultati koji se bave odnosom karakteristika ukazuju na ancestralnost monaksonih spikula i spongina, te viviparnosti. Oviparnost se, kao odvedena karakteristika, pojavljuje konvergentno dva puta u evoluciji sružvi s jednom reverzijom na viviparnost (Boury-Esnault, 2006). Aktualni problemi unutar skupine Demospongiae koji traže rješenje su odnosi izme u prepostavljenih redova, polifilija Halichondrida, Axinellida i vjerojatno još nekih skupina, te parafilija Haplosclerida. Tako er, Nichols (2005) koristi opsežniji set sekvenci 18S rDNA kojim ne može potvrditi monofiletsko porijeklo Demospongiae *sensu stricto*. Prema ovom istraživanju Hexactinellida su unutarnja skupina Demospongiae. Pojavile su se i nove nedoumice unutar porodice Geodiidae.

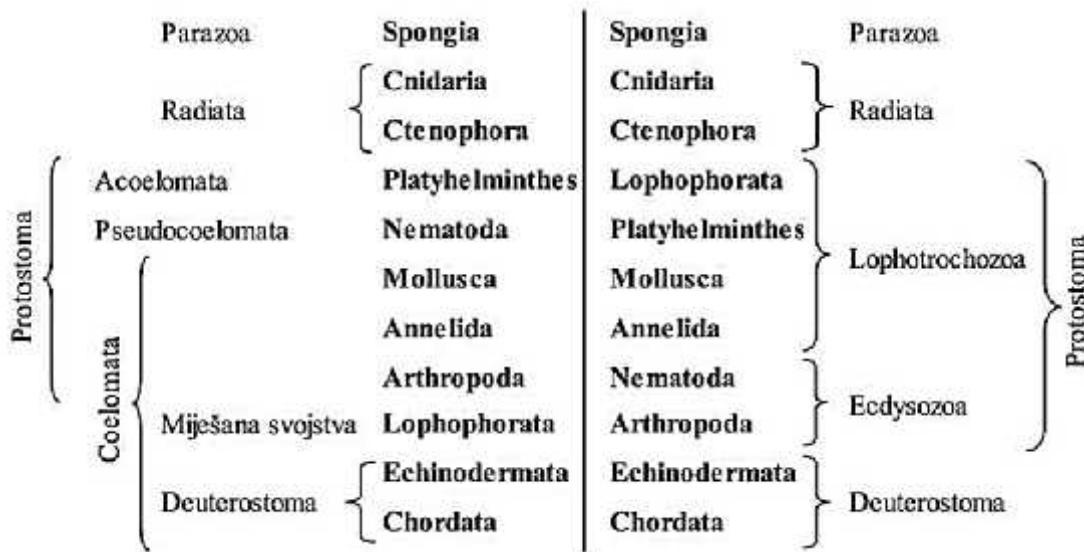
Philippe i sur. (2011) ulaze u problematiku samih metoda filogenomike. Problemi o kojima e biti rije najviše dolaze do izražaja kad se rekonstrukcija filogenije radi na vrstama ija se specijacija odvila u relativno kratkom vremenu ili kad je doga aj specijacije evolucijski jako „star“. U prvom slu aju je koli ina filogenetskog signala mala, a u sljede em su terminalne grane stabla jako duga ke (LBA eng. long branch attraction) i time je u estalost sekvenci koje se kao identi ne homoplasti ki ponavljaju drugdje velika. LBA je poteško a filogenomskog istraživanja dviju ili više linija koje imaju duge grane tj. dugu evolucijsku povijest. U tom slu aju dolazi do filogenetskog grupiranja dviju linija koje uop e nisu srodne. Philippe i sur. kao glavne probleme isti u našu nemogu nost da detektiramo nefilogenetski signal (što se prvenstveno odnosi na višestruke supstitucije) i uklju ivanje sekvenci koje odstupaju od filogenije vrste. Slu ajno uklju ivanje nefilogenetskog signala u istraživanje ima tri esta korijena: neto nu identifikaciju ortologa (jedne od dvije ili više homolognih genskih sekvenci koje je mogu e na i u razli itim vrstama), zatim neto no ili pogrešno poravnavanje sekvenci i neto no ili pogrešno rekonstruiranje višestrukih supstitucija na odre enoj poziciji u genomu. Ove pogreške kao posljedicu daju i neto ne rezultate u izra unima statisti ke relevantnosti pojedinog rezultata. U svrhu izbjegavanja ovih pogrešaka u znanstvenom istraživanju potrebno je odabrati gene koji dolaze u samo jednoj kopiji unutar genoma,

ortologa koji su najmanje podložni zasi enju. Zasi enje je u filogenomskom smislu pojam koji ozna ava poravnanje sekvenci koje su prošle višestruke supstitucije i stoga je njihova prividna filogenetska udaljenost mnogo manja od stvarne - rezultat lažne srodnosti. Bitno je u istraživanje uklju iti sporoevoluiraju e vrste i vrlo bliske vanjske skupine. Pove anje koli ine podataka koji se koriste za rekonstrukciju filogenije (u vidu uklju ivanja ve eg broja vrsta u analizu) može zasjeniti pogreške nastale uslijed prisutnosti nefilogenetskog signala (npr. olakšava se detekcija višestrukih supstitucija). Suprotno, u situaciji kad je uz malu koli inu podataka prisutan nefilogenetski signal, mogu se generirati potpuno pogrešni rezultati s visokom statisti kom potkrepljenoš u. Nažalost, rješenje problema koje bi slijedilo ovu logiku nije jednostavno uklju ivanje ve e koli ine podataka u analizu, ve je u mnoštvu informacija potrebno pažljivo izdvojiti one koje nose filogenetski korisnu.

Op enito se može ustvrditi da uz korištenje 18S rDNA i 28S rDNA obe avaju e pomake prema jasnijim rezultatima pokazuju usporedbe sekundarne strukture 28S rDNA, te uklju ivanje sekvenci CO1, Hsp 70 (eng. heat shock protein 70), EF-1 (eng. elongation factor 1 alpha) i tubulinskih introna u ulazni set podataka za konstruiranje filogenetskog stabla. Hsp 70 pokazao se korisnim u rješavanju dubokih vorišta u pojedinim slu ajevima, me utim, malo je vrsta za koje su trenutno dostupne ove sekvene. EF-1 koristi se za rješavanje filogenije Halichondrida, ali cjelovita sekvenca još nije dostupna za sve vrste. Me u spužvama bi bilo korisno odabrati modelni organizam. Levi predlaže vrstu *Ephydatia fluviatilis*, slatkvodnu spužvu koja se razmnožava isklju ivo nespolno i lako je dostupna. Naglašava i potrebu za sekvenciranjem cjelovitih genoma spužvi. Za sada je jedino poznata sekvenca genoma vrste *Amphimedon queenslandica* (ranije poznate kao *Reniera* sp.) koja živi na obalama Australije (Degnan i sur., 2005). Ova spužva nije prikladna kao modelni organizam, jer nije kozmopolitska vrsta stoga Boury-Esnault navodi kako joj je ovaj izbor za prvu sekvencu nejasan. Unato tome, prva kompletna genomska sekvenca spužve sigurno je podatak koji je vrlo koristan i na i e mnoge primjene.

2.4. Položaj koljena Porifera u odnosu na ostale Metazoa

Tijekom povijesti spužve su bile smještane u različita carstva. Postanak spužvi, kao i njihova unutarnja filogenija, još uvijek nisu potpuno jasni. Sa sigurnošću se danas može reći jedino da su se Porifera odvojile od glavne razvojne linije Metazoa, a evolucijski predstavljaju slijepu liniju. Tome u prilog ide i dalje niz injenica: postoji jedinstveni sustav kanali a koji nije homolog probavnog ni krvožilnog sustava, spužve nemaju usni otvor ni probavilo, epidermalni sloj je u odnosu na ostale Metazoa izrazito slabo razvijen, embriološke razlike, itd. Prema mnogim izvorima, kako bi se spužve na temelju tjelesne organizacije izdvojilo od ostalih mnogostanih životinja (Eumetazoa), svrstava ih se u zasebnu grupu - Parazoa. Parazoa je odjeljak u koji pored spužvi (Porifera) spada još samo vrsta *Trichoplax adhaerens*, jedina unutar koljena Placozoa. Parazoa su definirani izostankom specijaliziranih tkiva kao što su živano i miši no, te izostanak organa i simetrije tijela. Evolucijski gledano, Porifera su najstarije (recentne) životinje (Erpenbeck i Wörheide, 2007). Položaj spužvi u odnosu na ostale životinje uz usporedbu tradicionalne i molekularne taksonomske podjele vidljiv je na slici 1.

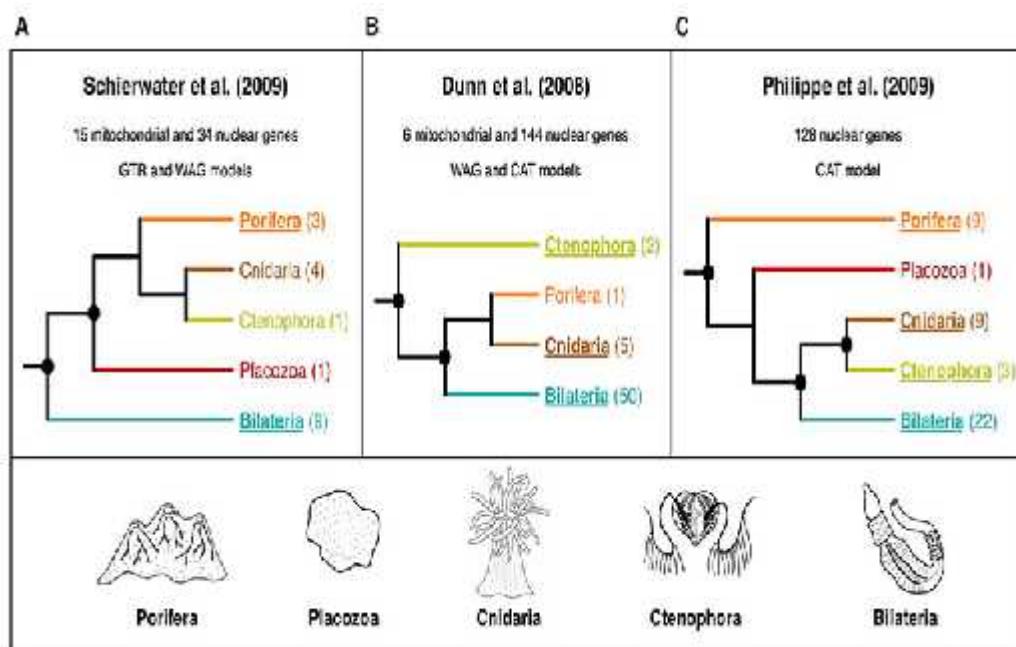


Slika 1. Usporedba podjele taksonomskih skupina životinja prema tradicionalnoj taksonomiji – lijevo i molekularnoj taksonomiji – desno (Raven i sur., 2005)

Dokazi koje o filogeniji Porifera nudi embriologija ne daju jednozna an odgovor. Tako kod ve ine Calcarea i Demospongiae gastrula nastaje na tipi an na in, invaginacijom celoblastule. Za razliku od ostalih Metazoa invaginira animalni umjesto vegetativnog pola. Kod ostalih Porifera sekundarnom delaminacijom dolazi do stereogastrule tako da se unutarnji sloj (koji kod ostalih Metazoa formira crijevo) pretvara u epiderm i mezenhim. Na površinskom sloju se formiraju bi aste stanice (Matoni kin i sur., 1988).

Najstariji fosilni nalazi Demospongiae stari su 750 milijuna godina. Tjelesnom gra om one su, od kasnog kambrija do danas, ostale prakti ki nepromijenjene (Reitner i Wörheide, 2002). Keratosa se smatraju najodvedenijom skupinom koljena.

Neka autapomorfna svojstva su zajedni ka Eumetazoa i Porifera. Kao primjeri esto se navode višestani nost u diploidnoj fazi životnog ciklusa, mejoti ka dioba spolnih stanica, oogeneza (jedna jajna stanica i tri polarna tijela iz jedne oocite), spermatogeneza (formacija etiri identi na spermija iz jedne spermatocite), te sama gra a spermija (Ax, 1995). Spomenute karakteristike ukazuju na jasnu odijeljenost Porifera i ostalih Metazoa od njima pretpostavljene najsrodnije vanjske skupine - Choanoflagellata. Ove su tvrdnje potvr ene brojnim istraživanjima koja su se bavila molekularnom filogenijom spužvi (slika 2.)



Slika 2. Pojednostavljen prikaz filogenetskih stabala dobivenih iz 3 recentne filogenomske analize. Prikazano je rano grananje carstva životinja (Philippe i sur. 2011)

3. Zaklju ak

Nicole Boury-Esnault (2006) navodi kako je nakon više od 40 godina istraživanja spužvi došla do samo jednog primjenjivog pravila: „sve je moguće kad se radi o spužvama“, isti u i pritom kao primjere karnivorne spužve, spužve bez pora i hoanocita, hiperkalcificirani skelet uz silicijske spikule kod pojedinih Demospongiae, Hexactinellida koje nastanjuju plitke mediteranske spilje, itd. Smatram da je time vrlo slikovito do arana raznolikost ovih, praktički najrasprostranjenijih i iznimno uspješnih morskih beskralješnjaka (Hooper i van Soest, 2002).

Dosadašnji rezultati istraživanja filogenije Porifera relativno esto daju prepostavke koje nije moguće jednoznačno interpretirati s potpunom sigurnošću. Među razlozima se svakako nalaze oni navedeni kao problemi metoda molekularne filogenomike. Svako nepreklapanje morfološki i molekularno generiranih filogenetskih stabala stoga bi trebalo pokušati razjasniti uključivanjem novih gena u set ulaznih podataka. Bitno je pri tom pokušati odbaciti sve prepostavljene ideje o rezultatu, te još jednom pomno razmotriti morfologiju vrste. U molekularnoj filogeniji spužvi za sada su se najkorisnijim sekvencama pokazale cijelovita 18S rDNA za rješavanje dubokih vorišta i cijelovita 28S rDNA za rješavanje vanjskih vorišta (grananja na razini porodice i roda).

Probleme moderne filogenije ne može se riješiti univerzalnom metodom niti jedinstvenim setom informacija, što je kao zaključak primjenjivo na sfere šire od koljena Porifera. Od kљuna ne je važnosti analizirati iz višestrukih pozicija i koristeći sve dostupne informacije (morfološke, citološke, embriološke i genetičke; Boury-Esnault, 2006). Od konačnog definiranja filogenetskog stabla svih živih organizama zasigurno neće dijeli „instant“ rješenje nego temeljitije prikupljanje podataka, revizija postojećih, te kombiniranje dostupnog znanja.

4. Literatura

1. Boury-Esnault N. 2006. Systematics and evolution of Demospongiae, Canadian Journal of Zoology, 84: 205-224
2. Dohrmann M., Janussen D., Reitner J., Collins A.G., Wörheide G. 2008. Phylogeny and Evolution of Glass Sponges (Porifera, Hexactinellida), Systematic Biology, 57(3): 388 - 405
3. Erpenbeck D., Wörheide G. 2007. On the molecular phylogeny of sponges (Porifera), Zootaxa, 1668: 107–126
4. Hooper J.N.A., van Soest R.W.M. 2002. Systema Porifera: A guide to the classification of sponges, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York
5. Jenner R.A 2004. When molecules and morphology clash: reconciling conflicting phylogenies of the Metazoa by considering secondary character loss, Evolution & Development 6: 372-378
6. Matonić I., Habdija I., Primc-Habdija B. 1988. Beskralješnjaci - biologija nižih avertebrata, Školska knjiga, Zagreb
7. Philippe H., Brinkmann H., Lavrov D.V., Littlewood D.T.J., Manuel M., Wörheide G., Baurain D. 2011. Resolving Difficult Phylogenetic Questions: Why More Sequences Are Not Enough, PLoS Biol 9(3): 1-10
8. Philippe H., Derelle R., Lopez P., Pick K., Borchiellini C., Boury-Esnault N., Vacelet J., Renard E., Houliston E., Queinnec E., Da Silva C., Wincker P., Le Guyader H., Leys S., Jackson D., Schreiber F., Erpenbeck D., Morgenstern B., Wörheide G., Manuel M. 2009. Phylogenomics Revives Traditional Views on Deep Animal Relationships, Current Biology 19: 1-7
9. Raven P. H., Johnson G. B., Losos J. B., Singer, S. R. 2005. Biology, 7. izdanje, McGraw Hill
10. Vacelet J., Boury-Esnault N., De Vos L., Donadey C. 1989. Comparative study of the choanosome of Porifera: II. The keratose sponges. Journal of Morphology 201: 119–129
11. www.bioinformatika.hr
12. www.evolution.berkeley.edu/evolibrary/article_0/history_20
13. www.jiffynotes.com/a_study_guides/book_notes/grze_01/grze_01_00022.html
14. www.portol.org/thesaurus/TheThesaurusCatSearch.php?categories=3

5. Sažetak

U znanosti postoji težnja za rješavanjem evolucijske povijesti taksonomskih skupina živih (i poznatih izumrlih) organizama. Ovim se kompleksnim zadatkom bavi filogenija. Koljeno Porifera - spužve - pokazalo se kao iznimno zanimljiva skupina ija filogenija nije potpuno ustanovljena niti nakon više od stotinu godina istraživanja i unato razvitu novih metoda istraživanja.

Povjesno gledaju i, morfologija spikula te cijelokupnog skeleta imala je važnu ulogu u postavljanju prvotne sistematike spužvi, a njen se zna aj ne smije zanemariti ni danas. Uspostavljanje filogenije isklju ivo pomo u morfologije nije bilo mogu e. Nešto kasnije, citologija je donijela novitete u pristupu i jasne odgovore kod razlu ivanja pojedinih porodica. Tako er je vrlo važna metoda kod istraživanja spužvi bez spikula. U pojedinim slu ajevima, citologija se pokazala efikasnijom od molekularne filogenetike. Istraživanja sekundarnih metabolita pokazala su se problemati nima zbog brojnosti endosimbionata u spužvi, iako potencijalno nude koristan set informacija za filogeniju. Razvitak metoda molekularne filogenije 1990-ih rezultirao je opsežnom primjenom na spužvama, me utim postoji još niz neriješenih pitanja osobito unutar skupine Demospongiae. Ipak, postoje poteško e u primjeni tih novih metoda kad je potrebno odrediti filogeniju vrsta ija se specijacija odvijala u evolucijski kratkom periodu ili kad je proces odvajanja evolucijski „star“. Problem naj eš e proizlazi iz naše nemogu nosti da sa sigurnoš u detektiramo homoplaziju (tj. ortologe) i sekundaran gubitak karakteristika. Dio poteško a bit e mogu e riješiti kroz pažljiv odabir ve eg broja gena s filogenetski važnom informacijom u ulazni set podataka za formiranje rodoslovnog stabla.

Probleme filogenije spužvi stoga nije mogu e riješiti jedinstvenom metodom niti izoliranim setom informacija. Njima treba pristupiti multidisciplinarno uz racionalno korištenje što ve eg broja dostupnih metoda/informacija.

6. Summary

There is a strong tendency in science towards solving the evolutionary history of taxonomic ranks of all living (and known fossil) organisms. That complex task is assigned to phylogeny. The phylum Porifera - sponges - has turned out to be a very interesting group whose phylogeny has not yet been resolved despite more than hundred years of research and emergence of new scientific methods.

From a historical point of view, morphology of spicules and overall skeleton shape as a whole had an important role in defining the early systematics of Porifera and it is not to be ignored even at this point in time. On the other hand, using morphology as the only key to assemble phylogeny was not sufficient. Appearing a bit later, cytology has brought novelty in approach and clear answers regarding some Poriferan genera. Also, it plays a very important role in studying sponges without spicules. In some cases cytology has proved to be more effective in yielding information than molecular phylogeny. Including secondary metabolites in analyses, although potentially useful, has shown to be rather difficult due to a great number of endosymbionts living in sponges. The development of molecular phylogeny methods in 1990's resulted with their wide use in research of Porifera. Still, many questions remain unanswered, especially regarding the class Demospongiae. These new methods have been less effective in search of connections among species that evolved rather quickly in an evolutionary sense of time and/or have separated early in the evolution. The problem most commonly arises from our inability to detect homoplasy (or orthologues) and a secondary character loss with certainty. A part of the solution is expected to be reached through inclusion of more carefully selected genes that carry useful phylogenetic information which would be included in the formation of a phylogenetic tree.

In the end, problems of modern phylogeny cannot be solved with any unique method or single set of information. They have to be approached from a multidisciplinary point of view with rational use of as many methods/information as possible.