

Evolución de secuencias palindromicas en genomas de cianobacterias

Eduardo Padilla Mendoza

2023-08-17

Contents

Resumen	5
1 Introducción	7
2 Métodos	9
2.1 Abundancia de palíndromos	9
2.2 Significancia de los conteos observados	12
2.3 Visualización de la abundancia: OE vs Frecuencia Observada cada 1000nt	14
2.4 Filogenia	14
2.5 Identificación de casos relevantes	16
2.6 Reconstrucción Ancestral de sitios palindrómicos en ortólogos . .	16
3 RESULTADOS	23
Sección I	25
3.1 Distribución de HIP1 en los marcos de lectura	25
Sección II	27
3.2 Clado Calothrix	27

Resumen

El palíndromo altamente iterado 1 (HIP1 por sus siglas en inglés) cuya secuencia es 5'-GCGATCGC-3', está ampliamente representado en las cianobacterias con excepción de las pico-cianobacterias marinas y otros linajes. El origen de HIP1 y su función (si es que tiene alguna) permanecen desconocidos. Se ha observado que el sitio de reconocimiento (5'-Gm6ATC-3') de la enzima Dam metiltransferasa específica para adenina N6 de clase D12 (Dam-met) y el sitio de reconocimiento de DmtC (5'-m5CGATCG-3') están contenidos en HIP1, lo que sugiere una posible relación. Sin embargo, la asociación funcional de otros genes con HIP1 no se ha reportado.

Chapter 1

Introducción

Chapter 2

Métodos

Se descargaron 2 conjuntos de genomas de cianobacterias del servidor del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/prokaryotes>).

Estos conjuntos corresponden a:

- 269 genomas completos y aquellos que solo contenian el cromosoma (**complete_chr**)
- 165 genomas nuevos usados en Cabello-Yeves et al. (2022) (**pico**)

Dichos genomas fueron descargados en formato Genebank (.gbk o gbff).

2.1 Abundancia de palíndromos.

Una vez descargados los genomas, el siguiente paso fue calcular el valor observado y esperado de repeticiones de todos los posibles octámeros palindrómicos de 8 nucleótidos.

El valor observado es el número de veces que cada octámero palindrómico se repite a lo largo de cada genoma. El valor esperado se calculó mediante un **modelo de markov de 3er orden**.

2.1.1 Modelos de Markov

En una cadena de Markov, el valor tomado por una variable aleatoria depende de los valores tomados por la variable aleatoria en un estado anterior. El número de estados históricos que influyen en el valor de la variable aleatoria en un lugar dado a lo largo de la secuencia también se conoce como el **grado del proceso de Markov**. El modelo de cadena de Markov de **primer grado** tiene parámetros $|\Sigma| + |\Sigma|^2$, correspondientes a las frecuencias de nucleótidos individuales así como a las frecuencias de dinucleótidos. De esta manera, este modelo permite que una posición sea dependiente de la posición anterior. Sin embargo, las frecuencias

se modelan de manera invariable en la posición y, por lo tanto, pueden no ser adecuadas para modelar señales. Este modelo de secuencia M se define sobre el espacio muestral Σ^* y asigna una probabilidad a cada secuencia x de longitud $n(x)$ sobre Σ^* :

$$P(x|M) = P_1(x_1) \prod_{i=2, \dots, n(x)} P_2(x_i|x_{i-1}, \dots, x_{i-n}) \quad (2.1)$$

donde P_1 es una función de probabilidad en Σ que modela la distribución de α 's en la primera posición de la secuencia y P_2 es la función de probabilidad condicional en $\Sigma \times \Sigma$ que modela la distribución de β 's en la posición $i > 1$ en el símbolo alfabético α en la posición $i - 1$. La estimación de parámetros se hace utilizando el estimador de **probabilidad máxima**. Las probabilidades de transición se estiman utilizando el teorema de Bayes, como se muestra a continuación:

$$P_2(\beta|\alpha) = \frac{P(\alpha\beta)}{P(\alpha)} \quad (2.2)$$

De esta manera, las probabilidades transicionales condicionales de encontrar una base β en la posición (i) dado que la base α se encontró en la posición $(i - 1)$ se calculan encontrando la abundancia del dinucleótido $\alpha\beta$ como una fracción de la abundancia del nucleótido α .

Ejemplo:

Considerando una la secuencia de 25 nucleótidos.

Seq = AACGTCTCTATCATGCCAGGATCTG

Al considerar los modelos de cadena de Markov de **primer grado**, es necesario calcular los $4 - \text{parmetros}$ correspondientes a las **frecuencias de nucleótidos individuales** y los 4^2 parámetros correspondientes a las **frecuencias de dinucleótidos**. Los parámetros de Σ son:

$$\begin{aligned} \Sigma &= \{ \text{freq}(A), \text{freq}(C), \text{freq}(G), \text{freq}(T), \} \\ &= \left\{ \frac{6}{25}, \frac{7}{25}, \frac{7}{25}, \frac{5}{25} \right\} \end{aligned} \quad (2.3)$$

Para calcular P_2 , los valores de probabilidad condicional $\Sigma \times \Sigma$, las frecuencias de dinucleótidos y las probabilidades se calculan a partir de los datos de secuencia. Las frecuencias de los dinucleótidos y las probabilidades se muestran a continuación (con los números entre paréntesis que representan las probabilidades):

$$\Sigma \times \Sigma = \left\{ \begin{array}{llll} freq(AA) = \frac{1}{24} & freq(AC) = \frac{1}{24} & freq(AT) = \frac{3}{24} & freq(AG) = \frac{1}{24} \\ freq(CA) = \frac{2}{24} & freq(CC) = \frac{1}{24} & freq(CT) = \frac{3}{24} & freq(CG) = \frac{1}{24} \\ freq(TA) = \frac{1}{24} & freq(TC) = \frac{4}{24} & freq(TT) = \frac{0}{24} & freq(TG) = \frac{1}{24} \\ freq(GA) = \frac{1}{24} & freq(GC) = \frac{1}{24} & freq(GT) = \frac{1}{24} & freq(GG) = \frac{1}{24} \end{array} \right\} \quad (2.4)$$

A continuación, las probabilidades condicionales se calculan utilizando el teorema de Bayes (consulte la Ecuación (2.2)). Por ejemplo, la probabilidad de encontrar C en la posición $i+1$ dado que se ha encontrado una A en la posición (i) es:

$$P(C|A) = \frac{P_{AC}}{P_A} = \frac{\frac{1}{24}}{\frac{6}{25}} \quad (2.5)$$

Para secuencias grandes, la probabilidad condicional $P(S_i|S_{i-1})$ se aproxima a:

$$P(S_i|S_{i-1}) = \frac{freq(S_i S_{i-1})}{freq(S_{i-1})} \quad (2.6)$$

Las probabilidades condicionales para la secuencia de ejemplo se muestran en (2.4). Usando estos parámetros del modelo, la probabilidad de encontrar el patrón *CAAT* en esta secuencia usando el **modelo de Markov de primer orden** de la secuencia subyacente sería igual a:

$$\begin{aligned} P(C)P(A|C)P(A|A)P(T|A) &= P(C) \cdot \frac{P(CA)}{P(C)} \cdot \frac{P(AA)}{P(A)} \cdot \frac{P(AT)}{P(A)} \\ &= \left(\frac{7}{25}\right) \cdot \left(\frac{50}{168}\right) \cdot \left(\frac{25}{144}\right) \cdot \left(\frac{75}{144}\right) \\ &= 0.0075 \end{aligned} \quad (2.7)$$

2.1.2 Modelo de Markov de orden 1 para hallar octanucleótidos

Por ejemplo, para una octanucleótido de 8 letras, digamos HIP1:

$$W = GCGATCGC$$

Los parametros de Σ corresponden a:

$$\Sigma = \{freq(A), freq(C), freq(G), freq(T)\} \quad (2.8)$$

Los valores de probabilidad condicional de $\Sigma \times \Sigma$ son:

$$\Sigma \times \Sigma = \begin{Bmatrix} freq(AA) & freq(AC) & freq(AT) & freq(AG) \\ freq(CA) & freq(CC) & freq(CT) & freq(CG) \\ freq(TA) & freq(TC) & freq(TT) & freq(TG) \\ freq(GA) & freq(GC) & freq(GT) & freq(GG) \end{Bmatrix} \quad (2.9)$$

Si queremos usar un **modelo de orden 1**, la probabilidad de hallar W segun las ecuaciones (2.1) y(2.2) es:

$$\begin{aligned} P(W) &= P(G) \cdot P(C|G) \cdot P(G|C) \cdot P(A|G) \cdot P(T|A) \cdot P(C|T) \cdot P(G|C) \cdot P(C|G) \\ &= P(G) \cdot \frac{P(GC)}{P(G)} \cdot \frac{P(CG)}{P(C)} \cdot \frac{P(GA)}{P(G)} \cdot \frac{P(AT)}{P(A)} \cdot \frac{P(TC)}{P(T)} \cdot \frac{P(CG)}{P(C)} \cdot \frac{P(GC)}{P(G)} \\ &= P(GC) \cdot \frac{P(CG)}{P(C)} \cdot \frac{P(GA)}{P(G)} \cdot \frac{P(AT)}{P(A)} \cdot \frac{P(TC)}{P(T)} \cdot \frac{P(CG)}{P(C)} \cdot \frac{P(GC)}{P(G)} \end{aligned} \quad (2.10)$$

finalmente:

$$P(W) = \frac{P(GC) \cdot P(CG) \cdot P(GA) \cdot P(AT) \cdot P(TC) \cdot P(CG) \cdot P(GC)}{P(C) \cdot P(G) \cdot P(A) \cdot P(T) \cdot P(C) \cdot P(G)} \quad (2.11)$$

2.1.3 Abundancia de acuerdo a la frecuencia observada y tasa OE

Adicionalmente se calculó una abundancia de acuerdo a la frecuencia observada cada 1000 nucleótidos (**FrecObs**) y otra en base a la tasa de sitios observados sobre esperados (**OE**).

2.2 Significancia de los conteos observados

Para darle una significancia estadística al conteo se usó una **prueba binomial** y un test **FDR**.

2.2.1 Prueba binomial.

Para calcular la probabilidad de que el **conteo esperado**, el cual sigue una distribución binomial, tome valores MAYORES O IGUALES al **conteo observado**, usamos la función ***pbinom***

```
pbinom(q, size, prob, lower.tail = FALSE)
```

Donde:

- **q**: Cuantil o vector de cuantiles
- **size**: Numero de experimentos ($n \geq 0$)

- **prob:** Probabilidad de éxito en cada experimento
- **lower.tail:** si es TRUE, las probabilidades son $P(X \leq x)$, o $P(X > x)$ en otro caso.

Tomemos un caso particular del conteo:

Spp	Palindrome	Observed	Markov (Expected)	GenomeSize
336-3	GCGATCGC	6202	65.396286071305	6420126

La probabilidad de que se observen **6202** sitios *CCGATCCC*, O MAS, si el número de sitios posibles en el genoma es **6420119** ($6420126 - 8 + 1$, es decir $GenomeSize - k + 1$) y la probabilidad de observar dicho sitio es de: **1.018615e-05** ($\frac{65.3962860713054}{6420126 - 8 + 1}$, es decir $\frac{Expected}{GenomeSize - k + 1}$), es casi **0**.

En otras palabras, la probabilidad de que suceda lo que estoy observando es muy baja.

2.2.2 FDR

Para estudios en los que se realizan miles de test de forma simultánea, el resultado de estos métodos es demasiado conservativo e impide que se detecten diferencias reales. Una alternativa es controlar el false discovery rate o FDR.

Para nuestros datos el FDR se calculó en R de usando los valores obtenidos de la prueba binomial:

```
p.adjust(pval, method="fdr")
```

Donde **pval** es la probabilidad obtenida de la prueba binomial.

2.2.3 Conjuntos de conteos de acuerdo a la significancia

Se crearon 4 conjuntos de resultados de acuerdo a 4 valores mínimos de significancia de acuerdo al FDR:

- **sel32** (1×10^{-32})
- **sel64** (1×10^{-64})
- **sel128** (1×10^{-128})
- **sel256** (1×10^{-256})

El conjunto más laxo corresponde a **sel32** ya que su valor de corte de FDR es 1×10^{-32} , debido a esto, es el conjunto con más palíndromos (Figura 2.1). Por otro lado, el conjunto **sel256** es el conjunto más restrictivo ya que su valor de corte de FDR es de 1×10^{-256} , y por lo tanto tiene menos palíndromos (Figura 2.2).

En la tabla (Tabla ??) se muestra el conjunto **sel256** el cual contiene 9 palíndromos significativos.

2.3 Visualización de la abundancia: OE vs Frecuencia Observada cada 1000nt

Para visualizar la abundancia creamos un gráfico que muestra el enriquecimiento OE vs la abundancia por cada 1000 nucleótidos. Esto se hizo para cada conjunto de significancia y para cada conjunto de genomas.

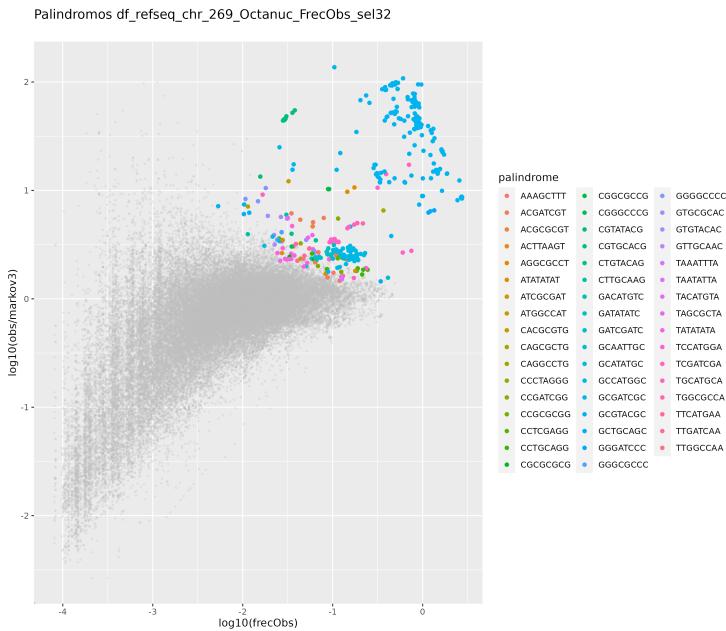


Figure 2.1: **Enriquecimiento versus abundancia de palíndromos octámeros en el conjunto de genomas complete_chr con un $FDR \leq 1 \times 10^{-32}$.** Enrichment (**O/E**) in function of the frequency of the motif every 1000 nt (**FreqObs**). Each point represents a palindromic octamer of a genome.

2.4 Filogenia

Se infirieron filogenias para los dos conjuntos de genomas. Para esto usamos el software **Orthofinder** (Emms and Kelly (2019)), el cual utiliza **FastME** para inferir la filogenia (Lefort et al. (2015)). **FastME** proporciona algoritmos de distancia para inferir filogenias. FastME se basa en una evolución mínima equilibrada, que es el principio mismo de Neighbor Joining (NJ).

El software se corrió en la línea de comandos de la siguiente manera:

```
orthofinder -f genomas/
```

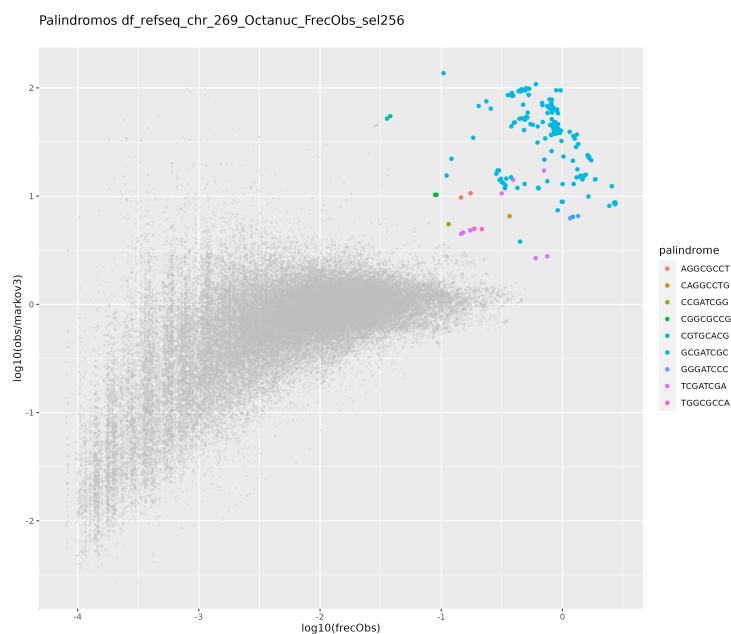


Figure 2.2: **Enriquecimiento versus abundancia de palíndromos octámeros en el conjunto de genomas complete_chr con un $FDR \leq 1 \times 10^{-256}$.** Enriquecimiento (**O/E**) en función de la frecuencia del motivo cada 1000 nt (**FrecObs**). Cada punto representa un palíndromo octámero de un genoma.

2.4.1 Anotación de la filogenia

Para tener una forma de más visual de entender la distribución de los palíndromos en los genomas, anotamos las filogenias de acuerdo a su abundancia. Se anotaron 4 filogenias según la significancia (**sel32**, **sel64**, **sel128** y **sel256**) para los 2 conjuntos de genomas. Además, esta anotación se hizo para la abundancia de acuerdo a la Frecuencia Observada por cada 1000 nucleotidos (*FrecObs*) (Figura 2.3) y a la tasa de Observados sobre esperados (*OE*) (Figura 2.4).

La anotación de las filogenias consistió en agregarles un heatmap que mostrara la abundancia de cada palíndromo y un diagrama de barras que indicara aquel palíndromo con mayor abundancia.

2.5 Identificación de casos relevantes

De acuerdo a las filogenias anotadas, se buscaron aquellos casos en los que HIP1 o algún otro palíndromo se hubiera ganado o perdido abruptamente y en su lugar hubiese otro palíndromo abundante. Además, se buscó que en aquellos casos, las ramas en la filogenia no fueran tan largas. Esto se hizo de manera visual revisando el diagrama de barras que mostraba el palíndromo más abundante para cada especie. En total hubo 6 subclados que mostraban cambios abruptos en la abundancia de sus palíndromos (Figura 2.5).

También se hallo un caso interesante en el conjunto **pico** (**clado A18-40**) el cual sirvió como punto de partida para análisis posteriores. En este caso se muestra que la especie *Synechococcus* A18-40 muestra una tasa OE mucho mayor comparada con las demás especies del clado (Figura 2.6).

2.6 Reconstrucción Ancestral de sitios palindrómicos en ortólogos

Para tratar de entender como es que los sitios HIP1 han ido evolucionando, hicimos una reconstrucción de sitios ancestrales y posteriormente construimos varios conjuntos de redes para visualizar dicha evolución.

2.6.1 Ortólogos

Para simplificar la reconstrucción de secuencias ancestrales usamos únicamente los ortólogos. Para obtener esto usamos el pipeline `get_homologues`:

```
get_homologues.pl -d gbff -t 0 -M -n PPN
```

Después de obtener los ortólogos filtramos:

- aquellos que no estuvieran en las 6 especies del clado
- aquellos que tuvieran mas de una copia (parálogos)
- aquellos sin sitios HIP1

2.6. RECONSTRUCCIÓN ANCESTRAL DE SITIOS PALINDRÓMICOS EN ORTÓLOGOS17



Figure 2.3: **Filogenia del conjunto de genomas *complete_chr* anotada de acuerdo a la Frecuencia observada cada 1000 nt (FreqObs).** La abundancia visualizada en esta filogenia es de acuerdo al conjunto **sel256**, es decir conteos con un $FDR \leq 1 \times 10^{-256}$. La filogenia muestra 269 especies, frente a la filogenia se muestra un heatmap que indica la abundancia de cada palíndromo. Frente al Heatmap se muestra un Diagrama de barras el cual indica el palíndromo mas abundante de entre todos.

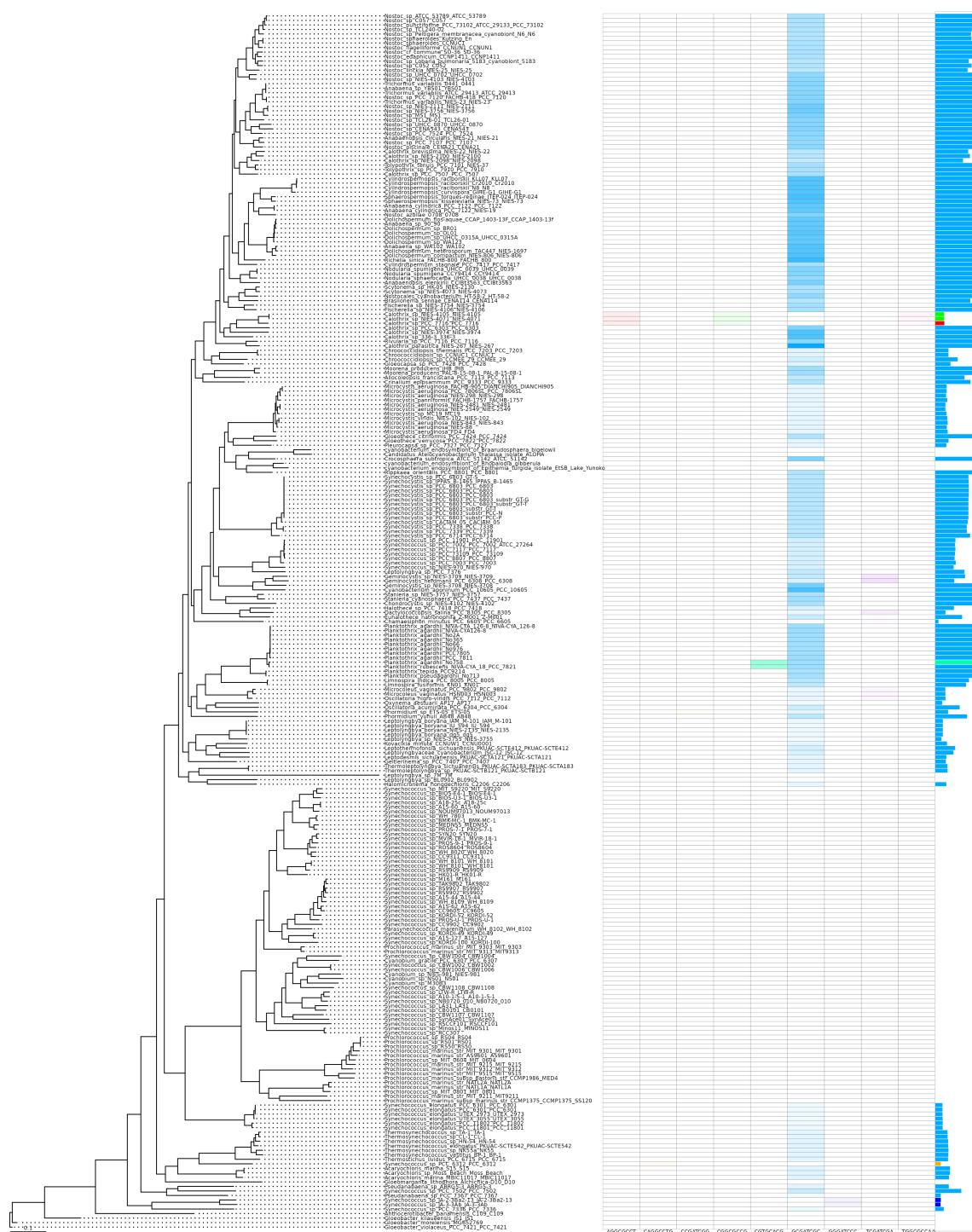


Figure 2.4: **Filogenia del conjunto de genomas *complete_chr* anotada de acuerdo a la tasa de observados sobre esperados (OE).** La abundancia visualizada en esta filogenia es de acuerdo al conjunto **sel256**, es decir conteos con un $FDR \leq 1 \times 10^{-256}$. La filogenia muestra 269 especies, frente a la filogenia se muestra un heatmap que indica la abundancia de cada palíndromo. Frente al Heatmap se muestra un Diagrama de barras el cual indica el palindromo mas abundante de entre todos.

2.6. RECONSTRUCCIÓN ANCESTRAL DE SITIOS PALINDRÓMICOS EN ORTÓLOGOS19

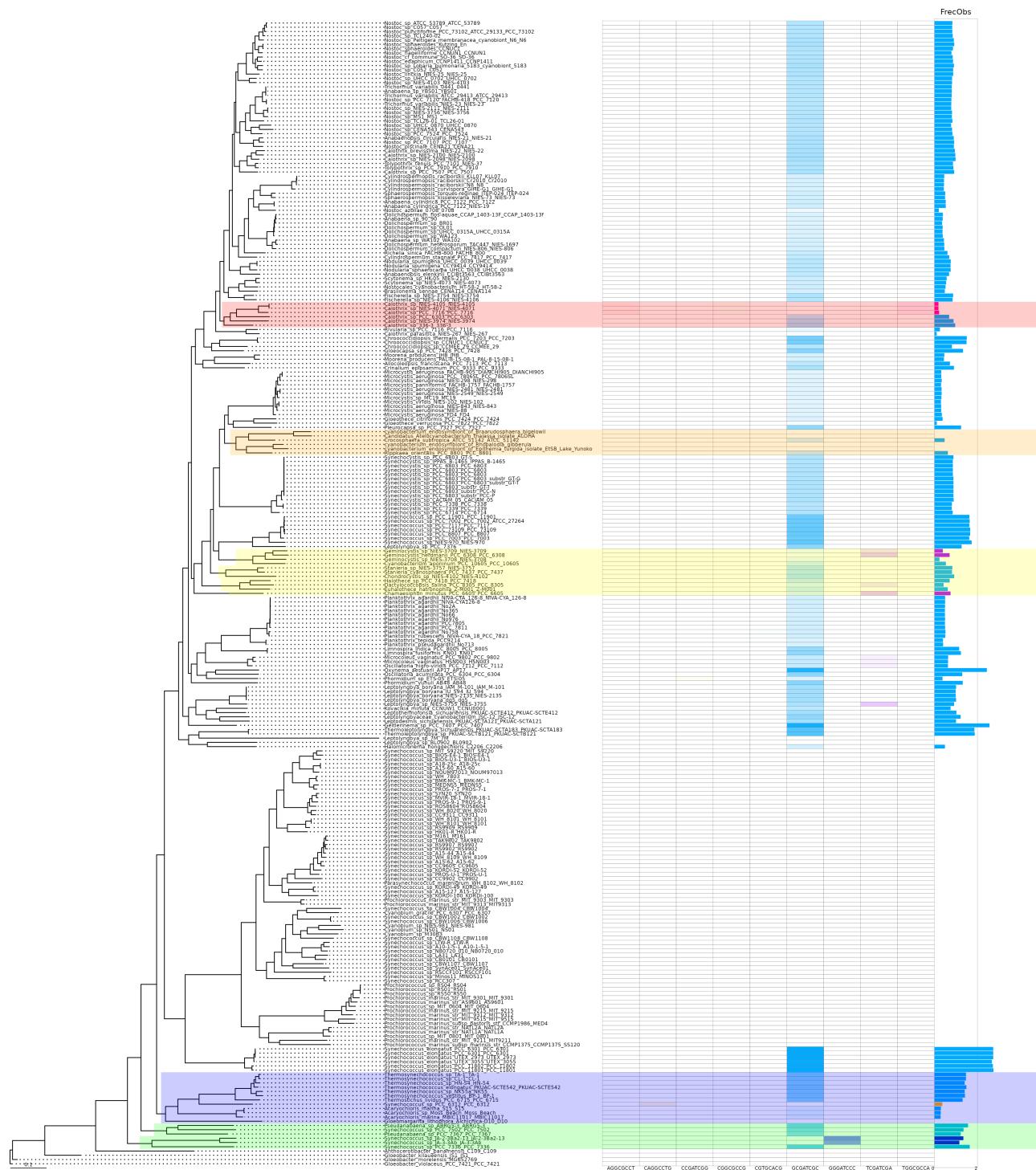


Figure 2.5: **Casos de interés.** En la figura se muestran remarcados los casos interesantes: **clado calothrix** (rojo), **clado cyanobacterium** (naranja), **clado geminocystis** (amarillo), **clado thermosynechococcus** (azul), **clado pseudoanabaena** (verde).

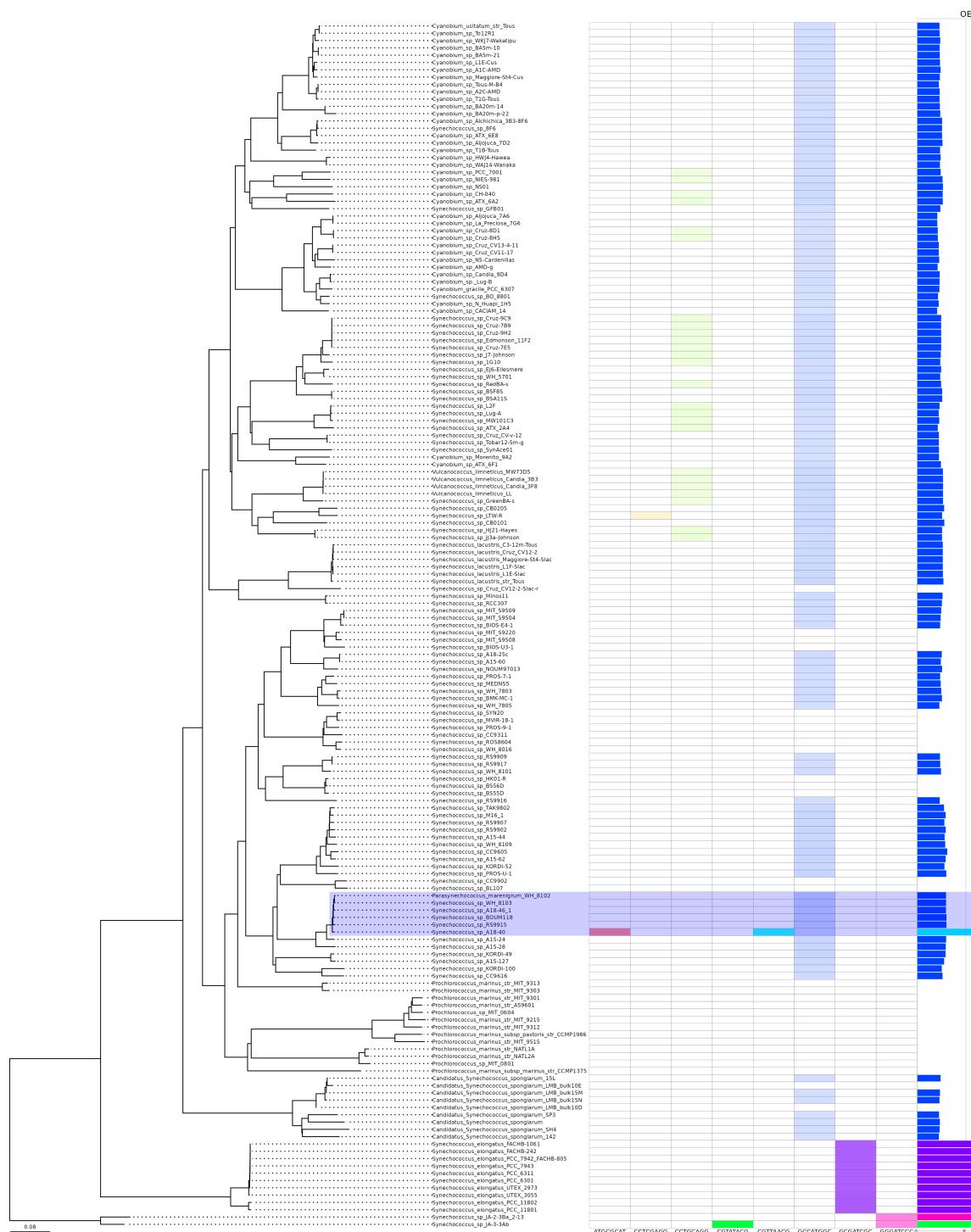


Figure 2.6: **Casos de interés.** En la figura se muestra remarcado el **clado A18-40** (azul).

2.6.2 Reconstrucción

Para hacer la reconstrucción usamos la paguetería de R `phangorn`, la cual proporciona varios métodos para estimar estados de caracteres ancestrales con Máxima Parsimonia (MP) o Máxima Verosimilitud (ML). En este caso usamos ML. Adicionalmente podemos asignar los estados ancestrales según la máxima verosimilitud (“ml”):

$$P(x_r = A) = \frac{L(x_r = A)}{\sum_{k \in \{A, C, G, T\}} L(x_r = k)}$$

y el criterio de mayor probabilidad posterior (“bayes”):

$$P(x_r = A) = \frac{\pi_A L(x_r = A)}{\sum_{k \in \{A, C, G, T\}} \pi_k L(x_r = k)}$$

dónde $L(x_r)$ es la probabilidad conjunta de los estados en las puntas y el estado en la raíz x_r y π_i son las frecuencias base estimadas del estado i .

Toda la información de la reconstrucción fue guardada en dos tablas las cuales contienen listas de cada transición entre cada estado. Estas tablas fueron creadas con la siguiente función:

```
source("ASR_Orth_Functions/NodeAndEdges.R")

Create_Transition_Table (SitesTable = "Clados/Callothrix_clade/PALINDROMES/GCGATCGC/Orthologues_PALINDROMES",
                           EvolutionModel = "F81",
                           Method = "bayes",
                           Phylogeny = "Clados/Callothrix_clade/SpeciesTree_rooted.txt",
                           OrthoPath = "Clados/Callothrix_clade/PALINDROMES/GCGATCGC/Only_OPALINDROMES")
```


Chapter 3

RESULTADOS

Acontinuación se presentan los resultados en cuatro secciones:

- La **Sección I** muestra los análisis de la distribución de los sitios palindrómicos a través de los ortólogos y marcos de lectura de las especies.
- La **Sección II** muestra una serie de resultados de la reconstrucción ancestral de los sitios palindrómicos HIP1 y TGGCGCCA únicamente para el clado Calothrix.
- La **Sección III** muestra una serie de resultados de la reconstrucción ancestral de los sitios palindrómicos HIP1 y TGGCGCCA únicamente para el clado Thermosynechococcus.
- La **Sección IV** muestra los resultados del análisis de sitios CGTTAACG en el clado A18-40.
- La **Sección V** muestra los resultados del análisis de sitios repetidos en los clados.
- La **Sección VI** muestra una serie de resultados de la reconstrucción ancestral de los sitios palindrómicos HIP1 para los clados Cyanobacterium, Geminocystis y Pseudoanabaena.

Sección I

3.1 Distribución de HIP1 en los marcos de lectura

Para el análisis de los sitios palindrómicos primero se hizo un conteo de los sitios en cada especie de cada clado para luego tomar aquella especie que tuviera la mayor cantidad de sitios posibles. Esto con el fin de tener más sitios para analizar. Aquellas especies con la mayor cantidad de sitios se muestran resaltadas en amarillo en la Tabla ??.

Para ver como es la distribución de los sitios HIP1 a través del genoma hicimos un conteo de sitios en cada marco de lectura (Tabla ??).

Sección II

3.2 Clado Calothrix

El clado calothrix contiene 6 especies y es de interés ya que según la filogenia están estrechamente relacionadas y muestra un cambio en el palíndromo más abundante, pasando de **GCGATCGC** a **TGGCGCCA** (Figure 3.1).

3.2.1 Conjunto de sitios HIP1 usando la especie 336-3 como referencia

3.2.1.1 Red de transiciones

Para hacer mas visual la reconstrucción, construimos una red de las transiciones entre los estados ancestrales. Esto lo hicimos en r usando la función `Create_Transition_Table()`:

Posteriormente creamos la red usando la función `Create Network()`:

y visualizamos dicha red.

Para visualizar la red usamos la paquetería `networkD3`. Hicimos 2 figuras, la (Figura ??) muestra la red como una conexión de nodos a través de vértices con un grosor proporcional al número de veces que ocurrió cada transición. En dicha red podemos ver algunos nodos con bordes muy gruesos como **GCGATTGC**, **GCAATTGC**, **GCTATCGC**, **GCTATTGC** (Tabla ??).

En la (Figura ??) podemos ver las transiciones de una forma mas ordenada, con el numero de ocurrencias y la dirección en la que ocurrieron.

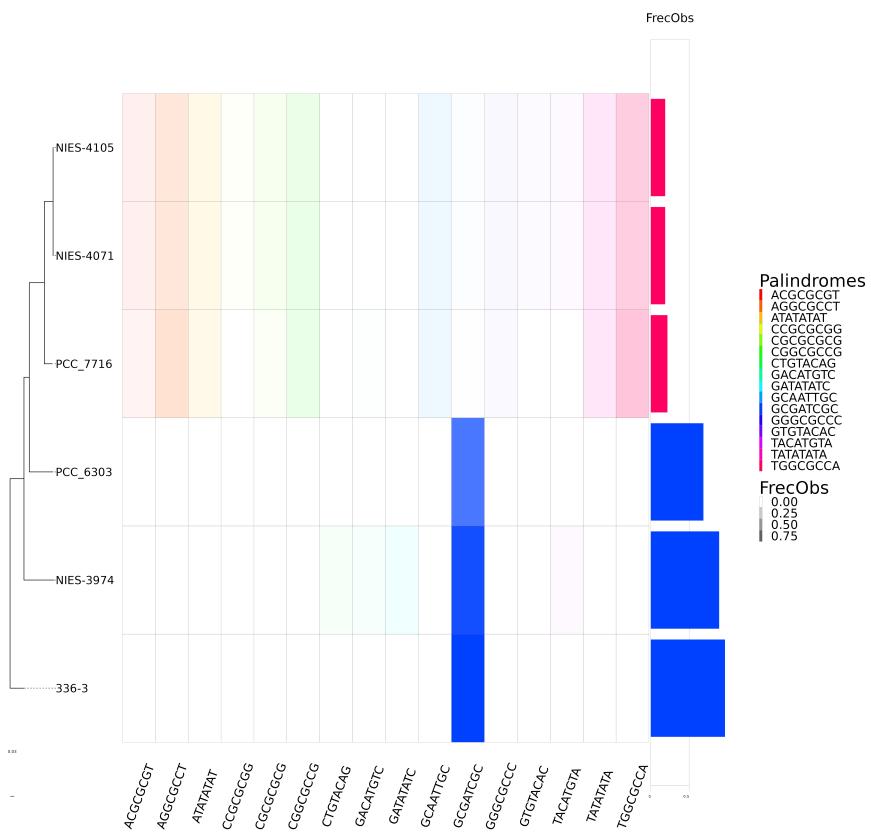


Figure 3.1: **Filogenia anotada del clado Calothrix.** En esta imagen se muestra un cambio abrupto en la Frecuencia observada de **GCGCATCGC** en las especies NIES-4105, NIES-4071 y PCC_7716.

3.2.1.2 Transiciones entre Nodo 9 y Nodo 10

Para entender más como es que se gana o se pierden los sitios palindrómicos revisamos la transición en tre los nodos 9 y 10. Esto es porque es esta transicion de nodos la que separa a los dos subclados entre los que hay una repentina cambio de abundancia de sitios palindrómicos (Figura 3.2).

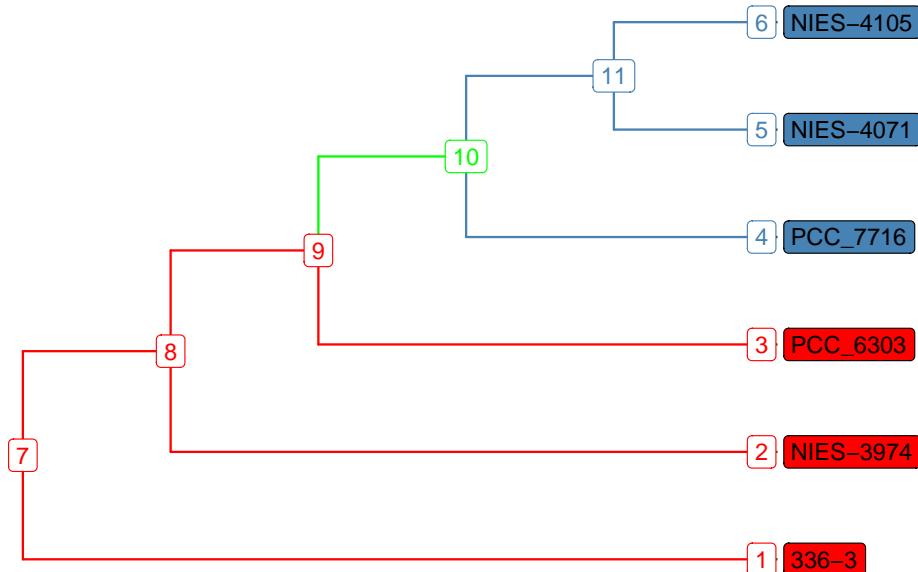


Figure 3.2: **Filogenia del clado Calotrix.** En rojo y azul se muestran los subclados unidos (en verde) por la transición entre los nodos 9 y 10.

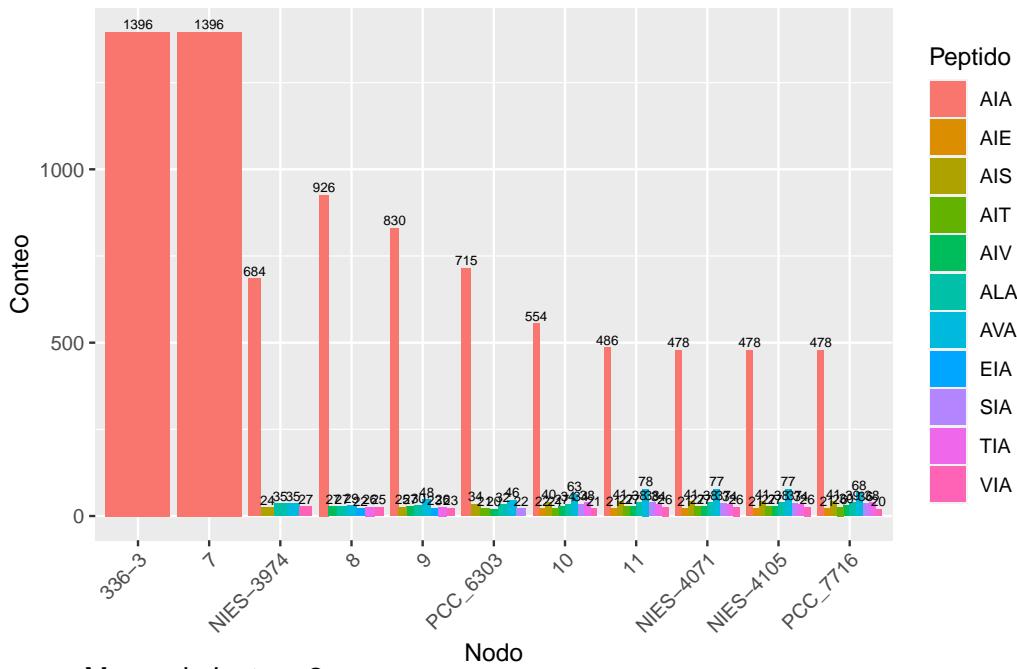
Para hacer esto filtramos los datos de la red para mostrar únicamente las transiciones que se dieron entre los nodos 9 y 10 e hicimos las mismas figuras. En la (Figura ??) se muestra la red como una conexión de nodos a través de vértices con un grosor proporcional al número de veces que ocurrió cada transición. En la (Figura ??) podemos ver las transiciones de una forma más ordenada, con el número de ocurrencias y la dirección en la que ocurrieron.

3.2.1.3 Mutaciones en los codones

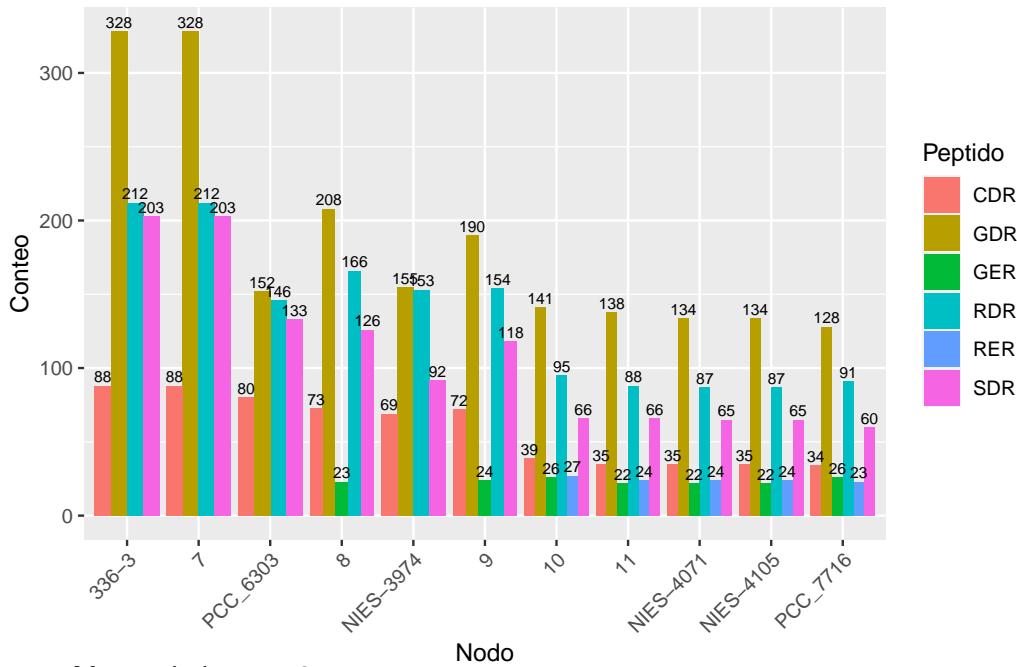
Para entender como es que se van ganando o perdiendo los sitios palindrómicos hicimos un análisis del tipo mutaciones de los sitios. Esto lo hicimos viendo en que marco de lectura se encontraba cada nodo y revisando la secuencia de aminoacidos que codificaban. En la (Figura 3.3) mostramos 3 gráficos que indican la abundancia de los peptidos codificados por los sitios palindrómicos de acuerdo al marco de lectura en el que se encuentran. En esta figura podemos observar que el marco de lectura es el que contiene la mayoría de los sitios

En la (Figura 3.4) mostramos 3 gráficos que indican la abundancia del tipo de

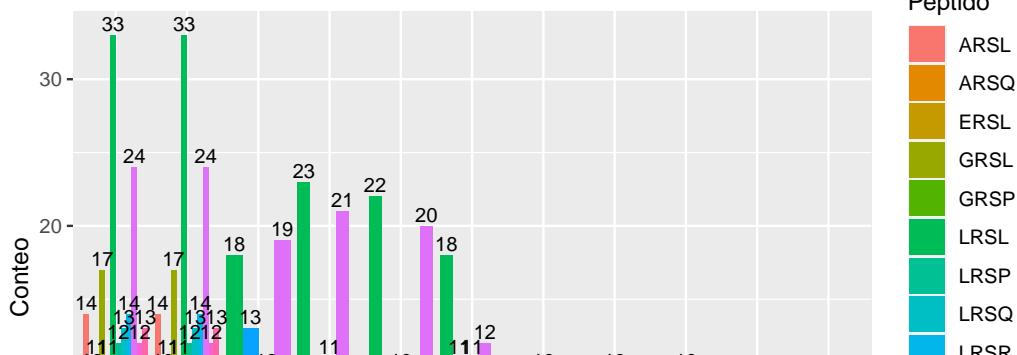
Marco de lectura 1



Marco de lectura 2



Marco de lectura 3



mutaciones que hay en cada nodo de acuerdo al marco de lectura. Los sitios de mutaciones mostrados pueden ser de los siguientes tipos:

- Conservative (la secuencia de AA cambió pero tiene similitud de acuerdo al score de BLOSUM62)
- ConservativeNoSiteMut (la secuencia de AA cambió pero tiene similitud de acuerdo al score de BLOSUM62. Sin embargo, el sitio no sufrió mutaciones)
- Deletion (La secuencia de AA tiene sufrió 1 o mas delecciones)
- NoMutation (La secuencia de AA no sufrió mutaciones)
- NoSynonym (La secuencia de AA cambió)
- NoSynonymNoSiteMut (La secuencia de AA cambió. Sin embargo, el sitio no sufrió mutaciones.)
- Synonym (El sitio sufrió mutaciones. Sin embargo, la secuencia de AA no cambió.)

3.2.1.4 Análisis de sitios en los cuales su ancestro era HIP1

Para tratar de entender como es que los sitios HIP1 se pierden hicimos un análisis únicamente en las transiciones en las que el nodo ancestral tenía un sitio HIP1.

En la (Figura 3.5) mostramos 3 gráficos que indican la frecuencia del tipo de sustituciones que hubo para estos casos para cada nodo en cada uno de los marcos de lectura.

En la (Figura 3.6) mostramos 3 gráficos (uno por cada marco de lectura) que indican la frecuencia de las mutaciones en cada uno de los 8 nucleótidos del sitio HIP.

En la (Figura 3.7) mostramos 3 gráficos (uno por cada marco de lectura) que indican la frecuencia del tipo sustitución de bases.

3.2.1.5 Análisis de sitios en los cuales solo el nodo actual tiene HIP1

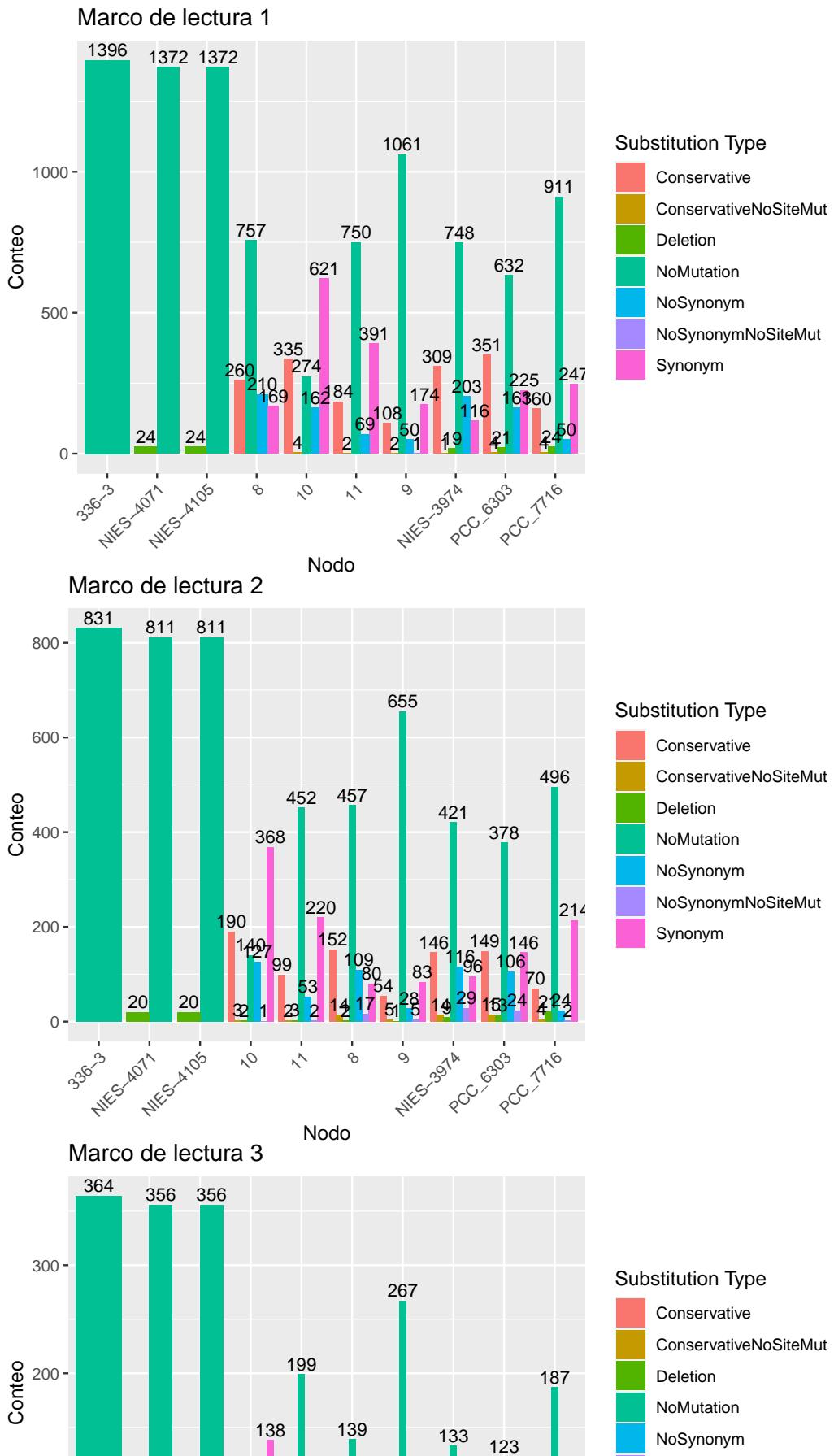
Para tratar de entender como es que los sitios HIP se ganan, hicimos un análisis únicamente en las transiciones en las que el nodo actual tenía un sitio HIP1.

En la Figura 3.8 mostramos 3 gráficos (uno por cada marco de lectura) que indican la frecuencia del tipo de sustituciones que hubo para estos casos para cada nodo en cada uno de los marcos de lectura.

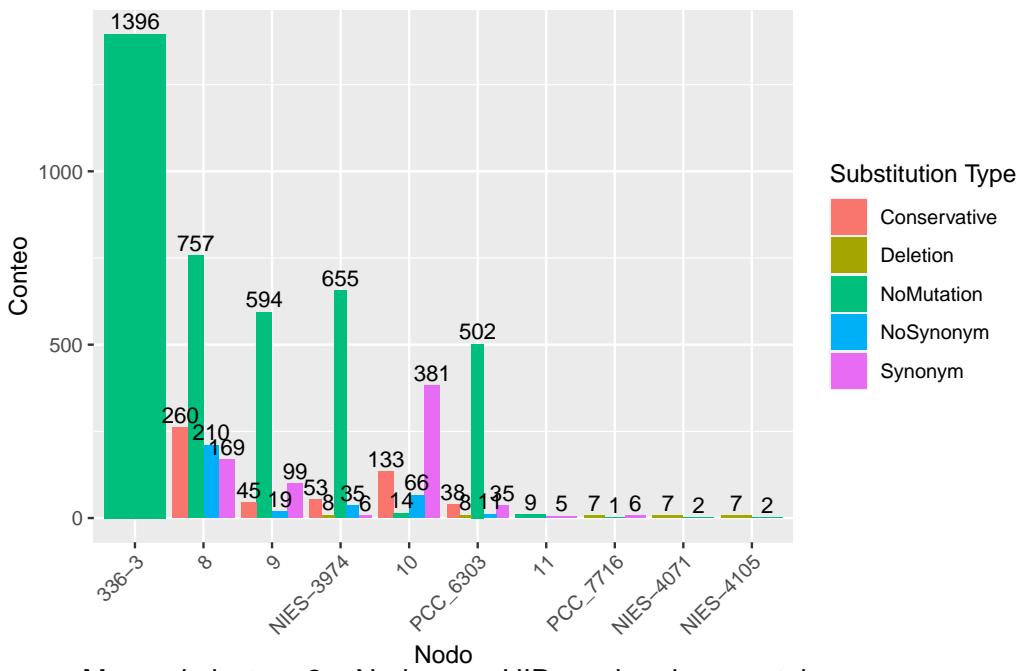
3.2.2 Conjunto de sitios HIP1 usando la especie NIES-3974 como referencia

3.2.2.1 Red de transiciones

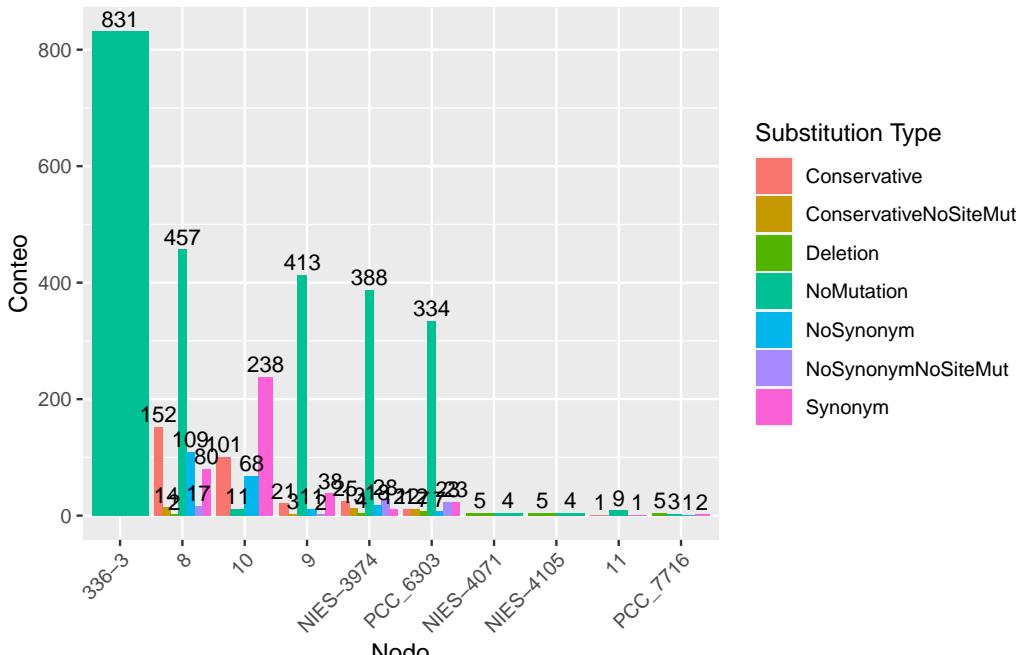
visualizamos dicha red .



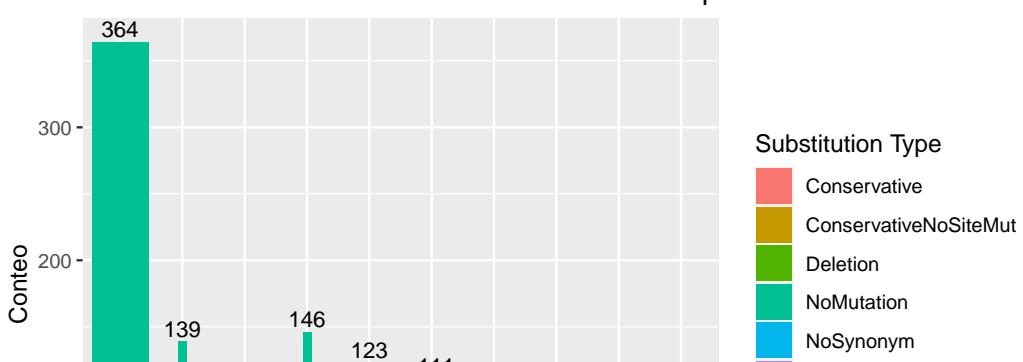
Marco de lectura 1 – Nodos con HIP en el nodo parental



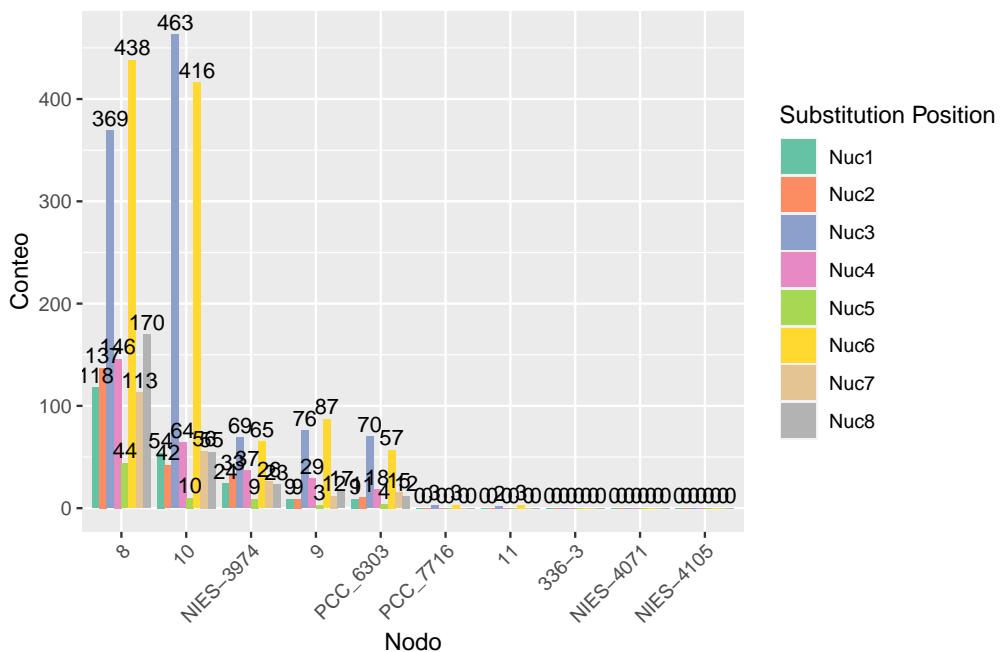
Marco de lectura 2 – Nodos con HIP en el nodo parental



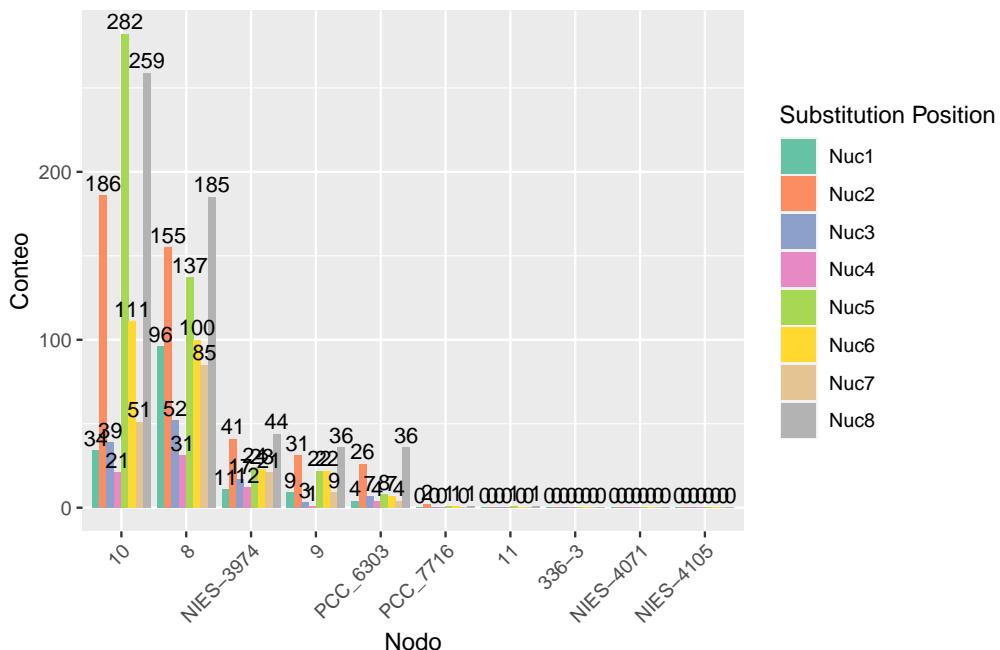
Marco de lectura 3 – Nodos con HIP en el nodo parental



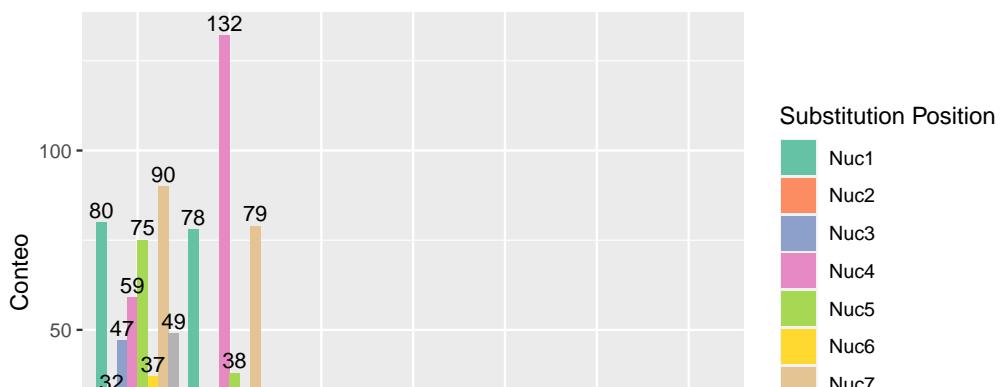
Marco de lectura 1 – Nodos con HIP en el nodo parental – Mutaciones por



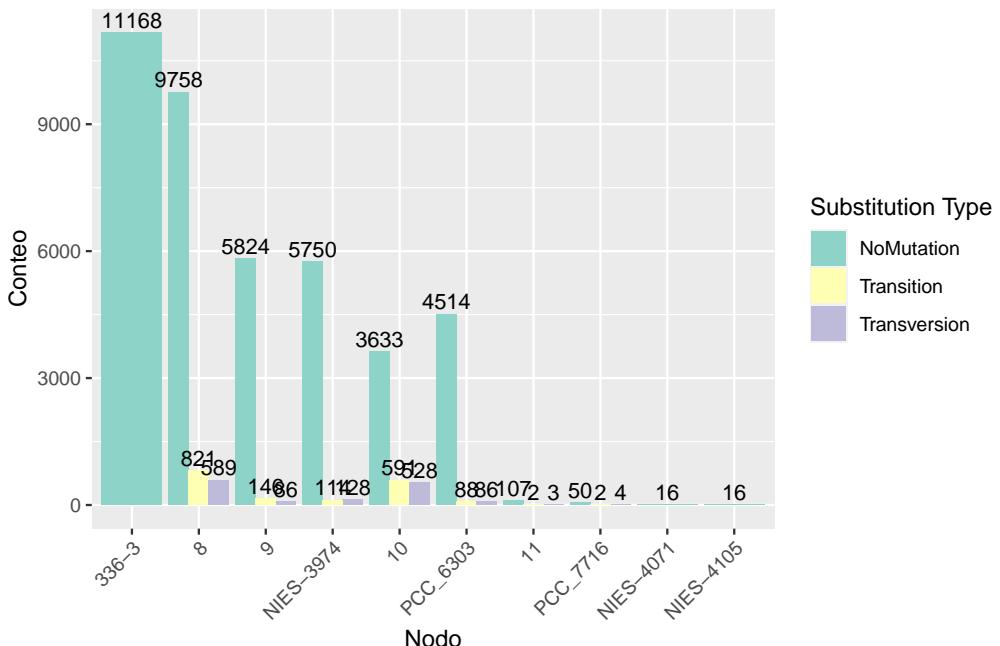
Marco de lectura 2 – Nodos con HIP en el nodo parental – Mutaciones por



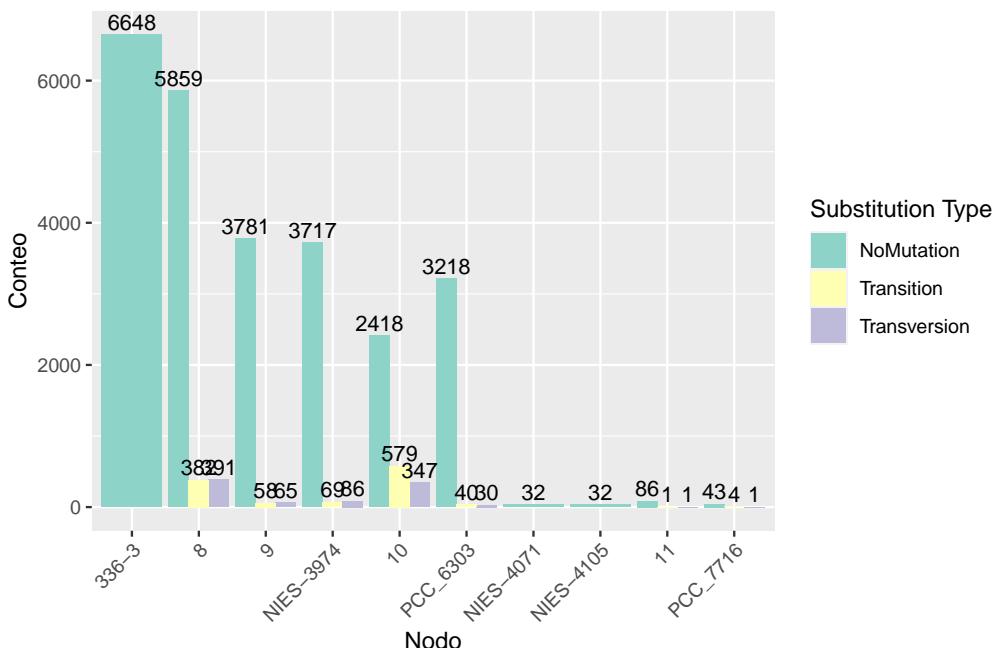
Marco de lectura 3 – Nodos con HIP en el nodo parental – Mutaciones por



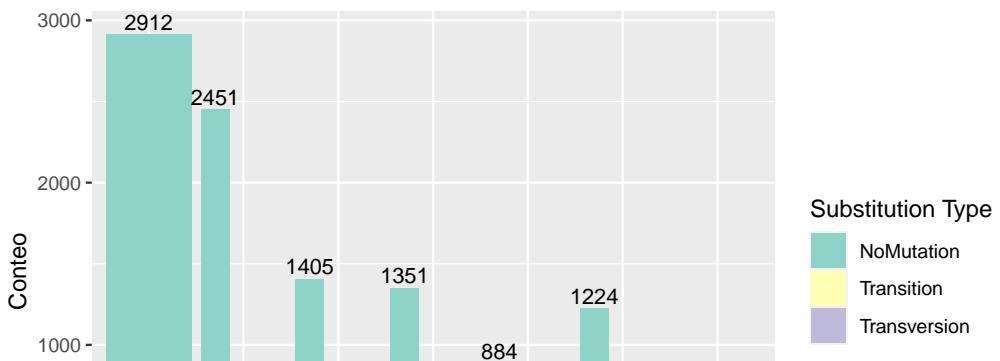
Marco de lectura 1 – Nodos con HIP en el nodo parental – Tipo de sustitución



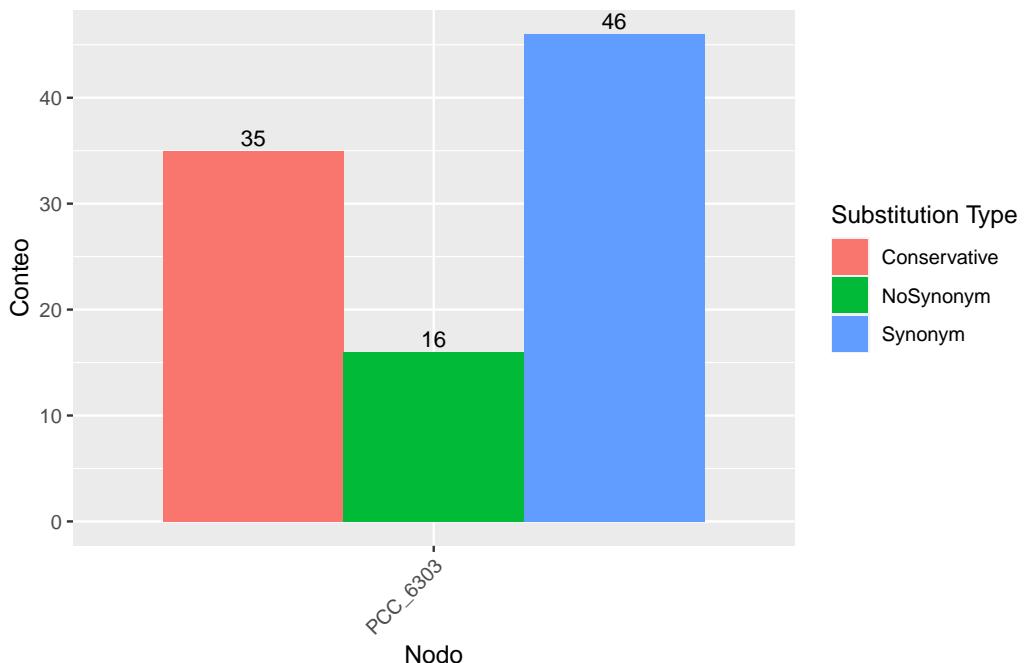
Marco de lectura 2 – Nodos con HIP en el nodo parental – Tipo de transición



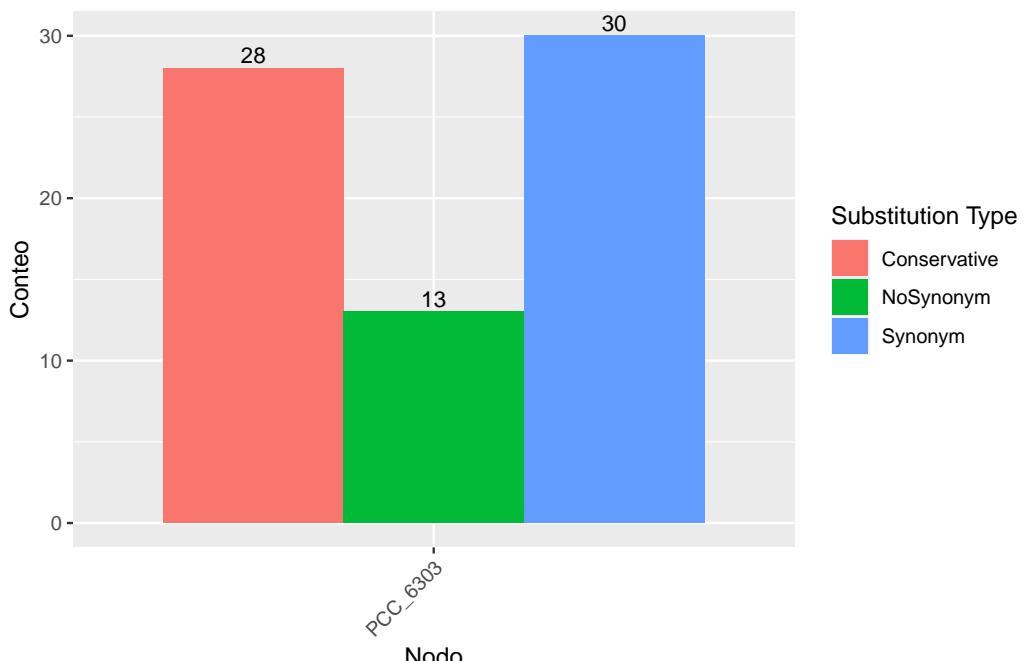
Marco de lectura 3 – Nodos con HIP en el nodo parental – Tipo de transición



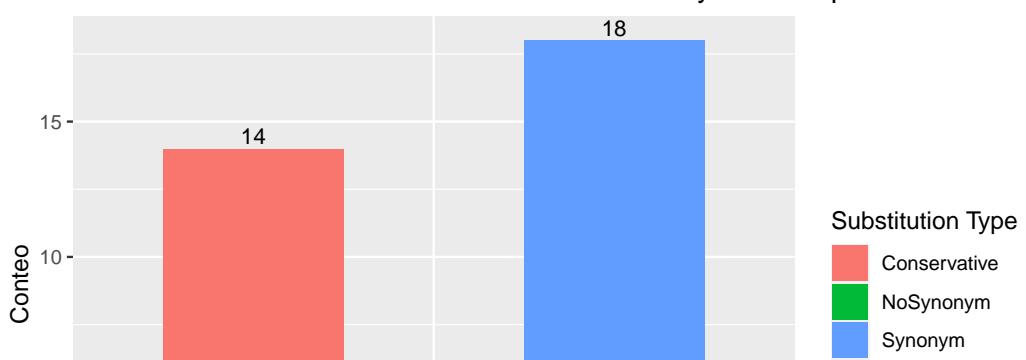
Marco de lectura 1 – HIP Solo en el nodo actual y no en el parental.



Marco de lectura 2 – HIP Solo en el nodo actual y no en el parental.



Marco de lectura 3 – HIP Solo en el nodo actual y no en el parental.



Para visualizar la red usamos la paquetería `networkD3`. Hicimos 2 figuras, la (Figura ??) muestra la red como una conexión de nodos a través de vértices con un grosor proporcional al número de veces que ocurrió cada transición.

En la (Figura ??) podemos ver las transiciones de una forma más ordenada, con el número de ocurrencias y la dirección en la que ocurrieron.

3.2.2.2 Transiciones entre Nodo 9 y Nodo 10

Para entender más como es que se gana o se pierden los sitios palindrómicos revisamos la transición entre los nodos 9 y 10. Esto es porque es esta transición de nodos la que separa a los dos subclados entre los que hay una repentino cambio de abundancia de sitios palindrómicos (Figura 3.2).

Para hacer esto filtramos los datos de la red para mostrar únicamente las transiciones que se dieron entre los nodos 9 y 10 e hicimos las mismas figuras. En la (Figura ??) se muestra la red como una conexión de nodos a través de vértices con un grosor proporcional al número de veces que ocurrió cada transición. En la (Figura ??) podemos ver las transiciones de una forma más ordenada, con el número de ocurrencias y la dirección en la que ocurrieron.

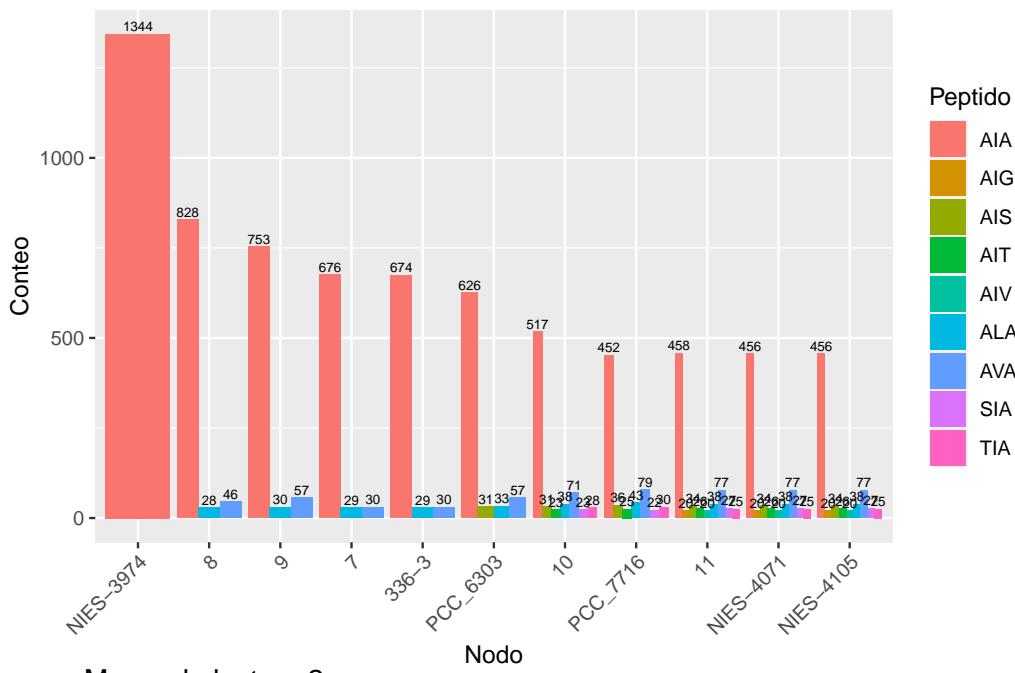
3.2.2.3 Mutaciones en los codones

Para entender como es que se van ganando o perdiendo los sitios palindrómicos hicimos un análisis del tipo mutaciones de los sitios. Esto lo hicimos viendo en qué marco de lectura se encontraba cada nodo y revisando la secuencia de aminoácidos que codificaban. En la (Figura 3.9) mostramos 3 gráficos que indican la abundancia de los péptidos codificados por los sitios palindrómicos de acuerdo al marco de lectura en el que se encuentran. En esta figura podemos observar que el marco de lectura es el que contiene la mayoría de los sitios

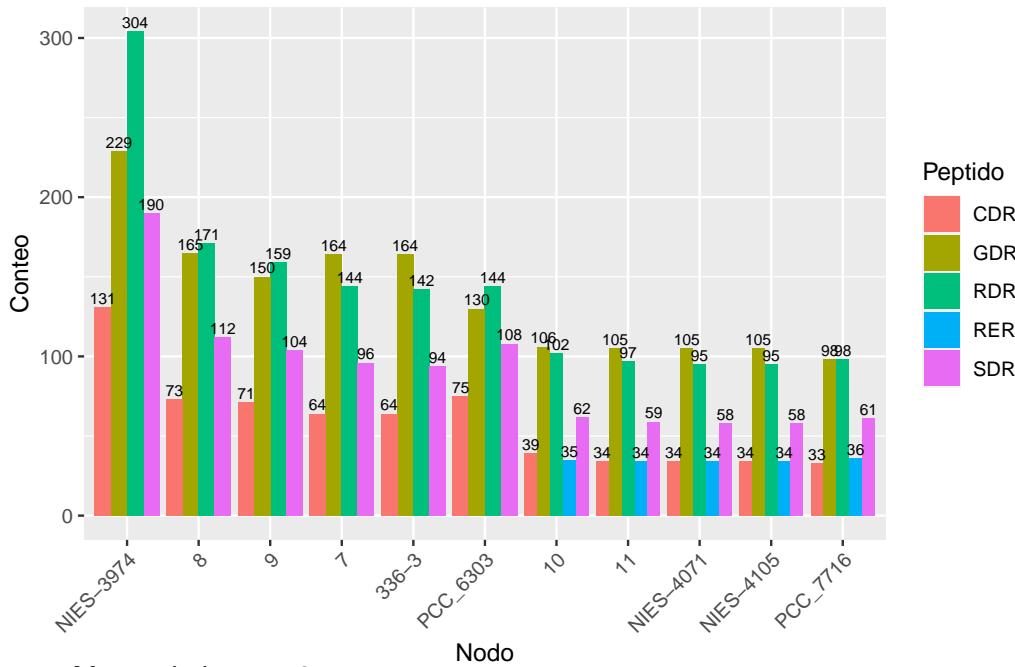
En la (Figura 3.10) mostramos 3 gráficos que indican la abundancia del tipo de mutaciones que hay en cada nodo de acuerdo al marco de lectura. Los sitios de mutaciones mostrados pueden ser de los siguientes tipos:

- Conservative (la secuencia de AA cambió pero tiene similitud de acuerdo al score de BLOSUM62)
- ConservativeNoSiteMut (la secuencia de AA cambió pero tiene similitud de acuerdo al score de BLOSUM62. Sin embargo, el sitio no sufrió mutaciones)
- Deletion (La secuencia de AA tiene sufrió 1 o más delecciones)
- NoMutation (La secuencia de AA no sufrió mutaciones)
- NoSynonym (La secuencia de AA cambió)
- NoSynonymNoSiteMut (La secuencia de AA cambió. Sin embargo, el sitio no sufrió mutaciones.)
- Synonym (El sitio sufrió mutaciones. Sin embargo, la secuencia de AA no cambió.)

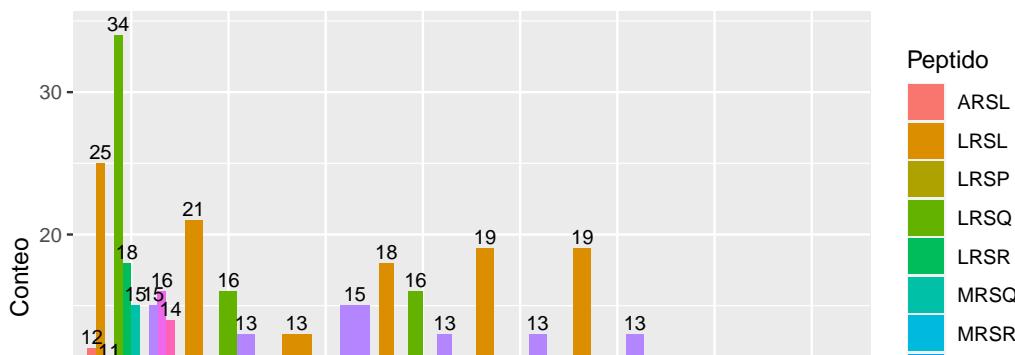
Marco de lectura 1

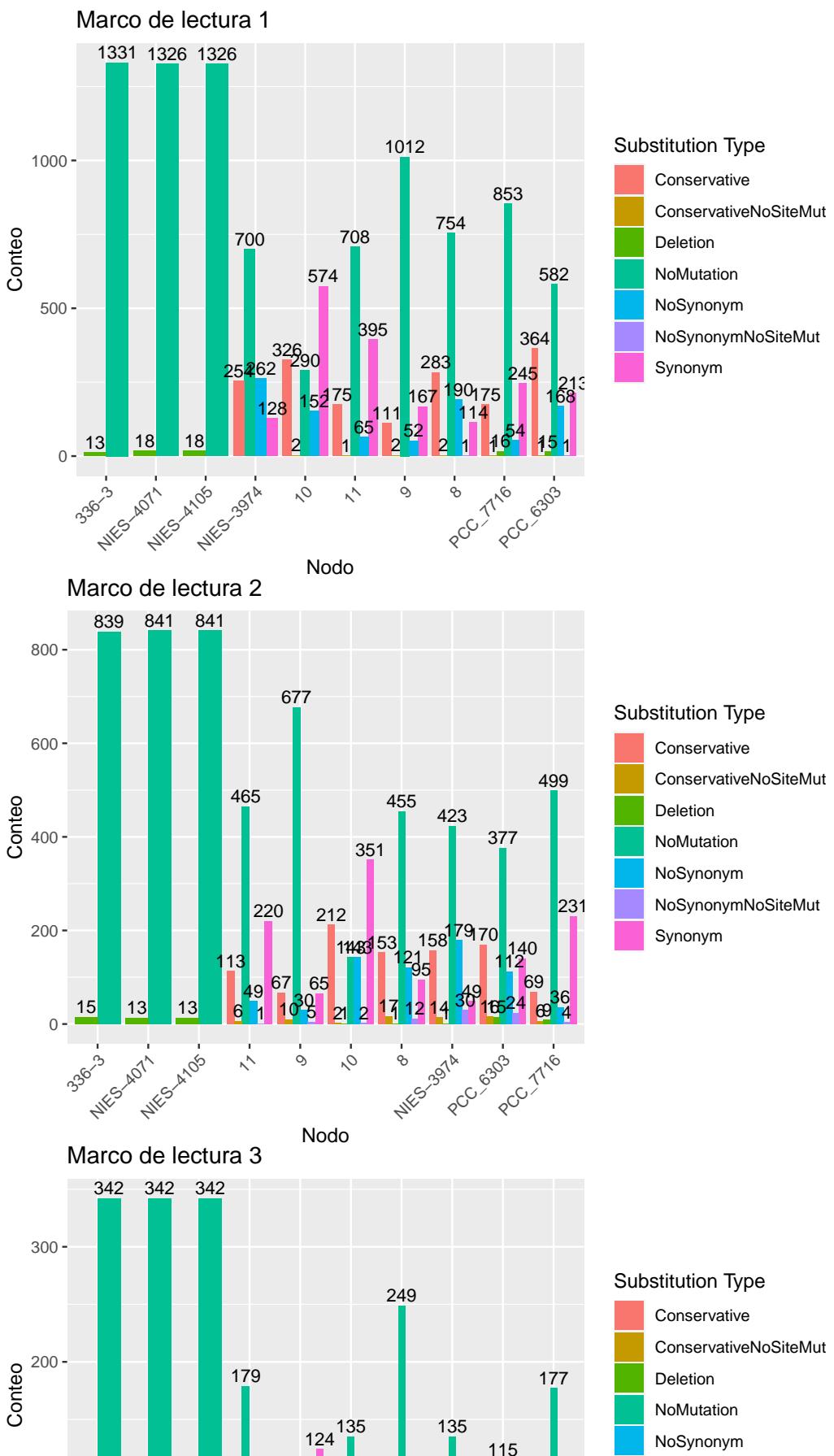


Marco de lectura 2



Marco de lectura 3





3.2.2.4 Análisis de sitios en los cuales su ancestro era HIP1

Para tratar de entender como es que los sitios HIP1 se pierden hicimos un análisis únicamente en las transiciones en las que el nodo ancestral tenía un sitio HIP1.

En la (Figura 3.11) mostramos 3 gráficos que indican la frecuencia del tipo de sustituciones que hubo para estos casos para cada nodo en cada uno de los marcos de lectura.

En la (Figura 3.12) mostramos 3 gráficos (uno por cada marco de lectura) que indican la frecuencia de las mutaciones en cada uno de los 8 nucleótidos del sitio HIP.

En la (Figura 3.13) mostramos 3 gráficos (uno por cada marco de lectura) que indican la frecuencia del tipo sustitución de bases.

3.2.2.5 Análisis de sitios en los cuales solo el nodo actual tiene HIP1

Para tratar de entender como es que los sitios HIP se ganan, hicimos un análisis únicamente en las transiciones en las que el nodo actual tenía un sitio HIP1.

En la Figura 3.14 mostramos 3 gráficos (uno por cada marco de lectura) que indican la frecuencia del tipo de sustituciones que hubo para estos casos para cada nodo en cada uno de los marcos de lectura.

3.2.3 Conjunto de sitios HIP1 usando la especie PCC_6303 como referencia

3.2.3.1 Red de transiciones

visualizamos dicha red .

Para visualizar la red usamos la paquetería `networkD3`. Hicimos 2 figuras, la (Figura ??) muestra la red como una conexión de nodos a través de vértices con un grosor proporcional al número de veces que ocurrió cada transición.

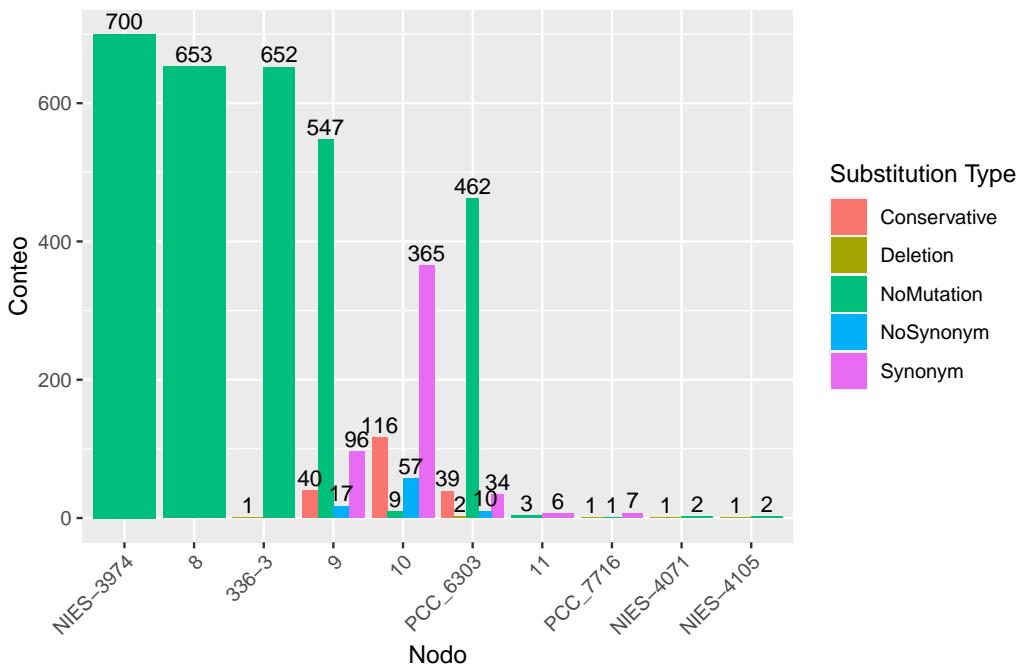
En la (Figura ??) podemos ver las transiciones de una forma más ordenada, con el número de ocurrencias y la dirección en la que ocurrieron.

3.2.3.2 Transiciones entre Nodo 9 y Nodo 10

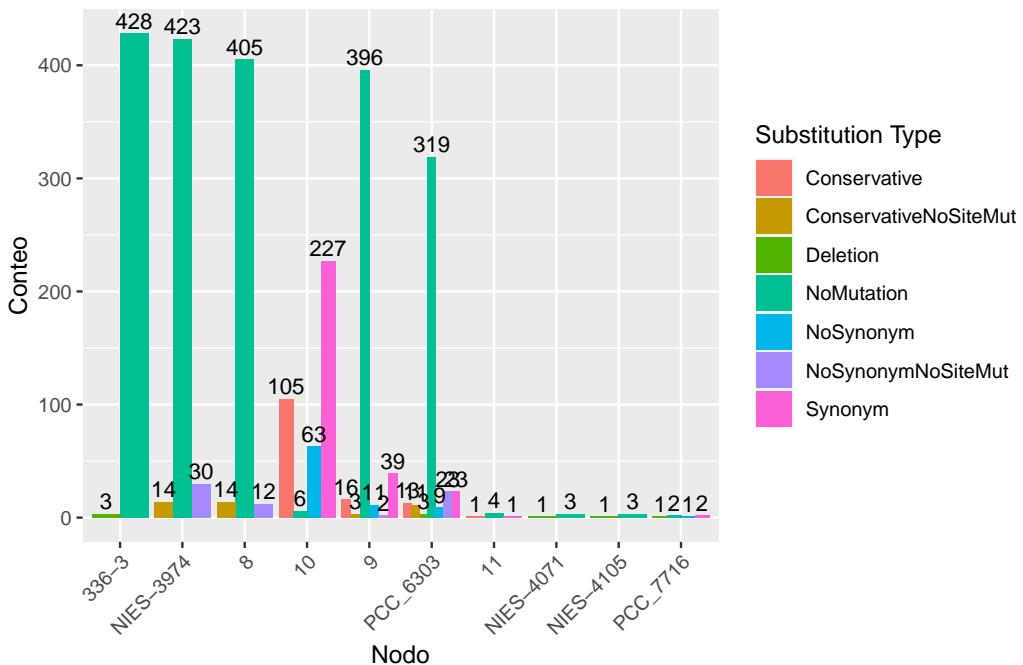
Para entender más como es que se gana o se pierden los sitios palíndromos revisamos la transición entre los nodos 9 y 10. Esto es porque esta transición de nodos la que separa a los dos subclados entre los que hay una repentino cambio de abundancia de sitios palíndromos (Figura 3.2).

Para hacer esto filtramos los datos de la red para mostrar únicamente las transiciones que se dieron entre los nodos 9 y 10 e hicimos las mismas figuras. En la (Figura ??) se muestra la red como una conexión de nodos a través de vértices con un grosor proporcional al número de veces que ocurrió cada transición. En

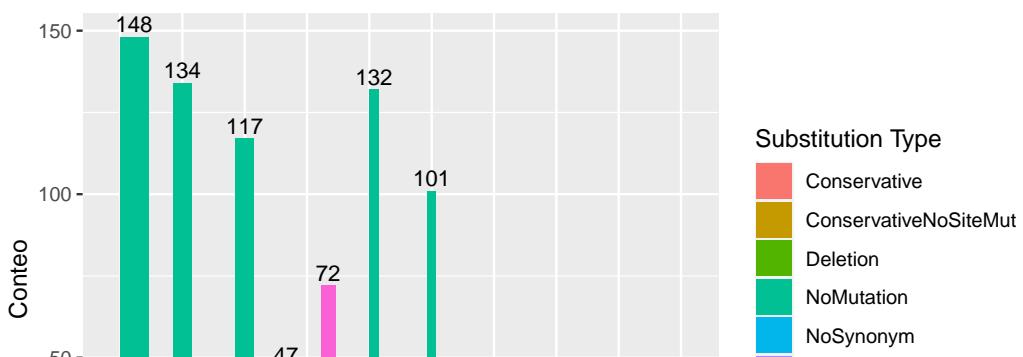
Marco de lectura 1 – Nodos con HIP en el nodo parental



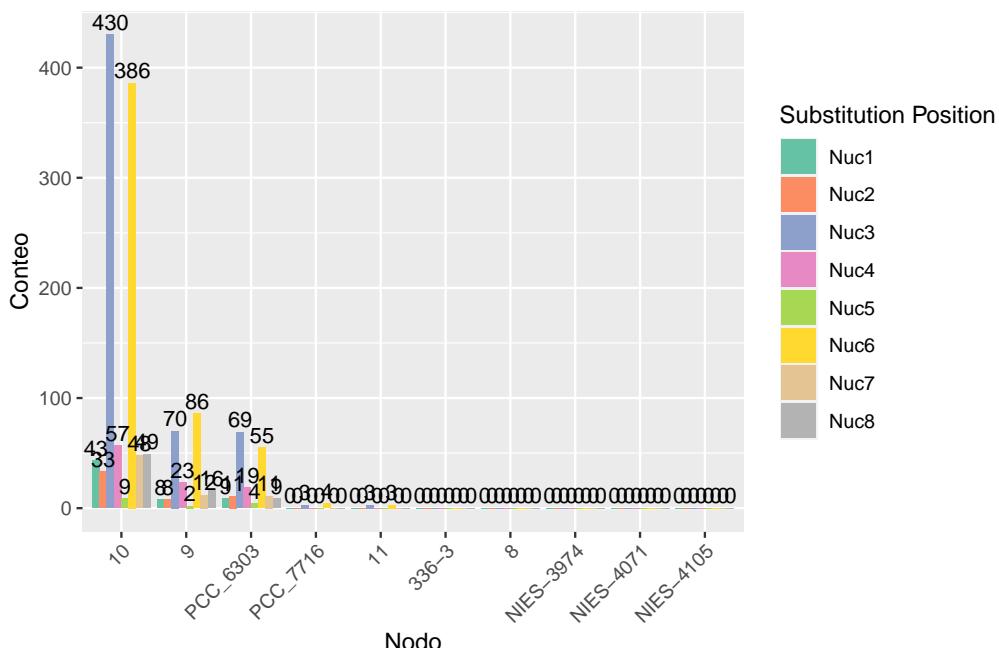
Marco de lectura 2 – Nodos con HIP en el nodo parental



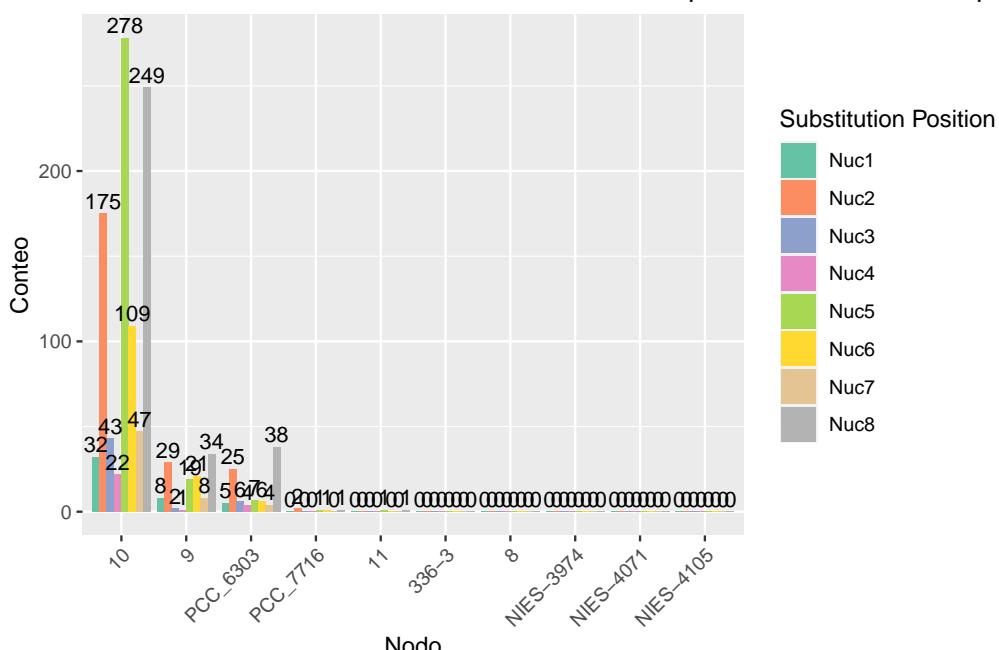
Marco de lectura 3 – Nodos con HIP en el nodo parental



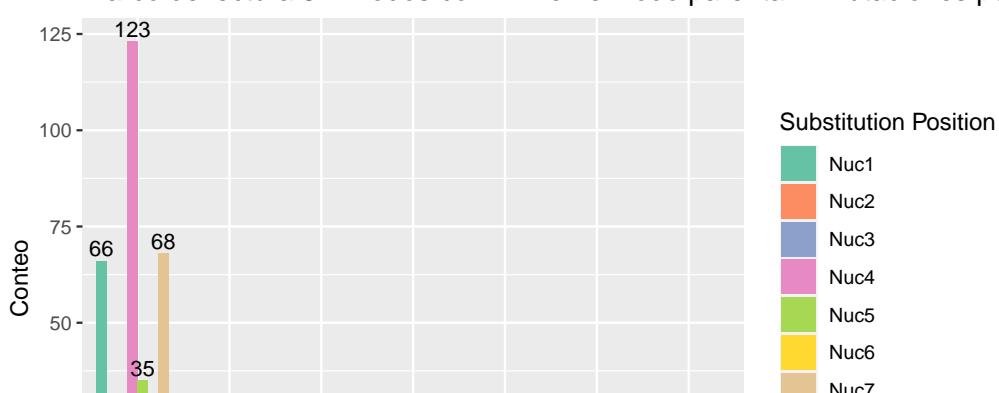
Marco de lectura 1 – Nodos con HIP en el nodo parental – Mutaciones por



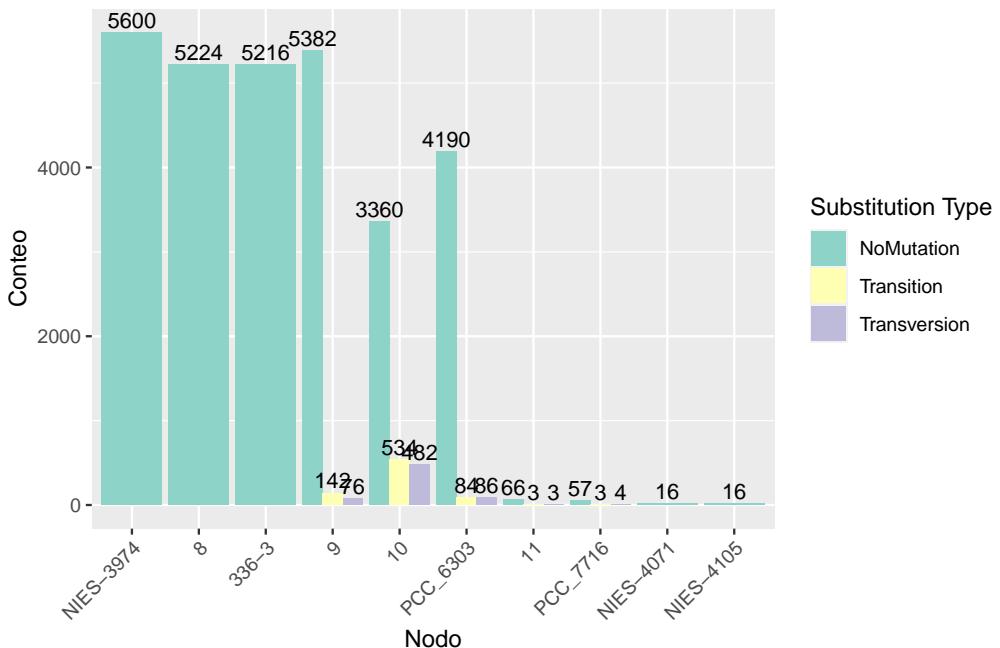
Marco de lectura 2 – Nodos con HIP en el nodo parental – Mutaciones por



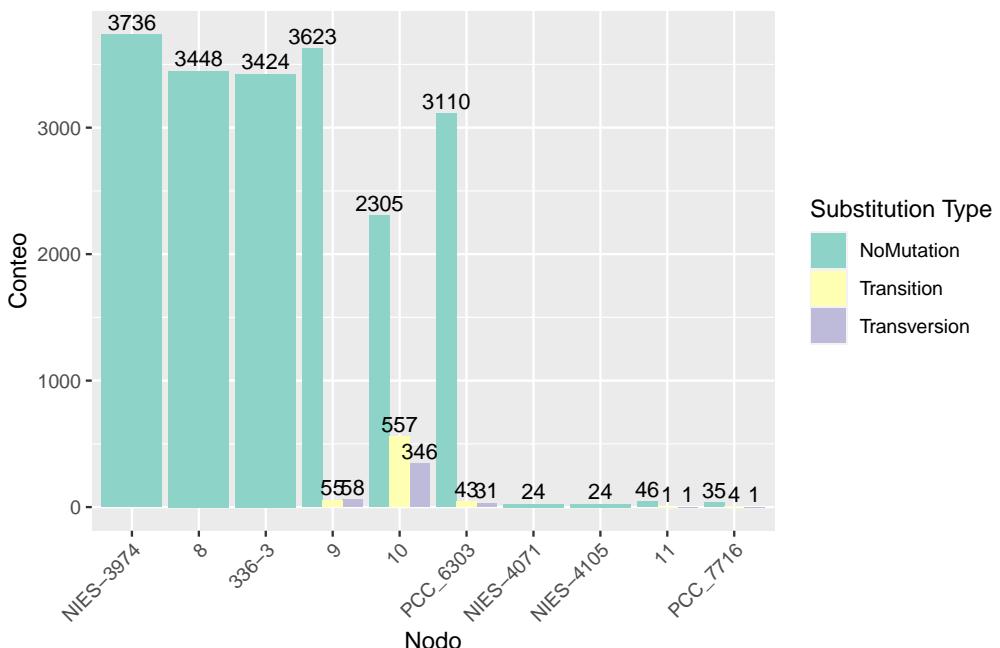
Marco de lectura 3 – Nodos con HIP en el nodo parental – Mutaciones por



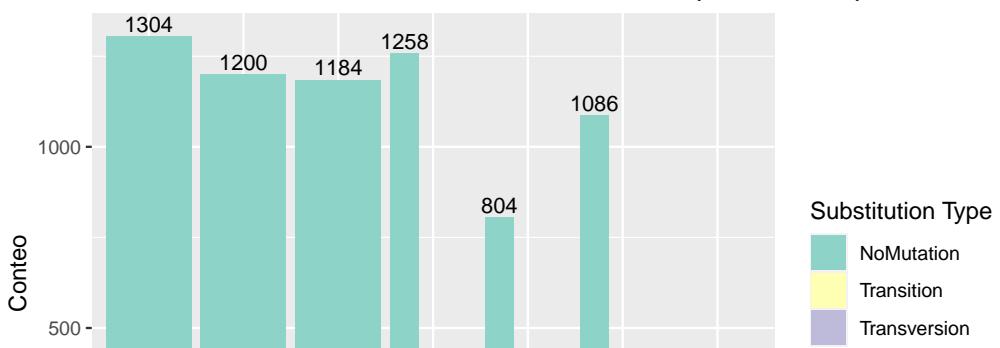
Marco de lectura 1 – Nodos con HIP en el nodo parental – Tipo de sustitución



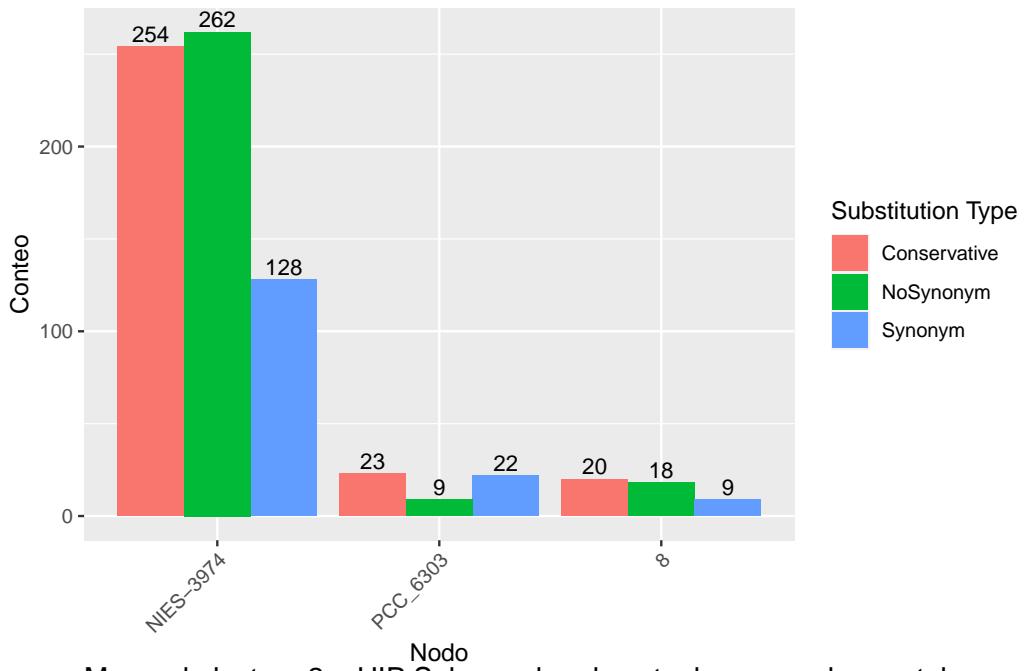
Marco de lectura 2 – Nodos con HIP en el nodo parental – Tipo de transición



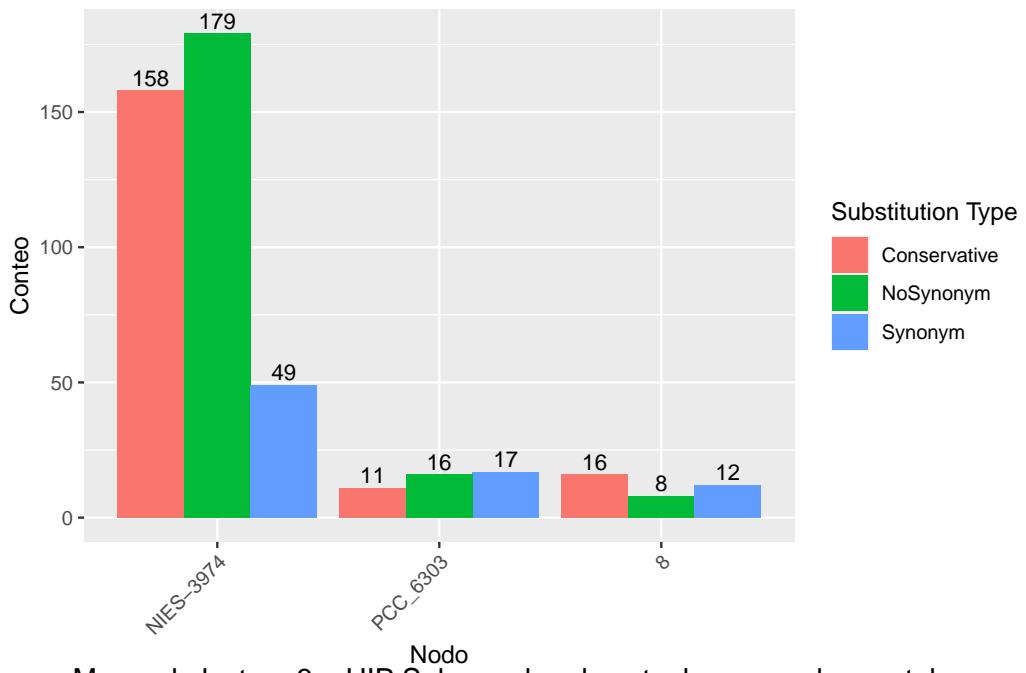
Marco de lectura 3 – Nodos con HIP en el nodo parental – Tipo de transición



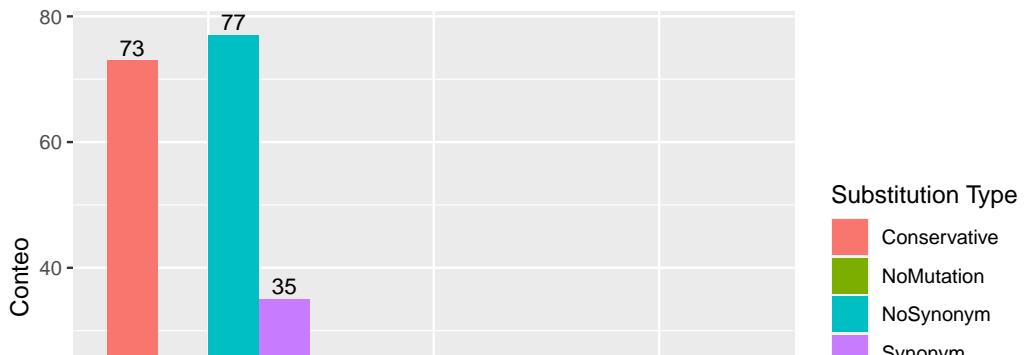
Marco de lectura 1 – HIP Solo en el nodo actual y no en el parental.



Marco de lectura 2 – HIP Solo en el nodo actual y no en el parental.



Marco de lectura 3 – HIP Solo en el nodo actual y no en el parental.



la (Figura ??) podemos ver las transiciones de una forma mas ordenada, con el numero de ocurrencias y la dirección en la que ocurrieron.

3.2.3.3 Mutaciones en los codones

Para entender como es que se van ganando o perdiendo los sitios palindrómicos hicimos un análisis del tipo mutaciones de los sitios. Esto lo hicimos viendo en que marco de lectura se encontraba cada nodo y revisando la secuencia de aminoacidos que codificaban. En la (Figura 3.15) mostramos 3 gráficos que indican la abundancia de los peptidos codificados por los sitios palindrómicos de acuerdo al marco de lectura en el que se encuentran. En esta figura podemos observar que el marco de lectura es el que contiene la mayoría de los sitios

En la (Figura 3.16) mostramos 3 gráficos que indican la abundancia del tipo de mutaciones que hay en cada nodo de acuerdo al marco de lectura. Los sitios de mutaciones mostrados pueden ser de los siguientes tipos:

- Conservative (la secuencia de AA cambió pero tiene similitud de acuerdo al score de BLOSUM62)
- ConservativeNoSiteMut (la secuencia de AA cambió pero tiene similitud de acuerdo al score de BLOSUM62. Sin embargo, el sitio no sufrió mutaciones)
- Deletion (La secuencia de AA tiene sufrió 1 o más delecciones)
- NoMutation (La secuencia de AA no sufrió mutaciones)
- NoSynonym (La secuencia de AA cambió)
- NoSynonymNoSiteMut (La secuencia de AA cambió. Sin embargo, el sitio no sufrió mutaciones.)
- Synonym (El sitio sufrió mutaciones. Sin embargo, la secuencia de AA no cambió.)

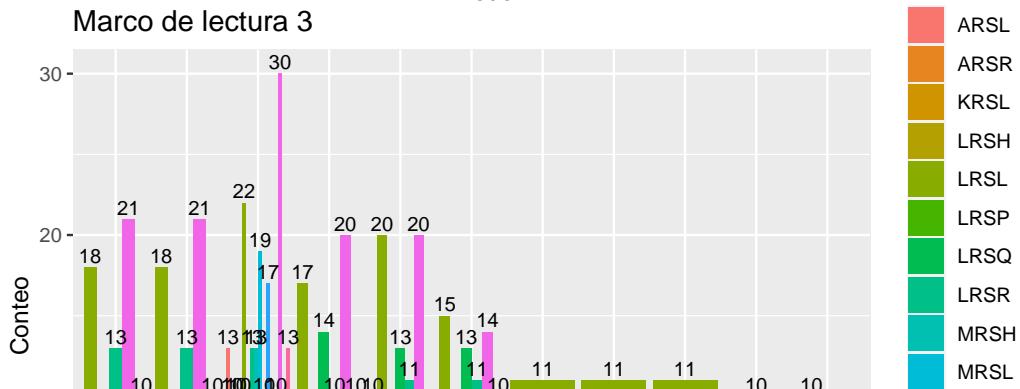
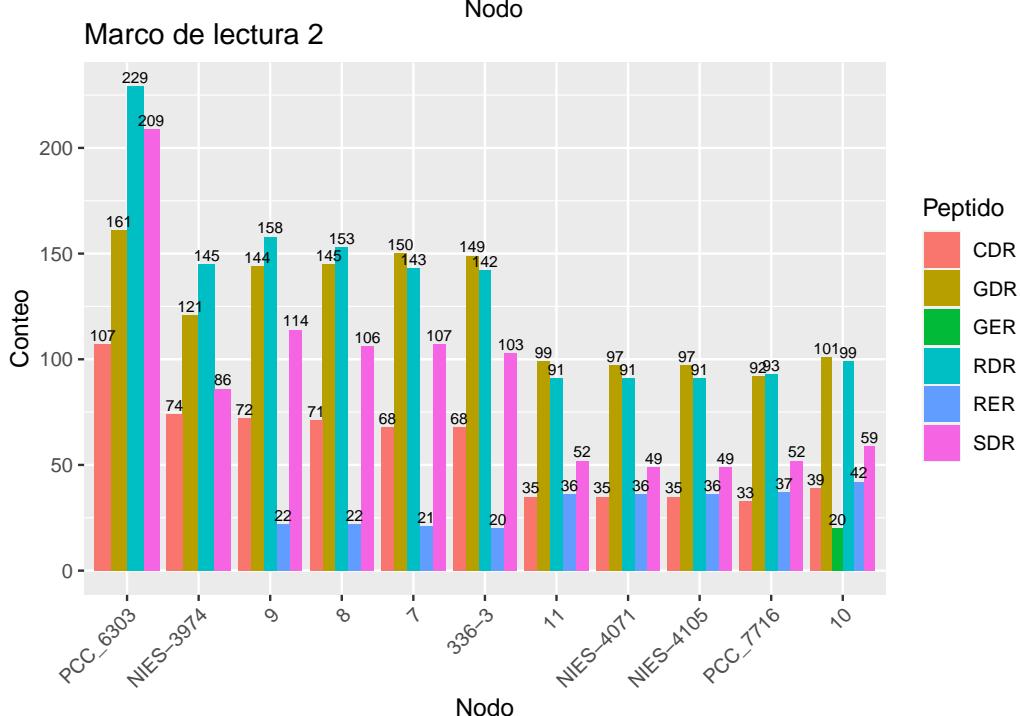
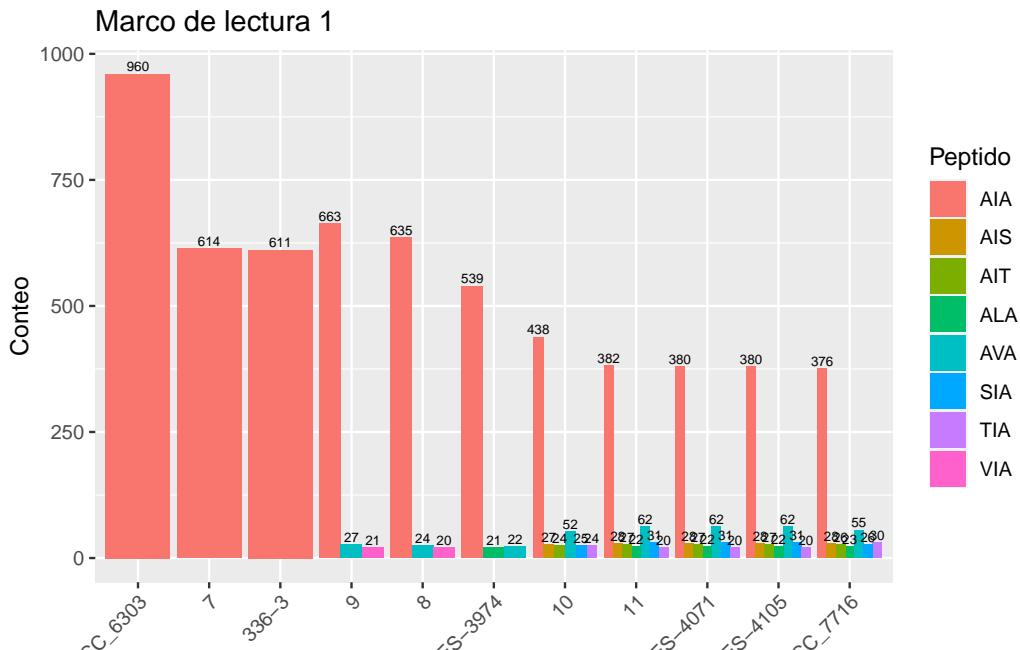
3.2.3.4 Análisis de sitios en los cuales su ancestro era HIP1

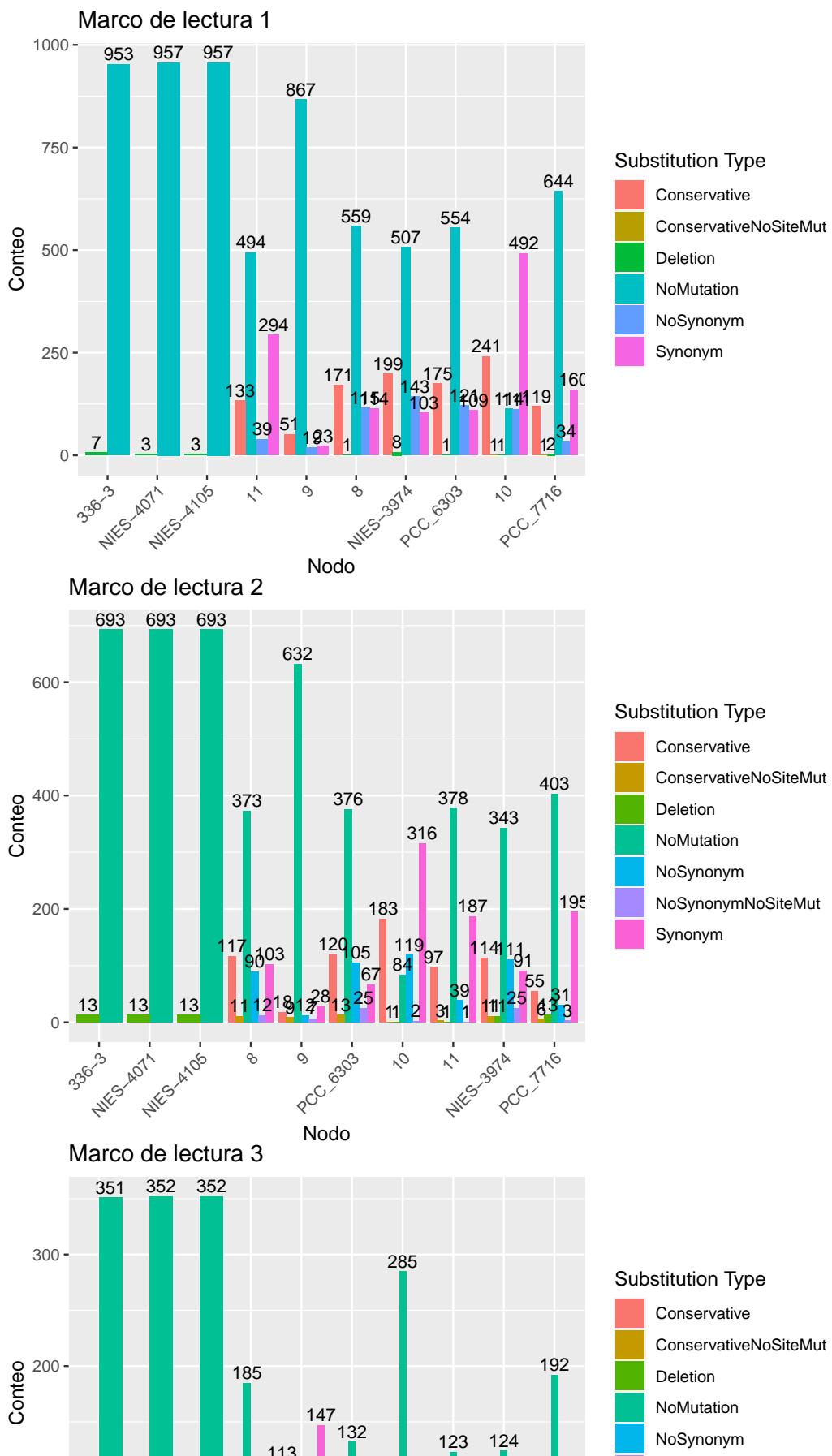
Para tratar de entender como es que los sitios HIP1 se pierden hicimos un análisis únicamente en las transiciones en las que el nodo ancestral tenía un sitio HIP1.

En la (Figura 3.17) mostramos 3 gráficos que indican la frecuencia del tipo de sustituciones que hubo para estos casos para cada nodo en cada uno de los marcos de lectura.

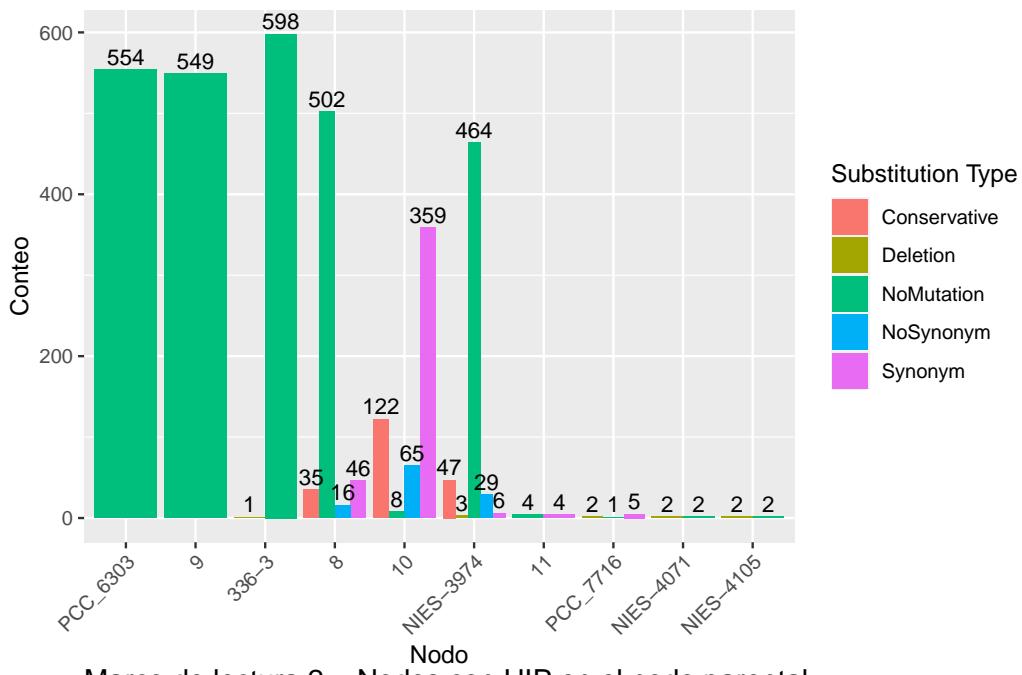
En la (Figura 3.18) mostramos 3 gráficos (uno por cada marco de lectura) que indican la frecuencia de las mutaciones en cada uno de los 8 nucleótidos del sitio HIP.

En la (Figura 3.19) mostramos 3 gráficos (uno por cada marco de lectura) que indican la frecuencia del tipo sustitución de bases.

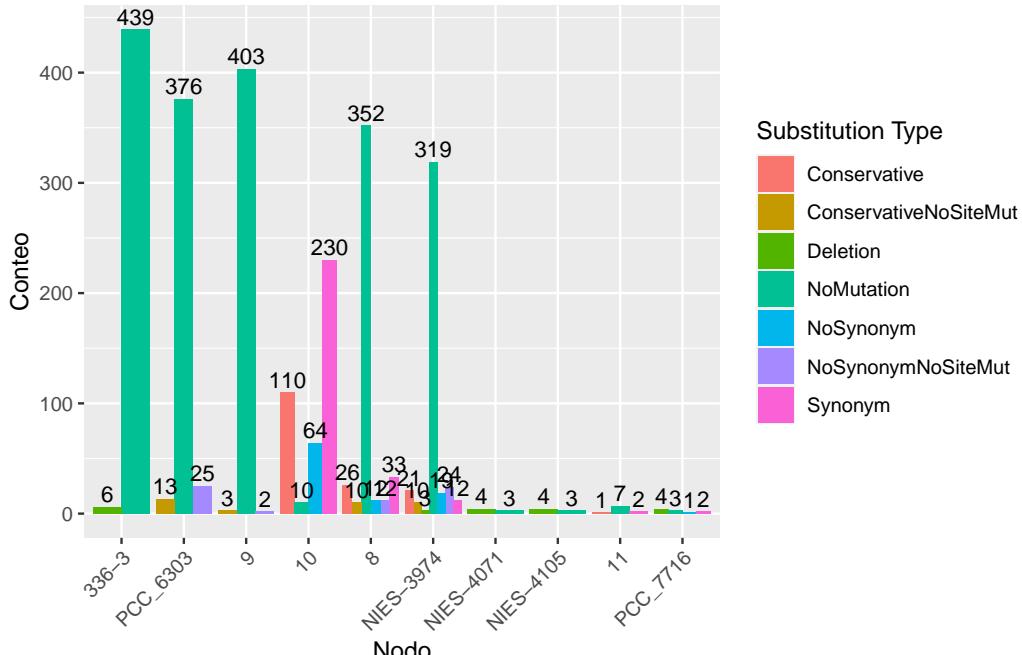




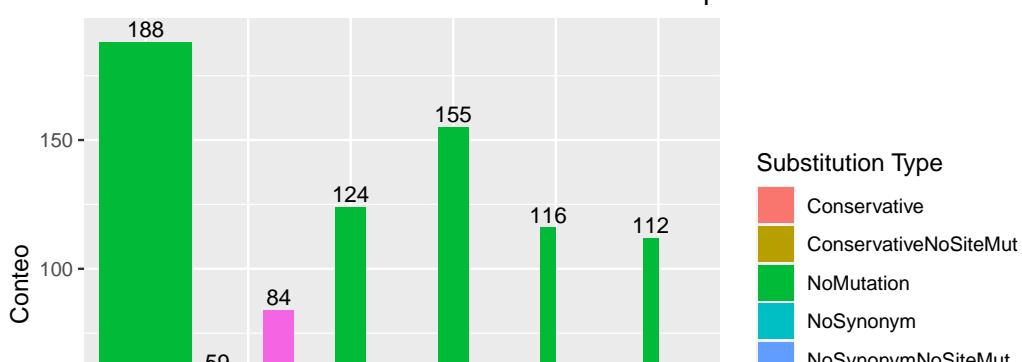
Marco de lectura 1 – Nodos con HIP en el nodo parental



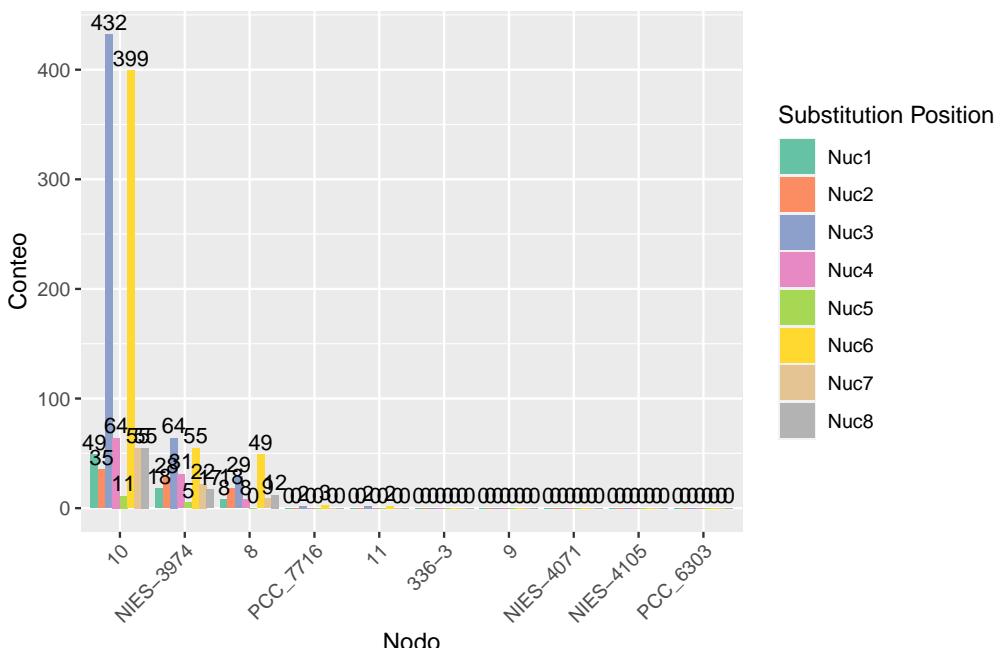
Marco de lectura 2 – Nodos con HIP en el nodo parental



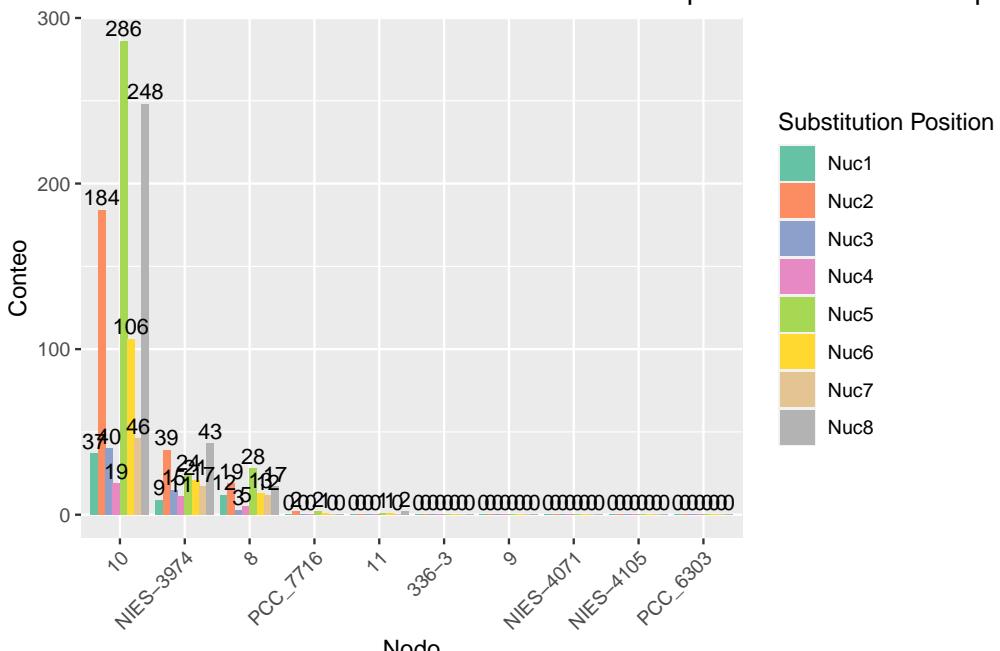
Marco de lectura 3 – Nodos con HIP en el nodo parental



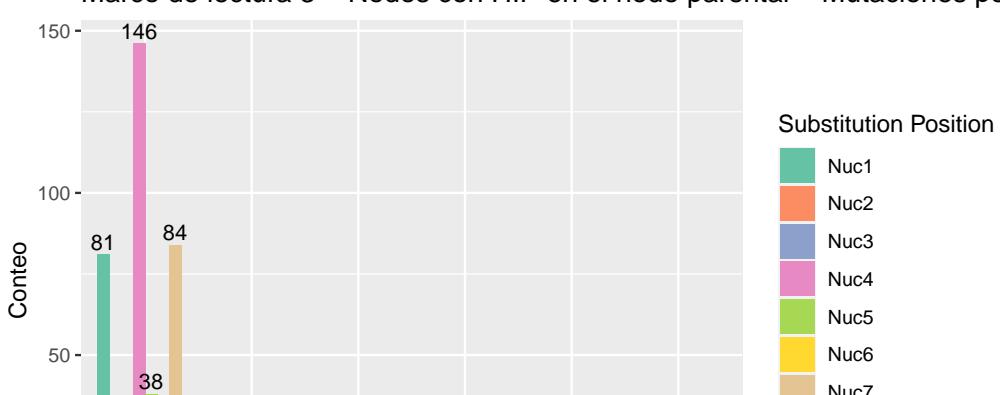
Marco de lectura 1 – Nodos con HIP en el nodo parental – Mutaciones por

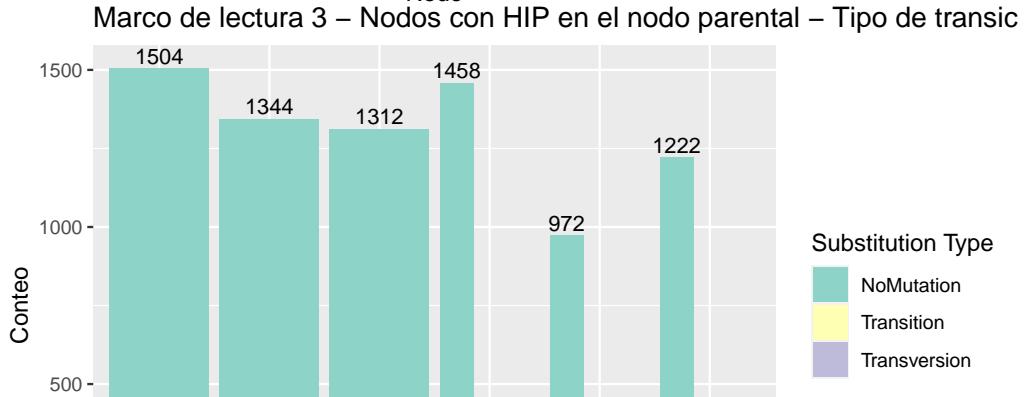
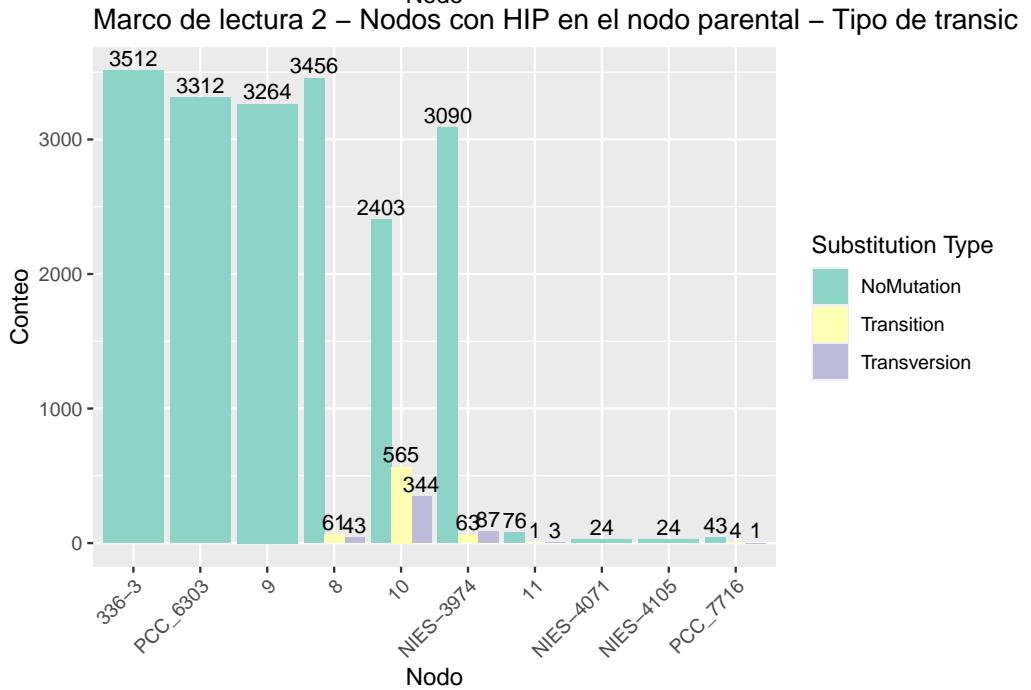
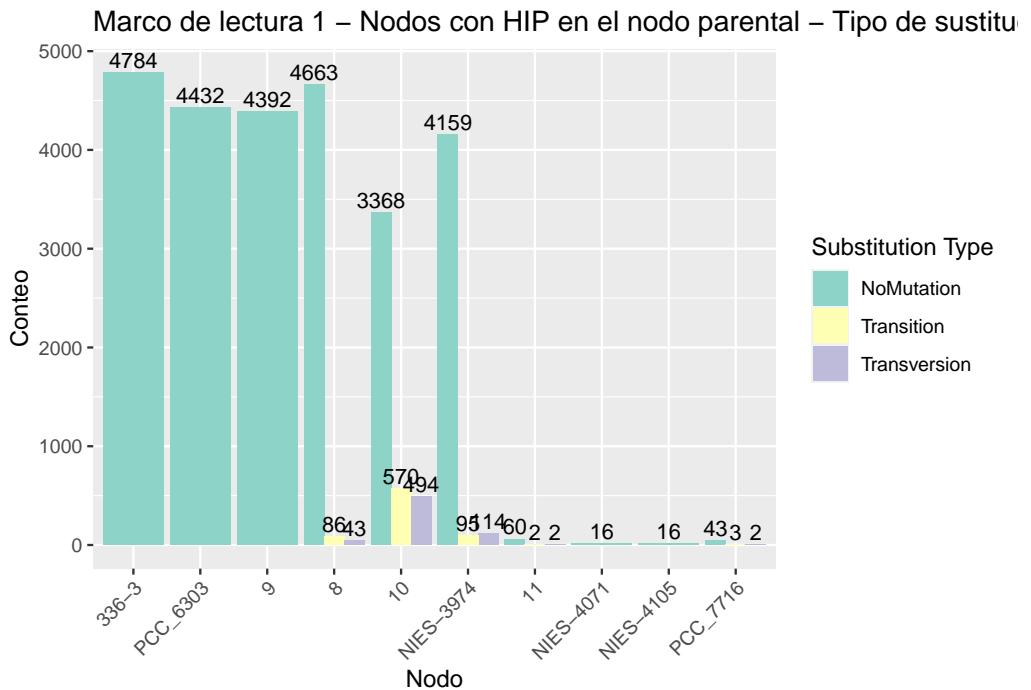


Marco de lectura 2 – Nodos con HIP en el nodo parental – Mutaciones por



Nodo
Marco de lectura 3 – Nodos con HIP en el nodo parental – Mutaciones por





3.2.3.5 Análisis de sitios en los cuales solo el nodo actual tiene HIP1

Para tratar de entender como es que los sitios HIP se ganan, hicimos un análisis únicamente en las transiciones en las que el nodo actual tenía un sitio HIP1.

En la Figura 3.20 mostramos 3 gráficos (uno por cada marco de lectura) que indican la frecuencia del tipo de sustituciones que hubo para estos casos para cada nodo en cada uno de los marcos de lectura.

3.2.4 Conjunto de sitios HIP1 únicos en las especies 336-3, NIES-3974 y PCC_6303

3.2.4.1 Red de transiciones

Para aumentar el número de “experimentos”, buscamos todos los sitios HIP1 UNICOS existentes en el subclado que contiene a las especies 336-3, NIES-3974 y PCC_6303.

Posteriormente creamos la red usando la función `Create_Network()`:

y visualizamos dicha red .

Para visualizar la red usamos la paquetería `networkD3`. Hicimos 2 figuras, la (Figura ??) muestra la red como una conexión de nodos a través de vértices con un grosor proporcional al número de veces que ocurrió cada transición.

En la (Figura ??) podemos ver las transiciones de una forma más ordenada, con el número de ocurrencias y la dirección en la que ocurrieron.

3.2.4.2 Transiciones entre Nodo 9 y Nodo 10

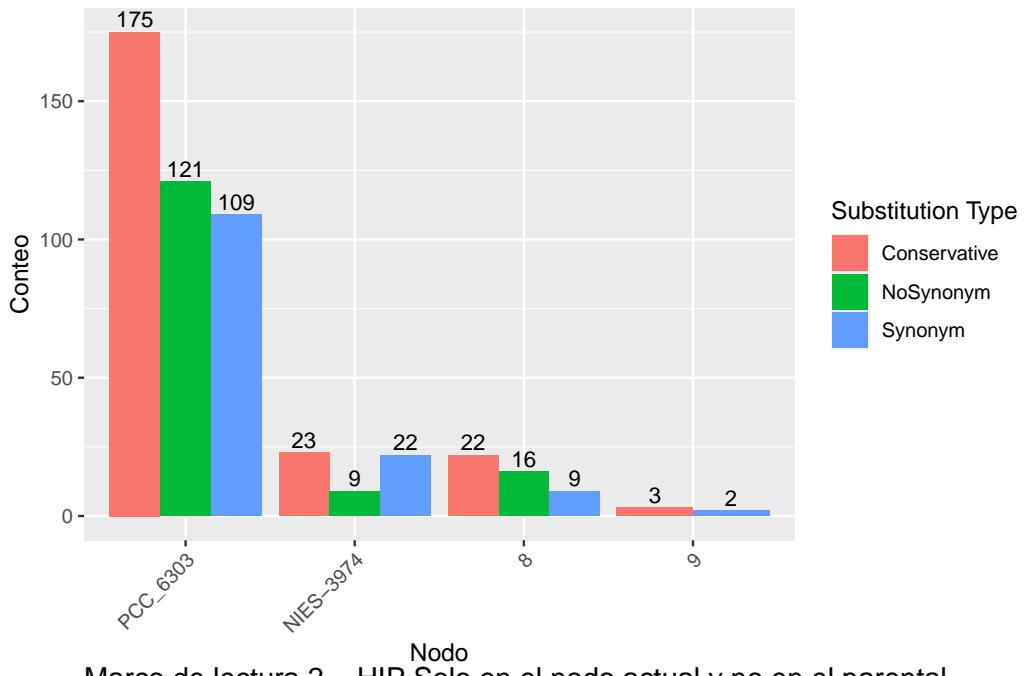
En la (Figura ??) se muestra la red como una conexión de nodos a través de vértices con un grosor proporcional al número de veces que ocurrió cada transición. En la (Figura ??) podemos ver las transiciones de una forma más ordenada, con el número de ocurrencias y la dirección en la que ocurrieron.

3.2.4.3 Mutaciones en los codones

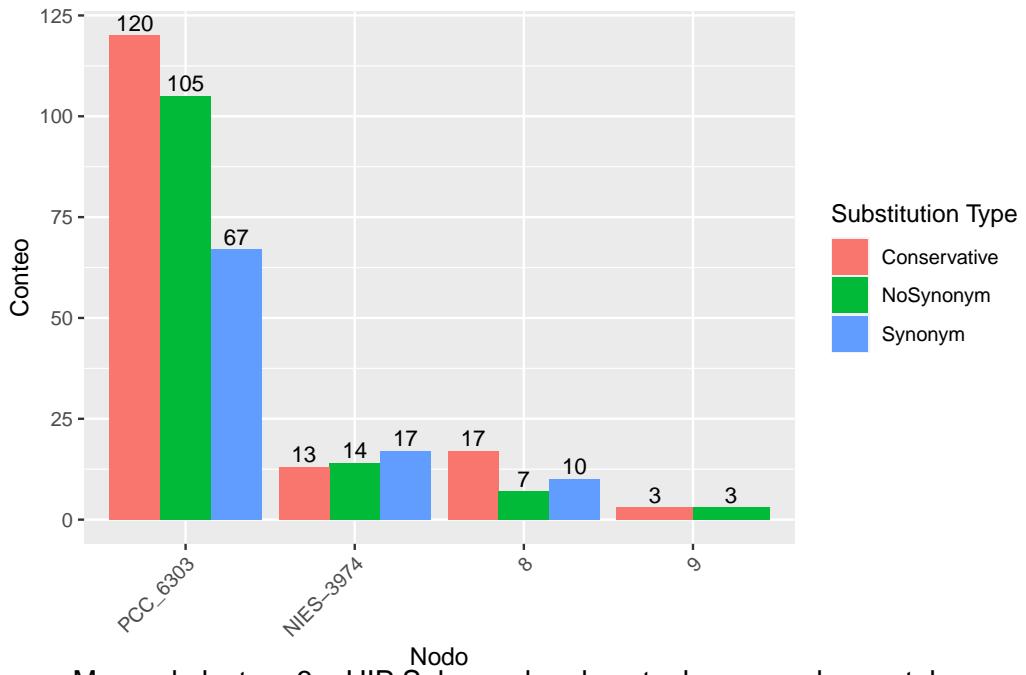
Para entender como es que se van ganando o perdiendo los sitios palindrómicos hicimos un análisis del tipo mutaciones de los sitios. Esto lo hicimos viendo en qué marco de lectura se encontraba cada nodo y revisando la secuencia de aminoácidos que codificaban. En la (Figura 3.21) mostramos 3 gráficos que indican la abundancia de los péptidos codificados por los sitios palindrómicos de acuerdo al marco de lectura en el que se encuentran. En esta figura podemos observar que el marco de lectura es el que contiene la mayoría de los sitios

En la (Figura 3.22) mostramos 3 gráficos que indican la abundancia del tipo de mutaciones que hay en cada nodo de acuerdo al marco de lectura. Los sitios de mutaciones mostrados pueden ser de los siguientes tipos:

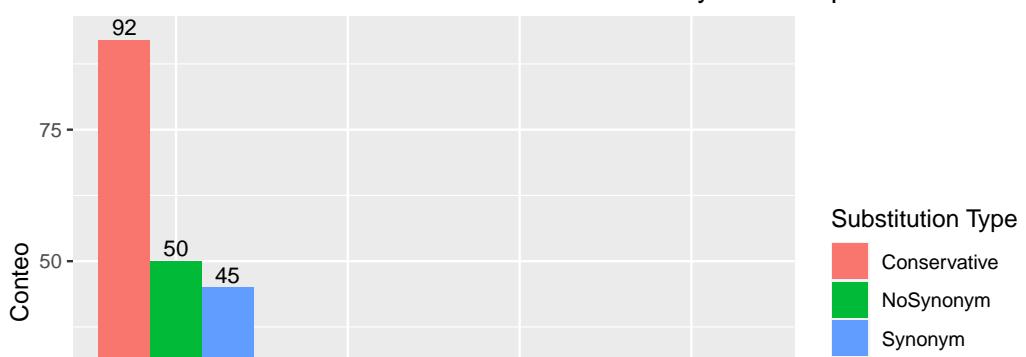
Marco de lectura 1 – HIP Solo en el nodo actual y no en el parental.

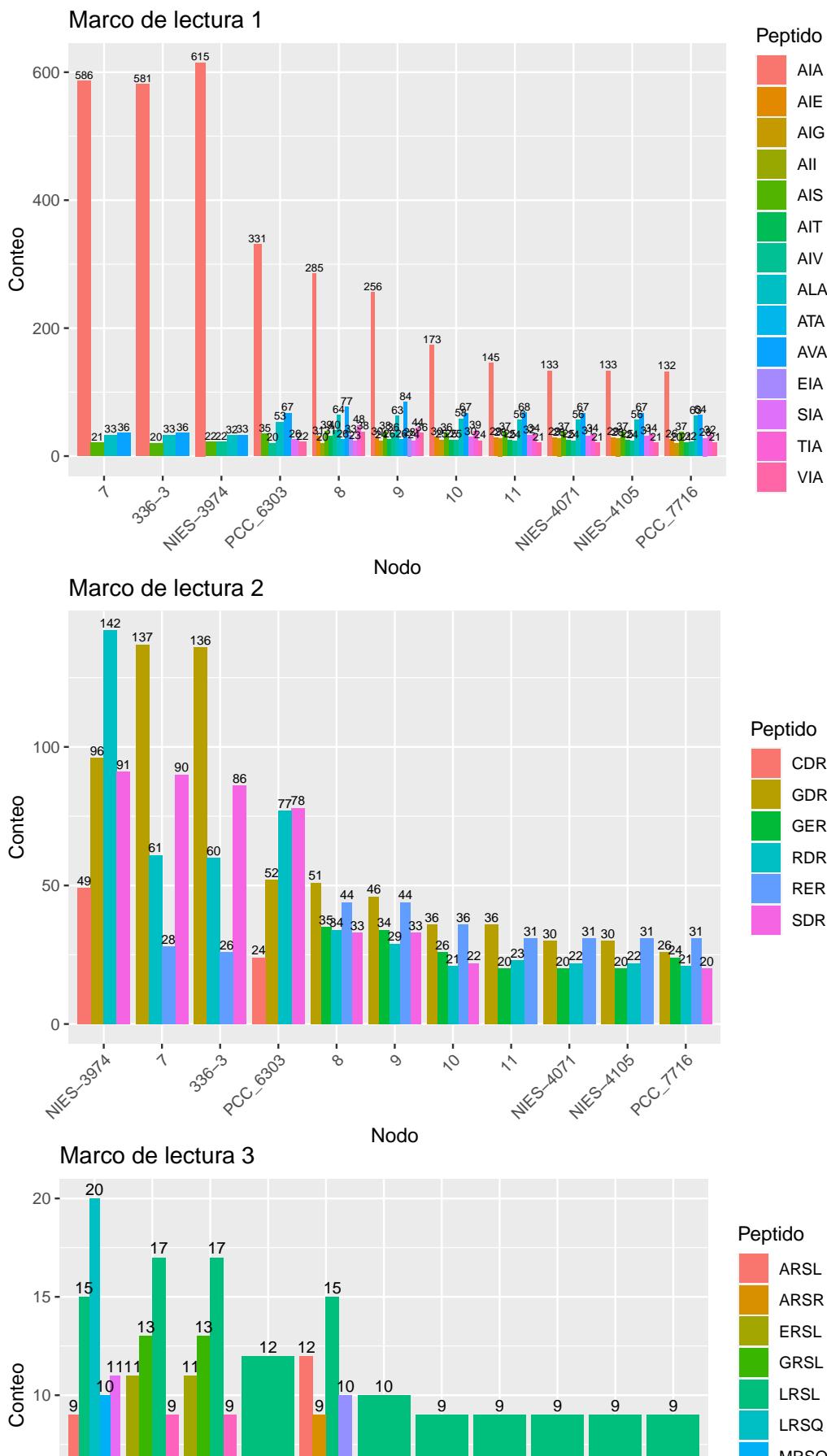


Marco de lectura 2 – HIP Solo en el nodo actual y no en el parental.



Marco de lectura 3 – HIP Solo en el nodo actual y no en el parental.





- Conservative (la secuencia de AA cambió pero tiene similitud de acuerdo al score de BLOSUM62)
- ConservativeNoSiteMut (la secuencia de AA cambió pero tiene similitud de acuerdo al score de BLOSUM62. Sin embargo, el sitio no sufrió mutaciones)
- Deletion (La secuencia de AA tiene sufrió 1 o mas delecciones)
- NoMutation (La secuencia de AA no sufrió mutaciones)
- NoSynonym (La secuencia de AA cambió)
- NoSynonymNoSiteMut (La secuencia de AA cambió. Sin embargo, el sitio no sufrió mutaciones.)
- Synonym (El sitio sufrió mutaciones. Sin embargo, la secuencia de AA no cambió.)

3.2.4.4 Análisis de sitios en los cuales su ancestro era HIP1

Para tratar de entender como es que los sitios HIP1 se pierden hicimos un análisis únicamente en las transiciones en las que el nodo ancestral tenía un sitio HIP1.

En la (Figura 3.23) mostramos 3 gráficos que indican la frecuencia del tipo de sustituciones que hubo para estos casos para cada nodo en cada uno de los marcos de lectura.

En la (Figura 3.24) mostramos 3 gráficos (uno por cada marco de lectura) que indican la frecuencia de las mutaciones en cada uno de los 8 nucleótidos del sitio HIP.

En la (Figura 3.25) mostramos 3 gráficos (uno por cada marco de lectura) que indican la frecuencia del tipo sustitución de bases.

3.2.4.5 Análisis de sitios en los cuales solo el nodo actual tiene HIP1

Para tratar de entender como es que los sitios HIP se ganan, hicimos un análisis únicamente en las transiciones en las que el nodo actual tenía un sitio HIP1.

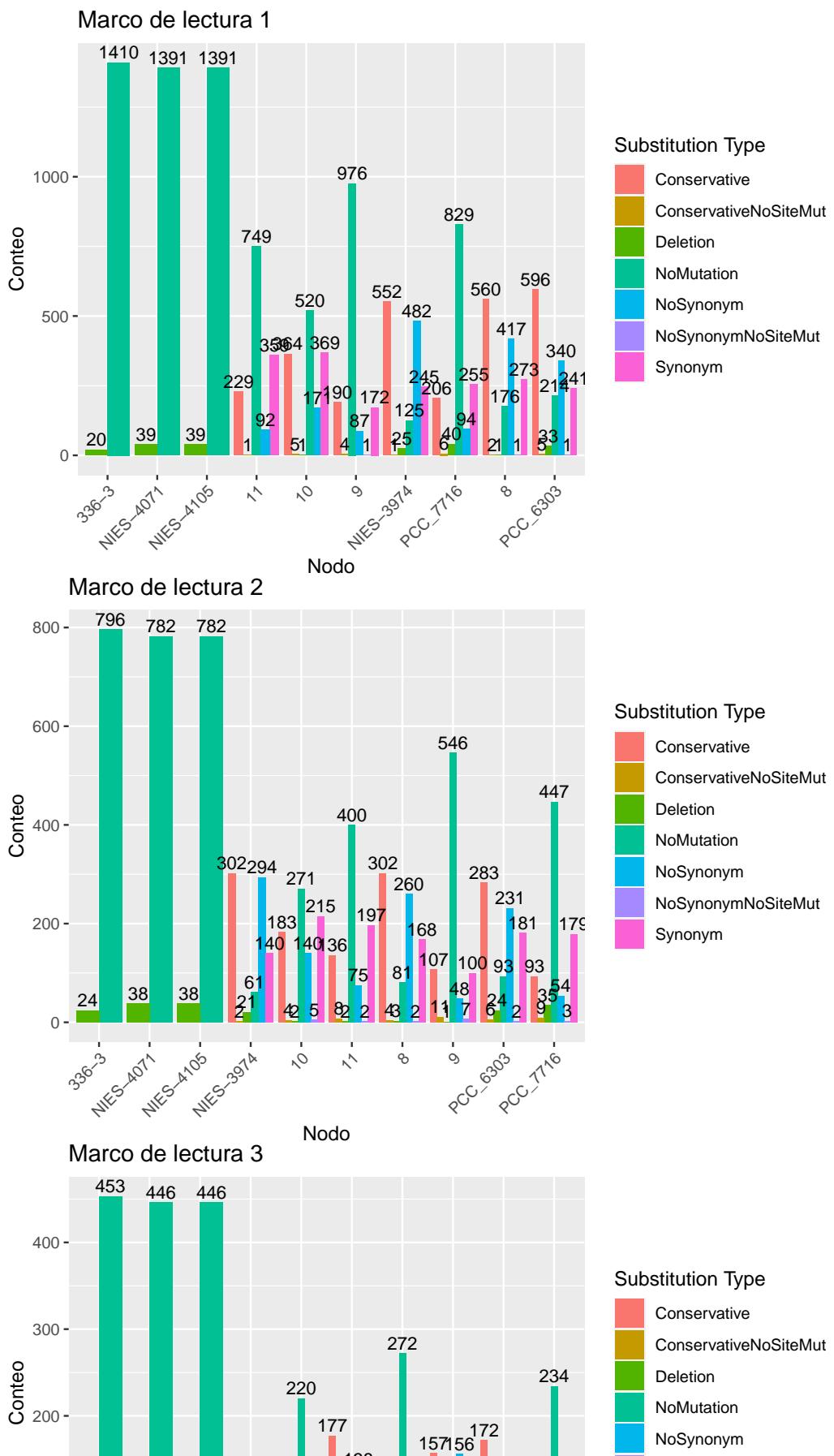
En la Figura 3.26 mostramos 3 gráficos (uno por cada marco de lectura) que indican la frecuencia del tipo de sustituciones que hubo para estos casos para cada nodo en cada uno de los marcos de lectura.

3.2.5 TGGCGCCA

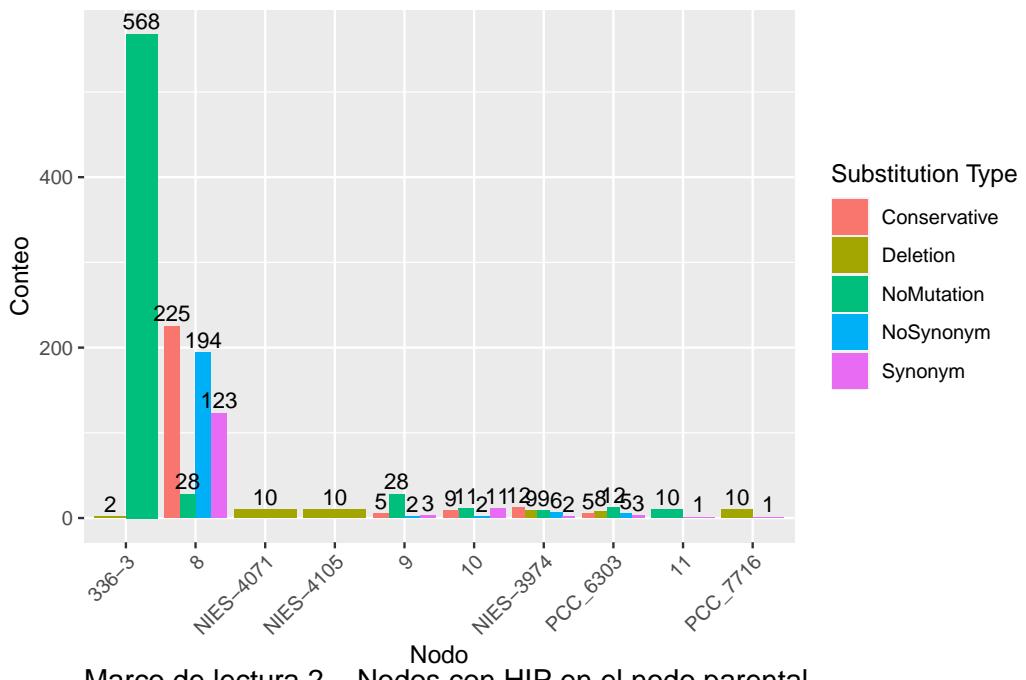
3.2.5.1 Red de transiciones

Para hacer mas visual la reconstrucción, construimos una red de las transiciones entre los estados ancestrales. Esto lo hicimos en r usando la función `Create_Transition_Table()`:

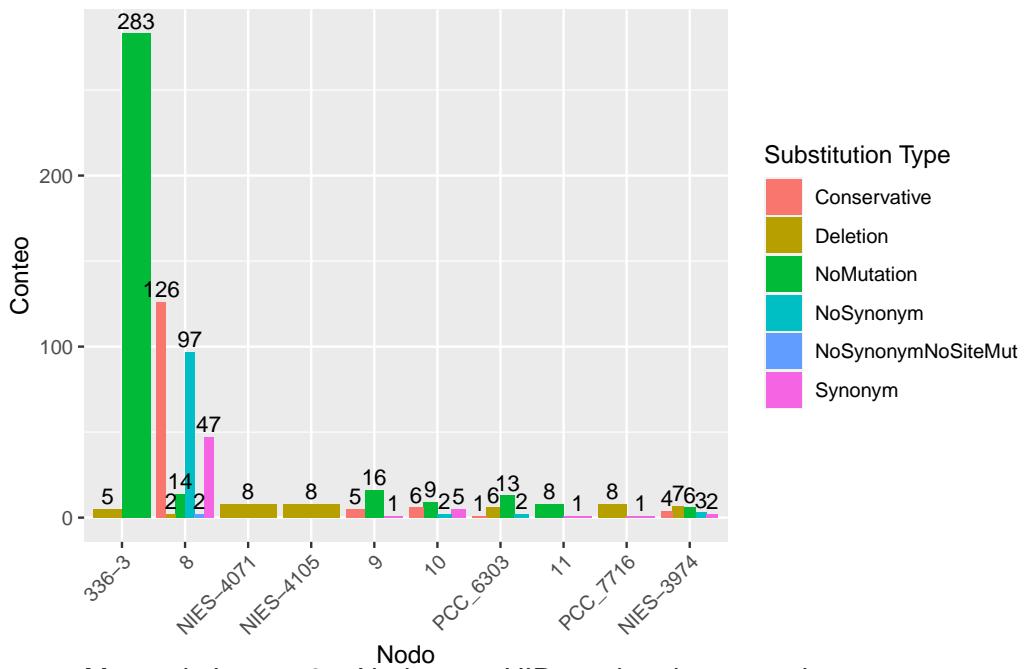
```
source("ASR_Orth_Functions/NodeAndEdges.R")
Nodes.Edges <- Create_Transition_Table(SitesTable = "Clados/Calothrix_clade/PALINDROMES")
```



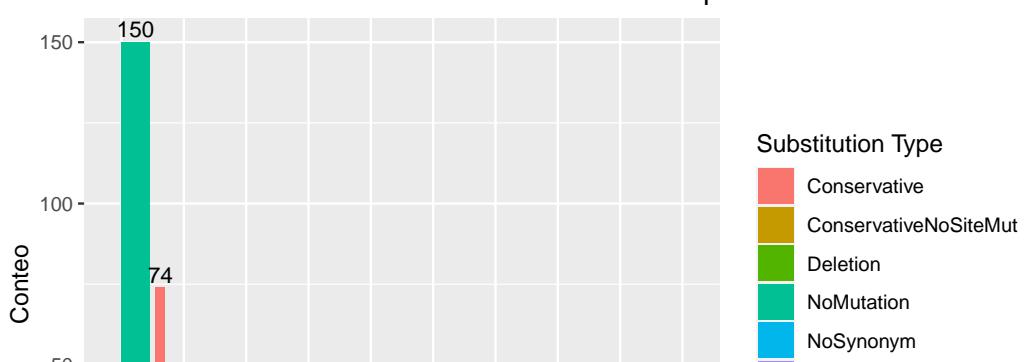
Marco de lectura 1 – Nodos con HIP en el nodo parental



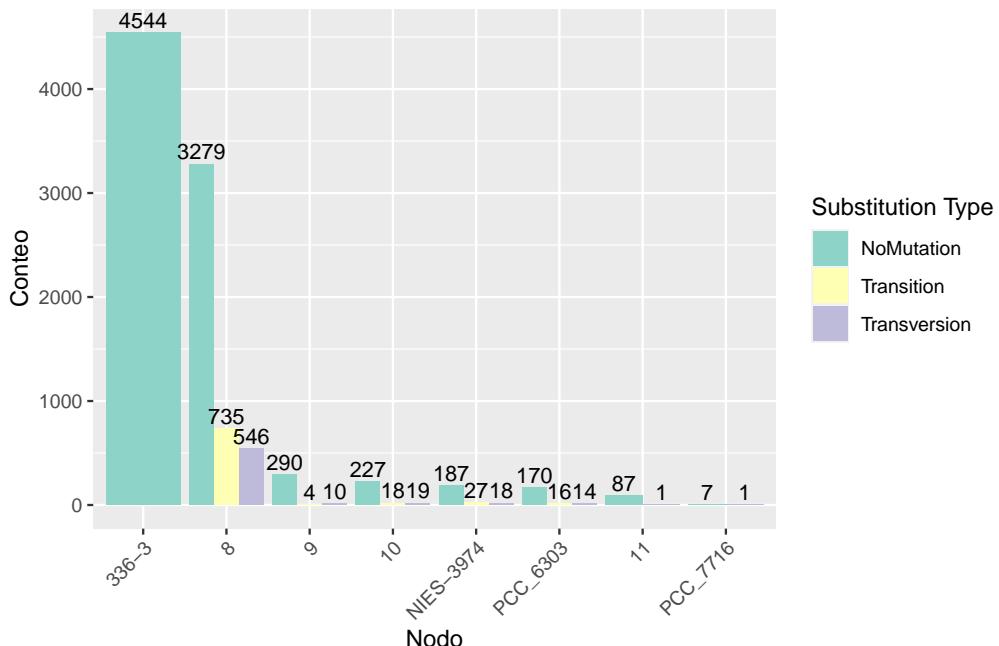
Marco de lectura 2 – Nodos con HIP en el nodo parental



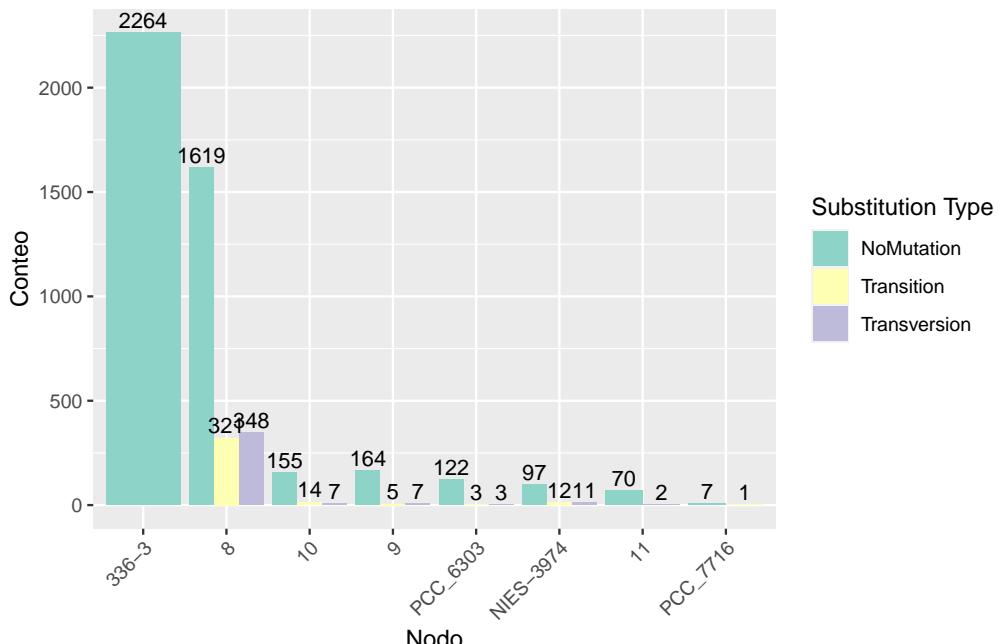
Marco de lectura 3 – Nodos con HIP en el nodo parental



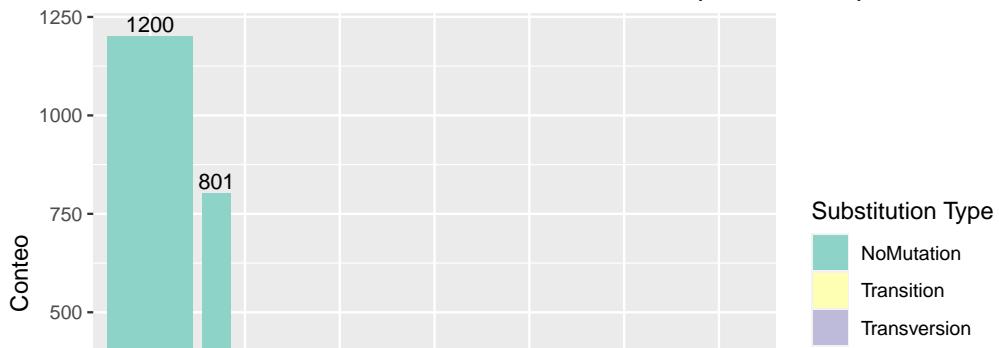
Marco de lectura 1 – Nodos con HIP en el nodo parental – Tipo de sustitución



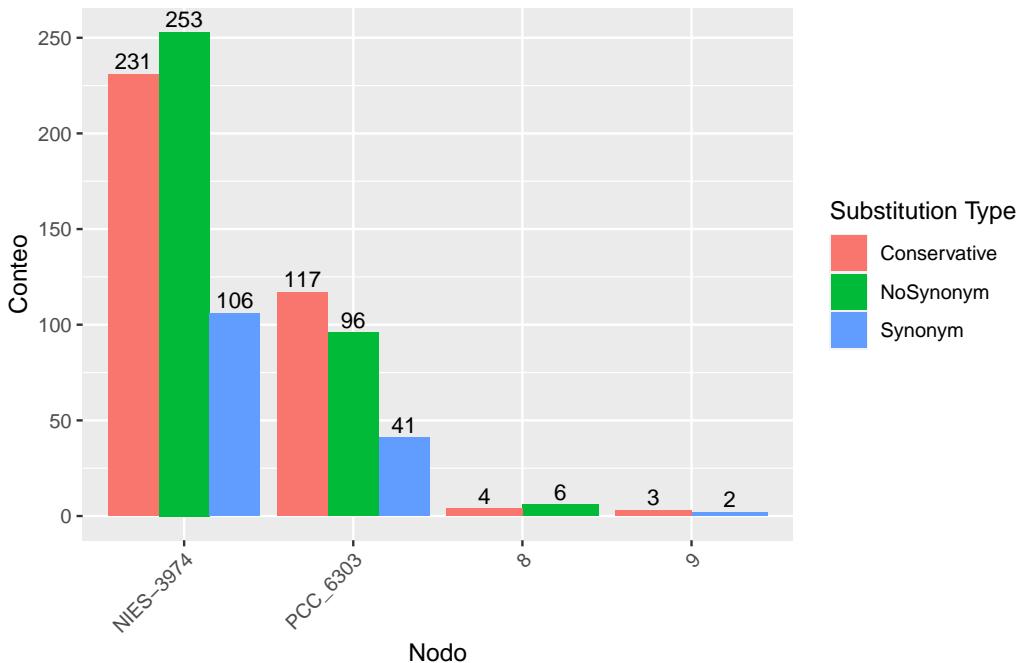
Marco de lectura 2 – Nodos con HIP en el nodo parental – Tipo de transición



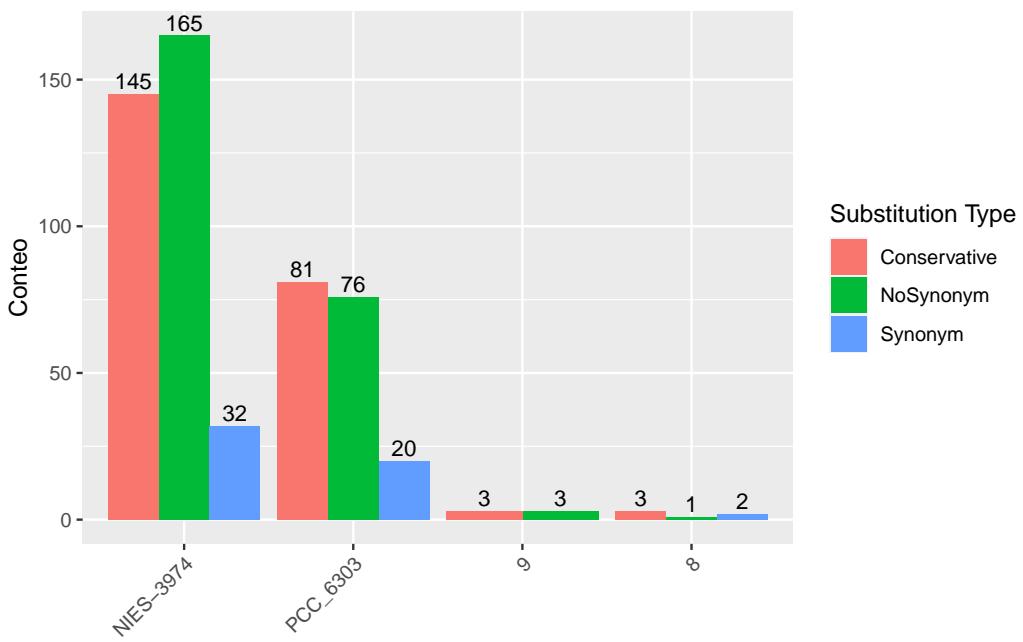
Marco de lectura 3 – Nodos con HIP en el nodo parental – Tipo de transición



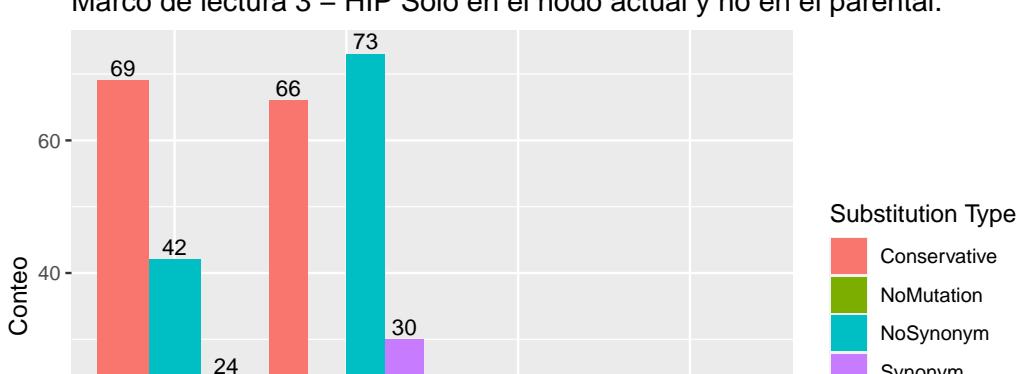
Marco de lectura 1 – HIP Solo en el nodo actual y no en el parental.



Marco de lectura 2 – HIP Solo en el nodo actual y no en el parental.



Marco de lectura 3 – HIP Solo en el nodo actual y no en el parental.



```

EvolutionModel = "F81",
Method = "bayes",
Phylogeny = "Clados/Callothrix_clade/SpeciesTree_rooted"
OrthoPath = "Clados/Callothrix_clade/PALINDROMES/TGGCGG"

```

Posteriormente creamos la red usando la función `Create_Network()`:

y visualizamos dicha red .

Para visualizar la red usamos la paquetería `networkD3`. Hicimos 2 figuras, la (Figura ??) muestra la red como una conexión de nodos a través de vértices con un grosor proporcional al número de veces que ocurrió cada transición. En dicha red podemos ver algunos nodos con bordes muy gruesos como **GCAATTGC**, **GCAATCGC**, **GCAATAGC**, **GCGATTGC** (Tabla ??).

En la (Figura ??) podemos ver las transiciones de una forma más ordenada, con el número de ocurrencias y la dirección en la que ocurrieron.

3.2.5.2 Transiciones entre Nodo 9 y Nodo 10

Para entender más como es que se gana o se pierden los sitios palindrómicos revisamos la transición entre los nodos 9 y 10. Esto es porque es esta transición de nodos la que separa a los dos subclados entre los que hay una repentino cambio de abundancia de sitios palindrómicos (Figura 3.2).

Para hacer esto filtramos los datos de la red para mostrar únicamente las transiciones que se dieron entre los nodos 9 y 10 e hicimos las mismas figuras. En la (Figura ??) se muestra la red como una conexión de nodos a través de vértices con un grosor proporcional al número de veces que ocurrió cada transición. En la (Figura ??) podemos ver las transiciones de una forma más ordenada, con el número de ocurrencias y la dirección en la que ocurrieron.

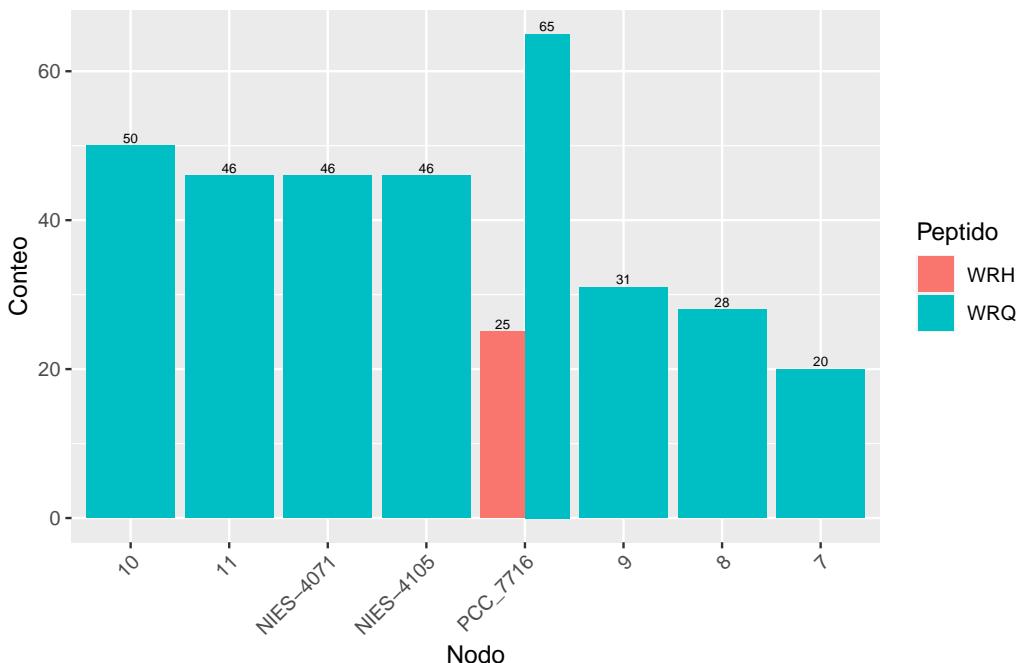
3.2.5.3 Mutaciones en los codones

Para entender como es que se van ganando o perdiendo los sitios palindrómicos hicimos un análisis del tipo mutaciones de los sitios. Esto lo hicimos viendo en qué marco de lectura se encontraba cada nodo y revisando la secuencia de aminoácidos que codificaban. En la (Figura 3.27) mostramos 3 gráficos que indican la abundancia de los péptidos codificados por los sitios palindrómicos de acuerdo al marco de lectura en el que se encuentran.

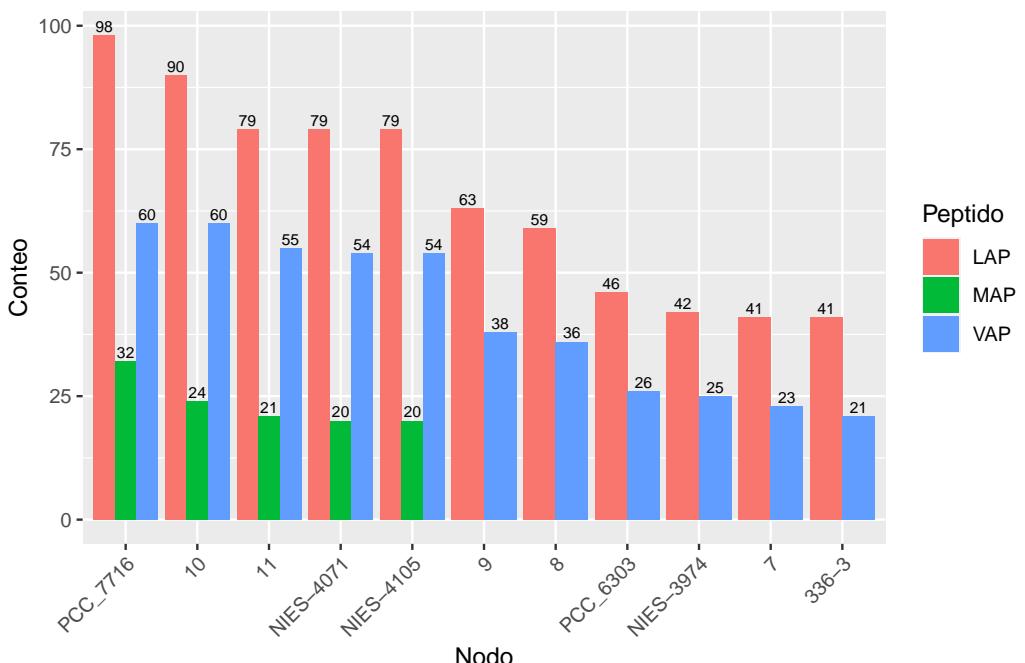
En la (Figura 3.28) mostramos 3 gráficos que indican la abundancia del tipo de mutaciones que hay en cada nodo de acuerdo al marco de lectura. Los sitios de mutaciones mostrados pueden ser de los siguientes tipos:

- Conservative (la secuencia de AA cambió pero tiene similitud de acuerdo al score de BLOSUM62)

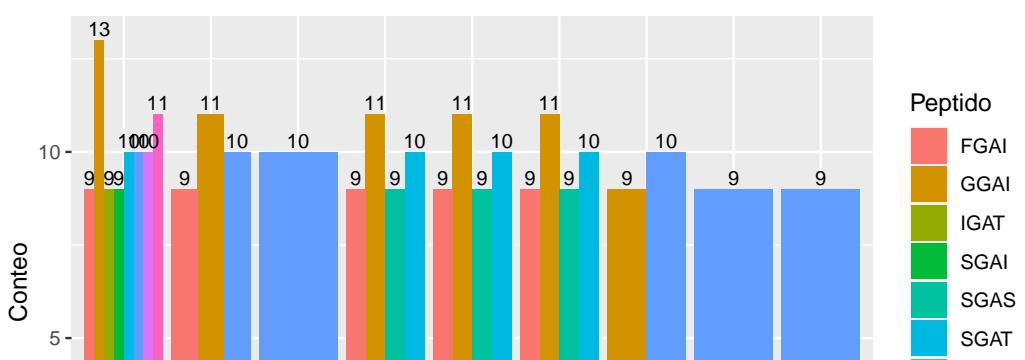
Marco de lectura 1



Marco de lectura 2



Marco de lectura 3



- ConservativeNoSiteMut (la secuencia de AA cambió pero tiene similitud de acuerdo al score de BLOSUM62. Sin embargo, el sitio no sufrió mutaciones)
- Deletion (La secuencia de AA tiene sufrió 1 o mas delecciones)
- NoMutation (La secuencia de AA no sufrió mutaciones)
- NoSynonym (La secuencia de AA cambió)
- NoSynonymNoSiteMut (La secuencia de AA cambió. Sin embargo, el sitio no sufrió mutaciones.)
- Synonym (El sitio sufrió mutaciones. Sin embargo, la secuencia de AA no cambió.)

3.2.5.4 Análisis de sitios en los cuales su ancestro era TGGCGCCA

Para tratar de entender como es que los sitios HIP1 se pierden hicimos un análisis únicamente en las transiciones en las que el nodo ancestral tenía un sitio TGGCGCCA.

En la (Figura 3.29) mostramos 3 gráficos que indican la frecuencia del tipo de sustituciones que hubo para estos casos para cada nodo en cada uno de los marcos de lectura.

En la (Figura 3.30) mostramos 3 gráficos (uno por cada marco de lectura) que indican la frecuencia de las mutaciones en cada uno de los 8 nucleótidos del sitio HIP.

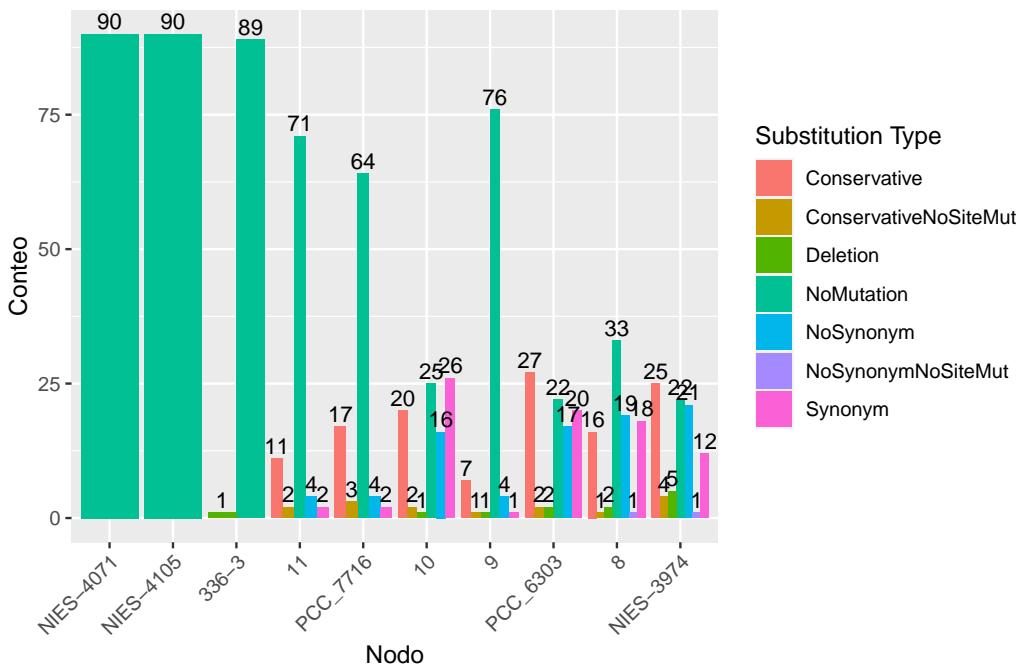
En la (Figura 3.31) mostramos 3 gráficos (uno por cada marco de lectura) que indican la frecuencia del tipo sustitución de bases.

3.2.5.5 Análisis de sitios en los cuales solo el nodo actual tiene TG-GCGCCA

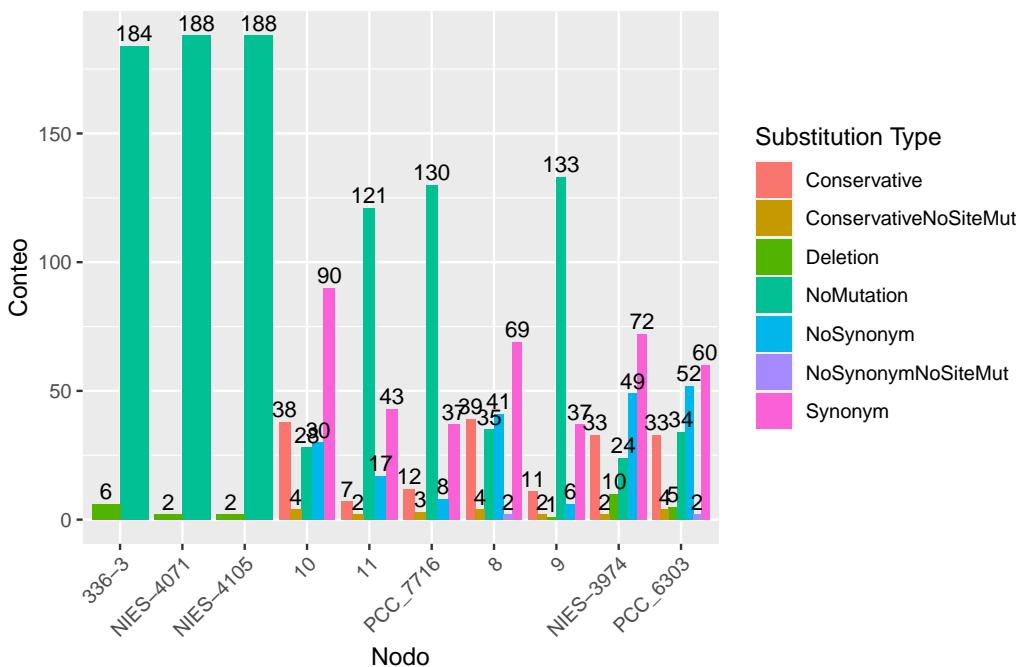
Para tratar de entender como es que los sitios TGGCGCCA se ganan, hicimos un análisis únicamente en las transiciones en las que el nodo actual tenía un sitio TGGCGCCA.

En la Figura 3.32 mostramos 3 gráficos (uno por cada marco de lectura) que indican la frecuencia del tipo de sustituciones que hubo para estos casos para cada nodo en cada uno de los marcos de lectura.

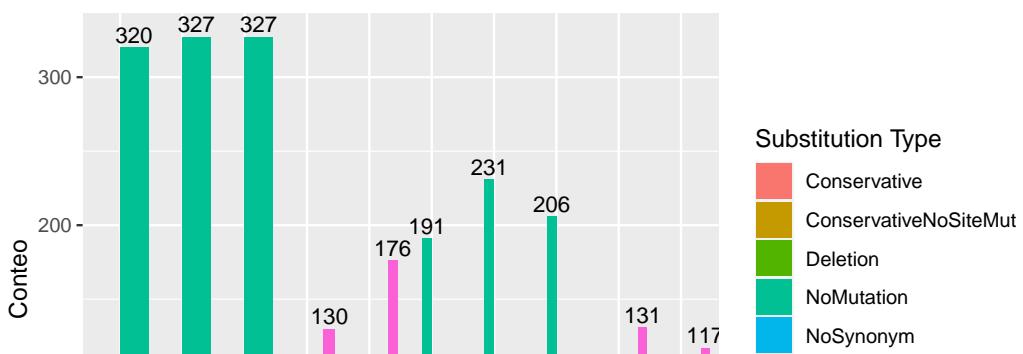
Marco de lectura 1



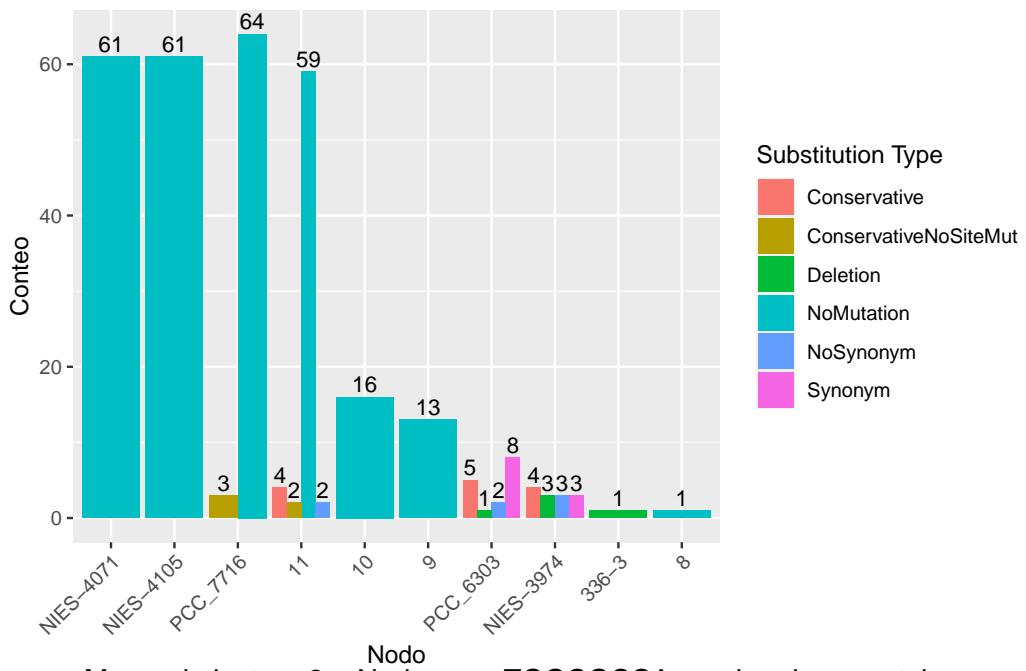
Marco de lectura 2



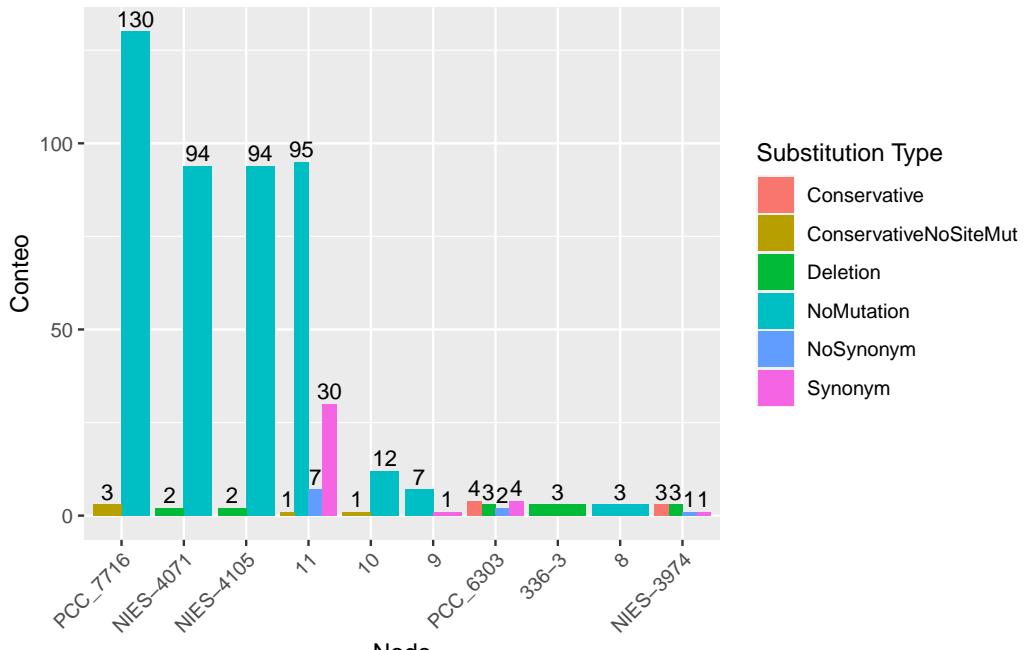
Marco de lectura 3



Marco de lectura 1 – Nodos con TGGCGCCA en el nodo parental



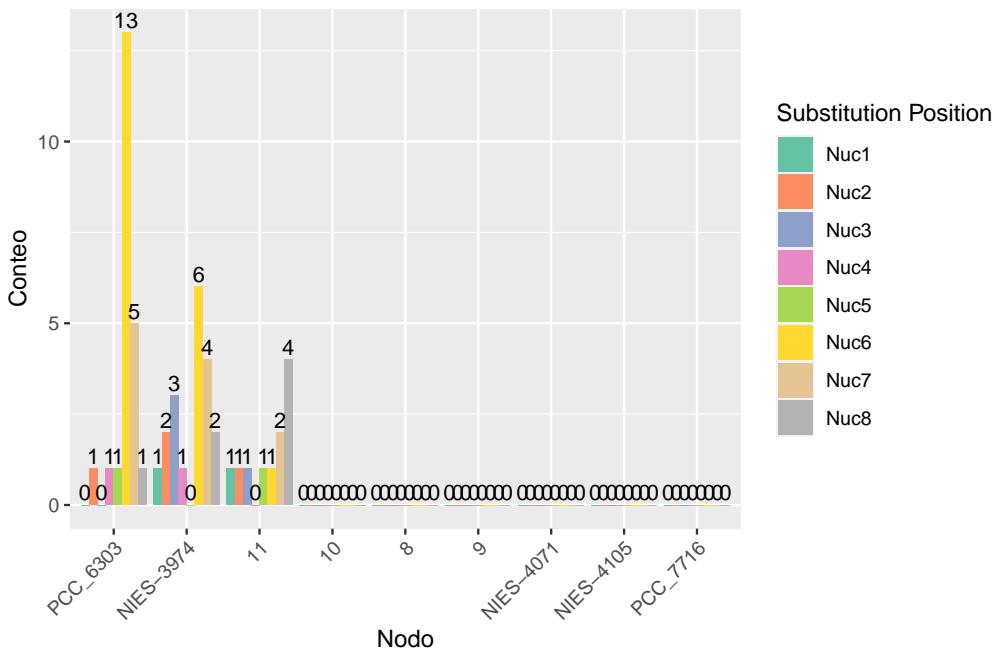
Marco de lectura 2 – Nodos con TGGCGCCA en el nodo parental



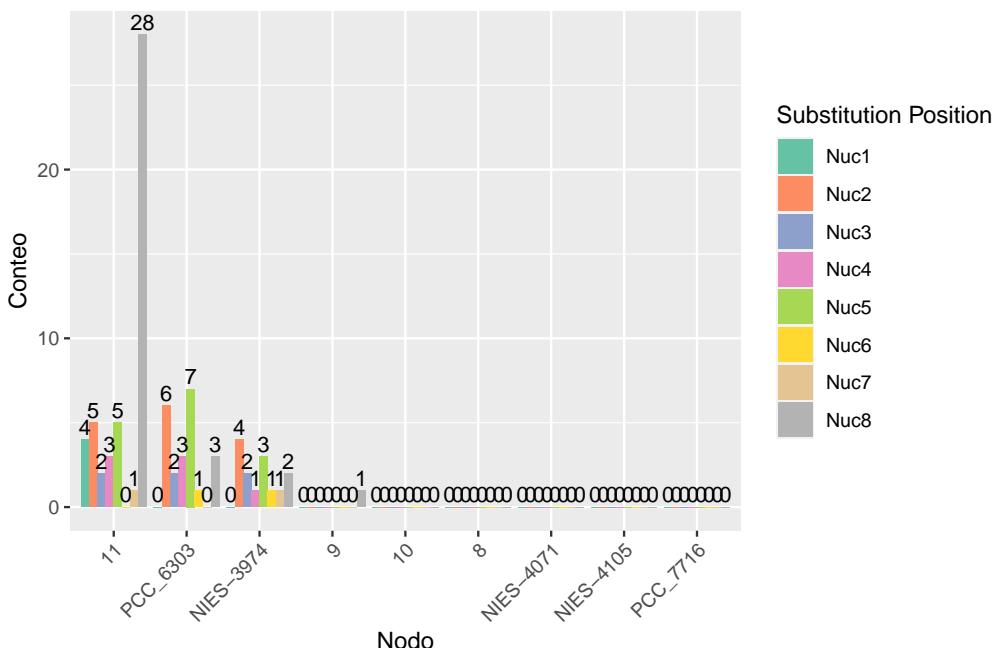
Marco de lectura 3 – Nodos con TGGCGCCA en el nodo parental



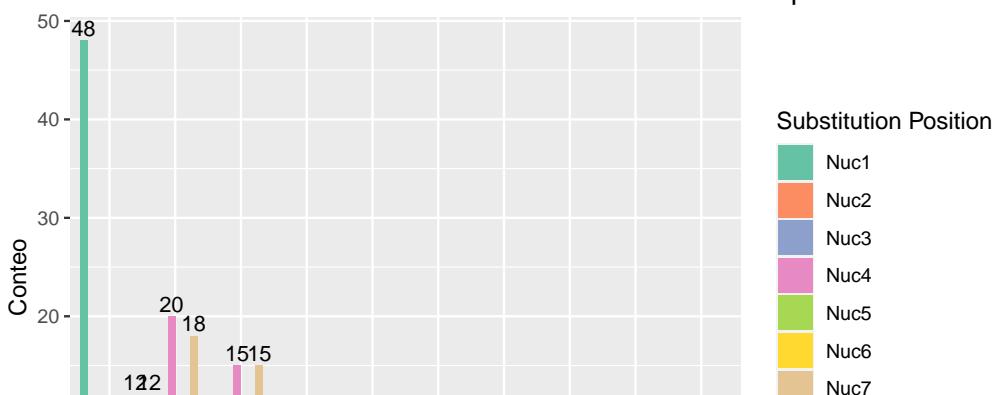
Marco de lectura 1 – Nodos con TGGCGCCA en el nodo parental – Mutación



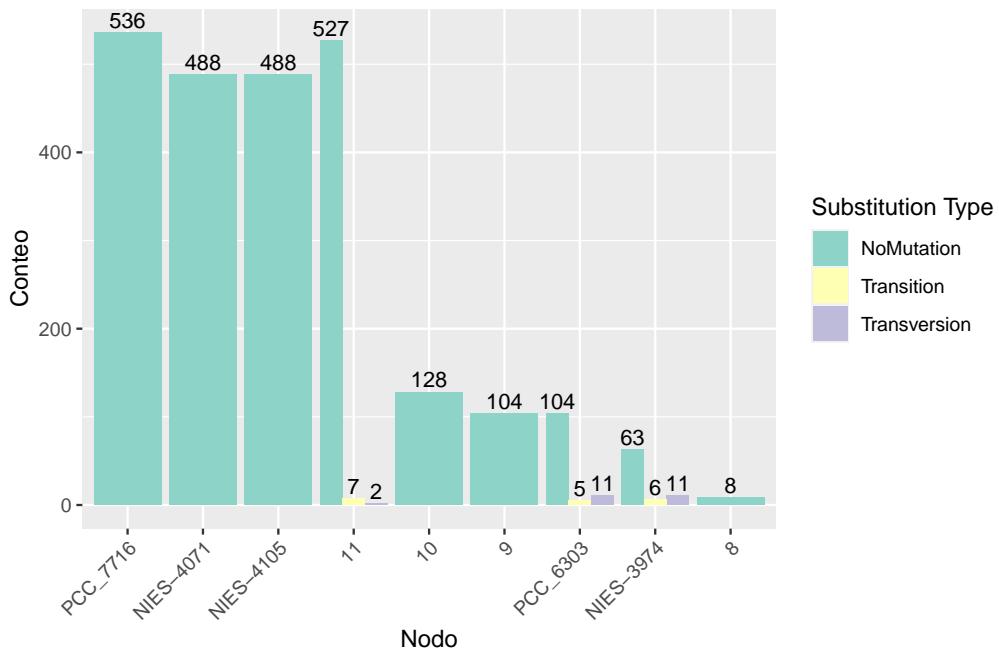
Marco de lectura 2 – Nodos con TGGCGCCA en el nodo parental – Mutación



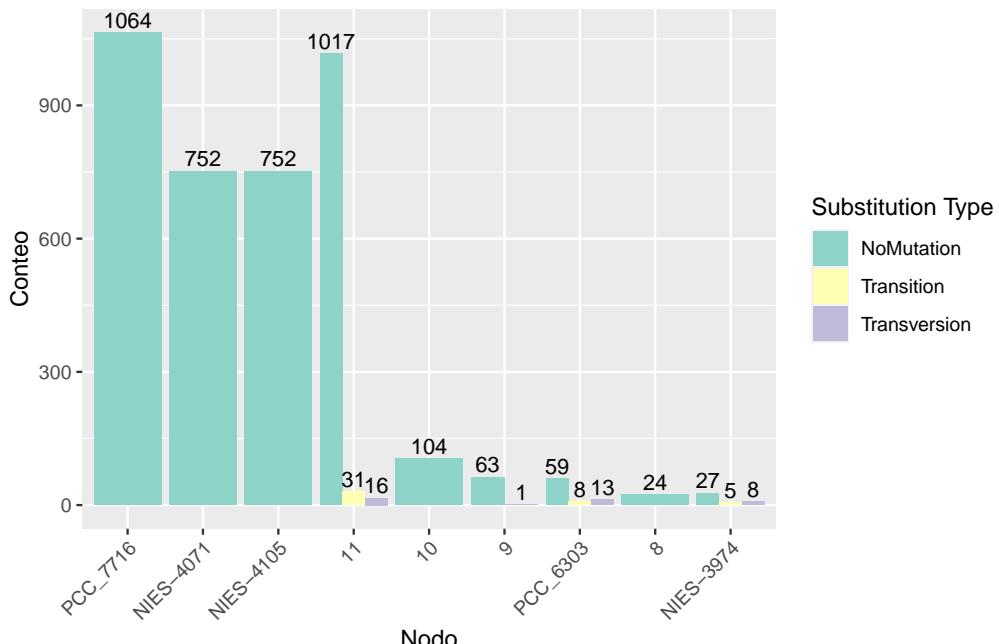
Marco de lectura 3 – Nodos con TGGCGCCA en el nodo parental – Mutación



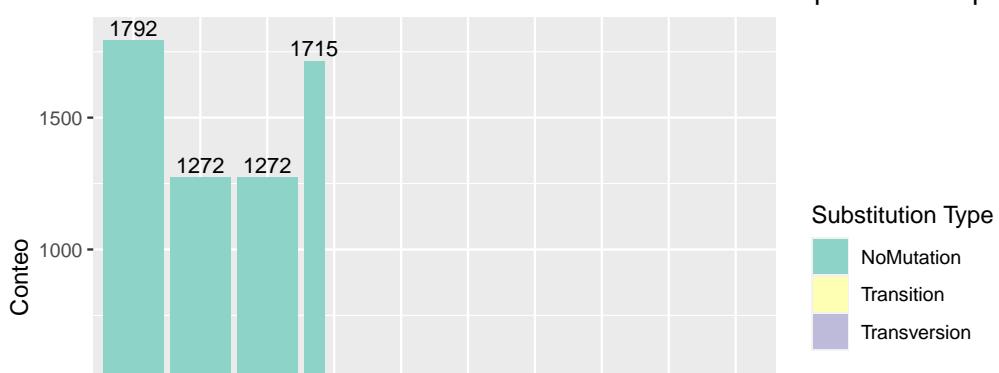
Marco de lectura 1 – Nodos con TGGCGCCA en el nodo parental – Tipo d



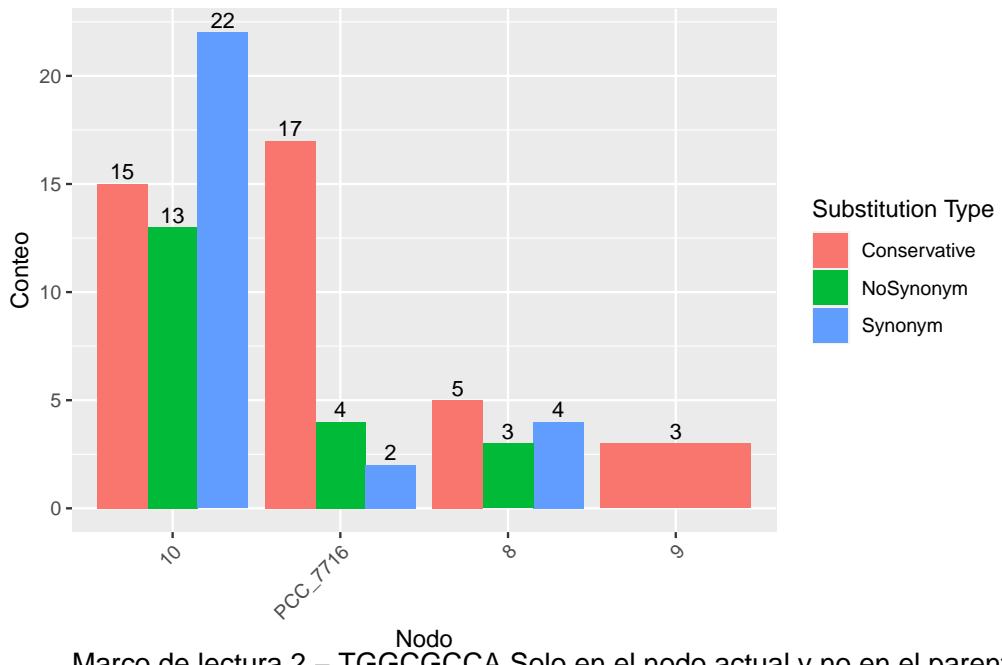
Marco de lectura 2 – Nodos con TGGCGCCA en el nodo parental – Tipo d



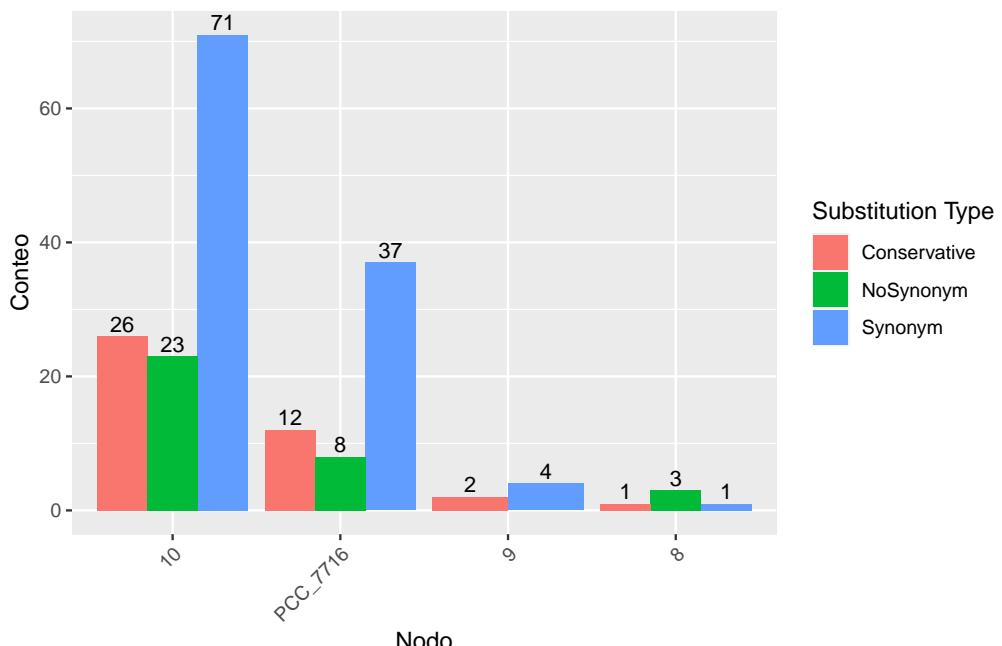
Marco de lectura 3 – Nodos con TGGCGCCA en el nodo parental – Tipo c



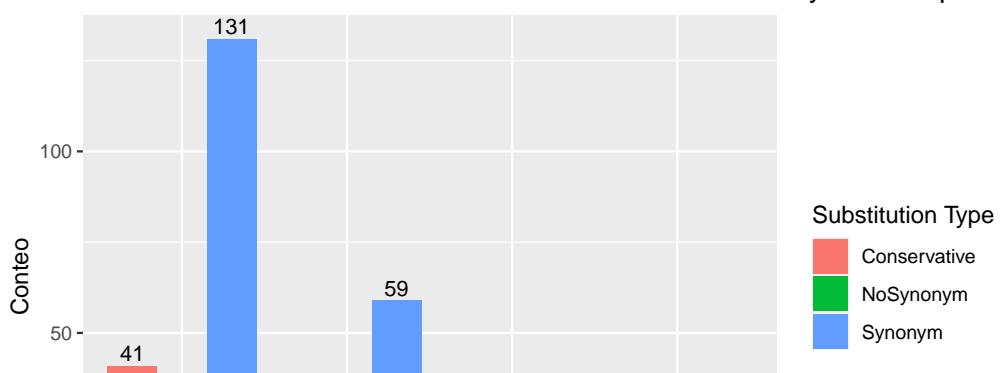
Marco de lectura 1 – TGGCGCCA Solo en el nodo actual y no en el parent



Marco de lectura 2 – TGGCGCCA Solo en el nodo actual y no en el parent



Marco de lectura 3 – TGGCGCCA Solo en el nodo actual y no en el parent



Bibliography

- Cabello-Yeves, P. J., Callieri, C., Picazo, A., Schallenberg, L., Huber, P., Roda-Garcia, J. J., Bartosiewicz, M., Belykh, O. I., Tikhonova, I. V., Torcello-Requena, A., et al. (2022). Elucidating the picocyanobacteria salinity divide through ecogenomics of new freshwater isolates. *BMC biology*, 20(1):1–24.
- Emms, D. M. and Kelly, S. (2019). Orthofinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome biology*, 20:1–14.
- Lefort, V., Desper, R., and Gascuel, O. (2015). Fastme 2.0: a comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. *Molecular biology and evolution*, 32(10):2798–2800.