



Fylogenetiske træer

Dette dokument indeholder først et eksempel på hvordan man kan bruge UPGMA-metoden til at danne fylogenetiske træer ud fra en afstandsmatrice, og derefter en række øvelser der illustrerer både hvordan man kan lave fylogenetiske træer i hånden og tilsvarende træer i programmet MEGA.

Håndlavede træer med UPGMA-metoden

I dette afsnit bliver UPGMA-metoden i hånden gennemgået. For en grundigere gennemgang af metoden til at lave UPGMA-træer i hånden se Bioteknologi 6, side 31-34, hvor et alternativt eksempel er gennemgået.

Herunder er vist en afstandsmatrice for fem pattedyr: Ulv (U), moskusokse (M), kænguru (K), isbjørn (I) og vildsvin (V).

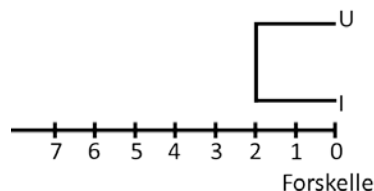
	Ulv	Moskusokse	Kænguru	Isbjørn	Vildsvin
Ulv	0	8	14	4	8
Moskusokse		0	14	8	6
Kænguru			0	14	14
Isbjørn				0	8
Vildsvin					0

1. Det første vi gør i en UPGMA-metode, er at finde de to grupper der har færrest forskelle, i dette tilfælde er det ulven og isbjørnen da der kun er fire forskelle mellem dem. Derfor dannes nu den første gruppering så de fire forskelle er fordelt lige på de to udviklingslinjer. Den nye afstandsmatrice hvor U og I er slået sammen, dannes nu ved at udregne UI-gruppens gennemsnitlige afstand til de andre dyr. Eksempelvis udregnes UI-gruppens afstand til M ved at sige:

$$UI-M = (U-M + I-M) / 2 = (8 + 8) / 2 = 8$$

På den måde dannes den nye afstandsmatrice samt den første forgrening på træet som vist herunder.

	U-I	M	K	V
U-I	0	8	14	8
M		0	14	6
K			0	14
V				0



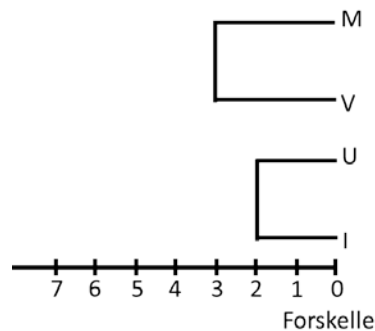
Bioteknologi 6, Tema 12 – Øvelser og opgaver

Linkadresserne fungerer pr. 1.11.2012. Forlaget tager forbehold for evt. ændringer i adresserne

2. Nu er det moskusoksen (M) og vildsvinet (V) der skal grupperes, og da afstanden mellem dem er 6, skal der være tre forskelle på hver gren. Nu udregnes en ny afstandsmatrice og træet udvides. Afstanden mellem UI og MV udregnes på følgende måde:

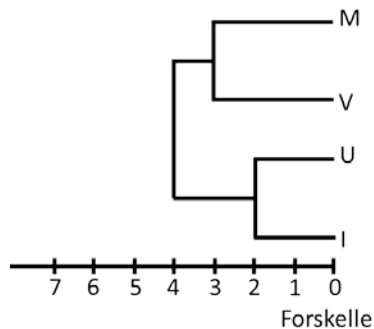
$$UI-MV = (U-M + U-V + I-M + I-V) / 4 = (8+8+8+8) / 4 = 8$$

	UI	MV	K
UI	0	8	14
MV		0	14
K			0



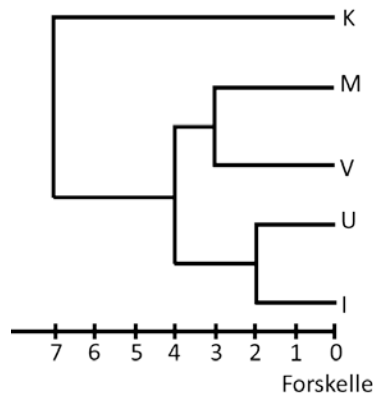
3. Nu ses det at næste forgrening skal være kombinationen af de to grupper UI og MV, så den samlede afstand mellem et af rovdirene (U og I) og et af hovdyrene (V og M) bliver otte forskelle. Derudover udregnes denne gruppes gennemsnitlige afstand til kænguruuen, og der opstilles en ny afstandsmatrice. Dette er vist herunder.

	UIMV	K
UIMV	0	14
K		0



4. Der er nu kun tilbage at sætte sidste forgrening på træet så den samlede afstand mellem kænguruuen, som jo er et pungdyr, og alle de placentale pattedyr (M, V, U og I) hver især er 14 forskelle. Dette gøres ved at grenen ud til kænguruuen skal være syv forskelle lang og grenen hen til de placentale pattedyr tre forskelle lang (fra fire ud til syv). Herunder er vist det færdige træ samt den oprindelige afstandsmatrice.

	U	M	K	I	V
U	0	8	14	4	8
M		0	14	8	6
K			0	14	14
I				0	8
V					0



Yderligere bemærkninger til håndlavede stamtræer

Grunden til at træet var forholdsvis ukompliceret at lave, er at datasættet (afstandsmatricen) der blev benyttet, er særligt udvalgt, så det opfyldte en række krav. Det primære krav var at evolutionsraten er den samme i alle grene i træet, hvilket gør at alle afstande passer sammen.

Hvis du ser grundigt efter, ser du at alle de indbyrdes afstande passer perfekt sammen, så der optrådte aldrig nye tal i afstandsmatricen. Så simpel er virkeligheden meget sjældent når man arbejder med rigtige data, men metoden er den samme. Så længe man altid husker at udregne de nye gennemsnitlige afstande som vist herover og i Bioteknologi 6, så får man lavet et UPGMA-træ som man derefter kan analysere og fortolke.

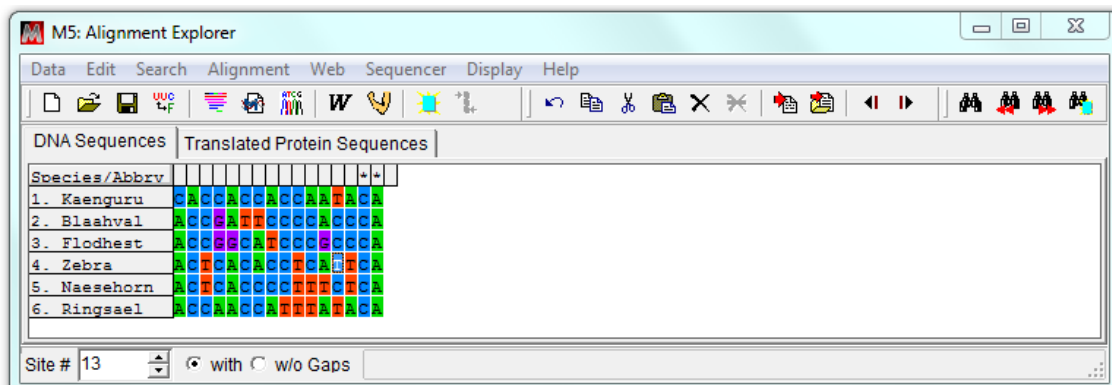
Fylogenetiske træer ved hjælp af MEGA

Det er meget let og hurtigt at lave en afstandsmatrice og et fylogenetisk træ i MEGA. Desværre kan MEGA på nuværende tidspunkt ikke bruge en afstandsmatrice som input, den skal have de bagvedliggende sekvenser, men da man ofte også har dem til rådighed er dette et mindre problem. Lad os tage udgangspunkt i en gammel eksamensopgave fra Biologi A.

Til august eksamen 2008 handlede opgave 3 om slægtskabsanalyser og forskellige dyrs tilpasning til at leve i vand. I opgaven blev der angivet en multipel alignment som er vist herunder.

Kænguru	CACCACCACCAATACA
Blåhval	ACCGATTCCCCACCCA
Flodhest	ACCGGCATCCCGCCCA
Zebra	ACTCACACCTCATTCA
Næsehorn	ACTCACCCCTTTCTCA
Ringsæl	ACCAACCATTTATACA

1. Åben MEGA og opret en ny alignment ved at vælge 'Align' og 'Edit/Build Alignment'. Vælg nu 'Create a new alignment' efterfulgt af 'DNA'.
2. Opret de seks nye sekvenser i MEGA og indtast ovenstående sekvenser. Vejledning til hvordan dette gøres, findes i link tre, tema 12 til Bioteknologi 6. Der gives en grundig gennemgang af, hvordan man opretter og arbejder med alignments i MEGA. Efter indtastning af sekvenserne bør skærmbilledet ligne det der er vist herunder:



3. Klik på 'Data' og vælg 'Phylogenetic Analysis' og sig nej til at det er proteinkodende sekvenser. Nu er det indtastede datasæt klar til nærmere analyse i MEGA.

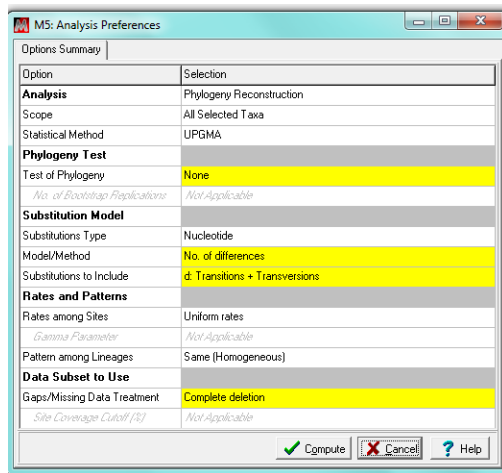
Bioteknologi 6, Tema 12 – Øvelser og opgaver

Linkadresserne fungerer pr. 1.11.2012. Forlaget tager forbehold for evt. ændringer i adresserne

- Gå til hovedvinduet i MEGA og vælg 'Distance' og 'Compute Pairwise Distances'. Sørg for at modellen der beregnes ud fra, er 'No. of differences'. For nærmere vejledning til at danne afstandsmatricer i MEGA se link 5 på Bioteknologi 6's hjemmeside hvor det er gennemgået mere detaljeret. Tjek at den fundne afstandsmatrice stemmer overens med den der er vist herunder.

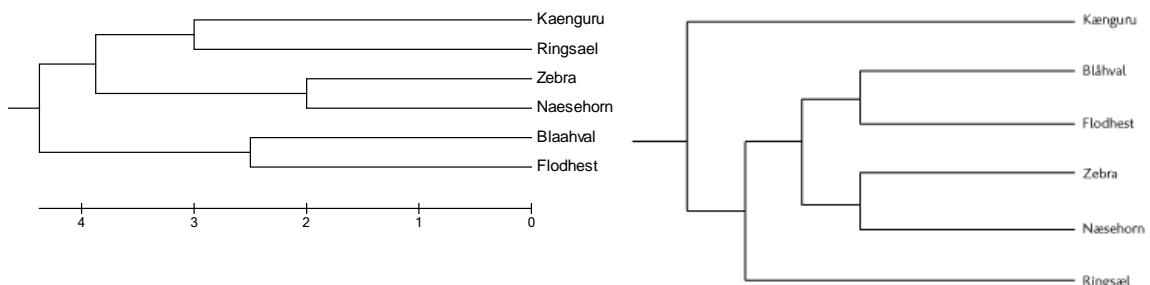
	Kænguru	Blåhval	Flodhest	Zebra	Næsehorn	Ringsæl
Kænguru	-					
Blåhval	9	-				
Flodhest	10	5	-			
Zebra	8	7	8	-		
Næsehorn	9	8	9	4	-	
Ringsæl	6	9	10	7	7	-

- Der skal nu laves et UPGMA-træ baseret på denne afstandsmatrice. Vælg knappen 'Phylogeny' og herefter 'Construct/Test UPGMA tree'. Følgende vindue dukker nu op.



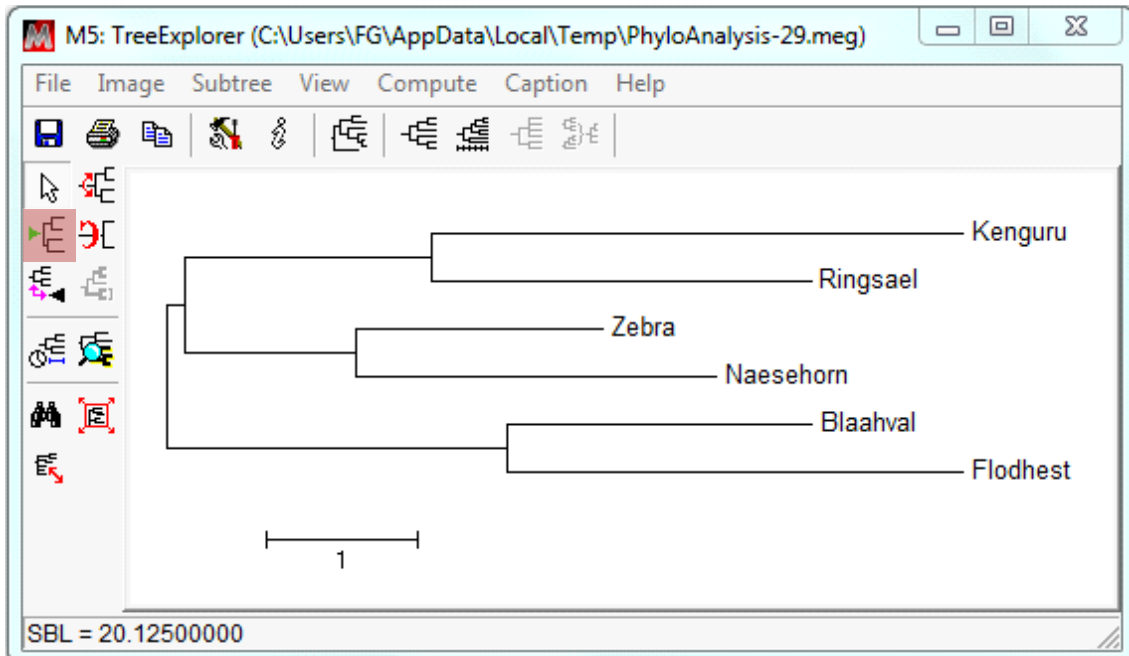
Det er vigtigt at beregningsmodellen er valgt rigtigt, sørg for at der under 'Substitution Model' i feltet 'Model/Method' står 'No. of differences' og i feltet nedenunder med titlen 'Substitutions to Include' står 'd: Transitions + Transversions'. Tjek også at de andre valgmuligheder er lig det viste.

- Tjek at opsætninger er som vist herover og klik på 'Compute'-knappen. Efter et kort øjeblik vises et fylogenetisk træ som gerne skulle se ud som vist herunder til venstre. Til højre er vist et fylogenetisk træ med samme forgreningsmønster som det der var angivet i opgaven.



- Sammenlign de to stamtræer, er de ens? Hvilket af de to træer tror du er mest rigtigt biologisk set?
- Hvis ikke hvad kan forklaringen være på dette? Indeholder datasættet nok information til at lave et korrekt stamtræ eller kan tilfældig variation påvirke træet? Er nogle af antagelserne i den simple UPGMA-model ikke i orden?

9. Luk UPGMA stamtræet ned og lav i stedet et såkaldt NJ-stamtræ ved at vælge 'Construct/Test Neighbor-Joining Tree'. Dette træ antager ikke at evolutionen går lige hurtigt i alle arter, og er baseret på en helt anden type algoritme til at beregne stamtræet. Nu finder man et stamtræ i stil med det vist herunder.



Urodet NJ-træ der viser resultatet af at bruge en anden stamtræs metode på det meget lille datasæt. Det er tydeligt at denne metode tyder på at arterne ikke har gennemgået lige hurtig udvikling, hvilket er en af antagelserne i UPGMA-metoden. Træet er urodet, men vi kan tilføje en rod ved at trykke på den med rødt markerede knap 'Place Root on Branch' og derefter vælge den art vi mener, er fjernest beslægtet med de andre.

10. Hvordan passer dette NJ-stamtræ med det der blev angivet i opgaven?
11. Placer roden af træet på grenen ud til kænguruen, da denne er det eneste ikke placentale pattedyr i opgaven. Hvordan passer træet nu med det der blev angivet i opgaven?

Metoderne til at bygge stamtræer kan give upræcise resultater hvis datasættet er lille

Hvis datasættet ikke indeholder meget information kan alle typer stamtræsmetoder give biologisk forkerte stamtræer.

Hvis de forskellige metodens antagelser ikke passer med data kan de give forkerte stamtræer

Det er ofte en god ide at dobbelttjekke sit stamtræ hvis det er muligt, og undersøge hvorvidt en alternativ metode giver samme stamtræ. Hvis ikke forskellige metoder giver samme stamtræ skyldes det ofte en kombination af mangel på data og at metodens antagelser ikke passer med data.

Opgaver til fylogenetiske træer

Herunder er der to opgaver der begge omhandler fylogenetiske træer.

Opgave 1. Truede tigre


Et af de vejledende eksamensopgavesæt der udkom i 2006 indeholdt en opgave om truede tigre. I opgaven fik man en multipel nucleotidalignment af seks tigre som vist herunder samt en delvist udfyldt afstandsmatrice.

Sekvenserne er ifølge opgaven et udsnit af det mitokondrielle DNA. Spørgsmålene herunder er stærkt inspireret af den vejledende eksamensopgave.

Sibirisk tiger	GCACCGTACCCCCCTCACTTTGTGGCACCTCTATATAATGCTACTAGGCTGCCG
Sydkinesisk tiger	ACGCCGCACTCCCTCCGCTTTGTGGCATCTCTACATGATGCCATCAAGCCACTG
Indokinesisk tiger I	GTACCGCACCCCCCTCGCTTTATAGCACTTCTATATAATGCTACTAGGCTGCTG
Indokinesisk tiger II	GCGCCGCACCCCCCTCGCTTTGTGATATCTTTACGTAATGCTACTAGGCTGCCG
Sumatra tiger	ACGCCGCACTCCCTTCGCTTTGCGGCGTCTCTACATAACGCCATTAGGTTGCTG
Bengalsk tiger	GCGCCGGACCCCCCTTGCTCTGTGGCATCTCTACATAACGTCATTAGACTGCTG

Her er vist en færdig udfyldt afstandsmatrice baseret på ovenstående sekvenser.

	Sibirisk tiger	Sydkinesisk tiger	Indokinesisk tiger I	Indokinesisk tiger II	Sumatra tiger	Bengalsk tiger
Sibirisk tiger	0	17	7	9	14	13
Sydkinesisk tiger		0	18	16	11	15
Indokinesisk tiger I			0	12	15	15
Indokinesisk tiger II				0	13	13
Sumatra tiger					0	10
Bengalsk tiger						0



1. Angiv fordele og eventuelle ulemper ved at anvende mitokondrie-DNA i stedet for kerne-DNA til slægtskabsundersøgelser af tætbeslægtede arter.
2. Lav et fylogenetisk træ baseret på de angivne sekvenser. Du kan enten lave træet i hånden eller ved hjælp af MEGA.
3. Diskuter med udgangspunkt i den konstruerede fylogeni, hvorvidt indokinesisk tiger I og indokinesisk tiger II bør betragtes som en eller to separate arter.

Opgave 2. Isbjørnen og dens familie

På videnskab.dk kunne man d. 19. oktober 2011 i artiklen 'Den brune bjørns arvemasse kortlagt', læse følgende:

En bjørn fra nationalparken Pasvik i Norge har fået sit genom kortlagt. Det kan blive nøglen til banebrydende klima- og evolutionsforskning. Forskerne håber at lære mere om artens tilpasning til et nyt klima.

...

Brunbjørnens genom har specielt stor betydning på grund af det nære slægtskab med isbjørnen – selve symbolet på klimaændring.

Nyere studier ved BiK-F viser, at den brune bjørn og isbjørnen først udviklede sig til forskellige arter for 600.000 år siden, og at arterne er langt ældre end først antaget. At sammenligne deres genomer vil derfor fortælle meget om, hvordan de har formået at tilpasse sig forskellige klimaer.

Det samlede mitokondriegenom er kendt for en række forskellige bjørnearter. Herunder er vist en afstandsmatrice baseret på antal parvise forskelle.

	Panda	Kravebjørn	Am. sortbjørn	Isbjørn	Brun bjørn
Panda	0	27	26	26	25
Kravebjørn		0	8	12	11
Am. sortbjørn			0	13	13
Isbjørn				0	5
Brun bjørn					0

1. Tegn et UPGMA-træ for de fem bjørnearter baseret på ovenstående afstandsmatrice.

På den grønlandske nyhedstjeneste knr.gl kunne man d. 3. maj 2010 i artiklen 'Hybridbjørn fanget i Canada', læse følgende:

En yderst sjælden blanding mellem en grizzlybjørn og en isbjørn er blevet skudt i Nordvest Territoriet i Canada.

Hybrid-bjørnen blev skudt for en måned siden nær Ulukhaktok, og det var dens usædvanlige udseende, som efterfølgende fik biologer til at foretage en nærmere undersøgelse, oplyser canadisk CBC.

Og nu står det klart, at det drejer sig om en hybrid-bjørn, som på canadisk er blevet til en pizzly eller en grolarbjørn. Hybriden har hvid pels og et hvidt hoved som en isbjørn – men brune ben og brune poter som en grizzly¹. Biologer vurderer, at vi fremover vil komme til at se flere og flere hybridbjørne. Blandt andet på grund af klimaændringer. 'Når havisen forsvinder om sommeren, strander isbjørnene på land, og på den måde kommer de i kontakt med grizzly-bjørnene, siger marinebiolog Brendan Kelly.'

¹ Grizzlybjørne er et populært navn for Nordamerikanske bjørne af arten brun bjørn.

2. Diskutér på baggrund af artiklen hvorvidt isbjørnen og den brune bjørn bør betragtes som to forskellige arter eller to underarter af den samme art, inddrag dit UPGMA stamtræ.
3. Download nedenstående fil med en alignment af 12sRNA-genet fra otte bjørne og konstruer et UPGMA-stamtræ i MEGA baseret på denne alignment. Hvilke to bjørnearter er tættest beslægtet ifølge dette stamtræ?

www.bioteknologibogen.dk/bioteknologi-6/data/12S-rRNA-Bjoerne.meg