Kospecijacija

Jelinčić, Marinela

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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/urn:nbn:hr:217:586685

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Kospecijacija
Cospeciation

SEMINARSKI RAD

Marinela Jelinčić
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduated Study of Molecular Biology)
Mentor: izv. prof. dr. sc. Damjan Franjević

Zagreb, 2020.

SADRŽAJ

1. UVOD……1
2. KOEVOLUCIJA I KOFILOGENETSKI PROCESI……..……....2
3. OD KOEVOLUCIJE DO (KO)SPECIJACIJE…..……5
4. KOSPECIJACIJA……..7
5. PROUČAVANJE KOSPECIJACIJE…….....9
   5.1. UVOD U PROUČAVANJE KOSPECIJACIJE……..9
   5.2. METODE TEMELJENE NA DOGAĐAJU…….12
   5.3. METODE TEMELJENE NA TOPOLOGIJI ILI UDALJENOSTI……...17
   5.4. PROBLEMI KORIŠTENJA KOFILOGENETSKIH METODA……..20
6. LITERATURA…….23
7. SAŽETAK……....30
8. SUMMARY…….31

1. UVOD

Organizmi u prirodi ostvaruju različite interakcije s drugim vrstama, a proučavanje tih interakcija nužno je za razumijevanje makroevolucijskih obrazaca diversifikacije. Najznačajniji su koevolucijski obrasci između blisko povezanih skupina, kao što su paraziti i domaćini te mutualisti. Raznoliki procesi doprinose njihovoj diversifikaciji, a odvijaju se na nekoliko razina počevši od stanične, i u svim taksonima, od virusa do kralježnjaka. Filogenetska istraživanja krajem 20. stoljeća pokazivala su veliku sličnost, čak i gotovo potpuna preklapanja u filogeniji mnogobrojnih skupina kao posljedicu kospecijacije, odnosno simultane specijacije interagirajućih taksona. Procesi koji uglavnom reduciraju podudarnost su: prebacivanje između domaćina (horizontalni transfer), duplikacije, sortirajući događaji i neuspjela specijacija (Johnson i Clayton, 2004). Daljnjim istraživanjima pokazano je da je kospecijacija ipak rijedak događaj (7%), korištene kofilogenetske metode precijenile su njezinu pojavnost, dinamika interakcija između domaćina i parazita ne favorizira kospecijaciju, a prebacivanje između domaćina najčešći je mehanizam specijacije parazita (de Vienne i sur., 2013).

Pojam koevolucija koristi se za opis mnogih interakcija među organizmima. Uveli su ga Ehrlich i Raven 1964. godine kako bi opisali interakciju leptira monarha (rod *Danaus*) i njihovoga domaćina, biljaka mlječika iz reda Gentianales. Hranjenje ličinki leptira koje su pod selekcijskim pritiskom fiziološkim adaptacijama stekle mogućnost metaboliziranja toksičnih alkaloida mlječika i raznolikost kemijskih prilagodbi biljke pripisali su recipročnom evolucijskom procesu i predložili da takav proces uvelike pridonosi diversifikaciji biljaka cvjetnica i herbivora.

S vremenom se interakcije počinju preciznije definirati. Fox (1988) razlikuje difuznu i parnu koevoluciju. Difuzna koevolucija odnosi se na više interagirajućih svojti koje recipročno utječu jedna na drugu (ideja Ehrlicha i Ravena, 1964), a parna koevolucija podrazumijeva dvije interagirajuće populacije koje pridonose međusobnoj selekciji. Paralelna diversifikacija ili kospecijacija podrazumijeva da je specijacija jedne svojte popraćena specijacijom unutar druge, ali ona nije nužno niti uzrok niti posljedica parne koevolucije. Dakle, potrebno je razlikovati koevoluciju i kospecijaciju. Koevolucija se može definirati kao neprestani recipročni selekcijski pritisak i rezultirajuće mikroevolucijske promjene (npr. poboljšanje prepoznavanja parazita od strane domaćina i poboljšanje mehanizama za izbjegavanje prepoznavanja), a kospecijacija kao dugoročan proces istovremene specijacije dviju usko interagirajućih vrsta. Često obligatne i

specijalizirane interakcije između domaćina i simbionta sugeriraju da će bifurkacija linije domaćina vjerojatno rezultirati simultanom izolacijom povezanih simbionata, tj. specijacija u jednoj liniji povezana je sa specijacijom u drugoj (de Vienne i sur., 2013).

2. KOEVOLUCIJA I KOFILOGENETSKI PROCESI

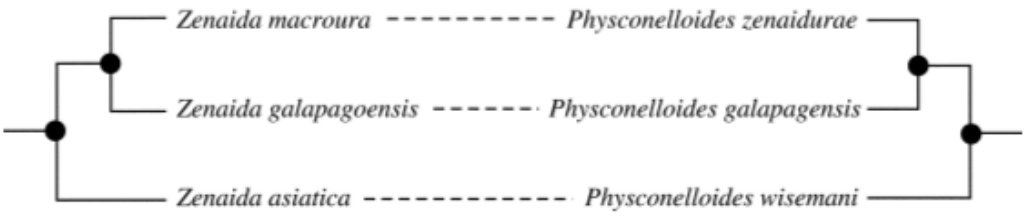
Koevolucija se odvija kada dvije ili više svojti djeluju kao uzajamni agenti selekcije i reagiraju kroz promjene koje povećavaju fitnes. Recipročna adaptacija ili koadaptacija moguća je kada međudjelovanje za posljedicu ima promjenu fitnesa kod oba sudionika. Primjer je evolucijska utrka između fitofagnih insekata roda *Tetraopes* i njihova domaćina, biljaka mlječika iz roda *Asclepia*s. Kornjaši imaju razvijene bihevioralne i fiziološke načine bijega od obrambenih mehanizama domaćina, npr. mogu mehanički prekinuti protok lateksa u sekretornim kanalima i razvili su toleranciju na određene glikozide mlječika (Farrell i Mitter, 1998). Sekundarni su se metaboliti također izmijenili na način da su u recentnim linijama mlječika koje su u asocijaciji s *Tetraopes* toksičniji nego kod njihovih bliskih srodnika. Ovakva evolucijska utrka mogla je dovesti do diversifikacije ovih svojti (Farrell, 1991).

Uvjeti za koevoluciju jednaki su bez obzira o koje se dvije skupine organizama radi, bilo da su u pitanju biljke i fitofagni insekti, domaćin i parazit, domaćin i parazitoid ili predator i plijen. Mora postojati fenotipska varijacija osobine koja utječe na prednosti ili nedostatke interakcije za svakoga sudionika. Genetička komponenta ove varijacije može biti selektirana preko dinamičkih promjena u fitnesu koje se s vremenom događaju na obje strane interakcije. Intenzitet recipročne selekcije i posljedice fitnesa variraju u različitim geografskim područjima jer i sama genetička struktura interagirajućih populacija varira od jednoga do drugoga mjesta. Ovi procesi na razini populacije odražavaju se na geografski mozaik koevolucije na razini vrsta (Thompson, 1994).

U prirodi se odvija nekolicina procesa odgovornih za različite obrasce koevolucijske povijesti. Za objašnjenje kospecijacije, prebacivanja između domaćina, izumiranja, sortirajućih događaja, duplikacije i neuspjele specijacije te pripadajućega izgleda filogenetskoga stabla, Johnson i Clayton (2004) upotrijebili su domaćin-parazit sustav koji čine golubovi (Columbiformes) i uši (Phthiraptera).

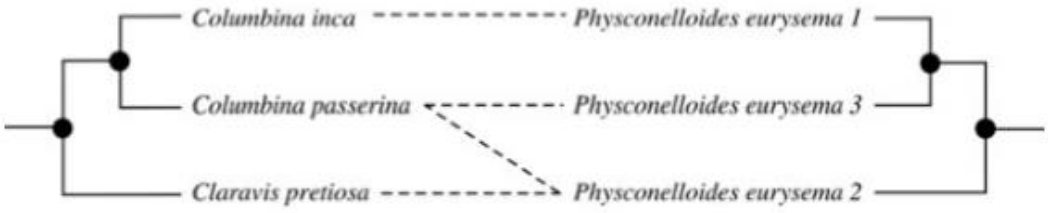
Ponovljeni slučajevi kospecijacije, tj. istovremene specijacije parazita i domaćina, povećavaju kongruenciju u filogeniji domadara i parazita, a kospecijacija je obično i izvedena

izravno iz kongruencije, stoga treba pažljivo pristupiti analizi filogenetskih odnosa. Primjer kospecijacije su uši roda *Physconellidae* i golubovi Novoga Svijeta (Sl. 1.).



Slika 1. Filogenije golubova roda *Zenaida* i njihovih parazitskih uši (rod Physconelloides) primjer su savršene kospecijacije (Preuzeto iz Johnson i Clayton, 2003).

Prebacivanje između domaćina jedan je od procesa koji u pravilu reduciraju filogenetsku podudarnost. Nepotpuno prebacivanje zapravo je proširenje parazitskoga opsega domaćina (parazit je kolonizirao još jednoga domaćina, uz prethodno postojećega). Prebacivanje između domaćina potpuno je nakon izumiranja parazita na originalnom domaćinu, nakon specijacije populacije parazita na jednom od domaćina ili oboje. Nepotpuno prebacivanje između domaćina dogodilo se kod kriptičkih vrsta uši *Physconelloides eurysema* (Johnson i sur., 2002) i golubova iz redova *Claravis* i *Columbina* (Sl. 2.).

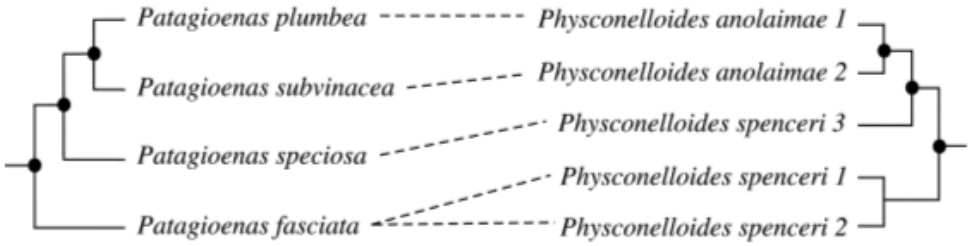


Slika 2. Nepotpuno prebacivanje između domaćina. *Physconelloides eurysema* 2 proširila je svoj opseg domaćina kolonizacijom vrste *Columbina passerina* (preuzeto iz Johnson i Clayton, 2003).

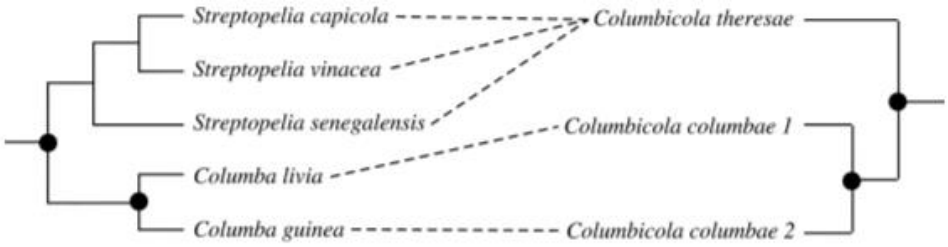
Sortirajući događaji druga su skupina čimbenika koji utječu na smanjenje sličnosti filogenija domaćina i parazita, a uključuju nestanak parazita iz populacije zbog efekta osnivača i izumiranje.

Izumiranje podrazumijeva gubitak parazita iz postojeće interakcije s domaćinom. Primjer su golubovi s Novoga Zelanda (*Hemiphaga novaeseelandiae*) i uši roda *Columbicola.*

Duplikacije (specijacije unutar domaćina) također smanjuju filogenetsku kongruenciju parazita i domaćina, a podrazumijevaju specijaciju parazita bez specijacije domaćina. Duplikacija se dogodi simpatrijskom specijacijom parazita ili alopatrijskom specijacijom populacija parazita diljem geografskoga opsega domaćina, što je slučaj kod golubova *Patagioenas fasciata* i njihovih parazitskih uši (Sl. 3.). Golubovi vrste *Patagioenas fasciata* u Južnoj i Sjevernoj Americi ne razlikuju se na razini mtDNA, ali njihove se parazitske uši (*Physconelloides spenceri*) razlikuju čak 9%. Suprotno od duplikacije jest neuspjela specijacija, odnosno specijacija domaćina odvije se bez specijacije parazita. Ovakva se situacija može dogoditi kada paraziti zadrže sposobnost širenja između divergirajućih vrsta domaćina (Johnson i sur., 2003), a primjer su uši (*Columbicola*) i golubovi roda *Streptopelia* (Sl.4.).



Slika 3. Duplikacijski događaj parazitskih uši (*Physconelloides*) golubova vrste *Patagioenas fasciata* (Preuzeto iz Johnson i Clayton, 2004).



Slika 4. Neuspjela specijacija parazitskih uši *Columbicola theresae* prilikom specijacije goluba roda *Streptopelia* (preuzeto iz Johnson i sur., 2003).

3. OD KOEVOLUCIJE DO (KO)SPECIJACIJE

Da bi se dogodila diversifikacija, koevolucijski mehanizmi prvotno moraju potaknuti specijalizaciju simbionata (parazita ili mutualista), koja potom može dovesti do specijacije. Divergencija se, tvrde de Vienne i sur. (2013), češće događa kroz specijaciju nakon promjene domaćina nego kospecijacijom.

Koevolucija domaćina i parazita proces je neprestane recipročne selekcije. U najjednostavnijem sustavu, selekcija uključuje po jedan lokus u svakom sudioniku. Moguća su dva ishoda dinamike frekvencije alela domaćina i parazita, prema selekciji ovisnoj o frekvenciji (Holub, 2001; Woolhouse i sur., 2002). Prema modelu utrke u naoružanju („arms race“) povoljne se varijante fiksiraju, a prema modelu rovovskoga ratovanja („trench warfare“) frekvencije alela osciliraju tijekom vremena ili konvergiraju u ravnotežnim frekvencijama rezultirajući zadržavanjem nekoliko alela parazita i domaćina (Brown i Tellier, 2011). Još jedna klasifikacija razmatra dinamiku promjene fenotipa uzrokovanu selekcijom. Kada vrijednosti fenotipa uvijek imaju pomak u istome smjeru, kao u predator-plijen sustavu sa selekcijom ovisnom o gustoći, interakcija se naziva fenotipskom razlikom (Dawkins i Krebs, 1979), dok u fenotipskom podudaranju (Lahti, 2005) sustav oscilira ovisno o fenotipskoj vrijednosti interagirajućih vrsta, kao u većini sustava sa selekcijom ovisnom o frekvenciji. Van Valen (1973), promatrajući dinamiku sustava, koevolucijske procese između domaćina i parazita naziva dinamikom Crvene Kraljice. Teorija je dobila ime po rečenici iz priče Lewisa Carrolla: „Trebaš trčati što brže možeš kako bi ostao na istom mjestu”, koja ukazuje na to da su vrste u konstantnoj evolucijskoj utrci za preživljavanjem i moraju razvijati mehanizme za opstanak. Van Valen je prvi povezao kratkoročnu koevolucijsku dinamiku s makroevolucijom, ali pitanje jest može li koevolucija, bez obzira na prevladavajuću dinamiku selekcije, izravno promovirati specijalizaciju parazita.

Specijalizirani paraziti učestaliji su od generalista kod fitofagnih insekata (Dres i Mallet, 2002), gljiva (Giraud i sur., 2008) i ptica (Proctor i Owens, 2000), iako bi se apriorno moglo očekivati suprotno jer generalisti imaju širi opseg staništa i načina ishrane što osigurava preživljavanje u uvjetima nedostupnosti određenih resursa ili nestabilnosti populacije domaćina. Relativna malobrojnost generalista možebitno je rezultat ravnoteže između mogućnosti infekcije širokoga spektra domaćina i optimalne stope iskorištavanja postojećega tipa domaćina, što je primijećeno u eksperimentima serijskoga pasažiranja u kojima je propagacija mikroorganizma na

drugoj vrsti domaćina dovela do opadanja fitnesa u interakciji s primarnim domaćinom (Ebert, 1998). Također, specijalisti pokazuju bržu adaptaciju nego generalisti za pojedinu vrstu domaćina, prema hipotezi Crvene Kraljice. Selekcija na temelju uspješnije infekcije postojećega domaćina prisutna je u svakoj generaciji specijalista, a kod generalista se događa tek povremeno. U prilog specijalizaciji ide smanjena kompeticija u alternativnim nišama, za razliku od niša koje imaju specijaliste, što onda indirektno potiče specijalizaciju i u tim nišama. Dakle, specijalizacija može biti izravno potaknuta koevolucijom zbog smanjene uspješnosti opstanka na različitim domaćinima i više stope adaptacije specijalista, te neizravno kroz kompeticiju s drugim specijalistima (Whitlock, 1996; Kawecki, 1998). Kospecijacija i specijacija nakon prebacivanja između domaćina zahtijevaju specijaciju domaćina neovisnim mehanizmima, poput geografske izolacije, ili specijalizaciju parazita (ranije opisanim mehanizmima) koju slijedi specijacija.

Učinke specijalizacije na specijaciju razmatrali su i saželi de Vienne i sur. (2013). Evolucija specifičnih genotipova domaćina dovodi do pojave specijalista samo prilikom reproduktivne izolacije, što odgovara ekološkoj specijaciji u kojoj parazitske vrste okupiraju različite niše (različite vrste domaćina) pa postanu reproduktivno izolirane jedne od drugih (Giraud i sur., 2010). Dva čimbenika pogoduju evoluciji reproduktivne izolacije u populacijama prilagođenima različitim ekološkim nišama: niska razina raspršenja među populacijama (Hendry i sur., 2007) i parenje samo između jedinki specijalista na određenoj niši (Rice, 1984), zbog istih bihevioralnih i razvojnih čimbenika (Giraud i sur., 2010). Dakle, specijalizacija parazita doprinosi diversifikaciji putem specijacije, a sama brzina specijacije ovisi o generacijskom vremenu, stopi raspršenja i efektivnoj veličini populacije (Huyse i sur., 2005). Specijalizacija dviju parazitskih linija na sestrinskim vrstama domaćina može rezultirati kospecijacijom. Međutim, mnogobrojni su razlozi narušavanja takvoga procesa, čak i nakon dugotrajne koevolucije domaćina i parazita i u visokospecijaliziranim linijama. Paraziti mogu izumrijeti, imati malu incidenciju u populacijama domaćina ili malu veličinu populacije pa zbog toga propuste specijaciju domaćina, što je naročito moguće prilikom osnivanja populacije u alopatriji od nekolicine jedinki koje su slobodne od parazita. Mala veličina populacije domaćina nije kompatibilna s ustrajnošću patogenih specijalista (de Castro i Bolker, 2005), što je dodatan razlog zašto koevolucija često ne dovodi do kospecijacije, ako u obzir uzmemo da se inicijalne populacije nove vrste domaćina sastoje od nekoliko jedinki.

Obratna situacija, odnosno mogu li paraziti potaknuti specijaciju domaćina, manje je istražena. Kofilogenetske analize pokazuju da se specijacija u višoj stopi događa u lozama primata s većim brojem parazitskih vrsta (Nunn i sur., 2004), što bi moglo značiti recipročni utjecaj na specijaciju. Međutim, neka eksperimentalna istraživanja predlažu da koevolucija s parazitima može ometati diversifikaciju domaćina (Buckling i Rainey, 2002). Zaključno, istraživanja srodnih vrsta parazita sugeriraju da koevolucija potiče specijaciju parazita putem specijalizacije na različitim domaćinima. Kao posljedica specijalizacije, paraziti se mogu razdvojiti u dvije vrste kada se razdvoji linija domaćina te se to naziva kospecijacijom, ali samo u slučaju ako paraziti i domaćini ostanu povezani kroz cijeli specijacijski proces. Ipak, pregledom kofilogenetskih analiza utvrđeno je da se specijacija češće događa prebacivanjem između domaćina nego kospecijacijom u interakcijama između parazita i domaćina, čak i uz predominantan utjecaj koevolucije u kraćem vremenskom segmentu. Čak i kada se čini da se kospecijacija dogodila, sinkrona divergencija linija domaćina i parazita primarno je rezultat strogoga vertikalnog nasljeđivanja, a ne recipročnoga selektivnoga pritiska izvršenoga od sudionika interakcije (de Vienne i sur., 2013).

4. KOSPECIJACIJA

Interakcije između domaćina i simbionta (parazita, mutualista, komenzala) očituju se u kratkim vremenskim skalama, od jednoga ciklusa zaraze u slučaju parazitskih infekcija, ali i u dugoj vremenskoj skali, do višestrukih specijacijskih događaja. Prvonavedene se odnose na recipročni selekcijski pritisak između domaćina i parazita koji dovodi do promjena u frekvenciji alela tijekom uzastopnih generacija, odnosno koevoluciju u užem smislu (Clayton i Moore, 1997), a višestruki specijacijski događaji, ukoliko su istodobni, znače kospecijaciju (Page, 2003) i najčešće uključuju alopatrijsku specijaciju domaćina i njegova simbionta. Iako se u početku smatralo da je učestala, kospecijacija, ili ko-kladogeneza, relativno je rijetka pojava (Godfray, 1994). Simbiont bi trebao biti usko povezan s domaćinom od vremena same pojave ancestralnoga domaćina (Mitter i sur., 1991). Budući da je povezanost između domaćina i simbionta kontinuirana tijekom njihove koevolucijske povijesti, kospecijacijske klade trebale bi biti slične starosti (Bush i Butlin, 2004).

Ideja kospecijacije iznesena je u pionirskim istraživanjima Kellogga i Fahrenholza (1913) u kojima je navedeno da su usko povezani ptičji paraziti, sa sličnim fenotipskim odlikama,

udruženi s usko povezanim vrstama domaćina. Predložili su tzv. Fahrenholzovo pravilo: „Filogenija parazita odraz je filogenije domaćina.“ Sličan princip predložio je Szidat 1940. godine: „Primitivni domaćini udomljuju primitivne parazite.“ Ideja iza toga jest da je sličnost među parazitima srodnih domaćina rezultat kospecijacije, odnosno istovremenoga i međuovisnoga grananja linija domaćina i parazita koje dovodi do podudarnih filogenija. Prva istraživanja koja su se pozivala na Fahrenholzovo pravilo nisu zapravo testirala kospecijaciju kao hipotezu. Budući da DNA sekvenciranje nije bilo moguće, bilo je od iznimne važnosti prikupiti ostale filogenetske podatke. Uska distribucija domaćina mnogih animalnih parazita dovela je do upotrebe parazita kao kriterij za zaključivanje filogenetskih odnosa među domaćinima (Hoberg i sur., 1997). Obratno tomu, klasifikacija domaćina često je bila korištena kao kriterij za klasifikaciju parazita. U oba slučaja, filogenija jednoga sudionika interakcije korištena je za izgradnju filogenije drugoga, iz čega je proizlazila kongruentnost. Budući da je filogenetska podudarnost bila široko prihvaćen kriterij za kospecijaciju, proširilo se uvjerenje da je kospecijacija učestala. Tek krajem osamdesetih godina prošloga stoljeća neovisne filogenije domaćina i parazita počinju se koristiti u istraživanjima kospecijacije (Hafner i Nadler, 1988).

Teoretski, dvije vrste dokaza potrebne su i dovoljne za potvrdu kospecijacije u domaćin-parazit sustavu: neovisno dobivene filogenije domaćina i parazita te statistička potvrda da topološka sličnost filogenetskih stabala nadilazi slučajna očekivanja. Ako su zadovoljena oba uvjeta, vjerojatnost lažne podudarnosti je niska. Iako su dokumentirani slučajevi kospecijacije rijetki, od velikoga su interesa zato što otkrivaju povijest povezanosti dviju skupina organizama koje pripadaju čak i različitim koljenima, omogućuju pomnije proučavanje relativnih stopa evolucije dviju grupa usporedbom količine nakupljenih promjena kojima je svaka od njih podlegla tijekom perioda paralelne filogeneze, istraživanje životnih ciklusa, generacijskoga vremena, mobilnosti, strukture populacija i drugih parametara (Hafner i Nadler, 1990).

Čest primjer kospecijacije uključuje glodavce (Geomyidae) i ektoparazitske uši (Mallophaga). Filogenetsko istraživanje u kojem je korištena citokrom oksidaza I pokazalo je da je kospecijacija prisutna između većine od 15 alopatrijskih glodavaca i njihovih parazitskih uši (Page i Hafner, 1996), ali čak i u ovom primjeru dogodilo se i jedno prebacivanje između domaćina. Inače, prebacivanje između domaćina gotovo je pravilo za uši i njihove domaćine, a još jedna od iznimki jest kospecijacija kod ptica iz porodice Apodidae i uši iz porodice Menoponidae

(Clayton i sur., 1996). Pojavnost kospecijacije kod uši ovisi o stupnju alopatrije među vrstama domaćina. Ako domaćini ostanu u alopatriji, poput većine glodavaca, mala je vjerojatnost za prebacivanje između domaćina. Kada vrste domaćina postanu simpatrijske, uši mogu prijeći na drugoga domaćina uslijed interspecijske kompeticije i izumiranja (Barker, 1994).

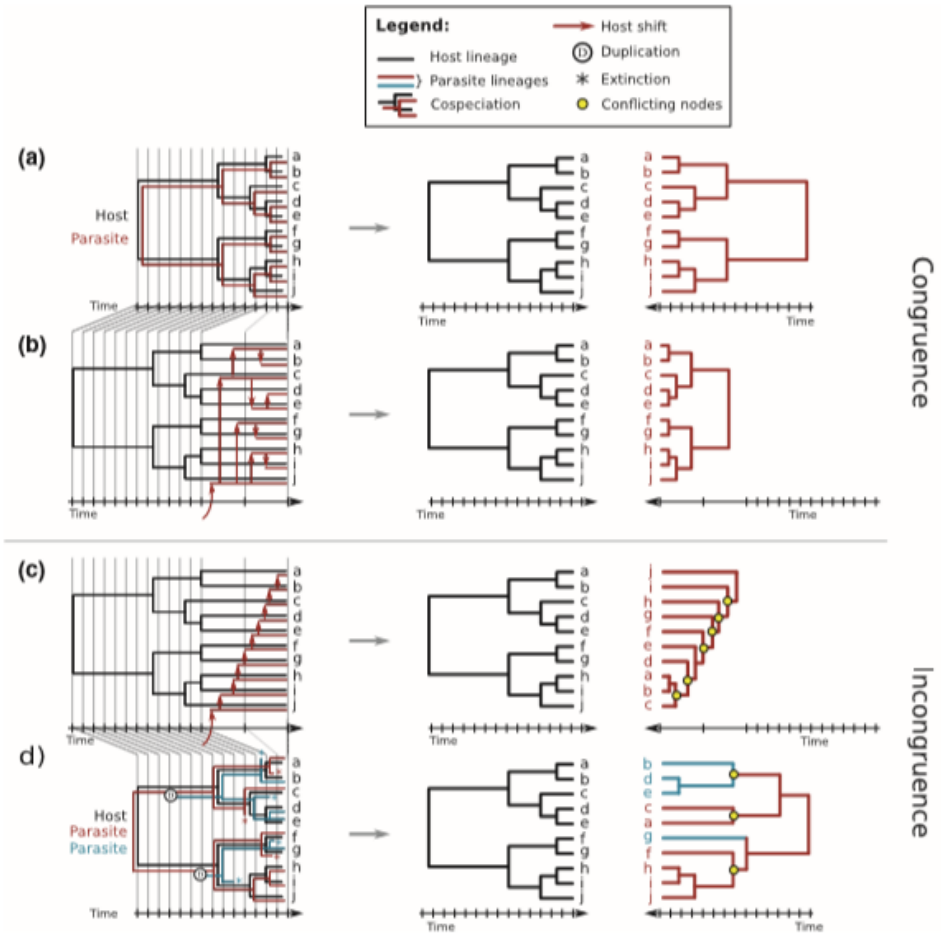
Kod smokvi (rod *Ficus*) i njihovih oprašivačkih osa (porodica Agaonidae), kospecijacija je pravilo (Machado i sur., 1996). Detaljnom filogenetskom analizom (Weiblen, 2001) uočena je ekstenzivna „jedan na jedan" kospecijacija između novogvinejskih smokava (*Ficus,* subg, *Ficus*) i njihovih visokospecijaliziranih oprašivača (Agaonidae), uz samo nekoliko prebacivanja između domaćina. Primijećena je velika korelacija između duljine leglice osa i pojedine vrste smokve, kao i druge prilagodbe koje potiču stabilan mutualizam. Budući da se parenje odvija u unutrašnjosti smokve, inbreeding rezultira gubitkom genske varijabilnosti, a zajedno s ekstremnim stupnjem specijalizacije gotovo je nemoguće za oprašivače da promijene domaćina. Smatra se da su smokve i njihove oprašivačke ose primjer alopatrijske kospecijacije, iako se ne može stopostotno isključiti simpatrijska specijacija vođena od strane oprašivača (Weiblen, 2002).

5. PROUČAVANJE KOSPECIJACIJE

5.1. UVOD U PROUČAVANJE KOSPECIJACIJE

Primarni cilj usporedbe filogenije domaćina i parazita dokumentiranje je tijeka njihova odnosa, a filogenetskim metodama mogu se razlučiti komponente interakcije koje su posljedica zajedničke povijesti (udruživanje porijeklom, engl. association by descent") od komponenti koje su posljedica raspršenja ili prebacivanja između domaćina (udruživanje kolonizacijom, engl. association by colonization). Dugo je vremena bila uvriježena pretpostavka da su filogenije domaćina i parazita podudarne, topološki jednake. Podudarnost je bila dokaz za kospecijaciju (Sl. 5.a), odnosno da su domaćin i parazit udruženi porijeklom. Obratno tomu, nepodudarnost je služila kao dokaz za prebacivanje između domaćina, odnosno udruženje kolonizacijom. Upravo se na toj dihotomiji temeljila filogenetska analiza kospecijacije, iako su znanstvenici bili svjesni da je teorijski moguće da se dogodi sekvencijalno prebacivanje parazita između domaćina, popraćeno specijacijom, koje će preslikavati filogenetske odnose između domaćina (Sl. 5.b), što bi značilo da podudarnost ne znači nužno kospecijaciju (Brooks i McLennan, 1991). U pravilu, prebacivanje

između domaćina dovest će do smanjenje podudarnosti (Sl. 5.c), kao i duplikacije, izumiranja (Sl. 5.d) ili greške prilikom uzorkovanja (Page, 1993).



Slika 5. Kofilogenetski uzorci različitih tipova parazitske specijacije. (a) Podudarne filogenije kao rezultat kospecijacije. (b) Specijacija nakon prebacivanja između domaćina rezultirala je podudarnim filogenijama, ali grane parazitskih linija su kraće. (c) Prebacivanje između domaćina koje je rezultiralo nepodudarnim filogenijama. (d) Kospecijacija koja se odvija uz duplikacije i izumiranja rezultira nepodudarnim filogenijama, bez ijednoga prebacivanja između domaćina. (Preuzeto iz de Vienne i sur., 2013).

Proučavanje kospecijacije zahtijeva neovisan pristup genetičkoj diferencijaciji domaćina i njihovih parazita, što omogućuju molekularni podatci, odnosno nukleotidne sekvence. Filogenije dobivene iz molekularnih podataka oslobođene su nagađanja o stopi evolucijskih promjena jer se

iz njih može točno izračunati genetička udaljenost i količina promjena (molekularni sat) te na osnovu toga odrediti uklapaju li se specijacijski događaji u isti vremenski okvir (Zuckerkandl i Pauling, 1965; Kimura 1983). Na osnovi neovisnih molekularnih podataka konstruiraju se filogenetska stabla, a korištena metoda ovisi o istraživaču. Budući da će topologija dobivenih stabala biti statistički uspoređivana kako bi se testirala hipoteza kospecijacije, pouzdanost korištene metode utjecat će na jačinu zaključka o kospecijaciji. Dakle, filogenetska stabla domaćina i parazita uspoređuju se kako bi se utvrdilo nadmašuje li njihova topološka sličnost nivo sličnosti očekivan pukom slučajnosti. Ako razina sličnosti prelazi slučajna očekivanja, onda je prikladno prihvatiti hipotezu o rasprostranjenoj kospecijaciji među promatranim domaćinima i parazitima, čak i ako kospecijacijski događaj nije prisutan u svakome grananju. Ako razina topološke sličnosti ne nadilazi razinu slučajnosti, hipoteza o rasprostranjenoj kospecijaciji među proučavanim taksonima se odbacuje, unatoč tomu što se između određenih domaćina i parazita dogodila kospecijacija. Osim intrinzične zanimljivosti same kospecijacije, mnogo se više može proučavati usporedbom stupnja i obrasca genetičke diferencijacije, npr. lokusi homolognih gena ili cjelokupne sekvence, na osnovi čega se može usporediti razlika između lokusa ili stopa mutacija. Također se može odrediti evoluiraju li paraziti brže, sporije ili jednakom stopom kao njihovi domaćini (Hafner i Nadler, 1988).

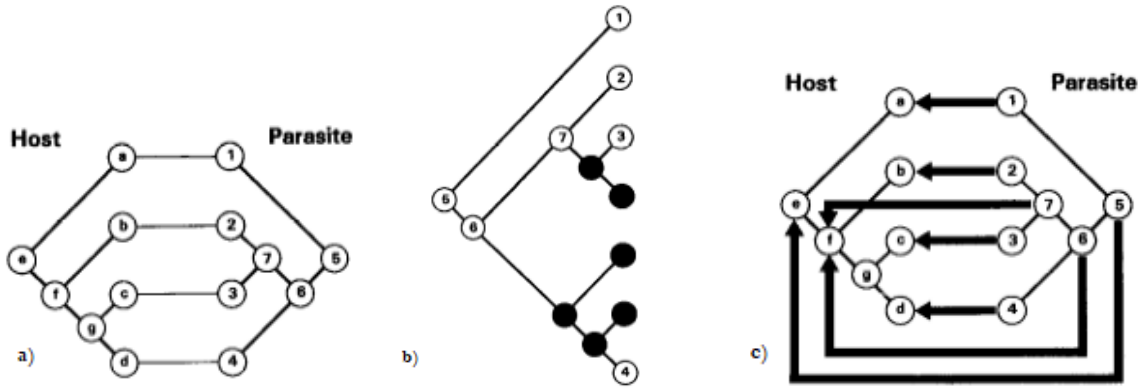
Kofilogenetske metode mogu se podijeliti u dva razreda. U prvome su razredu metode koje za cilj imaju rekonstruirati evolucijsku povijest interagirajućih skupina i izvesti zaključak o prirodi i učestalosti različitih evolucijskih scenarija usporedbom filogenetskih stabala (metode temeljene na događaju, engl. event-based methods). Diversifikacija kospecijacijom biva zaključena ako je broj kospecijacijskih događaja značajno veći od broja kospecijacijskih događaja izvedenih uslijed randomiziranih asocijacija, iako ovakva pretpostavka ukazuje samo na topološku podudarnost, a ne nužno kospecijaciju. Drugome razredu pripadaju metode koje testiraju cjelokupnu podudarnost između filogenija proučavanih skupina (metode temeljene na topologiji ili udaljenosti, engl. topology or distance based-methods) koristeći sličnost ili simetriju u vremenu divergencije između parazita i domaćina i uopćeno se pretpostavlja da visoka razina podudarnosti pruža dokaz učestale kospecijacije, iako i takav zaključak može biti neopravdan.

5.2. METODE TEMELJENE NA DOGAĐAJU

Prva razvijena metoda bila je Brooksova analiza štedljivosti (engl. Brooks' Parsimony Analysis, BPA; Brooks, 1981). Paraziti su uzeti kao stanja karaktera domaćina i dodijeljeni svakoj grani u filogeniji domaćina, a rekonstrukcija s najvećom štedljivosti, odnosno ona s najmanjim brojem promjena stanja parazitske prisutnosti i odsutnosti u filogeniji domaćina, zadržava se. Ako su filogenije domaćina i parazita topološki podudarne, svakoj unutrašnjoj grani u filogeniji domaćina dodijeljeno je jedno „parazitsko“ stanje tako da nije potrebna promjena stanja i kospecijacija se zaključuje duž cijele filogenije. Nastoje se uklopiti i kospecijacija i kolonizacija, ali dobiveni rezultati mogu biti poprilično nelogični za interpretaciju, npr. preci sadašnjega parazita trebali bi se raspršiti svaki put kada se postojeći parazit raspršuje, a potomci predačkoga parazita izumrijeti ako je izumro predački parazit (Page, 1990). Iako je BPA bila u širokoj upotrebi 80-ih i ranih 90-ih godina prošloga stoljeća, dobila je velike kritike, naročito zbog potrebe za velikim brojem interpretacija *a posteriori* (Page, 1994).

Analiza poravnanjem (engl. reconciliation analysis; Page, 1990) parazite karakterizira kao evolucijske linije, a ne kao stanja karaktera. Implementirana u COMPONENT program (Page, 1993), procjenjuje minimalni broj izumiranja i duplikacija potrebnih za preklapanje odvojenih filogenija domaćina i parazita (Sl. 6.). Kospecijacija se eksplicitno smatra hipotezom s najvećom štedljivosti. Prebacivanje između domaćina dodano je u TREEMAP 1 program (Page, 1994), ali program ne garantira da su rekonstrukcije koje uključuju više od jednoga prebacivanja između domaćina realne u vremenskom okviru. Ovom se metodom nastoje poravnati filogenije domaćina i parazita maksimizirajući broj kospecijacijskih događaja i minimizirajući broj specijacija uslijed prebacivanja između domaćina. Zahtijeva korespodenciju jedan na jedan na završnim vršcima. Budući da nema ograničenja broja duplikacija i izumiranja ili broja parazita na unutrašnjim čvorovima, broj parazita na predačkim vrstama domaćina ili broj duplikacija može biti nerazumno velik (Refrégier i sur., 2008), a može se dobiti i pozamašan broj rekonstrukcija. Prednost je dobiveni grafički prikaz povijesti interakcije domaćina i parazita, ali često je netočan zbog događaja koji se ne mogu procijeniti a priori. TREEMAP 1 također procjenjuje je li broj kospecijacijskih događaja u uspoređivanim stablima veći nego u nasumičnim filogenijama. Zapravo je to najkorisniji dio programa, iako se često koristi kao test za kospecijaciju, a u suštini je test za topološku podudarnost. Dakle, analiza poravnanjem precjenjuje pojavnost kospecijacije

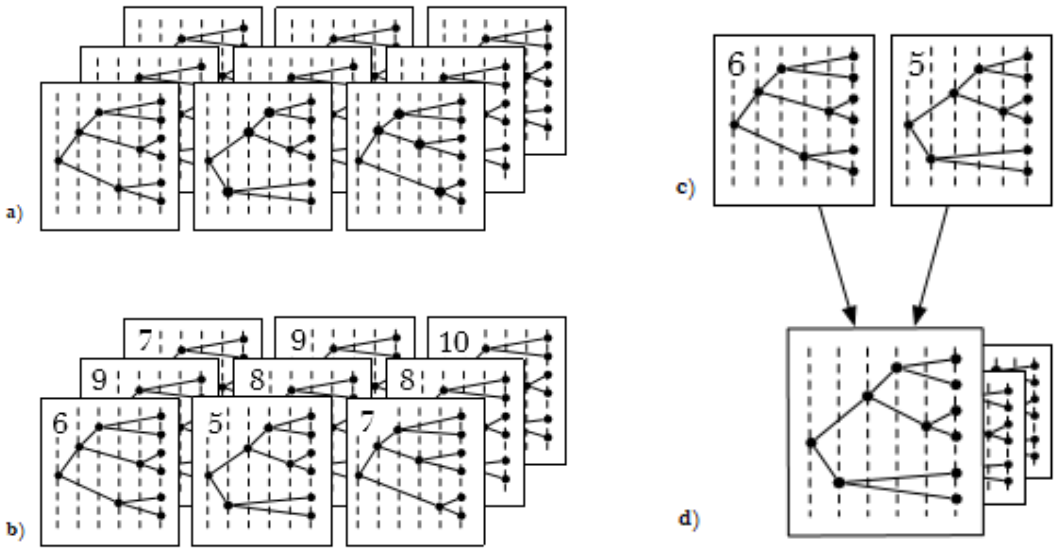
zato što apriorno pretpostavlja da je kospecijacija učestalija od drugih koevolucijskih događaja te interpretira podudarnost kao dokaz za kospecijaciju.



Slika 6. Princip analize poravnanjem, početna verzija. (a) Nepodudarni kladogrami domaćina i parazita. Paraziti 2 i 3 su monofiletski, a njihovi domaćini b i c parafiletski. (b) Usklađeno stablo koje objašnjava nepodudarnost stabala pod (a). Zatamnjeni kružići predstavljaju dijelove parazitskoga stabla koji nedostaju, bilo zbog greške u uzorkovanju ili izumiranja. Paraziti 1-4 smatraju se reliktima veće klade. (c) Plan konstruiranja usklađenoga stabla. Svaki čvor stabla parazita preslikava se na odgovarajući čvor u kladogramu domaćina. Duplikacija je potrebna na čvoru f zato što se dva čvora s parazitskoga stabla (6 i 7) preslikavaju na čvor f na stablu domaćina. (Preuzeto iz Page, 1993).

Novija verzija, TREEMAP 2, ima implementiranu „jungle“ metodu, algoritam koji omogućava brži pronalazak optimalne filogenetske rekonstrukcije jer u obzir uzima vremensku izvedivost svake rekonstrukcije, upravo kako bi se izbjeglo proučavanje neoptimalnih rekonstrukcija. Ipak, program je spor kada su u pitanju velika stabla (Charleston, 1998). Poslije su razvijene heurističke metode TARZAN i JANE. Heuristika je optimizacijska računska metoda koja ne garantira optimalno rješenje, nego se odriče optimalnosti u zamjenu za efikasnost. TARZAN, softver koji su razvili Merkle i Middendorf (2005), dopušta nesigurnost po pitanju starosti parazitskih čvorova povezujući svaki čvor s vremenskom zonom i odabire kaznu (engl. cost) svakoga događaja, ali ne garantira optimalnost rješenja i ponekad ne može pronaći rješenje čak i ako je samo jedno, ili ponudi rješenje koje biološki nema smisla, npr. rekonstrukcija zahtijeva da se specijacijski događaj x dogodi prije događaja y, ali i da se y dogodi prije x. JANE, koju su razvili Conow i sur. (2010), temelji se na genetičkim algoritmima. Genetički algoritam komputacijska je tehnika učinkovita u simulaciji evolucije s prirodnom selekcijom. Omogućava pronalazak dobrih rješenja teških komputacijskih problema predstavljajući moguća rješenja kao metaforičke organizme, a više njih tvori populaciju koja neće uključivati svaki mogući organizam zato što ih je uglavnom previše. Populacija sadrži relativno mali uzorak organizama i evoluira

tijekom vremena dok ne zadobije prikladne organizme (dobro rješenje). U ovom kontekstu, populacije se sastoje od nasumičnih poredaka (engl. orderings) specijacijskih događaja sa stabla domaćina (Sl. 7. a). Za svaki se poredak događaja na stablu domaćina, koristeći algoritam dinamičkoga programiranja, pronalazi najbolje rješenje za rekonstruiranje pripadajućega stabla parazita, a kazna najboljega rješenja je fitnes takvoga poretka (Sl. 7. b).



Slika 7. Koraci genetičkoga algoritma koji JANE koristi. (a) Genetički algoritam generira populaciju „organizama“, a svaki od njih predstavlja različit poredak specijacijskih događaja na stablu domaćina. (b) Brzo dinamičko programiranje koristi se za pronalazak najbolje rekonstrukcije stabla parazita za svaki poredak stabla domaćina. Kazna rekonstrukcije upotrebljava se kao fitnes toga poretka. U lijevome gornjem kutu dane su vrijednosti fitnesa. (c) dva poretka nasumično su odabrana, uz favoriziranje poredaka s nižom kaznom (boljim fitnesom). Potom se ovi poreci sparuju kako bi se konstruirao novi poredak koji sadrži neka svojstva od dva roditeljska poretka. Potomstvo se smješta u populaciju za sljedeću generaciju. (d) Roditeljski poreci vraćaju se u svoju populaciju, a proces sparivanja se ponavlja dok se ne konstruira nova populacija poredaka željene veličine. Ciklus se ponavlja od koraka (a) koristeći novu generaciju kao populaciju za sparivanja. (Preuzeto iz Libeskind-Hadas, 2010).

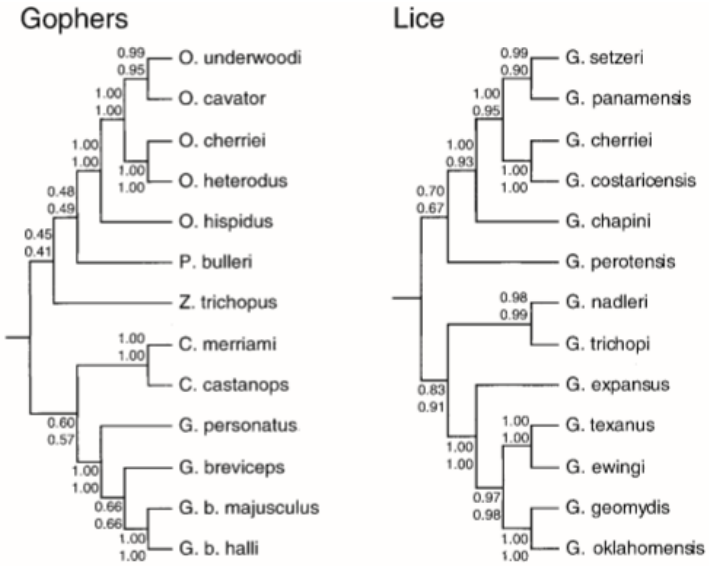
Nadalje, biraju se parovi poredaka specijacijskih događaja, a nasumični izbor preferira prikladnije poretke (s manjom kaznom) više od manje prikladnih (s većom kaznom), tj. preferiraju se poreci specijacijskih događaja na stablu domaćina koji će dozvoliti pronalazak boljih rješenja. Spareni poretci rezultiraju novim poretkom koji čuva poneko obilježje od oba roditeljska poretka,

s ciljem da za novonastali poredak specijacijskih događaja u stablu domaćina postoji još bolje rješenje (Sl. 7. c). Proces se ponavlja dok se ne izgradi populacija novih poredaka željene veličine (Sl. 7. d), nakon čega se sve ponavlja, s novodobivenom populacijom koja služi za sparivanje populacija. Naposlijetku bivaju predložena najbolja rješenja pronađena tijekom evolucijskoga procesa, u zadanome broju generacija (Libeskind-Hadas, 2010). JANE u obzir uzima vremensku nesigurnost filogenije domaćina bez znatnoga porasta u vremenu računanja i daje biološki razumna rješenja. Dakle, ima mogućnost definiranja vremena za čvorove domaćina, kao i za čvorove parazita te kazne različitih prebacivanja između domaćina razmatra odvojeno. Sve dosad navedene metode kospecijaciju smatraju hipotezom s najvećom štedljivosti (de Vienne i sur., 2013).

Prvu seriju metoda koje dopuštaju korisniku da pripiše kaznu svakom evolucijskom događaju (kospecijaciji, specijaciji uslijed prebacivanja između domaćina, duplikaciji i izumiranju) razvio je Ronquist (1995). Metode temeljene na kazni (engl. cost-based methods) pronalaze najštedljiviji scenarij minimizirajući ukupnu kaznu. Najpoznatija takva metoda implementirana je u TREEFITTER softver (Ronquist, 1995). TREEFITTER procjenjuje broj događaja svakoga tipa koji može objasniti uočenu kongruenciju između dviju filogenija. Potom svakome događaju pridružuje vjerojatnost, izračunatu permutacijama odsustava domaćina i/ili parazita u filogeniji. Dakle, softver pronalazi optimalan broj događaja svakoga tipa minimizirajući ukupnu kaznu rekonstrukcije, ali ne dopušta da kospecijacija ima veću kaznu nego prebacivanja između domaćina. Kazna svakoga događaja postavljena je od strane korisnika, a moguće su inkompatibilnosti u vremenu koje mogu dovesti do krivih zaključaka.

Sve opisane metode smatraju filogenije domaćina i parazita potpuno poznatima, s potpuno riješenim stablima, stoga su osjetljive na odabir drukčijih optimalnih stabala. Taj je problem savladan u Bayesian metodi koju su razvili Huelsenbeck i sur. (2000), koja za cilj ima utvrditi najvjerojatniji evolucijski scenarij na osnovi DNA sekvenci domaćina i parazita, radije nego na njihovim filogenijama. Bazirana je na dva jednostavna stohastička modela, jedan za specijacije uslijed prebacivanja između domaćina, a drugi za DNA supstitucije, koji se zajedno podvrgnu Bayesian analizi (de Vienne i sur., 2013). Za prebacivanja između domaćina pretpostavljeno je da se događaju konstantnom stopom tijekom cijele evolucijske povijesti domaćina i parazita. Gustoća posljedične vjerojatnosti (engl. posterior probability) parametara modela prebacivanja između domaćina procjenjuju se numerički koristeći MCMC metodu (Markov chain Monte Carlo).

Metoda generira gustoću vjerojatnosti broja prebacivanja između domaćina i stope prebacivanja između domaćina te pruža informacije o vjerojatnosti povezanosti određenoga prebacivanja između domaćina s određenim granama (Sl. 8.). Ima nekoliko prednosti pred ostalim metodama za analizu kospecijacije. Kao prvo, ne pretpostavlja da su filogenetska stabla domaćina i parazita potpuno točna; metoda tretira filogenije domaćina i parazita kao nasumične varijable i integrira ih. Druga prednost leži u stohastičkom modelu prebacivanja između domaćina i provođenju standardnih statističkih procjena parametara modela, što omogućava dobivanje intervala vjerodostojnosti za parametre i ispitivanje drugih, možda manje vjerojatnih, rekonstrukcija prebacivanja između domaćina. Ipak, metoda ne uključuje nekoliko važnih bioloških procesa: duplikacije i izumiranja parazita koja ne prate specijacije i izumiranja u domaćinima, čime bi se omogućilo udruživanje više parazita s jednim domaćinom, te izumiranja domaćina i uzorkovanje, tj. domaćini koji nedostaju mogu služiti kao izvor za prebacivanje između domaćina (Huelsenbeck i sur., 2000).



Slika 8. Najvjerojatnija stabla 13 vrsta glodavaca i njihovih ektoparazitskih uši (isključene su vrste koje su imale više od jedne vrste uši udružene s vrstama glodavaca). Brojevi na unutarnjim granama predstavljaju posljedičnu vrijednost točnosti grananja. Gornji brojevi dobiveni su predstavljenim modelom prebacivanja između domaćina koji povezuje podatke dviju skupina i time neka parazitska stabla a priori čini vjerojatnijima od drugih. Donji brojevi dobiveni su neovisnim analiziranjem sekvenci glodavaca i uši. (Preuzeto iz Huelsenbeck i sur., 2000.)

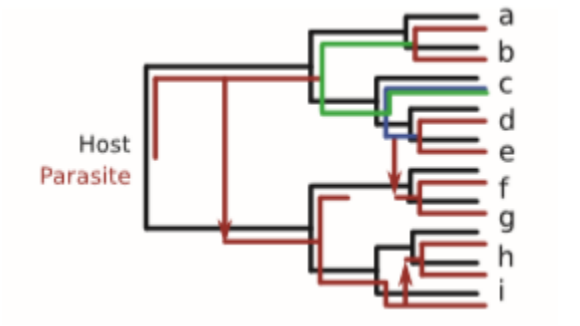
5.3. METODE TEMELJENE NA TOPOLOGIJI ILI UDALJENOSTI

Drugi set metoda zasniva se na statističkim testovima podudarnosti među parazitima i domaćina, odnosno ove metode ne smatraju visoku razinu podudarnosti izravnim dokazom kospecijacije, nego uspoređuju vjerojatnost opažanja određene razine podudarnosti između dva stabla, s očekivanjima zasnovanima na neovisnosti između stabala. Povezivanjem dobivenih rezultata sa zajedničkom povijesti interagirajućih linija moguće je dobiti *a posteriori* interpretaciju koja nije sastavni dio testa. Ovaj se pristup može smatrati manje pristranim od pristupa u metodama temeljenima na događaju.

Ovisno o testiranoj nul-hipotezi (sličnost ili neovisnost; Huelsenbeck i sur., 2003) i podatcima korištenima za testiranje (stabla, matrice udaljenosti ili sama poravnanja sekvenci; Light i Hafner, 2008), metode su podijeljene u različite razrede. Testovi neovisnosti temelje se na usporedbama topoloških ili genetskih udaljenosti fokusne interakcije domaćina i parazita s distribucijom udaljenosti izračunatom iz velikoga broja nasumično generiranih stabala. Ako je promatrana udaljenost značajno manja nego što je slučajno očekivano, interakcija se smatra značajno podudarnom. Sličan je princip u testu implementiranom u TREEMAP 1. Jedna od slabosti ovih metoda velik je broj nasumičnih stabala koja moraju biti *de novo* generirana za svaku novu usporedbu stabala. Test neovisnosti stabla (I_{cong} indeks, de Vienne i sur., 2007) predložen je kako bi se savladao ovaj problem.

Testovi neovisnosti koriste se za procjenu podudarnosti u specijacijskoj prošlosti domaćina i parazita. Ponovljeni kospecijacijski događaji impliciraju simultanu pojavnost specijacijskih događaja (vremenska podudarnost), a samim time i proporcionalnu duljinu grana i jednako datiranje čvorova uspoređivanih filogenija. Jedna od metoda (Hafner i sur., 1994) ispituje jesu li dvije vrste nakupile sličan broj genetskih razlika. Ulazni podatci uključuju interakcije vrsta domaćina i parazita te poravnanja jednoga specifičnoga lokusa (ili nekoliko ulančanih lokusa). Poravnanja se koriste za izračun matrica udaljenosti. Potom se značaj korelacije između dviju matrica jednake veličine procjenjuje Mantel testom. Budući da će jednaka veličina matrica zahtijevati eliminaciju određenih domaćina ili parazita u slučaju višestruke distribucije parazita, preporučuju se iterativni testovi (sa zamjenama) kako bi se statistički proučile sve genetske udaljenosti između parazit-domaćin parova (Hafner i Nadler, 1988., Hafner i sur., 1994). Druga metoda uspoređuje matrice duljine grana stabala domaćina i parazita, a ako su dostupni

molekularni satovi i za domaćina i za parazita, moguće je usporediti procijenjenu apsolutnu starost čvorova. Određivanje identične starosti svakoga čvora zapravo je jedini način za pouzdano utvrđivanje kospecijacije, iako jednaka relativna vremena divergencije, izvedena iz proporcionalnih duljina grana, mogu postojati u nekim interakcijama domaćina i parazita kojima specijacijsko vrijeme nije jednako, npr. kada se parazit preferencijalno prebaci na usko povezanoga domaćina i vrijeme koje je bilo potrebno za specijaciju bude proporcionalno filogenetskoj udaljenosti između inicijalnoga i novoga domaćina (Charleston i Robertson, 2002). Nadalje, Mantel testovi objašnjavaju statističku neovisnost u matricama, ali ne i filogenetsku neovisnost (Sl. 9.), tj. podatci za divergenciju na starijim čvorovima uključuju iste informacije kao podatci za divergenciju na recentnijim čvorovima duž istih grana. Dakle, sve točke u matricama udaljenosti filogenetski su neovisne, što čini Mantel test nepogodnim za upotrebu.



Slika 9. Prikaz problema filogenetske neovisnosti. Filogenetska udaljenost između a i c nije neovisna od filogenetske udaljenosti između b i c jer velik dio ovih udaljenosti dijeli evolucijsku prošlost (zeleno). Slično tomu, udaljenosti između c i d te c i e broje se kao dvije udaljenosti između c i zajedničkoga pretka d i e (plavo). Takva pseudoreplikacija može podići razinu podudarnosti. (Preuzeto iz de Vienne i sur., 2013).

PARAFIT (Legendre i sur., 2002) testira neovisnost genetskih i patrističkih udaljenosti domaćina i simbionta. Patrističke udaljenosti izračunate su sumiranjem duljine grana u procijenjenom stablu pridružujući svaki par taksona. Prednosti ove metode su mogućnost rješavanja slučajeva u kojima je više simbionata povezano s jednim domaćinom ili više domaćina s jednim simbiontom te procjena doprinosa pojedine interakcije u ukupnoj statistici podudarnosti. Sekvence i/ili stablo domaćina te sekvence i/ili stablo simbionta pretvoreni su u matrice udaljenosti. Zbroj kvadrata udaljenosti daje vrijednost sveukupne podudarnosti između stabala

(ParafitGlobal), koja se uspoređuje s raspodjelom ParafitGlobal vrijednosti dobivenom permutacijama za procjenu značajnosti. Doprinos svake pojedine interakcije na ukupnu podudarnost između stabala procijenjena je uklanjanjem jedne po jedne interakcije. PARAFIT također ima problem filogenetske neovisnosti.

Hommola i sur. (2009) razvili su novu permutacijsku metodu za procjenu neovisnosti filogenija domaćina i parazita. Test se zasniva na izračunu Pearsonova korelacijskog koeficijenta između udaljenosti domaćina i udaljenosti parazita, uzimajući u obzir sve parove interagirajućih domaćina i parazita. Potom se korelacijski koeficijent uspoređuje s koeficijentom dobivenim nasumičnim permutacijama podataka, zadržavajući uočene interakcijske veze. Ova je metoda generalizacija Mantel testa, omogućivši testiranje podataka u odsutnosti jedan na jedan korespondencije između domaćina i parazita. Metoda je snažnija od PARAFIT-a, s preciznijim P-vrijednostima, a superiornost može biti pripisana znatno većem broju izvedenih permutacija (100 000 naspram 99 kod PARAFIT-a).

Schardl i sur. (2008) predložili su modifikaciju za programe poput PARAFIT-a, uzevši u obzir neovisnost parova vrsti na istoj grani, a metoda je slična metodi filogenetskih neovisnih kontrasta (PIC, engl. phylogenetic independent contrasts) koju je predložio Felsenstein (1985). Algoritam MRCAlink (engl. Most Recent Common Ancestor) identificira filogenetski neovisne parove između stabala domaćina i parazita, a onda uspoređuje reducirane matrice domaćina i parazita.

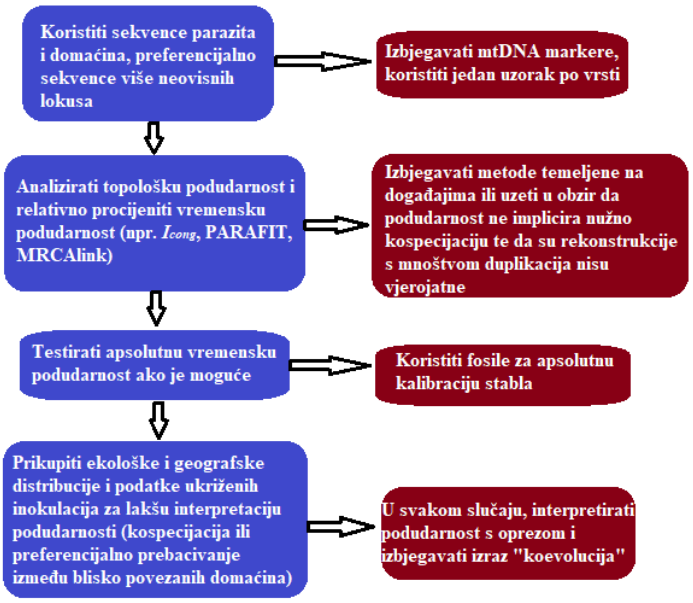
TREEMAP se ubraja i u metode bazirane na topologiji, a zajedno s metodama navedenim u ovom potpoglavlju bazira se na testiranju neovisnosti između stabala ili poravnatih sekvenci. Metode koje se temelje na sličnosti ili istovjetnosti su metoda najveće vjerojatnosti (ML, engl. maximum likelihood), Bayesian metoda (koja spada i u metode temeljene na događaju; Huelsenbeck i sur., 1997) i druga metoda najveće vjerojatnosti (Huelsenbeck i sur., 2003). Ove metode procjenjuju vjerojatnost opažanja varijacija u DNA sekvencama uz pretpostavku da su njihove filogenije podudarne. Prednosti ovih metoda su što ne smatraju stabla potpuno poznatima, ulazni podatci su poravnate sekvence, a potonja ispituje i vremensku podudarnost (nul-hipoteza je da su se specijacije dogodile u isto vrijeme).

5.4. PROBLEMI KORIŠTENJA KOFILOGENETSKIH METODA

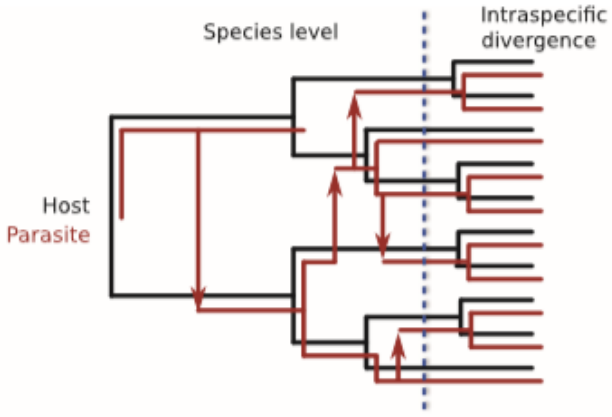
Sve opisane metode imaju svoje nedostatke. Problemi uključuju testiranje podudarnosti na temelju procijenjenih filogenija bez uzimanja nesigurnosti podataka u obzir (TREEMAP, TREEFITTER, I_{cong} zahtijevaju potpuna stabla), filogenetsku neovisnost (TREEMAP, TREEFITTER, PARAFIT), testiranje temeljeno na topologiji uz zanemarivanje duljina grana (I_{cong} i Huelsenbeckove metode) ili podcjenjivanje visoke vjerojatnosti specijacija uslijed prebacivanja između domaćina (TREEMAP). Ključan je problem zapravo kriva interpretacija rezultata ovih metoda, osobito procjena da je filogenetska podudarnost rezultat česte kospecijacije između parazita i domaćina, a nepodudarnost rezultat specijacija uslijed prebacivanja između domaćina, izumiranja, duplikacija ili drugih evolucijskih scenarija. Jedna od najvećih zamki metoda temeljenih na događaju je to što kospecijacijski događaji mogu biti zaključeni samo pretpostavljajući nerazumno velik broj duplikacija i sortirajućih događaja (npr. Percy i sur., 2004: herbivorni insekti i biljke (Genistae), 29 duplikacija i 220 sortirajućih događaja). PARAFIT pak nije pokazao značajnost i starost čvorova nije išla u prilog kospecijaciji. Dakle, velik broj zaključenih kospecijacijskih događaja očito nije bio točan (Lanterbecq i sur., 2010). Zadane vrijednosti kazni za kospecijaciju, prebacivanje između domaćina, duplikaciju i sortirajuće događaje u analizama poravnanja nisu pravi odraz stvarnih vjerojatnosti ovih događaja. Ako se izumiranje parazita dogodi u domaćinskoj liniji, a potom domaćinska linija bude rekolonizirana kroz prebacivanje između domaćina, rekonstrukcije dobivene metodama temeljenima na događaju predložit će pojavu duplikacija u dalekoj prošlosti koje prati mnogo događaja izumiranja. Dakle, sklonost izbjegavanja prebacivanja između domaćina čini nužnim uključivanje više evolucijskih događaja za poravnavanje dviju filogenija (de Vienne i sur., 2013). Eksperimentalna i teorijska istraživanja pokazala su da podudarnost može biti rezultat preferencijalnoga prebacivanja između blisko povezanih domaćina i pod određenim uvjetima vremenskoga zaostatka između prebacivanja i specijacije, što naglašava važnost ispitivanja vremenske podudarnosti (Sl. 10.) jer samo se na taj način može potvrditi pojavnost kospecijacijskih događaja (Charleston i Robertson, 2002).

Još jedna zamka kofilogenetskih istraživanja je neuspješnost točnoga razgraničenja vrsti što može dovesti do povećanja podudarnosti kada su generalisti prisutni na blisko povezanim domaćinima. Razgraničenje parazitskih vrsta nije jednostavno i generalisti često inficiraju blisko

povezane domaćine, stoga podudarni intraspecijski čvorovi lažno povećavaju broj zaključaka o kospecijacijskim događajima (Sl. 11.)



Slika 10. Prikaz preporučenoga pristupa za izbjegavanje pogreški kod zaključivanja o interakcijama između domaćina i parazita. (Prilagođeno prema de Vienne i sur., 2013.)



Slika 11. Prikaz problema uzorkovanja više jedinki po kriptičnoj vrsti. Intraspecijski čvorovi povećavaju podudarnost, ali ne predstavljaju kospecijaciju, nego divergenciju unutar vrste. (Preuzeto iz de Vienne i sur., 2013.)

Česta upotreba filogenija temeljenih na mtDNA također je problem kofilogenetskih istraživanja. Jedinstveni marker ne može biti pouzdano korišten za rekonstruiranje filogenija vrsta, što se naročito odnosi na mtDNA koja je sklonija introgresiji nego jezgrina DNA (Coyne i Orr, 2004) i može biti podložna snažnome selektivnom pritisku i niskim stopama rekombinacije (Balloux, 2010). Preporučeni pristup za proučavanje kospecijacije i izbjegavanje opisanih problema prikazan je na Slici 10.

6. LITERATURA

Balloux, F., 2010: The worm in the fruit of the mitochondrial DNA tree. *Heredity* **104**, 419-420

Barker, S. C., 1994: Phylogeny and classification, origins, and evolution of host associations of lice. *International Journal of Parasitology* **24**, 1285-1291

Brooks, D. R., McLennan, D. A., 1991: *Phylogeny, Ecology, and Behavior*. Chicago University Press, Chicago, SAD

Brown, J. K. M., Tellier, A., 2011: Plant–parasite coevolution: bridging the gap between genetics and ecology. *Annual Review of Phytopathology* **49**, 345–367

Bush, G. L., Butlin, R. K., 2004: Sympatric Speciation in Insects. U: Adaptive Speciation. Eds. U. Dieckmann, M. Doebeli, J. A. J. Metz, D. Tautz. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 229-248

Buckling, A., Rainey, P. B., 2002: The role of parasites in sympatric and allopatric host diversification. *Nature* **420,** 496-499

de Castro, F., Bolker, B. M., 2005: Parasite establishment and host extinction in model communities. *Oikos* **111**, 501-513

Charleston, M. A., Robertson, D. L., 2002: Preferential host switching by primate lentiviruses can account for phylogenetic similarity with the primate phylogeny. *Systematic Biology* **51**, 528-535.

Charleston, M. A., 1998: Jungles: a new solution to the host/parasite phylogeny reconciliation problem. *Mathematical Biosciences* **149**, 191-223

Clayton, D. H., Moore, J., 1997: Introduction. U: Host - parasite evolution, general principles and avian models. Eds. D. H., Clayton, J. Moore, Oxford University Press Inc., New York, SAD, pp. 1-7

Clayton, D.H., Price, R. D., Page, R. D. M., 1996: Revision of Dennyus (Collodennyus) lice (Phthiraptera: Menoponidae) from swiftlets, with descriptions of new taxa and a comparison of host–parasite relationships. *Systematic Entomology* **21**, 179-204

Conow, C., Fielder, D., Ovadia, Y., Libeskind-Hadas, R., 2010: Jane: a new tool for the cophylogeny reconstruction problem. *Algorithms for Molecular Biology* **5**, 16

Coyne, J. A., Orr, H. A., 2004: *Speciation*. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates

Dawkins, R., Krebs, J. R., 1979: Arms races between and within species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **205**, 489-511

Dimcheff, D. E., Drovetski, S. V., Krishnan, M., Mindell, D. P., 2000: Cospeciation and horizontal transmission of avian sarcoma and leukosis virus *gag* genes in galliform birds. *Journal of Virology* **74** (9), 3984-3995

Dres, M., Mallet, J., 2002: Host races in plant – feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* **357**, 471-492

Ebert, D., 1998: Evolution – experimental evolution of parasites. *Science* **282**, 1432-1435

Ehrlich, P. R. i Raven, P. H., 1964: Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* **18**, 586-608

Fahrenholz, H., 1913: Ectoparasiten und abstammungslehre. *Zoologischer Anzeiger* **41,** 371-374

Farrell, B. D. i Mitter, C., 1998: The timing of insect/plant diversification: might *Tetraopes* (Coleoptera: Cerambycidae) and *Asclepias* (Asclepiadaceae) have coevolved? *Biological Journal of the Linnean Society* **63**, 553-577

Farrell, B. D., Dussourd, D., Mitter, C., 1991: Escalation of plant defense: do latex/resin canals spur plant diversification? *American Naturalist* **138**: 881-900

Felsenstein, J., 1985: Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist* **125**, 1

Fox, L. R., 1988: Diffuse evolution within complex communities. *Ecology* **69**, 906-907

Garamszegi, L. Z., 2009: Patterns of co-speciation and host switching in primate malaria parasites. *Malaria Journal* **8**(1):110

Giraud, T., Gladieux, P., Gavrilets, S., 2010: Linking emerging fungal plant diseases and ecological speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **25**, 387-395

Giraud, T., Refregier, G., Le Gac, M., de Vienne, D. M., Hood, M. E., 2008: Speciation in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **45**, 791-802

Godfray, H. C. J., 1994: U: Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology. Eds. H. C. J. Godfray, Princeton University Press, Princeton, SAD

Hafner, M. S., Sudman, P. D., Villablanca, F. X., Spradling, T. A., Demastes, J. W., Nadler, S. A., 1994: Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. *Science* **265**, 1087-1090

Hafner, M.S., Nadler, S. A., 1990: Cospeciation in Host-Parasite Assemblages: Comparative Analysis of Rates of Evolution and Timing of Cospeciation Events. *Systematic Zoology* **39**(3), 192-204

Hafner, M. S., Nadler, S. A., 1988: Phylogenetic trees support the coevolution of parasites and their hosts. *Nature* **332**, 258-259

Hendry, A. P., Nosil, P., Rieseberg, L. H., 2007: The speed of ecological speciation. *Functional Ecology* **21**, 455-464

Hoberg, E. P, Brooks, D. R., Siegel-Causey, D., 1997: Host-parasite co-speciation: history, principles, and prospects. U: Host - parasite evolution, general principles and avian models. Eds. D. H., Clayton, J. Moore, Oxford University Press Inc., New York, SAD, pp. 212-235

Holub, E., 2001: The arms race is ancient history in Arabidopsis, the wildflower. *Nature Reviews Genetics* **2**, 516-527

Hommola, K., Smith, J. E., Qiu, Y., Gilks, W. R., 2009: A permutation test of host– parasite cospeciation. *Molecular Biology and Evolution* **26**, 1457-1468

Huelsenbeck, J.P., Rannala, B., Larget, B., 2003: A statistical perspective for reconstructing the history of host–parasite associations. U: Tangled trees. Eds. R. D. M. Page. The University of Chicago Press, Chicago, SAD, pp. 93-119

Huelsenbeck, J. P., Rannala, B., Larget, B., 2000: A Bayesian framework for the analysis of cospeciation. *Evolution* **54** (2), 352-364

Huelsenbeck, J. P., Rannala, B., Yang, Z., 1997: Statistical tests of host–parasite cospeciation. *Evolution* **51**, 410-419

Huyse, T., Poulin, R., Theron, A., 2005: Speciation in parasites: a population genetics approach. *Trends in Parasitology* **21**, 469-475

Itino, T., Davies, S. J., Tada, H., Hieda, Y., Inoguchi, M., Itioka, T., Yamane, S., Inoue T., 2001: Cospeciation of ants and plants. *Ecological Research* **16**, 787-793

Johnson, K. P., Clayton, D. H., 2004: Untangling Coevolutionary History. *Systematic Biology* **53** (1), 92-94

Johnson, K.P. i Clayton, D. H., 2003: Coevolutionary history of ecological replicates: Comparing phylogenies of wing and body lice to columbiform hosts. U: Tangled trees: Phylogeny, cospeciation, and coevolution. Ed. R. D. M. Page. Univ. Chicago Press, Chicago, pp. 262-286

Johnson, K. P., Williams, B. L., Drown, D. M., Adams, R. J. i D. H. Clayton, 2002: The population genetics of host specificity: Genetic differentiation in dove lice (Insecta: Phthiraptera). *Mol. Ecol*. **11**, 25-38

Kellogg, V. L., 1913. Distribution and species-forming of ecto-parasites. *American Naturalist* **47**, 129-158

Kimura, M., 1983: The neutral theory of molecular evolution. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, pp. 367

Lahti, D. C., 2005: Evolution of bird eggs in the absence of cuckoo parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**, 18057-18062

Lanterbecq, D., Rouse, G. W., Eeckhaut I., 2010: Evidence for cospeciation events in the host-symbiont system involving crinoids (Echinodermata) and their obligate associates, the myzostomids (Myzostomida, Annelida). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54** (2), 357-371

Legendre, P., Desdevises, Y., Bazin, E., 2002: A statistical test for host–parasite coevolution. *Systematic Biology* **51**, 217-234

Libeskind-Hadas, R., 2010: Figs, Wasps, Gophers, and Lice: A Computational Exploration of Coevolutoin. U: Bioinformatics for Biologists. Ed. P. Pevzner i R. Shamir, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 227-247

Light, J., Hafner, M., 2008: Codivergence in heteromyid rodents (Rodentia: Heteromyidae) and their sucking lice of the genus *Fahrenholzia* (Phthiraptera: Anoplura). *Systematic Biology* **57**, 449-465

Machado, C. A., Herre, E. A., McCafferty, S., Bermingham, E., 1996, Molecular phylogenies of fig pollinating and non-pollinating wasps and the implications for the origin and evolution of fig–fig wasp mutualism. *Journal of Biogeography* **23**, 531-542

Merkle, D., Middendorf, M., 2005: Reconstruction of the cophylogenetic history of related phylogenetic trees with divergence timing information. *Theory in Biosciences* **123**, 277-299

Mitter, C., Farrell, B., Futuyma, D. J., 1991: Phylogenetic studies of insect – plant interactions: Insights into the genesis of diversity. *Trends in Ecology and Evolution* **6**, 290-293

Moeller, A. H., Caro-Quintero, A., Mjungu, D., Georgiev, A. V., Lonsdorf, E. V., Muller, M. N., Pusey, A. E., Peeters, M., Hahn, B. H., Ochman, H., 2016: Cospeciation of gut microbiota with hominids. *Science* **353** (6297), 380-382

Nunn, C., Altizer, S., Sechrest, W., Jones, K., Barton, R., Gittleman, J., 2004: Parasites and the evolutionary diversification of primate clades. *American Naturalist* **164,** S90-S103

Page, R. D. M. i Hafner, M. S., 1996: Molecular phylogenies and host–parasite cospeciation: Gophers and lice as a model system. U: New Uses for New Phylogenies. Eds.: P. H. Harvey, A. J. L. Brown, J. M. Smith, S. Nee, Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 255-270

Page, R. D. M., 1994: Parallel phylogenies: reconstructing the history of host–parasite assemblages. *Cladistics* **10**, 155-173

Page, R. D. M., 1993: Parasites, phylogeny and cospeciation. *International Journal for Parasitology* **23**(4), 499-506

Page, R. D. M., 1990: Component analysis: a valiant failure? *Cladistics* **6**, 119-136

Percy, D.M, Page, R. D. M., Cronk, Q. C. B., 2004: Plant–insect interactions: double-dating associated insect and plant lineages reveals asynchronous radiations. *Systematic Biology* **53**, 120-127

Proctor, H., Owens, I., 2000: Mites and birds: diversity, parasitism and coevolution. *Trends in Ecology & Evolution* **15,** 358-364

Refrégier, G., Le Gac, M., Jabbour, F., Widmer, A., Hood, M., Yockteng, R., Shykoff, J., Giraud, T., 2008: Cophylogeny of the anther smut fungi and their caryophyllaceous hosts: prevalence of host shifts and importance of delimiting parasite species. *BMC Evolutionary Biology* **8**, 100

Rice, W. R., 1984: Disruptive selection on habitat preference and the evolution of reproductive isolation: a simulation study. *Evolution* **38**, 1251-1260

Ricklefs, R. E., Fallon, S. M., Bermingham E., 2004: Evolutionary Relationships, Cospeciation, and Host Switching in Avian Malaria Parasites. *Systematic Biology* **53**(1), 111-119

Ronquist, F., 1995: Reconstructing the history of host–parasite associations using generalised parsimony. *Cladistics* **11**, 73-89

Schardl, C. L., Craven, K.D., Speakman, S., Stromberg, A., Lindstrom, A., Yoshida, R., 2008: A novel test for host–symbiont codivergence indicates ancient origin of fungal endophytes in grasses. *Systematic Biology* **57**, 483-498

Szidat, L., 1940: Beiträge zum aubfau eines natürlichen systems der trematoden. I. Die entwicklung von echinocercaria choanophila u. Szidat zu cathaemasia hians und die ableitung der fasciolidae von den echinostomidae. *Zeitschrift für Parasitenkunde Parasitology Research* **11**, 239-283

Thompson, J. N., 1994: *The Coevolutionary Process*. Chicago: University of Chicago Press

Van Valen, L., 1973: A new evolutionary law. *Evolutionary Theory 1* **1**,1-30

de Vienne, D. M., Refrégier, G., López-Villavicencio, M., Tellier, A., Hood, M. E., Giraud, T., 2013: Cospeciation vs host-shift speciation: methods for testing, evidence from natural associations and relation to coevolution. *New Phytologist* **198**, 347-385

de Vienne, D. M., Giraud, T., Martin, O. C., 2007: A congruence index for testing topological similarity between trees. *Bioinformatics* **23**, 3119-3124

Weiblen, G. D., 2002: How to be a fig wasp. *Annual Review of Entomology* **47**, 299-330

Weiblen, G. D., 2001: Phylogenetic relationships of fig wasps pollinating functionally dioecious figs based on mitochondrial DNA sequences and morphology. *Systematic Biology* **50**, 243-267

Woolhouse, M. E. J., Webster, J. P., Domingo, E., Charlesworth, B., Levin, B. R., 2002: Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens andt heir hosts. *Nature Genetics* **32**, 569-577

Zuckerkandl, E., Pauling, L., 1965: Evolutionary divergence and convergence in proteins. U: Evolving genes and proteins. Eds. V. Bryson i H. J. Vogel. Academic Press, New York, SAD pp. 97-166

7. SAŽETAK

Mnogobrojni koevolucijski procesi doprinose diversifikaciji interagirajućih skupina organizama. Da bi se diversifikacija dogodila, koevolucija prvo mora potaknuti specijalizaciju simbionata koja potom može dovesti do specijacije. Jedan od mehanizama divergencije je kospecijacija, dugoročan proces istovremene specijacije dviju usko interagirajućih vrsta. Kospecijaciju ne treba poistovjećivati s koevolucijom, koja se može definirati kao neprestani recipročni selektivni pritisak i rezultirajuće mikroevolucijske promjene. Ostali mehanizmi su: prebacivanje između domaćina, duplikacije, sortirajući događaji i neuspjela specijacija.

Metode korištene u kofilogenetskim istraživanjima precjenjivale su pojavnost kospecijacije smatrajući topološku podudarnost izravnim dokazom kospecijacije. Kasnijim istraživanjima pokazano je da je specijacija uslijed prebacivanja između domaćina najčešći mehanizam specijacije, dok je kospecijacija prilično rijedak događaj. Kofilogenetske metode mogu se podijeliti u dva razreda. Metode temeljene na događaju rekonstruiraju evolucijsku povijest interagirajućih skupina i izvode zaključak o učestalosti različitih evolucijskih scenarija usporedbom filogenetskih stabala. Mogu se podijeliti na: Brooksovu analizu štedljivosti, analizu poravnanjem ukomponiranu u nekolicinu softvera, metode temeljene na kazni i Bayesian metodu. Problemi ovih metoda uključuju filogenetsku neovisnost, vremensku inkompatibilnost, kospecijacija se smatra najštedljivijom hipotezom i zaključena je pretpostavljajući ogroman broj duplikacija i sortirajućih događaja, a pojavnost specijacije uslijed prebacivanja između domaćina podcijenjena je. Metode temeljene na topologiji ili udaljenosti zasnivaju se na statističkim testovima podudarnosti između domaćina i parazita, a visoka razina podudarnosti ne smatra se izravnim dokazom kospecijacije. Dijelimo ih na testove neovisnosti, temeljene na usporedbama topološke ili genetske udaljenosti interakcije od interesa s distribucijom udaljenosti izračunatom iz velikoga broja nasumično generiranih stabala, te testove sličnosti, koji procjenjuju vjerojatnost uočavanja varijacija u DNA sekvencama domaćina i parazita pretpostavivši da su njihove filogenije podudarne. Ključan problem jest kriva interpretacija rezultata dobivenih kofilogenetskim metodama, naročito zaključak da je filogenetska podudarnost rezultat česte kospecijacije, a nepodudarnost ostalih koevolucijskih scenarija. Istraživanja su pokazala da podudarnost može biti rezultat preferencijalnoga prebacivanja između blisko povezanih domaćina te da je određivanje starosti čvorova ključno za pouzdano utvrđivanje kospecijacije.

8. SUMMARY

A variety of coevolutionary processes contribute to diversification of interacting taxa. For diversification to occur, coevolution must first foster the specialization of symbionts, which could then lead to speciation. One of the divergence mechanisms is cospeciation, long-term process of concurrent speciation of two closely interacting species. Coevolution should not be used as a synonym for cospeciation. Coevolution can be defined as a process of never-ending reciprocal selection and resulting micro-evolutionary changes. Coevolutionary mechanisms also include host-switching, duplications or intrahost speciations, sorting events and failure to speciate. Methods used in cophylogenetic studies overestimated the occurrence of cospeciation, considering topological congruence as a direct evidence of cospeciation. In later research it has been shown that host-shift speciation is the most common mechanism of speciation, while cospeciation is quite rare event. Cophylogenetic methods can be divided into two main classes. Event-based methods aim to reconstruct the evolutionary history of the interacting lineages and infer the frequency of different evolutionary scenarios by comparing phylogenetic trees. Event-based methods include: Brooks' Parsimony Analysis, reconciliation analyses implemented in several software, cost-based methods and Bayesian method. These methods have several disadvantages: phylogenetic independence, temporal incompatibility, cospeciation considered the most parsimonious hypothesis and could only be inferred while assuming large number of duplications and sorting events, and occurrence of host-shift speciation is underestimated. On the other hand, topology and distance-based methods are based on statistical tests for congruence between host and parasite phylogenies, and do not directly consider high levels of congruence to constitute proof of cospeciation. These methods include test of independence, based on comparisons of the topological or genetic distances of interaction of interest with a distribution of distances computed from a large number of randomly generated trees, and test of similarity or identity, which estimates the probability of observing the actual host and parasite DNA sequence variation assuming their phylogenies are congruent. A key issue is wrong interpretation of results obtained by cophylogenetic methods, specifically the conclusion that phylogenetic congruence results from frequent cospeciations, whereas incongruence results from other evolutionary scenarios. Studies have shown that congruence can result from preferential host-shift towards closely related hosts and that determination of identical ages for each node is crucial to establish cospeciation with confidence.