

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 geneti ar i evolucijski biolog Theodosius Grigorjevi Dobzhansky, poznat po svom doprinosu u formiranju moderne sinteze evolucije, napisao je izme u ostalog esej naslova "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 riješe 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 podru je istražuje, klju ne probleme s kojima se znanstvenici susre u unato pojavi novih metoda istraživanja i potencijalna rješenja.

Prema definiciji, filogenetika je znanstveno prou avanje odnosa me u 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, esto se koriste 18S rDNA i 28S rDNA kao djelomi ne ili cjelovite sekvence, te CO1 (citokrom oksidaza – 1) mitohondrijskog genoma (mtDNA). Uz kontrolu odre enih parametara, kona ni rezultat obrade podataka je filogenetsko stablo. Filogenetsko stablo tip je kladograma koji prikazuje evolucijske odnose izme u razli itih vrsta ili viših kategorija uz predo enje to ke grananja (zajedni kog pretka). Prema tipu, ono može biti aktivno stablo (ija duljina grana odgovara evolucijskoj udaljenosti - obi no u milijunima godina) ili ultrametrijsko stablo (kod kojeg su svi terminalni vrhovi jednako udaljeni od baze i ne odgovaraju vremenskoj skali) (Philippe i sur., 2011). Filogenija je, u užem smislu, evolucijska povijest taksonomskih skupina: razreda, porodica, rodova... (www.bioinformatika.hr). U ovom seminaru obra ena 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, me utim ovo podru je svojom kompleksnoš u nadilazi opseg seminara.

Povijesno gledajući, intenzivan rad na sistematici spužvi započeo je 80-ih godina 19. stoljeća. Mnogi su znanstvenici od početaka do današnjeg dana izdvajali spužve kao osobito problematno područje istraživanja. Isprva je to bilo zbog općenitih poteškoća u radu s podmorskim organizmima (otežan pristup uzorcima) i jednostavne morfologije organizama kroz koju je teško razlučiti ancestralne od odvedenih karakteristika. Današnji problemi vezani su za nove metode koje još uvijek nisu dale jedinstveno rješenje. Koljeno Porifera veliki je znanstveni izazov unatoč činjenici da su ovi organizmi slijepa grana relativno ranog odvajanja na evolucijskom stablu. Za spužve možemo reći da su graničnici slaba višestaničnost. Ona je nedvojbeno, ali organizacija i koordinacija ovog sustava je unatoč tome zadržana na razini stanice (složenije razine organizacije i koordinacije podrazumijevaju tkiva i organe). Izgleda da upravo u jednostavnosti leži korijen problema. Slikovito rećemo, znamo rasporediti vrste u „ladice“ (klade) pomoću etikete „boje“, ali spužve su u tom slučaju „šarene“. Još je veći izazov iscertati njihovu filogenijsku poveznicu. U modernoj filogeniji najviše problema predstavljaju odnosi Porifera i Metazoa, te unutar Porifera razred Demospongia (kremenorošnjače), stoga je na ova područja istraživanja u seminaru stavljen naglasak. Iako su Porifera samo segment živog svijeta, izazovi na koje se nailazi u tom području istraživanja primjenjivi su na druga područja bioloških istraživanja. Isto vrijedi i za metode koje će biti razrađene kroz seminar. Kroz seminar 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 omogućuju ga hoanocite (u većini spužvi protok doseže 100 L morske vode dnevno; Matonkin i sur., 1988). Hoanocite su specijalizirane bičaste 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 sjedilacki organizmi, a ličinke su im pokretne. Žive u moru uz iznimku porodice *Spongilidae* 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 građevine: askon, sikon i leukon koji odražavaju stupanj nabiranja stijenke tijela (za detaljniji morfološki opis - tipovi stanica i složenije strukture, konzultirati Matonkin 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 ni 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 građevin od silikatnih ili karbonatnih spikula ili proteina spongina. U jednoj spužvi mogu se naći i silicijske ili karbonatne spikule, (gotovo) nikad zajedno, jer proces dobivanja pojedinog tipa spikule zahtjeva drastične razlike u metabolizmu (iznimke su pronađene kod pojedinih vrsta razreda Demospongiae). Na karakteristikama spikula temelji (la) 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 taksonomsko 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 Astrotetraxonida i Sigmatotetraxonida.

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 - također homoplastična karakteristika što je dodatni nedostatak Dendyevog pristupa.

Skupine Hexactinellida i Calcispongia poivaju na vrstnim temeljima. Definirane krajem 19. st. prihvaćene 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 zastarjelom, 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 Laubenfelsovom revizijom iz 1936. godine. Sistematika u tom radu teži pojednostavljenju i donekle je ciljano odmaknuta od stvarnih filogenetskih odnosa prema u 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). Naglašavaju i kako su embriologija i citologija zanemarivane u istraživanju spužvi, ističe neophodnost multidisciplinarnog pristupa, te važnost raspolaganja svježim uzorcima i opisivanja staništa u kojem su životinje nastale (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 slučaju spužvi pridaje pažnju na načinu 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. st. 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 općenito povećala interes za podmorje,

omoguila je prouavanje spužvi *in situ* i istraživanje do tad teže dostupnih staništa (kao što su podvodne spilje). Ironično, 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 značajna 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 značaja 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., archeocite, 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 sličnoj morfološkoj i citološkoj formi. Najviše filogenetski korisnih informacija crpilo se iz analize hoanocita (tip stanice, tip komore, brojnost, volumen, prisutnost biflagelarnog rukavca, broj mikrovila na ovratniku...), egzopinakocita, apopilarnih stanica, ekstenzija u hoanocitne komore, staninjak i gustozona. 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 pokušavalo odgovoriti na neka filogenetska pitanja. Uz izolirane uspješne slučajeve, veliki je problem ovog pristupa mnogobrojnost i raznolikost endosimbionata spužvi (prvenstveno jednostanih algi - poput Zoocyanellae, Zooxantellae, Zoochlorellae, te bakterija). Endosimbionti su najčešće smješteni u mezenhimu u amebocitnim stanicama. Naime, obično je teško ili nemoguće sa sigurnošću razlučiti koji metaboliti potječu u isključivo od stanica 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 uspoređivanje 6 vrsta porodica Chalinidae i Callyspongiidae (Haplosclerida) S. Pomponi iz 1976. godine (prema Boury-Esnault, 2006). Ona je predložila stanice ne inkluzije sferulocita kao mogućnost razlikovanja ove dvije porodice. Sferulocite su stanice koje sudjeluju u eliminaciji metaboličkog otpada (Vacelet, 1967) i pohrani bioaktivnih tvari (Thompson i sur., 1983). Već i dio citoplazme kod njih zauzima sferičnu ili jajolika inkluziju sa spomenutim sadržajem. Ovakvih je primjera razlikovanja na razini porodice mnogo. Nicole Boury-Esnault kroz svoje radove naglašava i mogućnost u primjenu histoloških analiza mezohila uz dodatak opisa sustava kanala. Ovakav pristup još uvijek nije uključen u praksu, 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	financijski trošak	potrebno iskustvo
SPIKULE	+	-	-	-	+
SKELET	-	-	+	-	+
CITOLOGIJA	-	+	+	-	+
MOLEKULARNA BIOLOGIJA	+	+	+	+	+
KEMIJA	+	+	+	+	+

Problemi s kojima se znanstvenici susreću kada 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 slušajne 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, me u kojima je prvi i vjerojatno najistaknutiji van Soest s nizom radova nastalih između u 1984. i 1990. godine.

2.3. Okretanje molekularnoj filogeniji i neriješena pitanja

Molekularna filogenija se u istraživanju spužvi poela koristiti 1990-ih godina. Senzacija primjene novih metoda ponukala je spogiole 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 uspoređivale 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*. Također, klasično definirane *Demospongiae* nisu monofiletska skupina (Borchiellini i sur., 2004).

Parcijalno sekvenciranje rDNA, te odabiranje pojedinih domena kao relevantnih za istraživanje (C1, C2, D1-D7), ovisilo je o autorima i variralo kroz niz istraživanja. Posljedica je ovog neunificiranog pristupa nemogućnost uspoređivanja podataka. Velika količina sekvenci 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 svrstavanih 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 također jasno odbacuju klasičnu podjelu na podrazrede *Tetractinomorpha* i *Ceractinomorpha* prema Leviju 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 (obuhvaća Dictyoceratida i Dendroceratida)
2. Myxospongiae (obuhvaća 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 spužvi s jednom reverzijom na viviparnost (Boury-Esnault, 2006). Aktualni problemi unutar skupine Demospongiae koji traže rješenje su odnosi između u pretpostavljenih redova, polifilija Halichondrida, Axinellida i vjerojatno još nekih skupina, te parafilija Haplosclerida. Također, 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.

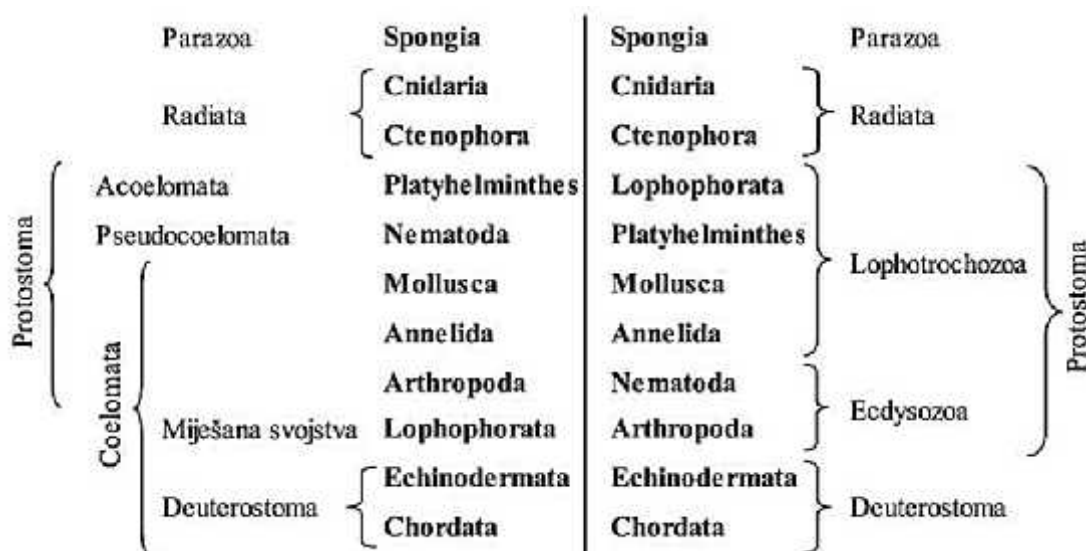
Philippe i sur. (2011) ulaze u problematiku samih metoda filogenomike. Problemi o kojima se bitno riječi najviše dolaze do izražaja kad se rekonstrukcija filogenije radi na vrstama koja se specijacija odvila u relativno kratkom vremenu ili kad je događaj specijacije evolucijski jako „star“. U prvom slučaju je količina filogenetskog signala mala, a u sljedećem su terminalne grane stabla jako dugačke (LBA eng. long branch attraction) i time je u nestalost sekvenci koje se kao identične homoplastičke ponavljaju drugdje velika. LBA je poteškoća u filogenomskom istraživanju dviju ili više linija koje imaju duge grane tj. dugu evolucijsku povijest. U tom slučaju dolazi do filogenetskog grupiranja dviju linija koje uopće nisu srodne. Philippe i sur. kao glavne probleme ističu u našu nemogućnost da detektiramo nefilogenetski signal (što se prvenstveno odnosi na višestruke supstitucije) i uključivanje sekvenci koje odstupaju od filogenije vrste. Slučajno uključivanje nefilogenetskog signala u istraživanje ima tri glavna korijena: netočnu identifikaciju ortologa (jedne od dvije ili više homolognih genskih sekvenci koje je moguće naći u različitim vrstama), zatim netočno ili pogrešno poravnavanje sekvenci i netočno ili pogrešno rekonstruiranje višestrukih supstitucija na određenoj poziciji u genomu. Ove pogreške kao posljedicu daju i netočne rezultate u izračunima statističke 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 označava poravnanje sekvenci koje su prošle višestruke supstitucije i stoga je njihova prividna filogenetska udaljenost mnogo manja od stvarne - rezultat lažne srodnosti. Bitno je u istraživanju uključiti sporoevoluirajuće vrste i vrlo bliske vanjske skupine. Povećanje količine podataka koji se koriste za rekonstrukciju filogenije (u vidu uključivanja većeg 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 količinu podataka prisutan nefilogenetski signal, mogu se generirati potpuno pogrešni rezultati s visokom statističkom potkrepljenošću. Nažalost, rješenje problema koje bi slijedilo ovu logiku nije jednostavno uključivanje većine podataka u analizu, već je u mnoštvu informacija potrebno pažljivo izdvojiti one koje nose filogenetski korisnu.

Općenito se može ustvrditi da uz korištenje 18S rDNA i 28S rDNA obe imaju određene pomake prema jasnijim rezultatima pokazuju usporedbe sekundarne strukture 28S rDNA, te uključivanje 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 razlika u pojedinim slučajevima, međutim, malo je vrsta za koje su trenutno dostupne ove sekvence. EF-1 koristi se za rješavanje filogenije Halichondrida, ali cjelovita sekvenca još nije dostupna za sve vrste. Međutim u spužvama bi bilo korisno odabrati modelni organizam. Levi predlaže vrstu *Ephydatia fluviatilis*, slatkovodnu spužvu koja se razmnožava isključivo 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. Unatoč tome, prva kompletna genomska sekvenca spužve sigurno je podatak koji je vrlo koristan i na koji će 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 i jedino da su se Porifera odvojile od glavne razvojne linije Metazoa, a evolucijski predstavljaju slijepu liniju. Tome u prilog idu i takve činjenice: postoji jedinstveni sustav kanala a koji nije homolog probavnom ni krvožilnom sustavu, 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 živčano i mišićno, 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.

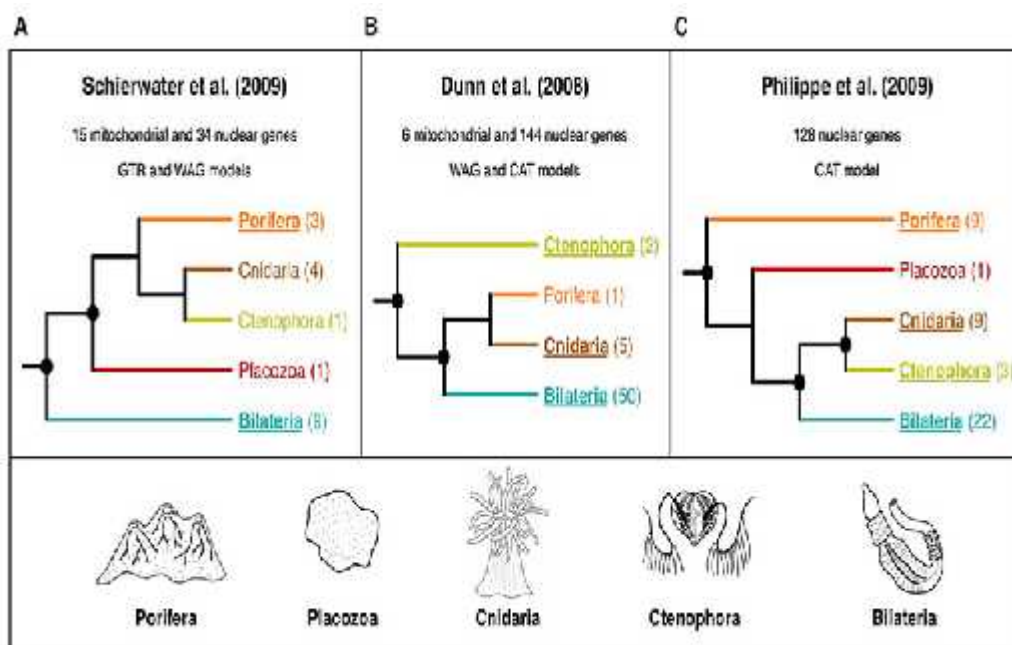


Slika 1. Usporedba podjele taksonomskih skupina životinja prema tradicionalnoj taksonomiji – lijevo i molekularnoj taksonomiji – desno (Raven i sur., 2005)

Dokazi koje o filogeniji Porifera nudi embriologija ne daju jednoznačan odgovor. Tako kod nekih *Calcarea* i *Demospongiae* gastrula nastaje na tipičan način, 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 bičaste stanice (Matonkin i sur., 1988).

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

Neka autapomorfna svojstva su zajednička Eumetazoa i Porifera. Kao primjeri često se navode višestaničnost u diploidnoj fazi životnog ciklusa, mejotička dioba spolnih stanica, oogeneza (jedna jajna stanica i tri polarna tijela iz jedne oocite), spermatogeneza (formacija četiri identična spermija iz jedne spermatocite), te sama građina spermija (Ax, 1995). Spomenute karakteristike ukazuju na jasnu odijeljenost Porifera i ostalih Metazoa od njima pretpostavljene najbližnje vanjske skupine - Choanoflagellata. Ove su tvrdnje potvrđene 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. Zaključak

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 često daju pretpostavke koje nije moguće jednoznačno interpretirati s potpunom sigurnošću. Međutim u 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 pretpostavljene ideje o rezultatu, te još jednom pomno razmotriti morfologiju vrste. U molekularnoj filogeniji spužvi za sada su se najkorisnijim sekvencama pokazale cjelovita 18S rDNA za rješavanje dubokih vorišta i cjelovita 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 ključne je važnosti analizirati iz višestrukih pozicija i koristiti i sve dostupne informacije (morfološke, citološke, embriološke i genetičke; Boury-Esnault, 2006). Od konačnog definiranja filogenetskog stabla svih živih organizama zasigurno nas ne 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. Matoni 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., Borchellini 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/ThesaurusCatSearch.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 razvitku novih metoda istraživanja.

Povijesno gledaju i, morfologija spikula te cjelokupnog skeleta imala je važnu ulogu u postavljanju prvotne sistematike spužvi, a njen se značaj ne smije zanemariti ni danas. Uspostavljanje filogenije isključivo pomoću morfologije nije bilo moguće. Nešto kasnije, citologija je donijela novitete u pristupu i jasne odgovore kod razlučivanja pojedinih porodica. Također je vrlo važna metoda kod istraživanja spužvi bez spikula. U pojedinim slučajevima, citologija se pokazala efikasnijom od molekularne filogenetike. Istraživanja sekundarnih metabolita pokazala su se problematičnima 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, međutim postoji još niz neriješenih pitanja osobito unutar skupine Demospongiae. Ipak, postoje poteškoće 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 najčešće proizlazi iz naše nemogućnosti da sa sigurnošću u detektiramo homoplaziju (tj. ortologe) i sekundaran gubitak karakteristika. Dio poteškoća bit će moguće riješiti kroz pažljiv odabir veće brojne gena s filogenetski važnom informacijom u ulazni set podataka za formiranje rodoslovnog stabla.

Probleme filogenije spužvi stoga nije moguće riješiti jedinstvenom metodom niti izoliranim setom informacija. Njima treba pristupiti multidisciplinarno uz racionalno korištenje što veće brojne 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.