Drzewa filogenetyczne i Horyzontalny Transfer Genów

dr hab. Grzegorz Góralski
Zakład Cytologii i Embriologii Roślin, Instytut Botaniki
Uniwersytet Jagielloński

Spis treści

Drzewa Filogenetyczne

Czym się zajmuje filogenetyka molekularna?

- **Filogenetyka** to nauka zajmująca się badaniem historii ewolucyjnej (filogenezy) organizmów lub ich grup z użyciem różnych metod w tym paleontologicznych, anatomii porównawczej, genetyki itd.
- **Filogenetyka molekularna**, jak wskazuje nazwa, skupia się na badaniach cząsteczek (DNA, białek) w celu rekonstrukcji filogenezy.
- W dalszej części mówiąc o filogenetyce będę miał na myśli głównie filogenetykę molekularną.
- Zwykle badania filogenetyczne zmierzają do stworzenia **drzewa filogenetycznego**, które w formie wizualnej pozwala przedstawić pokrewieństwa taksonów (zwykle gatunków) w badanej grupie, kolejność ich wyodrębniania oraz szacowane różnice genetyczne między nimi.

Etapy tworzenia drzew filogenetycznych

Proces tworzenia drzew filogenetycznych składa się z kilku etapów:

- Wybór rodzaju sekwencji odpowiedniej dla zestawu badanych taksonów (zmienność, dostępność sekwencji etc.)
- Zebranie sekwencji (sekwencje własne, bazy danych)
- Wybór algorytmów/oprogramowania do dopasowania sekwencji, budowy drzewek oraz ich wizualizacji
- Wstępne automatyczne dopasowanie sekwencji
- Ręczne poprawki: dokładniejsze dopasowanie sekwencji, przycięcie
- Wybranie modelu ewolucji molekularnej
- Budowanie drzewa
- Tworzenie filogramu/kladogramu
- Poprawki: wskazanie outgrupy, obracanie gałęzi, wybór typu drzewa itp.

Wybór sekwencji do badań

- Pierwszym krokiem w badaniach filogenetycznych jest wybór odpowiednich sekwencji do analiz.
- Tego typu analizy opierają się na założeniu, że jeśli porównuje się odpowiadające sobie sekwencje (na przykład konkretnego genu) to u organizmów bliżej ze sobą spokrewnionych powinny być one bardziej podobne do siebie niż w przypadku taksonów bardziej odległych ewolucyjnie.
- Wynika to z losowego gromadzenia mutacji - im więcej czasu minęło od rozdzielenia się w toku ewolucji badanych grup, tym więcej mutacji powinno się skumulować w DNA.
- Takie porównania sekwencji mają oczywiście sens tylko wtedy, gdy pochodzą one od wspólnego „molekularnego” przodka, czyli są **homologiczne**. Na tym jednak nie koniec.

- Sekwencje homologiczne można bowiem podzielić na dwie kategorie:
  - **ortologi**: sekwencje, które miały wspólnego przodka zaraz przed procesem specjacji
  - **paralogi**: sekwencje, które powstały w skutek duplikacji, czyli miały wspólnego przodka przed zduplikowaniem.
- Do badań filogenetycznych należy wybierać ortologi.
- Trzeba pamiętać, że samo podobieństwo badanych odcinków DNA jeszcze nie przesądza o ich homologiczności.
- Podobne sekwencje mogą bowiem powstać z niespokrewnionych sekwencji w wyniku dostosowania genów do pełnienia tych samych funkcji. Takie podobieństwo nazywamy **homoplazją** a geny **analogicznymi**.
- Oczywiście nie nadają się one do badań filogenetycznych.
- Kolejnym aspektem, który należy wziąć pod uwagę przy wyborze sekwencji jest ich tempo ewolucji.
- Różne sekwencje DNA mają różne tempo gromadzenia mutacji.
- Generalnie niekodujące sekwencje DNA zmieniają się w toku ewolucji dużo szybciej niż geny (choć istnieją także konserwatywne sekwencje niekodujące).
- Przyczyną tej różnicy nie jest różne tempo mutacji ale presja selekcyjna.
- Drobne zmiany fragmentów nieaktywnych DNA nie mają na ogół wpływu na organizm.
- Mutacje w ich obrębie mogą się więc kumulować w kolejnych pokoleniach praktycznie bez przeszkód.
- W przypadku sekwencji kodujących mutacje nawet pojedynczych nukleotydów, zwłaszcza jeśli są to delecje lub insercje (zbiorczo nazywane **indelami**) często wpływają negatywnie na funkcjonowanie produkowanych przez gen białek lub cząsteczek RNA, zmniejszając szanse lub uniemożliwiając nosicielowi mutacji przetrwanie i przekazanie mutacji następnym pokoleniom.
- Mutacje genów są więc w pewnym stopniu usuwane przez dobór.
- W jakim stopniu - to zależy od rodzaju genu.
- Geny różnią się „wrażliwością” na mutacje.
- W niektórych z nich niemal każda zmiana prowadzi do upośledzenia właściwego funkcjonowania kodowanego białka - są to **geny konserwatywne**.
- Do najbardziej skrajnych przykładów należą białka histonowe odpowiedzialne za strukturę chromatyny - nawet mała zmiana w ich strukturze ma niekorzystny wpływ na funkcjonowanie całego aparatu genetycznego, kluczowego dla działania komórki i organizmu.
- Inne geny wykazują większą tolerancję.

- Zatem im bardziej gen jest konserwatywny tym mniej różnic zauważymy między sekwencjami pochodzącymi między badanymi organizmami.
- Ważną konsekwencją omawianych różnic w tempie ewolucji jest to, że przy podejmowaniu decyzji którą sekwencję będzie się badać, należy wziąć pod uwagę stopień pokrewieństwa badanej grupy organizmów.
- Ogólna zasada jest taka, że im bliżej są one spokrewnione tym bardziej zmienne sekwencje należy wybrać.
- Tak więc na przykład przy badaniu gatunków w obrębie rodzaju praktyczniej jest wybrać sekwencję niekodującą lub mało konserwatywny gen, natomiast do analizy powiązań filogenetycznych pomiędzy przedstawicielami rodzin czy wyższych jednostek taksonomicznych raczej będą przydatne mniej zmienne geny.
- Jest to oczywiste w przypadku wyboru zbyt konserwatywnych genów.
- Jeśli wybierze się sekwencję o zbyt małej zmienności, może okazać się, że nie ma różnic między badanymi cząsteczkami u blisko spokrewnionych organizmów albo jest ich zbyt mało aby wyciągnąć sensowne wnioski.
- Mniej oczywiste są konsekwencje wyboru zbyt zmiennej sekwencji.
- Mogło by się wydawać, że nie powinno to szkodzić badaniom.
- W końcu im więcej mutacji tym więcej informacji którą można wykorzystać przy badaniach.
- Kłopot w tym, że także w tym wypadku nadmiar może być szkodliwy - zbyt wiele zmian może na tyle zatrzeć podobieństwa a także poprzednie mutacje, że sekwencje nie będą się nadawać do badań filogenetycznych.
- Przy wyborze rodzaju sekwencji do badań należy także wziąć pod uwagę aspekty praktyczne związane z sekwencjonowaniem DNA a także dostępność sekwencji w bazach danych (wtedy nie trzeba ich sekwencjonować we własnym zakresie).

Zbieranie sekwencji

- Sekwencje używane w badaniach pochodzą zazwyczaj z dwu źródeł:
  - badania własne
  - bazy danych
- Z punktu widzenia ekonomicznego i praktycznego im więcej sekwencji można pobrać z baz danych tym lepiej.
- Z drugiej strony, sekwencje pochodzące z własnych badań mogą wzbogacić dostępne dla innych badaczy bazy danych, co samo w sobie jest jakimś wkładem w naukę.

Internetowe bazy danych

Genbank i inne bazy sekwencji

- Trzy najbardziej znane, dostępne publicznie bazy danych sekwencji DNA (oraz RNA i białek) to:
  - **GenBank** utrzymywany przez National Center for Biotechnology Information (NCBI)

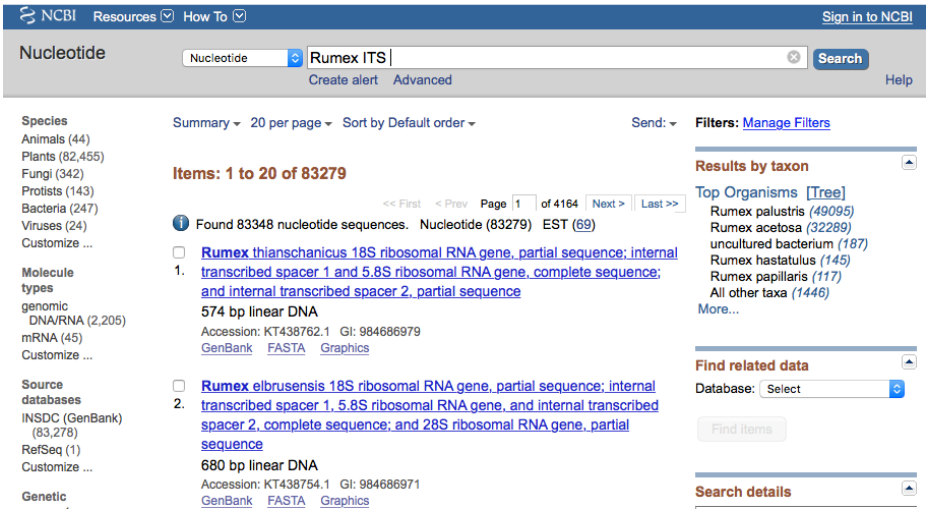


Fig. 1: Proste wyszukiwanie

  - DNA DataBank of Japan (DDBJ),
  - The European Nucleotide Archive (ENA)
- Wszystkie trzy bazy współpracują ze sobą w ramach (International Nucleotide Sequence Database Collaboration](http://insdc.org)(INSDC) synchronizując dane. W dalszej części kursu skupimy się na bazie GenBank.
- Baza GenBank pozwala wyszukiwać sekwencje na kilka sposobów.
- Zapewne najczęściej używana jest metoda zbliżona do wyszukiwarek internetowych, polegająca na wpisywaniu tekstu, np.
- nazw organizmów czy sekwencji, w okienko i przeglądaniu wyników wyszukiwania.
- Można przy tym wybierać spośród wielu dostępnych kategorii, m. in. sekwencje nukleotydów, genomy, taksony, białka.
- Przykładowo, jeśli chcemy wyszukać sekwencje ITS dla rodzaju *Rumex*, możemy wpisać `Rumex ITS`:

- Trzeba jednak uważać na kilka potencjalnych problemów.
- Po pierwsze przynajmniej obecnie, baza GenBank nie jest tak „domyślna” jak np. wyszukiwarka Google.
- Przykładowo jeśli zrobimy literówkę, i zamiast `Rumex ITS` wpiszemy `Ramex ITS` to nie ujrzymy podpowiedzi w rodzaju `Czy chodziło Ci o Rumex ITS?`, tylko baza nie zwróci żadnych wyników.

Blast

- GenBank i inne podobne do niego bazy sprawdzają się dobrze, gdy wyszukujemy sekwencje po ich nazwie, opisie czy nazwie taksonu.
- Ale często trzeba podejść do problemu z drugiej strony - mamy sekwencję nukleotydów i chcemy znaleźć inne, podobne do niej.
- Jest tak na przykład gdy nie wiemy czy odpowiada ona jakiemuś konkretnemu genowi albo gdy chcemy sprawdzić u jakiego organizmu występuje sekwencja najbardziej podobna (np. jeśli badamy odcinek DNA niewiadomego pochodzenia).
- W takich sytuacjach z pomocą przychodzi Blast (Basic Local Alignment Search Tool).

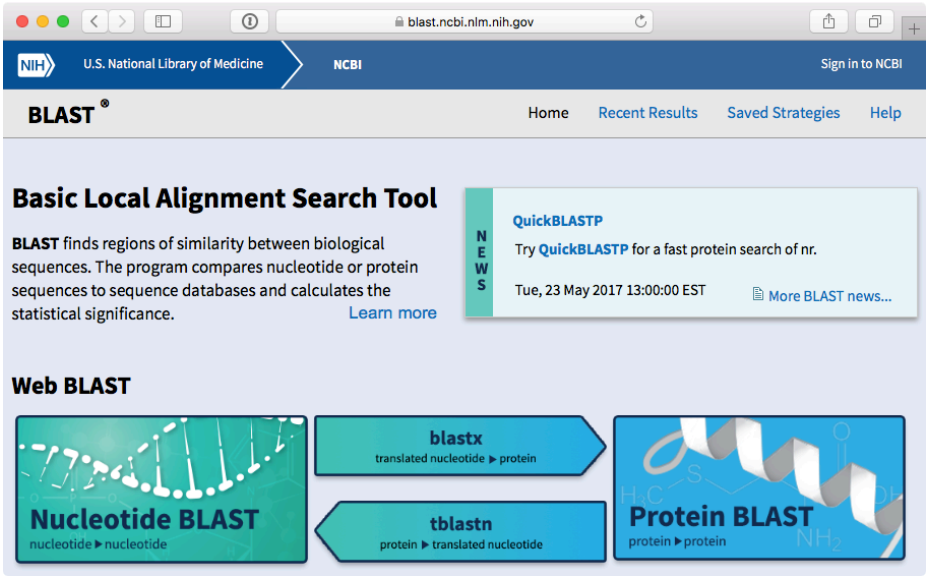


Fig. 2: Blast

- Jak widać serwis umożliwia wyszukiwanie sekwencji nukleotydowych a także białkowych.
- W najprostszym przypadku na stronie wyszukiwania w odpowiednim okienku wpisujemy szukaną sekwencję i wciskamy przycisk „Blast” na dole strony.
- Po dłuższej lub krótszej chwili oczekiwania wyświetlane są wyniki.
- Na górze strony mają one postać graficzną:
- Poniżej widnieje lista z krótką informacją na temat znalezionych sekwencji
- Pod nimi znajdują się dokładniejsze dane, schematyczne przedstawienie przyrównania sekwencji szukanej i znalezionej a także odsyłacze prowadzące do dalszych informacji dotyczących sekwencji w bazie GenBank.

Zbieranie sekwencji

- Do badań filogenetycznych sekwencje zapisuje się zwykle w plikach tekstowych w formacie **FASTA**.
- Zapis danych w pliku tekstowym ma wiele zalet.
- Może być edytowany w dowolnym edytorze tekstu (np. Vim, Emacs, Notepad++, Atom, TextMate, Jed, Pico), a także łatwo używać do pracy z nimi licznych dostępnych w systemach Uniksowych (np. w Linuksie) narzędzi ułatwiających na przykład wyciąganie z nich konkretnych danych.
- Uwaga: Word NIE jest edytorem tekstu, plik zapisany w formacie Worda NIE jest plikiem tekstowym.
- Plik zawierający sekwencje nukleotydów w formacie FASTA może wyglądąć np. tak:

```
>KC879635_Magnolia_stellata
CTGCTAACTCTCAGTTTGGTCCTACTTCTGGTTCATTTTGTTACTAAAAACGGAGGGGGAA
ACTCAGTACCAAATGCTTGGCAATCCTTGGTAGAGCTTATTCATGATTTCGTGCCGAACCC
GGTAAACGAACAAATAGGTGGTCTTTCCGGAAATGTTCAACAAAAGTTTTCCCCTCGCATC
```

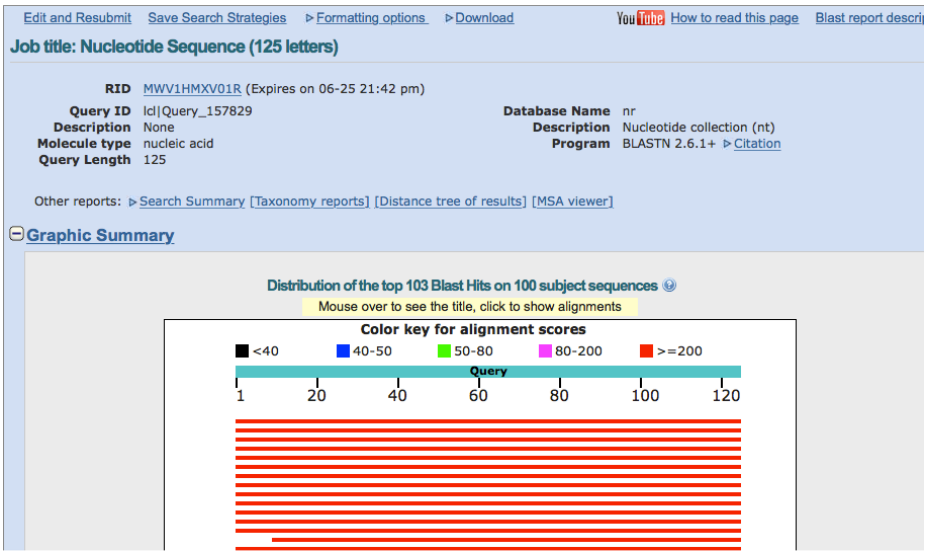


Fig. 3: Blast - wyniki graficzne

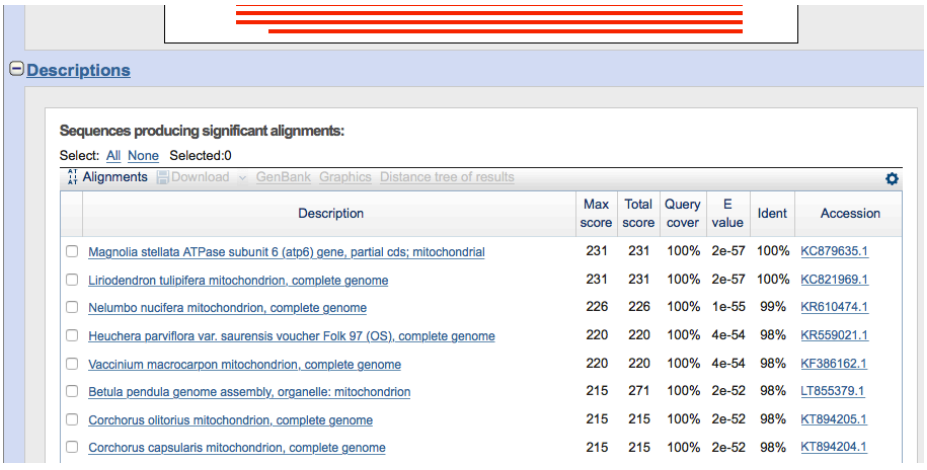


Fig. 4: Blast - wyniki tekstowe

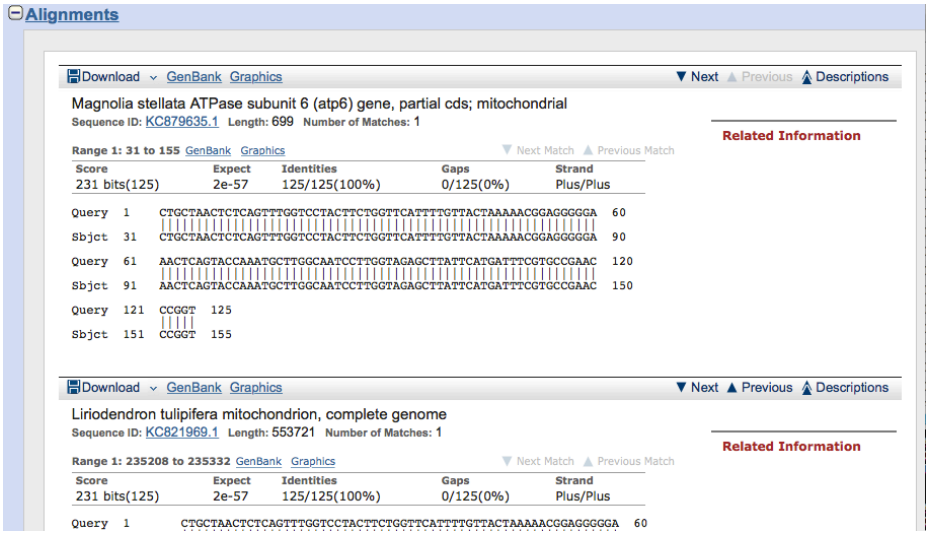


Fig. 5: Blast - wyniki szczegółowe

```
TCGGTCACTTCTACTTTTTCGTTATTTCGTAATCCCCAGGGTATGATACCTTATAGCTTCA
CAGTCACAAGTCATTTTCTCATTACTTTGGGTCTCTCATTTCCGATTTTTATTGGCATTAC
TATAGTGGGATTTCAAAGAAATGGGCTTCATTTTTTAAGCATCTCATTACCCGCAGGAGTC
CCACTGCCGTTAGCACCTTTTTTAGTACTCCTTGAGCTAATCCCTCATTGTTTTCGCGCAT
TAAGCTCAGGAATACGTTTATTTGCTAATATGATGGCCGGTCATAGTTCAGTAAAGATTTT
AAGTGGGTCCGCTTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTTTATTTCATAGGAGATCCT
GGTCCTTTATTTATAGTTCTTGCATTAACCGGTCCGGAATTAGGTGTAGCTATATCACAAG
CTCATGTTTCTACGATCTCAATCTGTATTTAC
>AF095276_Solanum_tuberosum
CTACTAACTCTCAGTTTGGTCCTACTTTTGGTTTATTTTGTTACTAAAAAGGGAGGAGGAA
ACTCAGTACCAAATGCTTGGCAATCCTTGGTAGAGCTTATTTATGATTTCGTGCTGAACCC
GGTAAACGAACAAATAGGTGGTCTTTCCGGAAATGTTAAACAAAAGTTTTCCCCTCGCATC
TCGGTCACTTTTACTTTTTCGTTATTTTGTAATCCCCAGGGTATGATACCTTATAGCTTCA
CAGTTACAAGTCATTTTCTCATTACTTTGGGTCTCTCATTTTCTATTTTTATTGGCATTAC
TATAGTGGGATTTCAAAAAAATGGGCTTCATTTTTTAAGCTTCTTATTACCCGCGGGAGTC
CCGCTGCCATTAGCACCTTTTTTAGTACTCCTTGAGCTAATCCCTTATTGTTTTCGAGCAT
TAAGCTCAGGAATACGTTTATTTGCTAATATGATGGCCGGTCATAGTTCAGTAAAGATTTT
AAGTGGGTTCGCTTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTCTATTTCATAGGGGATCTT
GGTCCTTTATTTATAGTTCTTGCATTAACCGGTCTGGAATTAGGTGTAGCTATATCACAAG
CTCATGTTTCTACGATCTTAATCTGTATTTAC
. . . .
```

- Każda sekwencja nukleotydów poprzedzona jest linią zaczynającą się znakiem >.
- Po tym znaku powinien znajdować się opis sekwencji.
- W powyższym przykładzie jest on dość lakoniczny, zawiera tylko numer dostępowy GenBank oraz nazwę taksonu, ale można tam zawrzeć też dużo więcej informacji.
- Tak na przykład wygląda nagłówek jednej z sekwencji pobranej z bazy GenBank:

```
>KX282989.1 Rumex vesicarius voucher EDNA15-0042869 ribulose-1,5-bisphosphate
carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast
```

- Po linii z opisem zapisana jest sekwencja nukleotydów lub aminokwasów.
- Może ona znajdować się w jednej lub wielu liniach, zasada jest taka, że wszystkie linie aż do następnego znaku > na początku linii powinny zawierać tylko i wyłącznie sekwencję.
- Niekoniecznie musi ona zawierać wyłącznie litery oznaczające nukleotydy lub aminokwasy, mogą tam także znajdować się dodatkowe oznaczenia np.
- niejednoznacznych lub nieznanych nukleotydów czy miejsc delecji.
- Stosuje się tu konwencję oznaczeń IUPAC.

Symbol IUPAC	**znaczenie**
A	Adenina
C	Cytozyna
G	Guanina
T (lub U)	Tymina (lub Uracyl)
R	A lub G
Y	C lub T
S	G lub C
W	A lub T
K	G lub T
M	A lub C
B	C lub G lub T
D	A lub G lub T
H	A lub C lub T
V	A or C or G
N	nieznany nukleotyd
- lub .	brak nukleotydu

- Czasem pomiędzy końcem sekwencji a nagłówkiem kolejnej dodawana jest pusta linia co może zwiększać czytelność dla człowieka.
- Format FASTA jest najprostszy i najpopularniejszy ale istnieją także inne, np. phylip, nexus, fastq.

Dopasowanie sekwencji

- Jak wspomniałem wcześniej sekwencje używane do badan filogenetycznych powinny być homologiczne.
- Dopasowanie wybranych sekwencji polega na tym aby ustawione w kolejnych liniach sekwencje miały w kolejnych kolumnach **homologiczne** względem siebie **nukleotydy**.
- Dopasowanie sekwencji składa się zwykle z dwu etapów:
  - Wstępne dopasowanie automatyczne dokonywane przez odpowiednie programy
  - Poprawki dokonywane przez człowieka
- Do wstępnego automatycznego wyrównania stosowanych jest wiele programów, które używają różnych algorytmów.
- W dodatku na sposób i efektywność działania każdego z nich duży wpływ mają parametry, które ustawia się przy ich uruchamianiu.

- Dlatego na pytania w rodzaju „*który program jest najlepszy do dopasowania sekwencji?*” nie ma dobrej odpowiedzi.
- Bardzo duże znaczenie ma tu rodzaj dopasowywanych sekwencji i ustawienia programów.
- Do najpopularniejszych programów tego typu należą m. in. `clustalw`, `muscle`, `mafft`, `probcons`.
- Jeśli porównywane sekwencje są stosunkowo mało zmienne i nie mają indeli (insercji i/lub delecji) automatyczne dopasowanie może nie wymagać ręcznych poprawek albo są one ograniczone do przycięcia końców sekwencji tak aby miały równą długość.
- Jeśli jednak tak nie jest,etap ręcznych poprawek może być długi i żmudny a końcowy efekt może być w większym lub mniejszym stopniu niepewny.
- Do pracy nad wstępnie wyrównanym zestawem sekwencji używać można edytorów tekstu, najlepiej z odpowiednimi skryptami/wtyczkami ułatwiającymi czytelne przedstawienie wyrównywanych sekwencji co związane jest z ich odpowiednim wyświetleniem oraz zwykle kolorowaniem.
- Częściej jednak, używa się w tym celu dedykowanych programów, które zwykle są wzbogacone w wiele dodatkowych funkcji ułatwiających pracę z plikami FASTA jak wyrównywanie sekwencji, zmiana na sekwencje odwrócone komplementarne, eksport do innych formatów a także dodatkowymi czynnościami jak wyszukiwanie sekwencji w bazach czy tworzenie drzewek filogenetycznych.
- Przykładami są programu AliView i Jalview:

Fig. 6: AliView - wyrównane sekwencje

Fig. 7: Jalview - wyrównane sekwencje

Wybór modelu ewolucji molekularnej

- Kolejnym etapem w drodze do stworzenia drzewa filogenetycznego powinien być wybór modelu ewolucji molekularnej.
- Modele ewolucji molekularnej a dokładniej modele substytucji (podstawień) nukleotydów, opisują w jaki sposób mogły ewoluować badane sekwencje.
- Jeśli chcemy rozwikłać pokrewieństwa ewolucyjne między badanymi organizmami, co jest zasadniczym celem badań filogenetycznym, powinniśmy dysponować jakąś metodą oceny odległości ewolucyjnych między nimi.
- Organizmy o mniejszej odległości będą uważane za bliżej spokrewnione między sobą niż taksony bardziej od siebie oddalone.
- Najprostszym sposobem, który przychodzi do głowy jest proste porównanie sekwencji i wyliczenie w ilu miejscach się one różnią - im więcej różnic tym większa odległość ewolucyjna.
- Tak obliczoną odległość możemy określić jako p i wyrazić ją w procentach lub w proporcji, wtedy mieszczą się w wartościach między 0 a 1.

- Na przykład jeśli dwie sekwencje o długości 100 miejsc będą się różnić w 17 miejscach, to p=17% lub p=0,17.
- Takie podejście co prawda pozwala ocenić różnice między sekwencjami ale niekoniecznie odzwierciedla rzeczywiste odległości ewolucyjne, zwłaszcza jeśli porównywane są sekwencje z dużą liczbą różnic.
- Niekoniecznie jest to intuicyjnie oczywiste ale wynika to ze sposobu w jaki zmieniają się nici DNA w czasie.
- Rozważmy hipotetyczną ewolucję dwu sekwencji, przedstawioną na poniższym rysunku:

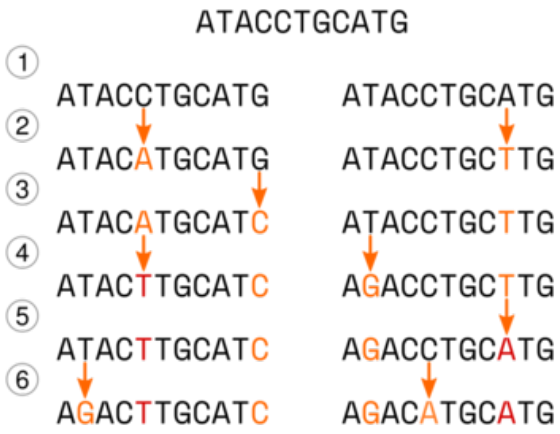


Fig. 8: Ewolucja sekwencji

Początkowo wygląda ona tak `ATACCTGCATG`.

(1) • Dochodzi do specjacji, powstają dwa gatunki, sekwencje są na początku identyczne, ale dalej ewoluują niezależnie od siebie

(2) • W obu sekwencjach dochodzi do mutacji (C->A, A-T).

(3) • W lewej sekwencji ostatni nukleotyd mutuje (G->C).

(4) • W lewej sekwencji piąty nukleotyd, który już wcześniej mutował, ponownie zmienia się (A->T), w prawej sekwencji w drugiej pozycji także dochodzi do substytucji (T->G).

(5) • W prawej sekwencji doszło do substytucji (T->A).

(6) • W obu sekwencjach dochodzi do substytucji (T->G, C->A), zauważ, że w lewej mutacji doszło do zmiany analogicznej do tej, która wydarzyła się w sekwencji prawej w kroku 4.

- W sumie w obu sekwencjach doszło do ośmiu substytucji. Dopasujmy teraz obie sekwencje do siebie:

Fig. 9: Porównanie sekwencji

- Jak widać mutacje są widoczne w czterech pozycjach i sześciu nukleotydach z czego dwa mutowały dwukrotnie.
- Zaznaczmy teraz miejsca gdzie widoczne są różnice:

Fig. 10: Porównanie sekwencji

- Okazuje się, że sekwencje różnią się tylko w dwu miejscach, mimo że w sumie wydarzyło się w nich osiem mutacji.
- Powyższy przykład pokazuje mechanizm „ukrywania się" mutacji.
- Porównując dwie sekwencje, jeśli widzimy różnicę między nukleotydami w danym miejscu, nie jesteśmy w stanie stwierdzić, czy jest ona wynikiem jednej czy wielu mutacji.
- Co więcej, następujące po sobie mutacje mogą najpierw sprawić, że nukleotydy będą się różnić a później, że będą takie same (choć niekoniecznie takie jak na początku).
- Im więcej czasu upływa i im więcej zachodzi mutacji w badanych sekwencjach, tym większy odsetek zmian zostaje „zatarty".
- O ile możemy przyjąć, że liczba mutacji w czasie rośnie w sposób liniowy, to liczba obserwowanych różnic rośnie liniowo tylko na początku (dla małej liczby różnic) a później coraz wolniej, ponieważ coraz więcej zmian wydarza się w tych samych miejscach.
- Liczba różnic zmienia się, dla sekwencji o równych proporcjach rodzajów nukleotydów, do wartości 3/4 liczby nukleotydów, przy czym zmierza do tej granicy coraz wolniej.
- Trzeba też pamiętać o tym, że zasady prawdopodobieństwa wskazują, że dla dwu losowo wybranych sekwencji DNA o tej samej długości 1/4 miejsc powinna być zgodna.
- Jak widać, prosta metoda obliczania różnic między sekwencjami jest zawodna.
- Konieczne zatem okazało się stworzenie modeli, które w bardziej realistyczny sposób pozwalałyby oszacować odległości ewolucyjne.
- Bardziej złożone modele uwzględniają różne prawdopodobieństwa różnych rodzajów substytucji

Model Junkes-Cantor (JC, JC69)

Najprostszy model, nazwany od nazwisk autorów **modelem Junkesa-Cantora** (w skrócie **JC**, lub **JC69** uwzględniając rok publikacji: 1969) oparty jest na założeniu, że nukleotydy mogą ulegać podmianie każdy z każdym z takim samym prawdopodobieństwem. Można to przedstawić za pomocą macierzy:

	T	C	A	G
T	$-$	α	α	α
C	α	$-$	α	α
A	α	α	$-$	α
G	α	α	α	$-$

Wartość α oznacza prawdopodobieństwo zmiany jednego nukleotydu w drugi w określonej jednostce czasu na przykład na rok. Wynika z tego, że prawdopodobieństwo zmiany danego nukleotydu w jakikolwiek inny nukleotyd w danym okresie czasu wynosi: $r = 3\alpha$

Z kolei odległość między dwoma sekwencjami po czasie t będzie wynosić: $d = 3\alpha t$

Wartości, tu oznaczone znakiem `-`, na przekątnych wynoszą ujemną sumę wartości w rzędach. W powyższym przypadku będzie to -3α

Model *General Time Reversible* (GTR)

Przykładem złożonego modelu jest GTR (General Time Reversible). Nazwa tego modelu wskazuje, że ma on charakter ogólny i zakłada odwracalność (substytucji) w czasie. Odwracalność w tym przypadku oznacza, że substytucje dla danej pary nukleotydów wydarzają się z takim samym prawdopodobieństwem w obie strony. A więc np. szansa, że `A` zmieni się w `T` jest taka sama jak mutacja `T` w `A`. Natomiast ogólność oznacza, że model uwzględnia indywidualne wartości frekwencji poszczególnych nukleotydów (π) a także prawdopodobieństw mutacji pomiędzy parami zasad (α, β, γ, δ, ϵ, η). Macierz dla modelu GTR wygląda zatem tak:

	T	C	A	G
T	$-$	$\alpha\pi_C$	$\beta\pi_A$	$\gamma\pi_G$
C	$\alpha\pi_T$	$-$	$\delta\pi_A$	$\epsilon\pi_G$
A	$\beta\pi_T$	$\delta\pi_C$	$-$	$\eta\pi_G$
G	$\gamma\pi_T$	$\epsilon\pi_C$	$\eta\pi_A$	$-$

Można powiedzieć, że model GTR jest najbardziej uniwersalny z przedstawionych i pozwala na opis ewolucji najbardziej zbliżony do rzeczywistego.

Konstruowanie drzew i szacowanie ich wiarygodności

Struktura drzewa filogenetycznego

- Zanim przejdziemy do algorytmów wykorzystywanych przy konstruowaniu drzew filogenetycznych, zwanych też **dendrogramami**, przyjrzyjmy się pokrótce ich podstawowym formom i strukturze.

- Drzewa filogenetyczne najczęściej przedstawiane są w dwu formach: Ukośnej i prostokątnej.

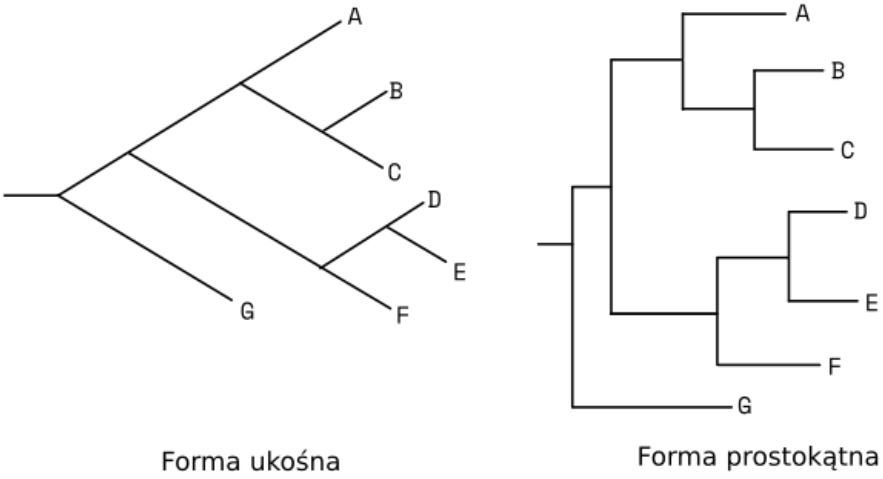


Fig. 11: Formy drzewa filogenetycznego

- Podstawowe elementy drzewa filogenetycznego to: liście, gałęzie i węzły.

- **Gałęzie** pokazują związki pomiędzy nimi. Ich długość może (w zależności od rodzaju drzewa) odpowiadać zmianom w sekwencjach nagromadzonych podczas ewolucji. Można wyróżnić gałęzie wewnętrzne prowadzące do węzłów i gałęzie zewnętrzne zakończone liśćmi.

- **Węzły** to miejsca łączenia się gałęzi - reprezentują jednostki taksonomiczne (gatunki, osobniki, odmiany itd.). Węzły wewnętrzne (nie będące liśćmi) reprezentują hipotetycznego wspólnego przodka kladu (zob. niżej)

- **Liście** są końcowymi (terminalnymi) węzłami, odpowiadają badanym sekwencjom/taksonom

- Grupa taksonów pochodzących od wspólnego przodka nazywana jest **kladem**.

- Niekoniecznie poszczególne klady wyróżnia się wizualnie na drzewie, ale jest to termin stosowany w opisie zależności filogenetycznych.

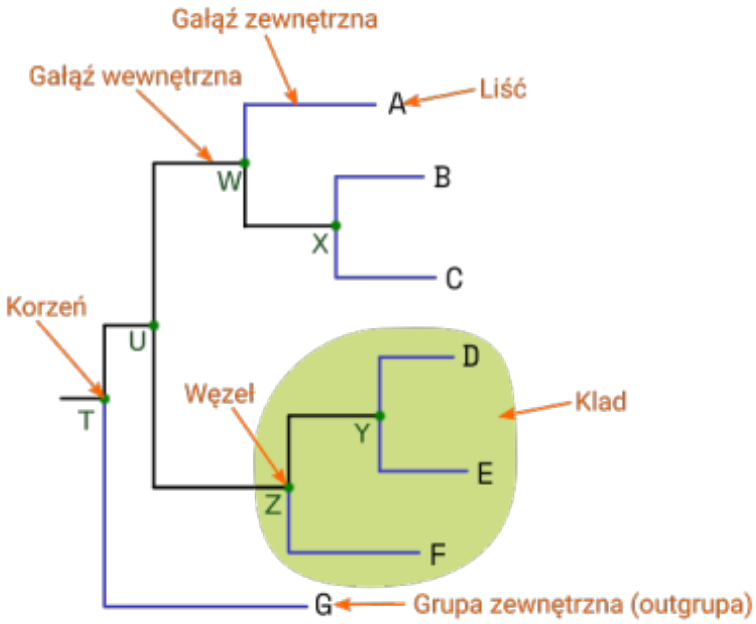


Fig. 12: Struktura drzewa filogenetycznego

- Wzorzec rozgałęzienia drzewa nazywany jest **topologią drzewa**. Drzewa o takiej samej topologii mogą mieć inną reprezentację graficzną, wynikającą np. z obracania gałęzi względem węzła.
- Przykładowo poniższe dwa drzewa mają taką samą topologię mimo innego wyglądu:

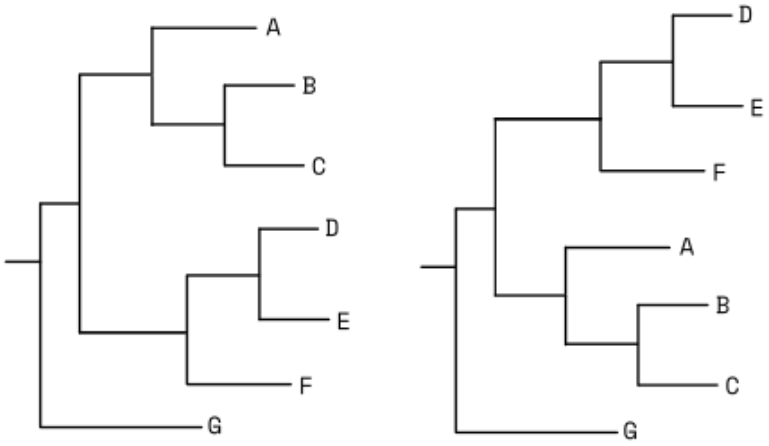


Fig. 13: Drzewa o takiej samej topologii

- **Drzewa nieukorzenione** przedstawiają wzajemne podobieństwa ale nie pozwalają określić w jakiej kolejności poszczególne taksony się od siebie oddzielały.
- **Drzewa ukorzenione** posiadają węzeł, który odpowiada ostatniemu wspólnemu przodkowi badanych taksonów.

- Często wyznacza się go (jest to tzw. „ukorzenianie drzewa") wskazując na **grupę zewnętrzną**, zwaną także **outgrupą** (ang. *outgroup*). Jest to takson (lub grupa taksonów), który jest dalej spokrewniony z pozostałymi badanymi, niż one między sobą. Innymi słowy, oddzielił się on najwcześniej podczas ewolucji. Przykładowo, gdybyśmy badali genetycznie gatunki *Homo*, grupą zewnętrzną mógłby być szympans.
- Ukorzenianie drzewa pozwala ustalić kolejność oddzielania się poszczególnych kladów i liści w toku ewolucji.

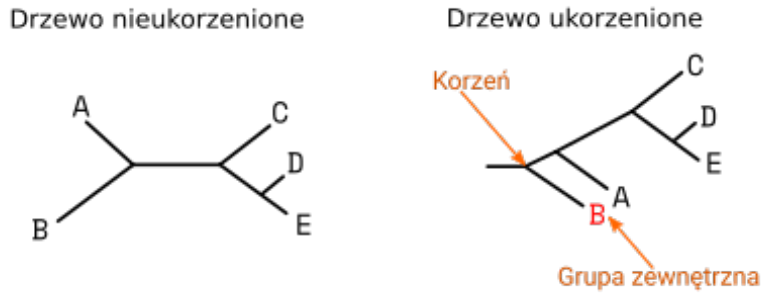


Fig. 14: Drzewo nieukorzenione i ukorzenione

- Jak wcześniej wspomniałem, długość gałęzi drzewa może odzwierciedlać odległość ewolucyjną badanych sekwencji, wtedy drzewo nazywamy **filogramem**.
- **Kladogram** natomiast pokazuje jedynie pokrewieństwa między badanymi taksonami.
- Wizualnie można go poznać po tym, że wszystkie gałęzie kończą się wzdłuż jednej linii (pionowej lub poziomej).

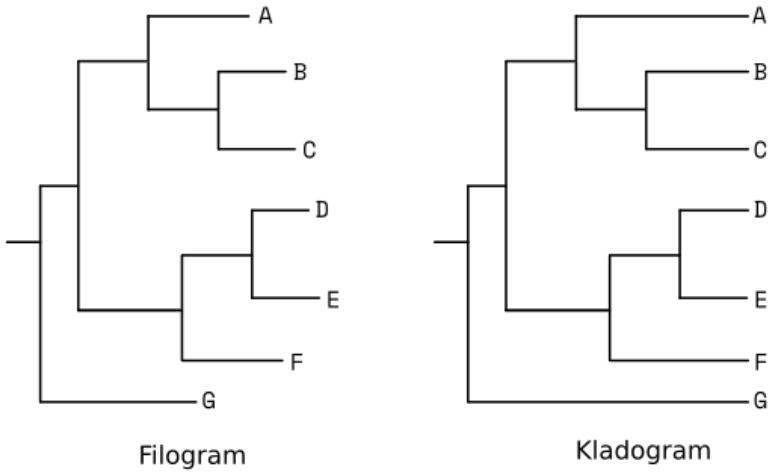


Fig. 15: Filogram i kladogram

- Mając dopasowane sekwencje nukleotydów oraz znaleziony model podstawień nukleotydów można przystąpić do konstruowania drzewa.
- Także na tym etapie napotykamy na dość duży wybór metod i programów, które służą wyliczeniu najbardziej prawdopodobnych związków filogenetycznych pomiędzy

badanymi organizmami, które w kolejnym kroku będzie można przedstawić w formie graficznej.

- Najbardziej znane metody używane przy konstruowaniu drzew to:
  - UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages)
  - Metoda najbliższego sąsiada (NJ - NeighborJoining)
  - Metoda największej oszczędności (MP - Maximum Parsimony)
  - Metoda największej wiarygodności (ML - Maximum Likelihood)
  - Metody bayesowskie (Bayesian Methods)
- Możemy je wykorzystać w programach, które zazwyczaj implementują jedną z metod, choć często z pewnymi modyfikacjami i dodatkami.
- Należą do nich `PhyML`, `IQ-tree`, `RAxML`, `PHYLIP`, `PAUP*`, `mrBAYES`, `BEAST`.
- Istnieją także „kombajny", jak np. `MEGA`, które pozwalają liczyć drzewa na kilka sposobów.

Szacowanie wiarygodności

- Konstruowaniu drzew towarzyszy zazwyczaj szacowanie ich wiarygodności.
- W większości przypadków stosuje się tu metodę **bootstrap** (samopróbkowania) a dla metod bayesowskich wyliczane jest prawdopodobieństwo bayesowskie.
- Samopróbkowanie w podstawowej formie polega na tym, że po utworzeniu optymalnego drzewa, z zestawu dopasowanych sekwencji losuje się kolumny zasad i tworzy się z nich kolejne zestawy „sekwencji" o takiej samej długości jak sekwencje wyjściowe.
- Jest to losowanie ze zwracaniem, co oznacza, że te same kolumny mogą zostać wylosowane wielokrotnie a inne nie pojawiają się w ogóle w generowanych zestawach.
- Na przykład dla przyrównania:

```
0123456789
CAGTCCGATG
TAATCTGATA
TAGTTTGATA
TAGTTTGATA
TAGTTTGATA
TAGTTTGATA
```

można stworzyć m. in. takie pseudosekwencje:

```
1735320955      8327248441
AATCTGCGCC      TTGAGCTCCA
AATTTATATT      TTAAACTCCA
AATTTGTATT      TTGAGTTTTA
AATTTGTATT      TTGAGTTTTA
AATTTGTATT      TTGAGTTTTA
AATTTGTATT      TTGAGTTTTA
```

itd…

- Dla każdego „pseudoprzyrównania" liczone jest drzewo w taki sam sposób jak drzewo główne, a następnie sprawdzana jest obecność poszczególnych kladów na obu

drzewach.

- Każdemu kladowi, który występuje na drzewie oryginalnym i wygenerowanym w procesie samopróbkowania przypisywany jest punkt.
- Im większa suma punktów, tym dany klad na drzewie jest bardziej wiarygodny.
- Wartości bootstrap przedstawia się zwykle w zakresie wartości 0-100, przy węzłach, co odpowiada procentowi wygenerowanych drzew w których występował dany klad.
- Liczba bootstrapów, który jest zazwyczaj jednym z parametrów ustawianych w programach generujących drzewa, powinna wynosić minimum 100 a najlepiej osiągać 1000-2000.
- Ponieważ dla każdego zestawu pseudosekwencji generowane jest drzewo, w zależności od stosowanej metody, proces samopróbkowania może zająć mniej lub więcej czasu.
- Im metoda bardziej wymagająca obliczeniowo, tym wartości bootstrap będą liczone dłużej.

Format Newick i wartości dodatkowe na drzewie

- Po zakończeniu obliczeń otrzymujemy wynik zazwyczaj w formie pliku tekstowego, który jest sformatowany w taki sposób, że zawiera informacje na temat relacji pomiędzy badanymi taksonami a także inne parametry drzew (np. wartości bootstap).
- Poniżej znajduje się przykładowy plik kladogramu zapisanego w formacie `newick`.

```
((((B,((C,D),(E,F))),G),(H,I)),A);
```

- Po przekształceniu go w formę graficzną uzyskujemy taki obraz:

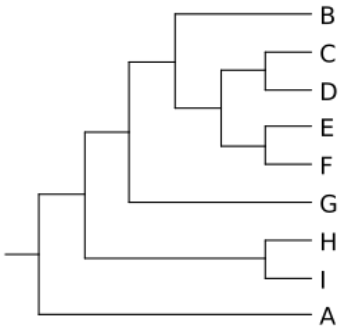


Fig. 16: Kladogram prosty

- Porównując powyższy plik w formacie `newick` z kladogramem można zrozumieć zasadę kodowania informacji w pierwszym z nich.
- W parze nawiasów zamykane się taksony należącego do wspólnego kladu.
- W formacie `newick` można też zapisać inne dane, na przykład dotyczące długości gałęzi i wartości bootstrapu:

```
(A:0.0611905636,((B:0.0271634370,((C:0.0024799833,D:0.0082762103)100:0.011585,
```

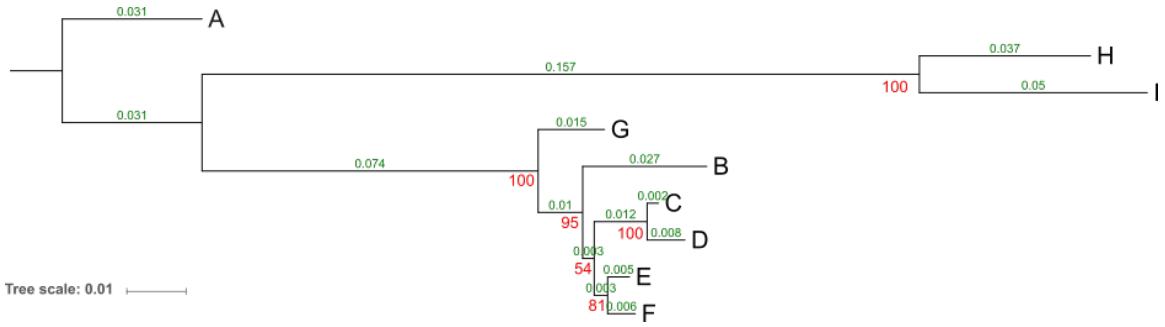


Fig. 17: Dendrogram z oznaczeniami

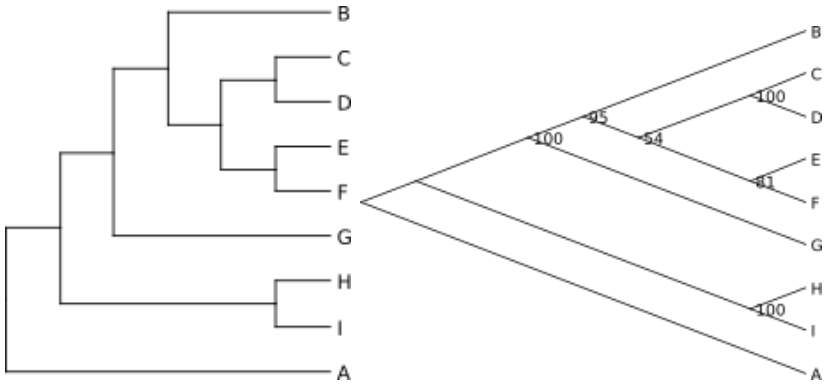
```
(E:0.0047747513,F:0.0060564542)81:0.002943)54:0.002522)95:0.009753,
G:0.0145402289)100:0.073576,(H:0.0374628169,I:0.0498809623)100:0.157039);
```

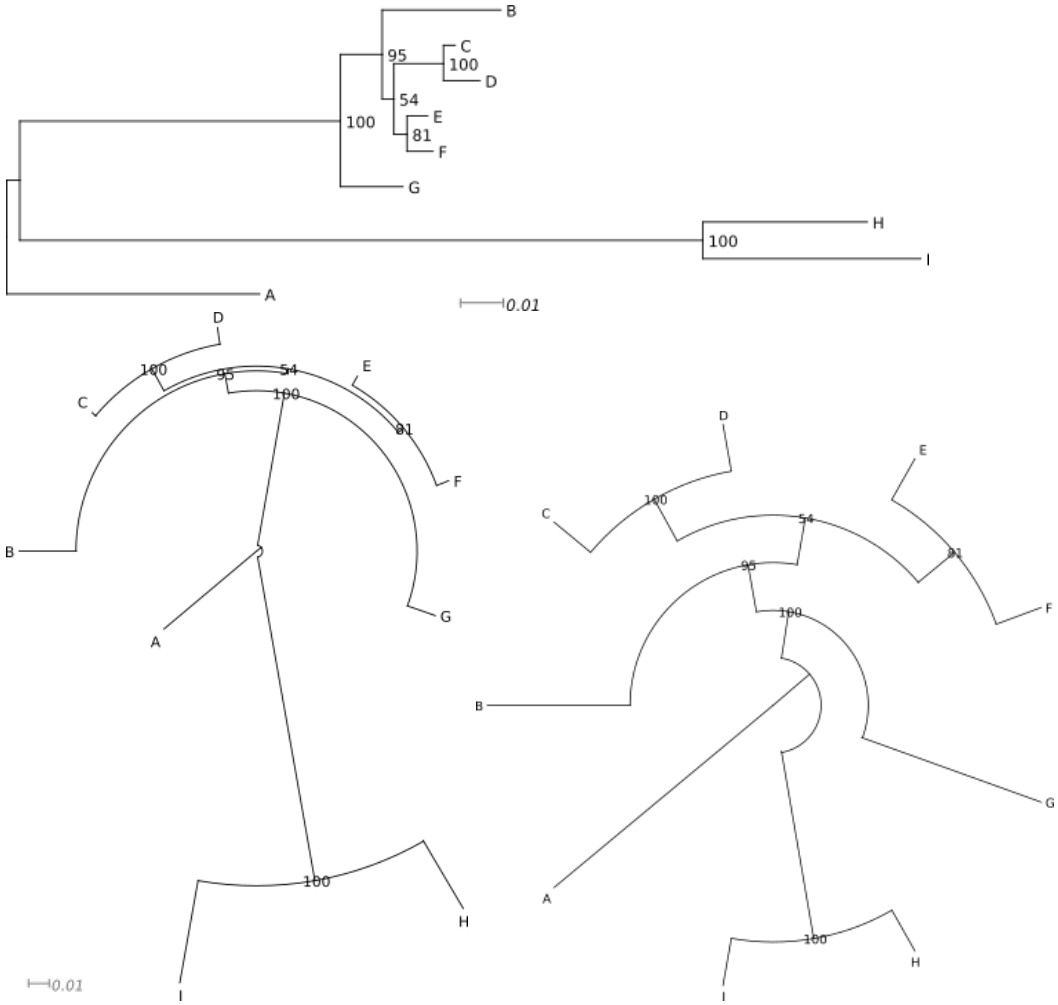
- Poniżej znajduje się odpowiedni dendrogram:
- Na zielono zaznaczono długości gałęzi (odpowiadające liczbie mutacji na miejsce), zaokrąglone do trzech miejsc po przecinku.
- Na czerwono wartości bootstrap.
- W lewym dolnym rogu widać skalę drzewa, którą można odnieść do długości gałęzi (zwłaszcza gdy ich wartości nie są zaznaczone).

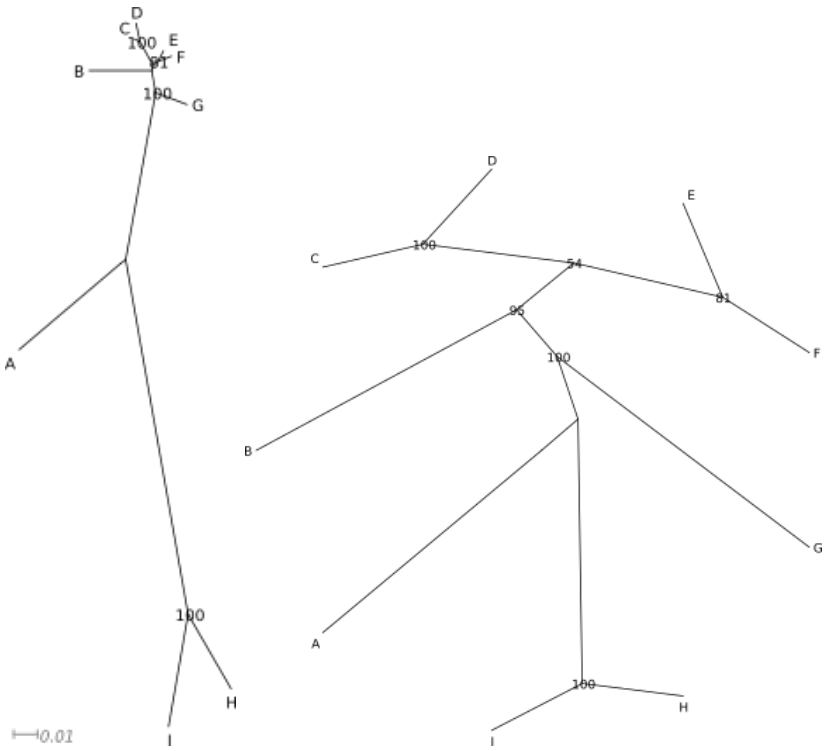
Wizualizacja drzew

- Forma graficzna drzewa filogenetycznego jest znacznie bardziej przejrzysta dla człowieka niż prezentowany powyżej zapis tekstowy.
- Pozwała łatwo uchwycić pokrewieństwa i odległości ewolucyjne pomiędzy badanymi organizmami, choć ich prawidłowe odczytanie wymaga jednak nieco wiedzy i wprawy.
- Trzeba pamiętać, że opierając się na tych samych danych, można utworzyć bardzo różnie wyglądające drzewa.
- Poniżej znajduje się zawartość pliku w formacie `newick` opisująca drzewo i kilka przykładów je przedstawić:

```
((((B:0.027163437,((C:0.0024799833,D:0.00827621):0.011585,
(E:0.004774751,F:0.006056454):0.002943):0.002522):0.009753,G:0.014540229):0.073576,
(H:0.037462816,I:0.049880963):0.157039):0.003059528,A:0.058131035);
```




B
C
95
100
D
54
E
100
81
F
G
H
100
I
A
0.01
D
100
95
54
E
C
100
81
F
B
A
G
100
H
I
0.01
D
E
C
100
54
95
81
F
100
B
G
A
100
H
I



- Nie ma „najlepszej" formy drzewa.
- To jakiej należy użyć, zależy od tego co i w jaki sposób chcemy pokazać, liczby danych, rodzaju odbiorcy itp.
- W pewnych sytuacjach najlepiej sprawdzi się forma drzewa „prostokątnego'‘w innej drzewo „okrągłe".

Horyzontalny Transfer Genów (HGT)

Czym jest HGT?

- Horyzontalny transfer genów (ang. *Horizontal Gene Transfer* - *HGT*) czasem zwany także poziomym transferem genów (ang. *Lateral Gene Transfer* - LGT) to proces przenoszenia materiału genetycznego pomiędzy organizmami w inny sposób niż rodzic-potomek (pionowy transfer genów, ang *vertical gene transfer* - VGT).

U jakich organizmów występuje HGT?

- Zjawisko po raz pierwszy odkryto w 1951 r. u maczugowca błonicy (*Corynebacterium diphtheriae*). Zauważono, że odpowiedzialny za patogenność gen pochodzenia wirusowego *tox* może przenosić się od bakterii patogennych do niepatogennych.
- W 1959 wykazano, że tą droga mogą się przenosić bakteryjne geny odpowiedzialne za odporność na antybiotyki
- Kolejne badania wskazały na dużą rolę HGT w wymianie materiału genetycznego u prokariontów. Kluczową rolę odgrywają w tej grupie organizmów takie procesy jak koniugacja, transdukcja i transformacja.
- Wykazano także, znaczny wpływ HGT na ewolucję eukariontów.
- Przede wszystkim zwraca się uwagę na rolę tego procesów u protistów.

- Obserwuje się je jednak u pozostałych grup *Eucaryota* i kolejne badania wskazują na istotną rolę w ewolucji tej grupy organizmów.

Pomiędzy jakimi organizmami występuje HGT?

- W przeciwieństwie do przenoszenia genów drogą krzyżowania międzygatunkowego, które ograniczone są do blisko spokrewnionych organizmów, wydaje się, że nie ma wyraźnych granic taksonomicznych dla HGT.
- Znane są transfery pomiędzy różnymi gatunkami bakteriami czy roślin, ale także pomiędzy bakteriami i grzybami, bakteriami i roślinami, bakteriami i zwierzętami, grzybami i zwierzętami czy grzybami i roślinami.
- Wydaje się zatem, że nie istnieją żadne bariery genetyczne „zakazujące" przenoszenia się materiału genetycznego pomiędzy nawet odległymi ewolucyjnie organizmami.

- Dalsze rozważania będą dotyczyć przede wszystkim roślin

W jaki sposób przenoszą się sekwencje DNA?

- Mechanizmy odpowiedzialne za HGT nie są dostatecznie wyjaśnione.
- Zwykle wskazuje się na:
  - Przenoszenie kwasów nukleinowych przez pośredników takich jak wirusy, bakterie, grzyby
  - Transpozony
  - Bezpośrednie pobieranie kwasów nukleinowych (zwłaszcza w układach pasożyt-żywiciel)
- Teoretycznie materiał genetyczny może przenosić się za pomocą fragmentów DNA lub poprzez mRNA, które następnie dzięki odwrotnej transkypcji mógłby z powrotem zostać przekształcony w DNA
- Badania wskazują raczej na tą pierwszą możliwość.

HGT u eukariontów

- Uważa się, że procesowi HGT sprzyja długotrwały fizyczny kontakt pomiędzy organizmami
- Taka sytuacja może dotyczyć np:
  - Endosymbiontów
  - Układów pasożyt-żywiciel
  - Szczepień
  - Wchłaniania jednych organizmów przez inne (pierwotniaki)
  - Jeśli przeniesione sekwencje DNA mają być przekazane następnym pokoleniom, muszą przedostać się do linii generatywnej (o ile organizm nie rozmnaża się bezpłciowo) toteż skutecznemu HGT sprzyja fizyczna komórek rozrodczych i symbiontów lub ich kontakt ze środowiskiem zewnętrznym

HGT w mitochondriach

- Mitochondria wydają się być szczególnie predysponowane do horyzontalnego transferu genów:
  - Posiadają mechanizmy pobierania DNA i RNA z otoczenia.

  - Często ulegają fuzji.
  - Roślinne mitochondria mają system rekombinacji homologicznej.
  - Ich genomy mają strukturę dynamiczną i ulegają rearanżacjom
  - Genomy mitochondriów roślinnych zawierają kilkadziesiąt genów
  - Pomiędzy genami znajdują się niekodujące odcinki w które może się wbudowywać obce DNA.
- U okrytonasiennych obce mtDNA zwykle pochodzi od mitochondriów innych okrytonasiennych ale znajduje się także geny mchów czy glonów.

HGT w jądrach komórkowych i plastydach

- W jądrach komórek roślin okrytonasiennych znaleziono także wiele śladów HGT
- Dotyczą one genów jądrowych a także transpozonów
- Ciekawym przypadkiem jest pasożytnicza roślina *Rafflesia cattlei*, u której znaleziono ponad 30 genów przeniesionych od żywiciela. Przynajmniej niektóre są funkcjonalne.
- Plastydy uważane są za bardzo odporne na takie procesy jak HGT czy IGT (zob. dalej).
- Obce sekwencje plastydowe, znajduje się raczej w innych genomach komórki - mitochondrialnym lub jądrowym

Transfer pomiędzy genomami wewnątrz komórki

- Fragmenty DNA mogą przenosić się z jądra komórkowego jednego organizmu do jądra komórkowego innego organizmu.
- Proces ten może także przebiegać pomiędzy wszystkimi elementami komórki zawierającymi materiał genetyczny: jądrem, mitochondriami i plastydami.
- Przenoszenie fragmentów DNA pomiędzy genomami wewnątrz komórki nazywamy międzygenomowym transferem genów (ang. *Intergenomic Gene Transfer - IGT*)
- Trzeba pamiętać, że genomy mitochondriów i plastydów maja charakter prokariotyczny a jądra (niejako z definicji) eukariotyczny.
- Mitochondria większości zbadanych roślin nasiennych zawierają sekwencje jądrowe i plastydowe.
- Geny mitochondrialne znajduje się także w plastydach, ale rzadko. Różnica wynika prawdopodobnie z tego, że mitochondria, w przeciwieństwie do plastydów, mają efektywne mechanizmy pobierania obcego DNA.
- W jądrach znaleziono wiele genów pochodzenia mitochondrialnego. W takich przypadkach następuje konwersja genów prokariotycznych w eukariotyczne co wiąże się m. in. z tym, że podlegają rekombinacji przy rozmnażaniu płciowym. Przypuszczalnie w tego typu IGT bierze udział RNA jako pośrednik.

Znaczenie HGT w ewolucji roślin

- Dotychczasowe badania wskazują na dużą rolę HGT w ewolucji eukariontów
- Ślady tego procesu znajduje się we wszystkich dużych grupach organizmów
- Odegrał także ważną rolę w ewolucji roślin
- Przykładowo, procesowi przekształcania się wewnątrzkomórkowego prokariotycznego endosymbiontu w chloroplast towarzyszył transfer kilkudziesięciu genów z chlamydii - które w tym czasie także prawdopodobnie były endosymbiontami komórek eukariotycznych.

- Uważa się, że geny pobrane od różnych organizmów miały istotną rolę w nabywaniu wielu ważnych cech umożliwiających m. in. adaptacje roślin do nowych i ekstremalnych warunków, efektywne reakcje na stress, wydajniejszą naprawę DNA, degradację celulozy czy rozwój tkanek przewodzących.

Rośliny pasożytnicze

- Rośliny pasożytnicze są dobrym kandydatem na organizmy pobierające obce DNA, ponieważ bezpośrednio są połączone z żywicielem i pobierają od niego składniki odżywcze.
- Połączenie odbywa się przez haustorium - strukturę która wnika w tkanki korzenia lub pędu gospodarza i pobiera wodę, sole mineralne i inne składniki odżywcze.
- Wyróżnia się dwie podstawowe kategorie pasożytów:
  - hemipasożyty (półpasożyty) - zdolne do prowadzenia własnej fotosyntezy, pobierające od żywiciela głównie wodę i sole mineralne (np. jemioła (*Viscum*), szelężnik (*Rhinanthus*))
  - holopasożyty - niezdolne do fotosyntezy, pobierają od żywiciela także cukry i inne składniki odżywcze (np. zaraza (*Orobanche*), kanianka (*Cuscuta*))
- Bardziej oczywistymi kandydatami na HGT wydają się być oczywiście holopasożyty

HGT u roślin pasożytniczych

- Rzeczywiście, badania wskazują, na stosunkowo liczne przypadki HGT w relacjach pasożyt-żywiciel
- Są więc dobrym modelem do badania tego procesu.
- Przy czym znajduje się nie tylko sekwencje przeniesione od żywiciela do pasożyta ale także od pasożyta do żywiciela.
- Nie jest zaskoczeniem, że głównie dotyczą one sekwencji mitochondrialnych, ale także znajduje się geny jądrowe i plastydowe
- Szacuje się, że u *Raflesiaceae* nawet ok 40% genów mitochondrialnych wykazuje ślady HGT

Wykrywanie HGT

- HGT wykrywa się głównie drogą znajdywania niezgodności na drzewach filogenetycznych.
- Porównuje się drzewo, które przedstawia „prawidłowe" relacje filogenetyczne z drzewem sporządzonym dla badanej sekwencji.
- Jeśli występują niezgodności, mogą one świadczyć o transferze genów.
- Położenie badanej sekwencji na drzewie filogenetycznym może wskazywać na źródło obcej sekwencji,
- Na przykład sekwencja pobrana od pasożyta może wykazywać bliskie podobieństwo do sekwencji żywiciela
- Wtedy można przypuszczać, że została pobrana od żywiciela i została wbudowana w genom pasożyta.

Fig. 18: *Orobanche flava*

Nasze badania - transfer *atp6* u *Orobanchaceae*

Orobanchaceae

- Rodzina *Orobanchaceae* jest najliczniejszą pod względem pasożytów. Zawiera 90 rodzajów i 2060 gatunków obejmujących autotrofy, hemipasożyty oraz holopasożyty.
- Zatem stanowi dobry model do badań na pasożytnictwem na różnych etapach jego rozwoju ewolucyjnego
- Uważa się, że półpasożytnictwo w tej rodzinie wyewoluowało raz, natomiast holopasożytnictwo kilkukrotnie. Najliczniejszymi holopasożytniczymi rodzinami, są blisko spokrewnione *Orobanche* i *Phelipanche* zawierające ok. 150-200 gatunków

HGT u *Orobanchaceae*

- Chociaż *Orobanchaceae* wydaje się być idealnym kandydatem do badań nad HGT, stosunkowo niewiele doniesień na ten temat można znaleźć w literaturze. Opublikowano HGT zaledwie w przypadku kilku genów, w tym zaledwie jeden dotyczący genu mitochondrialnego i to znalezionego u żywiciela a nie u pasożyta.
- Nasze badania polegały na sprawdzeniu czy w sekwencjach genów mitochondrialnych nie ma śladów HGT
- Jako referencyjne drzewo filogenetyczne używaliśmy sekwencji *trnL-trnF*, odzwierciedlających „właściwe" relacje filogenetyczne Na drzewach znalazły się sekwencje różnych gatunków *Orobanche* i *Phelipanche* a także sekwencje wybranych gatunków z innych grup roślin, włączając żywicieli lub ich krewniaków.
- W przypadku genu *atp6* udał się uzyskać sygnał wskazujący na HGT tego genu. Badanie całej sekwencji wskazało na transfer *atp6* u *Orobanche coerulescens*

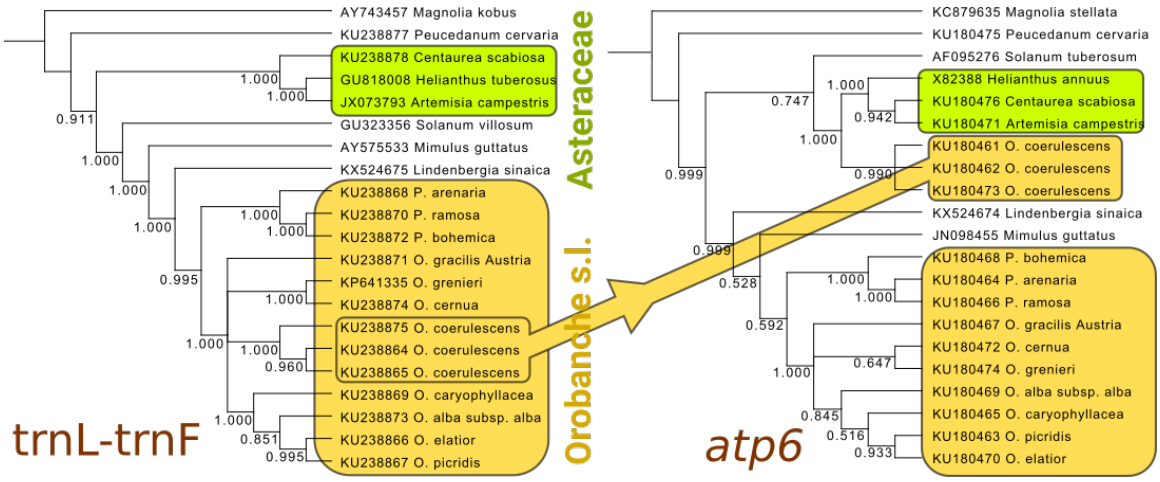


Fig. 19: HGT u *O. coerulescens*

- Dalej przyjrzeliśmy się bliżej sekwencjom badając które nukleotydy zostały przeniesione a które nie:

```
KC879635 Magnolia stellata          TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTTTATTTCATAGGAGATCCTG 550
KU180475 Peucedanum cervaria        TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTATATTTCATAGGAGATCTGG 550
AF095276 Solanum tuberosum          TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTCTATTTCATAGGGGATCTTG 550
KU180476 Centaurea scabiosa         TTGGACTATGCTATGTATGAATGATATTTTTTATTTTATAGGGGATCTTG 550
KU180471 Artemisia campestris       TTGGACTATGCTATGTATGAATGATATTTTGTTTTTTATAGGGGATCTTG 550
X82388 Helianthus annuus            TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTGTATTTTATAGGGGATCTTG 550
KU180464 P. arenaria                TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTTTTATTTCATAGGAGATCTTG 550
KU180466 P. ramosa                  TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTTTATTTCATAGGAGATCTTG 550
KU180468 P. bohemica                TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTTTATTTCATAGGAGATCTTG 550
KU180461 O. coerulescens            TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTGTATTTTATAGGGGATCTTG 550
KU180462 O. coerulescens            TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTGTATTTTATAGGGGATCTTG 550
KU180473 O. coerulescens            TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTGTATTTTATAGGGGATCTTG 550
KU180463 O. picridis                TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTATATTTCATAGGGGATCCTG 550
KU180465 O. caryophyllacea          TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTCTATTTCATAGGGGATCCTG 550
KU180467 O. gracilis Austria        TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTCTATTTCATAGGGGATCCTG 550
KU180469 O. alba subsp. alba        TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTCTATTTCATAGGGGATCCTG 550
KU180470 O. eliator                 TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTATATTTCATAGGGGATCCTG 550
KU180472 O. cernua                  TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTCTATTTCATAGGGGATCCTG 550
KU180474 O. grenieri                TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTCTATTTCATAGGGGATCCTG 550
KX524674 Lindenbergia sinaica       TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTCTATTTCATAGGGGATCCTG 550
JN098455 Mimulus guttatus           TTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTCTATTTCATAGGGGATCCTG 550
                                    ************************ **** * *** ***** ****  *
                                                                ...-548
```

Fig. 20: Badanie sekwencji

- Takie podejście przyniosło ciekawe rezultaty, okazał się bowiem, że ślad HGT występuje także u *Phelipanche*, że są to najprawdopodobniej dwa różne transfery i w dodatku dotyczą różnych fragmentów *atp6*

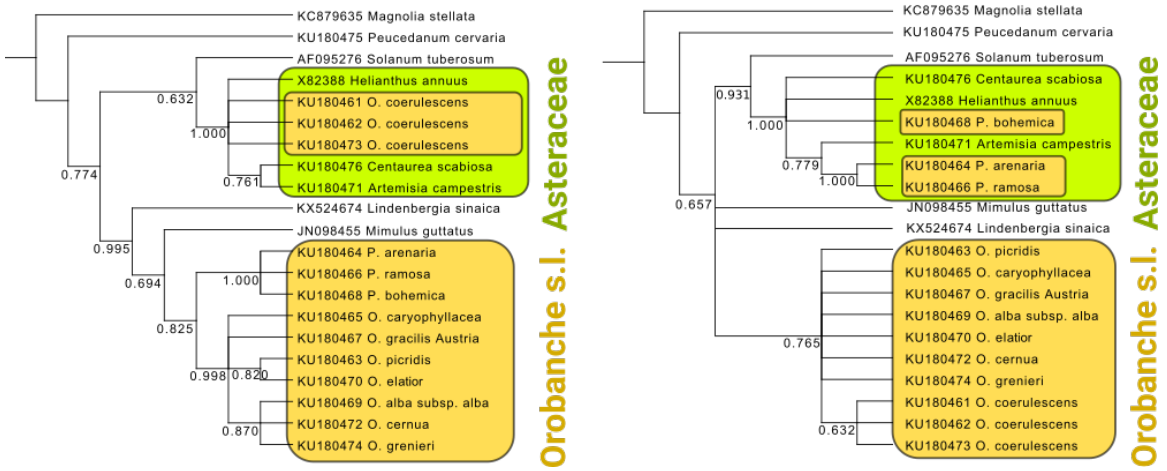


Fig. 21: HGT u *Orobanche* i *Phelipanche*

- HGT1 - wydarzył się stosunkowo niedawno, nie ma go u pokrewnych gatunków. *atp6* w tym przypadku ma charakter hybrydowy - składa się z fragmentów „oryginalnych" i przeniesionych od gospodarza.
- HGT2 - wydarzył się dawno, u wspólnego przodka badanych *Phelipanche*. Obejmuje końcowy fragment genu, nie wiadomo jak daleko sięga.
- Prowadzimy dalsze badania transferów.