

Рекомендовано науково-методичною комісією
Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
(протокол № 4 від 2 березня 2023 року)

Автори:

Матушкіна Наталія Олександрівна, кандидат біологічних наук, доцент кафедри екології та зоології Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Оскірко Олександра Станіславівна, випускниця кафедри екології та зоології Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, аспірантка Інституту зоології Китайської Академії Наук.

Рецензенти:

Гумовський Олексій Васильович, чл.-кор. НАНУ, доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу систематики ентомофагів та екологічних основ біометоду Інституту зоології імені І. І. Шмальгаузена НАН України.

Петльована Вікторія Ростиславівна, кандидат біологічних наук, доцент кафедри біології рослин ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Методичні рекомендації до кейс-завдання «ДНК-ідентифікація невідомого організму методами філогенетичного аналізу» / Автори: Н.О. Матушкіна, О.С. Оскірко. – Київ, 2023. – 24 с. [Електронне видання]

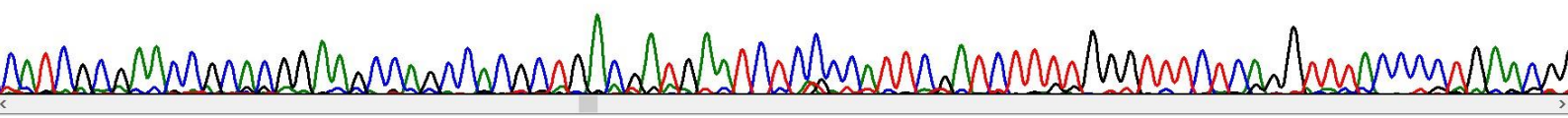
Методичні рекомендації знайомлять читача з методикою проведення занять з філогенетичного аналізу у форматі кейс-завдання щодо ДНК-ідентифікації невідомого організму. У рекомендаціях наведено приклад кейсу, висвітлено хід виконання роботи, поетапно розглядаються декілька альтернативних алгоритмів вирішення завдання із застосуванням різних філогенетичних програм, запропоновано різні форми звітування, оприлюднення та оцінювання результатів дослідження з урахуванням потреби проведення занять в аудиторному, дистанційному або комбінованому форматах, а також обговорюються окремі методичні прийоми, які сприяють досягненню цілей навчання. Видання призначене для студентів та викладачів ЗВО біолого-медичного спрямування.

© CC_BY_4.0

CAAGAAACACCACCCCAATTATCAAGATTATTAACTCCTCCTTTATTGACCTCCCAACCCCATCAAACATCTCTGCTTGATGAAATTTTGGATCTTTATTGGCCCTCTGTCTT
TACGAAACACCACCCCATCATCAAAATCATCAACTCCTCCTTTATTGACCTCCCAACCCCATCAAACATCTCTGCTTGATGAAACTTTGGATCCTTGTAGGTATCTGTCTA
CACGAAACACCACCCCATCATCAAAATTAATCAACTCCTCATTCATTGATCTTCCAAACCCCATCAAACATCTCTGCTTGATGAAACTTTGGATCACTACTAGGCCCTCTGCTTA

ЗМІСТ

Вступ	4
Опис кейс-завдання (приклад)	5
Рекомендований хід виконання завдання	6
Пошук і завантаження послідовності із GenBank	7
Автоматичне створення датасету в GenBank та його редагування в BioLign	8
Створення датасету в програмі BioLign без завантаження FASTA-файлів	10
Створення датасету в програмі Блокнот без завантаження FASTA-файлів	12
Множинне вирівнювання послідовностей в програмі BioLign	13
Множинне вирівнювання послідовностей в програмі MEGA	14
Пошук оптимальної еволюційної моделі в програмі MEGA	15
Філогенетичний аналіз в програмі MEGA	16
Редагування філогенетичних дерев у програмі FigTree	17
Альтернативний спосіб виконання завдання за допомогою онлайн інструменту iq-tree web server	18
Інтерпретація результатів аналізу	19
Оприлюднення результатів кейсу	20
Оцінювання кейс-завдання	21
Підсумки	22
Рекомендована література та корисні посилання	23



ОПИС КЕЙС-ЗАВДАННЯ (ПРИКЛАД)

Умови:

У приватному садку на житловому масиві Осокорки (м. Київ) була знайдена незвична ящірка, яку експерт з Інституту зоології ім І.І.Шмальгаузена НАНУ д.б.н. Олексій Марущак за фотографіями визначив як представника роду *Podarcis*. На жаль, через погану якість фотографії визначення до виду виявилось неможливим. Студентами ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка було взято зразок м'язової тканини хвоста для проведення ДНК-ідентифікації знайденої особини, із якого було секвеновано мітохондріальну ДНК гена *cytochrome b* (*cytb*).

Завдання:

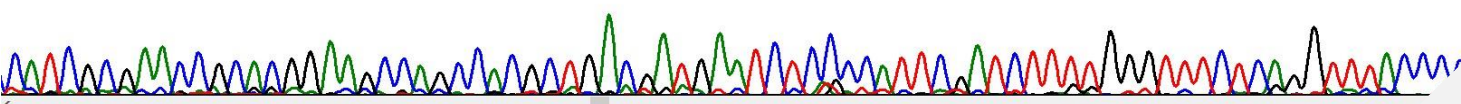
1. За секвенованою ДНК-послідовністю визначити видову приналежність досліджуваного зразка, використовуючи філогенетичний аналіз за методом Maximum Likelihood (ML).
2. Описати отримані філогенетичні дерева.
3. Результати представити у форматі доповіді на науково-практичній конференції.

ДНК-послідовність досліджуваного зразка:

```
ACACTTAATATACGAAAACATCACCCCATCATTAATAATTATCAACTCCTCCTTTATTGACCTACCAACC  
CCATCAAACATCTCTGCCTGATGAAACTTTGGATCACTACTAGGCCTATGCTTAATTATCCAAACTATT  
ACAGGCCTCTTTCTAGCCATGCATTATACCCAGATGTCTCTTCTGCATTCTCATCAATTGCTCACATT  
CATCGAGATGTTCAATACGGATGACTCATTCGTAACCTACACGCCAACGGAGCTTCCATATTCTTTAT  
CTGCATTTATCTCCACATTGGACGGGGCCTATACTACGGCTTTATATATACACCGAAACCTGAAATA  
TTGGAGTTCTACTTCTACTTCTAGTTATAGCCACAGCCTTTATAGGATATGTTCTACSTTGAGGACAA  
ATATCATTCTGAGGGA
```

Коди GenBank ID ДНК-послідовностей для порівняння:

MW619474; MW619471; MW619469; MW619467; MW619465; MW619464; MW619459;
MW619456; MW619453; MW619444; MW619449; MW619439; MW619435; MW619432;
MW619429; MW619425; MW619423. Зовнішня група: MW619485.



РЕКОМЕНДОВАНИЙ ХІД ВИКОНАННЯ ЗАВДАННЯ

Встановити на комп'ютері безкоштовне програмне устаткування

1. BioLign: редагування й вирівнювання послідовностей (<https://cutt.ly/y18vU3W>).
2. MEGA: вирівнювання послідовностей, підбір еволюційної моделі, побудова філогенетичних дерев (<https://www.megasoftware.net/>).
3. FigTree: редагування філогенетичних дерев (<https://cutt.ly/L18neOI>).

Завантажити послідовності із GenBank і створити датасет

1. Здійснити пошук послідовностей за кодом GenBank ID з опису кейсу на сайті <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
2. Завантажити кожну послідовність у форматі FASTA, або створити датасет без попереднього завантаження FASTA-файлів, або завантажити із GenBank датасет із кількох послідовностей у форматі FASTA-файлу і редагувати його в BioLign.

Вирівняти датасет

1. Виконати вирівнювання¹.
2. За необхідності обрізати неінформативні або сумнівні частини вирівняного датасету.

Здійснити філогенетичний аналіз в MEGA

1. Завантажити датасет.
2. Підібрати еволюційну модель.
3. Провести філогенетичний аналіз за методом Maximum Likelihood (ML).
4. Здійснити попереднє редагування філогенетичних дерев.
5. Завантажити філогенетичні дерева у Newick-форматі.

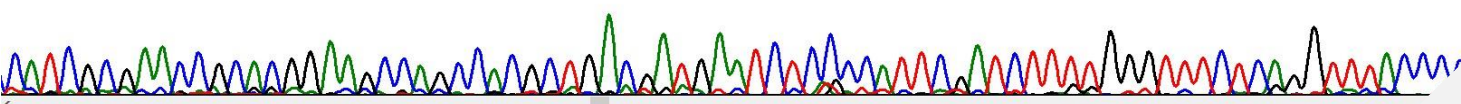
Редагувати філогенетичні дерева в FigTree

1. Змінити конфігурацію дерева на адитивне (additive tree) з масштабною лінійкою генетичної дистанції.
2. Позначити досліджувану послідовність червоним кольором.
3. Позначити зовнішню групу синім кольором.
4. Позначити сірим кольором клади з низькою бутстреп-підтримкою (<95).
5. Завантажити відредаговані дерева як графічні файли.

Прозвітуватися про виконання завдання в Google Класі

1. Результати завдання оформити як презентацію до конференції.
2. Зберегти презентацію як PDF-файл на особистому Google Диску.
3. Налаштувати доступ до файлу за посиланням з правом коментування.
4. Завантажити посилання на файл як відповідь на завдання в Google Класі.

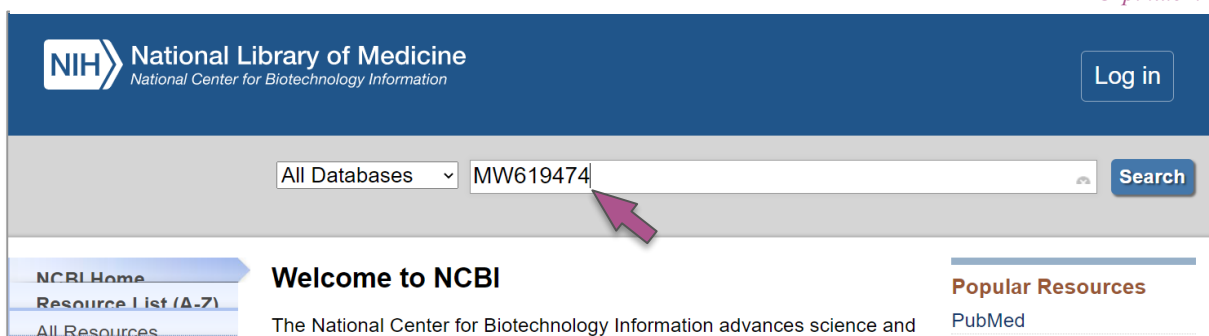
¹ Вирівнювання можна проводити в програмі BioLign або в програмі MEGA (див. відповідні розділи) - в обох випадках використовується вбудована програма ClustalW, а отже результати будуть ідентичними.



ПОШУК І ЗАВАНТАЖЕННЯ ОКРЕМИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ІЗ GENBANK

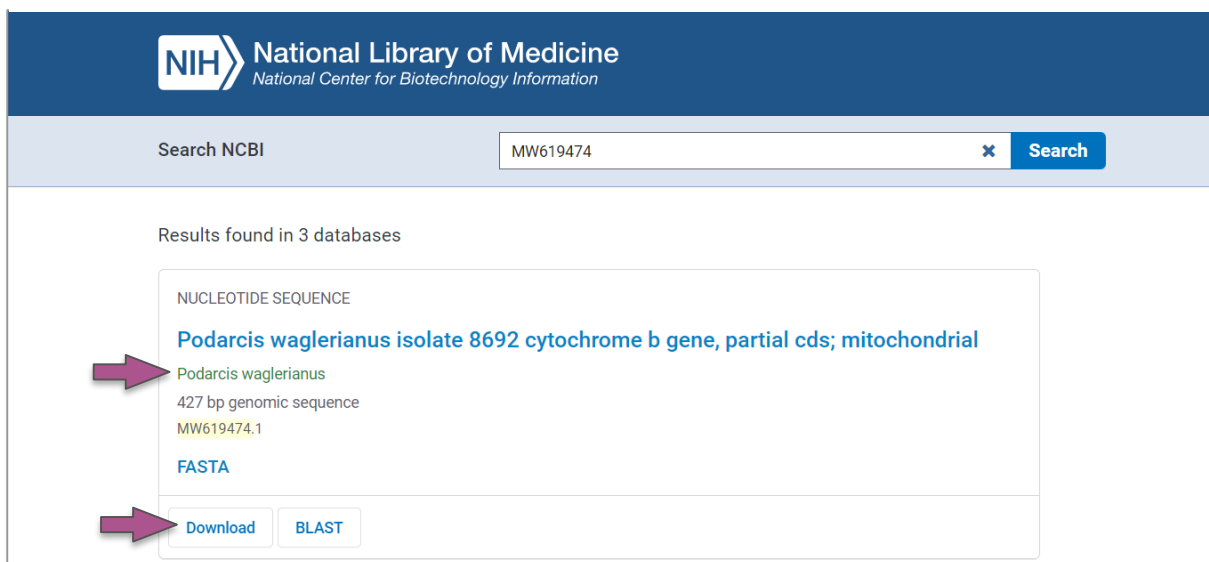
1. Перейти за посиланням на сторінку GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
2. У віконці пошуку ввести код послідовності GenBank ID (див. скріншот 1).

Скріншот 1

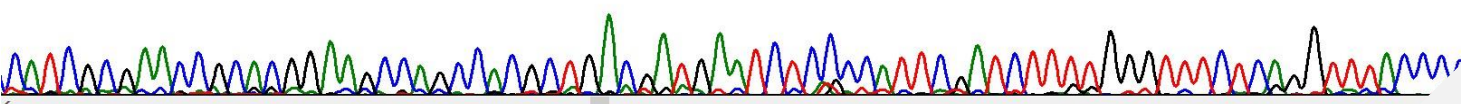


3. Зберегти послідовність у форматі FASTA, натиснувши **Download** і вказавши латинську назву виду і код GenBank ID у назві файлу (див. скріншот 2).

Скріншот 2



4. Повторити цю дію для всіх послідовностей з кейсу; у назву файлу зовнішньої групи додати слово "outgroup".
5. Усі завантажені файли послідовностей зберегти в одній папці.



АВТОМАТИЧНЕ СТВОРЕННЯ ДАТАСЕТУ В GENBANK ТА ЙОГО РЕДАГУВАННЯ В VIOLIGN

1. Перейти за посиланням на сторінку GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
2. У віконці пошуку через кому ввести коди всіх послідовностей із GenBank ID, наведених в описі завдання (див. скріншот 1).
3. Обрати необхідні послідовності.
4. У правому нижньому кутку вибрати **Send to**, у віконці, що відкрилося, позначити **Complete Record**, **File**, **Format** > **FASTA** й натиснути **Create File** (див. скріншот 3).

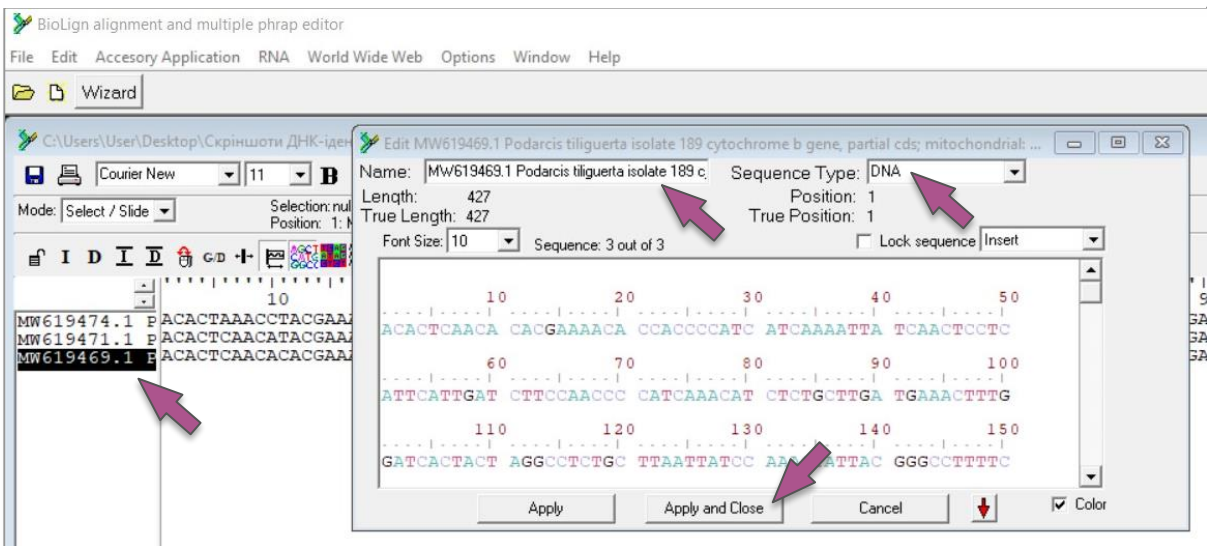
Скріншот 3

The screenshot shows the GenBank search results page. The search criteria are 'Nucleotide' and 'Advanced'. The results list three items, all of which are checked. A 'Send to' dropdown menu is open, showing options for 'Complete Record', 'Coding Sequences', and 'Gene Features'. Under 'Choose Destination', 'File' is selected. The 'Download 3 items' section shows 'Format' set to 'FASTA', 'Sort by' set to 'Default order', and 'Show GI' unchecked. The 'Create File' button is highlighted with a pink arrow.

5. Після цього FASTA-файл буде автоматично завантажений на ваш комп'ютер.
6. Запустити програму BioLign.
7. Відкрити файл датасету (головне меню вгорі): **File > Open > Відкрити**.
8. Навести курсор на назву послідовності (лівий стовпчик) і двічі натиснути ліву кнопку миші (див. скріншот 4).
9. У віконці редагування послідовності, що відкрилося, виправити назву послідовності (**Name**) - спочатку вказати назву виду, а потім - його код GenBank ID.
10. Перевірити, щоб тип послідовності (**Sequence Type**) було встановлено ДНК (DNA).
11. Зберегти зміни, натиснувши **Apply and Close**.
12. Повторити цю дію для всіх послідовностей з кейсу; у назву послідовності зовнішньої групи додати слово "outgroup".

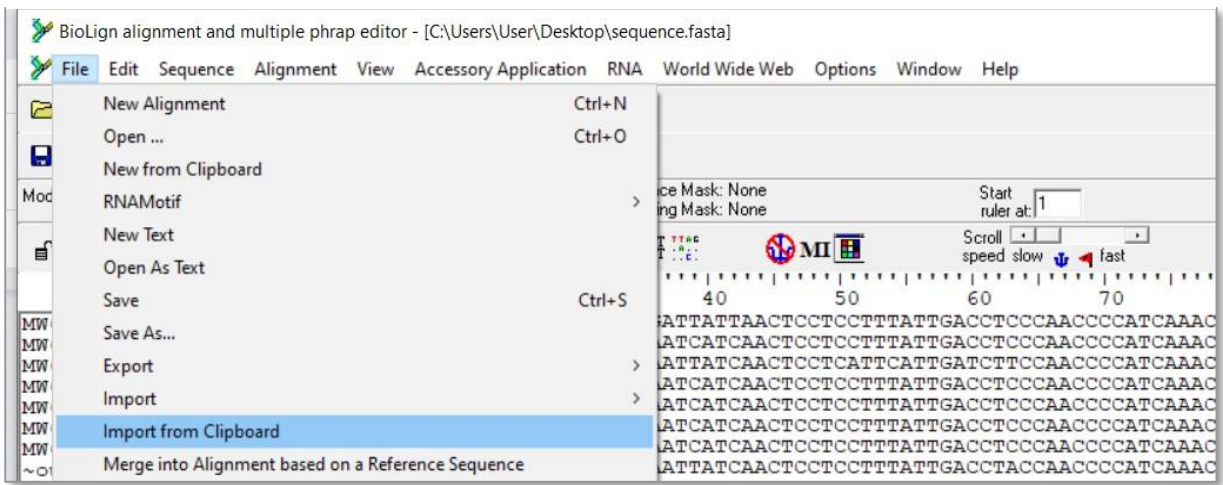
TACGAAAACACCACCCCATCATCAAAATCATCAACTCCTCCTTTATTGACCTCCCAACCCCATCAAACATCTCTGTTGATGAAATTTTGGATCCTTTATTGGCCCTCTGCTA
ACGAAAACACCACCCCATCATCAAAATTAATCAACTCCTCCTCATTCATTGATCTTCCCAACCCCATCAAACATCTCTGTTGATGAAACTTTGGATCACTACTAGGCCTCTGCTA

Скріншот 4

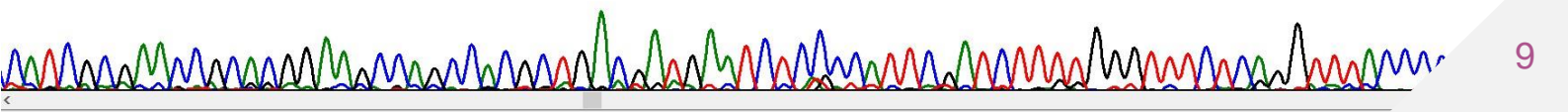


13. Щоб додати послідовність невідомого виду, її потрібно скопіювати у буфер обміну, повернутися до програми BioLign і додати до датасету (головне меню вгорі): **File > Import from Clipboard** (див. скріншот 5).

Скріншот 5

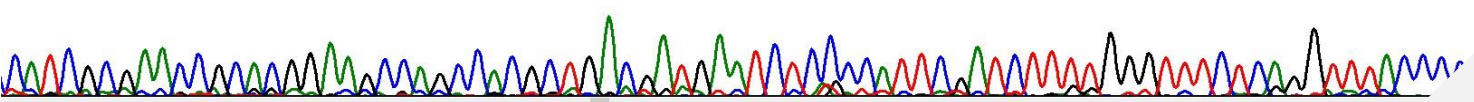


- 14. Навести курсор на назву послідовності (лівий стовпчик), двічі натиснути ліву кнопку миші і переназвати, вказавши назву роду та слово "unknow".
- 15. Перевірити, щоб тип послідовності (**Sequence Type**) було встановлено ДНК (DNA).
- 16. Зберегти зміни, натиснувши **Apply and Close**.
- 17. Створений датасет зберегти у форматі FASTA.



GAAGAAACACCACCCCAATATCAAGATATTAACTCCTCCTTTATTTGACCTCCCAACCCCATCAAACATCTCTGCTTGATGAAATTTTGGATCTTTATTGGGCCTCTGTCTT
TACGAAACACCACCCCAATCATCAAAATCATCAACTCCTCCTTTATTTGACCTCCCAACCCCATCAAACATCTCTGCTTGATGAAATTTTGGATCTTTATTGGGCCTCTGTCTT
ACAGAAACACCACCCCAATCATCAAAATTAATCAACTCCTCATTCATTTGATCTTCCCAACCCCATCAAACATCTCTGCTTGATGAAATTTTGGATCACTACTAGGCCTCTGCTTA

6. Повернутися до програми BioLign і створити новий файл із буферу обміну (головне меню вгорі): **File > New from Clipboard**.
7. Перейти за посиланням на сторінку GenBank й аналогічним чином знайти і скопіювати наступну послідовність.
8. Повернутися до програми BioLign і додати нову послідовність до датасету (головне меню вгорі): **File > Import from Clipboard** (див. скріншот 5).
9. Повторити цю дію для всіх послідовностей з кейсу.
10. Навести курсор на назву послідовності (лівий стовпчик) і двічі натиснути ліву кнопку миші (див. скріншот 4).
11. У віконці редагування послідовності, що відкрилося, виправити назву послідовності (**Name**) - спочатку вказати назву виду, а потім - його код GenBank ID; перевірити, щоб тип послідовності (**Sequence Type**) було встановлено ДНК (**DNA**); Зберегти зміни, натиснувши **Apply and Close**.
12. Повторити цю дію для всіх послідовностей з кейсу; у назву послідовності зовнішньої групи додати слово "outgroup", а у назву досліджуваної послідовності додати "unknown".
13. Створений датасет зберегти у форматі FASTA.



СТВОРЕННЯ ДАТАСЕТУ В ПРОГРАМІ БЛОКНОТ БЕЗ ЗАВАНТАЖЕННЯ FASTA-ФАЙЛІВ

1. Запустити програму Блокнот.
2. Перейти за посиланням на сторінку GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
3. У віконці пошуку ввести код послідовності GenBank ID (див. скріншот 1).
4. Відкрити послідовність, натиснувши на кнопку **FASTA** (див. скріншот 6).
5. Виділити і скопіювати в буфер обміну вміст віконця, що відкрилося.
6. Повернутися до програми Блокнот і з нового рядка вставити вміст буферу обміну.
7. У назві послідовності замінити назву після знаку ">" - спочатку вказати назву виду, потім - код GenBank ID (див. скріншот 8).

Скріншот 8

```
*Блокнот: Блокнот
Файл Редагування Формат Вигляд Довідка
>Podarcis sp. UNKNOWN
ACACTTAATATACGAAAACATCACCCCATCATTAATAATTATCAACTCCTCCTTTATTGACCTACCAACCC
CATCAAACATCTCTGCCTGATGAAACTTTGGATCACTACTAGGCCTATGCTTAATTATCCAAACTATTAC
AGGCCTCTTTCTAGCCATGCATTATACCCAGATGTCTCTTCTGCATTCTCATCAATTGCTCACATTCAT
CGAGATGTTCAATACGGATGACTCATTTCGTAACCTACACGCCAACGGAGCTTCCATATTCTTTATCTGCA
TTTATCTCCACATTGGACGGGGCCTATACTACGGCTCTTATATATACACCGAAACCTGAAATATTGGAGT
TCTACTTCTACTTCTAGTTATAGCCACAGCCTTTATAGGATATGTTCTACCTTGAGGACAAATATCATTC
TGAGGGA
>Podarcis waglerianus MW619474.1
ACASTAAACCTACGAAAACACCACCCCATTAATCAAGATTATTAACCTCCTCCTTTATTGACCTCCCAACCC
CATCAAACATCTCTGCTTGATGAAATTTTGGATCTTTATTGGGCCTCTGTCTTATTATCCAAACTATTAC
AGGCCTCTTTCTAGCCATACACTACACCCAGACATCTCTTCCGCATTCTCATCTGTGCGCCACATTCAC
CGAGATGTCCAATATGGATGACTAATCCGCAACTTACATGCCAACGGCGCTTCTATATTCTTTATCTGTA
TTTATCTCCATATTGGACGTGGCTTATATTATGGTTTCTACATATATACTGAAACCTGAAACATTGGAGT
CCTCCTCCTACTTCTCGTTATAGCTACAGCCTTCATAGGATATGTGTTACCTTGAGGACAAATATCATTC
TGAGGGA
>Podarcis vaucheri MW619471.1
ACACTCAACATACGAAAACACCACCCCATCAAAATCATCAACTCCTCCTTTATTGACCTCCCAACCC
CATCAAACATCTCTGCTTGATGAAACTTTGGATCCTTGTTAGGTATCTGTCTAATTATTCAAACCATCAC
AGGCCTTTTTCTAGCCATACACTACACCCAGACATCTCTTCTGCATTTTCATCCGTGCGCCACATTCAC
CGAGACGTTCAATTTGGATGACTGATCCGTAACCTACATGCCAACGGTGCCTCCATATTCTTTATTTGTA
TTTATCTTCATATCGGACGAGGACTATACTATGGCTCTTATATATTTATCGAAACCTGAAACATTGGCGT
ACTACTCCTCCTTCTAGTTATAGCCACTGCCTTTATAGGATACGTATTACCCTGAGGACAAATATCATTC
TGAGGGA
```

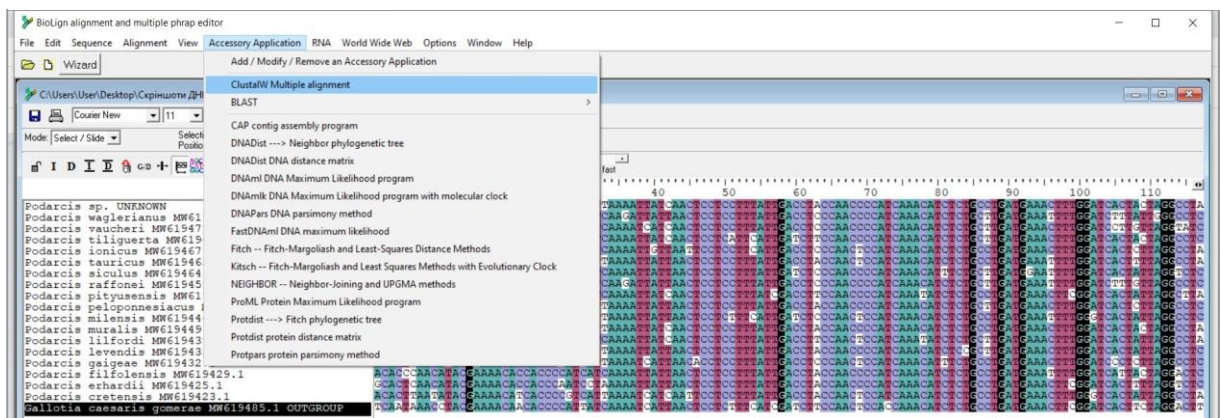
8. Перейти за посиланням на сторінку GenBank й аналогічним чином знайти і скопіювати решту послідовностей; у назву послідовності зовнішньої групи додати слово "outgroup", а у назву досліджуваної послідовності додати "unknown".
9. Зберегти отриманий датасет як текстовий файл (за замовчуванням).

TACGAAAACACCACCCCATTCATCAAAATCATCAACTCCTCCTTTATTGACCTCCCAACCCCATCAAACATCTCTGTTGATGAAATTTTGGATCCTTTGTTAGGGTATCTGTCTA
ACGAAAACACCACCCCATTCATCAAAATTAATCAACTCCTCCTTTATTGACCTCCCAACCCCATCAAACATCTCTGTTGATGAAATTTTGGATCCTTTGTTAGGGTATCTGTCTA

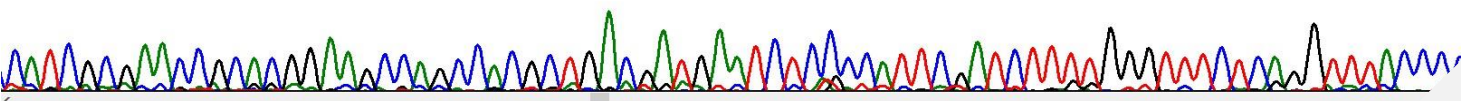
МНОЖИННЕ ВИРІВНЮВАННЯ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ В ПРОГРАМІ BIOLIGN

1. Запустити програму BioLign.
2. Відкрити файл датасету (головне меню вгорі): **File > Open > Відкрити**.
3. У головному меню вгорі запустити множинне вирівнювання за допомогою вбудованої програми ClustalW: **Accessory Application > ClustalW Multiple alignment** (див. скріншот 9).

Скріншот 9



4. Не змінюючи налаштування за замовчуванням провести множинне вирівнювання.
5. Вирівняний датасет зберегти під новим ім'ям як FASTA-файл (головне меню вгорі): **File > Save as**.



CAAAAACACCACCCCATCATCAAGATTTAACTTAACTCCTCCTTTATTTGACCTCCCAACCCCATCAAACATCTCTGCTTGATGAAATTTTGGATCTTTATTGGCCCTCTGCTT
TACGAAAACACCACCCCATCATCAAAATCATCAACTCCTCCTTTATTTGACCTCCCAACCCCATCAAACATCTCTGCTTGATGAAATTTTGGATCTTTATTGGCCCTCTGCTT
ACGAAAACACCACCCCATCATCAAAATTAATCAACTCCTCCTTTATTTGACCTCCCAACCCCATCAAACATCTCTGCTTGATGAAATTTTGGATCTTTATTGGCCCTCTGCTT

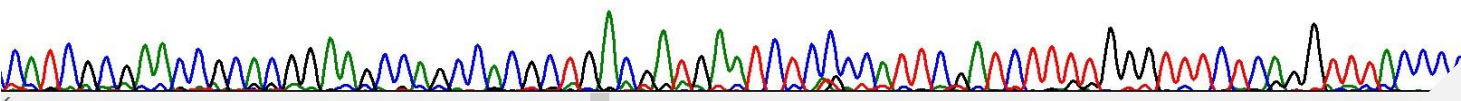
МНОЖИННЕ ВИРІВНЮВАННЯ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ В ПРОГРАМІ MEGA

1. Запустити програму MEGA.
2. Відкрити файл невіривняного датасету (головне меню вгорі): **File > Open a File/Session.**
3. У віконці, що відкрилося, вибрати **Align.**
4. У головному меню вгорі вибрати: **Alignment > Align by ClustalW.**
5. Не змінюючи налаштування за замовчуванням, провести множинне вирівнювання усього датасету.
6. Зверніть увагу, що неінформативні для філогенетичного аналізу консервативні сайти можна візуалізувати, використовуючи інструмент **Display > Toggle Conserved Sites > at 100% level** (див. скріншот 10).

Скріншот 10



7. Віривняний датасет можна зберегти як FASTA-файл під новим ім'ям: **File > Save as.**



ПОШУК ОПТИМАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЙНОЇ МОДЕЛІ В ПРОГРАМІ MEGA

1. Запустити програму MEGA.
2. Відкрити FASTA-файл вирівняного датасету через меню Моделі (головне меню з іконками): **Models > Find Best DNA/protein Models (ML)**.
3. У віконцях, що спливають, послідовно вибрати:
 - **Nucleotide Sequences > Ok**,
 - **Protein coding nucleotide sequences data > Yes**,
 - **Vertebrate Mitochondrial > Ok**.
4. Запустити програму пошуку оптимальної еволюційної моделі за параметрами за замовчуванням:
 - Tree to Use > Automatic (Neighbor-joining tree);
 - Statistical Method > Maximum Likelihood;
 - Substitution Type > Nucleotide;
 - Gaps/Missing Data Treatment > Use all sites;
 - Select Codon Positions > 1st, 2nd, 3rd, Noncoding Sites;
 - Branch Swap Filter > None;
 - Number of Threads > 3.
5. Результати пошуку оптимальної еволюційної моделі зберегти як Excel файл; зверніть увагу, що вказана у першому рядку таблиці модель і є оптимальною - занотуйте її назву (див. скріншот 11).

Скріншот 11

MEGA Caption Expert: Find Best-Fit Substitution Model (ML)

Results

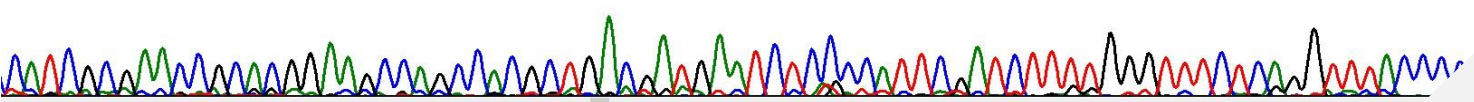
Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)
TN93+I	17	3206.975	3105.135	-1535.465	0.61	n/a	4.88	0.276	0.315	0.274	0.134	0.030	0.026
TN93+G	17	3207.464	3105.624	-1535.709	n/a	0.19	7.14	0.276	0.315	0.274	0.134	0.022	0.019
TN93+G+I	18	3210.166	3102.348	-1533.059	0.56	1.46	6.56	0.276	0.315	0.274	0.134	0.024	0.021
HKY+I	16	3211.644	3115.784	-1541.800	0.64	n/a	5.01	0.276	0.315	0.274	0.134	0.027	0.023
HKY+G+I	17	3219.013	3117.173	-1541.483	0.63	5.45	5.33	0.276	0.315	0.274	0.134	0.025	0.022
HKY+G	16	3220.097	3124.237	-1546.027	n/a	0.18	5.52	0.276	0.315	0.274	0.134	0.025	0.021
GTR+G	20	3220.242	3100.471	-1530.094	n/a	0.23	4.52	0.276	0.315	0.274	0.134	0.029	0.044
GTR+G+I	21	3227.306	3101.561	-1529.625	0.59	5.13	3.80	0.276	0.315	0.274	0.134	0.034	0.046
GTR+I	20	3235.136	3115.365	-1537.541	0.61	n/a	3.04	0.276	0.315	0.274	0.134	0.035	0.046
T92+I	14	3269.592	3185.696	-1578.777	0.64	n/a	4.82	0.296	0.296	0.204	0.204	0.025	0.017
T92+G+I	15	3277.491	3187.612	-1578.725	0.64	14.39	4.91	0.296	0.296	0.204	0.204	0.024	0.017

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ

В ПРОГРАМІ MEGA

1. Запустити програму MEGA.
2. Відкрити FASTA-файл вирівняного датасету через меню Філогенія (головне меню з іконками): **Phylogeny > Construct/Test Maximum Likelihood Tree...** .
3. У віконцях, що спливають, послідовно вибрати:
 - **Nucleotide Sequences > Ok,**
 - **Protein coding nucleotide sequences data > Yes,**
 - **Vertebrate Mitochondrial > Ok.**
4. Запустити програму пошуку оптимальної еволюційної моделі за такими параметрами (див. скріншот 9):
 - Statistical Method > Maximum Likelihood;
 - Test of Phylogeny > Bootstrap Method;
 - No. of Bootstrap Replications > 1000;
 - Substitution Type > Nucleotide;
 - Model/Method > *вказіть ту еволюційну модель, яку було знайдено як оптимальну на попередньому етапі дослідження,*
 - Rates among Sites > *вказіть ті критерії зважування замін, які було знайдено як оптимальні на попередньому етапі дослідження,*
 - Gaps/Missing Data Treatment > Use all sites;
 - Select Codon Positions > 1st, 2nd, 3rd, Noncoding Sites;
 - ML Heuristic Method > NNI;
 - Initial Tree for ML > Make initial tree automatically (Default - NJ/BioNJ)
 - Branch Swap Filter > None;
 - Number of Threads > 3.
5. Почекати, поки відбудеться філогенетичний аналіз, й програма генерує дерева.
6. Використовуючи панель інструментів у лівій частині сторінки можна редагувати отримані дерева:
 - розмір та шрифти підписів таксонів (інструмент **Taxon Names**),
 - ширина і висота дерева (інструмент **Layout**),
 - примусове укорінення дерева (інструмент **SubTree > Root Tree**),
 - пронумерувати гілки (інструмент **Statistics/Frequency/Info > Node IDs**),
 - вказати довжину гілок (інструмент **Branch Lengths**) тощо.
7. Якщо планується продовжити редагування дерев у програмі FigTree, отримані дерева зберегти у форматі Newick: **File > Export Current Tree (Newick)**.
8. У віконці **Newick Export Option**, що відкрилося, обрати **Bootstrap > Ok**.
9. Філогенетичне дерево, що відображається у текстовому форматі, зберегти: **File > Save as**.
10. За бажанням відредаговані в програмі MEGA філогенетичні дерева можна зберегти як рисунки або PDF-файли.

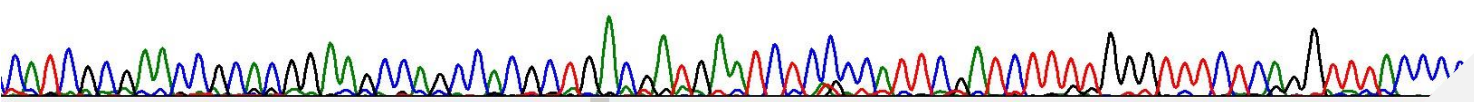


РЕДАГУВАННЯ ФІЛОГЕНЕТИЧНИХ ДЕРЕВ

У ПРОГРАМІ FIGTREE

1. Запустити програму FigTree.
2. Відкрити Newick-файл філогенетичного дерева через головне меню: **File > Open**.
3. Редагувати дерево за допомогою інструментів бічного меню:
 - змінити ширину та висоту дерева (інструмент **Layout**),
 - упорядкувати розташування назв таксонів у правій частині дерева: **Layout > Align Tip Labels**,
 - змінити товщину ліній: **Appearance > Line Weight**,
 - змінити конфігурацію дерева (інструмент **Trees**):
 - вкорінити посередині клад: **Trees > Root tree > Midpoint**,
 - впорядкувати вузли: **Trees > Order Nodes > Decreasing**,
 - змінити шрифт назв таксонів: **Tip Labels > Setup > Font**,
 - показати на дереві довжину гілок: **Branch Labels**,
 - змінити шрифт довжини гілок: **Branch Labels > Setup > Font**,
 - додати і редагувати масштабну лінійку довжини гілок: **Scale Bar**.
4. Редагувати окремі елементи дерева за допомогою інструментів додаткового верхнього меню (меню з іконками):
 - лівою клавішею миші вибрати будь-який елемент дерева: кладу або таксон, або групу клад або таксонів, утримуючи клавішу shift (іконки в меню при цьому активуються),
 - в меню **Node: Clade: Taxa** вибрати, який саме елемент потрібно редагувати - гілку, кладу або таксон,
 - змінити колір тла окремих клад, гілок або таксонів можна за допомогою інструментів додаткового верхнього меню **Hilight** і **Colour** (щоб змінити суцільну на градієнтну заливку тла, використовуйте бічну панель інструментів **Appearance > Gradient** і **Hilight with gradient**),
 - виділити таксон зовнішньої групи синім кольором: натиснути на назву таксона і за допомогою інструменту **Colour** змінити колір шрифту на синій,
 - виділити таксон досліджуваної групи червоним кольором: натиснути на назву таксона і за допомогою інструменту **Colour** змінити колір шрифту на червоний,
 - виділити гілки Nodes з низькою бутстреп-підтримкою і за допомогою інструменту **Colour** перефарбувати їх в сірий колір.
5. Отримане дерево зберегти як PNG-файл: **File > Export PNG**.

NB: FigTree підтримує файли у форматах Nexus і Newick.

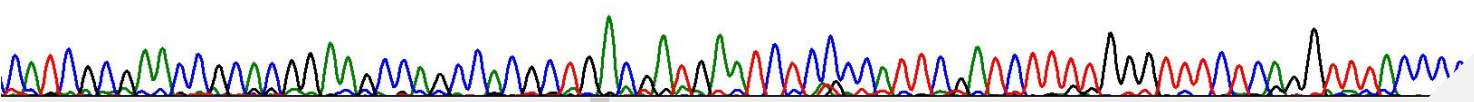


AAAAACACCACCCCAATTATCAAGATATTAACTCCTCCTTTATTTGACCTCCCAACCCCATCAAACATCTCTGCTTGATGAAATTTTGGATCTTTATTGGCCCTCTGCTTA
TACGAAAAACACCACCCCAATCATCAAAAATCATCAAACTCCTCCTTTATTTGACCTCCCAACCCCATCAAACATCTCTGCTTGATGAAACTTTGGATCCTTTGTTAGGTATCTGTCTA
CACGAAAAACACCACCCCAATCATCAAAAATTAATCAACTCCTCATTCATTTGATCTTCCAACCCCATCAAACATCTCTGCTTGATGAAACTTTGGATCACTACTAGGCCCTCTGCTTA

АЛЬТЕРНАТИВНИЙ СПОСІБ ВИКОНАННЯ ЗАВДАННЯ ЗА ДОПОМОГОЮ ОНЛАЙН ІНСТРУМЕНТУ IQ-TREE WEB SERVER

1. Перейти за посиланням на сторінку онлайн ресурсу IQ-tree web server (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at>).
2. Обрати файл вирівняного датасету: **Tree Inference > Alignment File**.
3. Вказати тип послідовності ДНК: **Tree Inference > Sequence type > DNA**.
4. Вказати електронну пошту, якщо бажаєте отримати повідомлення про те, що результати філогенетичного аналізу готові (опціонально).
5. Натиснути внизу сторінки на клавішу **Submit job**.
6. Текстовий опис результатів з'явиться у основному віконці вкладки **Analysis Results**.
7. Завантажити результати як архів можна, натиснувши на кнопку **Download selected jobs** у лівому віконці вкладки **Analysis Results**.
8. Редагувати отримані дерева можна у програмі FigTree - для цього використовуйте файли із суфіксами **.contree** (це консенсусне дерево) та **.treefile** (це ML дерево).
9. Також у текстовому файлі з архіву ви знайдете всю інформацію про ваші дерева, включаючи найкращу модель (Best Model).

NB: Керівництво з використання ресурсу IQ-tree web server можна знайти за посиланням: <http://www.iqtree.org/doc/Web-Server-Tutorial>.





ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ АНАЛІЗУ

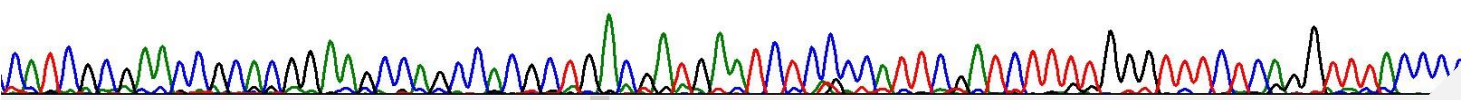
Метод максимальної правдоподібності (Maximum likelihood, ML) використовується для філогенетичного аналізу молекулярних даних, для яких обчислюються ймовірності трансформації станів ознак у кожному сайті для усього датасету. Таким чином, ML аналіз вимагає попереднього підбору певної моделі трансформації ознак (= еволюційної моделі), яка найкраще описує її у певному датасеті. Оптимальні дерева обирають за показником комплексної ймовірності у такий спосіб, що чим вищим є показник комплексної ймовірності (= максимальна правдоподібність), тим кращим є дерево.

Для здійснення інтерпретації отриманих в результаті ML аналізу дерев спочатку потрібно узагальнити основні показники датасету й критерії, за якими був проведений аналіз:

- тип молекулярної інформації, який був застосований для аналізу,
- кількість таксонів у датасеті,
- кількість сайтів у датасеті,
- кількість й відсоток неінформативних (консервативних) сайтів,
- кількість інформативних (варіабельних) сайтів,
- застосовану еволюційну модель і параметри, які вона враховує,
- кількість бутстреп-повторів (bootstrap replications),
- програми, які були використані для кожного етапу дослідження.

Далі можна перейти до опису дерев, отриманих в результаті проведеного аналізу. Для цього рекомендується застосовувати топологічний підхід, тобто послідовно описати паттерн галуження дерева й його окремі клади, починаючи від основи дерева до термінальних сестринських клад. До опису кожної кладки потрібно включити її **назву (або номер), таксономічний склад, бутстреп-підтримку у відсотках**.

Грунтуючись на результатах проведеного аналізу слід зробити висновок про належність досліджуваної особини до певного таксону й словесно оцінити достовірність такого передбачення, орієнтуючись на дані щодо бутстреп-підтримки гілок.



ОПРИЛЮДНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ КЕЙСУ

Результати кейс-завдання можуть бути оприлюднені у форматі **доповіді** на імітаційній науковій конференції, під час якої перевіряється опанування студентом методики філогенетичного аналізу ДНК-послідовностей, розуміння кожного із його етапів, а також розвиваються універсальні навички, пов'язані з публічним виступом перед фаховою аудиторією (детальніше про розвиток навичок див. у розділі “Підсумки”).

Ми рекомендуємо відтворити на занятті формат реальної наукової конференції - наприклад, щорічної Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених “Шевченківська весна”, що організовується Київським національним університетом імені Тараса Шевченка.

Для цього викладач організовує заняття як окрему сесію на імітаційній конференції й бере на себе функцію голови секції: розповідає про цілі конференції, знайомить присутніх із регламентом, оголошує послідовність виступів, стежить за дотриманням регламенту кожним доповідачем, керує дискусією тощо. Кожен студент оприлюднює результати кейсу у форматі усної доповіді з презентацією, тривалість якої обмежується 5 хвилинами. Після виступу аудиторія має право поставити питання до доповідача. За бажанням функцію голови секції може виконувати й студент під контролем викладача. Якщо є така можливість, до заняття можуть долучатися й інші викладачі та студенти, які виконують роль запрошених гостей.

Залежно від наявних технічних можливостей, заняття-конференція може бути проведена в стінах аудиторії, дистанційно, у комбінованому форматі, і навіть асинхронно, з використанням прямої трансляції на каналі в YouTube. У останньому разі питання до доповідача можна ставити в режимі реального часу в чаті, або надіслати заздалегідь викладачеві. Якщо не всі студенти мають технічну можливість працювати синхронно, можна зробити запис конференції й оприлюднити його в Google Класі. Важливо максимально точно наслідувати реальну конференцію, що допомагає студентам відчувати атмосферу наукової дискусії та краще розвинути навички академічного спілкування.

Додатковим форматом оприлюднення результатів кейсів можуть стати **тези доповідей**, з яких, за бажанням, можна згенерувати імітаційну “Збірку матеріалів конференції...”. Такий тип роботи дозволяє студентам додатково відпрацювати навички академічного письма й робить кейс-завдання логічно завершеним. Варто, однак, враховувати, що робота з текстами потребує набагато більше часу.

ОЦІНЮВАННЯ КЕЙС-ЗАВДАННЯ

Після заслуховування та обговорення усіх доповідей викладач запрошує студентів оцінити представлені виступи за допомогою **анонімного анкетування**, яке проводиться асинхронно. В анкеті за 5-бальною шкалою пропонується оцінити окремі параметри доповіді (науковість, доступність сприйняття, естетичну привабливість, відповідність формату тощо), навички доповідача (вміння дотримуватися регламенту, володіння матеріалом та фаховою термінологією, переконливість, вміння працювати з аудиторією тощо), а також висловитися щодо загального враження від доповіді та надати рекомендації щодо її покращення. Підготовлені викладачем зведені результати анонімного анкетування публікуються в Google Класі та в Telegram-каналі навчальної дисципліни.

Після прослуховування доповідей та додаткового ознайомлення з презентаціями студентів, які були завантажені в Google Клас, викладач оцінює кейс-завдання за тими самими критеріями, які використовуються в анкеті самооцінювання. Важливо, що критерії оцінювання завдання має бути оприлюднений в Google Класі заздалегідь - разом із публікацією відповідного завдання. Також кожному студентові потрібно буде згодом пояснити отриману оцінку - це можна зробити у форматі коментарів до завдання в Google Класі.

Для збільшення вмотивованості студентів викладач може організувати й провести **конкурс на найкращу доповідь**. При цьому рекомендується враховувати результати самооцінювання студентів. Автор/авторка найкращої доповіді здобуває звання “Переможця конкурсу на найкращу доповідь” та отримує символічну нагороду - спеціально розроблену одногрупниками грамоту, стікер, дизайнерський аватар для ZOOM чи просто бурхливі овації аудиторії. Нагородою можуть бути й додаткові бали, якщо це передбачено робочою програмою.

Після завершення завдання й оприлюднення відповідних оцінок рекомендується розіслати студентам анкету зворотного зв'язку, яка дозволить викладачеві визначити слабкі й сильні сторони кейс-завдання, зрозуміти специфіку сприйняття завдання конкретною групою студентів та у майбутньому покращити свою викладацьку майстерність. За бажанням, студентів можна ознайомити зі зведеними результатами анонімного анкетування в Telegram-каналі навчальної дисципліни, простимулювавши, у такий спосіб, подальше обговорення самої методики вивчення матеріалів курсу. Це дозволяє розвинути у студентів навички метапізнання, себто здатності самостійно регулювати процес свого навчання.

ПІДСУМКИ

В умовах невизначеності щодо фізичної можливості українських студентів і викладачів відвідувати заняття в стінах аудиторій, що постала у часи коронавірусної пандемії й загострилася після початку повномасштабних військових дій в Україні, нагальним завданням для викладача постає розробка й впровадження нових форм навчальних занять, які можна легко адаптувати до актуальних й мінливих умов сьогодення.

На наш погляд, завдання із застосуванням кейс-технологій найкраще підходять для реалізації педагогічних задач в таких умовах, адже вони дозволяють вирішити низку питань, пов'язаних із специфікою організації і проведення освітнього процесу синхронно та/або асинхронно в очному, дистанційному та комбінованому форматах, а саме:

- допомагають викладачеві створити на занятті атмосферу згуртованості й залученості до виконання спільного завдання (у випадку командної роботи) або схожих завдань (у випадку індивідуальної роботи),
- навчають студентів поетапно планувати свої дії,
- сприяють розвитку навичок тайм-менеджменту,
- розвивають мультимодальну грамотність студентів,
- демонструють сферу практичного застосування набутих знань, навичок та вмінь у контексті конкретної навчальної дисципліни та на межі предметних галузей і тому підвищують вмотивованість студентів до навчання,
- дозволяють викладачеві коригувати свою роль відповідно до потреб кожного студента як організатора освітнього процесу, ментора-наставника, інструктора, експерта-практика тощо.

Досвід проведення занять в дистанційному і комбінованому форматах в КНУТШ показав, що зручним інструментом для організації освітнього процесу є використання окремої групи в Telegram, яка об'єднує викладача і студентів, що вивчають певну дисципліну. За умов нестабільного доступу до інтернету, а іноді - й тимчасової відсутності електропостачання, месенджери доповнюють інструментарій Google Класу й допомагають викладачеві підтримувати зв'язок зі студентами, доносити актуальну інформацію щодо дисципліни, організувати дискусії. Наприклад, у контексті кейс-завдання з ДНК-ідентифікації організмів студенти мають можливість обговорювати особливості використання певних інструментів філогенетичного аналізу, ділитись власним досвідом виконання завдання, допомагати один одному у проведенні певних його етапів.

Іншими важливими інструментами розвитку універсальних навичок студентів під час виконання кейсу можуть бути особливі форми звітування та оприлюднення одержаних результатів, зокрема, як результатів наукового дослідження. Це дозволяє відточити навички академічної комунікації, критичного мислення, виступу перед аудиторією тощо. У цьому контексті кейс-завдання зі спеціальних дисциплін можуть бути особливо корисними для підготовки майбутніх випускників до професійної діяльності.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА ТА КОРИСНІ ПОСИЛАННЯ

Керівництва для проведення філогенетичного аналізу молекулярних даних:

- Horiike T. AN 2016. Introduction to Molecular Phylogenetic Analysis. Reviews in Agricultural Science, 4: 36- 45. DOI: 10.7831/ras.4.36
- The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing. Ed. Philip Lemey, Marco Salemi and Anne-Mieke Vandamme. Cambridge University Press; 2009.
- Hall, Barry G. Phylogenetic trees made easy: a how-to manual. Vol. 547. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2004.

Огляди (мануали) філогенетичних програм:

- Barry G. Hall, Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA, Molecular Biology and Evolution, Volume 30, Issue 5, May 2013, Pages 1229–1235. Режим доступу: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst012>
- Paradis, Emmanuel. Analysis of Phylogenetics and Evolution with R. Springer Science & Business Media, 2011.

Дискусійні групи щодо філогенетичного аналізу послідовностей:

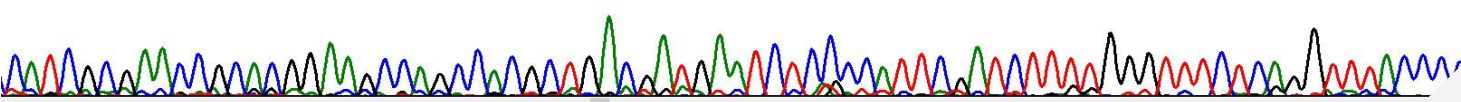
- <https://www.researchgate.net/topic/MEGA/2>
- <https://www.biostars.org/>
- <https://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>

Еволюційні моделі:

- Model fitting in phylogenetics - a short and simple introduction by Pablo Vinuesa (https://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/Model_fitting_in_phylogenetics.html)
- Nei M. and Kumar S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549

Інтерпретація і опис молекулярних дерев:

- Brown, T. A. Genomes. 2nd edition. Oxford: Wiley-Liss; 2002. Chapter 16, Molecular Phylogenetics. Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21122/>
- Baum, David A., and Stacey D. Smith. Tree thinking: an introduction to phylogenetic biology. Roberts, 2013.



AAAAACACCACCCCAATATCAAGATATTAACTCCTCCTTTATTGACCTCCCAACCCCATCAAACATCTCTGTTGATGAAATTTTGGATCTTTATTGGCCCTCTGTCTT
TACGAAAACACCACCCCATCATCAAAATCATCAACTCCTCCTTTATTGACCTCCCAACCCCATCAAACATCTCTGTTGATGAAACTTTGGATCCTTGTAGGTATCTGTCTA
CACGAAAACACCACCCCATCATCAAAATTAATCAACTCCTCATTCATTGATCTTCCAACCCCATCAAACATCTCTGTTGATGAAACTTTGGATCACTACTAGGCCCTCTGTCTA

Приклади наукових досліджень з використанням схожої методології дослідження:

- Oskyrko O., Laakkonen H., Silva-Rocha I., Jablonski D., Marushchak O., Uller T., Carretero M. (2020): The possible origin of the common wall lizards *Podarcis muralis* (Laurenti, 1768) in Ukraine. *Herpetozoa*, 33: 87-93.
- Oskyrko O., Sos T., Vacheva E., Vlad S.E., Cogălniceanu D., Uller T., Feiner N., Carretero M.A. (2022). Unravelling the origin of the common wall lizards (*Podarcis muralis*) in south-eastern Europe using mitochondrial evidence. *Biodiversity Data Journal*, 10: e90337.
- Jablonski, D., Jandzík, D., Mikulíček, P., Džikić, G., Ljubisavljević, K., Tzankov, N., Jelić, D., Thanou, E., Moravec, J., Gvoždík, V. (2016). Contrasting evolutionary histories of the legless lizards slow worms (*Anguis*) shaped by the topography of the Balkan Peninsula. *BMC Evolutionary Biology*, 16(99): 1–18.
- Janecka J.E., Miller W., Pringle T.H., Wiens F., Zitzmann A., Helgen K.M., Springer M.S., Murphy W.J. (2007). Molecular and genomic data identify the closest living relative of primates. *Science*, 318(5851): 792-4.
- Cruaud A., Jabbour-Zahab R., Genson G., Couloux A., Yan-Qiong P., Da Rong Y., Ubaidillah R., Pereira R.A.S., Kjellberg F., van Noort S., Kerdelhué C., Rasplus J.Y. (2017). Out of Australia and back again: the world-wide historical biogeography of non-pollinating fig wasps (Hymenoptera: Sycophaginae). *Journal of Biogeography*, 38: 209-225.

