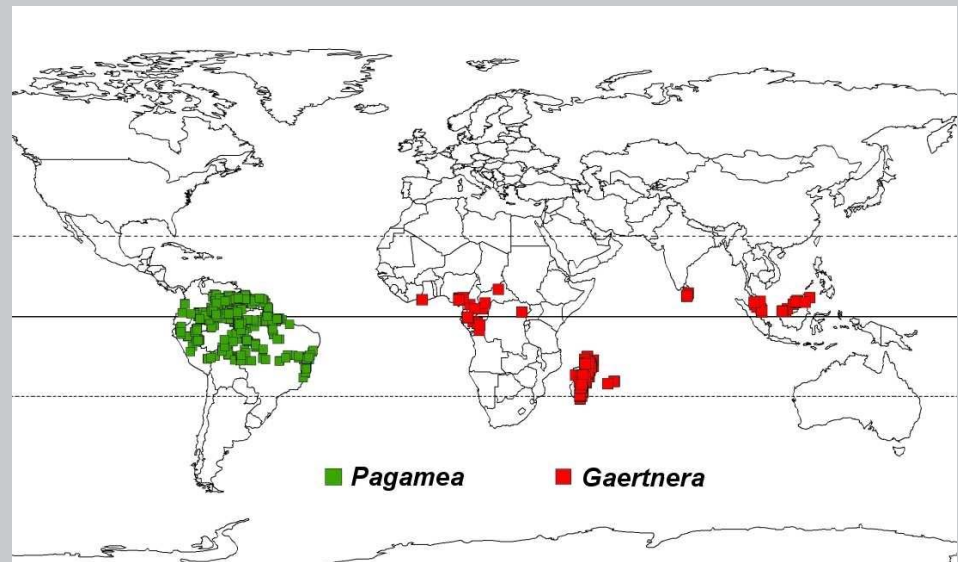


Malcomber S.T. (2000): Phylogeny of *Gaertnera* Lam. (Rubiaceae) based on multiple DNA markers: evidence of a rapid radiation in a widespread, morphologically diverse genus.  
*Evolution* 56(1):42-57



# Proč to studovali ?

- fylogenetické vztahy v rodu *Gaertnera*
- výzkum genetické variability geograficky široce rozšířeného a morfologicky diverzifikovaného rodu
- využití nekodujících úseků jaderného genomu

# Studovaný rod

- 68 druhů – malé stromy a keře
- vlhké tropické oblasti – Afrika, Madagaskar, Sri Lanka, JV Asie
- regionální endemity
- morfologická diverzifikace – květenství, palisty, kalich, barva květů
- *Pagamea* – sesterská skupina
- *Morinda* – outgroup

# Metodika

- CTAB DNA extrakce + purifikace
- ITS – přímé sekvenování nebo klonování
- *PepC*, *Tpi* – klonování
- sekvenování dvou až šesti klonů z každé PCR
- alignment – Sequencher, Seqman, ClustalW
- test kongruence mezi jednotlivými sadami sekvencí
- maximum parsimony + maximum likelihood
- test molekulárních hodin
- odhad doby divergence jednotlivých skupin pomocí různých kalibračních metod

# Fylogenetická analýza

- PAUP
  - TBR branch swapping
  - 1000 random addition sequence replicates
  - gaps – missing data
  - MAXTREES = 10 000
- *converse constraint heuristic search* – strict consensus z první analýzy použit jako constraint při hledání dalších stejně nebo více parsimonních stromů
- bootstrap support

# ILD test

- incongruence length difference test (Farris et al. 1994)
- kritérium pro kombinovatelnost různých sad sekvencí
- jaká část zjištěné homoplazie je způsobena kombinací různých dat?
- určen k detekci silně podpořených konfliktů znaků („hard incongruence“)

# Kombinovaná molekulární analýza

- 31 druhů – kombinovaný dataset
- MP
- náhodně vybraný strom -> Modeltest -> identifikace vhodných parametrů pro ML
- ML

# Analýza molekulárních hodin

- k odhadu doby diversifikace
- konstantní rychlost změn mezi liniemi (rate constancy among lineages)
- ML tree – absence vs. presence molekulárních hodin
- absolutní doba divergence – tři kalibrace
  - vznik *Mauritia* (8 mil.)
  - *Pagamea* diversifikována při oddělení J. Ameriky od Afriky (95 mil.)
  - oddělení *Pagamea* souvisí s prvními fosiliemi *Rubiaceae* v eocénu (54 mil.)



# Výsledky

- signifikantní fylogenetická struktura v datových souborech ( $g_1$  statistika – fylogeneticky informativní data jsou signifikantně „zešikmená“ - skewness)
- dobře podpořený *Gaertnera* clade, ale minimální fylogenetická struktura uvnitř rodu
- nedostatečné rozlišení – nedostatečná divergence sekvencí (vysoký CI, RI...)
- ILD test – pouze ITS vs. *PepC*-large nekompatibilní
- constraints (Tab 3.) – žádné stromy nejsou signifikantně odlišné

# Výsledky - kombinovaná MP analýza

- monofylie *Gaertnera* – 100% bootstrap
  - podpořeno minimálně 35 změnami (ACCTRAN optimalizace – accelerated transformation – tj. optimalizuje reverse, nikoliv paralelismy)
- velmi krátké větve v rámci rodu (0-8 změn)
  - jen několik skupin podpořeno více než 70% bootstrapem
  - přesto však skupiny geograficky konzistentní
- *G. cooperi* – sesterská skupina všem ostatním
- dobře podpořené skupiny – Mauritijská skupina a Srí Lanka+JV Asie

# Maximum likelihood

- nejlepší model HKY + G (dvě různé rychlosti substitucí, nestejně frekvence bazí, gamma distribuce)
- Mauritijská skupina sesterská ostatním
- *G. lowryi* sesterská Srí Lanka+JV Asie
- *G. cooperi* a *G. paniculata* nerozlišené a spolu s *G. lowryi* ve skupině se Srí Lanka+JV Asie
- MP strom s topologií kompatibilní s ML stromem není statisticky odlišný od „unconstrained“ (Templeton test)

# Molekulární hodiny

- hypotéza nemůže být zamítnuta (Tab. 4)
- zamítnuta až při zahrnutí *Morinda*
- odhadnuté doby diversifikace (Tab. 5)

# Diskuze

- nedostatek variability k rekonstrukci fylogeneze uvnitř rodu -> dáno rychlým šířením nebo pomalou molekulární evolucí
- rozdíly mezi MP a ML analýzou
- sesterská skupina ostatních *Gaertnera*
  - *G. cooperi* (Z Afrika) – MP
  - Mauritius clade – ML
  - ani jedna hypotéza není signifikantně suboptimální
- MP hypotéza – původ v Z Africe a pak šíření na východ – kompatibilnější s morfologií a biogeografií
- obě hypotézy – několik dálkových šíření – ptáci

# Diskuze – molekulární hodiny

- záleží na kalibrační metodě
- kalibrace dle stáří Mauritius – nadhodnoceno (dnešní druhy ve vyvinutém sukcesním stadiu, tj. kolonizace asi mnohem později)
- nejpravděpodobnější třetí metoda
  - migrace *Gaertnera* do Afriky před cca 5 mil. lety (boreotropický pevninský most)
  - další šíření dál do JV Asie dálkovou migrací
- diversifikace linií – cca 0.8 druhů/milion let (podobné hawajským *Argyroxylum*)

# Závěr

- nedostatek genetické diverzity je způsoben ne pomalou molekulární evolucí, ale relativně recentní a rychlou radiací na interkontinentálním měřítku
- je nutné dále studovat evoluci široce rozšířených druhů a mechanismy diversifikace linií a morfologických změn