

ITS sequenties in populaties van
Ascophyllum nodosum
(Fucales, Phaeophyta)

Kor-jent van Dijk
Yakgroep: Mariene Biologie
Rijksuniversiteit Groningen
Begeleiders: Wytze Stam en Stella Boele Bos.
Februari 1997 - Juli 1997

Inhoud

Samenvatting	3
Inleiding	4
Materiaal en methoden	6
Resultaten	11
Discussie en conclusies	18
Dankwoord	20
Literatuurlijst	21

Samenvatting

Ascophyllum nodosum (L.) Le Jol is een bruinwier, dat langs de rotskusten van het gematigde deel van de Noord Atlantische Oceaan voorkomt.

Ascophyllum is als onderwerp gekozen omdat deze soort een van de studieobjecten is van het EU Programma "Biodiversity and Genetics of Algal Populations" (BIOGAP). Het is een relatief oude soort en het was onbekend of er in de loop van de tijd genetische verschillen tussen de verschillende populaties zijn ontstaan, zonder dat er morfologische verschillen zijn opgetreden.

Onderzocht is, of er genotypische verschillen bestaan tussen de populaties uit Delfzijl, Tjämnö, Göteborg, Schotland 'Marien', Scotland 'Estuarien', Ierland, Roscoff en Isle of Mann. In het geval dat deze verschillen er zijn, of er dan sprake is van een andere soort. Hiervoor is gekeken naar de sequenties van de ITS 1 en 2 fragmenten van de verschillende isolaten.

Uit de analyse kwamen drie Most Parsimonious Trees, waarin twee groepen te zien zijn. De eerste groep bestaat uit isolaten uit Schotland en Ierland en de andere groep wordt gevormd door Delfzijl, Tjämnö en Göteborg. Roscoff kwam niet genoeg overeen met deze groepen en staat alleen. Isle of Mann verschilde relatief veel van de rest, dit is onder andere te wijten aan een insert van 13 base-paren dat in geen enkel ander isolaat voorkomt.

Er waren 26 variabele posities waarvan er zeven informatief waren, wat erg weinig is. Het grootste verschil was 2,66%, waaruit geconcludeerd kan worden dat de verschillende isolaten wel tot de zelfde soort behoren. Opvallend was een repeat in het ITS 2-gedeelte dat erg variabel was vergeleken met de rest van de sequentie. Er is niet vastgesteld of deze variabiliteit ook binnen de populaties bestaat.

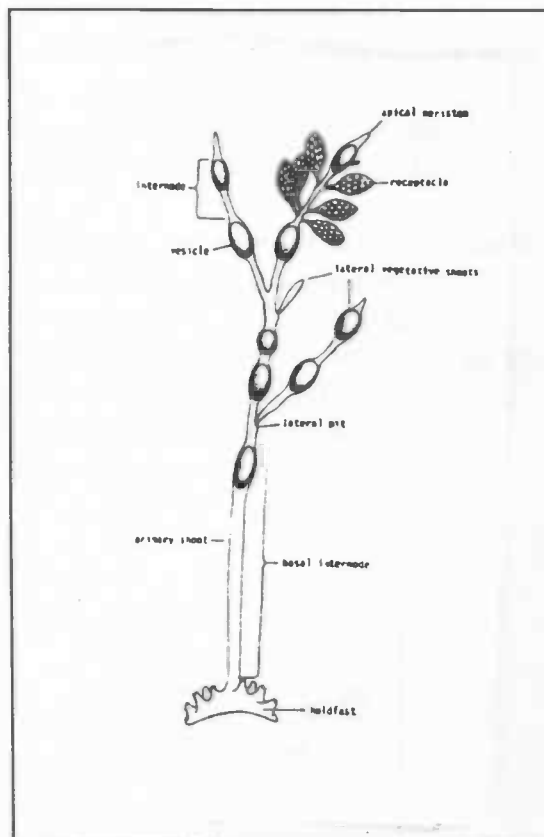
Inleiding

Ascophyllum nodosum (L.) Le Jol is een bruinwier behorende tot de fucusachtige mariene algen. De soort komt voor in het litoraal langs de rotskusten in het gematigde deel van de Noord Atlantische Oceaan. *Ascophyllum nodosum* (Figuur 1) wordt gekenmerkt door afgeplatte thalli en vertakt eens per jaar dichotoom. Dit gebeurt nadat in de vroege lente bij het begin van de vegetatieve groei achter elke apex een luchtblaas is ontstaan (Moss 1971). Tijdens de zomer ontstaan er voortplantingsorganen, de receptacula. Deze ontwikkelen zich het gehele jaar en produceren gameten in het volgende voorjaar (april, mei). Na het vrijkomen van de gameten verdwijnt het receptaculum (Moss 1969). In het thallus van *A. nodosum* komt de endosymbiontische schimmel, *Mycosphaerella ascophylli* voor.

Ascophyllum nodosum is gekozen omdat de soort één van de studieobjecten is in het EU programma "Biodiversity and Genetics of Algal Populations" (BIOGAP). Het doel van het programma is het maken van toepasbare modellen voor "gene flow" en demografie bij vier bentische macroalgen die in levenscyclus verschillen. *Ascophyllum nodosum* bezit een voor bentische zeevieren vrij unieke diplonte levenscyclus, die veel lijkt op die van hogere planten.

Ascophyllum nodosum is een zeer oude soort waarvan niet bekend was of de verschillende populaties die verspreid zijn over de Noord Atlantische Oceaan, wel allemaal het zelfde zijn. Uiterlijk zijn ze identiek.

Van *Ascophyllum nodosum* zijn ook verschillende verschijningsvormen beschreven welke ecad's worden genoemd. *Ascophyllum nodosum* ecad *mackaii* is bijvoorbeeld een verschijningsvorm, die voorkomt in beschutte gedeeltes, waar zoet water grote invloed geeft (Gibb 1957). Morfologisch gezien is deze verschillend van *Ascophyllum nodosum*, maar genetisch is ook hiervan niet bekend of het om dezelfde soort gaat.



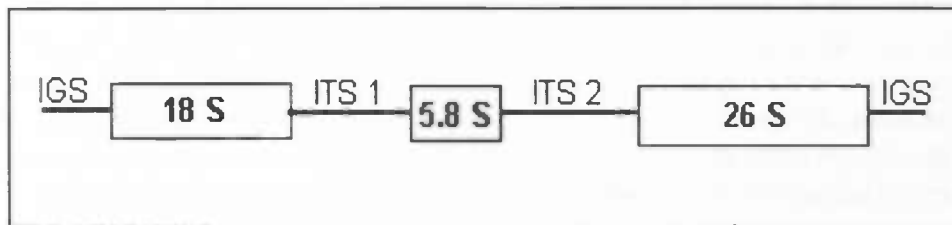
Figuur 1:
Ascophyllum nodosum (uit Cousens 1984)

Het onderzoek richt zich op de volgende vragen:

1. Bestaan er genotypische verschillen tussen isolaten uit de verschillende populaties?
- 2a. Zijn de verschillen zo groot dat er sprake is van verschillende soorten?
- 2b. Is *ecad mackaii* genetisch verschillend van *Ascophyllum nodosum*?

Om deze vragen te beantwoorden is gekeken naar verschillen en overeenkomsten in de basenvolgorde van de Internal Transcribed Spacers (ITS1 en ITS2) van het ribosomaal-DNA cistron. Analyse van dit DNA gedeelte heeft bewezen een hoge resolutie te hebben in studies die vergelijkbaar zijn met deze (Kooistra *et al.* 1993, Bakker *et al.* 1995, van Oppen *et al.* 1995).

Omdat de ITS-regioenen geen coderende functie hebben, kan de mutatiesnelheid relatief hoog zijn, waardoor veranderingen op kleine evolutionaire schaal kunnen worden onderscheiden. Het ribosomaal-DNA is in alle organismen in veel kopieën aanwezig (Futuyama 1986; Manhart & McCourt 1992). Een ribosomaal-DNA cistron bestaat uit drie genen (18S, 5.8S en 26S) en twee Internal Transcribed Spacers (ITS1 en ITS2); zie **Figuur 2**. Deze cistronen komen in grote aantallen achter elkaar voor en elke cistron wordt door de Intergenic Spacers (IGS) gescheiden (Gerbi 1985).



Figuur 2:

rDNA cistron. Het rDNA cistron bestaat uit 18S, 5.8S en 26S, welke zijn gescheiden van elkaar door de Internal Transcribed Spacers.

Materiaal en methoden

De monsters van de verschillende isolaten zijn verzameld op verschillende plaatsen van de Europese westkust, zie Tabel 1.

Tabel 1:

De *Ascophyllum nodosum* isolaten die in deze studie zijn gebruikt. Links staat de code voor het project, rechts de werkelijke vindplaats.

Naam in project	Werkelijke vindplaats	
Delfzijl	-Delfzijl	Nederland
Tjärmö	-Tjärmö	Zweden
Göteborg	-Göteborg	Zweden
SchotMar	-St Andrews 'Marien'	Groot Brittanië (Schotland)
Scot Est	-St Andrews 'Estuarien'	Groot Brittanië (Schotland)
Ierland	-Portaferry	Ierland
Roscoff ¹	-Roscoff	Frankrijk
Isle of M ²	-Isle of Man	Groot Brittanië

1. Uit LeClerc *et al.* (1998) afkomstig.

2. De gegevens van deze sequentie zijn uit ongepubliceerde literatuur afkomstig.

Monstername

Van de isolaten zijn meerdere monsters genomen, die direct na monstername op silicagel gedroogd en bewaard zijn. De monsters van Göteborg zijn een uitzondering, deze zijn niet gedroogd, maar zijn vers bij -80°C bewaard. Bij de monstername zijn voornamelijk de apicale uiteinden verzameld. Het is niet mogelijk geweest om een ecad *mackaii* monster te verkrijgen. Voor de monsters uit Schotland is gekozen voor het nemen van monsters op twee verschillende lokaties, namelijk marien (normale vorm en kleur) en estuarien (kleiner en geler van kleur).

DNA-extractie

Voor de DNA-extractie zijn twee methoden gebruikt: de CTAB-methode en de CsCl-methode (alleen voor het Delfzijl materiaal).

CTAB-methode

De CTAB-methode is ontwikkeld om DNA extracties te doen van vers plantenmateriaal (Doyle & Doyle 1991) en is aangepast voor het extraheren van gedroogd plantenmateriaal (niet gepubliceerd). Verder is er een extra zuiveringsstap toegevoegd met behulp van de Sephaglas Bandprep Kit (Pharmacia Biotech). Hiervoor werd ca. 30 mg gedroogd algenmateriaal met vloeibare stikstof in een 2,0 ml Eppendorf-cupje met een microstamper fijn gemalen. Vervolgens werd 800 µl CTAB extractiebuffer (2%w/v CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 8) en 2 µl β-mercaptoethanol toegevoegd. Dit werd minstens 2 uur geïncubeert bij kamertemperatuur en regelmatig gekanteld. Hierna werd een gelijk volume CIA (Chloroform: Isomyl alcohol 24:1) toegevoegd en voorzichtig geschud en het cupje 15 min. gecentrifugeerd met 14000 rpm bij 4°C met een high speed microcentrifuge (Eppendorf). Het waterige supernatant werd voorzichtig afgepipetteerd en in een nieuw Eppendorf-cupje overgebracht, hierna is de CIA extractie herhaald. Aan het supernatant werd 2x het volume Gel Solubilizer buffer (6M NaI) toegevoegd

en het cupje werd stevig gevortexd. 20 µl Sephaglas werd toegevoegd en dit werd 5 minuten geïncubeerd bij kamertemperatuur, waarbij elke minuut kort werd gevortexed. Dit werd 30 sec. gecentrifugeerd met de high speed microcentrifuge en het supernatant afgegoten. Aan de pellet is 160 µl wasbuffer (8x het Sephaglas volume) toegevoegd en is geresuspendeerd. Deze stap is minimaal 2x herhaald, totdat het supernatant helder was. Hierna is 1ml 50% ethanol (kamertemperatuur) toegevoegd en vervolgens is dat een nacht bij 4°C gezet. De volgende dag zijn de cupjes 1 minuut gecentrifugeerd met de high speed microcentrifuge en het supernatant afgegoten, waarna de cupjes nog eens afgedept werden met een tissue. De oppervlakte van de pellet werd vergroot door tegen het cupje te tikken. Vervolgens is deze minimaal 10 minuten aan de lucht gedroogd (pellet moet droog zijn). Aan de pellet werd vervolgens 100 µl elutiebuffer (0,1 x Tris-EDTA-oplossing) toegevoegd en het geheel goed gevortexed en 5 minuten geïncubeerd bij 65°C. Tot slot is het cupje 1 minuut gecentrifugeerd en is het supernatant voorzichtig in een nieuw cupje overgepipetteerd (ca 100 µl).

CsCl-methode

De Ultracentrifuge-methode is alleen bij het monster van Delfzijl gebruikt. Hiervoor is het standaard protocol gevolgd (Olsen *et al.* 1994)

PCR amplificatie

Het reactievolume was 50 µl en bevatte 2 µl DNA oplossing, 31,8 µl milliQ water, 5 µl 10x reactiebuffer (Promega), 4 µl MgCl₂ (25 mM), 5 µl dNTP (200 µM dATP; 200 µM dTTP; 200 µM dGTP; 200 µM dCTP), 1,0 µl standaardprimer forward, 1,0 µl standaardprimer reverse en 0,2 µl Taq polymerase (Promega). Om het ITS1 en ITS2 gedeelte te kunnen amplificeren is het primerpaar C1-JO6 (Tabel 2) gebruikt; Primers die wel getest zijn, maar die niet gewerkt hebben zijn; TW5, ITS1, ITS2, ITS4, JO2, JO4 en G.

Om de goede DNA concentratie te bepalen voor de amplificatie, is voor elke DNA oplossing een verdunningsreeks (10⁻¹, 10⁻² en 10⁻³) gemaakt en getest.

Dubbelstrengs 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 55°C en 3 minuten bij 74°C, bij de laatste werd een extensietijd van 10 seconden per cyclus toegevoegd. Deze 27 cycli werden gevolgd door een soakfile van 10°C totdat de machine werd uitgezet.

De amplificaties werden gecontroleerd op de juiste lengte, zuiverheid en voldoende opbrengst op een 1,5% agarose TAE gel, waaraan 0,01% EtBr (ethidium-bromide) was toegevoegd en zichtbaar gemaakt op een UV-bak. Als de producten goed waren, werd van het beste monster het gehele reactievolume van de amplificatie gescheiden op een 1,5% agarose TAE (Tris Azijnzuur EDTA) gel met EtBr. Vervolgens zijn de bandjes op een UV-bak met behulp van een steriel dekglasje uitgesneden en in een 1,5 ml cupje gedaan. De zuivering is met een Sephaglas Bandprep Kit (Pharmacia Biotech) uitgevoerd, volgens standaard protocol.

Tabel 2:

De oligonucleotide primers die werden gebruikt voor het amplificeren en sequencen.

SR = synthese richting, F=forward, R=reverse, *=gebruikt bij sequencen

Primer	SR	Sequentie
C1	F	5'-GTA CAC ACC GCC CGT CGC TCC-3'
JO6	R	5'-ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT-3'
Universal primer*F		5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
(¹⁷ Sequencing™ Kit 'Pharmacia Biotech')		
Reverse*	R	5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'
(¹⁷ Sequencing™ Kit 'Pharmacia Biotech')		
ITS3*	F	5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3'
KDR1*	F	5'-GGC TTC TTG TTA CTG TTG G-3'

Recombinant DNA

Er is gebruik gemaakt van de recombinant DNA techniek, omdat de opbrengst van de amplificaties niet heel hoog was en omdat recombinant DNA makkelijk reproduceerbaar is. Hiervoor is gebruik gemaakt van pGEM®-T Vector Systems (Promega).

Ligatie

Bij de ligatie is gebruik gemaakt van 0,5 ml Eppendorf cupjes (PCR reactie vaatjes) en is het pipetteerschema van **Tabel 3** gebruikt. Hierbij is een standaardreactie gedaan met gezuiverd PCR-product, een positieve controle met Control Insert DNA (4 ng/μl) en een achtergrond controle met alleen milliQ water.

Voor de bepaling van de hoeveelheid PCR-product voor een optimale ligatie is van een 1:8 ratio molgewicht insert:vector uitgegaan. Hierbij is **Formule 1** gehanteerd.

Formule 1

$$\frac{\text{ng vector} \times \text{kb grootte van insert}}{\text{kb grootte van vector}} \times \frac{8}{1} = \text{ng insert nodig}$$

Tabel 3:

Pipetteerschema voor ligatie met pGEM®-T vector voor standaard reactie, positieve controle en achtergrond controle.

	Standaard reactie	Positieve controle	Achtergrond controle
T4 DNA ligase 10x buffer	1 μl	1 μl	1 μl
pGEM®-T vector (50 ng)	1 μl	1 μl	1 μl
PCR product	x μl	-	-
Control Insert DNA	-	2 μl	-
T4 DNA ligase (3 Weiss units/μl)	1 μl	1 μl	1 μl
milliQ tot eindvolume van	10 μl	10 μl	10 μl

De reacties zijn door een paar keer heen en weer te pipetteren gemixed en zijn vervolgens overnacht bij 4°C geïncubeerd.

Transformatie van pGEM-T vector ligatie reacties

2x YT Platen met IPTG, X-Gal en Ampicilline (25 mg/ml) werden op kamertemperatuur gebracht. Hiervoor zijn bij elke reactie 3 platen gebruikt. De ligatiemix werd afgecentrifugeerd en hiervan werd 2 µl in een steriel 1,5 ml Eppendorf cupje op ijs gepipetteerd. De competente *Escherichia coli* cellen "JM 109 Competent Cells, High Efficiency" (Promega) zijn op ijs ontdooid en voorzichtig gemengd. Hiervan werd 50 µl bij de ligatiemix, op ijs gepipetteerd, voorzichtig gemengd en 20 minuten op ijs geïncubeerd. Vervolgens is aan de cellen een hiteschok gegeven van 45-50 seconden bij 42°C, deze temperatuur is erg belangrijk voor een efficiënte transformatie. Hierna zijn de cupjes weer direkt op ijs gebracht gedurende 2 minuten, waarna 950 µl 2x YT medium aan de cupjes werd toegevoegd. Dit is voor 1,5 uur geïncubeerd bij 37°C in een schudstoof, waarbij de cupjes schuin werden neergezet. Hierna werd op platen 1 en 2, 100 µl van deze cellen uitgeplaat, waarna de rest van de cellen werd afgedraaid en het supernatant gedecanteerd. De overgebleven pellet met cellen is vervolgens gemengd en op de laatste plaat uitgeplaat. Deze platen zijn overnacht bij 37°C geïncubeerd, waarna ze de volgende dag bij 4°C gedurende enkele uren werden bewaard. Dit zorgt er voor dat de β-galactosidase kleuring beter zichtbaar is. Bij deze kleuring zijn de colonies met het insert wit gekleurd en die zonder blauw. De witte colonies werden gemerkt.

Plasmid-isolatie

De plasmid-isolatie is met een FlexiPrep Kit (Pharmacia Biotech) uitgevoerd, volgens het standaardprotocol.

Aan een fles, met 100 ml 2x YT medium, is 200 µl ampicilline toegevoegd. Hiervan is in 5 plastic reageerbuisen, 5 ml per buis toegevoegd. Met een pipetpuntje is een positieve kolonie opgepikt en hiermee een buis beënt. Dit is herhaald bij de rest van de buizen met elk een andere kolonie. Tevens is een blanco buis (niet beënt) ingezet. De buizen zijn overnacht bij 37°C in een schudstoof geïncubeerd, waarbij de buizen schuin zijn neergezet. Van de cultuur is 0,85 ml overgepipetteerd in een schoon cupje. Hier is 0,15 ml 87% glycerol aan toegevoegd; het geheel is goed gevortexed en bewaard bij -20°C. Met de ingevroren culture is het mogelijk om opnieuw cellen op te laten groeien. De rest van de culture in de buis is 5 minuten afgedraaid bij 5000 rpm en het supernatant verwijderd. De pellet is vervolgens in 200 µl van oplossing I geresuspendeerd. De oplossing is overgepipeteerd in een 1,5 ml Eppendorfcupje en hieraan is 200 µl van oplossing II toegevoegd, waarna de cupjes enige malen voorzichtig zijn gekanteld. Vervolgens is 200 µl van oplossing III toegevoegd en wederom enkele malen gekanteld. De cupjes zijn gedurende 5 minuten op volle snelheid gecentrifugeerd bij kamertemperatuur, waarna het supernatant in een schone buis is overgepipetteerd. Hieraan is 420 µl (0.7x het volume) isopropanol toegevoegd op kamertemperatuur en dit is goed gevortexed. Vervolgens zijn de cupjes 10 minuten bij kamertemperatuur geïncubeerd, waarna deze 10 minuten zijn gecentrifugeerd (Eppendorf) op volle snelheid en het supernatant verwijderd. De cupjes zijn omgekeerd om alle vloeistof kwijt te raken.

DNA-purificatie

Aan de pellet is 150 µl Sephaglas toegevoegd en deze is geresuspendeerd door zachtjes te vortexen. Dit is 15 seconden gecentrifugeerd op maximale snelheid en het supernatant werd verwijderd. De pellet is gewassen met 200 µl Wash Buffer door dit zachtjes te vortexen, waarna de cupjes 15 seconden zijn gecentrifugeerd op maximale snelheid.

Hiervan is het supernatant verwijderd en 300 µl 70% ethanol toegevoegd, waarmee de pellet is geresuspendeerd. Hierna zijn de cupjes 15 seconden gecentrifugeerd op maximale snelheid en het supernatant verwijderd, waarbij de cupjes op een tissue zijn afgetikt. Pellet is licht gevortexd om deze over de wand uit te smeren, waarna de pellet voor minimaal 10 minuten aan de lucht is gedroogd. Aan de gedroogde pellet werd 50 µl 0.1x TE toegevoegd en dit is 5 minuten bij kamertemperatuur geïncubeerd, waarbij af en toe gevortexd werd. De cupjes werden 1 minuut gecentrifugeerd en het supernatant (50 µl) overgebracht naar een schoon cupje. Dit werd bewaard bij -20°C.

Het knippen van recombinant DNA

2,0 µl DNA werd geknipt om te zien of er wel een insert in de opgegroeide cellen aanwezig was. Hiervoor is gebruik gemaakt van het BstZ I (Promega) restrictie enzym in een 20 µl reactie, volgens instructies van fabrikant. De monsters zijn gecontroleerd op een 1.5% agarose TAE gel, waaraan 0.01% EtBr is toegevoegd.

Sequencen

Het sequencen gebeurde volgens de Sanger methode (Sambrook *et al.* 1989), gebruik makend van ³⁵S-dATP en de T7-polymerase kit van Pharmacia. Hierbij is de annealing procedure veranderd, de rest is volgens het standaard protocol uitgevoerd.

Annealing reactie

Het dubbelstrengs recombinant-DNA is 2 minuten bij 95°C gedenatureerd, waarna het kort is gecentrifugeerd en weer 2 minuten bij 95°C geïncubeerd. Direct hierna zijn de cupjes 2 minuten op ijs gezet. Vervolgens is op kamertemperatuur 2 µl primer (Tabel 2) aan de cupjes toegevoegd, waarna 2 µl annealingbuffer is toegevoegd. Dit is goed gemengd en kort afgedraaid, waarna de cupjes 20 minuten bij 37°C zijn geïncubeerd.

Voor het sequencen zijn de volgende primers gebruikt, universal primer (forward), reverse, ITS 3 en KDR 1 (Tabel 2), de laatste primer is zelf ontwikkeld. Hiervoor is gekozen voor posities 94-113 (Figuur 3), waarbij $T_m=56,0^\circ\text{C}$ en percentage GC= 47,37%.

Sequence alignment en analyse

Sequenties werden ingevoerd en gealignd m.b.v. het UWGCG software pakket (Devereux *et al.* 1984). De uiteindelijke alignments zijn uitgewerkt met MacClade (Maddison & Maddison 1992), MEGA (Kumar *et al.* 1993), PHYLIP (Felsenstein 1989) en PAUP 3.11 computer programma's (Swofford 1993). Met PAUP werden alignments geanalyseerd en hiervan zijn Most Parsimonious Trees (MPT) berekend. Strict Consensus Trees werden berekend uit de MPT's. De stabiliteit van de MPT's werd met bootstrap analyses getest met 1000 replica's per keer.

Met MacClade zijn de alignments van het UWGCG software pakket, bewerkt zodat deze goed bruikbaar waren met PAUP 3.11. In MEGA zijn de alignments geanalyseerd op het aantal variabele posities en het aantal informatieve posities. Met PHYLIP is de relatieve genetische afstand tussen de verschillende isolaten berekend en hiervan is een afstanden matrix gemaakt. De afstanden matrix is berekend met het Kimura "2-parameter" model en met Neighbor-Joining is de boom samengesteld.

Resultaten

DNA extractie en amplificatie

Van elk isolaat is voldoende geïsoleerd DNA verkregen om te amplificeren. De isolatie verliep erg moeizaam, maar nadat het protocol enige malen is herzien verliep het zonder problemen, alleen de opbrengst was wat laag.

Het amplificeren van het "ITS 1;5.8S en ITS 2" fragment is bij alle isolaten gelukt met de primercombinatie C1-JO6.

Het fragment is met behulp van een 100-basen ladder naar grootte geschat op 1050 bp.

Recombinant DNA

De ligatie, transformatie, plasmide-isolatie en DNA purificatie verliepen zeer goed. De hoeveelheid witte kolonies ten opzichte van de blauwe kolonies was ongeveer 1:1 of lager. Dit is wel een beetje laag, maar de witte kolonies bevatten wel het insert. Bij de DNA purificatie was de DNA opbrengst ongeveer 400 ng/ μ l. Bij het knippen van het recombinant DNA met BstZ I restrictie enzym, waren bij het DNA met insert twee extra banden te zien met een grootte van 250 bp en 800 bp wat ongeveer met het insert overeenkomt.

Sequencen

Van alle isolaten waren de sequentie-reacties wel gelukt met de primers: Universal primer, reverse, ITS 3 en KDR 1 (**Tabel 2**). De rest van de primers die gebruikt konden worden hebben het niet of niet goed gedaan. De labeling-reactie is bij alle isolaten matig tot slecht verlopen. In de meeste gevallen moest de film meer dan 6 dagen worden belicht en in sommige gevallen 12 dagen. Doordat de films erg licht waren, was het moeilijk om de films te lezen. Primer KDR 1 is later ontwikkeld om het 5.8S gedeelte te kunnen lezen.

Sequentie alignment

Het alignen (**Figuur 3**) van de verschillende isolaten was goed te doen. Dit leverde een dataset van 926 basen lang op. De basen 872-884 kwamen alleen bij Isle of Man voor en waren niet aanwezig bij de andere 7 contigs. Ook ontbraken de laatste 6 basen van het ITS 2 gedeelte van Isle of Man. Verder valt de repeat bij basen 841-869 op, deze bestaat uit meerdere tetra-sequenties. Hierbij is er een verschil in aantal tussen de verschillende populaties te zien.

Isle of M	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
Goteborg	ACGAGAGGCT	TCTCGTCGAG	GCTGCGAGTG	GTGTGATACA	CGCAGCCCCA
Tjarno	ACGAGAGGCT	TCTCGTCGAG	GCTGCGAGTG	GTGTGATACA	CGCAGCCCCA
ScotEst	ACGAGAGGCT	TCTCGTCGGG	GCTGCGAGTG	GTGTGATACA	CGCAGCCCCA
ScotMar	ACGAGAGGCT	TCTCGTCGAG	GCTGCGAGTG	GTGTGATACA	CGCAGCCCCA
Ierland	CCGAGAGGCT	TCTCGTCGGG	GCTGCGAGTG	GTGTGATACA	CGCAGCCCCA
Delfzijl	ACGAGAGGCT	TCTCGTCGAG	GCTGCGAGTG	GT . GATACA	CGCAGCCC . A
Roscoff	ACGAGAGGCT	TCTCGTCGAG	GCTGCGAGTG	GTGTGATACC	CG . AGCCCCA

ITS 1 ↔ 5.8 S

349

Isle of M	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
Goteborg	AATCAAGCCG	AACCCGAAAC	GAACCAAGAG	TGGAATCTGA	GTCATCGGAA
Tjarno	AATCAAGCCG	AACCCGAAAC	GAACCAAGAG	TGGAATCTGA	GTCATCGGAA
ScotEst	AATCAACCCG	AACCCGAAAC	GAACCAAGAG	TGGAATCTGA	GTCATCGGAA
ScotMar	AATCAAGCCG	AACCCGAAAC	GAACCAAGAG	TGGAATCTGA	GTCATCGGAA
Ierland	AATCAAGCCG	AACCCGAAAC	GAACCAAGAG	TGGAATCTGA	GTCATCGGAA
Delfzijl	AATCAAGCCG	AACCCGAAAC	GAACCAAGAG	TGGAATCTGA	GTCATCGGAA
Roscoff	AATCAAGCCG	AACCCGAACC	GAACCAAGAG	TGGAATCTGA	GTCATCGGAA

399

Isle of M	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
Goteborg	AGGGAGCCTT	TTGTTAGGCT	CTCCGACCGA	GCATTACCTC	TACGTAATGA
Tjarno	AGGGAGCCTT	TTGTTAGGCT	CTCCGACCGA	GCATTACCTC	TACGTAATGA
ScotEst	AGGGAGCCTT	TTGTTAGGCT	CTCCGACCGA	GCATTACCTC	TACGTAATGA
ScotMar	AGGGAGCCTT	TTGTTAGGCT	CTCCGACCGA	GCATTACCCC	TACGTAATGA
Ierland	AGGGAGCCTT	TTGTTAGGCT	CTCCGACCGA	GCATTACCTC	TACGTAATGA
Delfzijl	AGGGAGCCTT	TTGTTAGGCT	CTCCGACCGA	GCATTACCTC	TACGTAATGA
Roscoff	AGGGAGCCTT	TTGTTAGGCT	CTCCGACCGA	GCATTACCTC	TACGTAATGA

449

Isle of M	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
Goteborg	CCAAAACTT	TCAGCGACGG	ATGTCTTGGC	TCCCCTACG	ATGAAGAACG
Tjarno	CCAAAACTT	TCAGCGACGG	ATGTCTTGGC	TCCCCTACG	ATGAAGAACG
ScotEst	CCAAAACTT	TCAGCGACGG	ATGTCTTGGC	TCCCCTACG	ATGAAGAACG
ScotMar	CCAAAACTT	TCAGCGACGG	ATGTCTTGGC	TCCCCTACG	ATGAAGAACG
Ierland	CCAAAACTT	TCAGCGACGG	ATGTCTTGGC	TCCCCTACG	ATGAAGAACG
Delfzijl	CCAAAACTT	TCAGCGACGG	ATGTCTTGGC	TCCCCTACG	ATGAAGAACG
Roscoff	CCAAAACTT	TCAGCGACGG	ATGTCTTGGC	TCCCCTACG	ATGAAGAACG

499

Isle of M	NNNNNNNNNN	NGATACGTCT	TGCGACTTGC	AGAATCCAGT	GAAT . CATCA
Goteborg	CAGCGAAATG	CTATACGTCT	TGCGACTTGC	AGAATCCAGT	GAAT . GATCA
Tjarno	CAGCGAAATG	CTATACGTCT	TGCGACTTGC	AGAATCCAGT	GAAT . GATCA
ScotEst	CAGCGAAATG	CGATACGTCT	TGCGACTTGC	AGAATCCAGT	GAAT . CATCA
ScotMar	CAGCGAAATG	CGATACGTCT	TGCGACTTGC	AGAATCCAGT	GAAT . CATCA
Ierland	CAGCGAAATG	CGATACGTCT	TGCGACTTGC	AGAATCCAGT	GAATTCAT . A
Delfzijl	CAGCGAAATG	CTATACGTCT	TGCGACTTGC	AGAATCCAGT	GAAT . GATCA
Roscoff	CAGCGAAATG	CGATACGTCT	TGCGACTTGC	AGAATCCAGT	GAAT . CATCA

549

Isle of M	AAACTTTGAA	CGCACCTTGC	GCTTCCGGGA	TATCCCTGGG	AGCATGCTTG
Goteborg	AAACTTTGGA	CGCACCTTGG	CCTTCCGGGA	TATCCCTGGG	AGCATGCTTG
Tjarno	AAACTTTGAA	CGCACCTTGG	CCTTCCGGGA	TATCCCTGGG	AGCATGCTTG
ScotEst	AAACTTTGAA	CGCACCTTGG	CCTTCCGGGA	TATCCCTGGG	AGCATGCTTG
ScotMar	AAACTTTGAA	CGCACCTTGG	CCTTCCGGGA	TATCCCTGGG	AGCATGCTTG
Ierland	AAACTTTGAA	CGCACCTTGG	CCTTCCGGGA	TATCCCTGGG	AGCATGCTTG
Delfzijl	AAACTTTGAA	CGCACCTTGG	CCTTCCGGGA	TATCCCTGGG	AGCATGCTTG
Roscoff	AAACTTTGAA	CGCACCTTGC	GCTTCCGGGA	WATCCCTGGG	AGCATGCTTG

Isle of M	TCGGAGTGTC	TGCTCACGCC	AATCGCTAGT	CGTCTCCGGC	CTCGGGTCGG
Goteborg	TCGGAGTGTC	TGCTCACGCC	AATCGCTAGT	CGTCTCCGGC	CTCGGGTCGG
Tjarno	TCGGAGTGTC	TGCTCACGCC	AATCGCTAGT	CGTCTCCGGC	CTCGGGTCGG
ScotEst	TCGGAGTGTC	TGCTCACGCC	AATCGCTAGT	CGTCTCCGGC	CTCGGGTCGG
ScotMar	TCGGAGTGTC	TGCTCACGCC	AATCGCTAGT	CGTCTCCGGC	CTCGGGTCGG
Ierland	TCGGAGTGTC	TGCTCACGCC	AATCGCTAGT	CGTCTCCGGC	CTCGGGTCGG
Delfzijl	TCGGAGTGTC	TGCTCACGCC	AATCGCTAGT	CGTCTCCGGC	CTCGGGTCGG
Roscoff	TCGGAGTGTC	TGCTCACGCC	AATCGCTAGT	CGTCTCCGGC	CTCGGGTCGG

649

Isle of M	GGGCTTCTGG	CGGACTATGA	GTGTTCCGGA	AGCGAAAGCC	GCCGAGTCCA
Goteborg	GGGCTTCTGG	CGGACTATGA	GTGTTCCGGA	AGCGAAACGC	GCCGAGTCCA
Tjarno	GGGCTTCTGG	CGGACTATGA	GTGTTCCGGA	AGCGAAACGC	GCCGAGTCCA
ScotEst	GGGCTTCTGG	CGGACTATGA	GTGTTCCGGA	AGCGAAACGC	GCCGAGTCCA
ScotMar	GGGCTTCTGG	CGGACTATGA	GTGTTCCGGA	AGCGAAACGC	GCCGAGTCCA
Ierland	GGGCTTCTGG	CGGACTATGA	GTGTTCCGGA	AGCGAAACGC	GCCGAGTCCA
Delfzijl	GGGCTTCTGG	CGGACTATGA	GTGTTCCGGA	AGCGAAACGC	GCCGAGTCCA
Roscoff	GGGCTTCTGG	CGGACTATGA	GTGTTCCGGA	AGCGAAACGC	GCCGAGTCCA

699

Isle of M	CCGCCGCATG	AACGATTTGT	AAGGCCCCC	ATGCGTGTGC	ATCACCCGCC
Goteborg	CCGAAGCATG	AACGATTTGT	AAGGCCCCC	ATGCGTGTGC	ATCACCCGCC
Tjarno	CCGAAGCATG	AACGATTTGT	AAGGCCCCC	ATGCGTGTGC	ATCACCCGCC
ScotEst	CCGAAGCATG	AACGATTTGT	AAGGCCCCC	ATGCGTGTGC	ATCACCCGCC
ScotMar	CCGAAGCATG	AACGATTTGT	AAGGCCCCC	ATGCGTGTGC	ATCACCCGCC
Ierland	CCGAAGCATG	AACGATTTGT	AAGGCCCCC	ATGCGTGTGC	ATCACCCGCC
Delfzijl	CCGAAGCATG	AACGATTTGT	AAGGCCCCC	ATGCGTGTGC	ATCACCCGCC
Roscoff	CCGAAGCATG	AACGATTTGT	AAGGCCCCC	ATGCGTGTGC	ATCACCCGCC

749

Isle of M	CGCCGAAGTG	AGTTCGCGCT	GAATGGGCCG	TTTACGGAGG	TCCCCTCCTT
Goteborg	CGCCGAAGTG	AGTTCGCGCT	GAATGGGCCG	TTTACG.AGG	TCCCCTCCTT
Tjarno	CGCCGAAGTG	AGTTCGCGCT	GAATGGGCCG	TTTACG.AGG	TCCCCTCCTT
ScotEst	CGCCGAAGTG	AGTTCGCGCT	GAATGGGCCG	TTTACG.AGG	TCCCCTCCTT
ScotMar	CGCCGAAGTG	AGTTCGCGCT	GAATGGGCCG	TTTACG.AGG	TCCCCTCCTT
Ierland	CGCCGAAGTG	AGTTCGCGCT	GAATGGGCCG	TTTACG.AGG	TCCCCTCCTT
Delfzijl	CGCCGAAGTG	AGTTCGCGCT	GAATGGGCCG	TTTACG.AGG	TCCC.TCCTT
Roscoff	CGCCGAAGTG	AGTTCGCGCT	GAATGGGCCG	TTTACGGAGG	TCCCCTCCTT

799

Isle of M	C.GAGAGGGG	ATGAAGATWA	CGGTCCGTCC	ACGTGTCTTG	CGAGGGTGGG
Goteborg	C.GAGAGGGG	ATGAAGATTA	CGGTCCGTCC	ACGTGTCTTG	CGAGGGTGGG
Tjarno	CCGAGAGGGG	ATGAAGATTA	CGGTCCGTCC	ACGTGTCTTG	CGAGGGTGGG
ScotEst	CCGAGAGGGG	ATGAAGATTA	CGGTCCGTCC	ACGTGTCTTG	CGAGGGTGGG
ScotMar	CCGAGAGGGG	ATGAAGATTA	CGGTCCGTCC	ACGTGTCTTG	CAAGGGTGGG
Ierland	CCGAGAGGGG	ACGAAGATTA	CGGTCCGTCC	ACGTGTCTTG	CGAGGGTGGG
Delfzijl	C.GAGAGGGG	ATGAAGATTA	CGGTCCGTCC	ACGTGTCTTG	CGAGGGTGGG
Roscoff	C.GAGAGGGG	ATSAAGATTA	CGGTCCGTCC	ACGTGTCTTG	CGAGGGTGGG

849

Isle of M	AGAATCTGTC	CGCGTGGCGT	CTTGGAGATC	ACGAATGGAT	CGATCG.TC.
Goteborg	AGAATCTGTC	CGCGTGGCGT	CTTGGAGATC	ACGAATGAAT	CGATCGATCG
Tjarno	AGAATCTGTC	CGCGTGGCGT	CTTGGAGATC	ACGAATGAAT	CGATCGATCG
ScotEst	AGAATCTGTC	CGCGTGGCGT	CTTGGAGATC	ACGAATGAAT	TGATCGATCG
ScotMar	AGAATCTGTC	CGCGTGGCGT	CTTGGAGATC	ACGAATGAAT	TGATCGATCG
Ierland	AGAATCTGTC	.GCGTGGCGT	CTTGGAGATC	ACGAATGAAT	TGATCGATCG
Delfzijl	AGAATCTGTC	.GCGTGGCGT	CTTGGAGATC	ACGAATGAAT	CGATCGATCG
Roscoff	AGAATCTGTC	CGCGTGGCGT	CTTGGAGATC	ACGAATGAAT	CGATCGATCG

```

Isle of M .....G AATGAAGGCG CGTGTCTTAT ACAAAAAGCA
Goteborg ATCGATC... .....G AAT..... CTTAT ACAAAAAGCA
Tjarno ATCGATC... .....G AAT..... CTTAT ACAAAAAGCA
ScotEst ATCGATCGAT C.....G AAT..... CTTAT ACAAAAAGCA
ScotMar ATCGATCGAT CGATCGATCG AAT..... CTTAT ACAAAAAGCA
Ierland ATCGATCGAT CGATC....G AAT..... CTTAT ACAAAAAGCA
Delfzijl ATC.....G AAT..... CTTAT ACAAAAAGCA
Roscoff ATCGATC... .....G AAT..... CTTAT ACAAAAAGCA

```

ITS 2 ← → 26 S

926

```

Isle of M TTATCCGACC TCCGATCGAG C
Goteborg TTATCCGACC TCCGATCAAG CAAGAGT
Tjarno TTATCCGACC TCCGATCAAG CAAGAGT
ScotEst TTATCCGACC TCCGATCAAG TAAGAGT
ScotMar TTATCCGACC TCCGATCAAG CAAGAGT
Ierland TTATCCGACC TCCGATCAAG CAAGAGT
Delfzijl TTATCCGACC TnCnATCAAG CAAGAGT
Roscoff TTATCCGACC TCCGATCAAG CAAGAGT

```

Analyse

Uit de parsimony analyse met PAUP kwamen drie Most Parsimonious Trees (MPT) met elk 28 stappen. Hierin (Figuur 4a,b en c) zijn ook de bootstrapwaardes te zien. Bij basen 196-

199 was de film niet te lezen vanwege een stop. De *g*1 is maat voor de frequentie verdeling van de boomlengtes deze ligt tussen de 1 en de -1. Hier heeft deze een waarde van -0.853, wat duidt op een goed fylogenetisch signaal (Hillis & Heulsenbeck 1992). De gegevens van de MPT's staan in Tabel 4. Er is

bij de analyse geen gebruik gemaakt van een outgroup. De isolaten uit Schotland en Ierland komen samen in een tak van de boom terecht met een bootstrapwaarde van 62%, net als Tjárnö, Göteborg en Delfzijl met een bootstrapwaarde van 72%. Roscoff en the Isle of Man staan alleen waarbij de rest een bootstrap waarde heeft van 91%. De drie verschillende bomen verschillen erg weinig van elkaar. De analyse is ook uitgevoerd onder de volgende voorwaarden; gap als vijfde base, uitsluiten van basen 872-885, uitsluiten van de repeat en een combinatie van deze. Door de verschillende variabelen in te stellen veranderde de topologie van de bomen niet. Met de bomen uit Figuur 4a, 4b en 4c is een samengevatte boom (consensus tree) berekend (Fig. 5).

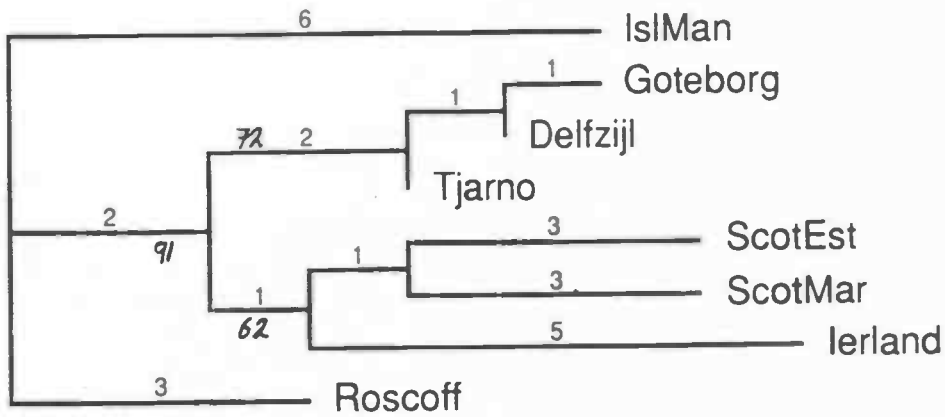
Het aantal variabele sites dat gevonden is is 26 en hiervan zijn er 7 informatief. Dat is erg weinig en betekent dat de ITS 1 - ITS 2 sequenties grotendeels gelijk zijn. Ook zijn de verhoudingen van A,T,C en G's in MEGA berekend en elke base komt bij alle contig's ongeveer even vaak voor.

De afstandenmatrix gemaakt met PHYLIP is te zien in Tabel 5, waarbij het grootste verschil 2.66% is. De verschillen zijn grafisch weergegeven in Figuur 6. Hierin is te zien, dat deze niet veel verschillen van de MPT's.

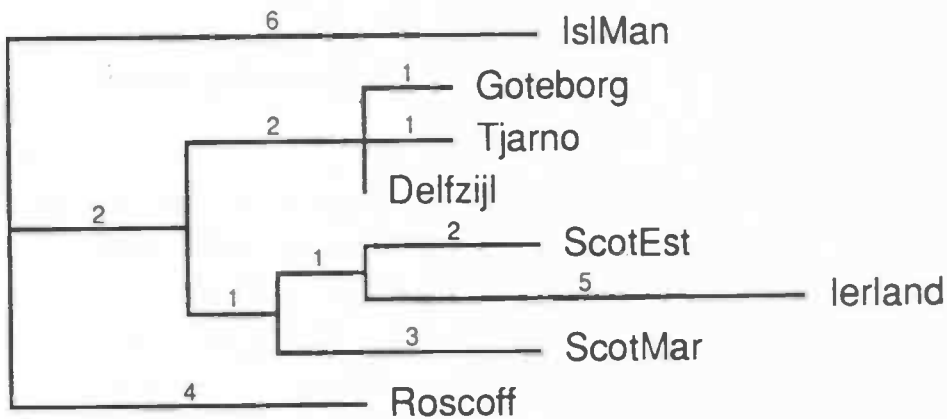
Tabel 4:

De gegevens van de Most Parsimonious Trees. *g*1=verdeling boom lengtes, CI=Consistency Index, RC= Rescaled Consistency index.

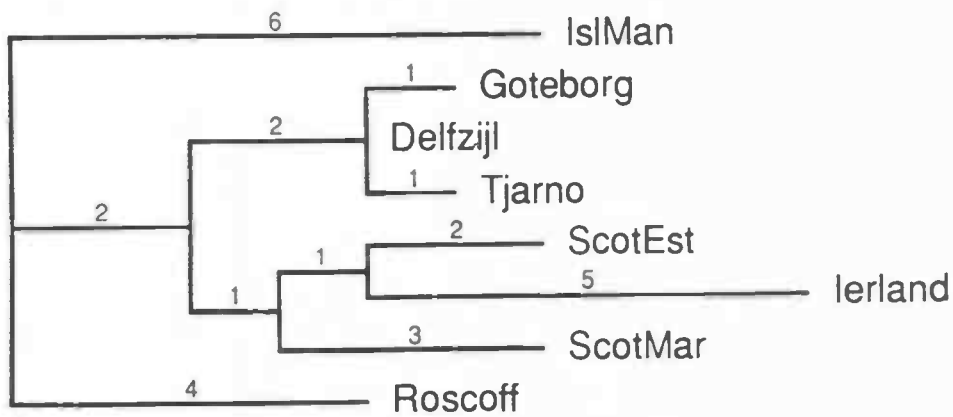
Aantal MPT's	3
Aantal stappen	28
<i>g</i> 1	-0.853
CI	0.929
RC	0.760



A



B

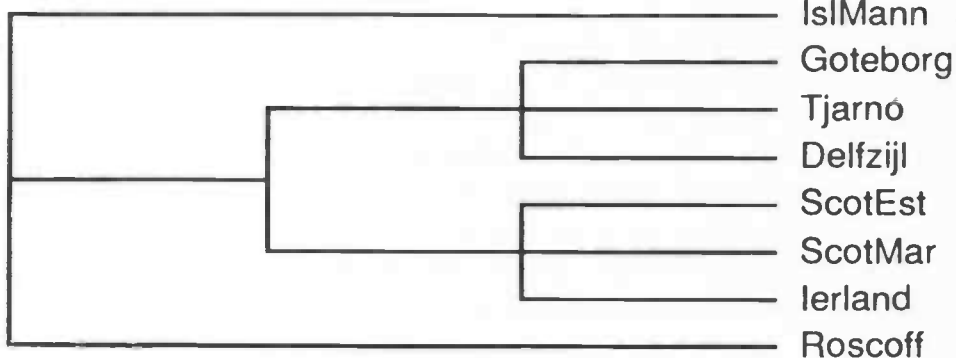


C

Figuur 4a, b en c:

Most Parsimonious Trees van *Ascophyllum nodosum* berekend met PAUP 3.11. Er is geen gebruik gemaakt van een outgroup. De nummers boven de lijnen zijn het aantal nucleotidenveranderingen en de getallen in de cirkels zijn de bootstrapwaarden (alleen a), waarden onder de 50 % zijn niet weergegeven.

Strict



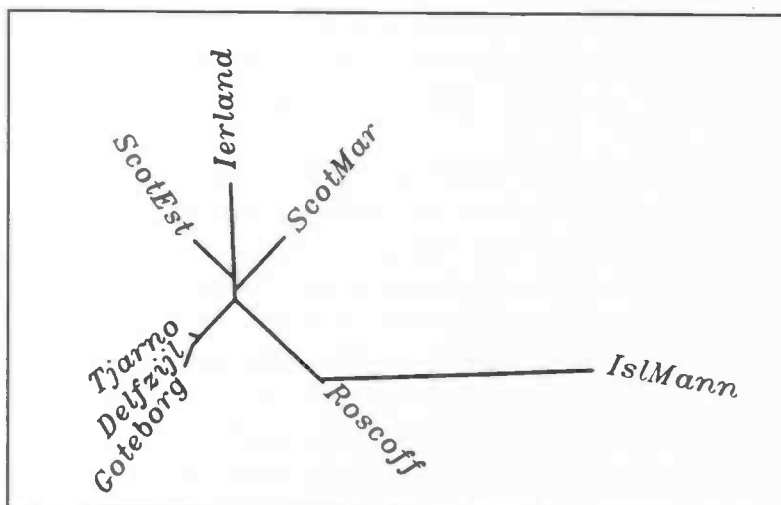
Figuur 5:

Strict consensus tree van de drie Most Parsimonious Trees.

Tabel 5:

Afstanden matrix van de verschillende isolaten van *Ascophyllum nodosum* berekend met PHYLIP (Felsenstein, 1989).

	Isle of M	Göteborg	Tjarnö	SchotEst	SchotMar	Ierland	Delfzijl	Roscoff
IsleofM	0.0000	0.0266	0.0242	0.0241	0.0241	0.0242	0.0244	0.0143
Göteborg	0.0266	0.0000	0.0022	0.0079	0.0079	0.0113	0.0011	0.0102
Tjarnö	0.0242	0.0022	0.0000	0.0079	0.0079	0.0090	0.0011	0.0079
SchotEst	0.0241	0.0079	0.0079	0.0000	0.0067	0.0078	0.0068	0.0113
SchotMar	0.0241	0.0079	0.0079	0.0067	0.0000	0.0100	0.0068	0.0113
Ierland	0.0242	0.0113	0.0090	0.0078	0.0100	0.0000	0.0103	0.0125
Delfzijl	0.0244	0.0011	0.0011	0.0068	0.0068	0.0103	0.0000	0.0091
Roscoff	0.0143	0.0102	0.0079	0.0113	0.0113	0.0125	0.0091	0.0000



Figuur 6:

Afstanden tussen de verschillende isolaten *Ascophyllum nodosum* berekent met PHYLIP grafisch weergegeven.

Discussie en conclusies

Bij alle isolaten die zelf zijn verzameld, was het erg moeilijk om de volledige ITS-sequenties te verkrijgen. Het signaal van het gebonden label was erg zwak en de films die werden ontwikkeld waren grotendeels zwak. Opvallend was het, dat er in de gedeeltes waar veel G's en C's achterelkaar voorkwamen bij de meeste reacties een stop aanwezig was. Na deze stops werd het signaal zo zwak dat niet verder kon worden gelezen. Hierdoor was de lengte van de gelezen fragmenten niet langer dan 300 bp, terwijl bij een normale film tot ongeveer 600 bp gelezen kan worden. Waarschijnlijk was de concentratie aan recombinant-DNA niet erg hoog, waardoor het label ook niet goed kon binden.

Uit de ITS 1 - ITS 2 fragmenten blijkt duidelijk, dat de isolaten uit de verschillende plaatsen genotypisch zo weinig verschillen, dat ze allemaal tot één soort behoren. Dit is goed te zien in de afstandenmatrix (Tabel 5), het grootste verschil is slechts 2.66%, dit tussen Göteborg en Isle of Man.

Ook al zijn de verschillen klein, er is duidelijk te zien dat de isolaten uit Schotland en Ierland in één groep zitten en dat Delfzijl, Göteborg en Tjärnö ook bij elkaar horen. Onverwacht is het grote verschil van the Isle of Man met Schotland en Ierland en dat Roscoff ook relatief veel verschilt met de Europese westkust. Het is wel zo dat van the Isle of Man alleen de ITS 2 sequentie aanwezig was en dat de verschillen in het ITS 1-gedeelte niet bekend zijn, hetgeen de resultaten nog zou kunnen veranderen. De sequenties uit Roscoff en the Isle of Man zijn uit de literatuur afkomstig en het is niet mogelijk om de ruwe data te vergelijken met de data die hier zijn verkregen.

Ook is te zien dat de afstandenfiguur gemaakt met PHYLIP (Figuur 6) redelijk overeen komt met de figuren gemaakt met PAUP. Dit maakt de aanname van de figuren met PAUP waarschijnlijker. De lengten in deze figuur komen overeen met het verschil tussen de isolaten en hierin valt ook weer het grote verschil van the Isle of Man op.

Om aan de analyse een outgroup toe te kunnen voegen, was het de bedoeling om ook een isolaat van de andere kant van de Atlantische Oceaan te verkrijgen. Helaas is dit niet mogelijk geweest en is de analyse zonder gedaan. Dit betekent dat er geen richting aan de boom gegeven kan worden.

Als de verschillende MPT's met elkaar vergeleken worden is er bijna geen verschil te zien. De verschillen bevinden zich tussen de isolaten uit Delfzijl, Tjärnö en Göteborg. Hierbij zijn de verschillen ontstaan door 1 stap, die op drie verschillende manieren kan worden genomen. Verder is de rest van de boom identiek. Als de consensusboom wordt bekeken, komt ook weer naar voren dat er twee groepen zijn, die van Schotland en Ierland en die van Delfzijl, Tjärnö en Göteborg. Bij de bootstraps is te zien (Figuur 4a), dat in 72% van de gevallen Delfzijl, Tjärnö, Göteborg samengaan, dat in 91% van de gevallen Delfzijl, Tjärnö, Göteborg, Schotland 'Marien en Estuarien' en Ierland samengaan en dat in 62% van de gevallen Schotland 'Marien en Estuarien' met Ierland samengaan. Dat laatste is een niet al te hoge waarde. De grens is een onderwerp waar nog veel discussie over is, maar deze ligt ongeveer bij 75%, wil dit een redelijke waarde zijn.

Dat deze waarde laag is komt waarschijnlijk door de lage hoeveelheid informatieve posities, waardoor één verschil al een grote invloed op het aantal MPT's heeft. Hier staat tegenover dat de MPT's een hoge g1 en CI waarde hebben, wat wil zeggen dat er wel een hoog fylogenetisch signaal is (Hillis & Heulsenbeck 1992)

Opvallend is de repeat, die in het ITS 2-gedeelte aanwezig is en de variatie die hierin is te zien. De informatieve waarde van deze repeat is nog niet te bepalen, omdat geen analyse is gedaan binnen de verschillende populaties. De mogelijkheid bestaat dat de repeat binnen een populatie variabel zou kunnen zijn.

Als dit niet zo is, dan zouden de verschillende populaties aan deze repeat herkenbaar kunnen zijn.

Hier staat tegenover dat de vele rDNA-cistron repeats onder invloed staan van concerted evolution. Dit betekent; Als er een mutatie optreedt in één repeat van het ITS2 van een individu binnen een populatie, dat alle rDNA-cistronen van dit individu, deze verandering ook zouden kunnen ondergaan (Zimmer *et al.* 1980). Dit maakt de variabiliteit binnen een populatie moeilijker.

Opvallend aan de sequentie van the Isle of Man is de insertie op positie 872-885 van het alingment. Vreemd hieraan is dat deze alleen hier voorkomt en niet in de andere isolaten. Mogelijk is deze populatie zo geïsoleerd, dat deze mutatie zich eenmaal heeft voorgedaan en binnen de populatie is gebleven. Leesfout(en) zou een andere verklaring kunnen zijn.

De MPT's die verkregen zijn 'zonder gaps', 'gap als vijfde base', 'uitsluiting van de repeat' en 'uitsluiting van basen 872-885' (niet afgebeeld) hadden een zelfde topologie als de boom zonder manipulatie. Dit betekent dat de uitgesloten gedeeltes geen tot weinig informatieve waarden bevatten. De veranderingen, die tussen de nucleotiden zijn ontstaan geven dus genoeg informatie over de relatie tussen de isolaten.

De vraag of *A. nodosum* *ecad mackaii* een andere soort is of niet, kon niet worden behandeld omdat er geen materiaal aanwezig was. Wel was het mogelijk om een estuarien en een marien monster uit Schotland met elkaar te vergelijken. Hierbij is te zien dat er erg weinig verschil tussen beide is, maar in de repeat heeft het mariene monster twee tetra nucleotiden sequenties meer dan het estuariene. Dit zou er op kunnen duiden dat dit twee verschillende populaties zijn of dat de variatie, zoals eerder gezegd binnen de populatie hier variabel is.

Dankwoord

Hierbij wil ik Andrew M. Johnston (monsters Schotland) en Jeanine Olsen (monsters Ierland) bedanken voor het verzamelen en opsturen van de monsters van de verschillende isolaten.

Ook wil ik Onno, Edwin, Han en Erwin bedanken voor alle hulp en advies die ik in het lab van hun heb gekregen.

Tot slot wil ik Wytze Stam, Stella Boele-Bos bedanken voor het begeleiden van mijn eerste afstudeeronderwerp.

Referenties:

- Bakker F.T., 1995. Time spans and spacers: Molecular phylogenetic explorations in the *Cladophora* complex (Chlorophyta) from the perspective of rDNA gene and spacer sequences. Proefschrift Rijks Universiteit Groningen, 119 pg.
- Cousens R., 1984. Estimation of annual production by the intertidal brown alga *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis. *Botanica Marina*, 27: 217-227.
- Devereux J., Haeberli P., Smithies O. 1984., A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nuc. Acids Res.*, 12: 387-395.
- Doyle J.J., Doyle J.L., 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12 no. 1.
- Felsenstein J., 1989. PHYLIP: Phylogeny inference package. *Cladistics*, 5: 164-6.
- Futuyama D.J., 1986. *Evolutionary biology*. Sinauer associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 600pg.
- Gerbi S.A., 1985. Evolution of ribosomal DNA. In: MacIntyre, R.J. (Ed). *Molecular evolutionary genetics*. Plenum Press, New York, 419-517.
- Gibb D.C., 1957. The Free-living forms of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. *J.Ecol.*, 45: 49-83.
- Hillis D.M., Heulsenbeck J.P., 1992. Signal, noise, and reliability in molecular phylogenetic analyses. *J.Hered.*, 83: 189-195.
- Kooistra W.H.C.F., 1993. Historical biography in tropical Atlantic populations of *Cladophoropsis membranacea* and related species. Proefschrift Rijksuniversiteit Groningen, 111pg.
- Kumar S., Tamura K., Nei M., 1993. MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 1.01). The Pennsylvania State University Park, Pennsylvania 16802.
- LeClerc M.C., 1998. Low divergence in rDNA ITS sequences among five species of *Fucus* (Phaeophyceae) suggests a very recent radiation. *Journal of Molecular Evolution*, 46(1): 115-120.
- Maddison W.P., Maddison D.R., 1992. *MacClade: Analysis of phylogeny and character evolution*, version 3.0. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Manhart J.R., McCourt R.M., 1992. Molecular data and species concepts in algae. *J.Phycol.*, 28: 730-737.
- Moss B.L., 1970. Meristems and growth control in *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. *New Phytol.*, 69: 253-260.
- Moss B.L., 1971. Meristems and morphogenesis in *Ascophyllum nodosum* ecad *Mackaii* (Cotton). *Br.Phycol*, 6 (2): 187-193.
- Olsen J.L., Stam W.T., Berger S., Menzel D., 1994. 18S rDNA evolution in the Dasycladales (Chlorophyta): modern living fossils. *J.Phycol.*, 30: 729-744
- Oppen M.J.H. van, 1995. Tracking trails and cracking codes: molecular biogeography and evolution of benthic cold-water seaweeds. Proefschrift Rijksuniversiteit Groningen, 163 pg.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 3 vols.
- Swofford D.L., 1993. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 3.1.1. *Lab. Mol. Sys.*, SI, Washington DC 20560.
- Zimmer E.A., Martin S.L., Beverly S.M., Kan Y.W., Wilson A.C., 1980. Rapid duplication and loss of genes coding for the α chain of hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 2158-2162. [15]