



# ***Fylogenetische analyse en cryptische biodiversiteit van het *Gyratrix hermaphroditus* soortencomplex***

**Rob Robeyns**

promotor :  
Prof. dr. Tom ARTOIS

co-promotor :  
dr. Wim WILLEMS

## Inhoudsopgave

1. Lijst met figuren en tabellen.....	3
2. Samenvatting.....	5
3. Inleiding.....	6
3.1. Algemeen.....	6
3.2. <i>Gyratrix hermaphroditus</i> .....	7
3.2.1. Systematische situering.....	7
3.2.2. Morfologie van <i>Gyratrix hermaphroditus</i> .....	7
3.2.3. Het <i>Gyratrix hermaphroditus</i> soortencomplex.....	8
3.3. Optimalisatie van het PCR proces.....	9
3.3.1. Selectie en ontwikkeling van de primer.....	9
3.3.2. Verhoging van de specificiteit van het PCR proces.....	10
3.4. Fylogenetische analyses.....	10
3.4.1. Achtergrond.....	10
3.4.2. Opstellen van datamatrices.....	11
3.4.3. Parsimonie analyse.....	12
3.4.4. Bayesian Inference.....	14
3.5. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR).....	17
3.5.1. Achtergrond.....	17
4. Materiaal en methoden.....	18
4.1. Staalname.....	18
4.2. DNA extractie en PCR amplificatie.....	18
4.3. Optimalisatie van de primers.....	19
4.3.1. Optimalisatie van het 16S primerpaar.....	19
4.3.2. Optimalisatie van het COI primerpaar.....	20
4.3. 2D-gelelektroforese en opzuivering.....	21
4.4. Fylogenetische analyses.....	21

4.4.1. Assemblage van de forward en reverse sequentie .....	21
4.4.2. Alligneren .....	21
4.4.3. Parsimonie analyse.....	22
4.4.4. Bayesian Inference .....	22
4.5. Optimalisatie van de ISSR techniek.....	22
5. Resultaten.....	24
5.1. Optimalisatieproces van het 16S primerpaar.....	24
5.2. Fylogenetische analyses van het 16S gen .....	27
5.2.1. Parsimonie analyse.....	27
5.2.2. Bayesian inference .....	28
5.3. Fylogenetische analyses van het COI gen.....	29
5.3.1. Parsimonie analyse.....	29
5.3.2. Bayesian Inference .....	30
5.4. Fylogenetische analyses van het ITS1 gen.....	31
5.4.1. Parsimonie analyse.....	31
5.4.2. Bayesian Inference .....	33
5.5. Optimalisatie van de ISSR techniek.....	34
6. Discussie .....	38
6.1. Optimalisatieproces van het 16S primerpaar.....	38
6.2. Fylogenetische analyses van het 16S gen .....	39
6.3. Fylogenetische analyses van het COI gen.....	40
6.4. Fylogenetische analyses van het ITS1 gen.....	40
7. Conclusie en synthese .....	42
8. Dankwoord .....	44
9. Referenties .....	46
10. Bijlage .....	48

# 1. Lijst met figuren en tabellen

Figuur	Titel	Pagina
<b>Figuur 1</b>	Getekende illustratie van <i>Gyratrix hermaphroditus</i> waarop de voornaamste morfologische structuren worden weergegeven (naar . Karling T.G., <i>Die turbellarien ostfennoskandien</i> ; 1963)	8
<b>Figuur 2</b>	Microscopische foto van <i>Gyratrix hermaphroditus</i> (foto: B. Egger)	8
<b>Figuur 3</b>	PCR product na amplificatie met het 16SarL en 16SbrH primerpaar, gebruik makend van het bijhorende PCR protocol (Palumbi et al, 1991).	24
<b>Figuur 4</b>	PCR product na amplificatie met het 16SarL en 16SbrH primerpaar, gebruik makend van een temperatuursgradiënt om de meest geschikte annealingstemperatuur te bepalen.	24
<b>Figuur 5</b>	PCR product na amplificatie met het 16SarL en 16SbrH primerpaar, waarbij de onderste bandjes afkomstig zijn van <i>Gyratrix hermaphroditus</i> . De bovenste bandjes zijn contaminatie van menselijk 16S DNA.	25
<b>Figuur 6</b>	Cladogram van het 16S gen met bootstrap ondersteuningswaarden. Gt35 ( <i>Neopolycystis tridentata</i> ) en Gt34 ( <i>Gyratrix proavus</i> ) werden gekozen als outgroup voor de parsimonie analyse.	27
<b>Figuur 7</b>	Cladogram van het 16S gen met bijhorende posterior probability waarden. Gt35 ( <i>Neopolycystis tridentata</i> ) en Gt34 ( <i>Gyratrix proavus</i> ) werden gekozen als outgroup voor de Bayesian inference analyse. De legende geeft de maat van divergentie weer.	28
<b>Figuur 8</b>	Cladogram van het COI gen met bootstrap ondersteuningswaarden. Gt21 ( <i>Neopolycystis tridentata</i> ) werd gekozen als outgroup voor de parsimonie analyse.	29
<b>Figuur 9</b>	Cladogram van het COI gen met bijhorende posterior probability waarden. Gt21 ( <i>Neopolycystis tridentata</i> ) werd gekozen als outgroup voor de Bayesian inference analyse. De legende geeft de maat van divergentie weer.	30
<b>Figuur 10</b>	Cladogram van het ITS1 gen met bootstrap ondersteuningswaarden. Gt73_74 ( <i>Gyratrix proavus</i> ) werd gekozen als outgroup voor de parsimonie analyse.	31
<b>Figuur 11</b>	Cladogram van het ITS1 gen met bijhorende posterior probability waarden. Gt73_74 ( <i>Gyratrix hermaphroditus</i> ) werd gekozen als outgroup voor de Bayesian inference analyse. De legende geeft de maat van divergentie weer.	33
<b>Figuur 12</b>	Visualisatie van het PCR product op een 2% agarose gel na amplificatie met de SAS1 primer. Links bevindt zich een moleculaire ladder gevolgd door drie verschillende populaties van <i>Gyratrix hermaphroditus</i> (steeds 2 herhalingen). Rechts bevindt zich de negatieve controle (enkel primer).	35
<b>Figuur 13</b>	Visualisatie van het PCR product op een 2% agarose gel na amplificatie met de SAS3 primer. Links bevindt zich een moleculaire ladder gevolgd door drie verschillende populaties van <i>Gyratrix hermaphroditus</i> (steeds 2 herhalingen). Rechts bevindt zich de negatieve controle (enkel primer).	35
<b>Figuur 14</b>	Visualisatie van het PCR product op een 2% agarose gel na amplificatie met de SAS1 primer. Links bevindt zich een moleculaire ladder gevolgd door de PCR producten van een individu van <i>Gyratrix hermaphroditus</i> bij verschillende annealingtemperaturen. Rechts bevinden zich drie negatieve controles (enkel primer; bij verschillende annealingtemperaturen).	36
<b>Figuur 15</b>	Visualisatie van het PCR product op een 2% agarose gel na amplificatie met de SAS3 primer. Links bevindt zich een moleculaire ladder gevolgd door de PCR producten van een individu van <i>Gyratrix hermaphroditus</i> bij verschillende annealingtemperaturen. Rechts bevinden zich drie negatieve controles (enkel primer; bij verschillende annealingtemperaturen).	36
<b>Figuur 16</b>	Visualisatie van het PCR product op een 2% agarose gel na amplificatie met de SAS1 en SAS3 primers. Links bevindt zich een moleculaire ladder gevolgd door het PCR product van de SAS1 primer van een individu v <i>Gyratrix hermaphroditus</i> na 55 PCR cycli bij een annealingtemperatuur van 59°C. Rechts: het PCR product van de SAS3 primer van een <i>Gyratrix hermaphroditus</i> individu na 55 PCR cycli bij een annealingtemperatuur van 59°C. BL is de negatieve controle.	37
<b>Figuur 17</b>	Visualisatie van het PCR product op een 2% agarose gel na amplificatie met de SAS1 en SAS3 primers. Links: een moleculaire ladder gevolg door het PCR product van de SAS1 primer van een <i>Gyratrix hermaphroditus</i> individu met een primerconcentratie van 4µM bij een annealingtemperatuur van 58°C. Rechts: het PCR product van de SAS3 primer van een <i>Gyratrix hermaphroditus</i> individu met een primerconcentratie van 4µM bij een annealingtemperatuur van 58°C. BL is de negatieve controle.	37

<b>Tabel</b>	<b>Titel</b>	<b>Pagina</b>
<b>Tabel 1</b>	Voorbeeld van een moleculaire datamatrix opgebouwd door de DNA sequenties van de verschillende soorten te alligneren, waarbij de liggende streepjes in de datamatrix de gaps in het allignement aan duiden.	12
<b>Tabel 2</b>	Naam en sequentie van de forward en reverse primers per gen met hun bijhorend PCR protocol. Voor het COI gen werd een Touchdown protocol gevolgd. Dit protocol startte met een hogere annealingtemperatuur en bouwde deze stelselmatig af. Tijdens het afbouwen van de annealingtemperatuur werden er maar vier cycli doorlopen.	19
<b>Tabel 3</b>	Primers met hun bijhorende sequentie en de grootte van de bandjes uitgedrukt in het aantal basenparen (bp). De primers en het PCR protocol werden ontwikkeld door Lai, T et al (2008).	23
<b>Tabel 4</b>	Lokaliteit, coördinaten en habitat per genotype. Gt34 en Gt35 vormen de outgroup in de parsimonie en Bayesian inference analyses.	48
<b>Tabel 5</b>	Lokaliteit en habitat per genotype. Gt21 vormt de outgroup in de parsimonie en Bayesian inference analyses.	48-49
<b>Tabel 6</b>	Lokaliteit en habitat per genotype. Gt73_74 vormt de outgroup in de parsimonie en Bayesian inference analyses.	49-50

## 2. Samenvatting

De systematiek rond kosmopoliete soorten is nog steeds een punt van discussie. Men veronderstelt een grote maat van verborgen diversiteit binnen deze kosmopoliete soorten, dat men met de term cryptische biodiversiteit aanduidt. Een uniek soortencomplex is de vrijlevende platworm *Gyratrix hermaphroditus* Ehrenberg, 1831 (Kalyptorhynchia, Platyhelminthes). *Gyratrix hermaphroditus* wordt wereldwijd teruggevonden in allerlei zoet- en brak water habitats, maar ook in mariene milieus. Uit gedetailleerde karyologische en morfologische studies werd aangetoond dat *Gyratrix hermaphroditus* een cryptisch soortencomplex vormt. Deze observaties zijn echter te fragmentair om een degelijke taxonomische interpretatie en reconstructie van de evolutionaire geschiedenis van dit soortencomplex toe te laten.

In het kader van deze problematiek zullen in deze studie voor het eerst DNA sequenties van twee mitochondriale genen (16S, COI) en één nucleair gen (ITS1) gebruikt worden om de genetische variatie, verwantschappen en biogeografie binnen het *Gyratrix hermaphroditus* soortencomplex te bestuderen. In een eerste fase wordt er DNA geëxtraheerd uit *Gyratrix hermaphroditus* afkomstig uit verschillende geografische gebieden wereldwijd. Door vervolgens gebruik te maken van specifieke primers wordt het gewenste DNA fragment geamplificeerd in een PCR reactie. Omdat er geen data voorhanden zijn van de beste primercombinaties en het PCR-protocol bij *Gyratrix hermaphroditus*, dienen deze eerst geoptimaliseerd te worden voor elk verschillend DNA fragment. Eenmaal de amplificatie van de fragmenten succesvol verlopen is, kunnen deze gesequeneerd worden.

Door de verkregen sequenties te analyseren aan de hand van een parsimonie- en een Bayesian inference analyse kunnen er bepaalde conclusies getrokken worden. Zo blijken er enkele biogeografische patronen aan het licht te komen tussen Zuid-Afrikaanse en Indische populaties en tussen twee Noord-Amerikaanse/Canadese populaties voor de 16S en ITS1 analyses. Vervolgens geven de resultaten van de fylogenetische analyses een zeer hoge variatie van de genen weer tussen de verschillende populaties van *Gyratrix hermaphroditus*. Dit wijst erop dat er zeker sprake is van meerdere soorten binnen het cryptisch soortencomplex van *Gyratrix hermaphroditus*.

### 3. Inleiding

#### 3.1. Algemeen

Wereldwijd verspreide soorten, ook wel kosmopoliete soorten genoemd, hebben recent een belangrijke plaats ingenomen in het onderzoek naar de evolutionaire biologie, biogeografie en biodiversiteit. Een kosmopoliet verspreidingspatroon kan op twee verschillende manieren worden veroorzaakt. Enerzijds kunnen organismen zich verspreiden vanuit hun oorspronkelijk verspreidingsgebied en zich op nieuwe plaatsen vestigen, een fenomeen dat men dispersie noemt. Anderzijds kan er een deel van een populatie afgescheiden worden door een geografische barrière, wat uiteindelijk resulteert in de splitsing van een populatie in meerdere geïsoleerde subpopulaties. Een kosmopoliete verspreiding wordt dan verklaard door het feit dat de soort wijd verspreid was ten tijde van het supercontinent Pangea (250 – 225 Ma), en na het opsplitsen van dit supercontinent op elk continent blijven bestaan is, tot op de dag van vandaag. Dit fenomeen noemt men vicariantie [1-3]. Ongeacht welk mechanisme verantwoordelijk is voor het ontstaan van kosmopoliete soorten, dienen zulke soorten te beschikken over een hogere tolerantie en aanpasbaarheid aan een breed spectrum van omgevingsfactoren.

Na grondige moleculaire fylogenetische analyses is in recentere tijden echter gebleken dat vele van deze kosmopoliete soorten geen echte soorten zijn. Hoewel vele populaties morfologisch ononderscheidbaar zijn, blijken zij vaak genetisch evenveel (of zelfs meer) van elkaar te verschillen dan morfologisch te onderscheiden soorten. Deze “verborgen” diversiteit duidt men algemeen aan met de term cryptische biodiversiteit. Kosmopoliete “soorten” blijken dus vaak groepen van dergelijke cryptische soorten te zijn, wat tot gevolg heeft gehad dat, althans voor taxa waar veel dergelijke cryptische soorten voorkomen, de werkelijke biodiversiteit zwaar onderschat is [4].

Een uniek soortencomplex is de vrijlevende platworm *Gyatrix hermaphroditus* Ehrenberg, 1831 (Kalyptorhynchia, Platyhelminthes). *Gyatrix hermaphroditus* wordt wereldwijd teruggevonden in allerlei zoet- en brak water habitats, maar ook in mariene milieus, wat zelfs uniek is binnen de Metazoa. Verder wordt *Gyatrix hermaphroditus* teruggevonden van de diepzee tot de hoogste bergtoppen. Uit gedetailleerde karyologische en morfologische studies werd aangetoond dat *Gyatrix hermaphroditus* een cryptisch soortencomplex vormt. Deze observaties zijn echter te fragmentair om een degelijke taxonomische interpretatie en reconstructie van de evolutionaire geschiedenis van dit soortencomplex toe te laten [5].

In het kader van deze problematiek zullen in deze studie voor het eerst DNA sequenties van verschillende genen gebruikt worden om de genetische variatie, verwantschappen en biogeografie binnen het *Gyatrix hermaphroditus* soortencomplex te bestuderen.



Gedurende de seniorstage worden moleculaire technieken en fylogenetische analyses gebruikt om de cryptische biodiversiteit van *Gyratrix hermaphroditus* te onderzoeken. In een eerste fase wordt er DNA geëxtraheerd uit *Gyratrix hermaphroditus* afkomstig van verschillende gebieden wereldwijd. Door vervolgens gebruik te maken van specifieke primers wordt het gewenste DNA fragment geamplificeerd in een PCR reactie. Omdat er geen data voorhanden zijn van de beste primercombinaties en het PCR-protocol bij *Gyratrix hermaphroditus*, dienen deze eerst geoptimaliseerd te worden voor elk verschillend DNA fragment. Eenmaal de amplificatie van de fragmenten succesvol verlopen is, kunnen deze gesequeneerd worden. Vervolgens worden alle sequenties gealigneerd en kan er aan de hand van de fylogenetische analyses informatie verkregen worden over de evolutionaire verwantschappen van de verschillende *Gyratrix hermaphroditus* populaties. Uiteindelijk geven deze studies een eerste indruk van de biodiversiteit binnen het *Gyratrix hermaphroditus* soortencomplex.

## 3.2. Gyratrix hermaphroditus

### *3.2.1. Systematische situering*

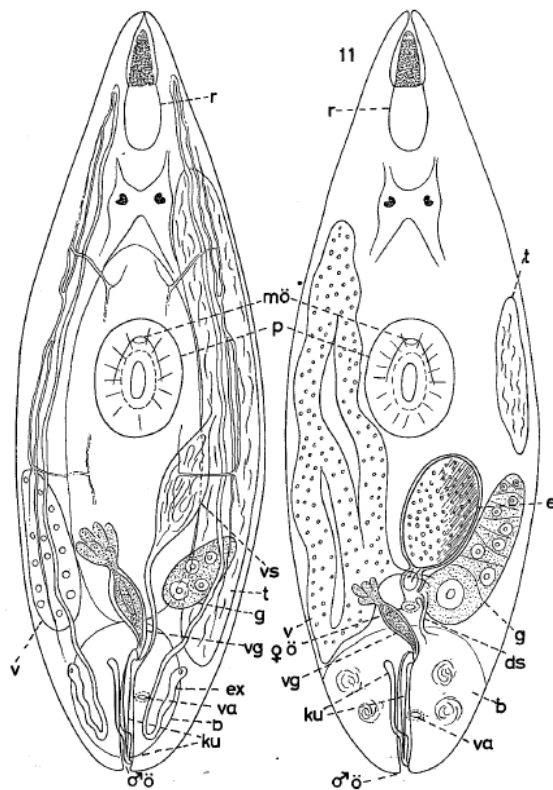
*Gyratrix hermaphroditus* Ehrenberg, 1831 is een rhabdocoele platworm (Rhabdocoela, Platyhelminthes), van de familie Polycystididae Graff, 1882. Naast *Gyratrix hermaphroditus* zijn er nog drie nauw verwante soorten beschreven: *Gyratrix proaviformis* (marien; Oregon, USA) [6], *Gyratrix proavus* (marien; Noord-Europese Atlantische kust, Middellandse Zee) [7] en *Gyratrix sinensis* (zoet water; China) [8].

*Gyratrix hermaphroditus* behoort tot de Neophora, een taxon dat wordt gekenmerkt door de opdeling van het oorspronkelijk ovarium in een eicelproducerend gedeelte (het eigenlijk ovarium, ook wel germarium genoemd) en een dooierproducerend gedeelte, dat vitellarium wordt genoemd. Verder is *Gyratrix hermaphroditus* tweeslachtig zoals alle andere platwormen.

### *3.2.2. Morfologie van Gyratrix hermaphroditus*

*Gyratrix hermaphroditus* is 1-2 mm lang en is over het algemeen kleurloos tot geelachtig, hoewel er gevallen bekend zijn met een donkere pigmentatie. De algemene morfologie wordt weergegeven in figuren 1 en 2. Achter de vooraangelegen proboscis (r), een gespierd orgaan dat gebruikt wordt om prooien te vangen, bevindt zich een paar ogen. De farynx (p) is kogelvormig, relatief klein en ongeveer in het midden gelegen. Het excretiekanaal (ex) is vooral bij zoet water vormen goed ontwikkeld en bestaat uit een paar protonephridia. De gonaden zijn onpaar. De testis (t) ligt aan een kant van het lichaam en strekt zich uit van het niveau van de ogen tot aan het copulatie-orgaan. De

vas deferens ontspringt ongeveer in het midden van de testes en verwijdt zich tot een spoelvormige vesicula seminalis (vs), van waaruit de lange ductus ejaculatorius vertrekt, die in het mannelijk genitaalkanaal ( $\sigma^{\circ}$ ) uitkomt. Naast de ductus ejaculatorius ligt de spoelvormige prostaatblaas (vg). Het mannelijk voortplantingsorgaan (ku) bestaat uit een recht tot zwak gebogen spits stilet, dat doorheen een stiletschede kan bewegen. De vrouwelijke porus ( $\text{♀}^{\circ}$ ) bevindt zich ventrocaudaal en geeft toegang tot het vrouwelijk antrum. Het geelbruine eikapsel (e) is bolvormig tot eivormig met een korte steel en sterk variabele filamentdruppels. Een dorsocaudale vagina externa (va) leidt naar een grote bursa dorsaal gelegen van het stilet. Een ductus spermaticus (ds) leidt het sperma van de bursa naar het oviduct [9, 10]. Er is echter ook een populatie gekend, afkomstig van de Galapagos, die over twee ducti spermatici beschikt [11].



**Figuur 1:** Getekende illustratie van *Gyratrix hermaphroditus* waarop de voornaamste morfologische structuren worden weergegeven (naar . Karling T.G., *Die turbellarien ostfennoskandien*; 1963)



**Figuur 2:** Microscopische foto van *Gyratrix hermaphroditus* (foto: B. Egger)

### 3.2.3. Het *Gyratrix hermaphroditus* soortencomplex

Tot heden is enkel via morfologische en karyologische studies vastgesteld dat *Gyratrix hermaphroditus* een soortencomplex vormt. Zo werden tussen populaties afkomstig van de Noordzee en Middellandse zee verschillen opgemerkt in de locatie van het centromeer van de

chromosomen. Er werd ook een verschil in de grootte van de stiletten tussen beide populaties vastgesteld [12]. In Roscoff (Frankrijk) werden sympatrisch twee morfologisch en karyologisch verschillende populaties teruggevonden. Hoewel ze hetzelfde chromosomenaantal hebben, verschilt ook hier de locatie van het centromeer. Maar ook de lengte van de chromosomen en de absolute lengte van het haploïd genoom komen niet overeen. Verder varieerde de grootte van het lichaam en het mannelijk voortplantingsorgaan tussen de twee populaties. De Roscoff populaties waren ook duidelijk verschillend van de Noordzee en Middellandse zee populaties [13].

Uit een studie met populaties afkomstig van West-Europa blijkt dat *Gyratrix hermaphroditus* tot een soortencomplex behoort waarbij de populaties karyologische, morfologische en ecologische verschillen vertonen. Zo beschikken de mariene populaties over zes chromosomen terwijl de zoetwater populaties maar over vier chromosomen beschikken [14]. Ook in het gebied rond Darwin (Northern Territory, Australië) werden verschillende *Gyratrix hermaphroditus* populaties onderzocht. Men stelde een verschil vast in karyotype (vier of zes chromosomen), locatie van het centromeer, genoomlengte en stiletgrootte. Deze populaties verschilden echter van de Europese populaties doordat de zoetwater populatie niet uitsluitend vier chromosomen bevat en de zoutwater populatie niet noodzakelijk zes chromosomen telt [15].

### 3.3. Optimalisatie van het PCR proces

#### *3.3.1. Selectie en ontwikkeling van de primer*

Omdat het *Gyratrix hermaphroditus* complex nog nooit moleculair was onderzocht, dienden in eerste instantie primers ontwikkeld te worden om de amplificatie van de gewenste genen mogelijk te maken. Een basisregel tijdens de ontwikkeling van een primerpaar is dat hoe meer er over de DNA sequentie geweten is, des te groter de kans is op het vinden van het "ideale" primerpaar. Bij de selectie van PCR primers dienen enkele belangrijke parameters in acht genomen te worden. Zo moet de primer een stabiele binding aangaan met het te amplificeren deel van het DNA, en niet met andere primermoleculen of een ongewenst deel in de DNA sequentie. Daarom is het belangrijk dat de primers geen significante complementariteit in hun 3' uiteinde bevatten, omdat dit de vorming van primer-dimer artefacten bevordert waardoor de PCR opbrengst drastisch verlaagd wordt.

Ten tweede dient de primer zo stabiel mogelijk te zijn. De stabiliteit van een primer wordt bepaald door zijn lengte (aantal nucleotiden), de GC/AT ratio en de smelttemperatuur. Voor een PCR product van ongeveer 500 basenparen, is het aangewezen om een primer van 18 à 21 nucleotiden lang te selecteren. De GC/AT ratio en de smelttemperatuur van de primer en het te amplificeren DNA liggen best zo dicht mogelijk bij elkaar zodat er een stabiele binding kan ontstaan [16].

### *3.3.2. Verhoging van de specificiteit van het PCR proces*

Primerparen werken echter niet allemaal met dezelfde reactiecondities. In sommige gevallen zal een primerpaar onder standaard condities zeer efficiënt werken en een uniek PCR product opleveren. Het is echter ook mogelijk dat onder dezelfde condities, maar met een ander primerpaar, helemaal geen product geamplificeerd kan worden. Aangezien de condities voor elk primerpaar variëren, start men meestal met standaard condities die vervolgens verder worden geoptimaliseerd. Indien er geen optimale amplificatie optreedt, kan het verhogen of verlagen van de strengheid van enkele reactieparameters tot het gewenste effect leiden. De belangrijkste reactieparameters die de specificiteit van een PCR reactie beïnvloeden, zijn de annealing temperatuur, het cycling regime en de buffer compositie [17].

## 3.4. Fylogenetische analyses

### *3.4.1. Achtergrond*

De mens heeft altijd de neiging gehad om grote hoeveelheden elementen te ordenen, waarbij de ordening vaak gebaseerd wordt op een aantal criteria die als vanzelfsprekend worden aanvoeld. Doordat elk niveau aan een ander criterium moet voldoen, kunnen deze groepen steeds verder onderverdeeld worden. Op deze manier probeert de mens ook de levende natuur op te delen in verschillende groepen. De wetenschap die zich bezighoudt met het indelen van organismen in hiërarchische groepen is de systematiek.

De denkpatronen binnen de systematiek bleven door de eeuwen heen niet onveranderd. Begin 18<sup>e</sup> eeuw voerde Carolus Linnaeus een systeem in van hiërarchische categorieën. Voor elk van deze groepen werd een diagnostisch kenmerk gegeven dat een organisme moest bezitten om tot die bepaalde groep te behoren. Het systeem weerspiegelde het creationistisch wereldbeeld van Linnaeus. Volgens hem had God de wereld geschapen en geordend in steeds meer omvattende groepen en het door hem voorgestelde systeem was dus een poging om deze orde te achterhalen.

In 1858, met de publicatie van Darwin's evolutietheorie, werd al snel duidelijk dat God de wereld niet had geschapen, en dat de gelijkenissen die men tussen organismen ziet het resultaat zijn van een gemeenschappelijke afkomst. De toepassing van Linnaeus' manier van het indelen van organismen met de evolutietheorie als verklarende theorie voor de gelijkenis tussen organismen noemt men de evolutionaire systematiek. Naast de uitbreiding van het aantal categorieën is het belangrijkste verschil met de oorspronkelijke werkwijze van Linnaeus het feit dat de diagnose niet gevormd wordt door een kenmerk, maar meestal door een combinatie van kenmerken.

De evolutionaire systematiek is tot voor zeer kort de meeste verspreide methodologie binnen de systematiek geweest. Zij heeft echter een aantal zwakke punten. Een van de grootste kritieken is het feit dat de evolutionaire systematiek een grote mate van subjectiviteit in het indelen van de organismen toelaat. Een kenmerk dat door sommige wetenschappers als belangrijk wordt beschouwd, kan door andere wetenschappers dan weer gezien worden als onbelangrijk. Dit leidt vaak tot verschillende indelingen van hetzelfde organisme waardoor er alternatieve classificaties ontstaan. Er is geen objectieve methode om uit te maken welke classificaties de beste is, wat resulteert in de omloop van verschillende alternatieven. Bovendien bestaat er vaak discussie over het niveau van de groep die erkend wordt. Sommige wetenschappers zullen een bepaald organisme in een hogere hiërarchische groep plaatsen terwijl andere opteren voor een lagere hiërarchische indeling.

Het is dan ook niet verwonderlijk dat er alternatieve methoden zijn ontwikkeld die deze vorm van subjectiviteit proberen tegen te gaan. De belangrijkste ontwikkelingen zijn de fenetische systematiek, ook wel numerieke taxonomie genoemd, en de fylogenetische systematiek of cladistiek. Vooral de cladistiek heeft de laatste 30 jaar een hoge vlucht genomen en heeft in de wetenschappelijke kringen de evolutieve systematiek bijna volledig verdrongen.

Het doel van de moleculaire fylogenie bestaat eruit om informatie, verkregen door DNA sequenties, om te zetten naar een evolutionaire stamboom of cladogram. Voor het opstellen van deze stambomen zijn een groot aantal verschillende methodes voorhanden. Gedurende de stage werd er geopteerd voor twee fylogenetische analyses, namelijk de parsimonie analyse en Bayesian inference.

#### *3.4.2. Opstellen van datamatrices*

Voordat er gestart kan worden met een fylogenetische analyse dienen de verschillende DNA sequenties eerst opgenomen te worden in een moleculaire datamatrix. Hierbij kan ook data van eiwitanalyses gebruikt worden, maar voor de overgrote meerderheid gebruikt men nucleotidesequenties van één of enkele genen van de soorten waarin men geïnteresseerd is. Een moleculaire datamatrix is eigenlijk niet meer dan de gealigneerde sequenties van de soorten die men bestudeert. Een moleculaire matrix gebaseerd op een DNA sequentie ziet er als volgt uit:

**Tabel 1: Voorbeeld van een moleculaire datamatrix opgebouwd door de DNA sequenties van de verschillende soorten te alligneren, waarbij de liggende streepjes in de datamatrix de gaps in het allignement aan duiden.**

<b>Soort 1</b>	A	G	A	T	G	C	Enz.
<b>Soort 2</b>	G	G	-	A	A	-	Enz.
<b>Soort 3</b>	G	G	G	C	-	A	Enz.
<b>Soort 4</b>	C	T	T	A	-	A	Enz.
<b>Enz.</b>	Enz.	Enz.	Enz.	Enz.	Enz.	Enz.	Enz.

### 3.4.3. Parsimonie analyse

De parsimonie of spaarzaamheidsanalyse is de oudste en eenvoudigste fylogenetische techniek. Aan de hand van deze analyse wordt gezocht naar de fylogenie of cladogram die het minst aantal evolutionaire “stappen” veronderstelt. Volgens het spaarzaamheidsprincipe is immers de meest eenvoudige verklaring van de data de beste verklaring. Een exacte parsimonie analyse start met het opstellen van alle mogelijke ongewortelde cladogrammen, gebaseerd op de gegeven datamatrix. Een ongeworteld cladogram is een voorstelling waarbij alle taxa met elkaar verbonden zijn, maar het start- en eindpunt zijn niet gekend. De verschillende taxa worden dus als het ware steeds in een andere volgorde aan elkaar gekoppeld. Het meest spaarzame cladogram is die volgorde van taxa waarbij het minste aantal DNA-basesubstituties moet worden verondersteld tussen de DNA sequenties. Deze methode noemt men exact, omdat het voor kleine datamatrices altijd de kortste cladogrammen vindt [18].

Als het aantal taxa in de datamatrix stijgt, zal automatisch het aantal ongewortelde cladogrammen sterk stijgen. De verhouding tussen het aantal taxa en het totale aantal ongewortelde cladogrammen kan met de volgende formule berekend worden:  $N_v = \frac{(2n-5)!}{(n-3)2^{n-3}}$ , waarbij n het aantal taxa weergeeft en  $N_v$  het aantal ongewortelde cladogrammen. Bijvoorbeeld, als er 20 taxa opgenomen worden in de datamatrix heeft dit tot gevolg dat er  $2,22 \times 10^{20}$  mogelijke ongewortelde cladogrammen zijn. Dit is het maximum aantal taxa om de analyse uit te voeren omwille van onvoldoende rekenkracht van de huidige computers. Indien er meer dan 20 taxa worden opgenomen in de datamatrix moet men noodgedwongen opteren voor zogenaamde heuristische zoekalgoritmen. Hoewel deze methoden veel sneller zijn dan de exacte methoden geven ze een benadering en geen zekerheid dat alle kortste cladogrammen gevonden worden. Heuristische methoden bouwen eerst een initiële boom door de willekeurige toevoeging van taxa, waarna ze starten met het zoeken naar kortere bomen door de initiële boom om te vormen, de zogenaamde “branch swapping” procedure. In het programma TNT kunnen drie mogelijke swapping algoritmes gebruikt worden. Bij Nearest Neighbour Interchange (NNI) worden twee aan elkaar grenzende claden met elkaar verwisseld ter hoogte van hun

gemeenschappelijk knooppunt. Deze procedure wordt herhaald voor elk knooppunt van de boom. Subtree Pruning and Regrafting (SPR) verandert de topologie van de boom drastischer, door een volledige clade af te knippen en het op een ander knooppunt te bevestigen. Een laatste mogelijkheid is de Tree Bisection and Reconnection (TBR). Dit algoritme is ongeveer gelijk aan SPR maar verschilt erin dat de subboom opnieuw geworteld wordt voordat hij aan het cladogram wordt vastgemaakt [19].

Na afloop van deze heuristische zoekalgoritmen is het nog niet duidelijk op welke manier de ongewortelde cladogrammen moeten afgelezen worden. Het is dus niet duidelijk waar de meest recente gemeenschappelijke voorouder zich bevindt in het cladogram. Om dit punt te bepalen wordt gebruikt gemaakt van een outgroup. Een outgroup bestaat uit een groep organismen die als referentiegroep functioneren voor het bepalen van de evolutionaire relatie tussen de organismen die bestudeerd worden. Met andere woorden, een outgroup is een organisme waarvan aangenomen kan worden dat deze minder verwant is met elk van de soorten die geanalyseerd worden dan dat deze onderling verwant zijn.

De parsimonie analyse gaat er dus vanuit dat soorten op een parsimone manier evolueren. Maar men heeft geen enkel bewijs dat de evolutie ook werkelijk volgens dit principe verloopt. Daarom is het verwonderlijk dat de parsimonie analyse nog steeds zoveel succes kent. Dit succes kan verklaard worden door het feit dat men het parsimonieprincipe niet meer opvat als een model van evolutie maar als een fundamenteel wetenschapsfilosofisch principe. Omwille van het feit dat de echte evolutie nooit perfect gereconstrueerd kan worden, is elke extra stap in een cladogram dat niet verklaard kan worden aan de hand van data een bijkomende zwakte voor het cladogram als wetenschappelijke hypothese van verwantschap. Het meest parsimone cladogram vormt de beste verklaring voor de data, maar niet noodzakelijk de beste voorstelling van de ware fylogenie.

Er zijn echter nog enkele alternatieve analyses voorhanden, die gebruik maken van substitutiemodellen. Deze modellen geven weer hoe de evolutie vermoedelijk is verlopen. Door gebruik te maken van een bepaald substitutiemodel uitgaande van een alignment van DNA sequenties kan men verwantschappen tussen soorten onderzoeken. Als het substitutiemodel correct gekozen wordt, zal het een cladogram opleveren dat dicht bij de werkelijke fylogenie staat dan een cladogram bekomen door een parsimonie analyse. In het volgende deel wordt een methode besproken die gebruik maakt van substitutiemodellen, namelijk Bayesian inference.

#### 3.4.4. Bayesian Inference

Bayesiaanse statistiek kende zijn oorsprong bij het postuum publiceren van de *Essay Towards Solving a Problem in the Doctrine of Chances*, geschreven door dominee Thomas Bayes in 1763. Bayes ontwikkelde een methode die reeds gekende data in beschouwing neemt indien men de kans op een bepaalde gebeurtenis wil berekenen.

Het Bayes theorema stelt dat  $P(H|D) = \frac{P(H)P(D|H)}{P(D)}$ , ofwel de kans op H, gegeven D is gelijk aan de kans op H maal de kans op D, als H gegeven is, gedeeld door de kans op D. In de Bayesiaanse statistiek worden enkele termen gebruikt om de verschillende delen van het theorema aan te duiden. Zo noemt men de linkerzijde van de vergelijking de “posterior probability”. Deze refereert naar de kans dat een gebeurtenis is opgetreden nadat met de geobserveerde data rekening is gehouden.  $P(H)$  kan men ook benoemen als de “prior probability” of “prior” en is de kans dat een gebeurtenis is opgetreden voordat er ook maar enige data geobserveerd is [20]. Men spreekt over de “likelijkheid” indien men de  $P(D|H)$  term benoemt. Hiermee wordt gerefereerd naar de conditionele kans van de data gegeven de hypothese. Ten slotte rest er nog  $P(D)$  of ookwel de “marginal probability” en wordt gegeven door volgende formule,  $P(D) = \sum_{\text{hypotheses}} P(H) \times P(D|H)$  en is dus de som van de tellers over alle mogelijke hypothesen.  $P(D)$  vervult eigenlijk enkel een rol als factor die er voor zorgt dat de posterior probability tussen het interval (0,1) ligt. Hierdoor wordt het Bayesiaans theorema vaak herschreven tot: *posterior probability*  $\approx$  *prior*  $\times$  *likelijkheid*.

De likelijkheid functie in zulke complexe applicaties, zoals fylogenetische analyses, bevat een groot aantal statistische parameters waarvan er eigenlijk maar één echt interessant is voor de onderzoeker. Zo is een fylogenetisch onderzoeker eigenlijk vooral geïnteresseerd in de topologie van een boom, maar minder in de transitie ratio parameter, gamma shape parameter, voorouder status, etc. Deze parameters zijn essentieel voor het evalueren van het probleem maar zijn niet van direct belang voor de onderzoeker en worden dan ook “nuisance” parameters genoemd. Het Bayes theorema laat toe om deze nuisance parameters te marginaliseren, door te integreren over deze parameters.

De parameters van het statistisch model die gebruikt worden in een fylogenetische context zijn de topologie van de evolutionaire bomen ( $\tau$ ), lengte van de takken ( $\nu$ ), substitutie model ( $\theta$ ) en de gamma shape parameter ( $\alpha$ ). Als we X nu gelijk stellen aan de data en  $\psi = \{\tau, \nu, \theta, \alpha\}$  is een specifieke boom met een bepaalde combinatie van taklengte, substitutie parameters en gamma shape parameter, kunnen we volgens het Bayes theorema stellen dat  $f(\psi|X) = \frac{f(X|\psi)f(\psi)}{f(X)}$ . De berekening van posterior probability vereist enkele hoogdimensionale integralen, die enkel in de meest eenvoudige gevallen nog analytisch opgelost kunnen worden. De onderzoeker zal dus moeten



vertrouwen op een benadering van de distributie aan de hand van een stochastische simulatie. Een belangrijke tool om de posterior probability te benaderen in Bayesian inference is de Markov chain Monte Carlo methode (MCMC).

Een Markov chain maakt een willekeurige wandeling door de parameter space, waarbij deze om de x aantal stappen of generaties een cladogram wordt bewaard. Hierboven werd reeds vermeld dat de nodige fylogenetische statistische parameters samengevat kunnen worden door de variabele  $\psi = \{\tau, \nu, \theta, \alpha\}$ , waar  $\psi$  een unieke boom met een welbepaalde topologie en specifieke combinatie van taklengtes, substitutie parameters en gamma shape parameters voorstelt. Het gemakkelijkste is om  $\psi$  voor te stellen als een uniek punt in de parameter space, en een perturbatie in een van de statistische parameter waardes zal  $\psi$  veranderen naar  $\psi'$  en dus een nieuw punt in de parameter space definiëren. Indien de chain logisch opgesteld wordt en men deze voldoende lang laat lopen, zal dit resulteren in geldige samples van de posterior probability distributie [21].

De perturbatie van de parameter waardes kan op twee manieren verlopen, één manier voor de substitutiemodel parameters en een tweede manier voor de topologie en taklengtes. Beide methodes maken gebruik van het Metropolis-Hastings algoritme, die de probabilliteit van de volgende stap bepaalt. Indien we de waarschijnlijkheid van de voorgestelde nieuwe status ( $x'$ ) startend vanuit de huidige status ( $x$ )  $q(\psi')$  noemen, en de waarschijnlijkheid van de voorgestelde oude status ( $x$ ) voorwaardelijk aan de nieuwe status ( $x'$ )  $q(\psi)$  noemen [21]. Dan wordt de nieuwe status  $x$  bepaald door probability  $R = \min\left[1, \frac{f(x|\psi')}{f(x|\psi)} x \frac{f(\psi')}{f(\psi)} x \frac{q(\psi)}{q(\psi')}\right]$  waar  $\frac{f(x|\psi')}{f(x|\psi)}$  de likelihoodratio is,  $\frac{f(\psi')}{f(\psi)}$  de prior ratio is, en  $\frac{q(\psi)}{q(\psi')}$  de voorstelratio is. De vergelijking zorgt er dus voor dat de voorgestelde statussen met een hogere posterior probability altijd geaccepteerd worden, terwijl voorgestelde statussen die “downhill” liggen enkel geaccepteerd worden met een waarschijnlijkheid die omgekeerd evenredig is met de maat van de val van de huidige status naar de nieuwe voorgestelde status. Het resultaat is dat de Markov chain de neiging heeft om “uphill” te klimmen, maar het algoritme is geen strikte “hill-climber” zoals in de conventionele heuristische fylogenetische algoritmes. De reden hiervoor is vrij simpel, Bayesian inference is namelijk geïnteresseerd in de vorm van het posterior probability “landschap” en niet enkel in het vinden van de hoogste piek [22]. De downhill stappen zijn namelijk een vereiste om “dalen” te doorkruisen en nieuwe pieken te ontdekken. Desondanks deze eigenschap kan het toch voorkomen dat de Markov chain vast komt te zitten in een lokaal optimum, ook wel “poor mixing” van de chain genoemd. Daarom is het belangrijk om de Markov chain voldoende lang te laten lopen of gebruik te maken van Metropolis coupled Markov chain Monte Carlo [(MC)<sup>3</sup>].

(MC)<sup>3</sup> is een variant van het MCMC algoritme en houdt in dat er naast de gewone Markov chain (cold chain) nog een aantal extra Markov chains (heated chain) lopen [23]. Elke heated chain berekent de posterior probability op de hierboven beschreven methode en verheft deze posterior probability tot de macht  $\beta$ .  $\beta$  is de “heat” waarde of “temperatuur” van de chain en neemt waardes aan van  $0 < \beta < 1$ . Door gebruik te maken van deze heated chains wordt het posterior probability landschap afgevlakt, waardoor valleien minder diep worden en pieken minder hoog en toch verkennen alle chains dezelfde parameter space. Hierdoor zullen heated chains nieuwe statussen sneller accepteren dan de cold chain en op deze manier zijn ze in staat om sneller een vallei in het posterior landschap te doorkruisen aangezien de hoogteverschillen minder extreem zijn dan deze in het landschap van de cold chain. Dit maakt het gemakkelijker voor heated chains om zich tussen geïsoleerde pieken te bewegen waar de cold chain eventueel zou blijven steken in een lokaal optima.

Ondanks de verhoogde mobiliteit van de heated chains blijft hun enige functie om de cold chain met informatie te voorzien van mogelijke nieuwe statussen [24]. De reden hiervoor is dat enkel de cold chain in staat is om samples uit de posterior probability distributie op te slaan. De heated chains vervullen dus enkel een rol als verkenners, die het oppervlak aftasten, op zoek naar geïsoleerde pieken met een hoge probability. Dit maakt de analyse op zijn beurt weer complexer aangezien de chains om de zoveel tijd met elkaar moeten communiceren. Indien de heated chain zich op een hogere piek bevindt dan de cold chain zullen zij van plaats wisselen, wat men ook wel een “swap” noemt. Aan de hand van de (MC)<sup>3</sup> is het mogelijk dat een cold chain die vast gelopen is op een bepaalde piek een sprong kan maken naar een betere piek in één generatie. De Metropolis coupling zorgt ervoor dat dit proces veel sneller verloopt en vergemakkelijkt op zijn manier het “mischen” van de cold chain binnen het posterior probability landschap. Eenmaal als de analyse afgelopen is en er een fylogenetische boom gegenereerd is, zal elke tak een bepaalde posterior probability waarde krijgen. Een tak wordt pas als betrouwbaar beschouwd bij een posterior probability van 0,95 of hoger.

Een van de grootste voordelen in het gebruik van Bayesian inference is zijn snelheid. Zo blijkt dat de constructie van een fylogenetische boom aan de hand van Bayesian inference 80 keer sneller verloopt dan een heuristische maximum likelihood analyse voor dezelfde fylogenetische boom [25]. Met de opkomst van de PCR techniek en de geautomatiseerde sequencing technologie is er een explosie van het aantal en grootte aan genetische datasets ontstaan. De snelheid van een analyse zal hierdoor een steeds belangrijkere factor worden, omdat deze factor uiteindelijk zal bepalen of een dataset geanalyseerd kan worden of niet.

## 3.5. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)

### *3.5.1. Achtergrond*

Met de opkomst van de PCR techniek werd het mogelijk om voor een groot aantal moleculaire merker protocols te ontwikkelen, die uiteindelijk gebruikt kunnen worden voor genoom identificatie en selectie. Een voordeel van deze protocols is dat ze snel zijn en maar kleine hoeveelheden DNA nodig hebben. Drie veel gebruikte PCR gebaseerde merkers zijn RAPD's (Random Amplification of Polymorphic DNA), AFLP's (Amplification Fragment Length Polymorphism) en SSR's (Simple Sequence Repeat) [26-28]. Maar elke merker heeft zijn voor- en nadelen. Zo zijn RAPD merkers snel en gemakkelijk te ontwikkelen maar missen ze reproduceerbaarheid. AFLP heeft een betere reproduceerbaarheid maar is zeer werkintensief en duur. Microsatellieten zijn specifiek en uiterst polymorf maar ze vereisen kennis over het volledige genoom om specifieke primers te ontwikkelen en zijn dus gelimiteerd tot de economisch belangrijke soorten [29].

In 1994 werd een nieuwe moleculaire merker techniek ontwikkeld, die men inter simple sequence repeat (ISSR) noemt [30]. Microsatellieten zijn zeer korte (10 à 20 nucleotiden) DNA fragmenten waarbij de lengte en exacte sequentie sterk kunnen variëren binnen een populatie of tussen soorten. Ze worden gekarakteriseerd door di-, of trinucleotide repeats (AA, AG, CAG,...) die 4 à 10 keer achter elkaar herhaald worden. Door primers te ontwikkelen voor deze variabele microsatelliet sequenties is het mogelijk om de gebieden geflankeerd door de microsatellieten te amplificeren aan de hand van een eenvoudige PCR reactie. Zo zal elke primer een ander bandenpatroon weergeven wanneer het PCR product gevisualiseerd wordt aan de hand van gelelektroforese. Indien de PCR reactie aan de hand van een welbepaalde primer met succes een deel tussen twee gelijkaardige microsatellieten kan amplificeren zal dit een bandje opleveren met een uniek moleculair gewicht. Meestal zijn er meerdere van deze gelijkaardige microsatelliet sequenties verspreid doorheen het genoom, waardoor er meerdere bandjes waargenomen kunnen worden, elk met een verschillend moleculair gewicht. Hierdoor zal elk organisme zijn eigen uniek bandenpatroon weergeven voor die welbepaalde primer.

ISSR is een techniek die veel gebruikt wordt in onderzoek naar genetische variatie tussen zeer sterk verwante individuen, aangezien de microsatelliet sequenties in het genoom een hoge mutatiefrequentie hebben waardoor ze snel van lengte kunnen veranderen, wat een verschil in het bandenpatroon zal veroorzaken.

## 4. Materiaal en methoden

### 4.1. Staalname

De specimens van *Gyatrix hermaphroditus* werden op voorhand verzameld door verschillende leden van het onderzoeksteam. De zoetwaterpopulaties werden verzameld in België, Galicië (Spanje), Doñana (Spanje), Oostenrijk, Tvärminne (Finland), Noord Amerika, Canada, Zuid-Afrika en India. De mariene populaties zijn afkomstig van Sylt (Duitsland), Roscoff (Frankrijk), Cerbère (Frankrijk), Sardinië (Italië) en India. De brakwater populatie is afkomstig van Tvärminne (Finland).

In het labo worden twee kwalitatieve methoden gebruikt voor de extractie van levende platwormen. Een eerste mogelijkheid is de dekantatie methode, die gebruikt wordt voor de extractie van mariene en brakwater organismen. Hierbij wordt een liter isotonische  $MgCl_2$  oplossing in een hoge smalle maatbeker op een laag sediment uitgegoten. De  $MgCl_2$  oplossing zorgt ervoor dat de platwormen na een tiental minuten tijdelijk verdoofd zijn. Door voorzichtig in de maatbeker te roeren kan het supernatans, met zo min mogelijk sediment, gedecanteerd worden. Het supernatans, met de platwormen, wordt uitgegoten over een plastic ring waaraan een gaas bevestigd en in een Petrischaal past. Door toevoeging van gefilterd zeewater zullen de meeste platwormen doorheen het gaas naar de Petrischaal migreren. Deze stap wordt herhaald in een nieuwe Petrischaal tot alle platwormen geëxtraheerd zijn. Aangezien sommige soorten te groot zijn om doorheen het gaas te migreren is het aangeraden om steeds het gaas te controleren op grotere organismen.

Een tweede mogelijkheid is de zuurstofdepletie methode, die voornamelijk gebruikt wordt voor platwormen afkomstig uit zoet water habitats. Voor deze methode wordt een laag sediment samen met plantenmateriaal ondergedompeld in een glazen bokaal. Na enkele dagen zullen de platwormen naar het oppervlak migreren omwille van de zuurstofdepletie, veroorzaakt door de bacteriële afbraak van het plantenmateriaal. Eenmaal aan het oppervlak kunnen ze eenvoudig opgezogen worden met behulp van een pipet en kunnen ze bewaard worden op ethanol bij een temperatuur van  $-20^{\circ}C$  [31].

### 4.2. DNA extractie en PCR amplificatie

De DNA extracties werden uitgevoerd aan de hand van een QIAamp<sup>®</sup> DNA Micro kit van Qiagen. Het bijgeleverde protocol voor de isolatie van genomisch DNA afkomstig van weefsels werd gevolgd.

Vervolgens werden er illustra PuRe Taq Ready-To-Go<sup>™</sup> PCR Beads van GE Healthcare gebruikt om het gewenste DNA fragment te amplificeren. De PCR Beads bevatten stabilisators, Bovine Serum Albumine (BSA), dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2,5 eenheid puReTaq DNA polymerase en reactie buffer. Aan de illustra PuRe Taq Ready-To-Go<sup>™</sup> PCR Beads werd enkel een forward en reverse primer (0,2  $\mu M$ ),  $H_2O$  en DNA staal (3  $\mu l$ ) toegevoegd tot een totaal volume van 25  $\mu l$  bereikt wordt. Wanneer de

PCR bead zijn finaal volume bereikte, bedroegen de concentraties van de dNTP's 200  $\mu$ M in 10 mM Tris-HCl (pH 9,0 op kamertemperatuur), 50 mM KCl en 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Een Eppendorf Mastercycler gradient toestel werd gebruikt om de volgende PCR protocols uit te voeren:

**Tabel 2: Naam en sequentie van de forward en reverse primers per gen met hun bijhorend PCR protocol. Voor het COI gen werd een Touchdown protocol gevolgd. Dit protocol startte met een hogere annealingtemperatuur en bouwde deze stelselmatig af. Tijdens het afbouwen van de annealingtemperatuur werden er maar vier cycli doorlopen.**

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	PCR Protocol
<b>16S</b>	16SFlatF3	16SbrH	95°C/2min
	5'→3' TGACTGTGCTAAGGTAGC	5'→3' CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	(95°C/30s – 55°C/40s – 72°C/1min) x37 72°C/10min
<b>COI</b>	LCO 1490	COI 1200R	<b>Touchdown protocol:</b>
	5'→3' GGTCCAAATCATAAAGATATTGG	5'→3' TCATAGTAGCCSYGTAAAATAAGGCTCG	95°C/4min (94°C/30s – 58-52°C/50s//30s – 72°C/30s//1min) x4//32 72°C/10min
<b>ITS1</b>	ITS1L	58C	95°C/5min
	5'→3' TCCGTAGGTGAACCTGCGAAGGAT	5'→3' TGC GTTCAAGATATCGATGTTCAA	(94°C/60s – 55°C/40s – 72°C/60s) x35 72°C/5min

### 4.3. Optimalisatie van de primers

#### 4.3.1. Optimalisatie van het 16S primerpaar

Omdat er geen 16S primers bekend zijn voor *Gyratrix hermaphroditus* of nauw verwante soorten was het selectie- en optimalisatieproces een belangrijke stap gedurende de stage. Er werd gestart met het zoeken naar universele 16S primers in de literatuur. Dit zijn primers die gebruikt worden om het 16S gen te amplificeren bij een uiteenlopend aantal organismen. Een primerpaar dat hiervoor vaak gebruikt wordt is 16SarL en 16SbrH [32]. Dit primerpaar werd getest met het bijhorende PCR protocol volgens Palumbi et al (figuur 3). Dit protocol is niet noodzakelijk het meest geschikt voor *Gyratrix hermaphroditus* en daarom werd er in een volgende stap gekeken of geen betere annealingstemperatuur gevonden kan worden (figuur 4). Doordat er met universele primers gewerkt wordt, bestaat er ten eerste het gevaar dat ook ongewenst DNA geamplificeerd kan worden. Zo kan er mogelijk menselijk DNA of DNA afkomstig van het voedsel aanwezig in de platworm geamplificeerd worden. Dit resulteert dan vaak in een patroon met dubbele bandjes als men het PCR product op een agarose gel laadt (figuur 5). Ten tweede is het mogelijk dat universele primers niet in staat zijn om de 16S sequenties van alle populaties van *Gyratrix hermaphroditus* te amplificeren. Deze problemen kunnen opgelost worden door kleine wijzigingen aan te brengen in de universele

primersequentie of een nieuwe primersequentie selecteren. Het doel was om een primerpaar te verkrijgen dat enkel nog het 16S gen van *Gyratrix hermaphroditus* zou amplificeren. Het aanpassen van de universele primers of het creëren van nieuwe, selectieve primers vereist echter wel enige kennis van de 16S sequentie bij *Gyratrix hermaphroditus*. Na het opstellen van een gealigneerde dataset van enkele goede 16S sequenties, konden er wijzigingen in de universele primers aangebracht worden of nieuwe primers geselecteerd worden aan de hand van conservatieve delen in de 16S sequentie. Omdat deze conservatieve delen zo goed als bij alle *Gyratrix hermaphroditus* soorten gelijkaardig zijn, is de kans groot dat de primers beter werken en enkel het *Gyratrix hermaphroditus* DNA amplificeren. Men dient wel rekening te houden met de smelttemperatuur van de primers, deze moet zo dicht mogelijk bijeen liggen voor de forward en reverse primer en het te amplificeren DNA. De smelttemperatuur van een primer kan berekend worden aan de hand van software zoals Fast PCR [33].

#### 4.3.2. Optimalisatie van het COI primerpaar

Het COI gen kon niet succesvol gesequeneerd worden aan de hand van universele primers. Het grootste probleem met de universele primers van COI was dat ze niet enkel het DNA van de platwormen amplificeren, maar ook ongewenste fragmenten van het voedsel in het darmstelsel van de worm. Doordat *Gyratrix hermaphroditus* zo klein is, is het niet mogelijk om de inhoud van de darmen te scheiden van de rest. De contaminatie van dit vreemde DNA resulteert in onleesbare chromatogrammen tijdens het sequencen. Dit probleem kan eventueel opgelost worden met de ontwikkeling van specifiekere primers. De ontwikkeling van de primers gebeurde op basis van een alignement van de enige twee COI sequenties van platwormen beschikbaar op genbank.

Doordat deze soorten evolutionair gezien niet dicht genoeg bij *Gyratrix hermaphroditus* liggen en omwille van de hoge variabiliteit van het COI gen konden er geen bruikbare primers ontwikkeld worden. Een tweede optie was om een tussenliggende cloneringstap uit te voeren (in samenwerking met het Department of Invertebrate Zoology of the Swedish Museum of Natural History, Stockholm). PCR producten van het COI gen werden geligeerd in een vector en gekloneerd in *E. coli* cellen. Door verschillende klonen van een PCR product te sequencen, is het mogelijk om de voedselcontaminatie te onderscheiden van de *Gyratrix hermaphroditus* sequenties. Dus met behulp van deze methode is het mogelijk om enkele echte *Gyratrix hermaphroditus* COI sequenties te verkrijgen. Hoewel deze procedure zeer arbeidsintensief en duur is het momenteel de enige manier om de sequentie van het COI gen van *Gyratrix hermaphroditus* te achterhalen.

### 4.3. 2D-gelelektroforese en opzuivering

Na amplificatie van een DNA fragment werden de verschillende stalen op een 1,2% agarose gel geladen. De gel liet men gedurende 50 minuten lopen bij een voltage van 100 V. Om het bandenpatroon te visualiseren wordt de gel eerst voor 30 minuten in een GelRed oplossing ondergedompeld. Aan de hand van een DNA ladder kon de lengte van het geamplificeerde fragment geschat worden. Indien er slechts een fragment zichtbaar was, werd het resterende PCR product opgezuiverd aan de hand van een QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Wanneer er meerdere fragmenten zichtbaar waren, werd enkel het fragment met de juiste lengte uit de gel gesneden en opgezuiverd met een QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen), volgens het bijgeleverde Gel Extraction Spin Protocol. Ten slotte werd de sequentie van de opgezuiverde stalen bepaald door MacroGen (Korea). Het bepalen van de sequenties gebeurde aan de hand van BigDye™ terminator cycling condities. Waarna de reactieproducten werden opgezuiverd door gebruik te maken van een ethanol precipitatie en gesequeneerd werden met een Automatic Sequencer 3730XL toestel.

### 4.4. Fylogenetische analyses

#### *4.4.1. Assemblage van de forward en reverse sequentie*

Eenmaal de sequentie van de PCR producten bepaald zijn, voorziet MacroGen een bestand met het chromatogram van de forward en reverse sequentie. Tijdens het sequencingproces werden dezelfde forward en reverse PCR primers gebruikt om de sequentie te bepalen (tabel 2). De volledige DNA sequentie werd geassembleerd door de complementaire forward en reverse streng aan elkaar te koppelen met behulp van de programma's Pregap4 en Gap4 (Staden Package) [34].

#### *4.4.2. Alligneren*

Met behulp van het programma MEGA4 werden de verschillende datasets gealligneerd [35]. Het MEGA4 programma gebruikt hiervoor een implementatie van het ClustalW programma [36]. Maar voordat de dataset gealligneerd kan worden, moeten alle sequenties even lang zijn (baseparen en gaps). Het trimmen van de allignementen is vereist om een correcte fylogenetische analyse uit te voeren. Het was echter niet altijd mogelijk om een allignement uit te voeren aan de hand van deze programma's. Sommige sequenties zoals die van het ITS1 gen zijn te divers en geven dan ook een onduidelijk allignement (in samenwerking met het Koninklijk Museum voor Midden-Afrika, Tervuren). Dit kon voorkomen worden door de sequenties deels handmatig te alligneren. Door naar homologe delen in de verschillende ITS1 sequenties te zoeken en deze sequenties te alligneren als een subgroep van het totale aantal sequenties, was het programma wel in staat zijn om een goed

alignment te creëren. Als al deze subgroepen apart gealigneerd waren, kon het totale aantal sequenties gemakkelijk gealigneerd worden.

#### 4.4.3. Parsimonie analyse

De parsimonie analyses werden uitgevoerd met behulp van het programma TNT [37]. Er werd hier geopteerd voor een traditional search met het Tree Bisection and Reconnection (TBR) algoritme. Het aantal replicaties werd ingesteld op 100 (één replica is random addition sequence) en de ondersteuningswaarden werden berekend aan de hand van een bootstrap resampling (1000 replica's). Takken met minder dan een 85% ondersteuningswaarde werden beschouwd als onvoldoende ondersteund en werden dus niet in de figuren weergegeven. Voor de analyse van het COI, 16S en ITS1 gen werden er respectievelijk 21, 36 en 65 taxa gebruikt. *Neopolycystis tridentata* en *Gyratrix proavus* werden gekozen als outgroup in de 16S parsimonie analyse. Voor de parsimonie analyse van het COI gen werd *Neopolycystis tridentata* als outgroup gekozen. *Gyratrix proavus* werd gebruikt als outgroup voor de parsimonie analyse van ITS1.

#### 4.4.4. Bayesian Inference

Voor de fylogenetische bomen die aan de hand van Bayesian inference werden opgesteld, werd het programma MrBayes gebruikt [23, 38]. Eerst werd de dataset geanalyseerd met behulp van jModelTest [39]. jModelTest werd gebruikt om het meest geschikte substitutiemodel te bepalen voor de dataset. Voor 16S was dit het GTR +G model. Voor COI en ITS1 werd het GTR +I +G model geselecteerd. Na het instellen van het juiste substitutiemodel werd het aantal generaties en de samplefrequentie ingesteld. Standaard staan deze op 1000000 generaties en een samplefrequentie om de 100 generaties. Ten slotte werd er een burnin van 5000 generaties gekozen. Na de analyse kon de data geëxporteerd worden naar programma's zoals Figtree of Treeview om de fylogenetische bomen te visualiseren. Voor de analyse van het COI, 16S en ITS1 gen werden er respectievelijk 21, 36 en 65 taxa gebruikt. *Neopolycystis tridentata* en *Gyratrix proavus* werden gekozen als outgroup in de 16S Bayesian inference analyse. Voor de Bayesian inference analyse van het COI gen werd *Neopolycystis tridentata* als outgroup gekozen. *Gyratrix proavus* werd gebruikt als outgroup voor de Bayesian inference analyse van ITS1.

### 4.5. Optimalisatie van de ISSR techniek

De beste strategie om de ISSR techniek te optimaliseren was door eerst in de literatuur naar primers van nauw verwante soorten te zoeken. In het geval van *Gyratrix hermaphroditus* zijn er primers



beschreven voor een verwante soort, namelijk *Minona ileanae* (Platyhelminthes, Proseriata) [40]. De volgende primers en het bijhorende protocol werden getest voor *Gyratrix hermaphroditus*:

**Tabel 3: Primers met hun bijhorende sequentie en de grootte van de bandjes uitgedrukt in het aantal basenparen (bp). De primers en het PCR protocol werden ontwikkeld door Lai, T et al (2008).**

Primer	Sequentie	Grootte bandjes (bp)	PCR protocol
<b>IT1</b>	5'→3' CACACACACACACACAGT	400 – 1600	
<b>SAS1</b>	5'→3' GTGGTGGTGGTGGC	350 – 1800	
<b>SAS3</b>	5'→3' GAGGAGGAGGAGGC	380 – 1800	94°C/3min
<b>PT1</b>	5'→3' GTGTGTGTGTGTGTGTC	350 – 2000	(94°C/40s – 55°C/45s –
<b>UBC809</b>	5'→3' AGAGAGAGAGAGAGAGG	300 – 1400	72°C/ 1min40s) x 45
<b>UBC811</b>	5'→3' GAGAGAGAGAGAGAGAC	400 – 900	
<b>UBC827</b>	5'→3' ACACACACACACACACG	400 – 1700	

Gedurende het optimalisatieproces werden er illustra PuRe Taq Ready-To-Go™ PCR Beads van GE Healthcare gebruikt om het gewenste ISSR fragment te amplificeren. De PCR Beads bevatten stabilisators, Bovine Serum Albumine (BSA), dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2,5 eenheid puReTaq DNA polymerase en reactie buffer. Aan de illustra PuRe Taq Ready-To-Go™ PCR Beads werd één enkele primer (0,2 µM), H<sub>2</sub>O en DNA staal (3 µl) toegevoegd tot een totaal volume van 25 µl bereikt werd. Wanneer de PCR bead zijn finaal volume bereikte, bedroeg de concentraties van de dNTP's 200 µM in 10 mM Tris-HCl (pH 9,0 op kamertemperatuur), 50 mM KCl en 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Een Eppendorf Mastercycler gradient toestel werd gebruikt om het PCR protocol uit te voeren.

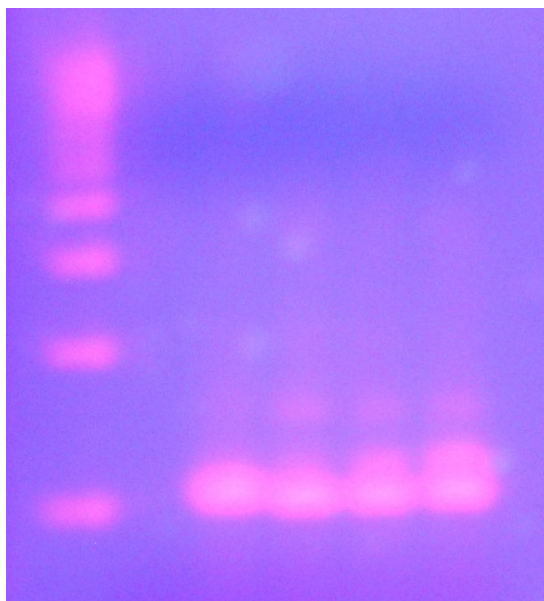
Omwille van tijdsdruk konden niet alle primers verder geoptimaliseerd worden en werd beslist om SAS1 en SAS3 verder te optimaliseren (figuur 11 en 12). Deze twee primers gaven het beste resultaat voor *Gyratrix hermaphroditus*. Voor de visualisatie van het bandenpatroon werd gebruik gemaakt van 2D-gelelektroforese. Er werd geselecteerd voor een 2% agarose gel omdat dergelijk hoog percentage aan agarose een mooie aflijning van de bandjes teweeg bracht. Aangezien er aan de primersequentie niets veranderd kon worden, konden enkel de reactieparameters die de specificiteit van de PCR reactie bepalen aangepast worden. Als eerste werd er een temperatuurgradiënt opgesteld om mogelijk een betere annealingstemperatuur te vinden (figuur 13 en 14). In een tweede stap werd het aantal cycli verhoogd naar 55 in plaats van 45 (figuur 15). Deze stap zorgt voor een toename van PCR product, waardoor er dikkere bandjes gevisualiseerd konden worden op de agarosegel (figuur 10). Ten slotte werd ook de concentratie van de toegevoegde primer verhoogd (figuur 16).

## 5. Resultaten

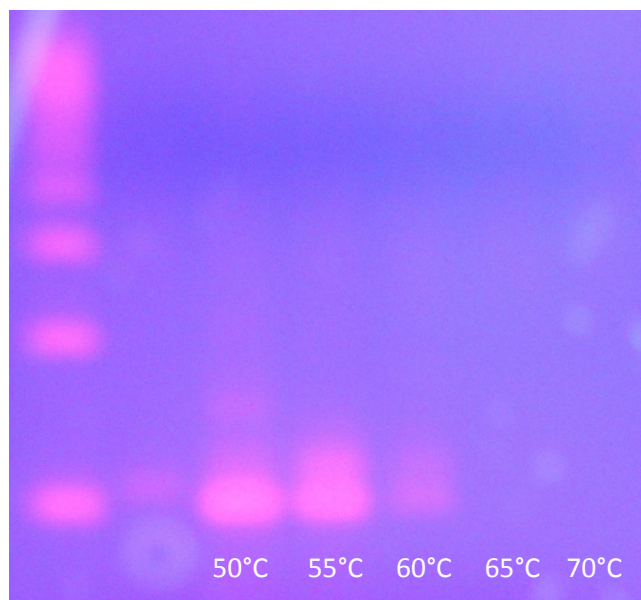
### 5.1. Optimalisatieproces van het 16S primerpaar

In een eerste instantie werd het universele 16SarL + 16SbrH primerpaar getest voor drie verschillende *Gyratrix hermaphroditus* populaties, afkomstig van België (zoet water), Doñana (zoet water) en Roscoff (marien) (figuur 3). Gedurende het hele optimalisatieproces werd er gebruik gemaakt van een moleculaire ladder (uiterst links) om de lengte van het geamplificeerde PCR product in te kunnen schatten. De bandjes bevonden zich steeds rond de 500 baseparen. Rechts van de ladder bevond zich een blanco of negatieve controle. Voor deze blanco's werd er enkel primer en H<sub>2</sub>O aan de PCR beads toegevoegd. Figuur 3 toont duidelijk dat er voor alle drie de populaties een bandje waar te nemen was met het verwachte aantal basenparen, hoewel er wel sprake was van smeer boven de bandjes en de vorming van een tweede bandje boven dat van 16S.

In een tweede stap werd er naar een betere annealingtemperatuur gezocht voor dezelfde drie populaties van *Gyratrix hermaphroditus*. Dit kon mogelijk ook het tweede bandje en de smeer verwijderen in het PCR product. In figuur 4 is te zien dat een annealingtemperatuur van 55°C het beste resultaat gaf. Er is namelijk minder smeer te zien in vergelijking met het oorspronkelijk protocol, maar het tweede bandje bleef aanwezig. Bij de negatieve controle was het tweede bandje ook lichtjes waar te nemen, wat mogelijk te wijten was aan een contaminatie met vreemd DNA tijdens de PCR opzet.

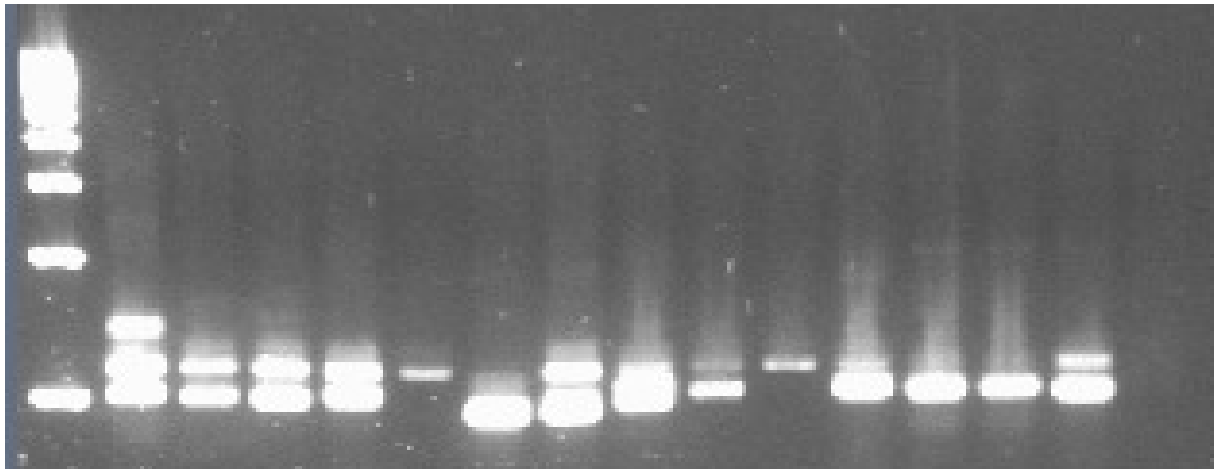


Figuur 3: PCR product na amplificatie met het 16SarL en 16SbrH primerpaar, gebruik makend van het bijhorende PCR protocol (Palumbi et al, 1991).



Figuur 4: PCR product na amplificatie met het 16SarL en 16SbrH primerpaar, gebruik makend van een temperatuursgradiënt om de meest geschikte annealingstemperatuur te bepalen.

Door een deel van de bovenste bandjes uit te snijden uit gel en hun sequentie te laten bepalen door MacroGen Korea, werd duidelijk dat ze uit menselijk 16S bestonden. De contaminatie met menselijk DNA kon tijdens verschillende procedures hebben plaats gevonden, van de staalname tot de DNA-extractie en/of de PCR opzet. Maar doordat het menselijk PCR product een groter aantal nucleotiden bevatte in vergelijking met het PCR product van *Gyratix hermaphroditus* was het mogelijk om een scheiding van de twee fragmenten te verkrijgen aan de hand van een 2D-gelelektroforese (figuur 5). Deze onderste bandjes konden eenvoudig uitgesneden en opgezuiverd worden, waarna de sequenties konden worden bepaald.



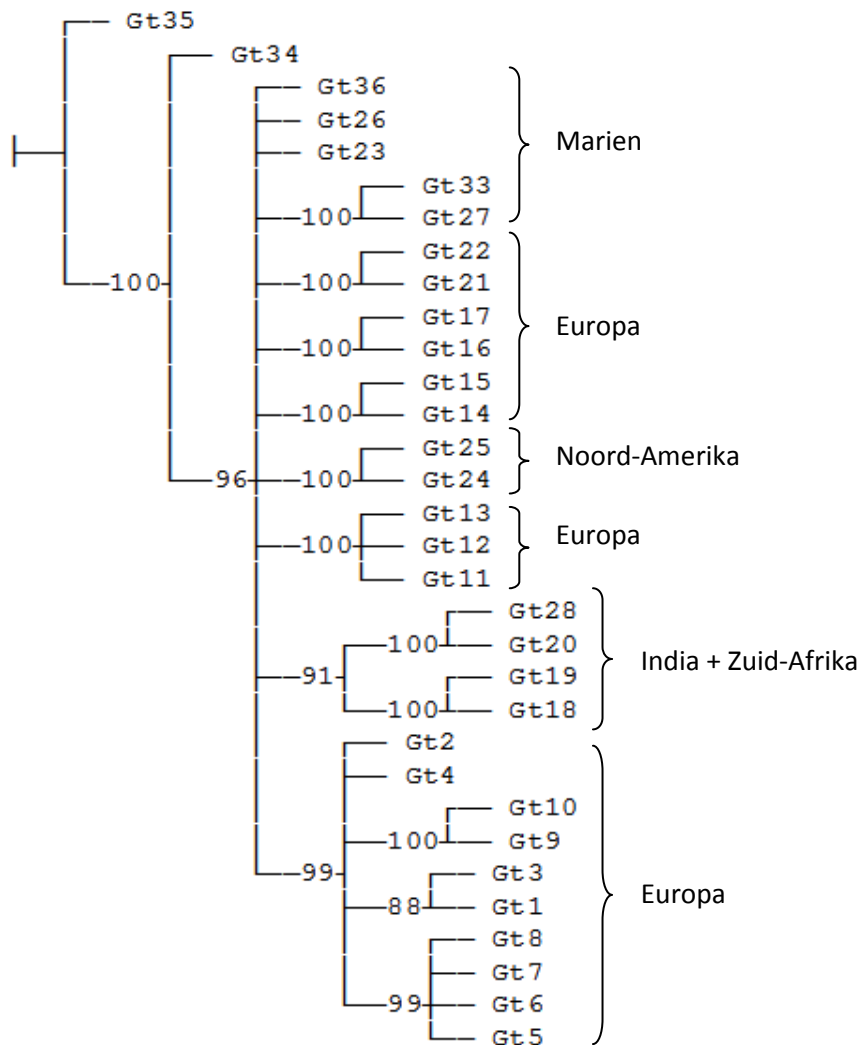
**Figuur 5: PCR product na amplificatie met het 16SarL en 16SbrH primerpaar, waarbij de onderste bandjes afkomstig zijn van *Gyratix hermaphroditus*. De bovenste bandjes zijn contaminatie van menselijk 16S DNA.**

Een tweede probleem deed zich voor bij de mariene populaties van *Gyratix hermaphroditus*. Alle sequenties werden gecontroleerd aan de hand van de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), wat enkel bij de mariene populaties vreemde resultaten gaf. Daarom werd er een dataset aangemaakt met sequenties van verschillende Malacostraca, Ostracoda, Gastropoda, Nematoda, Bivalvia en parasitaire Platyhelminthes. De sequenties van de twijfelachtige mariene populaties werden opgenomen in deze dataset en aan de hand van een eenvoudige fylogenetische analyse geanalyseerd. Doordat de mariene sequenties niet in de buurt van de Platyhelminthes groep vielen werd het al snel duidelijk dat het universele 16SarL + 16SbrH primerpaar niet bruikbaar was voor de mariene populaties. Een oplossing hiervoor was om aan de hand van een dataset met goede 16S sequenties van *Gyratix hermaphroditus* veranderingen in het universele primerpaar aan te brengen of nieuwe specifieke primers te ontwikkelen zodat de mariene populaties probleemloos konden worden gesequeneerd. De ontwikkeling van deze specifiekere primers zou ook een mogelijke oplossing voor de contaminatie met het menselijk DNA geweest kunnen zijn. Aangezien specifieke

primers enkel het *Gyatrix hermaphroditus* DNA zouden amplificeren en niet het menselijk 16S gen. In het alignement van de dataset werd er gezocht naar de conservatieve delen in het begin en einde van het 16S gen. Aan de hand van deze analyse werd er één nieuwe forward primer ontwikkeld, namelijk 16SFlatF3 (tabel 2). Voor de reverse primer werd er geen beter alternatief gevonden dan 16SbrH. Aan de hand van deze primercombinatie kon er dan toch van enkele mariene specimen de sequentie bepaald worden. Hoewel enkele mariene populaties nog steeds geen juiste sequentie gaven na amplificatie.

## 5.2. Fylogenetische analyses van het 16S gen

### 5.2.1. Parsimonie analyse

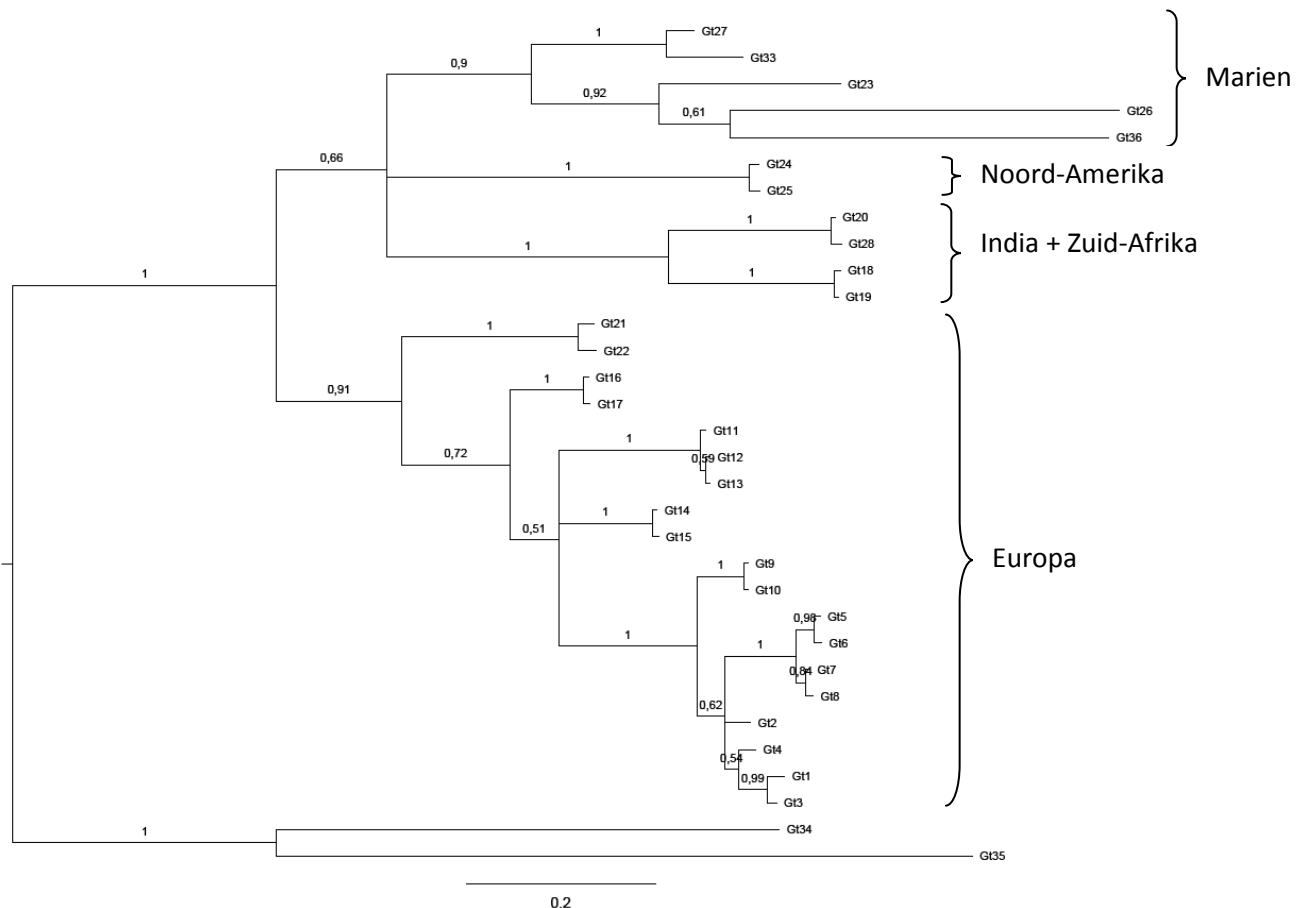


**Figuur 6:** Cladogram van het 16S gen met bootstrap ondersteuningswaarden. Gt35 (*Neopolycystis tridentata*) en Gt34 (*Gyratrix proavus*) werden gekozen als outgroup voor de parsimonie analyse.

Op figuur 6 is een cladogram van het 16S gen te zien met de bijhorende bootstrap ondersteuningswaarden. De lengte van het cladogram is gelijk aan 738 en er werd maar 1 boom gevonden. De takken van het cladogram met een bootstrapwaarde lager dan 85 werden ingeklapt. Het cladogram werd geroot op Gt34 (*Gyratrix proavus*) en Gt35 (*Neopolycystis tridentata*). De verschillende lokaliteiten en het habitat van de taxa zijn terug te vinden in tabel 4 (bijlage). De resultaten van de parsimonie analyse vertonen weinig resolutie. Op het cladogram is echter wel een mooie groepering volgens de lokaliteit en habitat waar te nemen. De mariene taxa vormen geen monofyletische groep, wat wel het geval is in het Bayesian inference cladogram. Wat hier zeker

opvalt, is dat de taxa afkomstig van India samenvallen met diegene afkomstig van Zuid-Afrika. De twee taxa afkomstig van Noord-Amerika vormen een monofyletische clade ondersteund door een bootstrapwaarde van 100. Ten slotte vallen alle Europese taxa samen in één grote clade, waarbij de taxa afkomstig van Finland verspreid liggen tussen de andere lokaliteiten.

### 5.2.2. Bayesian inference



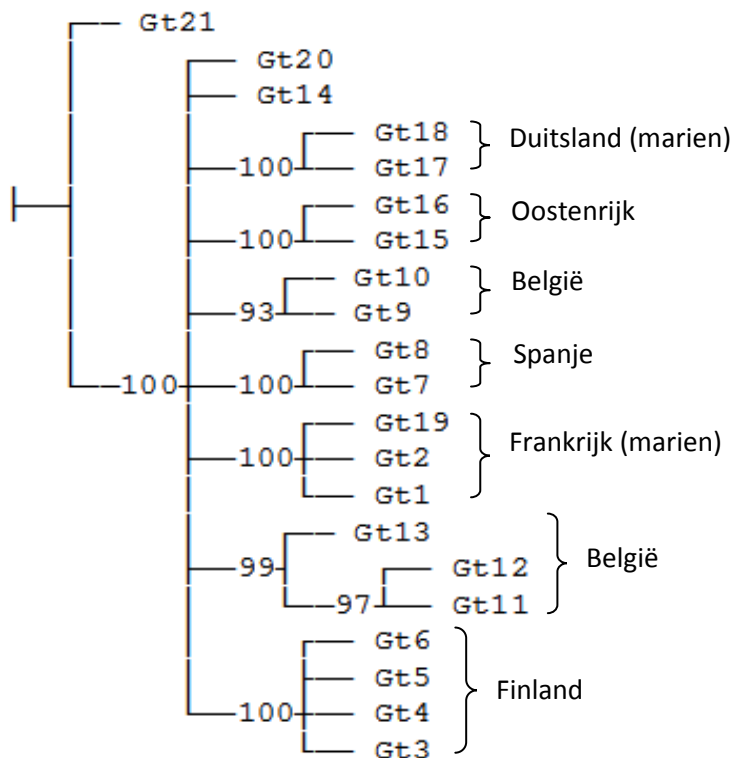
**Figuur 7: Cladogram van het 16S gen met bijhorende posterior probability waarden. Gt35 (*Neopolycystis tridentata*) en Gt34 (*Gyratrix proavus*) werden gekozen als outgroup voor de Bayesian inference analyse. De legende geeft de maat van divergentie weer.**

Figuur 7 geeft een cladogram weer voor het 16S gen dat verkregen werd aan de hand van een Bayesian inference analyse. Het cladogram werd net zoals bij de parsimonie analyse geroot op Gt34 (*Gyratrix proavus*) en Gt35 (*Neopolycystis tridentata*). De verschillende lokaliteiten en het habitat van de taxa zijn terug te vinden in tabel 4 (bijlage). In vergelijking met het parsimonie cladogram vormen de mariene populaties hier wel een monofyletische groep. Ook hier blijkt dat de Zuid-Afrikaanse populatie nauw verwant is met de populatie afkomstig uit India. Onderaan in het cladogram vindt men de Europese populaties terug. Hoewel een tak pas betrouwbaar wordt beschouwd bij een

posterior probability van 0,95 of hoger, zou men de Europese clade toch als betrouwbaar kunnen beschouwen (posterior probability van 0,91). Ook de twee Noord-Amerikaanse populaties vormen hier een goed ondersteunde clade.

### 5.3. Fylogenetische analyses van het COI gen

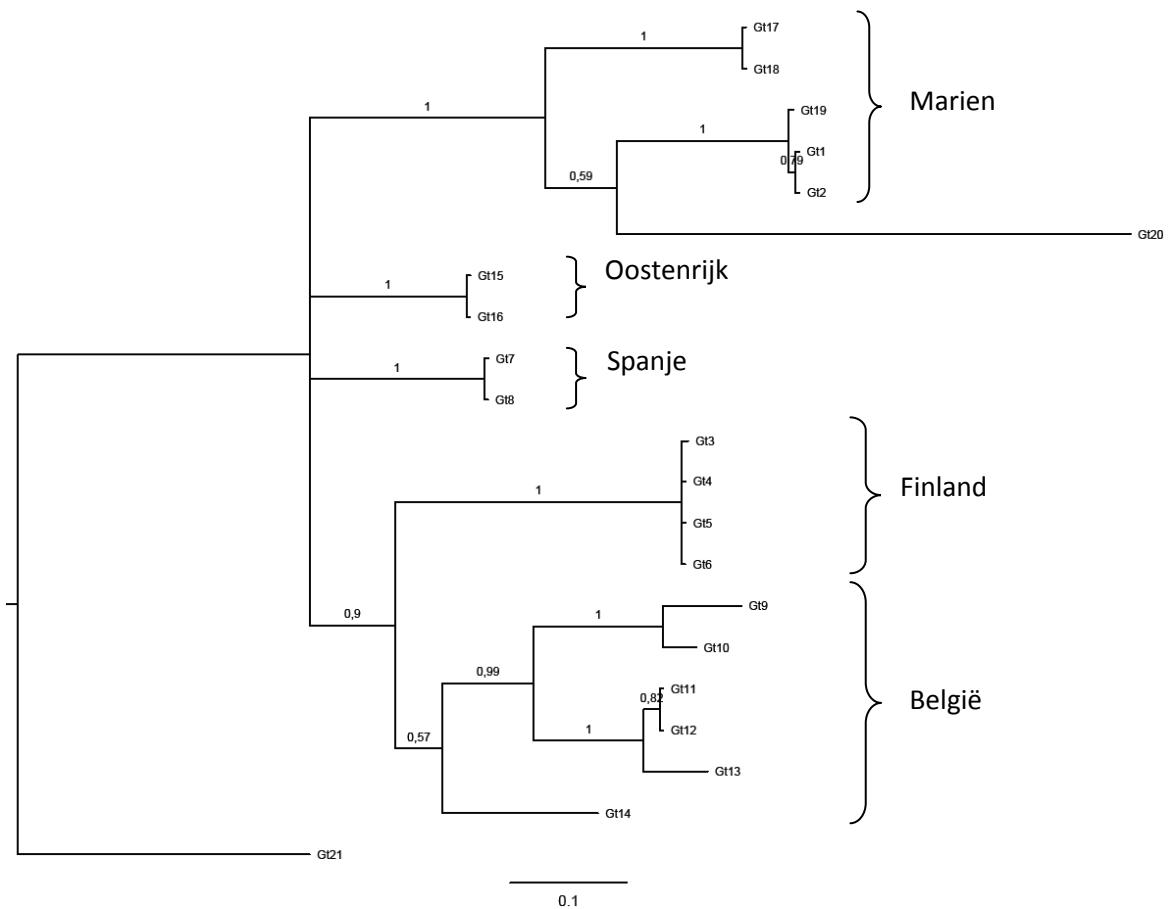
#### 5.3.1. Parsimonie analyse



**Figuur 8:** Cladogram van het COI gen met bootstrap ondersteuningswaarden. Gt21 (*Neopolycystis tridentata*) werd gekozen als outgroup voor de parsimonie analyse.

Figuur 8 geeft een cladogram voor het COI gen weer met bijhorende bootstrap ondersteuningswaarden. De lengte van het cladogram is gelijk aan 498 en er werd maar 1 boom gevonden. De takken van het cladogram met een bootstrapwaarde lager dan 85 werden ingeklapt. Gt21 (*Neopolycystis tridentata*) werd gekozen voor het rooten van het cladogram. De verschillende lokaliteiten en het habitat van de taxa zijn terug te vinden in tabel 5 (bijlage). De parsimonie analyse geeft geen uitsluitsel over de verwantschappen tussen de mariene en zoetwaterpopulaties. Maar het cladogram geeft opnieuw een mooi beeld van de groeperingen per lokaliteit.

### 5.3.2. Bayesian Inference



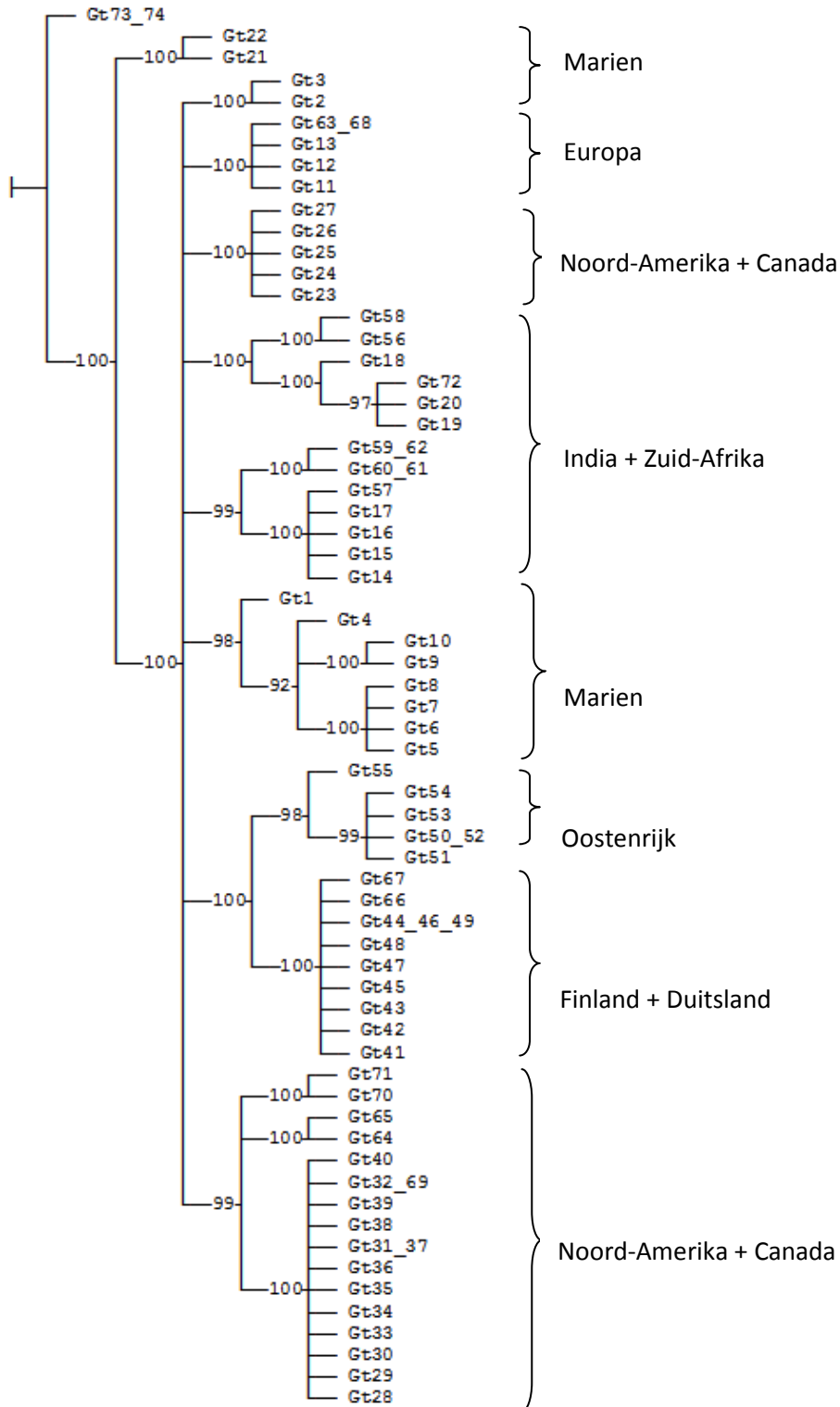
**Figuur 9: Cladogram van het COI gen met bijhorende posterior probability waarden. Gt21 (*Neopolycystis tridentata*) werd gekozen als outgroup voor de Bayesian inference analyse. De legende geeft de maat van divergentie weer.**

Figuur 9 geeft een cladogram weer voor het COI gen dat verkregen werd aan de hand van een Bayesian inference analyse. Het cladogram werd net zoals bij de parsimonie analyse geroot op Gt21 (*Neopolycystis tridentata*). De verschillende lokaliteiten en het habitat van de taxa zijn terug te vinden in tabel 5 (bijlage). Net zoals bij de parsimonie analyse vallen alle taxa met dezelfde lokaliteit samen in één clade. De mariene populaties vormen hier een parafyletische clade aangezien Gt20 (Zuid-Afrika; zoet water) een zustergroep is van de mariene populaties.



## 5.4. Fylogenetische analyses van het ITS1 gen

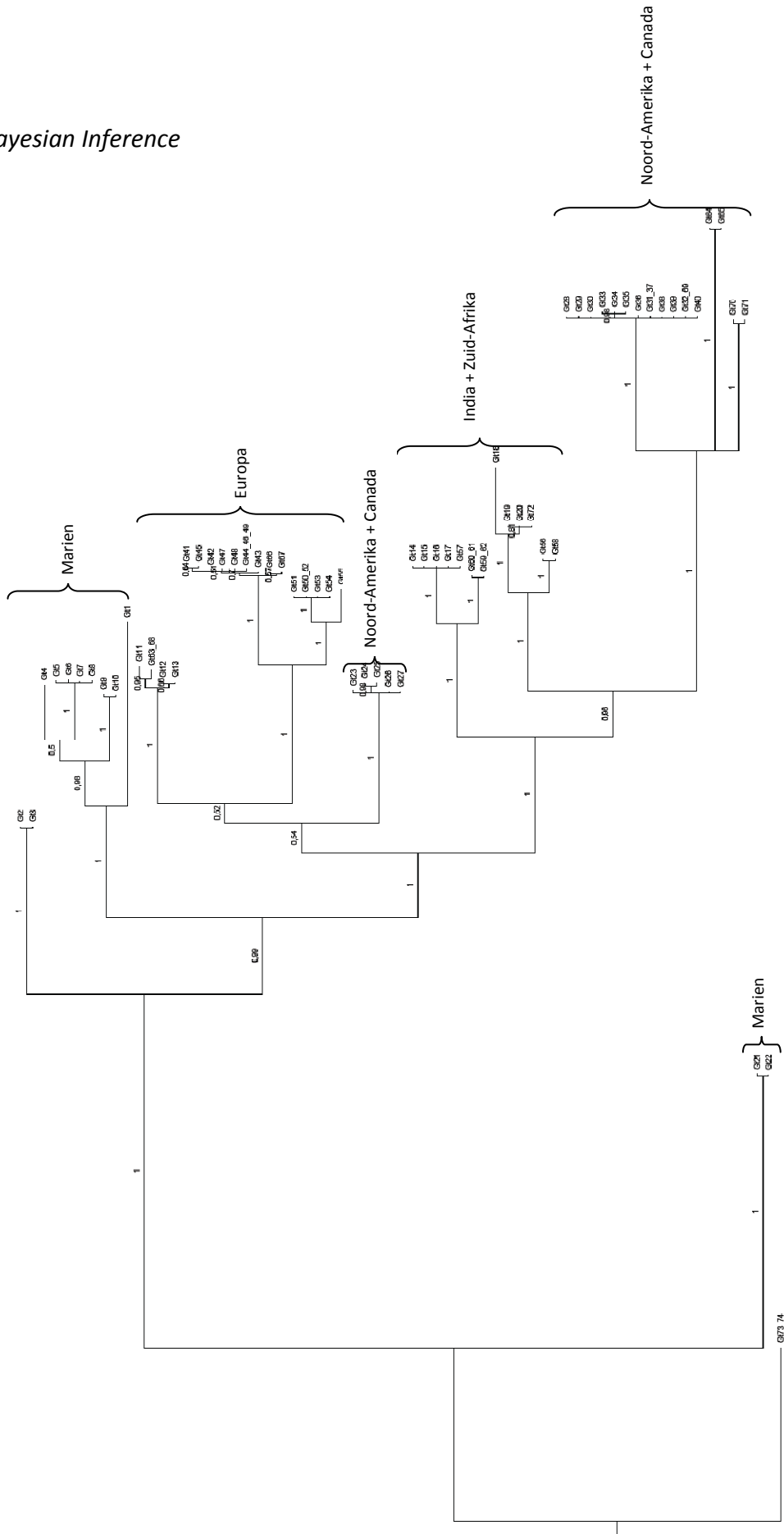
### 5.4.1. Parsimonie analyse



Figuur 10: Cladogram van het ITS1 gen met bootstrap ondersteuningswaarden. *Gt73\_74* (*Gytrix proavus*) werd gekozen als outgroup voor de parsimonie analyse.

Op figuur 10 is een cladogram (parsimonie) van het ITS1 gen te zien met de bijhorende bootstrap ondersteuningswaarden. De lengte van het cladogram is gelijk aan 1847 en er werden 270 bomen gevonden, waarvan één consensus boom gecreëerd werd door bootstrapping met de 50% majority rule. De takken van het cladogram met een bootstrapwaarde lager dan 85 werden ingeklapt. Het cladogram werd geroot op Gt73\_74 (*Gyratrix proavus*). De verschillende lokaliteiten en het habitat van de taxa zijn terug te vinden in tabel 6 (bijlage). De mariene populaties vormen een parafyletische groep. Verder valt het op dat de taxa afkomstig van Noord-Amerika en Canada opgesplitst zijn in twee groepen. Net zoals bij het 16S gen vormen ook hier de taxa afkomstig van India en de taxa van Zuid-Afrika een monofyletische groep.

### 5.4.2. Bayesian Inference

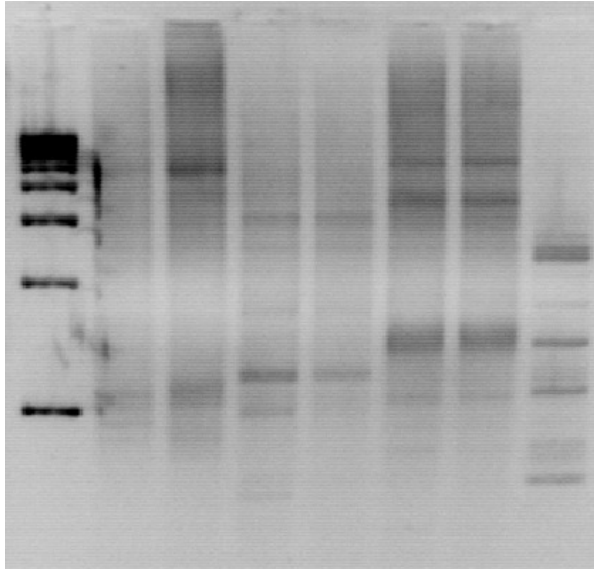


Figuur 11: Cladogram van het ITS1 gen met bijhorende posterior probability waarden. Gt73\_74 (*Gytratrix hermaphroditus*) werd gekozen als outgroup voor de Bayesian inference analyse. De legende geeft de maat van divergentie weer.

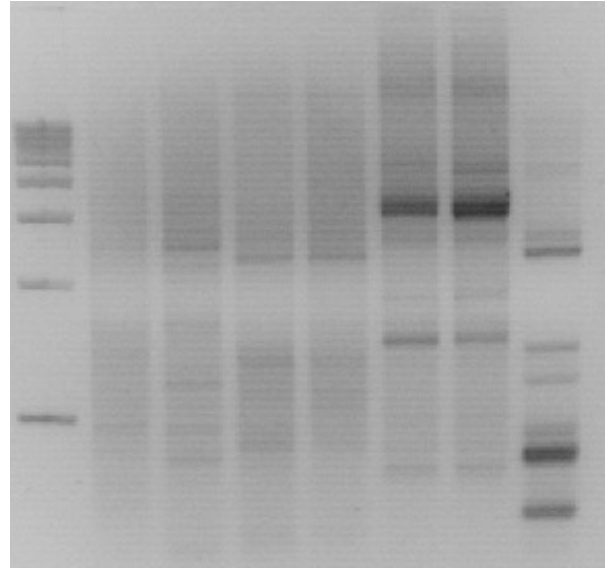
Figuur 11 geeft een cladogram weer voor het ITS1 gen dat verkregen werd aan de hand van een Bayesian inference analyse. Het cladogram werd net zoals bij de parsimonie analyse geroot op Gt73\_74(*Gyratrix proavus*). De verschillende lokaliteiten en het habitat van de taxa zijn terug te vinden in tabel 6 (bijlage). Ook hier vormen de mariene populaties een parafyletische groep. De Noord-Amerikaanse en Canadese populaties zijn ook hier weer opgesplitst in twee groepen. De taxa van India en Zuid-Afrika vallen in dit cladogram uiteen in twee monofyletische groepen, waarbij één clade een zustergroep vormt van de Noord-Amerikaanse en Canadese clade. Ten slotte clusteren alle Europese populaties ook mooi samen in dit cladogram.

### 5.5. Optimalisatie van de ISSR techniek

In een eerste fase werd er een keuze gemaakt welke primers geoptimaliseerd zouden worden. SAS1 en SAS3 gaven de beste resultaten wanneer ze gebruikt werden voor *Gyratrix hermaphroditus*. Gedurende het optimalisatieproces werd er gebruikt gemaakt van drie verschillende populaties, één mariene populatie (Roscoff) en twee zoetwaterpopulaties (Tvärminne en Doñana). Op onderstaande figuren is duidelijk een verschil in het bandenpatroon waar te nemen tussen de verschillende populaties van *Gyratrix hermaphroditus*. Het bandenpatroon wat te zien is bij de negatieve controle is een veel voorkomend fenomeen bij de ISSR techniek. Doordat de ISSR primers zeer gevoelig zijn, kan reeds een kleine contaminatie aan vreemd DNA een bandenpatroon veroorzaken. Maar zolang dat dit bandenpatroon verschilt van het bandenpatroon van het correct geamplificeerde product is er geen gevaar voor een foutief resultaat.

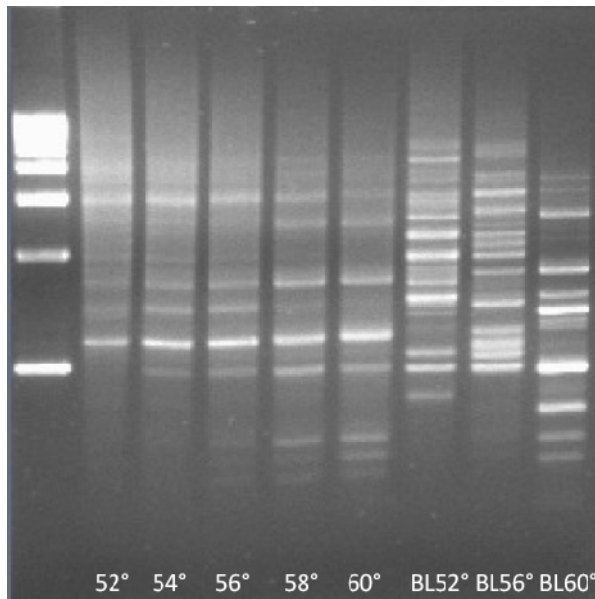


**Figuur 12:** Visualisatie van het PCR product op een 2% agarose gel na amplificatie met de SAS1 primer. Links bevindt zich een moleculaire ladder gevolgd door drie verschillende populaties van *Gyratrix hermaphroditus* (steeds 2 herhalingen). Rechts bevindt zich de negatieve controle (enkel primer).

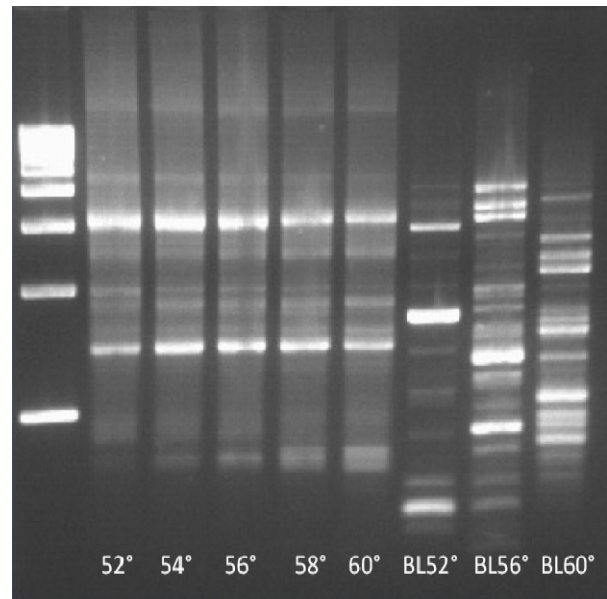


**Figuur 13:** Visualisatie van het PCR product op een 2% agarose gel na amplificatie met de SAS3 primer. Links bevindt zich een moleculaire ladder gevolgd door drie verschillende populaties van *Gyratrix hermaphroditus* (steeds 2 herhalingen). Rechts bevindt zich de negatieve controle (enkel primer).

Omdat de SAS1 en SAS3 primers ontwikkeld zijn voor een andere platworm (*Minona ileana*) is het mogelijk dat er nog een betere annealingtemperatuur bepaald kan worden. Dit was de tweede fase in het optimalisatieproces en werd verricht aan de hand van een PCR reactie met temperatuursgradiënt. In de onderstaande figuren wordt het verschil in het bandenpatroon weergegeven bij een variërende annealingtemperatuur. Zowel voor SAS1 als SAS3 werd er een Roscoff specimen gebruikt om de temperatuursgradiënt uit te voeren. Uit beide figuren blijkt dat een hogere annealingtemperatuur (58°C-60°C) voor een betere aflijning van de bandjes zorgt. De oorspronkelijke annealingtemperatuur werd dus met 3 à 4°C verhoogd.

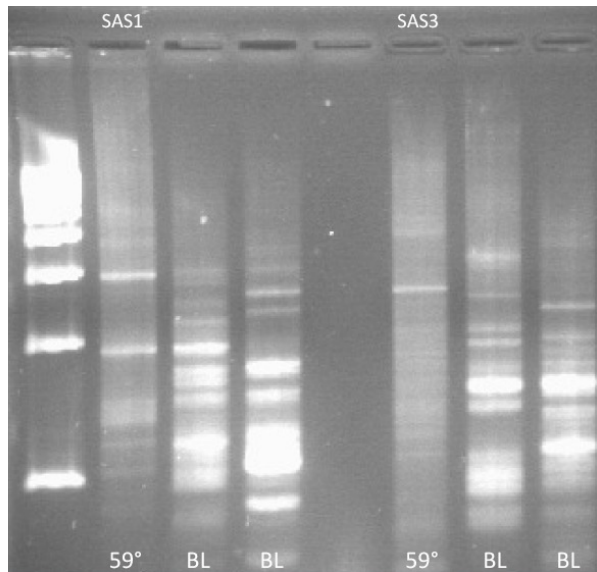


**Figuur 14:** Visualisatie van het PCR product op een 2% agarose gel na amplificatie met de SAS1 primer. Links bevindt zich een moleculaire ladder gevolgd door de PCR producten van een individu van *Gyratrix hermaphroditus* bij verschillende annealingtemperaturen. Rechts bevinden zich drie negatieve controles (enkel primer; bij verschillende annealingtemperaturen).

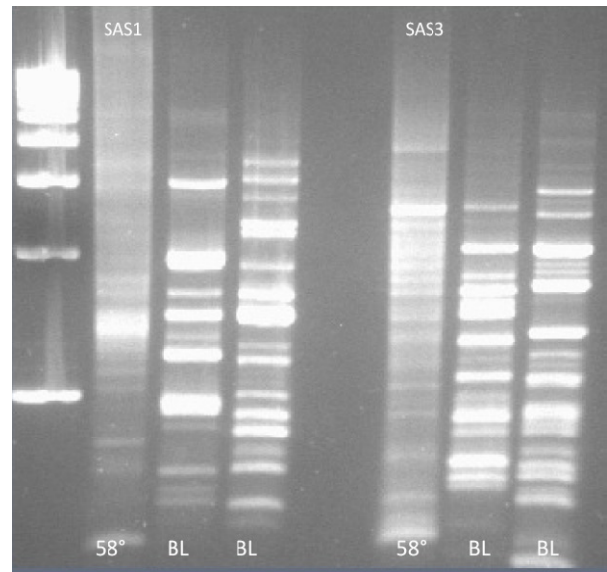


**Figuur 15:** Visualisatie van het PCR product op een 2% agarose gel na amplificatie met de SAS3 primer. Links bevindt zich een moleculaire ladder gevolgd door de PCR producten van een individu van *Gyratrix hermaphroditus* bij verschillende annealingtemperaturen. Rechts bevinden zich drie negatieve controles (enkel primer; bij verschillende annealingtemperaturen).

In een laatste fase werd geprobeerd aan de hand van een verhoging van het aantal PCR cycli of de primerconcentratie een stijging in de kwaliteit en het aantal bandjes te verkrijgen. Hiervoor werd het DNA-extract van één enkel specimen uit Doñana gebruikt. Op figuur 15 bleek dat een verhoging van het aantal cycli voor zowel SAS1 en SAS3 niet het gewenste effect veroorzaakte. Er ontstond een smeer doorheen het bandenpatroon dat hoogst waarschijnlijk veroorzaakt werd door amplificatie van aspecifieke producten. Figuur 16 toont dat een verhoging van de primerconcentratie een gunstiger effect op de kwaliteit van het bandenpatroon had, zeker voor de SAS3 primer. Een verdubbeling van de primerconcentratie zorgde voor duidelijke, scherp afgelijnde bandjes.



**Figuur 16:** Visualisatie van het PCR product op een 2% agarose gel na amplificatie met de SAS1 en SAS3 primers. Links bevindt zich een moleculaire ladder gevolgd door het PCR product van de SAS1 primer van een individu v *Gyratrix hermaphroditus* na 55 PCR cycli bij een annealingtemperatuur van 59°C. Rechts: het PCR product van de SAS3 primer van een *Gyratrix hermaphroditus* individu na 55 PCR cycli bij een annealingtemperatuur van 59°C. BL is de negatieve controle.



**Figuur 17:** Visualisatie van het PCR product op een 2% agarose gel na amplificatie met de SAS1 en SAS3 primers. Links: een moleculaire ladder gevolgd door het PCR product van de SAS1 primer van een *Gyratrix hermaphroditus* individu met een primerconcentratie van 4µM bij een annealingtemperatuur van 58°C. Rechts: het PCR product van de SAS3 primer van een *Gyratrix hermaphroditus* individu met een primerconcentratie van 4µM bij een annealingtemperatuur van 58°C. BL is de negatieve controle.

Omwille van tijdsgebrek was het niet mogelijk om de optimalisatie verder te vervolledigen voor de SAS1 en SAS3 primers. Niet tegenstaande blijkt de ISSR techniek een zeer krachtige moleculaire merker techniek te zijn, die zeker bruikbaar is voor onderzoek naar de fylogenetische verwantschappen en biogeografie van populaties op een kleinere geografische schaal.

## 6. Discussie

### 6.1. Optimalisatieproces van het 16S primerpaar

Optimalisatieprocessen lopen zelden zoals gepland. Hoewel er in vele wetenschappelijke artikels primers of bepaalde technieken aangehaald worden, wordt er zelden aandacht besteed aan wat voor optimalisatieproces hieraan voorafging. Gedurende de seniorstage was één van de doelstellingen, al dan niet de belangrijkste, om een werkend 16S primerpaar voor *Gyratrix hermaphroditus* te ontwikkelen. Het doorlopen van talrijke aanpassingen in de reactieparameters van het PCR protocol leverde uiteindelijk een werkend primerpaar op voor de zoetwaterpopulaties van *Gyratrix hermaphroditus*. Maar de fylogenetische analyses vereisten ook sequenties van de mariene populaties. Omdat er gestart werd vanuit universele 16S primers was het belangrijk om de primers specifiek voor *Gyratrix hermaphroditus* te maken. Hiervoor moest de sequentie van de primers zelf geoptimaliseerd worden. Er werd gezocht naar conservatieve delen in het 16S gen waarvoor een primer ontwikkeld kon worden. Na enkele pogingen ontwikkelden wij een zeer goed bruikbare primer, de 16SFlatF3 primer, die in combinatie met de universele 16SbrH gebruikt kan worden om het 16S gen van mariene populaties van *Gyratrix hermaphroditus* te amplificeren.

Toch bleven er mariene populaties over die niet correct geamplificeerd konden worden met behulp van dit primerpaar. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat het 16S gen een zeer hoge divergentie vertoont tussen de verschillende populaties van *Gyratrix hermaphroditus*, een divergentie die zeer hoog is vergeleken met andere soorten [41, 42]. Hierdoor is het moeilijk om een specifiek 16S primerpaar voor alle populaties van *Gyratrix hermaphroditus* te ontwikkelen. Maar ook voor de andere mitochondriale genen, zoals Cytochroom Oxidase 1 en Cytochroom B, zijn er moeilijkheden om een goed werkend primerpaar te ontwikkelen.

Een oplossing die al deze problemen zou kunnen omzeilen, is het sequencen van het volledige mitochondriaal DNA met behulp van next generation sequencing. De traditionele DNA sequencing technieken zijn slechts in staat om DNA fragmenten van 300 à 1000 nucleotiden lang in één keer te sequencen. Er zijn momenteel verschillende next generation sequencing protocols in ontwikkeling die in staat zijn om volledige chromosomen of mitochondriale genomen in één enkele keer te sequencen. Hoewel dit voorlopig nog een dure methode is, kunnen er dankzij deze techniek gemakkelijk verschillende mitochondriale genen gelokaliseerd worden eenmaal het volledige mitochondriaal genoom bekend is. Aan de hand van deze informatie kunnen primers ontwikkeld worden voor langere delen van het mitochondriaal DNA of kan zelfs het volledige mitochondriaal genoom gebruikt worden in fylogenetische analyses. Aan de hand van het 16S optimalisatieproces



werd dus duidelijk dat dit waarschijnlijk de enige oplossing is om een uitgebreide en correcte dataset van de verschillende mitochondriale genen te verkrijgen.

## 6.2. Fylogenetische analyses van het 16S gen

De resultaten van de parsimonie en de Bayesian inference analyses zijn voor wat betreft het 16S gen zeer gelijkaardig. Dezelfde monofyletische claden worden teruggevonden op basis van hun lokaliteiten. Over het algemeen vertoont het Bayesian inference cladogram meer resolutie dan het cladogram bekomen in de parsimonie analyse. Zo vormen de mariene taxa een monofyletische clade, die zeer goed ondersteund is (figuur 7), terwijl de parsimonie analyse de relaties tussen de marien taxa onderling en met de zoetwatertaxa niet kan oplossen. Getuige hiervan is de grote basale polytomie in het parsimonie cladogram (figuur 6). Doordat het 16S gen zo snel blijkt te evolueren binnen de verschillende taxa en de parsimonie analyse geen rekening houdt met een evolutionair substitutiemodel is deze analyse niet in staat een goede resolutie te geven voor de mariene claden. Omdat de Bayesian inference analyse gebruik maakt van het GTR substitutiemodel is deze wel in staat om de relatie van en binnen de mariene claden op te helderen.

Opvallend is dat de zoetwaterpopulaties afkomstig van India en Zuid-Afrika een zeer goed ondersteunde monofyletische clade vormen (parsimonie bootstrap: 91%, Bayesian posterior probability: 100%). Dit zou er op kunnen wijzen dat beide populaties een gemeenschappelijke voorouder hadden die ontstaan is voor het opsplitsen van het grote zuidelijke supercontinent Gondwana. Gondwana is het zuidelijk deel van het grote supercontinent Pangea dat op het einde van het Trias ( $\pm 210$  Ma) uiteenviel in een zuidelijk deel (Gondwana) en een noorderlijk deel (Laurazië). Zowel India als Afrika behoren tot het Gondwanaland en werden pas gesplitst  $\pm 160$  Ma. Genetische uitwisseling tussen populaties van Gondwanaland bleef dus veel langer mogelijk dan tussen populaties op het noordelijk en zuidelijk halfrond [1].

Het Bayesian inference cladogram (figuur 7) vertoont verder een hoge resolutie voor de Europese clade. Door op een kleinere schaal te werken voor de Europese populaties, zou er aan de hand van het 16S gen een intracontinentale fylogenie/verspreidingspatroon kunnen opgesteld worden voor *Gyratrix hermaphroditus*.

Het belangrijkste resultaat is echter de enorme variatie tussen de verschillende populaties van *Gyratrix hermaphroditus*. Vergeleken met fylogenetische studies van andere soorten, blijkt de divergentie van het 16S gen binnen *Gyratrix hermaphroditus* ongeveer overeen te komen met de divergentie van het 16S gen tussen bepaalde soorten of zelfs tussen hun genera. Uit een fylogenetische studie over *Marenzelleria* (Polychaeta, Spionidae) blijkt dat het 16S gen een divergentie, tussen de verschillende soorten, van 13% tot 30,8% bevat [43]. Deze verhoudingen zijn

ongeveer gelijkaardig voor het 16S gen van *Gyratrix hermaphroditus*, enkel worden deze divergentiewaardes voor *Gyratrix hermaphroditus* teruggevonden binnen dezelfde soort. In een andere studie rond Stomatopoda larven (Crustacea: Stomatopoda) wordt er aan de hand van het 16S gen een divergentie binnen de soort gevonden van <2,1%. De divergentie tussen de verschillende genera varieerde echter tussen de 3% tot 11% [44]. De divergentie tussen sommige claden van *Gyratrix hermaphroditus* is hoger dan de divergentie tussen verschillende genera van de Stomatopoda larven. Ook in tal van andere studies vinden we veel lagere divergentiewaardes voor het 16S gen binnen één soort terug [45, 46]. Dit wijst erop dat het *Gyratrix hermaphroditus* soortencomplex mogelijk uit een zeer groot aantal cryptische soorten bestaat.

### 6.3. Fylogenetische analyses van het COI gen

Het parsimonie cladogram voor COI is voor de mariene taxa onopgelost, dit is ook het geval voor het Bayesian inference cladogram (figuur 8 en 9). De taxa in de parsimonie analyse behoren net zoals bij het 16S gen tot een grote basale polytomie. Het feit dat de zoetwaterpopulatie van Zuid-Afrika in het Bayesian inference cladogram een zustergroep van de mariene taxa vormt, valt niet direct te verklaren. De oorzaak van deze topologie is mogelijk te vinden in het feit dat er maar één Zuid-Afrikaans populatie gebruikt werd in de analyses voor het COI gen. Door toevoeging van meerdere taxa, afkomstig van Zuid-Afrika of India zou dit een ander beeld kunnen geven voor deze populatie. Ook hier zien we weer hoge variatie van het COI gen tussen de verschillende populaties. Dit is mogelijk weer een bewijs van het bestaan van de cryptische biodiversiteit van *Gyratrix hermaphroditus*, zeker als deze resultaten vergeleken worden met de literatuur. In een studie rond vogels werd er aan de hand van het COI gen gekeken naar divergentie binnen een soort en naar divergentie tussen soorten. Deze bedroeg respectievelijk 0,43% en 7,93% [47]. In een andere studie over vlinders werd een gemiddelde COI divergentie vastgesteld van 2,76% [48]. In een studie omtrent mieren werd er een COI divergentie rond de 5% gevonden binnen een soort. De COI divergentie tussen soorten varieerde van 0% tot 10% [49]. Zoals hierboven vermeldt, wijst ook deze hoge divergentie van het COI gen bij *Gyratrix hermaphroditus* op een cryptisch soortencomplex.

### 6.4. Fylogenetische analyses van het ITS1 gen

Ook hier zijn beide cladogrammen bijna identiek (figuur 10 en 11). De mariene taxa vormen een parafyletische clade in beide cladogrammen. Beide cladogrammen vertonen veel structuur, met de vorming van claden volgens geografische verspreiding. Opnieuw is het Bayesian inference cladogram beter opgelost dan het parsimonie cladogram. Net zoals bij 16S vormen de taxa afkomstig van India

en Zuid-Afrika een monofyletische clade. Verder valt het op dat de taxa afkomstig van Noord-Amerika en Canada verdeeld worden in twee monofyletische claden, waarvan één meer gerelateerd is met de Europese taxa en de andere meer gerelateerd met Indische en Zuid-Afrikaanse clade. Een mogelijke verklaring is dat de groep gerelateerd met India en Zuid-Afrika een gemeenschappelijke voorouder hebben die teruggaat tot de splitsing van Zuid-Amerika met Gondwana. Toen er een landbrug (Midden-Amerika) ontstond tussen Noord- en Zuid-Amerika kon de voorouder zich via dispersie tot in Noord-Amerika en Canada verspreid hebben. De Noord-Amerikaanse taxa die nauwer verwant zijn met de Europese populaties zouden dan het resultaat kunnen zijn van recentere trans-Atlantische dispersie. Deze hypothese kan echter enkel bewezen worden door een populatie van Zuid-Amerika in de analyse op te nemen. Indien de Noord-Amerikaanse en Canadese taxa die verwant zijn met de Indische en Zuid-Afrikaanse taxa, ook verwant zijn met taxa afkomstig van Zuid-Amerika, zou dit een aannemelijke verklaring zijn voor het ITS1 cladogram.

Net zoals bij de vorige twee genen is er hier sprake van een hoge variatie van het ITS1 gen tussen de verschillende populaties. Hoewel er voor de divergentiewaarden van ITS1 niet veel bekend is bij andere soorten, bestaat er een studie rond sponzen die gebruik maakt van het nucleair ITS1 gen. In deze studie bedroeg de maximale divergentie binnen een soort 1,52%. De maximale divergentie binnen en tussen de verschillende genera bedroeg respectievelijk 17,28% en 30,69% [50]. De divergentie binnen en tussen de genera van de sponzen is van hetzelfde niveau als de divergentie binnen *Gyatrix hermaphroditus*. Dit wijst er weer op dat *Gyatrix hermaphroditus* meerdere cryptische soorten omvat.

## 7. Conclusie en synthese

Ten eerste valt het op dat de Bayesian inference cladogrammen bij alle drie genen meer resolutie vertoont dan bij de parsimonie analyses. De parsimonie cladogrammen voor 16S, COI en ITS1 vertonen op de diepere niveaus weinig resolutie door de vorming van een grote basale polytomie (figuur 6, 8 en 10). Dit is mogelijk te wijten aan het feit dat de parsimonie analyses geen evolutionair substitutiemodel gebruikten in hun berekeningen van de meest parsimone boom. Doordat de Bayesian inference analyses gebruik maakte van het General Time Reversible (GTR) model, werd er in deze analyses rekening gehouden met verschillende substitutieparameters, zoals meervoudige substituties op dezelfde plaatst tussen de verschillende taxa. Dit stelde de Bayesian inference analyses in staat om een hogere resolutie voor de cladogrammen te bereiken (figuur 7, 9 en 11).

Ten tweede kan er noch aan de hand van de parsimonie cladogrammen noch aan de hand van de Bayesian inference cladogrammen besloten worden of de mariene taxa een monofyletische of parafyletische clade vormen. Dit zou eventueel wel opgelost kunnen worden door meerdere mariene taxa aan een analyse toe te voegen.

Ten derde vertonen zowel de 16S als ITS1 cladogrammen steeds een monofyletische clade voor de zoetwaterpopulaties van Zuid-Afrika en India (figuur 6, 7, 10 en 11). Er zouden twee mogelijke verklaringen voor deze clade zijn. Een daarvan is dat de Zuid-Afrikaanse en Indische soorten verwant zijn aan elkaar aan de hand van lange afstand dispersie. Hoewel er niet veel geweten is over de dispersie capaciteiten van de microturbellaria, zouden de platwormen of hun eitjes kunnen getransporteerd worden door middel van drijvend afval, of zelfs drijvend ijs in de poolgebieden. Ook dieren die vaak in vochtige habitats vertoeven, zouden een rol kunnen spelen in de dispersie van de platwormen. Dit zijn dan voornamelijk de vogels indien het gaat over lange afstand dispersie [51]. Aangezien de volwassen platwormen meestal één of meerdere eitjes meedraagt, of over sperma beschikt van vorige copulaties om een eitje te bevruchten, kan één enkel individu voldoende zijn om een nieuwe locatie te koloniseren. Hoewel dispersie via deze wegen zeker een feit is, is het niet duidelijk in hoeverre deze processen de hedendaagse distributie van de microturbellaria beïnvloed heeft. Een tweede verklaring voor de clade van Zuid-Afrikaanse en Indische taxa is de continentendrift, waarbij de Zuid-Afrikaanse en Indische populaties over eenzelfde voorouderpopulatie beschikten die opgesplitst werd tijdens het opbreken van Gondwana in de verschillende continenten (Afrika, Zuid-Amerika, Antarctica, Australië en India). Deze verklaring lijkt de meest aannemelijke aangezien het hier over zoetwaterpopulaties gaat van Zuid-Afrika en India, waarvoor grote mariene oceanen een onoverbrugbare biogeografische barrière vormen.

Ten slotte het laatste maar al dan niet belangrijkste resultaat van deze studie is de hoge variatie van de drie genen tussen de verschillende populaties. Vergeleken met andere studies, ligt de divergentie van de drie genen velen malen hoger binnen *Gyratrix hermaphroditus* dan bij andere soorten. Dit geeft duidelijk een sterke indicatie dat het hier over meerdere soorten gaat. Zelfs over meer soorten dan dat we initieel in gedachten hadden. Hieruit kan besloten worden dat *Gyratrix hermaphroditus* wel degelijk een mooi voorbeeld is van een wereldwijd verspreid cryptisch soortencomplex. Naar de toekomst toe zou deze studies zeker uitgevoerd kunnen worden met het volledige mitochondriaal genoom in plaats van één barcoding gen. Verder zou de moleculaire informatie die verkregen werd aan de hand van deze studie getoetst moeten worden aan de gegevens die reeds geweten zijn over de morfologie en karyologie van *Gyratrix hermaphroditus*.

## 8. Dankwoord

Ongeveer zeven maanden, 60 PCR reacties en enkele zeer korte nachten later is de stage en het schrijven van de thesis dan uiteindelijk afgelopen. Het waren zeker de zeven interessantste en boeiendste maanden van de hele opleiding. Hoewel velen zich zullen afvragen hoe ik als biomedicus in de onderzoeksgroep biodiversiteit en taxonomie ben terecht gekomen, ben ik oprecht tevreden van mijn keuze die ik gemaakt heb. De interesse voor biodiversiteit en evolutie werd al vroeg in het eerste jaar aan de universiteit aangewakkerd. Dit had waarschijnlijk deels te maken met de boeiende lessen van professor Tom Artois en professor Patrick Reygel. Ook de daarop volgende jaren bleef de interesse voor de biodiversiteit even sterk. In mijn jaarwerkstuk besprak ik de biodiversiteit en verschillende soorten van de malariamug. Ik vond het dan ook een aangename afwisseling om toch enkele biologische aspecten te bestuderen in mijn loopbaan aan de universiteit.

In eerste plaats wil ik dus mijn promotor, prof. dr. Tom Artois, bedanken om me de kans te geven mezelf verder te verdiepen in de wondere wereld van de biodiversiteit en fylogenie. Ik zou hem ook graag bedanken voor het beantwoorden van talrijke vragen gedurende de stage, het bespreken van de cladogrammen, het nalezen en becommentariëren van mijn thesis. Zeker in deze laatste fase was je een grote hulp Tom! Graag zou ik hier ook mijn co-promotor, dr. Wim Willems, willen bedanken om me de kans te geven aan deze stage te beginnen en ze tot een goed einde te brengen.

Verder wil ik graag drs Bart Tessens bedanken. Bart, je was een grote hulp gedurende de hele stageperiode. Hoewel je enkele weken in het buitenland vertoefd hebt voor staalnames, was je altijd paraat me verder te helpen als ik met vragen zat, zeker diegene betreffende de moleculaire technieken die we gebruikten. Ook je fijne gezelschap als mijn begeleider is zeker de moeite waard om hier te vermelden.

Dr. Karen Smeets en drs. Niels Vandersteenkiste, bedankt voor de hulp tijdens de afwezigheid van Bart. Dra Kathleen Krznicaric zou ik graag bedanken voor het uitvoeren van de parsimonie analyses. Ook Floris Breman en Kurt Jordaens van het Koninklijk Museum voor Centraal-Afrika zijn het vermelden waard in dit dankwoord. Bedankt voor het opbouwen van de ITS1 dataset en het alligneren hiervan. Verder zou ik graag de onderzoeksgroep dierkunde willen bedanken voor de aangename werksfeer gedurende de stage.

Papa en mama, ik neem aan dat jullie nog steeds niet goed begrijpen waar ik de afgelopen maanden mee bezig ben geweest. Niettegenstaande wil ik jullie bedanken voor de kans die jullie me gaven om aan deze universitaire studie te beginnen. Bedankt voor alle steun afgelopen jaren!

Vervolgens zou ik graag al mijn vrienden willen bedanken voor het gezelschap, de fijne herinneringen en het opvrolijken van de afgelopen vijf jaar hier in Diepenbeek! Ik zal het zeker missen...

Ten slotte, zou ik graag mijn vriendin Liesbeth willen bedanken, voor de morele steun, het nalezen van mijn thesis en het geduld om naar mijn biodiversiteit “verhalen” te luisteren.

Bedankt iedereen voor de hulp tijdens de stage, zonder jullie was dit nooit gelukt!

## 9. Referenties

1. Upchurch, P., *Gondwanan break-up: legacies of a lost world?* Trends in Ecology & Evolution, 2008. **23**(4): p. 229-236.
2. Glasby, C.J. and B. Alvarez, *Distribution patterns and biogeographic analysis of Austral Polychaeta (Annelida)*. Journal of Biogeography, 1999. **26**(3): p. 507-533.
3. Sterrer, W., *Plate tectonics as a mechanism for dispersal and speciation in interstitial sand fauna*. Netherlands Journal of Sea Research, 1973. **7**: p. 200-222.
4. Nobrega, R., A.M. Sole-Cava, and C.A.M. Russo, *High genetic homogeneity of an intertidal marine invertebrate along 8000 km of the Atlantic coast of the Americas*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004. **303**(2): p. 173-181.
5. Curini-Galletti, M.C. and I. Puccinelli, *The Gyatrix hermaphroditus species-complex (Platyhelminthes kalyptorhynchia) in marine tropical areas: first data from the Caribbean*. Belgian Journal of Zoology, 1994. **124**(2): p. 157-166.
6. Karling, T.G. and E.R. Schockaert, *Anatomy and systematics of some Polycystididae (Turbellaria, Kalyptorhynchia) from the Pacific and S. Atlantic*. Zoologica Scripta, 1977. **6**: p. 5-19.
7. Meixner, J., *4. Turbellaria (Strudelwürmer)*. Die tierewelt der Nord- und Ostsee, 1938. **33**: p. 1-146.
8. Wang, A.T. and H. Li, *A new species of the genus Gyatrix from a freshwater pond in Guangdong province, China (Rhabdoceola, Polycystididae)*. Acta Zootaxonomica Sinica 2005. **30**(4): p. 721-724.
9. Karling, T.G., *Die turbellarien ostfennoskandiens - 5. Neorhabdoceola 3. Kalyptorhynchia*. Societas pro fauna et flora Fennica: Fauna Fennica 17, 1963. **17**: p. 1-59.
10. Meixner, J., *Morphologisch-kologische studien an neuen turbellarien aus dem meeressande der Kieler Bucht*. Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere, 1929. **14**: p. 765-791.
11. Artois, T.J. and E.R. Schockaert, *Interstitial fauna of the Galapagos: Duplacrorthynchinae, Macrorhynchinae, Polycystidinae, Gyatricinae (Plathelminthes, Polycystididae)*. Tropical Zoology, 2001. **14**: p. 63-85.
12. Puccinelli, I. and M.C. Curini-Galletti, *Chromosomal evolution and speciation in marine populations of Gyatrix hermaphroditus sensu lato (Platyhelminthes: Kalyptorhynchia) and in other species of the Gyatricinae*. Transactions of the American Microscopical Society, 1987. **106**(4): p. 311-320.
13. Curini-Galletti, M.C. and I. Puccinelli, *Karyometric and morphological analysis of two sympatric marine species of the Gyatrix hermaphroditus complex (Platyhelminthes: Kalyptorhynchia) occurins at Roscoff (Brittany, France)*. Hydrobiologia, 1989. **173**: p. 63-68.
14. Puccinelli, I., et al., *Chromosomal evolution and speciation in the Gyatrix hermaphroditus species complex (Platyhelminthes, Kalyptorhynchia): karyometric and morphological analyses of fifteen fresh-water populations from Western Europe*. Hydrobiologia, 1990. **190**: p. 83-92.
15. Curini-galletti, M.C. and I. Puccinelli, *The Gyatrix hermaphroditus Species Complex (Plathelminthes: Kalyptorhynchia) in the Darwin Area (Northern Territory, Australia)*. Trans.Am.Microsc.Soc., 1990. **109**(4): p. 368-379.
16. Rychlik, W., *Selection of primers for Polymerase Chain*. Molecular Biotechnology, 1995. **3**(2): p. 129-134.
17. McPherson, M.J. and S. Moller, *PCR Basics*. 2000, New York: Springer-Verlag.
18. Wägele, J.W., *Foundations of Phylogenetic Systematics*. second ed. 2005, München: Verlag Dr. Friedrich Pfeil.
19. Artois, T., *Cladistic analysis of the Polycystididae (Platyhelminthes, Kalyptorhynchia), with application of phylogenetic nomenclature*. 2001. (PhD thesis)
20. Sivia, D.S., *Data analysis: a Bayesian tutorial*. second ed. 2006, New York: Oxford University Press.
21. Altekar, G., et al., *Parallel metropolis coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian Phylogenetic Inference*. Bioinformatics, 2004. **20**(3): p. 407-415.
22. Lewis, P.O. and D.L. Swofford, *Back to the future: Bayesian inference arrives in phylogenetics*. Trends in Ecology and Evolution, 2001. **16**(11): p. 600-601.
23. Huelsenbeck, J.P. and F. Ronquist, *MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees*. Bioinformatics, 2001. **17**(8): p. 754-755.
24. Huelsenbeck, J.P., et al., *Potential Applications and Pitfalls of Bayesian Inference of Phylogeny*. Syst.Biol., 2002. **51**(5): p. 673-688.
25. Douady, C.J., et al., *Comparison of Bayesian and Maximum Likelihood Bootstrap Measures of Phylogenetic Reliability*. Mol.Biol.Evol., 2003. **20**(2): p. 248-254.
26. Williams, J.G.K., et al., *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. Nucleic Acids Research, 1990. **18**(22): p. 6531-6535.
27. Tautz, D., *Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers*. Nucleic Acids Research, 1989. **17**(16): p. 6463-6471.
28. Vos, P., et al., *AFLP- A new technique for DNA fingerprinting*. Nucleic Acids Research, 1995. **23**(21): p. 4407-4414.
29. Karp, A., et al., *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies*, in *IPGRI technical bulletin no 2*. 1997.



30. Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda, *Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored Polymerase Chain-Reaction amplification*. *Genomics*, 1994. **20**(2): p. 176-183.
31. Schockaert, E.R., *Turbellarians: The Importance of Turbellarians in Ecosystems*. CAB International, 1996. *Methods for the Examination of Organismal Diversity in Soils and Sediments*: p. 211-225.
32. Palumbi, S., et al., *The simple fool's guide to PCR. Version 2.0*. 1991, Honolulu: Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii.
33. Kalendar, R., D. Lee, and A.H. Schulman, *FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search*. *Genes, Genomes and Genomics*, 2009. **3**(1): p. 1-14.
34. Staden, R., K.F. Beal, and J.K. Bonfield, *The Staden Package*. *Methods in Molecular Biology*, 1998. **132**: p. 115-130.
35. Tamura, K., et al., *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. *Molecular Biology and Evolution*, 2007. **24**: p. 1596-1599.
36. Larkin, M.A., et al., *ClustalW and ClustalX version 2*. *Bioinformatics*, 2007. **23**(21): p. 2947-2948.
37. Goloboff, P.A., J.S. Farris, and K.C. Nixon, *TNT, a free program for phylogenetic analysis*. *Cladistics*, 2008. **24**(5): p. 774-786.
38. Ronquist, F. and J.P. Huelsenbeck, *MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models*. *Bioinformatics*, 2003. **19**: p. 1572-1574.
39. Posada, D., *jModelTest: Phylogenetic model averaging*. *Molecular Biology and Evolution*, 2008. **25**(7): p. 1253-1256.
40. Lai, T., M. Curini-Galletti, and M. Casu, *Genetic differentiation among populations of *Minona ileanae* (Platyhelminthes: Proseriata) from the Red Sea and the Suez Canal*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2008. **362**: p. 9-17.
41. Mincks, S.L., et al., *A new species of *Aurospio* (Polychaeta, Spionidae) from the Antarctic shelf, with analysis of its ecology, reproductive biology and evolutionary history*. *Marine Ecology-an Evolutionary Perspective*, 2009. **30**(2): p. 181-197.
42. Donald, K.M., M. Kennedy, and H.G. Spencer, *The phylogeny and taxonomy of austral monodontine topshells (Mollusca : Gastropoda : Trochidae), inferred from DNA sequences*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2005. **37**(2): p. 474-483.
43. Blank, M. and R. Bastrop, *Phylogeny of the mud worm genus *Marenzelleria* (Polychaeta, Spionidae) inferred from mitochondrial DNA sequences*. *Zoologica Scripta*, 2009. **38**(3): p. 313-321.
44. Tang, R.W.K., C. Yau, and W.C. Ng, *Identification of stomatopod larvae (Crustacea: Stomatopoda) from Hong Kong waters using DNA barcodes*. *Molecular Ecology Resources*. **10**(3): p. 439-448.
45. Aliabadian, M., et al., *Molecular Identification of Birds: Performance of Distance-Based DNA Barcoding in Three Genes to Delimit Parapatric Species*. *Plos One*, 2009. **4**(1).
46. Nikulina, E.A., *Taxonomy and ribosomal DNA-based phylogeny of the *Electra crustulenta* species group (Bryozoa: Cheilostomata) with revision of Borg's varieties and description of *Electra moskvikvendi* sp nov from the Western Baltic Sea*. *Organisms Diversity & Evolution*, 2008. **8**(3): p. 215-229.
47. Hebert, P.D.N., et al., *Identification of Birds through DNA Barcodes*. *Plos Biology*, 2004. **2**(10): p. 1657-1663.
48. Hebert, P.D.N., et al., *Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fuligator**. *PNAS*, 2004. **101**(41): p. 14812-14817.
49. Jansen, G., R. Savolainen, and K. Vepsäläinen, *DNA barcoding as a heuristic tool for classifying undescribed Nearctic *Myrmica* ants (Hymenoptera: Formicidae)*. *Zoologica Scripta*, 2009. **38**(5): p. 527-536.
50. Park, M.H., et al., *Identification of Gene Suitable for DNA Barcoding of Morphologically Indistinguishable Korean *Halichondriidae* Sponges*. *Molecules and Cells*, 2007. **23**(2): p. 220-227.
51. Vanschoenwinkel, B., et al., *Relative importance of different dispersal vectors for small aquatic invertebrates in a rock pool metacommunity*. *Ecography*, 2008. **31**: p. 567-577.

## 10. Bijlage

Tabel 4: Lokaliteit, coördinaten en habitat per genotype. Gt34 en Gt35 vormen de outgroup in de parsimonie en Bayesian inference analyses.

Genotype	Lokaliteit	Coördinaten	Habitat	Genotype	Lokaliteit	Coördinaten	Habitat
Gt1	België		Zoet	Gt19	Zuid-Afrika	28°28'01,7"S 32°15'46,7"E	Zoet
Gt2	België		Zoet	Gt20	India		Zoet
Gt3	België		Zoet	Gt21	Tvärminne (Finland)	60°5'30,23N 23°31'45,88"E	Zoet
Gt4	België		Zoet	Gt22	België		Zoet
Gt5	België		Zoet	Gt23	Sylt (Duitsland)	55°00'50,86"N 8°25'57,13"E	Marien
Gt6	België		Zoet	Gt24	Alabama (USA)	34°47.186'N 87°40.907'W	Zoet
Gt7	Tvärminne (Finland)	59°49'49,87"N 23°08'33,25"E	Zoet	Gt25	Alabama (USA)	34°47.186'N 87°40.907'W	Zoet
Gt8	Tvärminne (Finland)	59°49'49,87"N 23°08'33,25"E	Zoet	Gt26	Cerbère (Frankrijk)	42°26'27,71"N 3°09'59,61"E	Marien
Gt9	Greifswald (Duitsland)	54°7'37"N 13°20'34"E	Zoet	Gt27	Roscoff (Frankrijk)	48°43'43,11N 3°59'02,46W	Marien
Gt10	Greifswald (Duitsland)	54°7'37"N 13°20'34"E	Zoet	Gt28	India		Zoet
Gt11	Doñana (Spanje)		Zoet	Gt29	India		Zoet
Gt12	Tvärminne (Finland)	60°5'30,23N 23°31'45,88"E	Zoet	Gt30	India		Zoet
Gt13	Doñana (Spanje)		Zoet	Gt31	India	15°42'09.9"N 73°41'39.8"E	Zoet
Gt14	Oostenrijk	47°17'16,5"N 13°52'00,6"E	Zoet	Gt32	Sardinië		Marien
Gt15	Oostenrijk	47°17'16,5"N 13°52'00,6"E	Zoet	Gt33	Sardinië		Marien
Gt16	Galicië (Spanje)		Zoet	Gt34	<i>Gyratrix Proavus</i>		
Gt17	Galicië (Spanje)		Zoet	Gt35	<i>Neopolycystis tridentata</i>	55°00'50,86"N 8°25'57,13"E	
Gt18	Zuid-Afrika	28°28'01,7"S 32°15'46,7"E	Zoet	Gt36	Cerbère (Frankrijk)	42°26'27,71"N 3°09'59,61"E	Marien

Tabel 5: Lokaliteit en habitat per genotype. Gt21 vormt de outgroup in de parsimonie en Bayesian inference analyses.

Genotype	Lokaliteit	Coördinaten	Habitat	Genotype	Lokaliteit	Coördinaten	Habitat
Gt1	Roscoff (Frankrijk)	48°43'43,11N 3°59'02,46W	Marien	Gt12	België		Zoet
Gt2	Roscoff (Frankrijk)	48°43'43,11N 3°59'02,46W	Marien	Gt13	België		Zoet
Gt3	Tvärminne (Finland)	60°5'30,23N 23°31'45,88"E	Zoet	Gt14	Mol (België)		Zoet
Gt4	Tvärminne (Finland)	60°5'30,23N 23°31'45,88"E	Zoet	Gt15	Oostenrijk	47°17'16,5"N 13°52'00,6"E	Zoet
Gt5	Tvärminne (Finland)	60°5'30,23N 23°31'45,88"E	Zoet	Gt16	Oostenrijk	47°17'16,5"N 13°52'00,6"E	Zoet
Gt6	Tvärminne (Finland)	60°5'30,23N 23°31'45,88"E	Zoet	Gt17	Sylt (Duitsland)	55°00'50,86"N 8°25'57,13"E	Marien
Gt7	Doñana		Zoet	Gt18	Sylt (Duitsland)	55°00'50,86"N	Marien

	(Spanje)				8°25'57,13"E	
<b>Gt8</b>	Doñana (Spanje)	Zoet	<b>Gt19</b>	Roscoff (Frankrijk)	48°43'43,11N 3°59'02,46W	Marien
<b>Gt9</b>	België	Zoet	<b>Gt20</b>	Zuid-Afrika	28°28'01,7"S 32°15'46,7"E	Zoet
<b>Gt10</b>	België	Zoet	<b>Gt21</b>	<i>Neopolycystis tridentata</i>		
<b>Gt11</b>	België	Zoet				

Tabel 6: Lokaliteit en habitat per genotype. Gt73\_74 vormt de outgroup in de parsimonie en Bayesian inference analyses.

Genotype	Lokaliteit	Coördinaten	Habitat	Genotype	Lokaliteit	Coördinaten	Habitat
<b>Gt1</b>	India	15°34'2.8"N 73°44'28.5"E	Marien	<b>Gt34</b>	Alabama (USA)	34°38'54,35"N 86°49'08,19"W	Zoet
<b>Gt2</b>	Cerbère (Frankrijk)	42°26'31,34"N 3°10'02,92"E	Marien	<b>Gt35</b>	Alabama (USA)	34°38'54,35"N 86°49'08,19"W	Zoet
<b>Gt3</b>	Cerbère (Frankrijk)	42°26'31,34"N 3°10'02,92"E	Marien	<b>Gt36</b>	Alabama (USA)	34°38'54,35"N 86°49'08,19"W	Zoet
<b>Gt4</b>	Cerbère (Frankrijk)	42°26'31,34"N 3°10'02,92"E	Marien	<b>Gt38</b>	Alabama (USA)	34°33.853'N 86°46.728'W	Zoet
<b>Gt5</b>	Roscoff (Frankrijk)	48°43'43,11N 3°59'02,46W	Marien	<b>Gt39</b>	Alabama (USA)	34°47.186'N 87°40.907'W	Zoet
<b>Gt6</b>	Roscoff (Frankrijk)	48°43'43,11N 3°59'02,46W	Marien	<b>Gt40</b>	Alabama (USA)	34°33.293'N 86°57.284'W	Zoet
<b>Gt7</b>	Roscoff (Frankrijk)	48°43'43,11N 3°59'02,46W	Marien	<b>Gt41</b>	Tvärminne (Finland)	59°49'49,87"N 23°08'33,25"E	Zoet
<b>Gt8</b>	Roscoff (Frankrijk)	48°43'43,11N 3°59'02,46W	Marien	<b>Gt42</b>	Tvärminne (Finland)	59°49'49,87"N 23°08'33,25"E	Zoet
<b>Gt9</b>	Sylt (Duitsland)	55°00'50,86"N 8°25'57,13"E	Marien	<b>Gt43</b>	Tvärminne (Finland)	59°49'9.05"N 23°15'36.18"E	Zoet
<b>Gt10</b>	Sylt (Duitsland)	55°00'50,86"N 8°25'57,13"E	Marien	<b>Gt44_46_49</b>	Tvärminne (Finland)	59°49'49,87"N 23°08'33,25"E	Zoet
<b>Gt11</b>	Greifswald (Duitsland)	54°7'37"N 13°20'34"E	Zoet	<b>Gt45</b>	Tvärminne (Finland)	59°49'8,33"N 23°15'26,93"E	Zoet
<b>Gt12</b>	Tvärminne (Finland)	60°5'30,23N 23°31'45,88"E	Zoet	<b>Gt47</b>	Tvärminne (Finland)	59°49'8,33"N 23°15'26,93"E	Zoet
<b>Gt13</b>	Tvärminne (Finland)	60°5'30,23N 23°31'45,88"E	Zoet	<b>Gt48</b>	Tvärminne (Finland)	59°49'9.05"N 23°15'36.18"E	Zoet
<b>Gt14</b>	India	15°39'48.9"N 73°46'33.0"E	Zoet	<b>Gt50_52</b>	Oostenrijk	47°14'15,5"N 15°00'35,5"E	Zoet
<b>Gt15</b>	India	15°39'48.9"N 73°46'33.0"E	Zoet	<b>Gt51</b>	Oostenrijk	47°14'15,5"N 15°00'35,5"E	Zoet
<b>Gt16</b>	India	15°39'48.9"N 73°46'33.0"E	Zoet	<b>Gt53</b>	Oostenrijk	47°14'15,5"N 15°00'35,5"E	Zoet
<b>Gt17</b>	India	15°39'48.9"N 73°46'33.0"E	Zoet	<b>Gt54</b>	Oostenrijk	47°14'15,5"N 15°00'35,5"E	Zoet
<b>Gt18</b>	Zuid-Afrika	28°28'01,7"S 28°28'01,7"S	Zoet	<b>Gt55</b>	Oostenrijk	47°20'39,1"N 14°20'39,1"E	Zoet
<b>Gt19</b>	Zuid-Afrika	28°28'01,7"S 28°28'01,7"S	Zoet	<b>Gt56</b>	India	15°34'32.8"N 73°56'31.8"E	Zoet
<b>Gt20</b>	Zuid-Afrika	28°28'01,7"S 28°28'01,7"S	Zoet	<b>Gt57</b>	India	15°33'28.5"N 73°45'34.3"E	Zoet
<b>Gt21</b>	India	15°42'09.9"N 73°41'39.8"E	Marien	<b>Gt58</b>	India	15°34'32.8"N 73°56'31.8"E	Zoet
<b>Gt22</b>	India	15°34'2.8"N 73°44'28.5"E	Marien	<b>Gt59_62</b>	India	15°33'28.5"N 73°45'34.3"E	Zoet
<b>Gt23</b>	Canada	43°14'19.6"N 79°59'17.4"W	Zoet	<b>Gt60_61</b>	India	15°29'33.4"N 73°55'49.9"E	Zoet

<b>Gt24</b>	Alabama (USA)	34°38'54,35"N 86°49'08,19"W	Zoet	<b>Gt63_68</b>	Oostenrijk	47°16'17,03"N 14°04'46,76"E	Zoet
<b>Gt25</b>	Alabama (USA)	34°38'54,35"N 86°49'08,19"W	Zoet	<b>Gt64</b>	Canada	43°13'40.2"N 80°03'15.2"W	Zoet
<b>Gt26</b>	Canada	43°13'40.2"N 80°03'15.2"W	Zoet	<b>Gt65</b>	Canada	43°13'40.2"N 80°03'15.2"W	Zoet
<b>Gt27</b>	Canada	43°16'13.4"N 79°54'32.9"W	Zoet	<b>Gt66</b>	Greifswald (Duitsland)	54°7'37"N 13°20'34"E	Zoet
<b>Gt28</b>	Alabama (USA)	34°47.186'N 87°40.907'W	Zoet	<b>Gt67</b>	Greifswald (Duitsland)	54°7'37"N 13°20'34"E	Zoet
<b>Gt29</b>	Alabama (USA)	35°20'02,4"N 88°15'45,2"W	Zoet	<b>Gt70</b>	Alabama (USA)	32°48.430'N 87°48.255'W	Zoet
<b>Gt30</b>	Alabama (USA)	35°20'02,4"N 88°15'45,2"W	Zoet	<b>Gt71</b>	Alabama (USA)	35°20'02,4"N 88°15'45,2"W	Zoet
<b>Gt31_37</b>	Alabama (USA)	32°48.430'N 87°48.255'W	Zoet	<b>Gt72</b>	India	15°33'28.5"N 73°45'34.3"E	Zoet
<b>Gt32_69</b>	Alabama (USA)	32°48.430'N 87°48.255'W	Zoet	<b>Gt73_74</b>	<i>Gyratrix</i> <i>Proavus</i>		
<b>Gt33</b>	Alabama (USA)	34°38'54,35"N 86°49'08,19"W	Zoet				

## Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

**Fylogenetische analyse en cryptische biodiversiteit van het Gyratrix hermaphroditus soortencomplex**

Richting: **master in de biomedische wetenschappen-milieu en gezondheid**

Jaar: **2010**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Voor akkoord,

**Robeyns, Rob**

Datum: **15/06/2010**