

TEMA 3.1. Obtención de secuencias

Contacto: Virginia Valcárcel (virginia.valcarcel@uam.es)

INTRODUCCIÓN

El producto de la secuenciación se traduce en una cadena de nucleótidos que representa la secuencia de ADN amplificada con un cromatograma asociado (Fig. 1).

Faltan parámetros necesarios o son incorrectos.

Si tienes tus propias secuencias, entonces € con artefactos posiblemente ; cromatogramas. En la lectura de un cromatograma p debidos a la PCR. En la ; casos, dichos fallos son detectados e identificados me posición 299 se observa una . 1, posición 299), mientras que en otros casos no son d posible aditividad detectada, . Los fallos pueden deberse a la saturación de ur mientras en la posición 304 ; aditvidades reales o artefactos de la PCR (Figs. 1 y 2). se observa un posible

Figura 1. Cromatograma

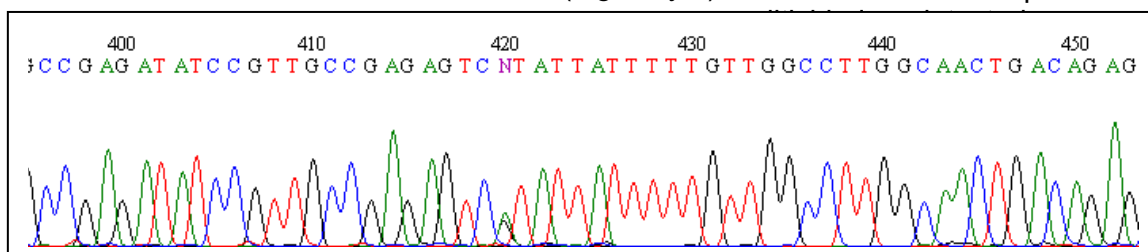


Figura 2. Cromatograma con una aditividad (posición 420) posiblemente debida a la presencia de dos copias diferentes de la región secuenciada (una con una A en posición 420 y otra con una G en esa misma posición).

Por todo ello, tras la secuenciación hay que revisar los cromatogramas y sustituir las N's por el o los nucleótidos correspondientes, corregir fallos no detectados en la lectura e identificar las secuencias de inicio y final de la región secuenciada.

Este curso está enfocado a trabajar con secuencias obtenidas por otros autores, por lo que no explicaremos cómo realizar la revisión de los cromatogramas. Sin embargo os recomendamos utilizar el programa PhyDE (Phylogenetic Data Editor) que es gratuito y de fácil manejo (véase tema 3.2). Este programa puede descargarse gratuitamente en el siguiente enlace web: <http://www.phyde.de/>.

También puedes hacer filogenias moleculares sin haber obtenido tus propias secuencias. Esto es posible gracias a una base de datos *online* llamada GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). En esta base de datos se almacenan todas las secuencias que se incluyen en todos los artículos publicados en revistas científicas indexadas. Cada secuencia queda registrada con un número de GenBank, conocido como “*GenBank accession number*” que ha de incluirse en los artículos para la identificación de las secuencias.

METODOLOGÍA Y PRÁCTICA

I. Búsqueda y descarga de secuencias en GenBank

- Paso 1. Ve a la página web del GenBank:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Paso 2. Selecciona “Nucleotide” en el desplegable “Search”. De esta manera, estás restringiendo la búsqueda a los registros de la base de datos del GenBank que corresponden a secuencias de nucleótidos.
- Paso 3. Especifica los criterios de la búsqueda de secuencias en la ventana “for”.
Opciones de búsqueda:
 - a. Si conoces el número de GenBank puedes incluirlo directamente (ej. DQ987166).
 - b. Si no conoces el número de GenBank o si lo que quieres es saber si hay algo publicado de un taxon concreto o de una región del ADN concreta, entonces has de hacer una búsqueda más genérica. Puedes buscar por el nombre del taxon (si es binomial ha de ir entre comillas; Ej. “*Reseda alba*” y te aparecerán todas las secuencias de todas las regiones del ADN de *R. alba* que hayan sido obtenidas y publicadas). También puedes buscar por el nombre de la región del ADN que te interese (Ej. “*Internal Transcribed Spacer*” y te aparecerán todas las secuencias de esta región del *nrADN* que se hayan obtenido y publicado para todos los organismos vivos). Para búsquedas combinadas los términos de la búsqueda deben ir anidados mediante un la palabra AND.

What is GenBank?

GenBank® is the NIH genetic sequence database, an annotated collection of all publicly available DNA sequences (*Nucleic Acids Research*, 2011 Jan;39(Database issue):D32-7). There are approximately 126,551,501,141 bases in 135,440,924 sequence records in the traditional GenBank divisions and 191,401,393,188 bases in 62,715,288 sequence records in the WGS division as of April 2011.

The complete [release notes](#) for the current version of GenBank are available on the NCBI ftp site. A new release is made every two months. GenBank is part of the [International Nucleotide Sequence Database Collaboration](#), which comprises the DNA DataBank of Japan (DDBJ), the European Molecular Biology Laboratory (EMBL), and GenBank at NCBI. These three organizations exchange data on a daily basis.

An example of a GenBank [record](#) may be viewed for a *Saccharomyces cerevisiae* gene.

Faltan parámetros necesarios o son incorrectos.

Paso 4. Según vayas realizando las búsquedas, puedes ir guardando las secuencias que te interesen para después descargarlas todas juntas. Para ello, debes seleccionar las secuencias deseadas, ir a “Send to” y señalar “Clipboard”. Esta opción almacena durante unas horas las secuencias que hayas seleccionado en una carpeta denominada “Clipboard”.

Results: 2 Selected: 1

☒ [Reseda suffruticosa](#) voucher S. Martin-Bravo 42SMB04 (UPOS) tRNA-Leu (trnL) sequence; trnL-trnF intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-Phe (trnF) chloroplast
775 bp linear DNA
Accession: DQ987062.1 GI: 119699009
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#) [Related Sequences](#)

☐ [Reseda suffruticosa](#) voucher S. Martin-Bravo 42SMB04 (UPOS) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence
639 bp linear DNA
Accession: DQ987210.1 GI: 119698364
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#) [Related Sequences](#)

Send to: ☒ **Filter your results:**

Choose Destination

☐ File ☒ Clipboard
☐ Collections ☐ Analysis Tool

Add 1 items.
[Add to Clipboard](#)

Analyze these sequences
Run BLAST

Find related data
Database: Select
[Find items](#)

Paso 5. Accede a la carpeta “Clipboard” que aparecerá en la parte superior derecha de la página junto a “Send to” y

- Selecciona todas las secuencias que quieras descargar (en nuestro caso todas las guardadas).
- Ve a “Send to” y selecciona la opción “File”. Inmediatamente se abrirá un desplegable que te pedirá el formato en el que quieres

descargar las secuencias. Señala “FASTA”. Cambia el nombre del fichero por “Secuencias_genbank_ITS”

The screenshot shows the NCBI Nucleotide database interface. A list of six sequences is displayed, each with a checkbox, accession number, and description. A 'Send to' menu is open, showing options for 'File', 'Clipboard', 'Collections', and 'Analysis Tool'. The 'FASTA' format is selected, and a 'Create File' button is visible. The 'Clipboard' option is highlighted, and a 'Clipboard: 6 items' notification is shown. The 'Recent activity' section on the right shows a list of recent searches.

Faltan parámetros necesarios o son incorrectos.

Paso 6. Al descargarte las secuencias obtendrás un archivo de texto que incluye todas las secuencias seleccionadas en formato fasta (véase tema 3.2). Ábrelo con un editor de texto (WordPad para PC, o TextWrangler para MAC; OJO es muy importante que no lo abráis con Word). En la línea superior a la cadena de nucleótidos de cada secuencia aparece lo que identifica como el nombre de las secuencias (véase tema 3.2). Como veréis más adelante, la mayoría de los programas de filogenia no admiten nombres largos, por lo que os recomiendo que después del símbolo > dejéis sólo alguna cadena de caracteres que identifique al taxon E.J.: >R_alb_DQ987192. Esto indicaría que ahí comienza el nombre de una secuencia de *Reseda alba* cuyo número de GenBank es DQ987192. Es importante conservar este número, pues es la única manera de saber cuál de todas las secuencias que hay en internet corresponde a la que te descargaste.

Ejercicio 3.1.1. Descárgate las siguientes secuencias de ITS (DQ987192, DQ987187, DQ987166, FJ212178, GQ891137, GQ891139, GQ891140, DQ987181, GQ891132, DQ987183, DQ987172, GQ891136, GQ891150, GQ891151, GQ891162, DQ987176, GQ891169). Abre el archivo con un editor de texto, renombra las secuencias y guarda el archivo (.fasta) bajo el nombre “Secuencias_ITS”.

Ejercicio 3.1.2. El objetivo final de las prácticas de este curso consiste en presentar una reconstrucción filogenética de *Reseda sect. Glaucorese*. Para ello utilizaremos dos regiones de ADN, una del genoma nuclear (ITS) y otra del genoma plastidial (*trnL-F*). Teniendo en cuenta que es posible que combinemos ambas regiones y que ya has descargado las secuencias del ejercicio 3.1.1., ¿qué *accessions* del *GenBank* del espaciador plastidial *trnL-F* de todas las disponibles en el *GenBank* utilizarías para hacer la matriz plastidial?

Ejercicio 3.1.3. Comprueba que has hecho bien el Ejercicio 3.1.2. y descárgate dichas secuencias, renómbralas y guárdalas bajo el nombre “Secuencias_LF”.

II. Otras opciones del GenBank: BLAST

La herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) es un motor de búsqueda que mediante un algoritmo heurístico (*Smith-Waterman*) realiza alineamiento de secuencias (véase tema 3.2). Esta herramienta está disponible en el GenBank y permite, entre otras opciones, comparar una secuencia modelo (*query*) con todas las secuencias almacenadas en la base de datos. El programa busca dentro de la base de datos aquellas secuencias que presenten mayor similitud con la secuencia modelo. La búsqueda se inicia mediante la identificación de una cadena de nucleótidos (en nuestro caso) de un tamaño determinado igual entre la secuencia de estudio y las disponibles en el GenBank. El tamaño de la secuencia a buscar define la especificidad inicial de la búsqueda. Posteriormente se aplica un sistema de penalización, para las diferencias, y ganancias, para las similitudes, cuya proporción relativa puede ajustarse en función de lo conservadas que sean las secuencias.

Esta herramienta es especialmente útil para la búsqueda de posibles grupos hermanos e incluso para la identificación de posibles contaminaciones y errores.

- Paso 1. Ve a la página web del GenBank:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Paso 2. Pincha en el link “BLAST” que aparece en la barra izquierda de la pantalla.
- Paso 3. Se abrirá una nueva ventana en la que se solicita el tipo de búsqueda a realizar. Si bien en este curso vamos a realizar una búsqueda básica, la herramienta BLAST del GenBank presenta múltiples opciones (alineamiento múltiple o diseño de *primers*, entre otras). Pincha en el link “nucleotide blast” dentro de *Basic BLAST*. Con ello estás restringiendo la búsqueda a secuencias de nucleótidos.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi

Google Gmail UPO UAM PHYLOGENY SYSTEMATICS DICIONARIOS STATISTICS REVISTAS CONSERVACION Google Acadé

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

► **NCBI/ BLAST Home**

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. [more...](#)

New Aligning Multiple Protein Sequences? Try the [COBALT Multiple Alignment Tool](#). [Go!](#)

BLAST Assembled RefSeq Genomes

Choose a species genome to search, or [list all genomic BLAST databases](#).

- Human
- Mouse
- Rat
- Arabidopsis thaliana
- Oryza sativa
- Bos taurus
- Danio rerio
- Drosophila melanogaster
- Gallus gallus
- Pan troglodytes
- Microbes
- Apis mellifera

Basic BLAST

Choose a BLAST program to run.

nucleotide blast	Search a nucleotide database using a nucleotide query <i>Algorithms: blastn, megablast, discontinuous megablast</i>
protein blast	Search protein database using a protein query <i>Algorithms: blastp, psi-blast, phi-blast</i>
blastx	Search protein database using a translated nucleotide query
tblastn	Search translated nucleotide database using a protein query
tblastx	Search translated nucleotide database using a translated nucleotide query

Specialized BLAST

Choose a type of specialized search (or database name in parentheses.)

Paso 4. Se abrirá una ventana en la que se solicita la secuencia modelo (*query*), esta puede cargarse a partir de un archivo o bien se puede pegar directamente en la ventana “Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)”. Abre el archivo “Glaucocreseda_ITS.fasta” con un editor de texto (WordPad para PC, o TextWrangler para MAC; OJO es muy importante que no lo abras con Word) copia la secuencia “R_bat1_GQ891132” y pégala en la página web. OJO: sólo se ha de pegar la cadena de nucleótidos.

The screenshot shows the NCBI BLAST web interface. The browser address bar displays the URL: `www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blastn`. The page title is "Nucleotide BLAST: Search nucleotide data".

The interface includes a navigation bar with links: Home, Recent Results, Saved Strategies, and Help. Below this, the "NCBI/ BLAST/ blastn suite" is shown, with tabs for blastn, blastp, blastx, tblastn, and tblastx. The "blastn" tab is selected.

The main section is titled "Enter Query Sequence". It contains a text area for "Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)" with a sample FASTA sequence. There are "Clear" and "Query subrange" buttons. Below the text area is a "Job Title" field and a checkbox for "Align two or more sequences".

The "Choose Search Set" section includes a "Database" dropdown menu set to "Nucleotide collection (nr/nt)". There are options for "Organism" (with a search field), "Exclude" (with checkboxes for "Models (XM/XP)" and "Uncultured/environmental sample sequences"), and "Entrez Query" (with a search field).

The "Program Selection" section has an "Optimize for" dropdown menu set to "Highly similar sequences (megablast)". There are also options for "More dissimilar sequences (discontiguous megablast)" and "Somewhat similar sequences (blastn)".

At the bottom, there is a "BLAST" button and a "Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)" button. A checkbox for "Show results in a new window" is also present.

A note at the bottom states: "Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow and marked with ♦ sign".

Paso 5. En “*Choose Search Set*”, selecciona la base de datos donde quieres que se realice la búsqueda. Por defecto viene señalada la base de datos del genoma humano, debes señalar “*Others (nr etc.)*”. En “*Program Selection*” se puede elegir el criterio para la búsqueda. Deja la opción que aparece señalada por defecto “*Highly similar sequences (megablast)*”. Aunque en este curso dejaremos el resto de los parámetros que definen la búsqueda con los valores que aparecen por defecto, es interesante ver qué otros parámetro intervienen en la búsqueda y cómo modificarlos. Si abres el link “*Algorithm parameters*” aparecerán los siguientes parámetros

Algorithm parameters Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow and marked with + sign

General Parameters

Max target sequences: 100 Select the maximum number of aligned sequences to display

Short queries: ☒ Automatically adjust parameters for short input sequences

Expect threshold: 10

Word size: 28

Max matches in a query range: 0

Scoring Parameters

Match/Mismatch Scores: 1,-2

Gap Costs: Linear

Filters and Masking

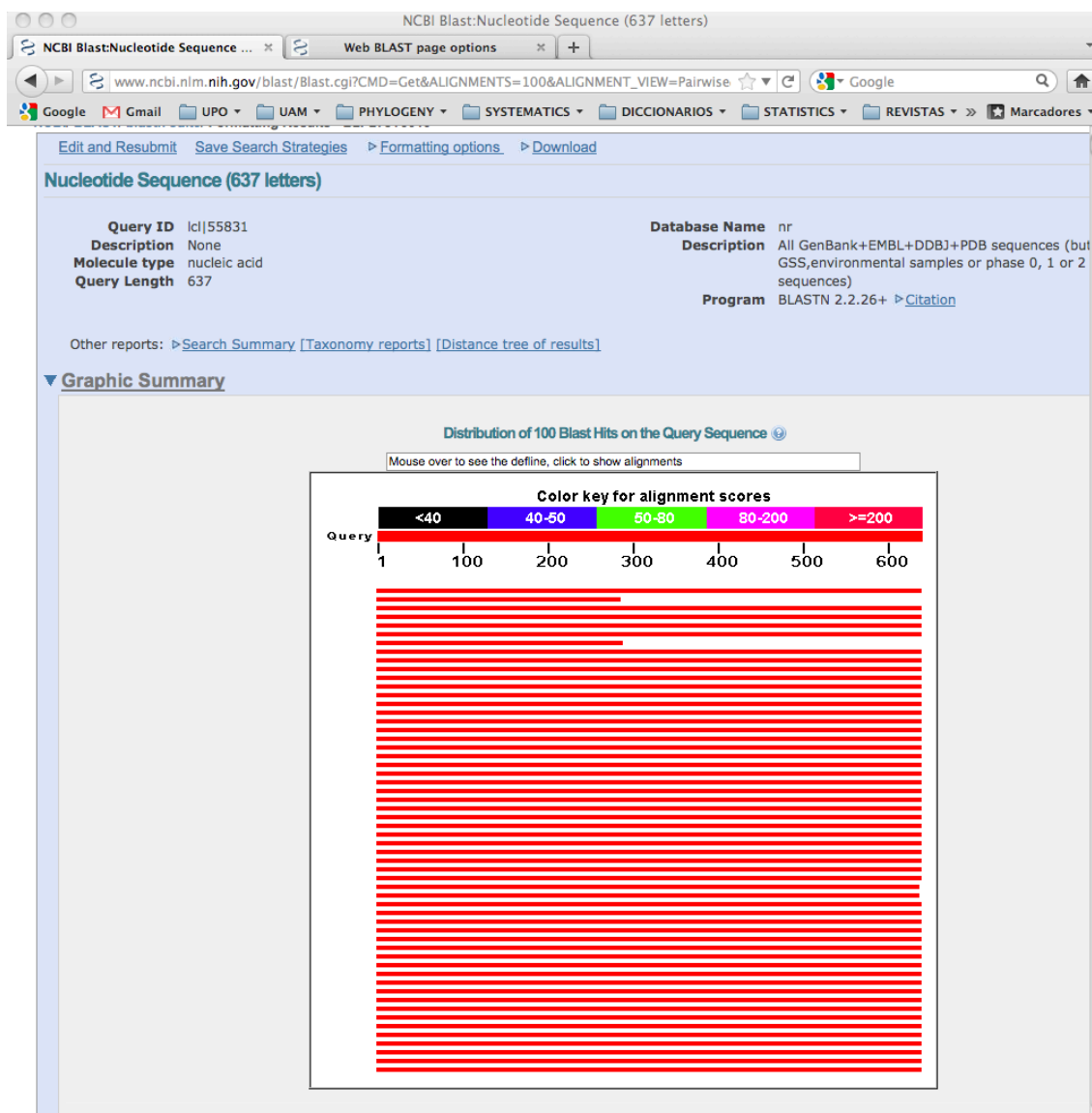
Filter: ☒ Low complexity regions ☐ Species-specific repeats for: Anopheles gambiae (African malaria mosquito)

Mask: ☒ Mask for lookup table only ☐ Mask lower case letters

- a. “Max target sequences”: número de secuencias que quieres que aparezcan como *output*.
- b. “Expect threshold”: es el número de asociaciones que se pueden producir por azar. Por defecto aparece 10 lo que significa que aquellas asociaciones cuya significación sea superior al umbral (10) serán descartadas por considerarse espurias.
- c. “Word size”: número de nucleótidos incluidos en la secuencia inicial de búsqueda. Cuanto mayor sea este número, más restrictiva será la búsqueda.
- d. “Match/Mismatch scores”: permite regular la relación penalización – ganancia. El valor que aparece por defecto “1,-2” permitirá la asociación de aquellas secuencias cuya similitud sea al menos del 95%. Este valor puede interesar modificarlo si, por ejemplo, no encontrásemos ninguna asociación en una primera búsqueda.

Paso 6. Una vez finalizada la definición de la búsqueda dale a la opción “BLAST”. Cuando termine la búsqueda se abrirá una ventana con los resultados. En la parte superior aparece un resumen gráfico en el que se muestran las 100 mejores secuencias encontradas en el *GenBank*; es decir, las 100 secuencias que más se parecen a la secuencia modelo. La barra horizontal superior representa la secuencia modelo indicando la longitud final. El resto de las barras horizontales indican con distintos colores la puntuación obtenida al alinear nuestra secuencia modelo con cada una de las 100 mejores secuencias. Colocando el cursor encima de cada barra podemos ver a qué secuencia pertenece.

Así, en esta figura se puede apreciar cómo las mejores secuencias encontradas en el *GenBank* presentan una puntuación superior a 200 (rojo) al compararse y alinearse con nuestra secuencia modelo (R_bat1_GQ891132). No obstante, mientras la mejor secuencia (primera barra) cuenta con un número de nucleótidos similar al de la secuencia modelo, la segunda mejor es una secuencia con cerca de 300 nucleótidos, que se alinean con una buena puntuación a las primeras 300 posiciones de nuestra secuencia modelo.



Paso 7. Debajo de “Graphic Summary” en “Descriptions” aparece una lista con la información de los alineamientos generados. Así, para cada una de las 100 mejores secuencias se indica el número del *GenBank*, la procedencia de la muestra, la puntuación del alineamiento, el porcentaje de la longitud total de la secuencia modelo que ha podido ser alineado con la secuencia encontrada, los valores esperados si el alineamiento se debiese al azar (<http://www.youtube.com/watch?v=nO0wJgZRZJs&feature=youtu.be>; <http://www.youtube.com/watch?v=Z7ek7UoP7Bg&feature=youtu.be>) y por último el porcentaje de similitud entre ambas secuencias.

Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [G](#) GEO [C](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ212175.1	Reseda battandieri voucher S. Martin-Bravo 35SMB06 (UPOS) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1177	1177	100%	0.0	100%
DQ987184.1	Reseda battandieri voucher D. Podlech 41249 (M) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	529	529	44%	1e-146	100%
DQ987183.1	Reseda battandieri voucher S. Martin-Bravo 98SMB06 (UPOS) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1173	1173	100%	0.0	99%
GQ891135.1	Reseda battandieri voucher S. Martin-Bravo 41SMB06 (UPOS) clone D internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1171	1171	100%	0.0	99%
GQ891133.1	Reseda battandieri voucher S. Martin-Bravo 41SMB06 (UPOS) clone B internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1171	1171	100%	0.0	99%
GQ891134.1	Reseda battandieri voucher S. Martin-Bravo 41SMB06 (UPOS) clone C internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1166	1166	100%	0.0	99%
DQ987178.1	Reseda virgata voucher S. Rivas-Martinez 8351 (M) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	527	527	45%	4e-146	99%
GQ891167.1	Reseda virgata voucher P. Vargas 401PV00 (UPOS) clone C internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1160	1160	100%	0.0	99%
GQ891162.1	Reseda virgata voucher S. Martin-Bravo 227SMB06 (UPOS) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1160	1160	100%	0.0	99%
GQ891161.1	Reseda virgata voucher G. Nieto 1070(MA) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1160	1160	100%	0.0	99%
GQ891158.1	Reseda gredensis voucher B. Garcia Munoz 05073 (UPOS) clone B internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1160	1160	100%	0.0	99%
GQ891153.1	Reseda gredensis voucher S. Martin-Bravo 47SMB04 (UPOS) clone B internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1160	1160	100%	0.0	99%
GQ891136.1	Reseda complicata voucher P. Jimenez-Mejias 152PJM06 (UPOS) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1160	1160	100%	0.0	99%
DQ987172.1	Reseda complicata voucher S. Martin-Bravo 62SMB04 (UPOS) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1160	1160	100%	0.0	99%
DQ987171.1	Reseda complicata voucher S. Martin-Bravo 57SMB04 (UPOS) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1160	1160	100%	0.0	99%
GQ891131.1	Reseda battandieri voucher S. Martin-Bravo 41SMB06 (UPOS) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1166	1166	100%	0.0	99%
GQ891170.1	Reseda virgata voucher A. Segura Zubizarreta 5835 (MA) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1157	1157	100%	0.0	99%
GQ891168.1	Reseda virgata voucher T. Romero s.n. (MA) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1157	1157	100%	0.0	99%
GQ891164.1	Reseda virgata voucher F. Amich s.n. (MA) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1157	1157	100%	0.0	99%
GQ891169.1	Reseda virgata voucher S. Martin-Bravo 235SMB06 (UPOS) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1155	1155	100%	0.0	99%
GQ891166.1	Reseda virgata voucher P. Vargas 401PV00 (UPOS) clone B internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1155	1155	100%	0.0	99%
GQ891155.1	Reseda gredensis voucher S. Martin-Bravo 47SMB04 (UPOS) clone D internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1155	1155	100%	0.0	99%
GQ891154.1	Reseda gredensis voucher S. Martin-Bravo 47SMB04 (UPOS) clone C internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1155	1155	100%	0.0	99%
GQ891139.1	Reseda glauca voucher S. Martin-Bravo 243SMB06 (UPOS) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1155	1155	100%	0.0	99%
GQ891138.1	Reseda glauca voucher J.M. Marin 14604MM(UPOS) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1155	1155	100%	0.0	99%
GQ891137.1	Reseda glauca voucher S. Martin-Bravo 64SMB04 (UPOS) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1155	1155	100%	0.0	99%
DQ987177.1	Reseda virgata voucher S. Martin-Bravo 408SMB05 (UPOS) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1155	1155	100%	0.0	99%
GQ891151.1	Reseda gredensis voucher S. Martin-Bravo 47SMB04 (UPOS) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1153	1153	100%	0.0	99%
DQ987174.1	Reseda gredensis voucher S. Martin-Bravo 50SMB04 (UPOS) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1153	1153	100%	0.0	99%
DQ987173.1	Reseda gredensis voucher S. Martin-Bravo 47SMB04 (UPOS) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1151	1151	100%	0.0	99%
GQ891165.1	Reseda virgata voucher P. Vargas 401PV00 (UPOS) clone A internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1149	1149	100%	0.0	99%
GQ891159.1	Reseda gredensis voucher B. Garcia Munoz 05073 (UPOS) clone C internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1149	1149	100%	0.0	99%
GQ891152.1	Reseda gredensis voucher S. Martin-Bravo 47SMB04 (UPOS) clone A internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1149	1149	100%	0.0	99%
GQ891150.1	Reseda gredensis voucher B. Garcia Munoz 05080 (UPOS) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1149	1149	100%	0.0	99%
GQ891156.1	Reseda gredensis voucher B. Garcia Munoz 05073 (UPOS) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1147	1147	99%	0.0	99%
GQ891157.1	Reseda gredensis voucher B. Garcia Munoz 05073 (UPOS) clone A internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1144	1144	99%	0.0	99%
GQ891163.1	Reseda virgata voucher J. Sanchez 126 (MA) internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1149	1149	100%	0.0	99%

Paso 8. Finalmente, bajo el epígrafe de “Alignments” aparecen cada uno de los 100 alineamientos.

Alignments

☐ Select All [Get selected sequences](#) [Distance tree of results](#)

>[GQ891132.1](#) Reseda battandieri voucher S. Martin-Bravo 41SMB06 (UPOS) clone A internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence
Length=637

Score = 1177 bits (637), Expect = 0.0
Identities = 637/637 (100%), Gaps = 0/637 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1	TCGAACCTGACCAAGGAGTTTACCCGAGAACAGTATTGTATGCCGAAACCGCAGG	60
Sbjct 1	TCGAACCTGACCAAGGAGTTTACCCGAGAACAGTATTGTATGCCGAAACCGCAGG	60
Query 61	CCTATCAGGCATGTCGTTTCCGATGCTCCGAGGCGCCGGGATCCTCTAGGATTTT	120
Sbjct 61	CCTATCAGGCATGTCGTTTCCGATGCTCCGAGGCGCCGGGATCCTCTAGGATTTT	120
Query 121	CCTAGCGGGCGCCCTCGCGCTGACGTGACACAAACCCACCCCGCGGCTTAAGCGT	180
Sbjct 121	CCTAGCGGGCGCCCTCGCGCTGACGTGACACAAACCCACCCCGCGGCTTAAGCGT	180
Query 181	CAAGGAATTGCAAGCAAGCAACCGCCATCCACGCTCCGTTCTCGGTGTGTGGTGGCT	240
Sbjct 181	CAAGGAATTGCAAGCAAGCAACCGCCATCCACGCTCCGTTCTCGGTGTGTGGTGGCT	240
Query 241	CGGATGCTGTTTGAATGACACATACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGAT	300
Sbjct 241	CGGATGCTGTTTGAATGACACATACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGAT	300
Query 301	CGATGAGAACCTAGCGAAATCGGATCTTGGTGTGAATTCAGAAATCCGCTGAACATC	360
Sbjct 301	CGATGAGAACCTAGCGAAATCGGATCTTGGTGTGAATTCAGAAATCCGCTGAACATC	360
Query 361	GAGTCTTTGACGCCAAGTTGCGCCCGAAGCCGTCAGGCCAAGGGCACGTCTGCTGGGTG	420
Sbjct 361	GAGTCTTTGACGCCAAGTTGCGCCCGAAGCCGTCAGGCCAAGGGCACGTCTGCTGGGTG	420
Query 421	TCACGATGCTGTCGCCCAATCAATCTCTCCAAATGGCGAGGGGTGGGTGCGACATTG	480
Sbjct 421	TCACGATGCTGTCGCCCAATCAATCTCTCCAAATGGCGAGGGGTGGGTGCGACATTG	480
Query 481	GCCCTCCGCTGCTGCTATGATCGCGCTGCTCAAAATCTGGCGACCCGCTGTAAGTTTC	540
Sbjct 481	GCCCTCCGCTGCTGCTATGATCGCGCTGCTCAAAATCTGGCGACCCGCTGTAAGTTTC	540
Query 541	CGACGAGCGGTGTTGAACCTCATGCTCGTGTGCAATCTTGGCGCTCAAGTGTCCCTCT	600
Sbjct 541	CGACGAGCGGTGTTGAACCTCATGCTCGTGTGCAATCTTGGCGCTCAAGTGTCCCTCT	600
Query 601	GGCTCTTTTCGAGGACCTCGGTGACCTCTCTAAGCA 637	
Sbjct 601	GGCTCTTTTCGAGGACCTCGGTGACCTCTCTAAGCA 637	