

# Historische biogeografie van *Valonia utricularis*



*Wobine de Sitter*

# Historische biogeografie van *Valonia utricularis*

door Wobine de Sitter  
begeleiders: Jeanine Olsen en Wytse Stam  
vakgroep Mariene Biologie  
Rijksuniversiteit Groningen  
oktober 1996

## **Inhoudsopgaven**

Samenvatting	4
Inleiding	5
Materiaal en methoden	10
Resultaten	13
Discussie en conclusies	20
Een dankwoord	23
Literatuurlijst	24
Bijlage	25

## Samenvatting

Paleogeografische en paleoklimatische gebeurtenissen hebben een belangrijke rol gespeeld in het tot stand komen van de huidige verspreiding van mariene organismen. *Valonia utricularis*, een (sub) tropisch groenwier, heeft een wereldwijde tropische verspreiding. Om de historische biogeografie van deze soort te onderzoeken zijn van zes *V. utricularis* isolaten en één *Valonia macrophysa* isolaat de beide internal transcribed spacers (ITS1 en ITS2) met elkaar vergeleken. De isolaten waren verzameld in de kustwateren van de Canarische eilanden, Kaapverdische eilanden, Mexico, Spanje (Middellandse Zee), Tunesië en Israël.

De ITS-sequenties van het Kaapverdische isolaat konden niet worden aligned met de overige sequenties. De aligned *V. utricularis* dataset van ITS1 en ITS2 zijn respectievelijk 416 en 433 basen lang en hebben respectievelijk 10 en 19 variabele sites.

Opvallend in het alignment zijn de vele tandem herhaalde motieven.

Van de geanalyseerde alignments zijn de most parsimony trees berekend. De positie van de isolaten in deze most parsimony trees zijn vergeleken met de biogeografische hypothesen. Met de gevonden gegevens kunnen geen van de hypothesen worden bevestigd of worden aangenomen. Toch zijn er interessante bevindingen gedaan. Zo is het Mexicaanse isolaat in de top van de cladogrammen te vinden, geheel tegen de verwachting in. Verder is het feit dat het ITS-sequenties van het Kaapverdische isolaat in het geheel niet overeen komt met de ITS-sequenties van de overige isolaten zeer opmerkelijk.

## Inleiding

De oceanen zijn in de loop van miljoenen jaren danig veranderd. Zo is ca. 12 Ma geleden de huidige Atlantische oceaan afgescheiden van de Indo West Pacific. Voor deze tijd was er een open verbinding tussen de huidige oceanen, de Tethys Zee. Deze paleogeografische gebeurtenis heeft op de verspreiding van tropische mariene flora en fauna grote invloed gehad.

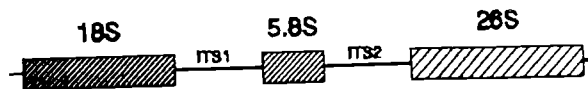
Bij onderzoek naar de historische biogeografie van een soort, wordt nagegaan hoe de huidige verspreiding in de loop van de tijd tot stand is gekomen. De verspreiding van bijvoorbeeld een macroalg is nu in de oceanen en zeeën te vinden. Maar welke gevolgen een gebeurtenis als het sluiten van de Tethys Zee heeft gehad op deze verspreiding is moeilijker te achter halen.

Welke gevolgen zulk een gebeurtenis heeft gehad op de verspreiding en evolutie van mariene biota kan op verschillende manieren worden onderzocht. Bij organismen met een skelet of houtachtige structuren kan aan de hand van fossielen een historische reconstructie worden gemaakt (Futuyma, 1986). Voor het beantwoorden van historische vragen over mariene organismen zonder deze structuren, zoals vele macroalgen, kunnen ecotypische en genetische differentiatie worden gebruikt om relaties tussen populaties of tussen verschillende soorten te onderzoeken.

Nucleotiden kunnen in de loop van de tijd veranderen door mutaties. Hiermee registreren zij hun evolutionaire geschiedenis. De mate van genetische differentiatie binnen een soort of tussen verwante soorten geeft een idee over hoelang geleden de afsplitsing met een gemeenschappelijke voorouder heeft plaatsgevonden. De afsplitsing van een gemeenschappelijke voorouder kan op twee manieren tot stand komen. Ten eerste kunnen organismen door het ontstaan van barrières van elkaar worden afgezonderd. Dit wordt vicariantie genoemd. Vicariantie kan bijvoorbeeld optreden door het ontstaan van een landbrug of door fysische factoren, zoals een koud waterstroom. Ten tweede kan er dispersie plaatsvinden, dit wil zeggen het verplaatsen van organismen naar een andere plaats. Macroalgen kunnen grote afstanden afleggen door zich aan drijvend materiaal vast te hechten. Over kleinere afstanden kunnen zij zich verplaatsen met behulp van sporen en gameten of als een macroalg loslaat en weg spoelt (Van Oppen, 1995).

De evolutionaire geschiedenis van organismen kan worden weerspiegeld in een fylogenetische reconstructie. Het principe van een fylogenetische reconstructie (cladogram) is het herkennen van homologie als de basis van monofyletische groepen. Hiertoe moeten de isolaten/taxa met elkaar worden vergeleken. Van elk isolaat moeten morfologische (de aan of afwezigheid van een bepaalde structuur) en/of moleculaire gegevens (*aligned DNA sequences*, vergelijken van nucleotiden per nucleotide-basis) verzameld worden (Kooistra, 1993). Welke data moeten worden gebruikt is afhankelijk van de gekozen vraagstelling. Voor genetisch onderzoek tussen soorten zijn conservatieve DNA-sequenties (DNA waar weinig mutaties in plaats vinden) nodig. Daarentegen moet voor het reconstrueren van een fylogenetische boom van isolaten-binnen-

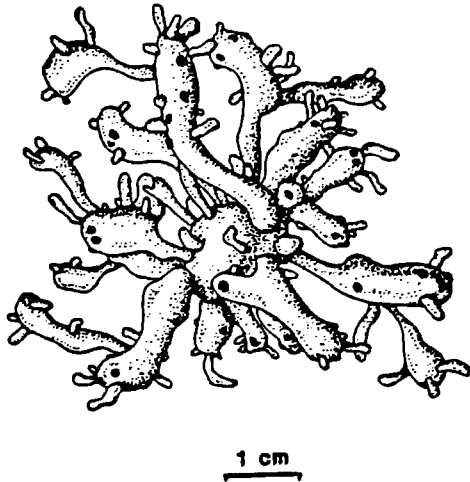
één-soort juist DNA-regio's worden gekozen waarin in de loop van de tijd wel veranderingen zijn opgetreden. Nucleair ribosomaal-DNA sequenties zijn in de laatste decennium veel gebruikt om fylogenetische relaties te vinden tussen taxa van verschillende hiërarchische niveau's (Bakker et al., 1992). Ribosomaal DNA (rDNA) is in alle organismen in vele kopieën aanwezig (Futuyma, 1986; Manhart en McCourt, 1992). Een rDNA-cistron bestaat uit drie genen en twee *internal transcribed spacers* (ITS) (figuur 1). De genen coderen voor de verschillende rRNA-subunits van de ribosomen. ITS1 en ITS2 maken deel uit van de transcriptie, maar worden tijdens de vorming van het pre-rRNA verwijderd (Gerbi, 1985). Deze regio's kunnen dus sneller veranderen, omdat zij niet worden gehinderd door het bezit van coderende sequenties. De aanwezigheid van conservatieve en zeer variabele regio's in rDNA maakt het mogelijk om de mate van fylogenetische resolutie te kiezen die nodig is voor het beantwoorden van een specifieke vraag (Bakker et al., 1992).



Figuur 1. rDNA-cistron. Het rDNA-cistron bestaat uit 18S, 5.8S en 26S, welke zijn gescheiden van elkaar door de *internal transcribed spacers*.

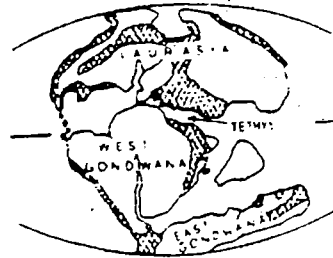
Ik heb onderzoek gedaan naar de historische biogeografie van het groenwier *Valonia utricularis* aan de hand van ITS1 en ITS2 sequenties.

*Valonia utricularis* (Roth) C. Agardh is een (sub) tropisch groenwier. Deze alg heeft langwerpige bel-achtige filamenten, die elk slechts uit één cel bestaan (zie figuur 2). Omdat *V. utricularis* hele grote cellen heeft, wordt deze soort onder meer gebruikt voor biofysisch onderzoek (Wang et al., 1993). Ecologisch gezien is er weinig bekend over *V. utricularis*. De levenscyclus is nog een vraagteken.



Figuur 2. Habitus *Valonia utricularis* (Olsen en West, 1988)

*Valonia utricularis* behoort tot het Siphonocladales-Cladophorales (S-C) complex. Verondersteld wordt dat de verspreiding van deze algen een Tethys imprint heeft. Het sluiten van de Tethys-zee (figuur 3) heeft de vroege equatoriale mariene biota gefragmenteerd. Met fylogenetische reconstructies gebaseerd op ITS-regio's toont Kooistra (1983) de Thetys imprint van de verspreiding van *Cladophoropsis membranacea* aan. Deze soort behoort ook tot het S-C complex.

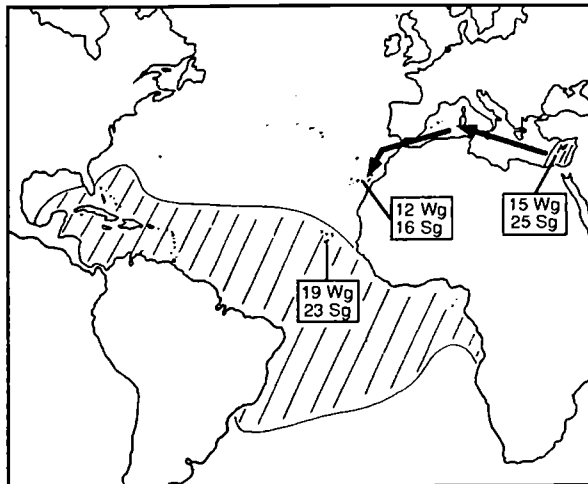


Figuur 3. Overzicht wereld delen en oceanen , 135 Ma geleden. De Thetys zee lag tussen de huidige Atlantische oceaan en de huidige Indo West Pacific en had een open verbinding met beide oceanen.

Tijdens de late-Mioceen (ongeveer 5,5 Ma geleden) onderging de aarde een wereldwijde afkoeling. Het zeewater niveau daalde. Dit heeft meegespeeld bij het ontstaan van een spectaculaire geologische gebeurtenis, namelijk de isolatie van de Middellandse zee van de wereld oceanen (Kennett, 1982). De Middellandse Zee droogde uit, waardoor zouten meren ontstonden. Omdat het extreme milieu leidde tot het uitsterven van de Middellandse Zee biota, wordt deze gebeurtenis de *salinity crisis* genoemd. Na ca. 0,5 Ma is de Middellandse Zee weer gevuld met water (Kennett, 1982). Vanuit de Atlantische Oceaan is de Middellandse Zee opnieuw gekoloniseerd. Verwacht wordt dat deze situatie weerspiegeld wordt in een cladogram van soorten die in de Atlantische oceaan en in de Middellandse Zee voorkomen.

De Middellandse Zee en het oosten van de Atlantische Oceaan zijn, na het hervullen van de Middellandse Zee, onderworpen aan verschillende glaciële en interglaciële periodes (Kennett, 1982). Tijdens het laatste glaciële maximum (18.000 jaar geleden) is een barrière van koud water ontstaan in het westelijke deel van de Middellandse Zee en het aanliggende Atlantische water (zie figuur 4) (Crowley en North, 1991; Pakker en Breeman, 1995).

Pakker en Breeman (1995) hebben vastgesteld dat binnen Atlantische isolaten van *V. utricularis* duidelijke ecotypische variatie voorkomt. Gebaseerd op eigen gegevens en paleoklimatische gegevens, stelde zij de volgende hypothese op over de evolutie van de ecotypen van de Middellandse Zee en de Canarische eilanden: Gedurende het laatste glaciële maximum hebben subtropische Atlantische populaties zich terug getrokken richting evenaar. Verder hebben koude-tolerante populaties deze ijstijd kunnen overleven in het oosten van de Middellandse zee. Warmere zeewater temperaturen van het huidige interglaciiaal (welke 10.000 jaar geleden is begonnen) hebben deze koude-tolerante populaties uit de Oostelijke Middellandse Zee een kans gegeven zich naar het westen te verpreiden. Door de *Canary current* heeft verspreiding vanuit de Middellandse zee naar de Canarische eilanden kunnen plaatsvinden (figuur 4).



Figuur 4. De mogelijke oorsprong van de ecotypen van de Middellandse Zee en de Canarische eilanden gebaseerd op de reconstructie van de glaciële zeewatertemperatuur. Zomer (Sg) en winter (Wg) oppervlakte isothermen 18.000 jaar geleden, gebaseerd op CLIMAP (1981). In de gearseerde gebieden konden koud-tolerante soorten overleven. De pijl geeft de mogelijke verspreidings route van deze soorten weer (Pakker en Breeman, 1995).

De ijstijden hebben een geringere invloed gehad op de zeewater temperaturen van de Pacifische oceaan dan op die van de Atlantische oceaan. Verder vormen de bijna onafgebroke rotskusten van de Pacifische oceaan weinig barrières voor migratie van bentische organismen. Deze gegevens wijzen op weinig extinctie en rekolonisatie van Pacifische biota (Bakker, 1995).

Op de vakgroep mariene biologie is veel onderzoek gedaan naar het S-C complex.



Momenteel wordt onderzoek gedaan naar de relaties tussen soorten van het S-C complex met behulp van 18S sequenties. Dit onderzoek naar de biogeografie van *V. utricularis* is een aanvulling hierop.

De hypothesen:

1) De verspreiding van *Valonia utricularis* heeft een Tethys imprint. In de fylogenetische reconstructie zal een scheiding te vinden zijn tussen Atlantische en Pacifische isolaten.

2) Na de salinity crisis is de Middellandse zee gekoloniseerd vanuit de Atlantische oceaan. Dit betekent dat de Middellandse zee isolaten in de fylogenetische reconstructie een monofyletische groep zullen vormen.

3) Na de laatste glaciële periode zijn de Middellandse zee en de Canarische eilanden gekoloniseerd vanuit het oosten van de Middellandse zee. In de fylogenetische reconstructie zullen de isolaten uit het oosten van de Middellandse zee een tak vormen met de overige Middellandse zee en Canarische isolaten als zustergroep.

## Materiaal en methoden

In tabel 1a zijn de verzamelplaatsen van de gebruikte *Valonia utricularis* isolaten aangegeven. De gebruikte verwante soorten en hun verzamelplaatsen staan in tabel 1b opgesomd. De unialgaal cultures werden gekweekt bij 25°C onder lange dag condities in een kwart PES (Provasoli verrijkt steriel zeewater) (Provasoli, 1966).

**Tabel 1a.** De *Valonia utricularis* isolaten die in deze studie werden gebruikt. Van elk isolaat is de verzamelplaats en de code van het isolaat aangegeven.

code isolaat	verzamelplaats
VUOJ	Japan
VU2582	China
VU-70C	Seychellen
VUF	Canarische eilanden
VUMEX	Yucatan, Mexico
VU1541	Israël
VU88E	Spanje, Middellandse Zee
VU1546	Tunesië
VU-TPa10	Kaapverdische eilanden

**Tabel 1b.** De verwante soorten van *Valonia utricularis* die in deze studie werden gebruikt. Van elk isolaat is de soort, de verzamelplaats en de code aangegeven.

code isolaat	soort	verzamelplaats
VM2628	<i>Valonia macrophysa</i>	Brazilië
VM CIC	<i>Valonia macrophysa</i>	Canarische eilanden
VF-563	<i>Valonia fastigiata</i>	Seychellen
VA-RZ	<i>Valonia aegagropila</i>	Rode Zee

### DNA extractie

Het DNA werd met de CTAB-methode uit bevroren materiaal (-80°C) geëxtraheerd. De CTAB-methode is ontwikkeld om DNA extracties te doen uit vers planten-materiaal (Doyle and Doyle, 1991). Door H. Klerk is deze methode aangepast voor het extraheren van DNA uit ingevroren algen-materiaal (niet gepubliceerd). Hiervoor werd een centrifugebuis met 10 ml CTAB extractiebuffer (2% w/v CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 8) voorverwarmd bij 60°C, achtereenvolgens werden toegevoegd 20 µl β-mercapto-ethanol en ongeveer 7,5 g plantenmateriaal. 30 minuten geïncubeerd bij 60°C, waarbij tussendoor de buis een paar keer goed werd geschud. Daarna werd een gelijk volume CIA (chloroform : isomyl alcohol 24:1) toegevoegd en werd de buis 15 minuten gecentrifugeerd bij 3000 rpm met een tafelf-centrifuge. De waterfase werd in een schone buis gepipetteerd. Aan de waterfase werd

koude isopropanol toevoegd (tweederde van het volume van de waterfase). Achtereenvolgens werd de centrifugebuis een uur bij 4°C gezet, 20 minuten centrifugeerd (10000 rpm met rotortype SS34 in een Sorvall -centrifuge). De pellet werd oplost in 500 µl 0,1×TE. 25 µl RNAse werd toevoegd. De oplossing werd gepipetteerd in een eppendorfcupje. 30 minuten bij 37°C gezet. 55 µl 4 M NaAc en 600 µl isopropanol werd toegevoegd, waarna het cupje voor ± 30 minuten bij -20°C werd geïncubeerd en 30 minuten afgedraaid in een eppendorfcentrifuge. De met de laatste stap verkregen pellet werd 2x gewassen met 80% EtOH en gedroogd in vacuümexicator en oplost in 200 µl 0,1×TE.

### PCR amplificatie

Dubbelstrengse amplificaties werden uitgevoerd in een Perkin-Elmer thermocycler, beginnend met een denaturatie-stap van 3 minuten bij 95°C, gevolgd door 27 cycli van 1 minuut bij 96°C, 2 minuten bij 50°C en 2 minuten bij 74°C. Deze 27 cycli werden gevolgd door een soakfile waarbij de Perkin-Elmer thermocycler een temperatuur van 10°C aannam. Het reactievolume was 100 µl en bevatte 8 µl DNA-oplossing (ongeveer 1ng DNA), 42 µl bidedst en 50 µl mastermix (200 µM dATP; 200 µM dTTP; 200 µM dCTP; 200 µM dGTP; 0,5 µM van elke primer; 10x reactie buffer (Promega Corp., Madison, WI); 2,5 eenheden Taq (polymerase, Promega kit); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> en 23 µl bidedst). In plaats van een annealing temperatuur van 50°C werd bij reacties, waar de amplificatie niet zo goed had gewerkt, een annealing temperatuur van 55°C geprobeerd. Om de rDNA regio's ITS1+ ITS2 te amplificeren werden twee primercombinaties gebruikt: ITS1 - ITS4 en TW81 - ITS4. Ook zijn de ITS1 en ITS2 fragmenten los van elkaar geamplificeerd met de primercombinaties ITS1 - ITS2 voor de regio ITS1 en ITS3 - ITS4 voor het amplificeren van ITS2. In tabel 2 geeft een overzicht van de primers en hun posities.

**Tabel 2.** De oligonucleotide primers die werden gebruikt voor het amplificeren en sequencen. SR = synthese richting, F = *forward*, R = *reverse*.

code	SR	sequentie	positie
ITS1	F	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	1788 18S
TW81	F	5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3'	1784 18S
ITS2	R	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'	30 5.8S
ITS3	F	5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'	30 5.8S
ITS4	R	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	52 26S

De amplificaties werden gecontroleerd op de juiste lengte, zuiverheid en voldoende opbrengst op een 1,5% agarose TAE gel (waaraan EtBr was toegevoegd) volgens de gebruikelijke methode (Sambrook et al., 1989). Voor het verwijderen van primers en nucleotiden uit de PCR producten werd de QIAquick PCR Purification Kit gebruikt (Qiagen, Hilden, Duitsland). De 44 µl gepurificeerde PCR producten waren voldoende voor minstens vier sequeunce reacties.

### Sequence reacties

Dubbelstrengse PCR producten werden volgens de Sanger methode gesequenced (Sambrook et al., 1989), gebruikmakend van 35S-dATP en de T-7 polymerase kit van Pharmacia.

De annealing mix bevatte 10 µl schoongemaakt template, 2 µl primer en 2 µl annealing buffer (kit). De 14 µl annealing mix werd in 3 min gedenateerd bij 95°C en werd onmiddellijk daarna voor 45 sec in ijswater gekoeld terwijl de cupjes werden bewogen. Labeling en terminatie stappen werden gedaan volgens de instructies van de fabrikant. Bij het sequencen zijn dezelfde primers gebruikt als bij de PCR amplificaties (zie tabel 2). Het elektroforesen werd gedaan volgens standaardmethodes; De 8% polyacrylamide-gradiënt-gel liep voor ongeveer 3½ uur bij een constant voltage van 1800 V (Sambrook et al., 1989). Achtereenvolgend werd de gel gefixeerd in een fixeerbad met een oplossing van 10% v/v azijnzuur en 10% v/v methanol, gedroogd en enkele dagen tot twee weken op een Fuji HR X-ray film geplaatst.

### Sequence alignment en analyses

Sequenties werden ingevoerd en aligned in het UWGCG software pakket (Devereux et al., 1984). De uiteindelijke alignments zijn uitgewerkt in het PAUP 3.1 programma (Swofford, 1990). Met dit computerprogramma werden ook de alignments geanalyseerd. Hiervan zijn de *most parsimony trees* (MPT) berekend. *Strict consensus trees* werden berekend uit de most parsimony trees. Bootstap analyses zijn uitgevoerd met 1000 replica's per keer. De bootstap analyses werden berekend om de statistische kracht van het alignment te kunnen inschatten.

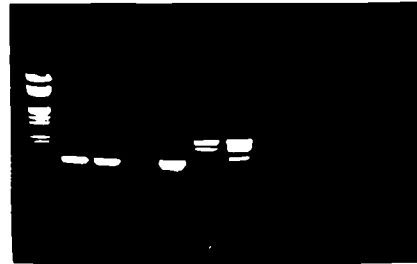
## Resultaten

### DNA extractie en amplificatie ITS regio's

Van elk isolaat is voldoende geïsoleerd DNA verkregen om te amplificeren. DNA van *Valonia utricularis* Mex, verzameld op de locatie Yucatan Mexico, was een gift van Dr. R. Zechmann. Het amplificeren van ITS1 en ITS2 is niet bij alle isolaten gelukt. Van de volgende isolaten kon het ITS1-ITS2 niet geamplificeerd worden:

- *V. utricularis*, locatie China
- *V. utricularis*, locatie Japan
- *V. aegagropila*, locatie Rode zee
- *V. aegagropila*, locatie Bahamas
- *V. macrophysa*, locatie Brazilië

Eén van de problemen was dat bij het controleren van de amplificaties bij enkele isolaten in plaats van één band enkele banden zichtbaar werden op de gel. Een voorbeeld is te zien in figuur 5.



Figuur 5. geamplificeerde ITS1 - ITS2 fragmenten. De fragmenten uit de eerste, tweede en vierde baan kunnen worden gesequenced. In de derde baan is een amplificatie mislukt, in de vijfde en zesde baan zijn dubbele banden te zien.

### Sequencen

Van de volgende isolaten kon de sequentie niet afgelezen worden van de film:

- *V. utricularis*, locatie Seychellen
- *V. fastigiata*, locatie Seychellen

Bij het Mexicaanse isolaat is de sequence-reactie met de primer ITS4 mislukt, waardoor slechts 88 nucleotiden van ITS2 bekend zijn.

### Sequence alignment en analyse

De *contig* van *V. utricularis* afkomstig van de Kaap Verdische eilanden kon niet worden *aligned* met de overige *V. utricularis* isolaten. Slechts een acht basen lange sequentie in de 5.8S regio en één tandem herhaald motief kwamen overeen. Deze *contig* is bij de onderstaande resultaten niet meer in beschouwing genomen.

De *aligned* dataset van ITS1 is 416 basen lang. Bij het sequencen van ITS2 zijn de laatste nucleotiden van de 5.8S regio ook gesequenced. ITS2, inclusief dit stuk 5.8S-DNA, is 433 basen lang. De *aligned* dataset van *V. utricularis* heeft in ITS1 tien variabele *sites* en in ITS2 19 variabele sites. In bijlage 1 is de *aligned* dataset weergegeven.

Opvallend in het alignment zijn de vele tandem gerangschikte herhalingen (*repe-*

ats). Dit zijn de sequenties GGCCT, GCT, GGC, GCA, GGA, TAC, AG, TA, GT en GC. Het aantal keren dat één van deze sequenties werd herhaald varieert tussen de isolaten, daarom werden gaps in het alignment geïntroduceerd.

Drie *parsimony* analyses werden gebruikt:

- 1) De *gaps* werden niet meegenomen in de analyse.
- 2) De *gaps* werden in de berekeningen als vijfde base meegenomen.
- 3) Aan het alignment werd een gapanalyse toegevoegd. Een gapanalyse werd gedaan om de variabiliteit van de tandem gerangschikte herhalingen tussen de isolaten mee te nemen in de berekeningen. Deze herhalingen leken op het oog de grootste verschillen tussen de isolaten weer te geven. Bij deze analyse werden de verschillen in grootte van de *gaps* gecodeerd. In het totaal zijn er 70 *gaps* in de alignments van ITS1 en ITS2 gevonden. De gapanalyse maakt het totale alignment dus 70 karakters langer. Tijdens de analyse werden de *gaps* zelf op de zelfde wijze behandeld als de missende data (= '?').

Uit de eerste *parsimony* analyse kwamen drie most *parsimony* trees (MPT) met elk 69 stappen (figuur 6 a,b,c). De verdeling van de boomlengtes (de 'g1') ligt schuin naar links en heeft een waarde van -0,947. Dit duidt op een relatief goed fylogenetisch signaal (Hillis and Huelsenbeck, 1992). De gegevens van de MPT's staan in tabel 3. Bij elk van de bomen is de outgroup *V. macrophysa* een zustergroep van alle *V. utricularis* isolaten. Dit geeft aan dat de *V. utricularis* isolaten monofyletisch zijn. De *decay value* (>5) van de *V. macrophysa* tak geeft aan dat deze stabiel is. De isolaten uit Mexico, Spanje en Fuerteventura staan in elke boom op en andere plaats. De *decay value* van deze takken is slechts twee. De isolaten uit Tunesië en Israël zijn in elke boom de zustergroep van de isolaten Mexico, Spanje en Fuerteventura.

**Tabel 3.** De gegevens van de most *parsimony* trees van de drie analyses. analyse 1 = zonder *gaps*, analyse 2 = *gap* als vijfde base, 3 = met gapanalyse. g1 = verdeling boomlengtes, CI = consistency index, RC = rescaled consistency index.

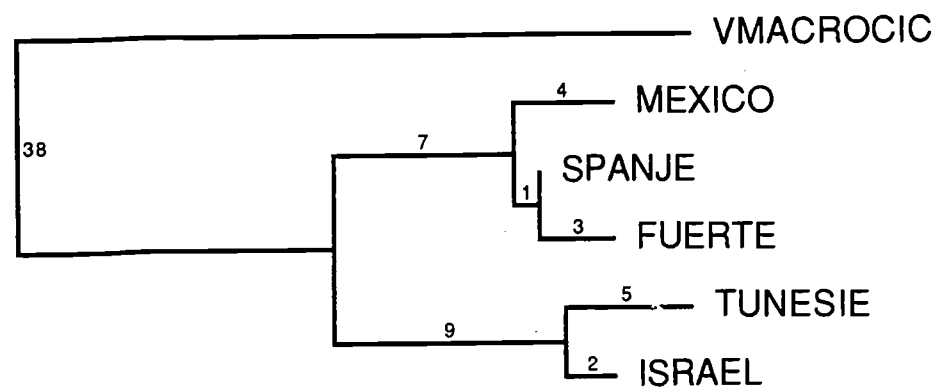
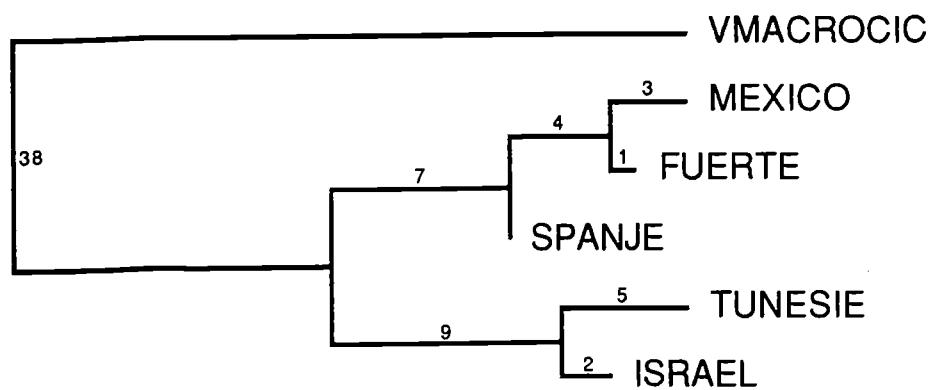
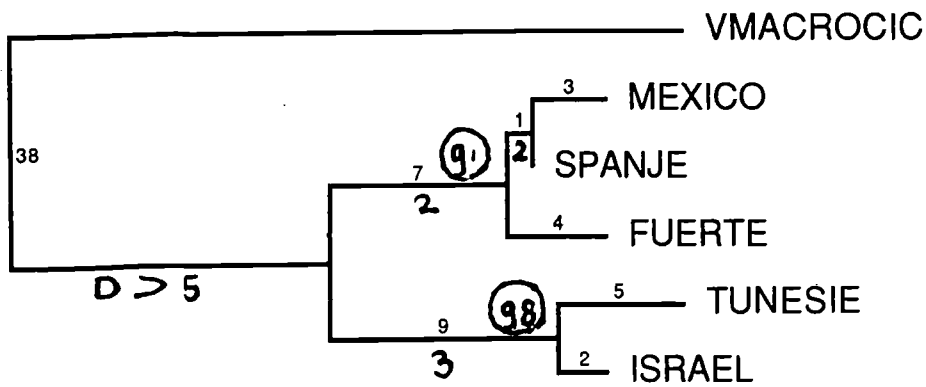
	analyse 1	analyse 2	analyse 3
aantal MPT's	3	2	3
aantal stappen MPT	69	291	162
g1	- 1,085	- 0,947	- 0,902
CI	0,986	0,938	0,951
RC	0,875	0,613	0,679
aantal MPT's + 1 stap	3	5	3
aantal MPT's + 2 stap	10	8	7

De tweede *parsimony* analyse (*gap* als vijfde base) laat twee MPT's zien met 291 stappen (Figuur 7). De *V. utricularis* isolaten vormen een monofyletische boom. In figuur 7a ligt de tak Tunesië-Israël aan de basis van de boom. In figuur 7b is deze tak te vinden in de top van de boom. Zulk een verschil komt tot stand als in het PAUP

programma de ene keer een gap (een 'vijfde' base) als basis wordt genomen en een base als verandering wordt gezien (figuur 7a) en de andere keer een base als basis wordt genomen en een gap als mutatie wordt gerekend (figuur 7b). De tak Tunesië-Israël is zeer stabiel (decay value >5). De takken met Mexico, Spanje en Fuerteventura daarentegen vallen met een stap meer al in elkaar tot een polytomie.

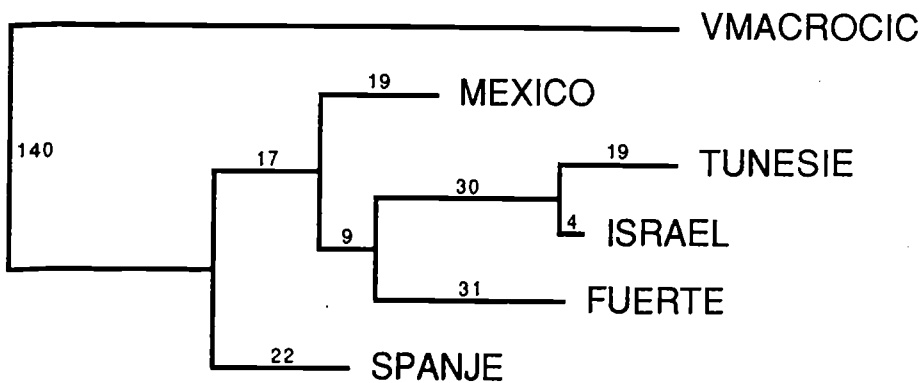
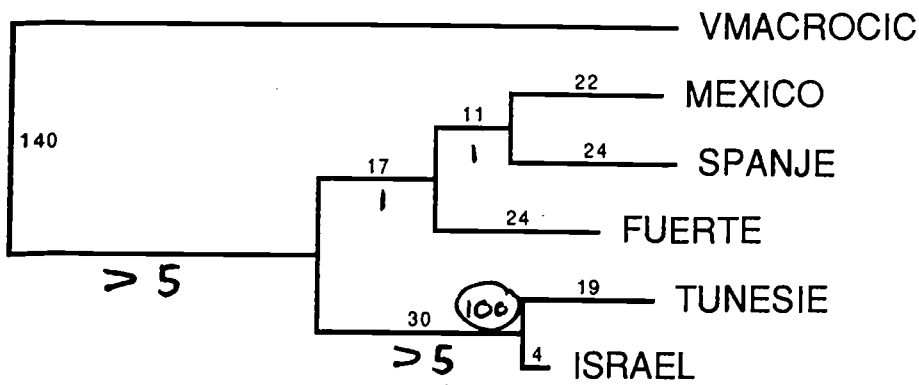
De resultaten van de derde parsimony analyse (met gapanalyse) zijn drie MPT's met elk 162 stappen (figuur 8 a,b,c). Ook in deze MPT's vormen de *V. utricularis* isolaten een monofyletische groep. De Tunesië-Israël tak is zeer stabiel en heeft een decay value van meer dan 5. De zustergroep van de Tunesië-Israël tak bestaat uit de isolaten uit Mexico, Spanje en Fuerteventura. De bomen verschillen van elkaar in de plaatsen waar deze drie isolaten in de boom te vinden zijn. Bij een boom met twee stappen meer dan de MPT is deze groep reeds een polytomie.

Alle analyses geven de zelfde samenvattende boom (consensus tree). Deze is weergegeven in figuur 9. Dit figuur laat een monofyletische boom zien met een polytomie en één zustergroep, de Tunesië-Israël tak.

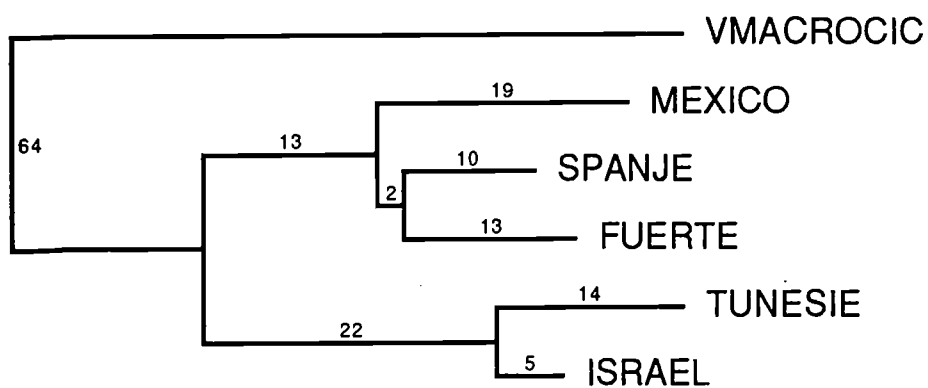
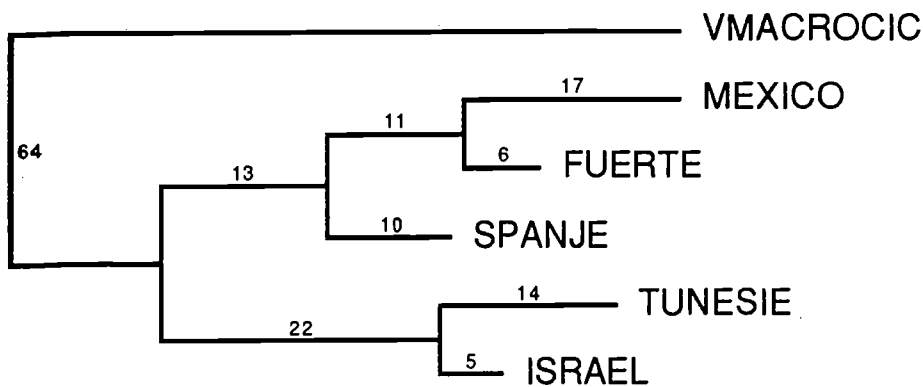
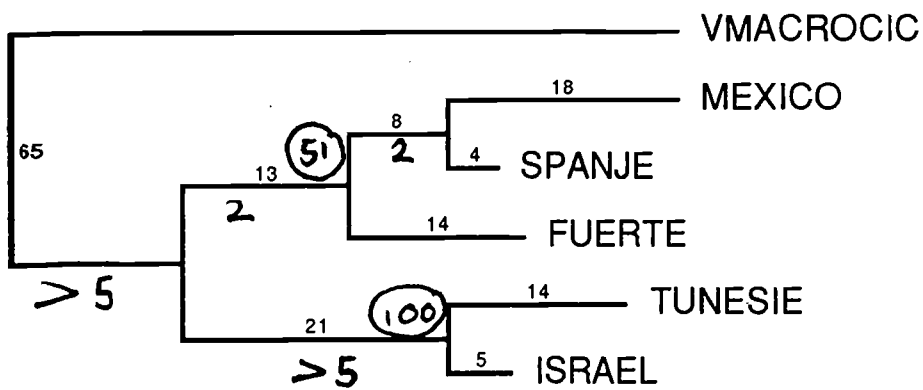


Figuur 6 a, b, c. Most parsimony trees van *Valonia utricularis*, verkregen met analyse 1. De outgroup is *Valonia macrophysa* (= VMACROCIC). Fuerte = Fuerteventura, Canarische eilanden. De nummers boven de lijnen zijn het aantal nucleotiden veranderingen. De nummers onder de lijnen zijn decay values. De nummers in de cirkels zijn de bootstapwaardes. De bootstapwaardes kleiner dan 50 zijn niet aangegeven.

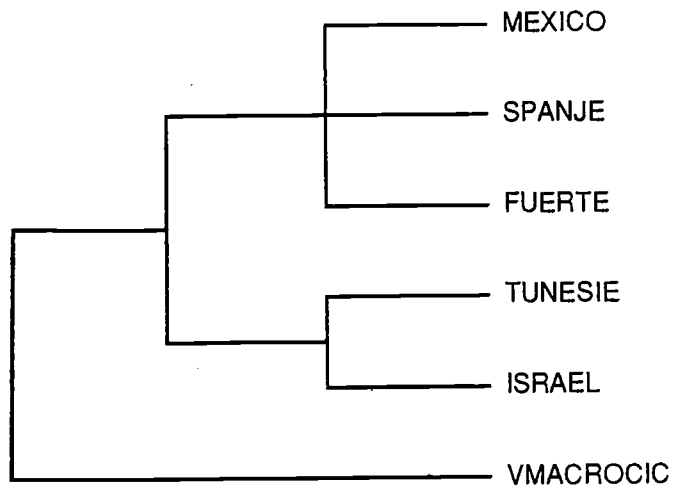




Figuur 7a, b. Most Parsimony trees van *Valonia utricularis* verkregen met analyse 2. *Valonia macrophysa* (= VMACROCIC) is de outgroup. FUERTE = Fuerteventura, Canarische eilanden. De nummers boven de lijnen zijn het aantal nucleotiden. De nummers onder de lijnen zijn decay values. De nummers in de circels zijn de bootstrapwaarden. De bootstrapwaarden kleiner dan 50 zijn niet aangegeven.



Figuur 8a, b, c. Most Parsimony trees van *Valonia utricularis* verkregen met analyse 3. De outgroup is *Valonia macrophysa* (= MACROCIC). FUERTE = Fuerteventura, Canarische eilanden. De nummers boven de lijnen zijn het aantal nucleotiden veranderingen. De nummers onder de lijnen zijn decay values. De nummers in de circels zijn de bootstapwaarden. De bootstapwaarden kleiner dan 50 zijn niet aangegeven.



Figuur 9. De samenvattende boom van de most parsimony trees van elk van de drie analyses.

## Discussie en conclusies

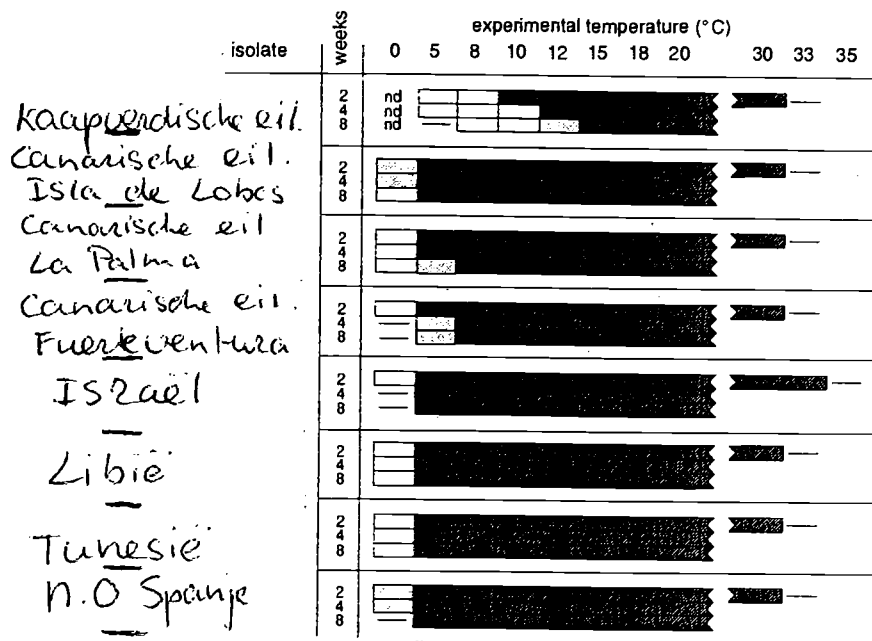
Om te onderzoeken hoe de verspreiding van *Valonia utricularis* tot stand is gekomen, zouden de rDNA regio's ITS1 en ITS2 van *V. utricularis* isolaten uit de Atlantische Oceaan, de Middellandse Zee en de *Indo-West Pacific* worden gesequenced en verwerkt in een cladogram. De ITS sequenties van de isolaten uit de Indo-West Pacific zijn niet verkregen. Ook van verschillende isolaten van verwante soorten zijn geen gegevens verkregen. De specifieke oorzaken voor het mislukken van deze proeven zijn niet aangetoond.

De ITS sequenties van *V. utricularis* laat een alignment zien met vele tandem herhaalde motieven. Er was veel variatie tussen de isolaten in het aantal herhalingen van deze motieven. Om een passend alignment te maken moesten op deze plekken en op plekken waar andere *insertions/deletions* (*indels*) zijn ontstaan gaps worden geïntroduceerd. Verondersteld wordt dat het ontstaan van de repeats en indels wordt veroorzaakt door zogenaamde *slipped-strand mispairing events* tijdens de DNA-replicatie (Levinson en Gutman, 1987). Bij het maken van het alignment en dus bij het introduceren van gaps, gaven de repeats en indels al een idee over de relaties tussen de verschillende isolaten. Omdat de indels belangrijke verschillen en overeenkomsten tussen de contigs leken weer te geven, is onder andere een analyse gedaan waarbij de grootte van de gaps is meegenomen. Dit is de analyse met 'gapanalyse' (analyse 3, zie resultaten).

De MPT's die werden verkregen met de analyses 'zonder gaps' en 'met gapanalyse' hebben dezelfde topologie (figuren 6 en 7). Dit geeft aan dat de veranderingen, die tussen de nucleotiden zijn ontstaan, al een goed beeld geven over de relaties tussen de isolaten. Door de gapanalyse aan deze 'basis'analyse ('zonder gaps') toe te voegen worden echter de stabiele takken stabiel terwijl de labiele tak met Mexico, Fuerteventura en Spanje labiel wordt. Dit komt door het toevoegen van meer gegevens over de isolaten aan het alignment. In deze discussie worden de MPT's verkregen met de analyse met 'gapanalyse' verder behandeld.

De MPT's (figuur 8a, b, c) laten een stabiele Oost-Zuid Middellandse zee groep zien, namelijk de Tunesië-Israël tak. Deze tak vormt een zustergroep van de overige *V. utricularis* isolaten. De interpretatie van deze gegevens kan overeenstemmen met de veronderstellingen van Pakker en Breeman (1995). Na de laatste ijstijd zouden vanuit het zuiden van de Middellandse Zee de rest van de Middellandse Zee en de Canarische eilanden gekoloniseerd zijn (zie figuur 4). In een cladogram zouden de isolaten uit het zuiden van de Middellandse Zee een zustergroep vormen van de overige Middellandse Zee en Canarische eilanden isolaten. Tunesië ligt niet in het, op figuur 4 aangegeven, gearceerde gebied. *V. utricularis* kan overleven bij 5°C (Kaapverdisch isolaat uitgezonderd) (zie figuur 10). Hierdoor is het goed mogelijk dat *V. utricularis* in de kustwateren van Tunesië de watertemperaturen van de laatste ijstijd heeft kunnen overleven (Pakker, mondeling).

De zustergroep van de Tunesië-Israël tak bestaat uit de isolaten uit Mexico, Spanje en Fuerteventura. Dat Spanje en Fuerteventura samen vallen komt ook overeen met de veronderstellingen van Pakker en Breeman (1995), dat na de laatste ijstijd de Middellandse Zee en de Canarische eilanden geherkoloniseerd zijn vanuit het zuiden van de Middellandse Zee.



figuur 10. Tolerantie van lage en hoge temperaturen in *Valonia utricularis* isolaten. Donker gestreep = niet beschadigd; gestippeld = licht beschadigd (<50%); open vakje = zwaar beschadigd (>50%); streep = dood (Pakker en Breeman, 1995).

Doordat Mexico in één tak te vinden is met de Spaanse isolaat en het isolaat uit Fuerteventura, vormen de Middellandse zee isolaten geen monofyletische groep. Mexico is in de cladogrammen te vinden in de top van de boom. Dit was zeker niet verwacht. Verwacht werd dat in de cladogrammen naar voren zou komen dat de Middellandse Zee populaties na de salinity crisis vanuit de Atlantische Oceaan geherkoloniseerd zijn. Deze hypothese kan aan de hand van de gevonden cladogrammen niet worden verworpen of worden bevestigd. Mexico in de top van de boom geeft meer een idee van verspreiding vanuit de Middellandse Zee naar de Cariben. Wijst dit op recente verspreiding?

Over de eerste hypothese, dat de verspreiding van *V. utricularis* een Tethys imprint heeft, kan geen uitspraak worden gedaan. De beschikbare gegevens bevatten geen contigs van de Pacifische Oceaan. Hierdoor konden de ITS-sequenties van de isolaten uit de Atlantische Oceaan niet worden vergeleken met die van de Pacifische oceaan.

Misschien is *V. utricularis* wel niet zo oud als wordt verondersteld en kunnen de hypothesen hierdoor niet worden bevestigd. Dit zal dan inhouden dat de gebeurtenissen waarop de hypothesen zijn gebaseerd te lang geleden hebben plaatsgevonden om invloed op de verspreiding van *V. utricularis* te hebben gehad. Om dit uit te zoeken moeten eerst gegevens worden

verzameld die aanwijzingen kunnen geven omtrent de mogelijke Tethys imprint van de verspreiding van de soort.

In het alignment zijn slechts twee isolaten uit de Atlantische Oceaan te vinden (Mexico en Fuerteventura). De ITS-sequenties van het Kaapverdische isolaat waren makkelijk te verkrijgen. De contig kon echter niet worden aligned met de overige contigs. Dit geeft het idee dat dit isolaat een ander soort vertegenwoordigt. Wat nog wordt versterkt met de volgende punten:

-Het DNA van het Kaapverdische isolaat is verkregen uit een alg die is verzameld bij Praia, Santiago, Kaapverdische eilanden. In het laboratorium is deze alg uniaalgaal opgekweekt. In het laboratorium heeft deze alg andere morfologische kenmerken dan de overige *V. utricularis* isolaten.

-Dit zelfde isolaat is door Pakker en Breeman (1995) gebruikt voor het onderzoek naar temperatuurtolerantie van tropische tot warm-gematigde macroalgen. Figuur 10 geeft de gevonden tolerantie temperaturen weer van enige *V. utricularis* isolaten, waaronder het Kaapverdische isolaat. Het limiet van de lage temperatuur tolerantie ligt bij het Kaapverdische isolaat veel hoger. Dat de andere isolaten lagere temperaturen kunnen overleven wordt door Pakker en Breeman (1995) toegeschreven aan ecotypische differentiatie. Dit als gevolg van koud water adaptatie van de, tijdens de laatste ijstijd, geïsoleerde populaties in het oosten van de Middellandse Zee.

Het is geen nieuw gegeven dat de Kaapverdische macroalgen flora een afgescheiden en individuele positie heeft. Dit is al bekend uit studies over de relatie van de Kaapverdische macroalgen flora met de macroalgen flora van omliggende gebieden (Prud'homme van Reine en van der Hoek, 1988).

ITS-sequenties van meer isolaten zal een beter beeld van de historische biogeografie van *V. utricularis* geven. Zoals al eerder gezegd moet eerst worden onderzocht of de verspreiding van deze soort een Tethys imprint heeft.

## **Een dankwoord**

Hierbij wil ik Rick Zechman hartelijk danken. Van hem kreeg ik het DNA van het Mexicaanse *Valonia utricularis* isolaat.

Verder wil ik Stella Boele-Bos, Jeanine Olsen en Wytse Stam bedanken voor het begeleiden van mijn eerste afstudeeronderwerp.

## Literatuur

- Bakker, F.T., Olsen, J.L., Stam, W.T., van den Hoek, C. 1992. Nuclear rDNA internal transcribed spacer regions (ITS1 and ITS2) define discrete biogeographic groups in *Cladophora albida* (chlorophyta). *J. Phycol.* 28: 839-845.
- Bakker, F.T. 1995 *Time Spans and Spacers: Molecular Phylogenetic explorations in the Cladophora Complex (Chlorophyta) from the perspective of rDNA gene and spacers sequences*. Ponsen en Looijen BV, Wageningen.
- Crowley, T.J. and North, G.R.V. 1991. *Paleoclimatology*. Oxford university press, New York.
- Devereux, J., Haeberli, P. And Smithies, O. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nuc. Acids Res.* 12: 387-395.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1991. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus* vol 12 no. 1.
- Futuyama, D. J, 1986. *Evolutionary biology*. Sinauer associates, Inc., Sunderland.
- Gerbi, S.A. 1985. Evolution of Ribosomal DNA. In: MacIntyre, R.J. (Ed). *Molecular Evolutionary Genetics*. Plenum Press, New York, pp 419-517.
- Hillis, D.M., Huelsenbeck, J.P. 1992. Signale noise, and reliability in molecular phylogenetic analyses. *J. Hered.* 83: 189-195.
- Kennett, J.P. 1982. *Marine Geology*. Pentice-Hall, Inc, Engle-wood cliffs.
- Kooistra, W.H.C.F., Stam, W.T., Olsen, J.L., van der Hoek, C. 1992. Biogeography of *Cladophoropsis membranacea* based on comparisons of nuclear rDNA ITS sequences. *J. Phycol.* 28: 660-668.
- Kooistra, W.H.C.F. 1993. *Historical biogeography in tropical Atlantic populations of Cladophoropsis membranacea and related species*. Van Denderen, Groningen.
- Levinson, G, Gutman, G. A., 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4: 203-221.
- Manhart, J. R., McCourt, R. M., 1992. Molecular data and species concepts in the algae. *J. Phycol.* 28: 730-737.
- Olsen, J. L., West, J. A., 1988. *Ventricaria* (Siphonocladales-Cladophorales complex, Chlorophyta), a new genus for *Valonia ventricaria*. *Phycologia* 27: 103-108.
- Oppen, van, M.J.H. 1995. *Tracking Trails by Cracking Codes*. Ponsen en Looijen B.V., Wageningen.
- Pakker, H. and Breeman, A.M. 1995. Temperature responses of tropical to warm temperate atlantic seaweeds. II evidence for ecotypic differentiation in amphi-atlantic tropical-mediterranean species. *Eur. J. Phycol.*
- Provasoli, L. 1966. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: Watanabe, A. and Hatterri, A. (Eds) *Cultures and Collections of Algae*. Proc. US-Japan Conf., Jap. Soc. Plant Physiol., Hakone, pp63-75.
- Prud'homme van Reine, W. F., and Hoek, van den, C., 1988. Biogeography of Capeverdean seaweeds. *Cour. Forsch.-Inst. Seckenberg* 105: 35-49.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 3 vols.
- Wang, J., Zimmermann, U., Benz, R. 1993. The voltage-dependent step of the chloride transporter of *Valonia utricularis* encounters a Nernst-Planck and not an Eyring type of potential energy barrier. *Biophys. J.* vol 64 no. 4 pp 1004-1016.



**Bijlage 1.** Het totale alignment van ITS1 en ITS2 van *Valonia utricularis*.

```
#nexus
begin data;
dimensions ntax=7 nchar=920;
format missing=? gap=. interleave datatype=dna;
matrix
```

```
[ ITS1 49]
KAAPUERDE ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??????????
UMACROIC ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??????????
MEXICO ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ???TCCCTAG
SPANJE CCACGTGAGC TCTCAGCACG ACTAGACACC ACAAGCCCTC GCTTCCCTAG
TUNESIE ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??????????
ISRAEL ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??????????
FUERTE ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??????????
```

```
[ 50 99]
KAAPUERDE ??TCCGCGGC CAGGTCCCCA GCGGTGGCAT GTCACCCGTT GGCCGG.TCA
UMACROIC ?????????? ???????GCGT CC.,GTGGGT GCNCCACCCG TTGGCTGGGT
MEXICO ACTATATATT GTTGTGCGGT CCCGGTGGGT GCSCCACCAG TTGGCTGGGT
SPANJE ACTATATATT GTTGTGCGGT CC.,GTGGGT GCGCCACCAG TTGGCTGGGT
TUNESIE ?????????? ?????????? ???????GCGT GCGCCACC.G TTGGCAGGGT
ISRAEL ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??????????
FUERTE ?????????? ?????????? ???????GCGT NCNCCACC.G TTGGCTGGGT
```

```
[ 100 149]
KAAPUERDE GCCGTGAGCA TATCTTTTGC TGCAGCTGGT CCCGTGCCCC TAGTGCCATT
UMACROIC CG.,GGGTT TGATCCCAAG CCTCG...TG GTCCCAAGCC GTTTTGCCAT
MEXICO CGTCTGGGGT TGATCCCAAG CCTCCTCATG GTCCCAAGCC GTTTKGCCAT
SPANJE CGTCTGGGGT TGATCCCAAG CCTCCTCATG GTCCCAAGCC GTTTTGCCAT
TUNESIE CGTCTGGGGT TGATCCCAAG CCTCCTCATG GTCCCAAGCC GTTTTGCCAT
ISRAEL ?????????? ?????CCCAAG CCTCCTCANN NN.CCAAGCC GNNNNGCCAT
FUERTE CGTCTGGGGT TGATCCCAAG CCTCCTCATG GTCCCAAGCC GTTTTGCCAT
```

```
[ 150 199]
KAAPUERDE TGTGCCCGC CGCGCAGGC TTGCATCCAA GGACCGCATT GCACCACCAG
UMACROIC ACGTGCCT.C GCAACAGTA AGCCTGGCCT GGCCRC....
MEXICO ACGTGCCTGC GCAACAGTN ,GCCTGGCCT GGCCTGGCCT GGC....TA
SPANJE ACGTGCCT.C GCAACAGTA AGCCTGGCCT GGCCTGGCCT GGC....TA
TUNESIE ACGTGCCT.C GCAACAGTA AGCACAGCCT GSCCTGGCCT GGCC....A
ISRAEL ACNNGCCT.C GCAACAGTA AGCACAGCCT GGCCTGGCCT GGCC....A
FUERTE ACGTGCCT.C GCAACAGTA AG....CCT GGCCTGGCCT GGCCTGGCTA
```

```
[ 200 249]
KAAPUERDE CCTCGCTGCA CGCTCGCGTC CAACCCAGCT CTCTGGGTTT GGTATTAAGC
UMACROIC ..AATAACTG GCTGG.T..T TGGAGCTTAG CGG.TGCACT .GGCTAGAGA
MEXICO GAA??????? ?????CTGGT TGGAGCTTAG CGGGTGCCT CGGCTAGAGA
SPANJE GAAATAACTG GCTGGCTGGT TGGAGCTTAG CGGGTGCCT .GGCTAGAGA
TUNESIE AAAATAACTG GCTGGCTGGT TGGAGCTTAG CGGGTGCCT .GGCTAGAGA
ISRAEL AAAATAGCTG GCTGGCTGGT TGGAGCTTAG CGG.TGCACT .GGCTAGAGA
FUERTE GAA.TAACTG GCTGGCTGGT TGGAGCTTAG CGGGTGCCT .GGCTAGAGA
```

```
[ 250 299]
KAAPUERDE GCGGCRATG GGGTTGTGTG TGTGTG.GTG CAGTGGACGC GAGCTGGCNG
UMACROIC TATATGCTTG CCTGCACTCT CATGTGTGTG TGTGTGTGTC TTT.AGNNG.
MEXICO TATACATA.. ....TACTCT C.TGTGTGTG TGTGTGTGTC TTTWAGCCGT
SPANJE TATACATA.. ....TACTCT C.TGTGTGTG TGTGTGTGTC TTT.AGCCG.
TUNESIE TATACAC... ....TACTYT CGTGTGTGTG TGTG...TC TTT.AGCCG.
ISRAEL TATACAC... ....TACTCT CGTGTGTGTG TGTGTG..TC TTT.AGCCG.
FUERTE TATACATA.. ....TACTCT C.TGTGTGTG TGTGTGTGTC TTT.AGCCG.
```

```
[ 300 349]
```

KAAPVERDE GCGTGTACT GGCTGGTTTG ACGCGTCCCC WAGGTTGGAT GTCCACCAGC  
 UMACROCI C GAGGGGGCTG CT.GCT.GCT NN.GCTGCTA GCTAGCTCTG CTGMGGC.GG  
 MEXICO GAKKGGGCTG CTTGCTTGCT CTAGCTGCTG CTC..... .WWWGCTTG  
 SPANJE GAGGGGGCTG CT.GCT.GCT CT.GCTGCTG CTC..... .TTTGCT.GC  
 TUNESIE GAGGGGGCTG CT.GCT.GCT CT.GCTGCTG CTC..... .TTTGCT.GC  
 ISRAEL GAGGGGGCTG CT.GCT.GCT CT.GCTGCTG CTC..... .TTTGCT.GC  
 FUERTE GAGGGGGCTG CT.GCT.GCT CT.GCTGCTG CTC..... .TTAGCT.GC

[ 350 409 ]  
 KAAPVERDE GGTAAGCGGC AGCAGGAGAA ACTAGCGGCC GGAGGTAAGA AGCTTTTGCT TCCCAC????  
 UMACROCI C GCGGGCGGCC GCMGTTACCA ...CCCTCCA AGCCATCAAC ACATCATTAA ACAACTGTAA  
 MEXICO GCGGGCGGTY Y????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??????????  
 SPANJE GCGGGCGGTC GCCGTTACCA CCACCCTCCA AGCCAACAAC ACATCATTAA ACAACTGTAA  
 TUNESIE GCGGGCGGTC GCCGTTACCA CCACCCTCCA AGCCAACANC ACATCATTAA ACAACTGTAA  
 ISRAEL GCGGGCGGTC GCCGTTACCA CCACCCTCCA AGCCAACAAC ACATCATTAA ACAACTGTAA  
 FUERTE GCGGGCGGTC GCCGTTACCA CAACCCTCCA AGCCAACA?? ?????????? ??????????

[ 410 416 ]  
 KAAPVERDE ??????  
 UMACROCI C CAGATG  
 MEXICO ??????  
 SPANJE CAGG??  
 TUNESIE CAGG??  
 ISRAEL CAGGA?  
 FUERTE ??????

[ 5.8S 466 ]  
 KAAPVERDE ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ?AGCGATCBA  
 UMACROCI C ?????????? ???CCGGGT TCCTGS.GA. .TGTCTGCCT CAGCG.TCGA  
 MEXICO ?????????? ?????????? ?????????? .TGTCTGCCT CAGCT.TC.A  
 SPANJE AACGCATATT GCCCGGGNN TCCTGS.GM. .TGTCTGCCT CAGCG.TCGA  
 TUNESIE ?????????? ???CCGGDK T...GCTGCG NTGTGCKGST CAGCG.TCGA  
 ISRAEL ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??????????  
 FUERTE ?????????? ?????????? ?????????? ??????TGCT CAGCG.TCGA

[ 5.8S \* ITS2 516 ]  
 KAAPVERDE TATCCTNGGC GYTTGCCACT CTCCCAGCCG GTCGYGCGAC GCGGGGCGGN  
 UMACROCI C ...TTTCCTT ATGGCTCTGC GGAT.TGGCT CTTGCAGCAG C...GCGCAC  
 MEXICO KAATTTCTT AKKKCTCTBC SGAT.TGGCT CTTGCAGCAG CAGCA.GCAC  
 SPANJE ...TTTCCTT ATGGCTCTGC GGATCTGGCT CTTGCAGCA. ....  
 TUNESIE ...TTTCCTT ATGGCTCTGC GGAT.TGGCT CTTGCAGCAG CAGCGCGCAC  
 ISRAEL ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ?????GCGCAC  
 FUERTE ....NTCCTT ATGGCTCTGC GGAT.YGGCT CTTGCAGCAG CAGCGCGCAC

[ 517 566 ]  
 KAAPVERDE TGANTTCCCG ANANTTGGCT CTTGCAGCAG CGCCATTCCC TATTGCATGA  
 UMACROCI C ...AGCAGC. AGCAGCAGCA ...TGGGCTG ARGTTTGCAA GGTTACA.GG  
 MEXICO AACHGMAGCC AGCAG.AG.A GC????????? ?????????? ??????????  
 SPANJE ..... .GAGCA GCATGGGCTG ARGTTTGCAA GGTTACA.GG  
 TUNESIE AACAGCAGCC AGCAGCAGCA GCATGGGCTG ARGTTTGCAA GGTTACA.GG  
 ISRAEL AACAGCAGCC AGCAGCAGCA GCATGGGCTG ARGTTTGCAA GGTTACA.GG  
 FUERTE AGCAGCAGC. AGCAGCAGCA ...TGGGCTG ARGTTTGCAA GGTTACAAGG

[ 567 616 ]  
 KAAPVERDE GCTGAGTAG GTCCAGGCC TTGSATGCAG CGTTTCGACC GCGCTCGCC  
 UMACROCI C CGGCGACAC. AGCGTGTGTG TNKKKKAACA CAGCAGCAGC AGCA.....  
 MEXICO ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??????????  
 SPANJE CGGCGACACG AGC.GAAGGA ACAGCCAGCA ..GCAGCAGC AGCGTCGTAA  
 TUNESIE CGGCGACACG AGCGGA.GGA ACAGC.AGCA CGGCAGGAGC GTCG...TAA  
 ISRAEL CGGCGACACG AGCGGA.GGA ACAGC.AGCA ..GCAGCAGG AGCGTCGTAA  
 FUERTE CGGCGACACG AGCGGA.GGA AC...AGCA ..GCAGCAGC AGCGTCGTAA

```

[ 617 665]
KAAPUERDE AACGCGCATT GTGGCGGCGA CTGGCTAACC CTCATCCATC CCCAGCGGBG
UMACROIC . . . . . GCTT?? ?????????? ?????????? ???AAC..
MEXICO ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??????????
SPANJE ATA.CACAGC GCGCGCTTGC T..CTACTAC TACTTTC..G CTAARCCG.
TUNESIE ATAACACAGC GCGC..TTGC TTGCT....C TACTTTCTCG CTAARCCG
ISRAEL ATAACACAGC GCGC..TTGC TTGCT....C TACTTTCTCG CTAARCCG
FUERTE ATA.CACAGC GCGCGCTTGC T..CTACTAC TACTA..TCG CTAARCCG.

```

```

[ 666 716]
KAAPUERDE TTTGGCATGG GTAGGCCTGC CTCATGGGAM CCAGACACGG GGGTTTCTTA
UMACROIC .GCTGGCCGT CAGTAGCCAA ..GAAAGTGG CCA.CCGACT GCT...MGAC
MEXICO ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??????????
SPANJE ..CTGGCCGT CAGTAGCCAA .CGAAGTGG CCA.CCGACT GCTTCTCGAC
TUNESIE CGCTGGCCGT CAGTAGCCAA ACGAAGTGG CCAACCGACT GCTTC..GAC
ISRAEL CGCTGGCCGT CAGTAGCCAA .CGAAGTGG CCA.CCGACT GCTTC..GAC
FUERTE ..CTGGCCGT CAGTAGCCAA .CGAAGTGG CCA.CCGACT GCTTCTCGAC

```

```

[ 717 766]
KAAPUERDE CGTSAGTTAC GTGCAGCAGC GGGGTTGTTG GTTTSTCAGC CCGGCTCAGC
UMACROIC CCCC.TCGT. .,GGTCTGGG CA.CGTCAGC TMACGGATC AGTACAACA
MEXICO ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??????????
SPANJE CC...TCGT. GGGGTCTGGG CA.CGTCAGC TCGCGGATC AGTMCAARCC
TUNESIE ACCCCTCGTT GGGGTCTGGG CAACGTCAGC TCGCGGATC AGTAGAAR.
ISRAEL CCCC.TCGTT GGGGTCTGGG CA.CGTCAGC TCGCGGATC AGTACAAR.
FUERTE CCC..TCGT. GGGGTCTGGG CA.CGTCAGC TCGCGGATC AGTACAAR.

```

```

[ 767 816]
KAAPUERDE TGTTAGTGT CCTCATGNG CCCTCCGCTT TTTTSTTGCA GCAGCGGCAG
UMACROIC ACCACTTGTG TGTGTGTGTA TGTTTCCTCG TGAGAG.CGG .CGTTCAACC
MEXICO ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??????????
SPANJE ...ACT.... . . . . . TGTTTCCTCG TGAGAG???? ??????????
TUNESIE ...ACT.... . . . . . TGTTTCCTCG TGAGAGACGG ACGTTCAACC
ISRAEL ...ACT.... . . . . . TGTTTCCTCG TGAGAG.CGG .CGTTCAACC
FUERTE ...ACT.... . . . . . TGTTTCCTCG TGAGAG.CGG .CGTTCAACC

```

```

[ 817 850]
KAAPUERDE CAGCAGCAGC AAAACGGCGC ATGTN????? ??????
UMACROIC CA..... .TCCTCGA.. ....GCAGG. CCC??
MEXICO ?????????? ?????????? ?????????? ??????
SPANJE ?????????? ?????????? ?????????? ??????
TUNESIE CATCGTCA.. .TCCTCGACG ARMAGCAGGG CCCGG
ISRAEL CATCGTCA.. .TCCTCGACG AGCAGCAGG. CCCGG
FUERTE CATCATCATC ATCCTCGT.G ATGA????? ??????

```

[ gapanalyse its1 en its2, totaal 70 gaps]

```

KAAPUERDE TATTTTTTTT TTTATTT?? TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTT
UMACROIC TTAATTGTAA ATTTTATAA ATAATAAAA TTTTAAATT TTTCCACACA TTAAACAAT
MEXICO TTTTTTCTT TAATTA??C ACATCTTT? ?????????? ??????????TA
SPANJE TTTTTTCTTT TAATTATTA ATTAGCCTAT ATTATTATTA TTACATGAA AA?????AT
TUNESIE ATTTTTATT TTTAATATT ATATTTTAT TAATATTAT ATTTTTATT CATTATTAT
ISRAEL ???TATATT AGTTGAT?? ????TTTTAT TAATTTTAT ATTTAAATA CAATATAAT
FUERTE ATTTTATT TAATTAT?? AATTTAATT TAGATTATTA TATAATCAA CAATTA?AT

```

```

[ totaal 920]
KAAPUERDE TTTTTTTTT
UMACROIC AAAAAAATT
MEXICO TTTTTTTAA
SPANJE AAAAAAATT

```

TUNESIE      AAAAAAATTT  
ISRAEL      AAAAAA?TT  
FUERTE      AAAAAAATTT;  
endblock;