

# Fylogenetische SSU rDNA-analyse van het fylum Nematoda

Martijn Holterman, Sven van den Elsen, Hanny van Megen, André van der Wurff en Johannes Helder

Laboratorium voor Nematologie, Binnenhaven 5, 6709 PD, Wageningen; e-mail: martijn.holterman@wur.nl

**De moeder van alle plantenparasitaire nematoden bestaat niet; het zijn meerdere (waarschijnlijk vijf of meer) moeders geweest. Plantparasitisme is dus meerdere malen onafhankelijk van elkaar 'uitgevonden'. De meest basale ('primitieve') groep wordt gevormd door de Trichodoriden. Onafhankelijk daarvan ontstonden de Longidorus / Xiphinema-groep en de Tylenchideaaltjes. Het patroon dat zich aftekent is dat schimmelende nematoden zich in de loop van de evolutie ontwikkeld hebben tot facultatieve plantenparasieten (bijvoorbeeld *Bursaphelenchus*), en dat de obligate plantenparasieten daar dan weer uit ontstaan zijn. Binnen de bekende plantenparasitaire aaltjessoorten zien we een paar opmerkelijk dingen: wortelknobbelaaltjes (*Meloidogyne spp.*) zijn voortgekomen uit de Pratylenchidae, terwijl de cystenaaltjes zijn ontstaan uit de Hoplolaimidae (o.a. *Rotylenchus*). Een ander opmerkelijk feit is dat het gen waarop dit onderzoek zich richt (ribosomaal-DNA) bij plantenparasieten sneller verandert dan bij veel vrijlevende aaltjes. Dit levert een onverwacht voordeel op: de gevonden informatie maakt het mogelijk om individuele soorten van elkaar te onderscheiden: met behulp van deze dataset kunnen stengelaaltjes (bijv. *Ditylenchus dipsaci*), wortellesieaaltjes (individuele *Pratylenchus*-soorten) en wortelknobbelaaltjes-soorten van elkaar onderscheiden worden. Anders dan in het verleden is het ontwikkelingsstadium van de nematoden nu niet meer van belang en kunnen monsters van vrijwel willekeurige grootte snel geanalyseerd worden. Het is opmerkelijk dat deze kennis voortgekomen is uit een onderzoek dat voornamelijk gedreven werd door nieuwsgierigheid naar de ontstaansgeschiedenis van deze bijzondere diergroep.**

## Inleiding

Nematoden vormen één van de meest gevarieerde en succesvolle diergroepen ter wereld. Ze zijn waarschijnlijk de meest talrijke dieren op aarde, komen in uiteenlopende milieus voor (zowel terrestrisch als marien) en spelen een belangrijke rol in het ecosysteem. De verscheidenheid van voedingstypes en habitats maken deze groep ook erg interessant vanuit een evolutionair oogpunt. Ons onderzoek richt zich op het uitzoeken van de evolutionaire

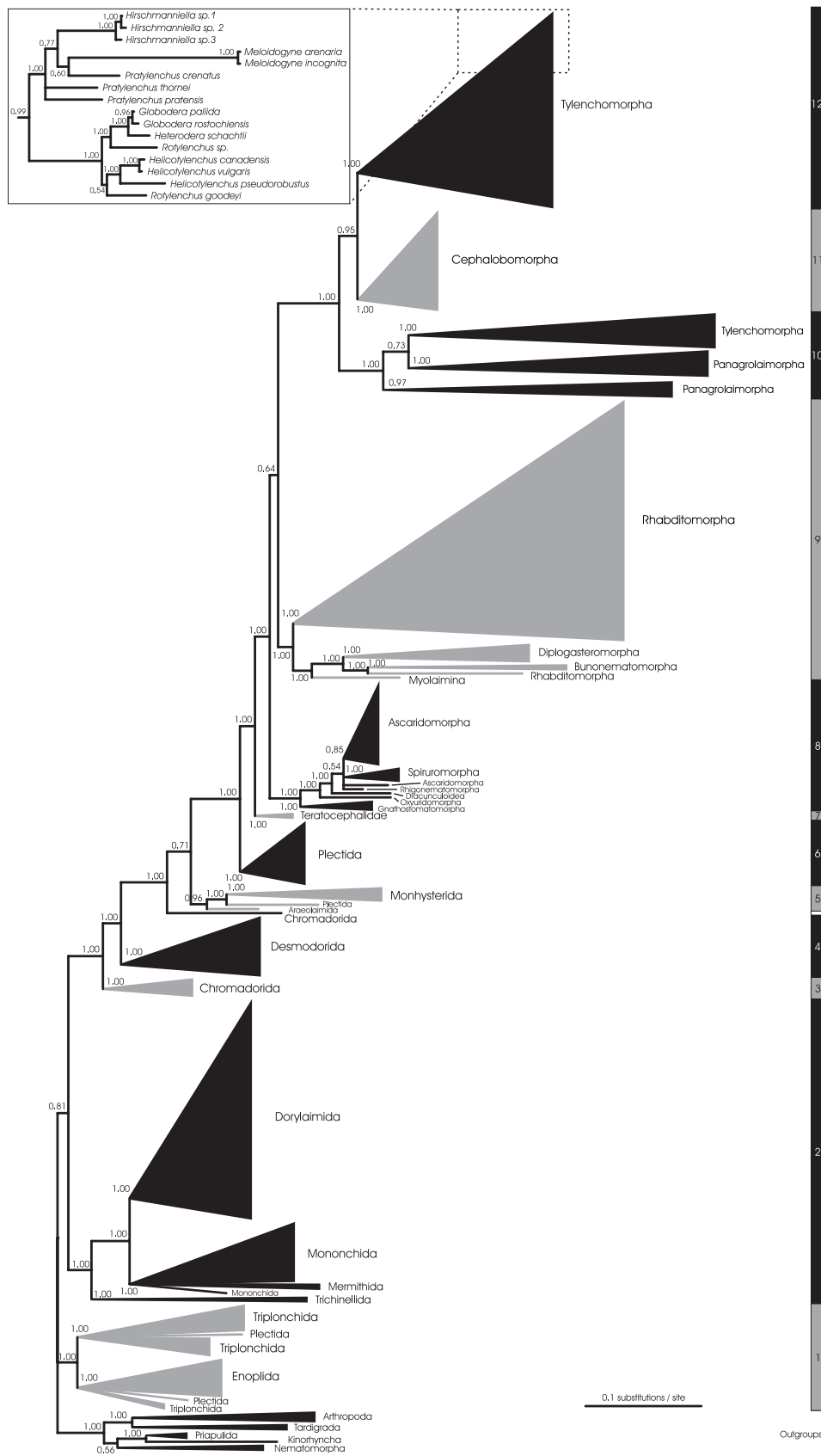
verwantschappen tussen nematoden aan de hand van het ribosomaal DNA – een neutraal gen dat niets te maken heeft met dier- of plantparasitisme – en de evolutie van kenmerken als voedingstypen, stresstolerantie en de overgang van een marien leefmilieu naar het land.

Nematodentaxonomie is een onderzoeksveld dat sinds het begin in beweging is geweest. De geconserveerde morfologie en de vaak moeilijk waarneembare kenmerken bemoeilij-

ken de reconstructie van de evolutie van nematoden. Dit heeft tot gevolg gehad dat de nematodensystematiek steeds veranderde en er bijna net zoveel classificaties als taxonomen zijn. De laatste jaren is er veel veranderd door de opkomst van de moleculaire fylogenie. Het gebruik van DNA-sequenties – in het geval van nematoden vaak het *small subunit ribosomal* DNA (SSU rDNA)-gen – om de evolutie te traceren heeft geleid tot nieuwe inzichten en een hernieuwde interesse in nematodenevolutie.

## Moleculaire fylogenie en de huidige taxonomie

In 1998 publiceerden Blaxter *et al.* de eerste grote moleculaire fylogenie van het fylum Nematoda op basis van SSU rDNA-sequenties. Deze fylogenetische 'boom' bestond uit ongeveer vijftig soorten verspreid over het hele fylum. Er konden toen vijf grote claden onderscheiden worden. Een clade is een groep organismen, die alle individuen omvat die afstammen van een bepaalde gemeenschappelijke evolutionaire voorouder, plus die voorouder zelf (zie kader voor fylogenetische begrippen). Veel groepen waren echter nog niet of ondervetegenwoordigd in deze boom. Op de basis van 349 SSU rDNA-sequenties (169 door ons verzameld, 180 van GenBank) is een fylogenetische



ARTIKEL

Figuur 1. Schematische weergave van de Bayesian-fylogenetische boom van de nematoden. De balk en kleuring geven de cladenindeling aan. Getallen in de boom staan voor de posterior probabilities. De indeling van (sub-, infra-) ordes volgt De Ley & Blaxter (2002; 2004). De inzet laat het meest distale gedeelte van de boom in meer detail zien.



boom geconstrueerd (Holterman *et al.*, 2006) waarin meer groepen vertegenwoordigd zijn. In Figuur 1 is een schematische weergave van deze boom te zien (voor de volledige boom, zie Holterman *et al.*, 2006). Zoals in de figuur te zien is kunnen er momenteel twaalf grote claden onderscheiden worden. Deze claden worden ook goed ondersteund door de data met *posterior probabilities* (p.p.) (zie kader) van 0.96 tot 1.00. De *posterior probability* is een maat voor de betrouwbaarheid van een gevonden clade en een p.p. van 0.95 of hoger wordt als betrouwbaar beschouwd. Ook de relaties tussen de twaalf claden worden over het algemeen goed ondersteund. Het SSU rDNA is een geconserveerd gen waarin relatief weinig mutaties plaats vinden en is daarom vooral geschikt voor het bepalen van diepe fylogenetische relaties. Echter, bij nematoden bleek het SSU verrassend genoeg ook een goede resolutie te bieden op lager taxonomisch niveau. Families konden goed van elkaar onderscheiden worden en in veel gevallen ook de geslachten en soms zelfs soorten (inzet Fig. 1). Grote uitzondering zijn de Dorylaimida waarbinnen het SSU zo weinig variatie vertoont dat er geen resolutie verkregen kon worden binnen deze orde.

De huidige indeling (De Ley & Blaxter, 2002; 2004) op ordeniveau en lager komt wel grotendeels overeen met de fylogenetische boom. Grote uitzondering zijn de Plectida waarvan leden op vier verschillende plaatsen (Claden 1, 5 en 6) in de boom zijn terug te vinden. Opvallend is verder de scheiding van de Aphelenchidae en Paraphelenchidae (Tylenchomorpha, Clade 12) van de Aphelenchoididae, Parasitaphelenchidae en Seinuridae (Tylenchomorpha,

Clade 10; zie Holterman *et al.*, 2006). De positionering van de laatste drie families in Clade 10 is waarschijnlijk een zogenaamd 'long branch attraction' artefact, veroorzaakt door de sterk afwijkende GC-percentages in het SSU rDNA van de groepen in Clade 10 (zie kader).

### De oorsprong van de Secernentea

Nematoden zijn traditioneel altijd ingedeeld in twee klassen, de Adenophorea en de Secernentea. Er zijn in het verleden al twijfels geuit over de monofylie van de Adenophorea (Maggenti, 1963) en dit wordt ondersteund door de moleculaire fylogenie. De Adenophorea (Claden 1-7) zijn duidelijk parafyletisch ten opzichte van de Secernentea (Claden 8-12). Leden van het geslacht *Teratocephalus* (Clade 7) lijken waarschijnlijk het meest op de voorouder van de Secernentea. Dit is in tegenstelling tot een recente hypothese op basis van de slokdarm morfologie die stelt dat de Secernentea waarschijnlijk uit de Plectida voortkwamen (Fürst von Lieven, 2003) en de resultaten van Blaxter *et al.* (1998) die de Plectida als zustergroep aanwezen.

### Wat is de oudste groep nematoden?

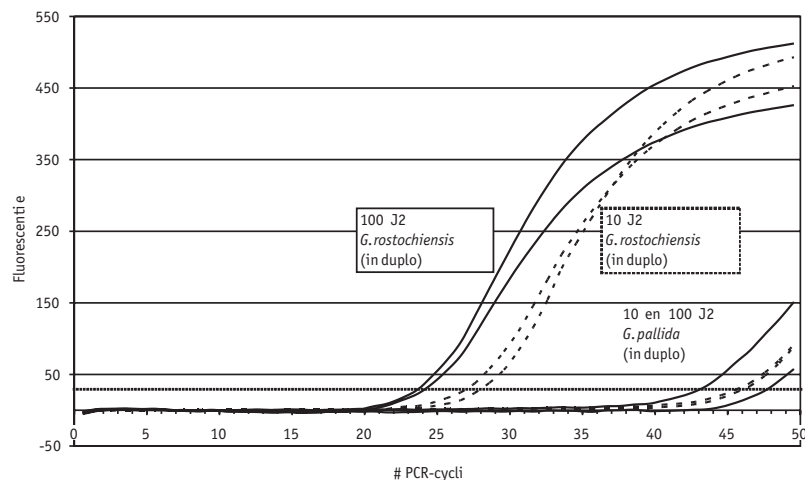
Clade 1, de meest basale clade in de boom, wordt gevormd door leden van de orders Enoplida, Triplonchida en enkele Plectida. Dit komt overeen met de algemene opvatting dat de voorouder van alle nematoden waarschijnlijk erg leek op leden van de huidige Enoplida. Deze basale positie in de moleculaire fylogenie wordt echter niet sterk ondersteund aangezien

de tak die claden 2-12 verbindt maar een p.p. van 0.81 heeft. Er zijn echter nog enkele andere aanwijzingen die de basale positie van deze clade ondersteunen. Het ontwikkelingspatroon van het embryo in leden van Clade 1 lijkt erg op die van andere dieren en niet op het typische ontwikkelingspatroon van andere nematoden (Schierenberg, 2005). Hetzelfde geldt voor de morfologie van de spermatozoa (Justine, 2002). Het is dus redelijk om te veronderstellen dat de oernematode erg leek op de huidige Enoplida en Triplonchida.

### Oorsprong van plantparasitisme

Er is een oude hypothese die stelt dat plantparasieten zijn geëvolueerd uit schimmelleers (Maggenti, 1971). Met behulp van de moleculaire fylogenie kan deze hypothese getest worden. Plantparasitisme is tenminste vijf keer ontstaan in de evolutie; in Clade 1 (Trichodoridae), twee maal in Clade 2 (Longidoridae en *Longidorella/Pungentus*), in Clade 12 (de meeste Tylenchomorpha) en de Aphelenchoididae en Parasitaphelenchidae (Tylenchomorpha Clade 10, maar horen waarschijnlijk in Clade 12). Bij zowel de plantparasitaire Tylenchomorpha als de Trichodoridae bestaan de naaste verwanten uit schimmelleers (Holterman *et al.*, 2006). In het geval van de Tylenchomorpha zijn dit *Pseudhalenchus* (Anguinidae), de Aphelenchidae en de Paraphelenchidae, in het geval van de Trichodoridae zijn dit de Diphtherophoridae. Ook binnen de Dorylaimida bevinden zich schimmelleers, maar door de slechte resolutie binnen de Dorylaimida is niet





**Figuur 2.** Real-time PCR-amplificatiecurven (in duplo) laten zien dat SNPs in het SSU rDNA gebruikt kunnen worden om *G. rostochiensis*-juvenielen (J2) (kwantitatief) te onderscheiden van hetzelfde aantal *G. pallida*-juvenielen ( $\Delta C_t \approx 20$  cycli).  $C_t$ : cyclus waarin de drempelwaarde wordt bereikt.

duidelijk hoe deze zich tot de plant parasitaire Dorylaimida verhouden. Echter het feit dat plant parasitaire nematoden en schimmeleers steeds zo nauw aan elkaar verwant zijn ondersteunt de hypothese. In het geval van de Tylenchomorpha kan zelfs met zekerheid gesteld worden dat de voorouder een schimmel-eater was.

### Versnelde evolutie binnen de Nematoda

Binnen het fylum Nematoda is een versnelling in de evolutiesnelheid zichtbaar van de basale naar de distale claden. Dit is in de boom duidelijk zichtbaar aan de langere taklengten in de distale claden (9-12; Fig. 1). Een test ('relative rate test', zie kader) bevestigde dat Claden 8-12 sneller evolueerden dan de basale Claden 1-7. Er zijn twee factoren die deze verhoogde mutatiesnelheid waarschijnlijk veroorzaken: een verhoogd contact met vrije radicalen, bijvoorbeeld ten gevolge van hoge metabolische activiteit, en/of een verhoogde accumulatie van DNA-repli-

catiefouten veroorzaakt door een korte generatietijd. Een groot gedeelte van deze claden bestaat uit kleine bacterie-eters met een korte generatietijd (Claden 9-11). Dit komt mede tot uiting in de *c-p* waarden van deze groepen in de zogenaamde Maturity Index (Bongers, 1990). Dit is een ecologische schaal van 1-5 waarmee wordt aangegeven of organismen opportunistisch en stress-tolerant of stressgevoelig zijn; er zijn typische 'colonisers' (*c-p* waarde 1, met zogenaamde *r*-strategie) of typische 'persisters' (*c-p* waarde 5, met zogenaamde *K*-strategie). Deze *c-p* waarden zijn o.a. gebaseerd op de generatietijd. Nematoden in *c-p* klasse 1 hebben korte levenscycli, grote geslachtsorganen en produceren grote hoeveelheden nakomelingen. De niet-parasitaire families in Clade 9 hebben bijzonder lage *c-p* waarden: Rhabditidae (1), Diplogasteridae (1), Neodiplogasteridae (1), Bunonematidae (1) en Myolaimidae (2). Hetzelfde geldt voor Clade 10: Panagrolaimidae (1), Brevibuccidae (1), Alloionematidae (1); en Clade 11: Cephalobidae (2) en Os-

stellidae (2). De hogere mutatiesnelheid van de overige families wordt waarschijnlijk veroorzaakt door het feit dat dit parasieten van planten (Clade 12, Aphelenchoididae en Parasitaphelenchidae) of dieren (Clade 8, Strongyloidea, Heterorhabditidae, Steinernematidae en Strongyloididae) zijn. Zowel in planten als dieren worden de nematoden blootgesteld aan vrije radicalen (vnl. reactieve zuurstofverbindingen) die onderdeel zijn van de afweerrespons van de waard.

### Nematode barcoding

De verhoogde evolutiesnelheid heeft tot gevolg dat veel nematoden tot op soortsniveau van elkaar onderscheiden kunnen worden, ook als deze morfologisch extreem veel op elkaar lijken, bijv. *Globodera rostochiensis* en *Globodera pallida* (inzet Fig. 1). In veel gevallen is dit onderscheid gebaseerd op *single nucleotide polymorphisms* (SNP). Deze SNPs kunnen gebruikt worden om soorten te identificeren en te kwantificeren m.b.v. moleculaire methoden. Een voorbeeld wordt gegeven in Figuur 2 waar *G. rostochiensis* wordt gedetecteerd m.b.v. specifieke primers terwijl de zeer nauw verwante *G. pallida* vrijwel geen amplificatie laat zien. Door het gebruik van 'real time PCR' (ook wel kwantitatieve PCR genoemd) kan ook een schatting gemaakt worden van het aantal aanwezige nematoden (Fig. 2). Dit biedt mogelijkheden tot ontwikkeling van een moleculair *barcoding*-systeem waarmee bijvoorbeeld snel en goedkoop een bodemanalyse van de nematodenfauna gedaan kan worden of quarantaine organismen kunnen worden gedetecteerd. Een dergelijk systeem wordt op dit moment ontwikkeld in een samenwer-



king tussen het Laboratorium voor Nematologie (Wageningen Universiteit), Blgg (Oosterbeek) en BioClear B.V. (Groningen) en wordt al in de praktijk toegepast door het Blgg voor de detectie van het stengelaaltje (*Ditylenchus dipsaci*).

### Literatuur

Blaxter, M.L., De Ley, P., Gary, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T. & Thomas, W.K., 1998. A molecular evolutionary framework for the Nematoda. *Nature* 392, 71-75.  
Bongers, T., 1990. The maturity index – an ecological measure of environmental

disturbance based on nematode species composition. *Oecologia* 83, 14-19.  
De Ley, P. & Blaxter, M.L., 2002. Systematic position and phylogeny. In: *The biology of nematodes*, Lee, D.L. (ed.), Taylor & Francis, London, Verenigd Koninkrijk, 1-30.  
De Ley, P. & Blaxter, M.L., 2004. A new system for Nematoda: combining morphological data with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. In: *Proceedings of fourth international congress of nematology*, 8-13 June, Tenerife, Spain, Cook, R. & Hunt, D.J. (eds.), Brill, Leiden, Nederland, 633-653.  
Fürst von Lieven, A., 2003. Functional morphology and evolutionary origin of the three-part pharynx in nematodes. *Zoology* 106, 183-201.  
Holterman, M., Van der Wurff, A., Van den Elsen, S., Van Megen, H., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J. & Helder, J., 2006. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships

among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. *Molecular Biology and Evolution* 23, 1792-1800.  
Justine, J.L., 2002. Male and female gametes and fertilisation. In: *The biology of nematodes*, Lee, D.L. (ed.), Taylor & Francis, London, Verenigd Koninkrijk, 73-119.  
Maggenti, A.R., 1963. Comparative morphology in nematode phylogeny. In: *The lower Metazoa, comparative biology and phylogeny*, Dougherty, E.C. (ed.), University of California Press, Berkeley, Verenigde Staten, 273-282.  
Maggenti, A.R., 1971. Nematode relationships and the origin of plant parasitic nematodes. In: *Plant parasitic nematodes*, Zuckerman, B.M., Mai, W.F. & Rohde, R.A. (eds.), Academic Press Inc., New York, Verenigde Staten, 65-81.  
Schierenberg, E., 2005. Unusual cleavage and gastrulation in a freshwater nematode: developmental and phylogenetic implications. *Development Genes and Evolution* 215, 103-108.

# ARTIKEL

## Fylogenetische begrippen

In verwantschapsstudies wordt een aantal technische termen gebruikt die hier worden verklaard.

Bayesian-fylogenetische analyse	Een fylogenetische analysemethode waarbij gebruik gemaakt wordt van Bayesian-statistiek.
Clade	Een groep organismen, die alle individuen omvat die afstammen van een bepaalde gemeenschappelijke evolutionaire voorouder, plus die voorouder zelf.
'long branch attraction'	Het verschijnsel dat taxa met een zeer variabele/afwijkende DNA sequentie (en die dus een lange tak in de boom hebben) de neiging hebben om samen te clusteren in een boom op basis van toevallige overeenkomsten in het DNA zonder dat ze daadwerkelijk verwant aan elkaar zijn.
Monofyletisch	Een groep taxa (bijvoorbeeld een familie) is monofyletisch als van de laatste gemeenschappelijke voorouder geen andere taxa (bijvoorbeeld een soort behorend tot een andere familie) afstammen.
Parafyletisch	Een groep taxa (bijvoorbeeld een familie) is parafyletisch als van de laatste gemeenschappelijke voorouder wel andere taxa (bijvoorbeeld een soort behorend tot een andere familie) afstammen.
'outgroup'	Een groep taxa die gebruikt worden om de positie van de laatste gemeenschappelijke voorouder te bepalen in een fylogenetische analyse. Deze taxa behoren niet tot de doelgroep maar zijn er bij voorkeur nauw aan verwant.
'posterior probability'	In een Bayesian-fylogenetische analyse is dit de waarschijnlijkheid dat een clade correct is gegeven de voorafgaande aannames.
'relative rate test'	Een test ontworpen om te testen of taxa of claden verschillende evolutionaire snelheden hebben ten opzichte van een <i>outgroup</i> .

