



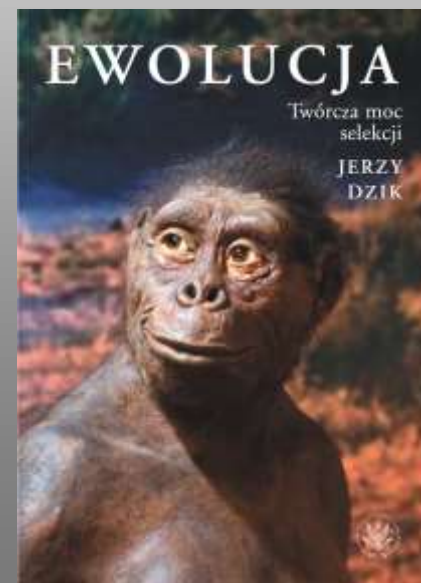
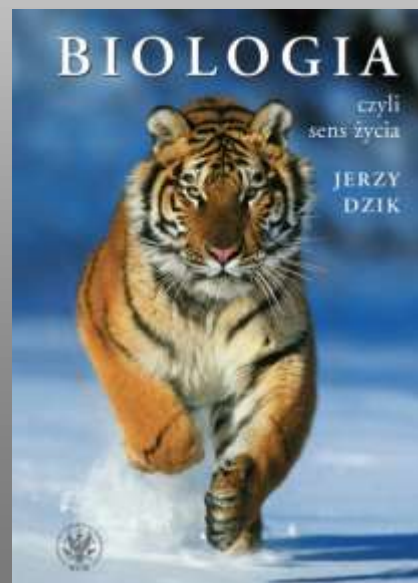
Ewolucja **7.**

# FILOGENETYKA

**Jerzy Dzik**

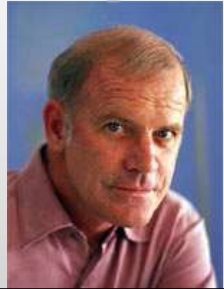
*Instytut Paleobiologii PAN  
Instytut Biologii Ewolucyjnej UW*

2022



# ŹRÓDŁO DANYCH

## amplifikacja PCR

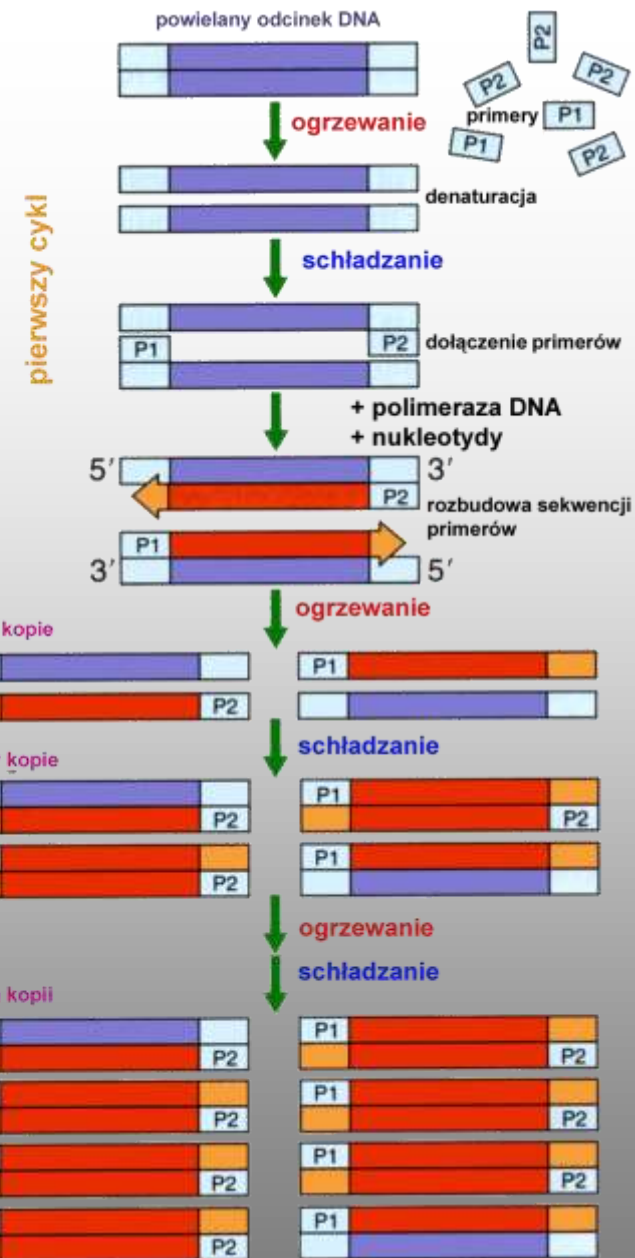


termocykler do PCR

Kary B. Mullis (1944–2019)  
1984 udoskonalił PCR



- polimeraza bakterii termofilnych do naprzemiennego rozplatania nici DNA i przyłączania
- syntetycznych odcinków DNA (*primers*) do krańców sekwencji
- polimeraza DNA dobudowuje wtedy dodane do roztworu trifosforany deoksyATP, dCTP, dGTP i dTTP



wyższa temperatura nie niszczy polimerazy *Thermophilus aquaticus*

# AMPLIFIKACJA

## kopalnego DNA



George (2019)

- fragmentacja nici i deaminacja nukleotydów ogranicza trwałość
- trzeba użyć równocześnie wielu primerów (multiplex PCR)
- DNA nie starsze niż 0,8 mln lat przetrwa (w zimnym klimacie)
- zbyt krótko, by zapisać ewolucję

**amplifikacja daje dość materiału, by umożliwić sekwencjonowanie**

# DNA sekwencjonowanie

sekwenator DNA

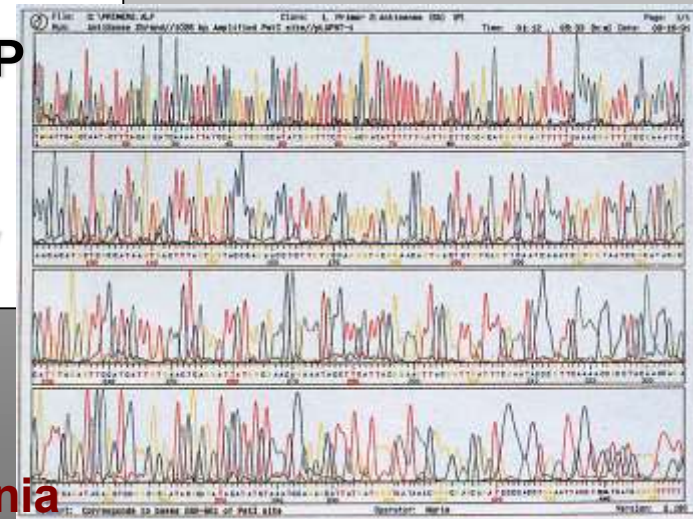


Gel:

|       |   |                            |
|-------|---|----------------------------|
| Black | G | GCGAATGCGTCCACACGCTACAGGTG |
| Red   | T | GCGAATGCGTCCACACGCTACAGGT  |
| Black | G | GCGAATGCGTCCACACGCTACAGG   |
| Black | G | GCGAATGCGTCCACACGCTACAG    |
| Green | A | GCGAATGCGTCCACACGCTACAG    |
| Blue  | C | GCGAATGCGTCCACACGCTAC      |
| Green | A | GCGAATGCGTCCACACGCTAC      |
| Red   | T | GCGAATGCGTCCACACGCT        |
| Blue  | C | GCGAATGCGTCCACACGCT        |
| Black | G | GCGAATGCGTCCACACG          |
| Blue  | C | GCGAATGCGTCCACAC           |
| Green | A | GCGAATGCGTCCACAA           |
| Green | A | GCGAATGCGTCCACA            |
| Blue  | C | GCGAATGCGTCCAC             |
| Green | A | GCGAATGCGTCCA              |
| Blue  | C | GCGAATGCGTCC               |
| Blue  | C | GCGAATGCGTC                |
| Red   | T | GCGAATGCGT                 |
| Black | G | GCGAATGCG                  |
| Blue  | C | GCGAATGC                   |
| Black | G | GCGAATG                    |
| Red   | T | GCGAAT                     |

kolejność  
odcinków  
DNA na żelu z  
elektroforezy

- 1976 reakcja Sangera: wstawienie dideoksyrybozy (bez OH<sup>-</sup> na końcu 3') do nukleotydu blokuje wzrost nici DNA
- jeśli do ddATP, ddCTP, ddGTP i ddTTP dołączyć małowcząsteczkowe związki fluoryzujące, można równocześnie rozpoznawać cztery nukleotydy w UV



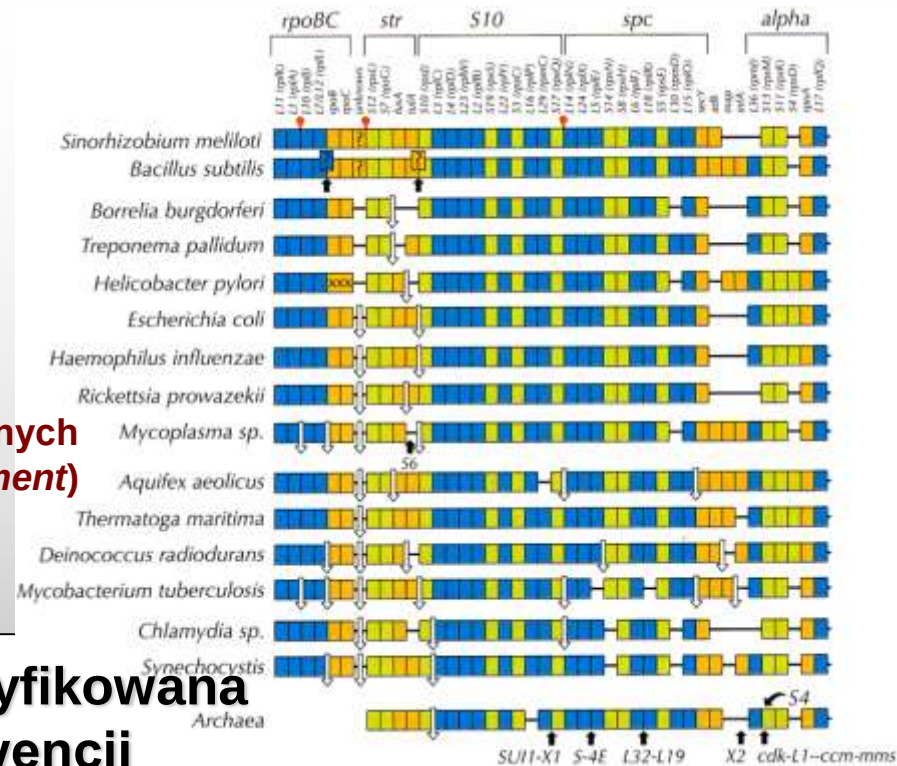
są też techniki masowego sekwencjonowania

automatyczne oznaczenia spektrofotometryczne

# HOMOLOGIA sekwencji

geny operonów białek rybosomalnych  
(sequence alignment)

- homologia molekularna identyfikowana na podstawie zgodności sekwencji
- ortologia między genomami
- paralogia między współwystępującymi genami – rezultat duplikacji genowej



Barloy-Hubler et al. (2001)

rozpoznanie homologii służy ustaleniu pokrewieństw gatunków

# FENETYKA

## analiza zgodności cech



Robert R. Sokal (1926–2012)

- sumowana jest liczba identycznych nukleotydów w homologicznych pozycjach między każdą parą gatunków
- uzyskuje się drzewo przez dołączanie do każdego węzła po parze odgałęzień (*neighbour joining*)
- dodatkowe kryterium optymalizacji to najmniejsza możliwa sumaryczna długość gałęzi drzewa (*minimum evolution*)

zamiast gatunków analizie podlegać mogą poszczególne cechy

# KLADYSTYKA

## analiza rozprzestrzenienia cech

PHYLP



PAUP



MacClade



Hennig86



MrBayes



- sumowana jest liczba zmian nukleotydów w każdym z możliwych układów gatunków na kladogramie
- wybiera się drzewo o możliwie najmniejszej liczbie substytucji nukleotydów (*maximum parsimony*)
- dąży się do drzewa odzwierciedlającego ewolucję

zwykle tylko część danych udaje się poddać analizie (heurystycznej)

# ANALIZA kladystyczna

analizowane sekwencje:

|            |   |          |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------------|---|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <b>I</b>   | G | <b>A</b> | T | C | C | T | A | G | G | C |
| <b>II</b>  | G | <b>G</b> | T | C | A | C | A | T | G | T |
| <b>III</b> | G | <b>G</b> | T | C | A | T | A | T | C | T |
| <b>IV</b>  | G | <b>A</b> | T | A | C | C | A | G | C | A |

jednostkowa analiza pokrewieństw: **A**(IV) (I)**A**

hipoteza wymaga 2 zmian w tym miejscu



w sumie taka hipoteza o  
pokrewieństwie wymaga

**G**(III) (II)**G**

12 zmian w całej sekwencji: 0 2 0 1 2 1 0 2 2 2

- wybór najprostszej drogi przemian czyli metoda parsymonii (PAUP – *phylogeny analysis using parsimony*)
- ale prawdopodobieństwo substytucji jest różne
- pewna część zgodności jest skutkiem rewersji

można to uwzględnić przy konstruowaniu drzewa

# OCENA

## prawdopodobieństwa drzewa



Joseph Felsenstein (1942-)

- inna częstość wymiany puryny na purynę niż pirymidynę; pewne kolejności mutacji są rzadsze od innych
- można na tej podstawie oszacować prawdopodobieństwo wygenerowanego drzewa (metoda *maximum likelihood*)

technika czasochłonna przy długich sekwencjach

# SZYBSZE

## podejście bayesowskie

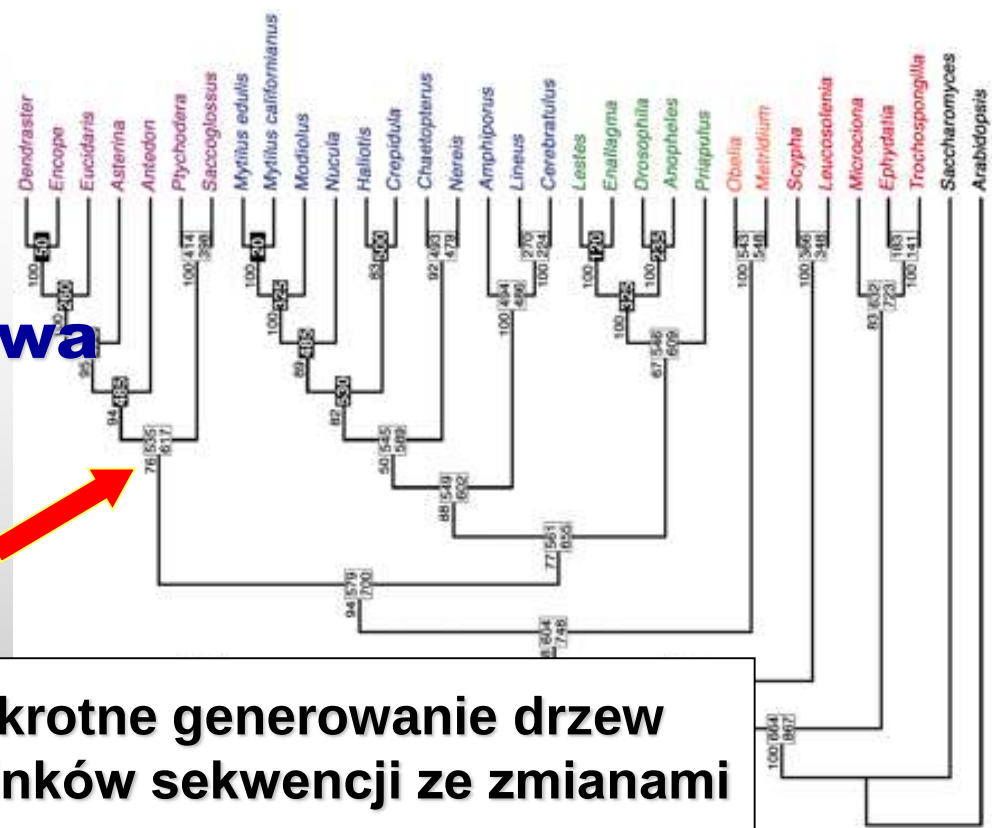


Thomas Bayes (1702-1761)

- punktem wyjścia drzewo z jednakowym (lub arbitralnym) prawdopodobieństwem substytucji
- następnie, uwzględniając czynniki deformujące (np. tempa substytucji w gałęziach),
- *a posteriori* oceniana jest zasadność drzewa

drzewo zyskuje wewnętrzną spójność przez ważenie danych

# OCENA wiarygodności drzewa



- technika *bootstrap*: wielokrotne generowanie drzew z losowo wybranych wycinków sekwencji ze zmianami
- rezultaty porównywane z pierwotną wersją drzewa
- zgodność rozgałęzień oceniana w procentach – oporność na zmiany sekwencji (wiarygodne od 70%)

pomaga ocenić, czy dodatkowe dane mogłyby zmienić kształt drzewa

# **ZEGAR**

## **molekularny**

Emile Zuckerkandl (1922-2013)



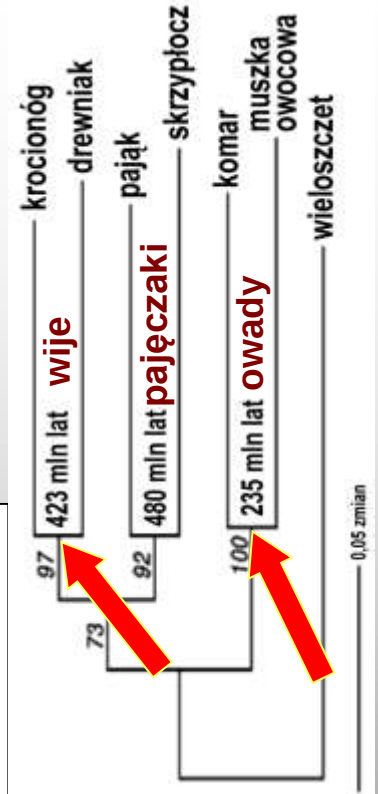
- **1962 Emile Zuckerkandl & Linus Pauling: założenie stałego tempa zmian w określonym typie cząsteczki niezależnie od organizmu**
- **tylko substytucja prowadząca do zmiany aminokwasu może być przejawem ewolucji pod wpływem doboru naturalnego**
- **koncepcja równomiernie tykającego zegara do takich sytuacji nie przystaje**

**kladogram jest deformowany przez różne tempo zmian**

# KALIBROWANIE

## zegara molekularnego

- tempo substytucji w homologicznych genach (białkach) bywa dramatycznie odmienne
- nieuwzględnienie tego prowadzi do dogłębnej deformacji drzewa (*long branch attraction*)
- czasem porównanie tempa przemian różnych genów w tych samych liniach umożliwia wyeliminowanie tego zniekształcenia



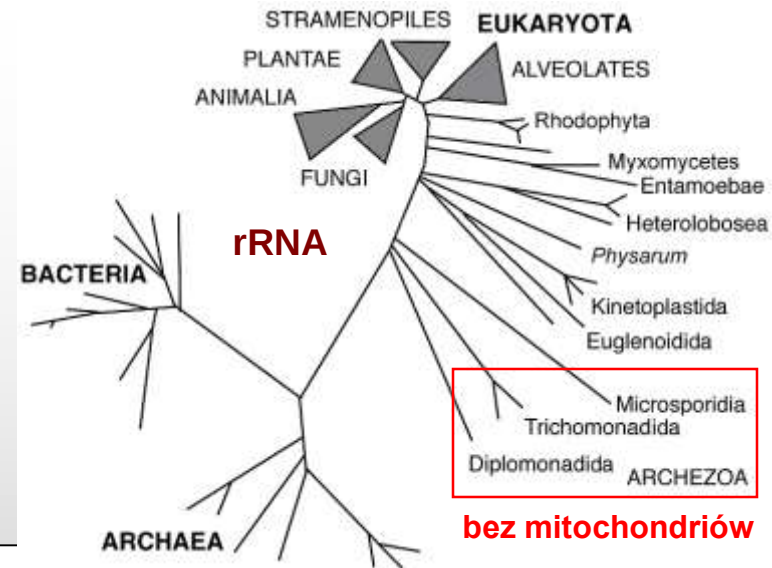
## Peterson & Butterfield (2005)

**tempo mutowania jest generalnie większe w skrajnych warunkach**

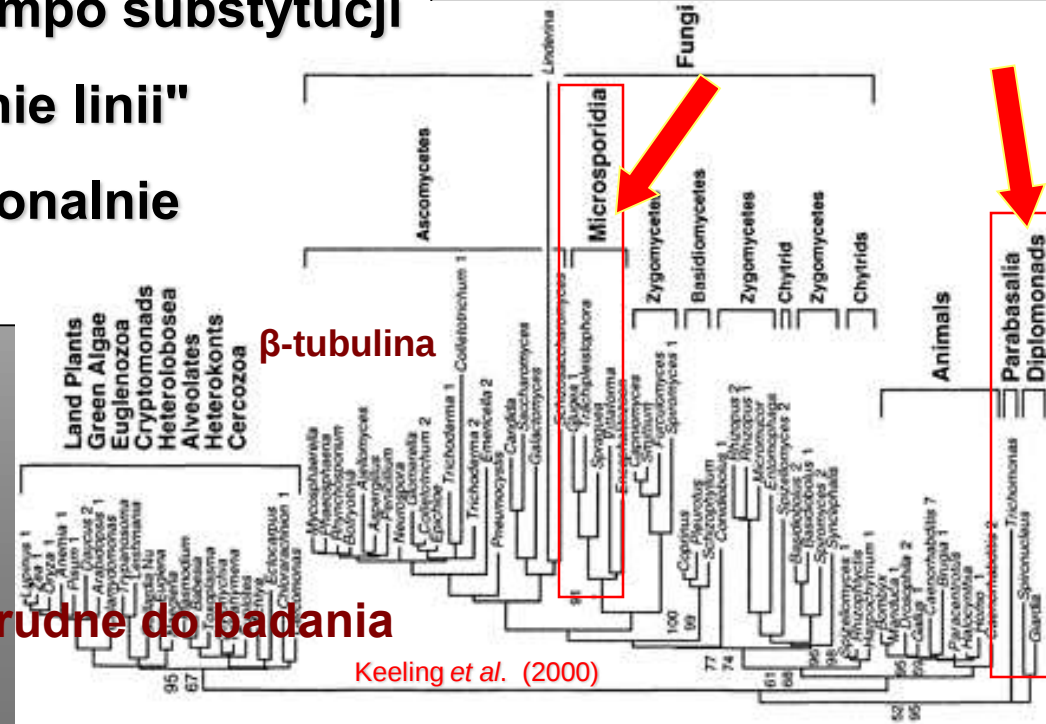
# MICROSPORIDIA

## a grzyby

- skrajne beztlenowe warunki życia zwiększają generalne tempo substytucji
- w rezultacie "przeciąganie linii"
- ale białka istotne funkcjonalnie zmieniają się wolniej



pokrewieństwa pasożytów trudne do badania



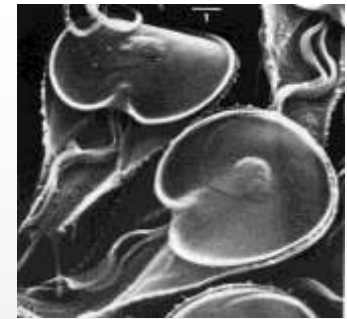
Keeling et al. (2000)

# ORGANIZMY bez mitochondriów

- mitochondria utraciły jednokomórkowce żyjące w beztlenowym środowisku, gdzie nie można pozyskiwać energii z oddychania
- geny mitochondrialne pozostały w ich jądrach

pasożytnicze  
eugleny

*Trichomonas*



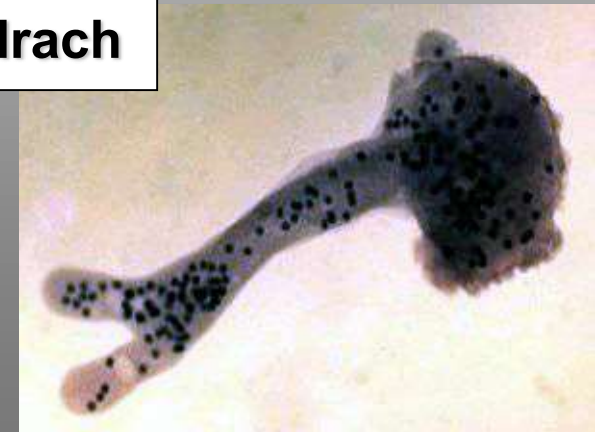
*Giardia*  
Diplomonadida



*Fibrillanosema*  
Microsporidia

pasożytniczy  
grzyb

ameba ze szczątkową wicią  
*Pelomyxa*



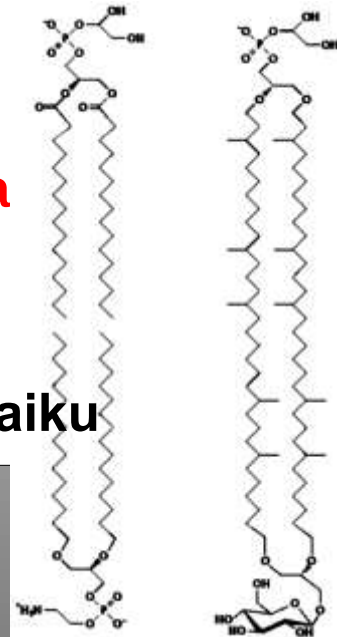
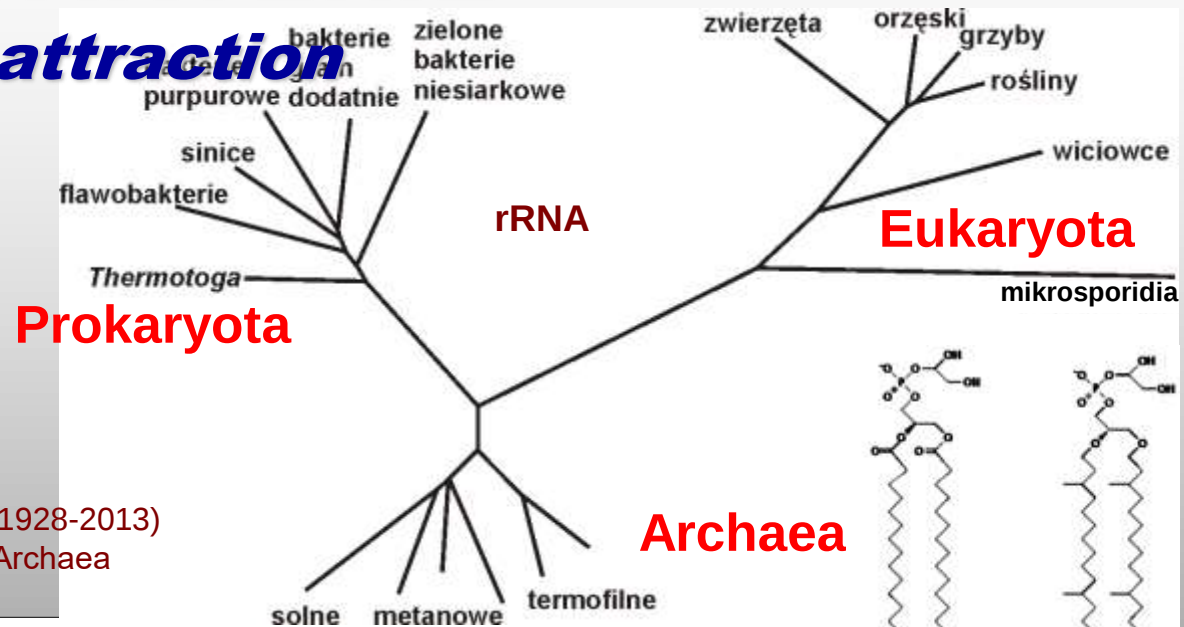
to przykład ewolucyjnej konwergencji

# ARCHEOBAKTERIE

## *a long branch attraction*



Carl R. Woese (1928-2013)  
1977 królestwo Archaea



błona komórkowa  
bakterii i archeobakterii

- całkowicie odrębny kład na drzewie rodowym rRNA
- żyją w warunkach przypominających te w erze archaiku

relikty życia sprzed miliardów lat czy *long branch attraction*?

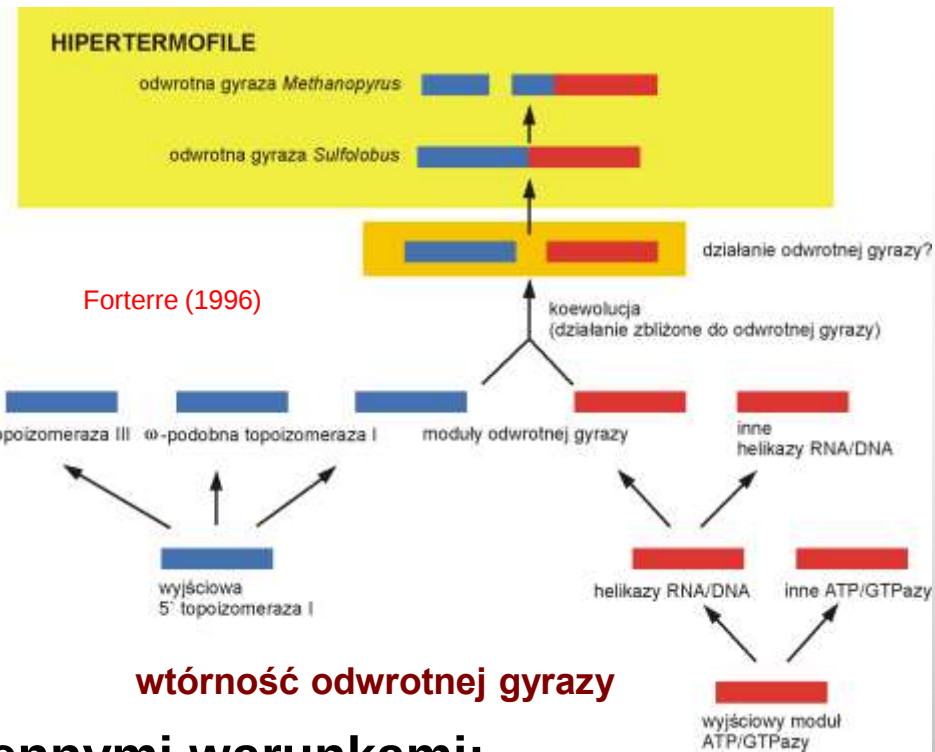
# BAKTERIE

## skrajnych środowisk

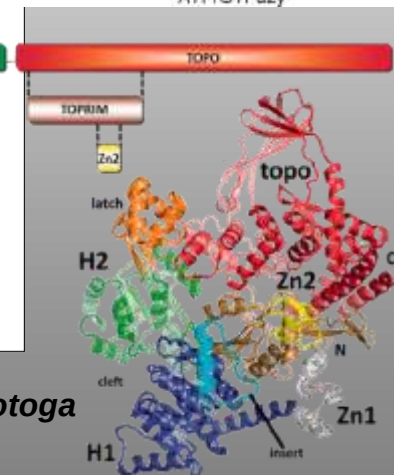


Patrick Forterre (1949-)  
1996 wtórność Archaea

- zabezpieczenia przed mutagennymi warunkami:
- enzymy dodatkowo zwijające chromosom
- wiązania eterowe w błonie trwalsze od estrowych
- ryboza w RNA bez grupy OH (metylacja)



odwrotna gyraza *Thermotoga*

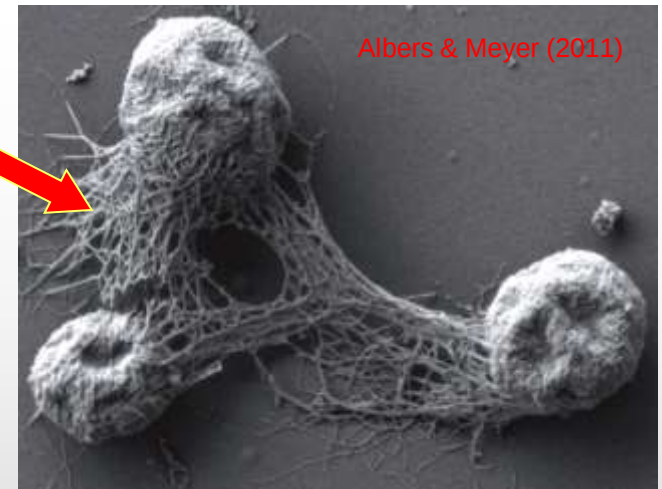


dzisiejsze organizmy o nadzwyczajnej odporności nie są pierwotne

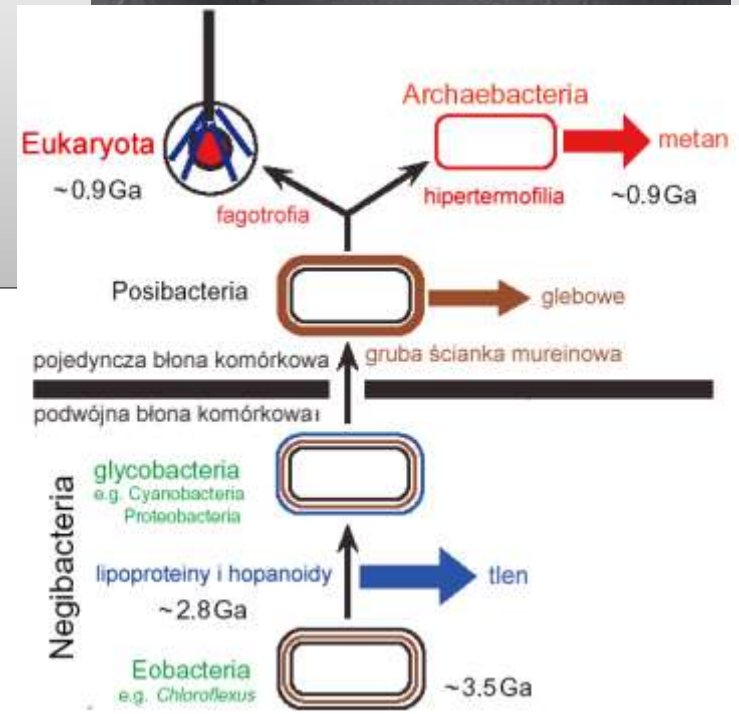
# POCHODZENIE archeobakterii

flagella  
homologiczne pili IV typu

archeobakteria  
*Methanocaldococcus*



- budowa komórki nie jest pierwotna
- pseudomureina metanobakterii całkiem późna ewolucyjnie
- powstały w wyniku adaptacji do hipertermofilności lub halofilności

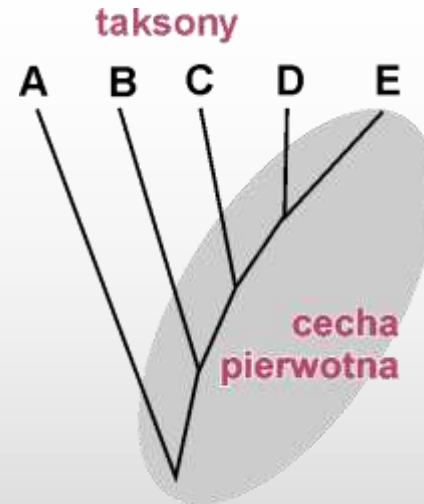


Cavalier-Smith (2012)

drzewo molekularne może być niezgodne z morfologicznym

# OGRANICZENIA

## metody filogenetyki



- odmienność organizmów jest proporcjonalna do czasu trwania ich osobnej ewolucji
- ale niekoniecznie linie wcześniej oddzielone przechowują cechy pierwotne
- informacja o dawnych stanach może być całkowicie wymazana z genomu

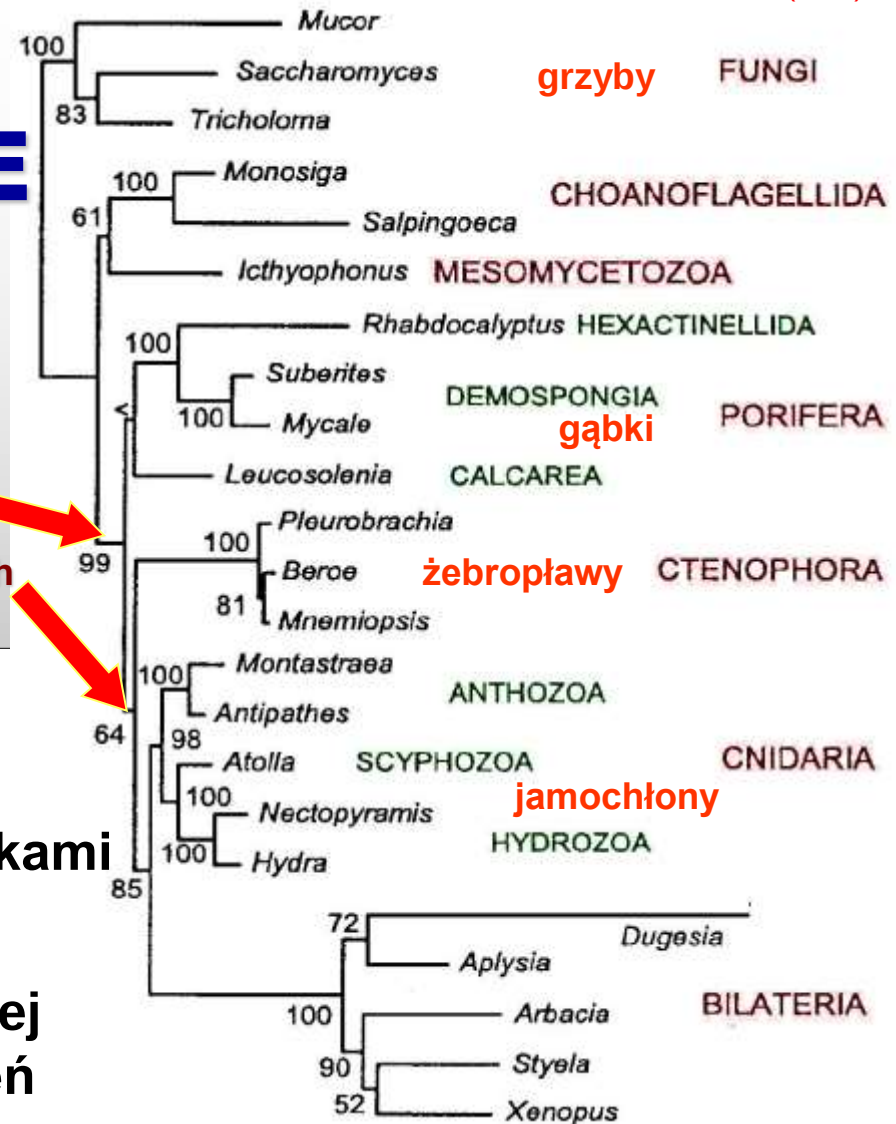
powiązania molekuł z morfologią bywają zaskakujące

# POCHODZENIE zwierząt

błona podstawna u larw

błona podstawna u dorosłych

- dane molekularne przełamały kryzys zoologii ewolucyjnej
- zwierzęta okazały się krewniakami grzybów (Opisthocontae)
- a w ich ewolucji morfologicznej dużo jest wtórnych uproszczeń



obie podjednostki rRNA

większość drzew molekularnych jest jednak niespójna logicznie

**filogeneza 28s rRNA, dopasowanie z  
uwzględnieniem struktury drugorzędowej**

## wnioskowania molekularne nie przełamują zaniku sygnału filogenetycznego

***alignment* utrudniony wtedy nawet przy uwzględnieniu struktury drugorzędowej**

## ewolucja wymazała większość pierwotnej informacji genetycznej



**filogeneza 28s rRNA, dopasowanie z  
uwzględnieniem struktury drugorzędowej**

- drzewa molekularne często pokazują pokrewieństwa ewidentnie fałszywe
- oczekuje się zgodności wyników z różnych zestawów danych
- ale są nierozstrzygalne sprzeczności między anatomią a molekułami

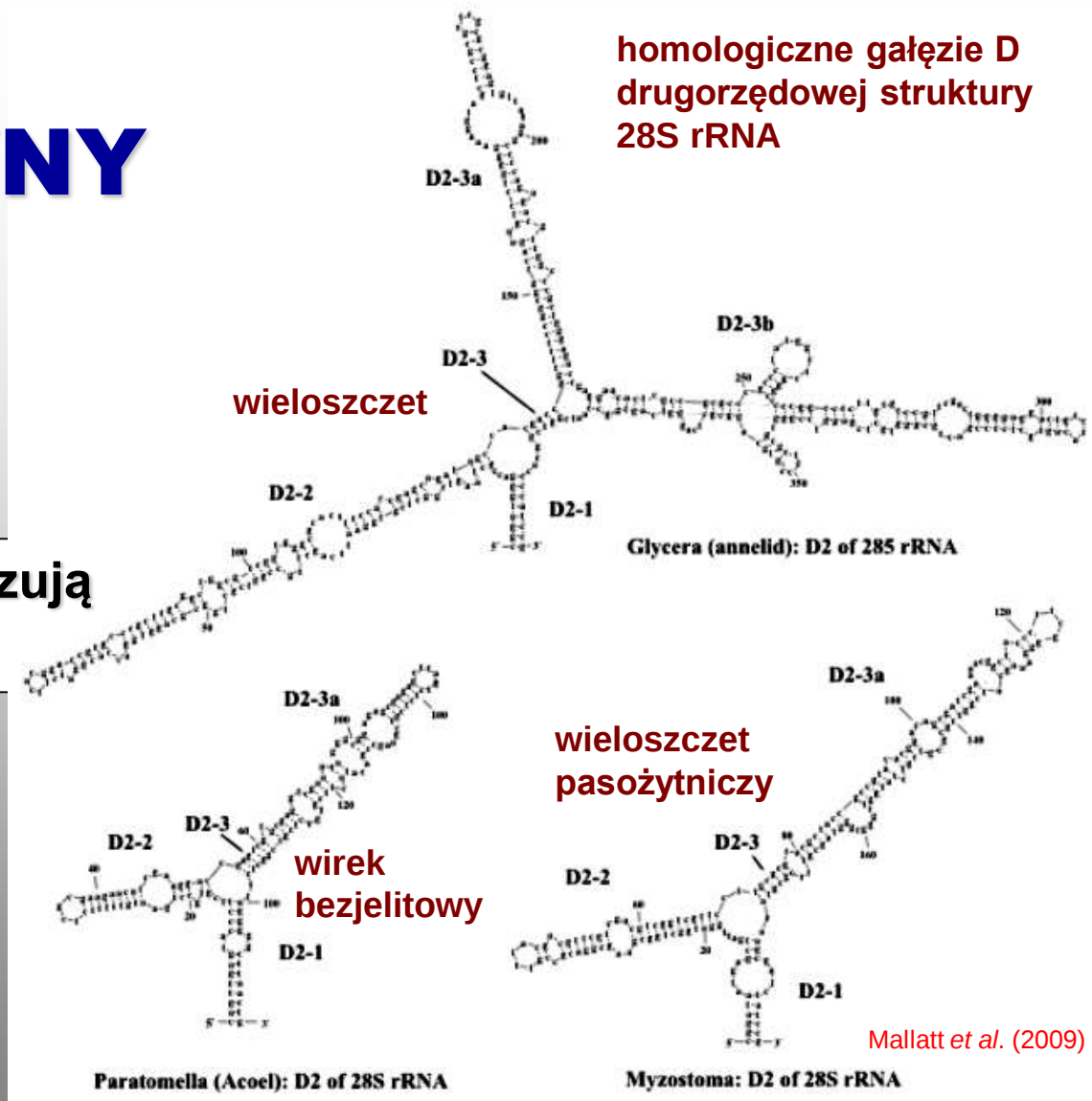
Mallatt *et al.* (2009)

**gałęzie  
w niewłaściwym położeniu**

efekt rewersji i homoplazji podobny na poziomie morfologii i molekuł

# PRZYCZYNY sprzeczności

- uproszczenia zamazują obraz filogenezy



arbitrem jest paleontologia

# FILOGENEZA

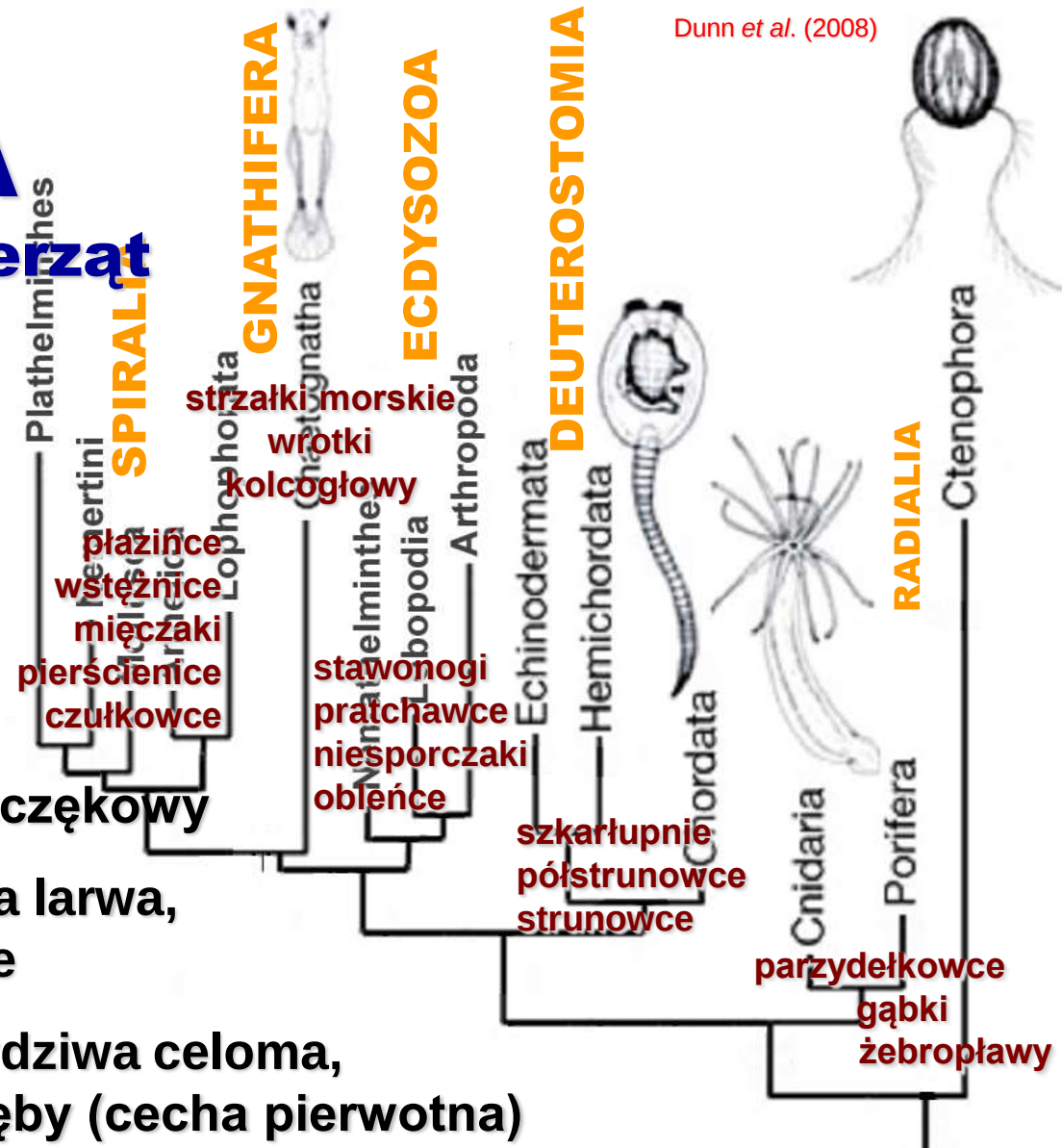
## molekularna zwierząt



Armstrong (2002)

embrion  
zebroplawa

- Ecdysozoa – liniejące
- Gnathifera – aparat szczękowy
- Spiralia – planktonowa larwa, spiralne bruzdkowanie
- Deuterostomia – prawdziwa celoma, odbył w miejsce prągnięcia (cecha pierwotna)



Dunn et al. (2008)

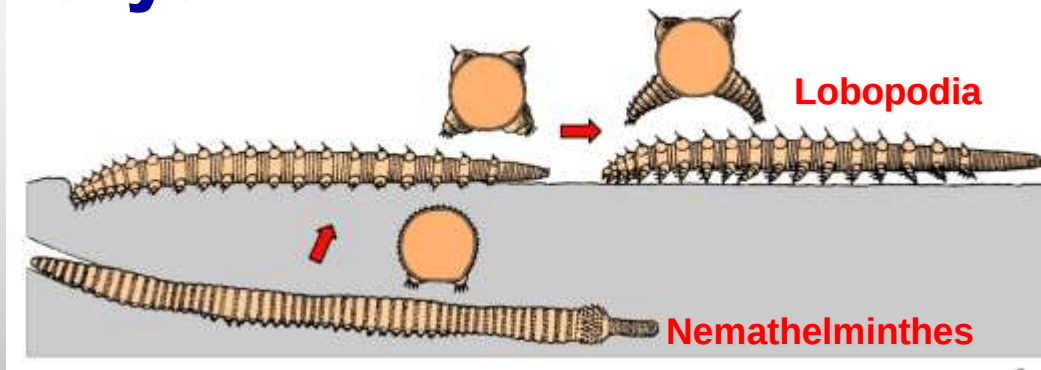
interpretacja sprzeczna z tradycyjną ale zgodna z paleontologią

*Xenusion* kambr 540 mln lat

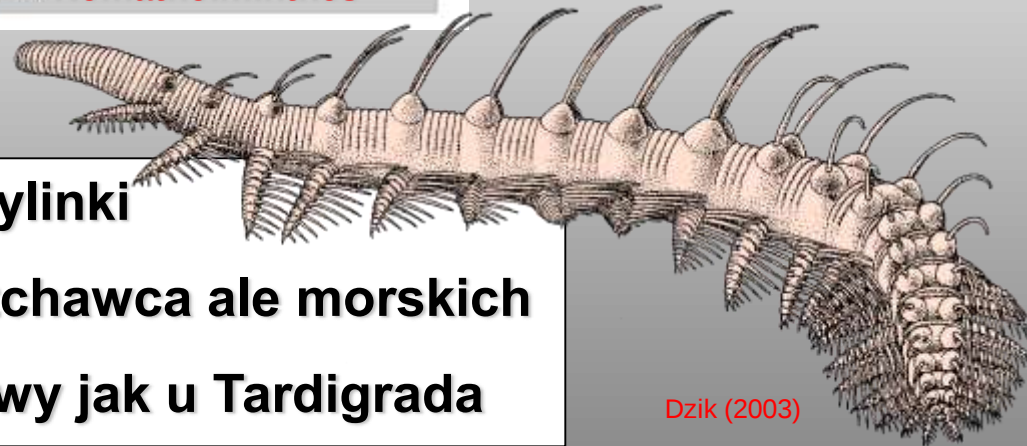
# OGNIWO WIAŻĄCE

## Ecdysozoa

Dzik & Krumbiegel (1989)



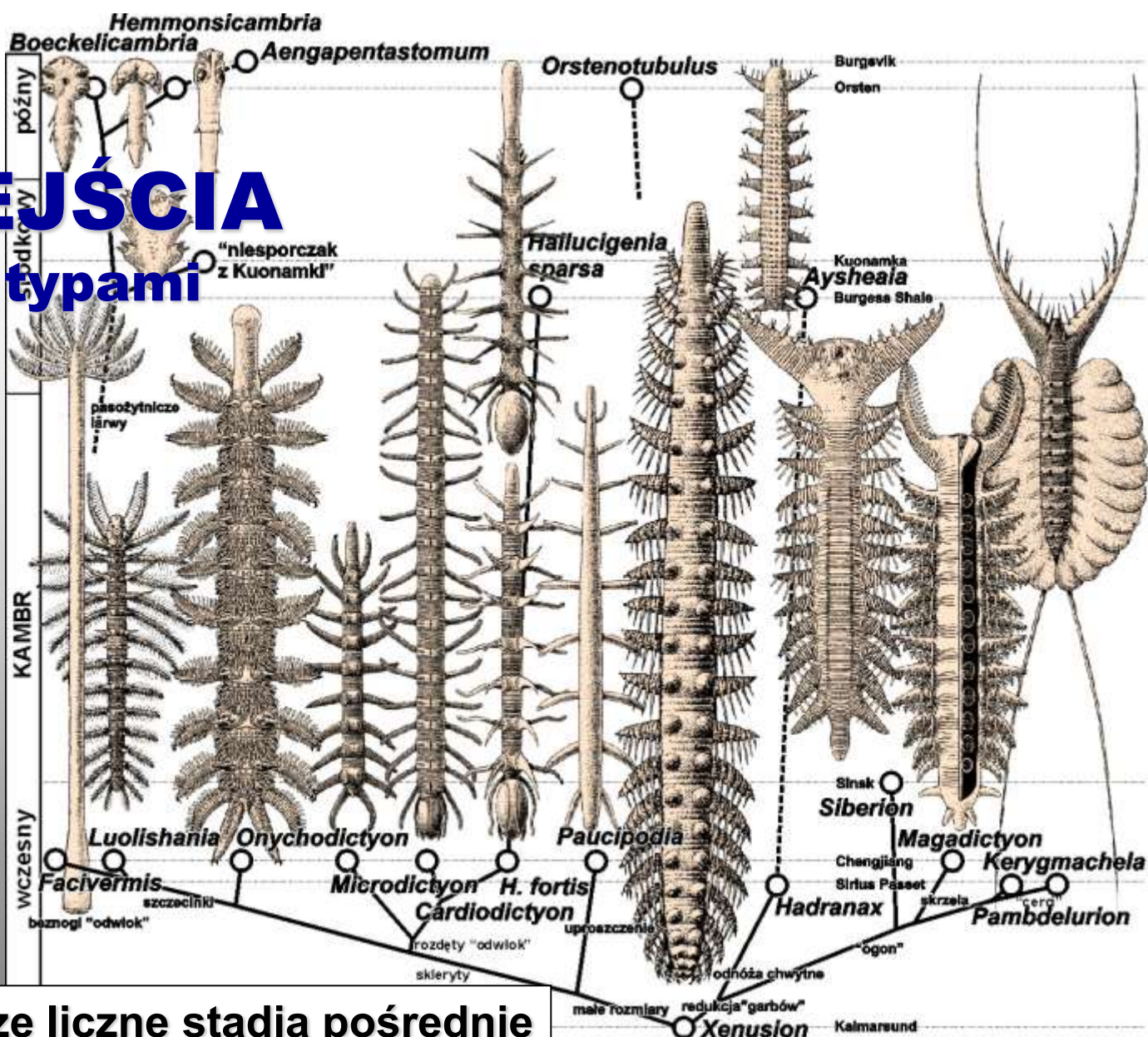
- od początku kambru wylinki
- zwierząt o pokroju pratchawca ale morskich
- terminalny otwór gębowy jak u Tardigrada



Dzik (2003)

anatomicznie pośrednie między niesporczakami a obleńcami

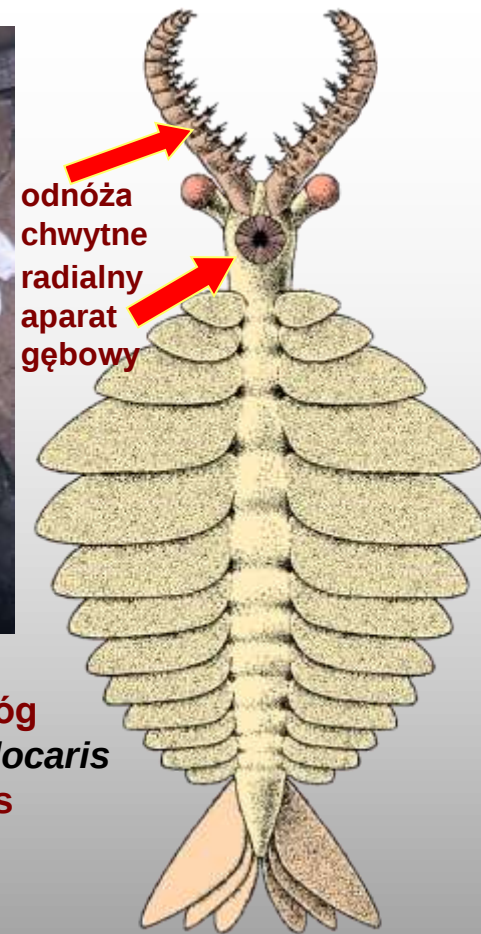
# PRZEJŚCIA między typami



■ w kambrze liczne stadia pośrednie między Xenusia i stawonogami

# PIERWSZE kambryjskie stawonog

- *Anomalocaris* jako stawonóg: zesklerytyzowane człony co najmniej pierwszej pary odnóży, oczy złożone, zagięta do tyłu gardziel
- dziedzictwem po obleńcach radialny aparat gębowy i ryjek



przedmiotem sporów jest wciąż budowa odnóży pozagębowych

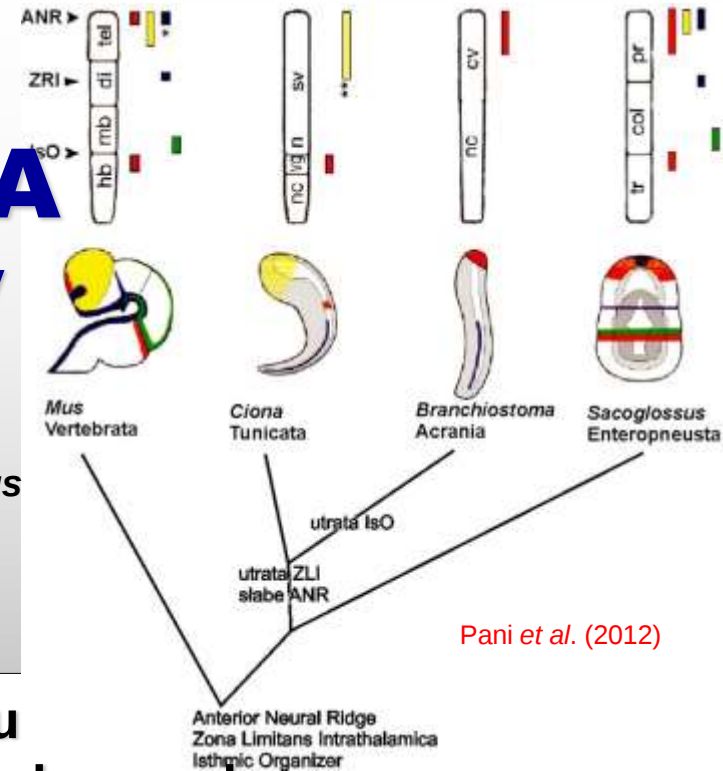
# ZASTANAWIAJĄCA

## konfiguracja pokrewieństw



*Spartobranchus*  
kambr 530 Ma

Caron *et al.* (2013)



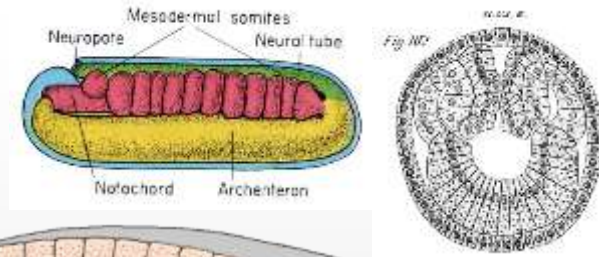
Pani *et al.* (2012)

- regulacja rozwoju centralnego układu nerwowego kręgowców taka jak jelitodysznych
- lancetnik i osłonice są uwstecznione pod tym względem
- w kambrze jelitodyszne filtratorami budującymi organiczne rurki

ekspresja homologów genów regulujących rozwój mózgu

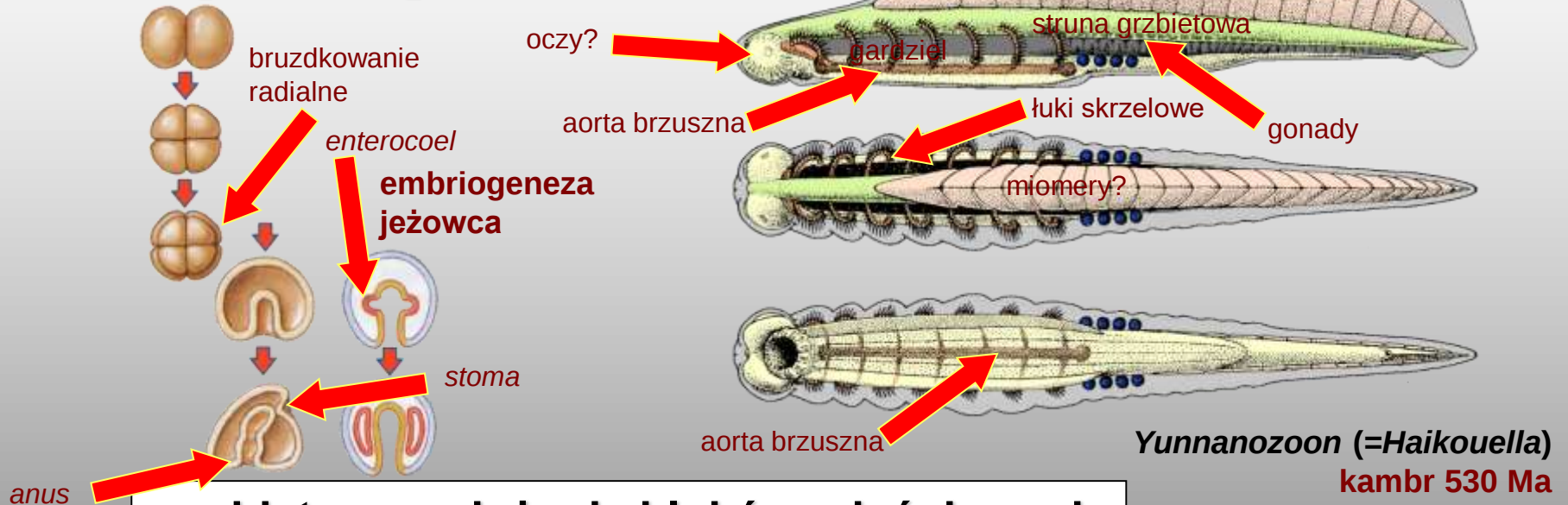
jak więc naprawdę wyglądał wspólny przodek wtóroustych?

*Branchiostoma* dziś



# **YUNNANOZOOON**

## **najstarszy strunowiec**



**Yunnanozoon (=Haikouella)**  
**kambr 530 Ma**

Dzik (1995)  
Chen *et al.* (2004)  
Cong *et al.* (2014)

- grzbietowe położenie bloków mięśniowych
- zgodne z rozwojem zarodkowym lancetnika
- deuterostomia i enterocelia to plezjomorfie

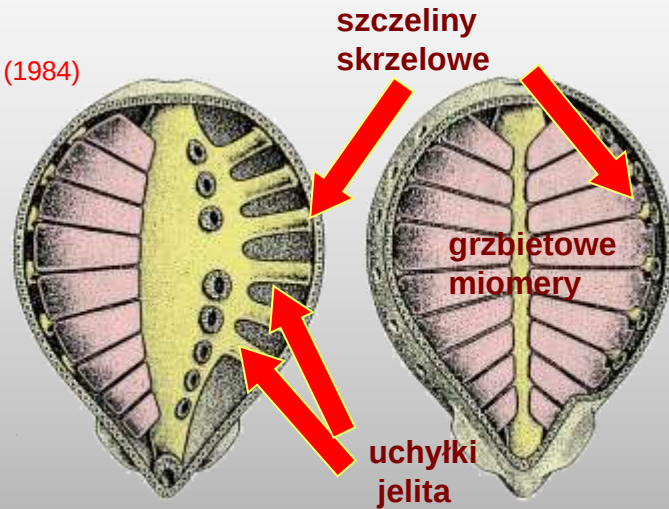
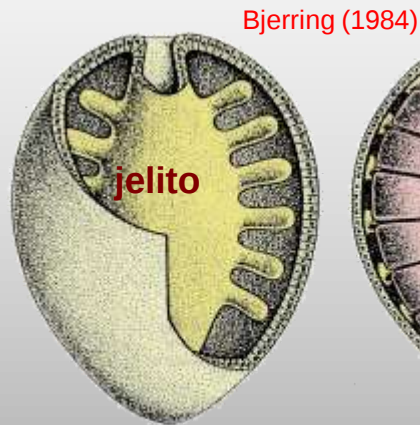
plezjomorfie – cechy pierwotne  
(syn)apomorfie – swoiste cechy zaawansowania

**skamieniałości sugerują to samo co embriologia**

# PRAPRZODEK

## Bilateria

*Dickinsonia wend* 555 Ma

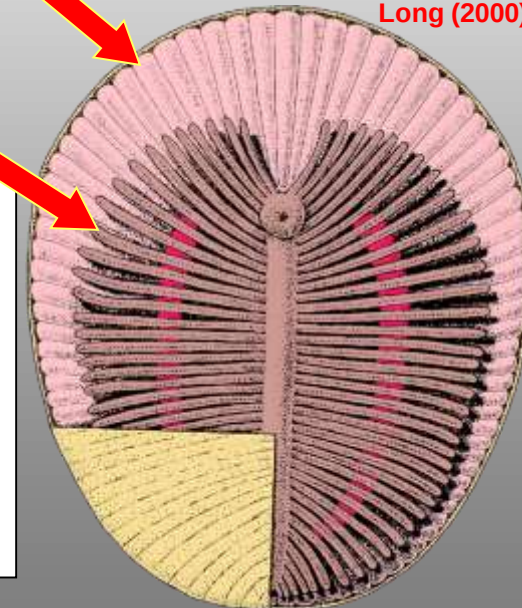


uchyłki jelita



grzbietowe komory mięśniowe

Long (2000)



uchyłki jelita

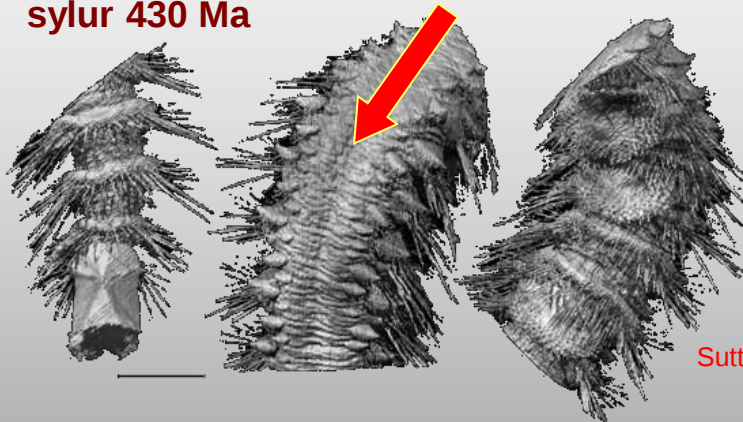
- seryjne wypustki jelita, gonady między nimi, i grzbietowe komory mięśniowe
- mogą być plezjomorfiami dla Dipleurozoa i wszystkich dwubocznych zwierząt
- oraz żebroławów?

niezależne interpretacje wiodą do jednego rezultatu

Dzik (2004)

# TAJEMNICA pochodzenia Spiralia

chiton? *Acaenoplax* nie ma podeszwy  
sylur 430 Ma

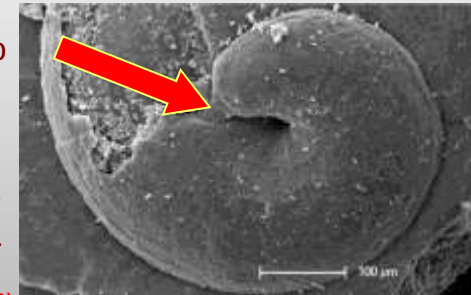


„ślimak” *Pelagiella*  
kambr 510 Ma



chaetae

„ślimak” *Aldanella*  
kambr 540 Ma



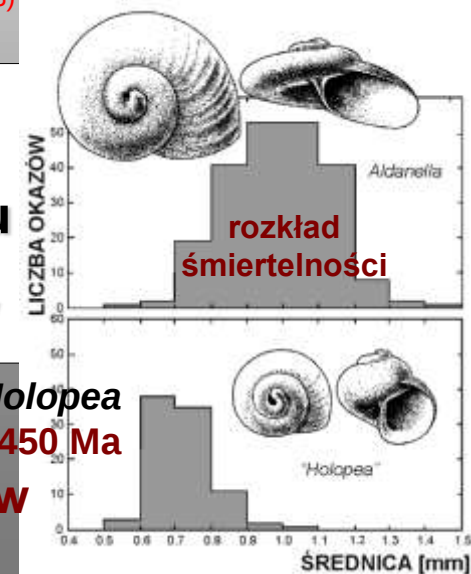
mucro

Sutton et al. (2001) Dzik & Mazurek (2013)

- kambryjskie „ślimaki” miały szczecinki
- ślady pełzania mięczaków od późnego kambru
- pierwsze mięczaki podobne do wieloszczetów

prawdziwy ślimak *Holopea*  
ordowik 450 Ma

nie ma spójnej teorii wyjaśniającej genezę mięczaków



**i skamien**



BRY

