

**Fylogeografi og symbiose hos
Verminephrobacter
og *Lumbricus terrestris***

Bakke, B.B.



Høgskolen i **Hedmark**

Masteroppgave

HØGSKOLEN I HEDMARK

2009

Innhold

FORORD	4
SAMMENDRAG	5
ABSTRACT	6
1. INNLEDNING.....	7
1.1 SYMBIOSER.....	7
1.2 OVERFØRING AV SYMBIONT.....	9
1.3 COEVOLUSJON.....	9
1.4 FYLOGEOGRAFI.....	11
1.4.1 Meitemarkens fylogeografi.....	12
1.4.2 Meitemarkens nefridier og <i>Verminephrobacter</i>	14
1.5 GENETISKE MARKØRER.....	15
2. MÅLSETNINGER.....	16
3. MATERIALER OG METODER.....	18
3.1 MEITEMARKPOPULASJONENE.....	18
3.1.1 DNA-isolering.....	18
3.2 EKSPERIMENTELLE OPPSETT.....	19
3.3 PRIMERDESIGN OG PCR-OPTIMALISERING.....	20
3.4 SEKVENSERING.....	22
3.5 FYLOGENETISKE ANALYSER.....	23
3.6 STATISTISKE ANALYSER.....	24

4. RESULTATER.....	25
4.1 PÅVISNING AV BAKTERIER, qPCR.....	25
<i>4.1.1 Bakteriemengde hos død vs. levende meitemark.....</i>	<i>28</i>
4.2 AMPLIFISERING OG SEKVENSERING.....	29
<i>4.2.1 Optimalisering av PCR-reaksjonene</i>	<i>30</i>
4.3 BAKTERIEMENGDE VS. FYLOTYPE.....	31
4.4 FYLOGEOGRAFI.....	33
4.5 NUKLEOTIDEPOLYMORFISME.....	35
4.6 BAKTERIEMENGDE FORELDRE VS. AVKOM.....	37
4.7 BEHANDLING MED ANTIBIOTIKA.....	37
4.8 STABILITETSFORSØK.....	38
5. DISKUSJON.....	39
5.1 FYLOGEOGRAFISK SPREDNINGSMØNSTER.....	39
5.2 BAKTERIENS TILSTEDEVÆRELSE.....	42
5.3 VARIASJON I BAKTERIEMENGDE OVER TID.....	44
5.4 TEKNISKE VURDERINGER.....	45
6. KONKLUSJON.....	47
LITTERATURLISTE	48

VEDLEGG:

DNA-ISOLERING

PRØVENE I STABILITETSTESTEN

ALLE PRØVENE I FORSØKET

ALIGNMENT ADK

ALIGNMENT ND4

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Høgskolen i Hedmark, avdeling for lærerutdanning og naturfag (LUNA), i perioden januar 2008 til juni 2009.

Jeg vil rette en stor takk til mine veiledere Prof. Dr. Knut Rudi og Ph. D. Robert Wilson for tålmodig veiledning både på laboratoriet, i faglige diskusjoner og ved nitidig og kritisk gjennomlesing av oppgaveteksten. Jeg har hatt stort faglig utbytte av perioden jeg har fått være deres student.

Jeg vil også takke de ansatte som er tilknyttet bioteknologistudiet, stipendiater og medstudenter både på bachelor- og masterstudiet. Dere har vist interesse og entusiasme for arbeidet mitt, oppmuntret meg gjennom tunge perioder da resultatene lot vente på seg og delt min glede når forsøkene har gitt resultater. Jeg hadde ikke gjennomført dette uten dere.

Min samboer, Aage, og mine venner har også hatt stor forståelse for mine prioriteringer og har lagt for dagen en overraskende interesse for meitemark. Jeg takker dere alle.

Hamar, 12. juni 2009

Beate Banken Bakke

Norsk sammendrag

Fylogeografiske sammenhenger hos symbiont og vertsorganisme kan fortelle noe om distribusjonsmønstre hos de aktuelle organismene. Stabilitet, tilstedeværelse og fravær av symbionten kan fortelle noe om symbiosens karakter. I dette prosjektet har vi undersøkt den symbionte bakterien *Verminephrobacter* i individer fra fire populasjoner av meitemarkarten *Lumbricus terrestris*. Vi har undersøkt om mengde bakterier er stabil over tid, og vi har gransket sammenhengen mellom fylogeni og geografi både hos meitemarken og bakterien. Resultatene viser at bakterie og meitemark har forskjellig fylogeografisk spredningsmønster. Meitemark fra samme område er nærmere i slekt med hverandre enn med meitemark fra andre geografiske områder. Dette er sammenfallende med oppfatningen om at de fleste høyerestående arter viser en fylogeografisk sammenheng. Tilsvarende sammenheng finner vi ikke for bakteriens vedkommende. Dette bekrefter hypotesen om global distribusjon av bakterier. Funnene viser dessuten at bakterien ikke finnes hos alle meitemarker og at mengde bakterier ikke er stabil over tid. I tillegg er det observert høyere bakteriemengde hos døde mark enn hos levende. Observasjonene viser at symbiosen ikke er obligat for meitemarkens vedkommende. Funnene støtter ikke teorien om at symbiosen mellom *L. terrestris* og *Verminephrobacter* er mutualistisk, altså fordelaktig for begge parter.

Abstract

Phylogeographic patterns of symbiont and host organism can tell us something about the distribution of the organisms. Stability, presence and absence of the symbiont can tell us something about the character of the symbiosis. In this project, we have examined the symbiont bacteria *Verminephrobacter* in individuals from four populations of the earthworm species *Lumbricus terrestris*. We have investigated whether the amount of bacteria is stable over time, and we have investigated the relationship between phylogeny and geography for both the earthworm and the bacteria. The results show that bacteria and earthworms have different phylogeographic distribution patterns. Earthworms from the same area are more closely related to each other than to earthworms from other geographical areas. This is congruent with the view that the majority of higher species shows a phylogeographic pattern. On the other hand, we find no such correlation for the bacteria. This supports the hypothesis of global distribution of bacteria. The findings also show that not all earthworm individuals harbour the bacteria, and that the amount of bacteria is not stable over time. In addition, we observed higher content of bacteria in dead worms than in living individuals. The observations show that the symbiosis is not obligate for the earthworms. The findings do not support the theory that the symbiosis between *L. terrestris* and *Verminephrobacter* is mutualistic, thus beneficial for both parties.

1. Innledning

I 1926 påviste den tyske vitenskapsmannen J. Knop stavformede bakterier i nefridiene hos meitemarken *Lumbricus terrestris*. Over 80 år seinere ble bakterier i nefridiene hos meitemarkarten *Eisenia fetida* beskrevet av Pinel et al. (2008) og bestemt til å være en egen art, *Verminephrobacter eiseniae*, nært beslektet med *Acidovorax*. Man antar at bakterien lever i mutualistisk symbiose med meitemarken, og forsøk utført av Schramm et al. (2003) tyder på at bakterien overføres vertikalt fra det voksne individet til kokongen der eggene utvikler seg til unge meitemarkindivider. Schramm fant også at det er større sekvenslikhet mellom bakterier fra individer av samme meitemarkart enn mellom forskjellige meitemarkarter, uavhengig av geografi.

1.1 Symbioser

Mange biologer anser at uttrykket "symbiose" kun beskriver en gjensidig (mutualistisk) fordelaktig relasjon mellom individer av to forskjellige arter, og at andre nære interaksjoner der den ene parten enten forblir upåvirket eller endog lider under samlivet, dermed ikke kan kalles symbiose. Andre mener at symbiose bare innebærer nære interaksjoner mellom individer av forskjellig art (sym = sam, bios = liv, gr.) uten en nærmere beskrivelse av samlivets karakter (Douglas, 1994). I denne oppgaven definerer vi symbiose som "nære interaksjoner mellom to forskjellige organismer der minst en av dem er obligat avhengig av forholdet, i det minste i en periode av livet" (Leung, 2008). Noen mener at et krav for å kalle et forhold "symbiose" er at det varer over en lengre periode, uten at "lengre periode" er definert utover at det vil være avhengig av generasjonstiden til organismene (Douglas, 1994).

Overalt i naturen ser vi eksempler på symbiotiske forhold både mellom planter, mellom dyr, mellom mikroorganismer og på tvers av taxa, som for eksempel mellom dyr og bakterier som lever i eller på dyrene (Ruby, 2008). De første beskrivelsene av symbionte bakterier kom i mikroskopets barndom, i 1683, da Antonie van Leeuwenhoek rapporterte til The Royal Society om bakteriene assosiert med hans egne tenner. I de neste to-tre-hundre år ble oppmerksomheten i stor grad rettet mot mikroorganismer som lot seg studere i laboratoriet, med et spesielt fokus på sykdomsfremkallende bakterier (McFall-Ngai, 2008).

Symbioser kan deles i tre hovedtyper: 1) Parasittisme er samliv der én av partene har fordel, mens den andre har ulempe av forholdet. 2) Mutualisme er en tilstand der begge parter har fordel av samlivet. 3) Kommensalisme er samspill der én av partene har fordel av samlivet mens den andre forblir upåvirket (Tortora et al., 2007). Denne tilsynelatende enkle inndelingen kompliseres av at fordel og ulempe i økologien måles i økt eller redusert fitness. Mange symbionter kan ha lite iøynefallende effekter på verten som enestående individ, men likevel virke sterkt på vertens fitness. I slike tilfeller kan en tilsynelatende kommensalistisk eller mutualistisk symbiose i virkeligheten være parasittisk, eller et forhold som tradisjonelt sett antas å være parasittisk eller kommensalistisk kan i virkeligheten være mutualistisk. Sammenhengene kompliseres ytterligere fordi symbiotiske interaksjoner kan være mutualistiske under visse betingelser, mens de kan skifte til å bli parasittiske dersom betingelsene endrer seg (Leung, 2008).

Mens kunnskapen om parasittiske mikroorganismer er forholdsvis stor, er det inntil nylig lagt mindre vekt på å studere betydningen av mutualistiske og kommensalistiske symbioser mellom bakterier og dyr (Rawls, 2004). De siste årene har likevel mer oppmerksomhet blitt rettet mot ulike interaksjoner mellom vert og symbionte mikroorganismer. Gjennom studier av forskjellige modellorganismer har man avslørt symbiotiske assosiasjoner der bakterier har stor betydning for vertens livsfunksjon og helse, og man har funnet at vertens respons på bakteriekolonisering er konservert i vertens gener. Ikke minst har undersøkelser vist at sammensetningen av bakterier i tarmsystemet hos mennesker kan ha en sammenheng med overvekt, immunsykdommer og andre lidelser (Flint et al., 2007. Ruby, 2008. Turnbaugh et al., 2006). Mens virveldyr ofte inneholder komplekse bakteriekonsortier, er vert-symbiont-interaksjoner hos virvelløse dyr gjerne en binær assosiasjon der én bakterie lever sammen med én vertsorganisme. Symbioser hos virvelløse dyr er derfor enklere å studere og sammenligne innbyrdes, mens erfaringer fra disse undersøkelsene igjen kan kaste lys over interaksjoner mellom vert og bakteriesamfunn hos virveldyr (McFall-Ngai, 2008). Studier av forskjellige modellorganismer har gitt oss verdifull informasjon om samspillet mellom vert og symbiont, det være seg bakterier i tarmen hos *Danio rerio* (zebrafisk), forholdet mellom flere *Bacillus*-arter og *Isoptera* (termitter), *Lumbricidae* (meitemark) og *Collembola* (spretthaler), forskjellige *Annelida* (leddormer) og deres symbionter, herunder også studier av symbiose mellom diverse meitemarkarter og bakterier i både tarm og nefridier (Rawls et al. 2004; Ruby, 2008; König, 2006; Bright & Giere, 2005).

1.2 Overføring av symbiont

Det finnes to hovedmodeller for hvordan symbionte mikroorganismer overføres mellom individer: horisontal og vertikal overføring. Ved vertikal overføring overføres symbionten(e) direkte fra foreldre til avkom. Hos flere arter, f. eks. *Glossina* (tsetse-fluer), *Aphidoidea* (bladlus) og *Megacocta* (stinkbug), ser dette ut til å skje inni eggene, mens overføringen også kan skje i kokongen der eggene utvikler seg til unge individer som hos meitemark og andre leddormer (Darby, 2003; Ruby, 2008).

Ved horisontal overføring erverver vertsindivider symbionten(e) fra omgivelsene heller enn direkte fra foreldrene. Mikroorganismer kan overføres via mat eller luft, med en vektor som mygg eller fluer eller med vannmasser som tilfelle er for blant andre luminiscens-bakterier hos flere fisker og bløtdyr. Hos flere av de større pattedyrene, f. eks. mennesket, skjer overføring av tarmbakterier fra mor til barn gjennom nær kontakt under og etter barnets fødsel. Undersøkelser viser at barn forløst med keisersnitt har et annerledes koloniseringsmønster av bakterier i tarmen enn barn som er født vaginalt (Ley, Peterson & Gordon, 2006).

Ewald (1987) oppsummerer sine undersøkelser av overføringsmåter og evolusjon av parasittisme og mutualisme med at "overføringsmåten er nøkkelen for å forstå om utviklingen hos en symbiont går i retning av alvorlig patogen (parasittisk), gunstig eller mutualistisk symbiose". En anerkjent hypotese går ut fra at symbionter som overføres vertikalt blir selektert for mild parasittisme eller mutualisme, mens horisontal overføring selekterer for mindre fordelaktige eller direkte skadelige symbionter (Ewald, 1987; Smith, 2007).

1.3 Coevolusjon

Coevolusjon kan enkelt defineres som parallell evolusjon av to arter der endrede egenskaper hos én art resulterer i endringer hos den andre arten, og forandringen er arvelig. I en interaksjon mellom vert og patogene bakterier vil vertsorganismen med høyere resistens få et lengre liv og flere avkom enn vertsorganismen som er mer mottakelige for infeksjon. Dersom dette har sin årsak i genetisk variasjon i vertspopulasjonen, vil den gjennomsnittlige fitnessen for vertspopulasjonen øke som et resultat av seleksjonspress generert av symbionten. Tilsvarende vil de bakteriene som best motstår vertens forsvarsmekanismer ha

størst mulighet til å infisere en ny vert og formere seg. Dersom egenskapen er arvelig, vil den gjennomsnittlige fitnessen hos parasitten øke, induisert av økt resistens i vertspopulasjonen. Dette resulterer i et våpenkappløp der både den gjennomsnittlige resistensen hos vertsorganismen og symbiontens gjennomsnittlige evne til å infisere vil øke over tid, noe som kan ende med at enten vert eller parasitt blir utryddet. I mutualistiske interaksjoner ser vi ikke denne tendensen til at en av artene blir utryddet, fordi det vil være positiv feedback mellom økt fitness og økning i antall både hos vert og symbiont (Wade, 2007).

Tidligere mente man at en vellykket og godt tilpasset parasitt ikke ville drepe sin vert, men utvikle seg i retning av kommensalisme. Dermed vil et nylig inngått forhold mellom en vert og en symbiont være mer skadelig for verten enn en etablert interaksjon som har vært gjenstand for coevolusjon over lengre tid. Resonnementet synes fornuftig, men for mange parasitter er vertens død en integrert del av parasittens livsløp. Dette taler imot en slik sammenheng, selv om man også har funnet flere eksempler som bekrefter at i en etablert symbiose er interaksjonen mindre virulent enn i et mer nylig etablert forhold (May og Anderson, 1983 og 1990).

Virulens beskriver ikke en kvalitet hos parasitten, heller en egenskap ved interaksjonen mellom vert og parasitt. Evolusjonen av virulens vil derfor være et resultat av en coevolusjonær prosess som involverer begge parter. Det kan se ut som om mikroorganismer har en fordel framfor flercellede vertsorganismer i en slik coevolusjonær prosess, idet de har kortere generasjonstid og derfor raskere kan utvikle egenskaper som er viktige for at bakteriesamfunnet skal overleve. På den annen side har vertsorganismer med seksuell reproduksjon en fordel fordi genetisk rekombinasjon vil ivareta heterozygositet og fører til større variasjon i immunresponsen hos verten (Dieckmann et al., 2005).

Gjennom årenes løp er det satt opp flere regler i et forsøk på å beskrive forholdet mellom vert og parasitt i en symbiotisk interaksjon. Fahrenholtz-regelen sier at fylogenen hos parasitten gjenspeiler fylogenen hos verten. Dette vil være tilfelle i en coevolusjonær prosess. Andre regler har varierende gyldighet, og det viser seg vanskelig å finne generelle og allmenngyldige beskrivelser av relasjonene mellom vert og symbiont i symbiotiske interaksjoner. (Mitter & Brooks, 1983).

1.4 Fylogeografi

Fylogeni har som mål å avdekke evolusjonære sammenhenger mellom beslektede sekvenser eller arter, mens fylogeografi beskriver de geografiske sammenhengene fylogenen avdekker (Mount, 2004). Fylogenetiske sammenhenger illustreres som oftest ved hjelp av fylogenetiske trær eller kladogram, som er en oversikt over slektskapet mellom individer og den mest sannsynlige evolusjonære utviklingen innen gruppa man studerer. I mange tilfeller baserer man slike antakelser på utviklingen hos ett gen, og framstillingen kalles da gjerne et gentre (Rannala & Michalakis, 2003). Uttrykket "fylogeografi" ble brukt for første gang for drøyt 20 år siden av Avise et al. for å beskrive et påfallende geografisk mønster som viste seg da de analyserte mitokondrielt DNA hos havlevende arter. Da de konstruerte fylogenetiske trær, viste det seg at den geografiske fordelingen av genotyper hos beslektede organismer hadde en klar sammenheng med slektskap (Avise, 2000).

Praktisk talt alle høyerestående arter viser en fylogeografisk struktur (Avise, 2009) og distribusjonen vil være bestemt av både kontinentaldrift, istider og geografiske økologiske faktorer i nyere tid (Cracraft, 1974). Når vi studerer den geografiske distribusjonen av høyerestående dyr, ser vi at individer som lever i geografisk nærhet av hverandre er nærmere beslektet enn individer som lever langt unna hverandre. Dersom det oppstår et fysisk skille som deler en populasjon, vil mutasjoner, naturlig seleksjon og gendrift skje uavhengig av hverandre i de to populasjonene og føre til at de to populasjonene utvikler seg forskjellig, og i løpet av evolusjonær tid vil populasjonene utvikle seg til egne, selvstendige arter (allopatrisk artsdannelse). I andre tilfeller vil arten bestå som én art, men fordi populasjonene lever i ulike miljø, vil individer bli selektert for forskjellige egenskaper i de to populasjonene, og det vil i økologisk tid oppstå en geografisk variasjon mellom dem. Variasjonen består i overvekt av ulike allelkombinasjoner i de forskjellige populasjonene, og man måler ulikheten ved hjelp av allelfrekvensene, mens sammenhengen mellom de forskjellige individene kan uttrykkes i et fylogenetisk tre (Halliburton, 2004).

Diskusjonen omkring den globale diversiteten hos mikroorganismer er dominert av to motstridende syn. På den ene siden kan man ta utgangspunkt i at frittlevende mikrober oppfører seg på samme måte som større organismer, ved at de har relativt lav migrasjonrate og relativt høy forekomst av allopatrisk artsdannelse og lokal utryddelse. Dette vil resultere i at noen mikrobearter vil være begrenset til bestemte områder og at det globale antall arter vil være enormt (Finlay et al., 1999). På den annen side kan man med grunnlag i mikroorganismenes minimale størrelse og høye spredningsrate argumentere for at de har

global distribusjon, er allestedsnærværende og dermed ikke viser noe biogeografisk mønster, den såkalte global distribusjons-hypotesen. Konsekvensen av denne hypotesen vil være at man ser en blanding av alle arter på alle kontinent, uten de regionale forskjellene man finner hos høyere taxa (Gray et al., 2007). Fierer (2005) konkluderer med at mikrobiell biogeografi i jord i hovedsak bestemmes av variabler knyttet til egenskaper hos jorda, så som pH, energitilgang, vann og vann-energi-balanse, med pH som den viktigste faktoren. Hos endobiotiske symbionter bestemmes den mikrobielle diversiteten i hovedsak av coevolusjon mellom vert og symbiont, og sammensetningen av bakteriefloraen påvirkes av dietten (Ley et al., 2006a og b, Rudi et al, 2008 i manuskript). Fahrenholtz-regelen sier at at fylogenen hos parasitten gjenspeiler fylogenen hos verten, så i slike tilfeller bør en kunne observere at det fylogenetiske treet for symbiont og vert vil være sammenfallende.

1.4.1 Meitemarkens fylogeografi

Meitemark er en meget gammel gruppe, fylogenetisk sett, og er funnet i sedimenter fra prekambrium og ordovicium, mer enn 300 millioner år før det store urkontinentet Pangea begynte å brytes opp i stykker (Makeschin, 1997). Store deler av dagens globale fordeling av meitemark kan forstås som et resultat av fragmentering av én sammenhengende bestand som fantes før verdensdelene begynte å drive fra hverandre. De mange istidene på deler av kloden regnes også å ha hatt en sterk påvirkning på meitemarkens utbredelse, idet man anser det som lite sannsynlig at meitemark kan overleve under isbreer og i områder med permafrost. Dermed kan meitemarker ha blitt utryddet i områder hvor det fantes levedyktige bestander før siste istid (James, 2004. Stürzenbaum, 2008. Tiunov, 2006).

Meitemark har en relativt lav aktiv spredningshastighet, omlag 2-10 m/år, og man regner med at saltvann er en barriere de ikke kan overleve å krysse, dersom de ikke tilfeldigvis følger med trær eller annen vegetasjon f.eks. i forbindelse med sykkloner eller lignende. Både voksne meitemark og ikke minst kokonger kan spres ved passiv transport. Dette kan skje ved at de følger med vannmasser i små bekker og elver, med jordmasser, med vind eller ved at de følger med større dyr i deres forflytning, herunder også mennesker. Flere undersøkelser tyder på at passiv transport grunnet menneskelig aktivitet er hovedårsaken til introduksjon av ukjente meitemarkarter til nye områder (Schwert, 1990. Cameron, 2007. James, 2004).

På verdensbasis regner man i dag med at det finnes over 3000 forskjellige meitemarkarter. De deles inn i tre økologiske kategorier: epigeiske (overflatelevende), endogeiske (jordlevende) og anecic (dyptgravende). Lumbricidae regnes som den viktigste

meitemarkfamilien med omlag 80 arter på den nordre halvkule. Lumbricider antas å ha det største spredningspotensialet, og representanter for familien finnes over nesten hele kloden (Makeschin, 1997). Reynolds (2004) og Addison (2008) rapporterer om minst 19 forskjellige lumbricidarter i Canada, Pommeresche (2007) nevner samme antall arter i Norge, mens britisk meitemarkfauna består av tilsammen 68 arter og underarter ifølge Blakemore (2006) og den franske faunaen av 180 arter ifølge King (2008).

Meitemark er blant de viktigste jordlevende organismer fordi de spiller en viktig rolle i dekomponering av dødt organisk materiale. Canadiske undersøkelser de siste årene viser imidlertid at innførte arter kan fortrenge stedegne arter og alternere den lokale økologiske balansen og endog bidra til å utrydde enkelte plantearter i visse områder. Dette kan skje fordi dyptgravende meitemark forflytter organisk materiale fra overflata og endrer den kjemiske balansen i det øverste jordlaget der plantene skal etablere seg. Man ser også pH-endringer i jorda der nye meitemarkarter er introdusert, og det er lumbricidarter som har sterkest negativ påvirkning (Addison, 2008. Dupont, 2008. Holdsworth, 2007).

Etterhvert som forståelsen for meitemarkens betydning både som jordbearbeider og som modellorganisme har økt, er det utviklet flere molekylærgenetiske ressurser for å kartlegge evolusjon, fylogeni, symbioser, biokjemiske prosesser, undersøkelser av meitemarkens betydning som biomarkør og studier av markens immunforsvar (Stürtzenbaum, 2008. Dupont, 2008) I 1995 kartla Boore & Brown hele sekvensen for mitokondrielt DNA hos *Lumbricus terrestris* (Boore & Brown, 1995). Resultater fra disse studiene er seinere brukt av flere, blant annet av Field et al. (2007) i undersøkelser av genetisk diversitet hos en *Lumbricus terrestris*-populasjon i Tyskland. Polymerase chain reaction (PCR) og sekvensering av cytochrome oxidase I (COI) er blitt brukt for å studere invasjonsmønsteret hos *Dendrobaena octaedra* i Canada (Cameron, 2008). 16S ribosomalt (r)RNA og NADH dehydrogenase 1 er sammen med COI anvendt i fylogeografiske studier av *Metaphire formosae* i Taiwan og i undersøkelser av diversitet hos flere meitemarkarter i Storbritannia (Chang, 2008. King, 2008). RAPD-PCR er brukt til fingerprinting for å granske genetisk diversitet hos *Aporrectodea caliginosa* i Tyskland, og for å studere *L. terrestris'* potensial som bioindikator (Lentzsch, 2006. Kautenburger, 2006). I tillegg er det gjort flere studier av bakterien i nefridiene hos meitemark (Davidson & Stahl, 2005 og 2008. Schramm et al., 2003. Pinel et al., 2008).

1.4.2 Meitemarkens nefridier og *Verminephrobacter*

Praktisk talt alle flercellede dyr har en slags rørformede ekskresjonsorganer som man antar ble utviklet for å skille ut løselige avfallstoffer. Det finnes tre hovedtyper rørformede ekskresjonsorganer: nefridier, coelomodukter og Malpeghiske rør. Av nefridier finnes det igjen to hovedtyper: de mest primitive protonefridiene, og metanefridier som vi finner bl. a. hos alle voksne eksemplarer av *Oligochaete* (fåbørstemark). Hos *Lumbricus* (Rekke: Annelida, Underklasse: Oligochaeta, Fam.: Lumbricidae) består nefridiene av et rør som er foldet slik at det danner tre hovedsløyfer. Røret har kontakt med coelum via en nefridiostom der væsken trekkes ut av coelum, passerer gjennom kanalen ved hjelp av cilier og skilles ut gjennom nefridioporen (Withers, 1992). I sløyfe nummer to er nefridiekanalen utvidet til en ampulle. Her finner man en symbiont bakterie som nylig ble artsbestemt til *Verminephrobacter* (Schramm et al., 2003. Pinel et al., 2008). Nefridiene og bakterier assosiert med disse organene hos *Lumbricus terrestris* ble grundig beskrevet av Knop allerede i 1926, og i sin artikkel henviser han til enda tidligere undersøkelser gjort av Cerfontaine (1890) og Cuénot (1898). Knop beskriver bakterien som: "stäbchenförmich, etwa 3-5 μ lang und 0,5-0,7 μ dick" (Knop, 1926).

Sekvensering og påfølgende fylogenetiske analyser av 16S rRNA fra bakterier i nefridiene hos fire arter av meitemark viser at bakterien er nærmest beslektet med *Acidovorax delafieldii*, *A. defluvii* og *A. facilis*. Andre bakterier i denne slekten er det opportunistiske plantepatogenet *A. aveana* subsp. *citrulli* som forårsaker sjukdom hos melon og agurk. Sekvenslikheten er større mellom individer innen samme meitemarkart enn mellom forskjellige meitemarkarter, uavhengig av hvilket geografiske område marken kom fra (Schramm et al. 2003). Disse funnene sammenfaller med hypotesen om universal distribusjon av bakterier.

I 2008 beskrev Pinel den symbionte bakterien i nefridiene hos *Eisenia fetida* som en gram negativ, heterotrofisk, katalasenegativ stavbakterie med flageller. 16S rRNA gensekvenser indikerer at den er i slekt med betaproteobakterien *Acidovorax*. Pinel foreslår at bakterien hører til en egen slekt og at denne nye slekten kalles *Verminephrobacter* og at arten isolert fra *Eisenia fetida* kalles *Verminephrobacter eiseniae* (Pinel, Davidson & Stahl, 2008).

Symbiosens karakter er ikke kjent, men Schramm antyder at bakteriene kan ha en betydning for degradering av proteiner i ekskresjonsvæsken (urin) for resirkulering av nitrogen (Schramm et al. 2003), og symbiosen vil isåfall være mutualistisk. For å få bedre innblikk i om symbiosen er mutualistisk eller kommensalistisk bør det gjøres undersøkelser der man

sammenligner meitemark kurert for bakterien med mark som har beholdt sin naturlige bakterieflora. Dette bør være mulig i og med at Davidson og Stahl kunne kurere meitemark ved å antibiotikabehandle kokongene hos *E. fetida* (Davidson & Stahl, 2005).

1.5 Genetiske markører

Genetiske markører er en type biomarkører som brukes i stadig større omfang både innen diagnostikk, avlsarbeid, natur- og miljøforvaltning og mer generelt innen forskning. De mest anvendte genetiske markørene er SNP (single nucleotide polymorphism), RFLP (restriction fragment length polymorphism) og STR (short tandem repeats). Hvilken del av genomet man velger å bruke, vil i sterk grad avhenge av hvilken type analyse man ønsker å gjøre og av foreliggende kunnskap om organismens genom. I mange tilfeller vil det være hensiktsmessig å anvende mitokondrielt DNA (mtDNA) som det vil være svært mye av i hver enkelt celle, eller et husholdningsgen. Husholdningsgener er en rekke gener som er essensielle for de normale celleduksjonene og derfor uttrykkes konstitutivt.

adk-genet hos *Verminiphrobacter* koder for adenylyl kinase (ADK) som katalyserer den reversible overføringen av fosfat fra adenosin trifosfat (ATP) til adenosin monofosfat (AMP), slik at det dannes adenosin difosfat (ADP). Enzymet er nødvendig for biosyntetiseringen av ADP og er essensiell for å opprettholde likevekten av adenosinofosfat (NCBI, 2009). Genet regnes blant bakterienes husholdningsgener.

ND4-genet hos meitemark er plassert på mtDNA, et sirkulært DNA-molekyl på snaut 15 kb. *ND4*-genet er 1855 nukleotider langt og koder for NADH dehydrogenase subunit 4. NADH dehydrogenase er et kompleks som består av flere polypeptidkjeder. Komplekset inneholder en rekke jern/svovel-sentre som spiller en viktig rolle i oksidering av NADH til NAD^+ i det første trinnet i respirasjonsskjeden (Mathews, Holde & Ahern, 1999). Det mitokondrielle genomet hos *Lumbricus terrestris* ble kartlagt i 1995, og inneholder blant annet koder for seks subunits av NADH dehydrogenase (Boore & Brown, 1995).

2. Målsetninger

Målsetningen for prosjektet var å studere fylogeografiske spredningsmønstre hos *Lumbricus terrestris* og den symbionte bakterien *Verminophrobacter*, samt å undersøke strategier for overføring av bakterien og hvorvidt mengde bakterier er stabil over tid. Resultatene kan fortelle noe om symbiosens karakter.

Tidligere studier er i hovedsak gjennomført på andre meitemarkarter, og man har konsentrert seg om å identifisere bakterien, plassere den taxonomisk (Schramm et al., 2003. Pinel, Davidson & Stahl, 2008) og å undersøke overføring av bakterier fra voksne individer til avkom (Davidson & Stahl, 2005) samt å kurere kokongene for bakterien ved hjelp av antibiotika (Schramm et al., 2003).

I lys av de rådende teorier om global diversitet, ønsket vi å lete etter fylogeografiske sammenhenger både hos meitemark og bakterie. For bakterienes vedkommende er hypotesen om global distribusjon rådende, altså ingen sammenheng mellom fylogeni og geografi, mens det hevdes at de fleste høgerestående dyr viser en sammenheng mellom fylogeni og geografisk distribusjon. Disse hypotesene vil vi teste. Canadisk *L. terrestris* regnes å ha sin opprinnelse i Europa, og de europeiske meitemarkene antas å ha vandret nordover etter hvert som isen forsvant etter siste istid, eller de har blitt spredd til nye områder ved passiv transport med dyr eller mennesker.

Tidligere studier forteller ikke hvorvidt bakterien finnes hos alle individer i en populasjon og sier heller ingenting om mengde bakterier i hvert enkelt individ er stabil over tid, derfor ville vi undersøke om *Verminophrobacter* kunne påvises i nefridiene hos alle individer av *Lumbricus terrestris* som var med i forsøkene. Både tilstedeværelse og stabilitet av bakterien kan gi opplysninger om hvorvidt relasjonen mellom *Verminophrobacter* og *L. terrestris* er en mutualistisk symbiose.

For å bekrefte eller avkrefte at bakterieoverføring fra foreldre til avkom funnet hos *Eisenia fetida* også gjelder for *Lumbricus terrestris*, ville vi undersøke foreldre og avkom for bakterien *Verminophrobacter*. I tidligere studier har man kurert kokonger for bakterien (Schramm et al. 2003) ved hjelp av antibiotika. Vi ville antibiotikabehandle voksne meitemark i et forsøk på å kurere dem for bakterien.

I analysene brukte vi PCR på *adk*-genet hos bakterien og på *ND4*-genet hos fire populasjoner av meitemark og fant fylotyper i henhold til single nucleotide polymorphism (SNP) i genene. For å undersøke om bakterien var til stede og finne en forholdsvis mengdeangivelse for bakterien, brukte vi kvantitativ PCR (qPCR) på *adk*-genet hos bakterien og på *18S*-genet hos meitemarken. Det ble utført Students T-test og korrelasjonsanalyser i OpenOffice Calc, Linux Mint og ANOVA på resultatene.

3. Materialer og metoder

DNA ble isolert fra meitemarker fra fire populasjoner av *Lumbricus terrestris*. qPCR ble brukt for å påvise og kvantifisere bakterien *Verminephrobacter* og PCR med påfølgende sekvensering ble brukt for å identifisere fylotyper.

3.1 Meitemarkpopulasjonene

Meitemark av arten *Lumbricus terrestris* fra Canada, Storbritannia, Tyskland og Norge ble brukt i forsøkene. De canadiske ble bestilt fra National Bait Inc. (Mississauga, Ontario, Canada). Den første britiske populasjonen ble samlet inn i Preston, Storbritannia av Ph.D.-studenten til Prof. K.R. Butt ved University of Central Lancashire, mens de andre tre britiske populasjonene ble bestilt fra The Recycle Works Ltd. (Ribchester, Storbritannia). De tyske kom fra en naturlig populasjon i Saarbrücken og ble samlet inn av Prof. Dr. R. Klein ved Universitetet i Trier mens de norske ble samlet inn i forfatterens hage i Grue kommune, Hedmark, av forfatteren selv.

20 individer fra hver populasjon, unntatt den tyske, ble plassert i hver sin 3 L boks med ca. 2,5 L jord fra Magic Products, Inc. Amherst Junction, USA og føret én gang pr. uke med Magic Worm Food (Magic Products). De tyske markene døde umiddelbart etter ankomst, slik at det kun var mulig å sikre ett prøveuttak fra denne populasjonen, og de fleste av markene var i ferd med å dekomponere da prøvene ble tatt.

3.1.1 DNA-isolering

Vevsprøven fra meitemarken ble øyeblikkelig tørket i 96 % etanol før den ble lysert under følgende betingelser: $(x \text{ mg vev}) + (x \cdot 10 \text{ } \mu\text{L lyseringsbuffer}) + (x \cdot 0,08 \text{ } \mu\text{L proteinase K [25 mg/mL]})$ på ristebrett ved 56 °C i min. to timer eller til alt vev var løst. Lysatet ble fortynnet i lyseringsbuffer i forholdet 1:1 før DNA ble isolert på GenoM-96 robot (GenoVision AS, Oslo, Norge) med MagnatrixOS 8000 plus (Magnetic Biosolutions, Stockholm, Sverige) som operativsystem. De første åtte prøvene ble ikke fortynnet (1B1, 1B2, 2B1, 2B2, C1, C2, C3, C4). Det ble brukt 200 μL MDL lyseringsbuffer fra MagAttract DNA, Blood M96 Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland) og 50 μL T_{10mM}E_{0,1mM} som elueringsbuffer; 200 μL vaskebuffer fra GenoPrepDNA (GenoVision AS, Oslo, Norge); 200 μL 80% EtOH og 200 μL destvann. For noen prøver ble lysisbuffer fra Qiagen erstattet med PB3/0,5 M

EDTA i forholdet 4:1 (Borodina et al. 2003). Noen prøver ble lysert og DNA isolert ved hjelp av Qiagen Blood and Tissue Kit, spin column protocol. DNA-konsentrasjon ble målt med NanoDrop ND 1000 spektrofotometer fra NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA.

3.2 Eksperimentelle oppsett

For alle individer ble det kuttet en bit (15-150 mg) av halen så snart populasjonen ankom. Vevet ble lysert og DNA isolert. Både meitemarkens *ND4*-gen og bakteriens *adk*-gen ble PCR-amplifisert og sekvensert. Til sist ble det utført qPCR på meitemarkens *18S*-gen og bakteriens *adk*-gen.

Stabilitet: For å undersøke om mengden av den symbionte bakterien, *Verminephrobacter*, er stabil over tid, ble det tatt ytterligere to prøver av 15 meitemarker, fem individer fra tre populasjoner (britisk, canadisk og norsk) i desember og februar. Hensikten var å utføre qPCR for å bestemme den forholdsvis mengden av bakterier til forskjellig tid. De tyske markene var døde og kunne ikke tas med i dette forsøket.

Vertikal overføring: Hvorvidt bakterien blir overført fra de voksne individene til avkommet ble undersøkt ved å granske avkommets bakterier og sammenligne med foreldrenes bakterieflora. Noen canadiske meitemark var befruktet før de ble isolert i egen boks, og avkommet fra disse ble undersøkt. Bare en av foreldrene var kjent.

Horisontal overføring: Fem meitemark ble behandlet med antibiotika. Kanamycin og ampicillin ble blandet i forholdet 1:1 og denne blandingen ble tilsatt i fôret, 1 mg/g fôr. Med denne blandingen ble markene matet på vanlig måte. Etter 17 dager fikk en presumtivt kurert mark leve i samme boks som en ubehandlet mark med en bakterieflora av annen fylotype enn den antibiotikabehandlede marken. Etter 48 dager i samme boks ble det tatt nye prøver av begge markene og SNPene i *adk*-genet skulle sammenlignes. Dette forsøket avdekker samtidig om meitemarken kan kureres for bakterien ved hjelp av antibiotikabehandling.

Fylogeografi og coevolusjon: Fylogeografiske mønstre hos meitemarken ble undersøkt ved å aligne *ND4*-sekvensene fra mitokondrielt DNA og konstruere fylogenetiske trær på basis av alignmentet. For bakterien ble *adk*-sekvensene alignet og fylogenetiske trær konstruert. Disse operasjonene ble utført i MEGA 4 (Tamura et al. 2009) med maximum parsimony. Trær konstruert med maximum parsimony representerer det minimale antall evolusjonære steg (mutasjoner) mellom hver sekvens.

Det ble konstruert egne fylogenetiske trær for ni individer der vi hadde vellykket sekvensering av både bakteriegenet og meitemarkgenet. Ved å sammenligne disse trærne, kunne vi trekke slutninger om coevolusjon mellom meitemark og bakterie.

Quantitative PCR (qPCR): For å konstatere hvorvidt bakterien *Verminephrobacter* var tilstede og for å bestemme den relative mengden av bakterien, ble det gjennomført qPCR på alle prøvene.

3.3 Primerdesign og PCR-optimalisering

Genetisk markør for bakterien: CLC Main Workbench (CLCbio, Danmark) ble brukt for å konstruere primere for fire husholdningsgener hos *Verminephrobacter*: *adk*, *fumC*, *icd* og *rpoB* (Tabell 1). Templat var annotert sekvens: *Verminephrobacter eiseniae* EF01-2, complete genome, accession NC_008786 (NCBI). For optimalisering av T_m ble det utført gradient-PCR med følgende protokoll for 20 μL reaksjonsvolum: 1 μL templat, 2 μL 10x buffer, 1,6 μL 25 mM MgCl_2 , 0,4 μL 10 mM dNTP, 0,4 μL 10 μM F-primer, 0,4 μL 10 μM R-primer, 14,05 μL H_2O , 0,15 μL AmpliTaq Gold. Temperatursyklus: [95 $^\circ\text{C}$ 10 min; 40 sykluser à 95 $^\circ\text{C}$ i 30 sek, gradient 50 $^\circ\text{C}$ -65 $^\circ\text{C}$ i 30 sek, 72 $^\circ\text{C}$ i 1 min 30 sek; 72 $^\circ\text{C}$ i 7 min.]. Det ble valgt å bruke den mest spesifikke markøren, *adk*, og det ble totalt konstruert tre primerpar for denne markøren. Prøver som ikke gav produkt med primerpar 1 (pp1), ble forsøkt amplifisert med primerpar 2 (pp2), primerpar 3 (pp3) og med forskjellige kombinasjoner av pp1, pp2 og pp3. I tillegg ble det utført nested-PCR, PCR med annet enzym (DynaZyme HotStart) og PCR med tre innledende sykluser med lavere anealingtemperatur. Det ble gjort et BLASTn-søk med primerne mot NCBI's database.

ND4-genet: For *ND4*-genet hos *Lumbricus terrestris* ble det brukt primere for amplifisering og sekvensering beskrevet av Field et al. (2006), se tabell 1.

Quantitative PCR (qPCR): For meitemarken ble det brukt primere og probe for 18S rRNA konstruert for dette prosjektet, og for *adk*-genet ble primere og prober konstruert på grunnlag av seks fylotyper av genet som ble funnet i dette forsøket. Probene var TaqMan-prober med 6-FAM som detektor uten quencher (Tabell 1).

Resultatene fra qPCR ble analysert med Sequence Detection software, Version 1.3.1., 7500 System SDS software fra Applied Biosystem (Foster City, CA, USA). Programvaren ble brukt for å finne stigningstallet og skjæringspunkt for fortynningsrekka. Disse verdiene dannet grunnlaget for å beregne et forholdstall mellom mengde DNA fra meitemarken og mengde DNA fra bakterien, $\log X - \log Y = \log Z$.

$$\log X = (\text{CT -skjæringspunkt})/\text{stigningstall}$$

$$\log Y = (\text{CT -skjæringspunkt})/\text{stigningstall}$$

X = mengde meitemark-DNA, Y = mengde bakterie-DNA og Z = forholdet mellom disse. Det er logZ-verdien som danner grunnlaget for sammenligningene i resultatdelen.

Tabell 1: Oversikt over primere og prober brukt ved vanlig PCR og qPCR. Alle ble konstruert som en del av dette prosjektet unntatt ND4 der det ble brukt primere beskrevet av Field et al. (2006).

Primer	Baserekkefølge	Lengde
fumC F	5'-TGA GCA GAT CCA AAG CAA-3'	18
fumC R	5'-TTC GGG GCG ATC GAG ATT-3'	18
icd F	5'-GGT TGC GGT TGT TGT CCA G-3'	19
icd R	5'-AAG GCG CGT GAT GTG AAG-3'	18
rpoB F	5'-CTT ACA TCT CGC ACA CCC T-3'	19
rpoB R	5'-CCA TCA CCA CCA GTT CCT C-3'	19
adk F1	5'-GCA TCC CGC AAA TCT CCA-3'	18
adk R1	5'-CAG TGG CTG TAG TAG TCC-3'	18
adk F2	5'-GAC TGA TTC TGT TGG GCG-3'	18
adk R2	5'-CGC TTT CTG ACG GTT TCT-3'	18
adk F3	5'-ATC CCG CAA ATC TCC AC-3'	17
adk R3	5'-CGC TTT CTG ACG GTT TC-3'	17
ND4 F	5'-TTG GGT GTC AAA AAT CAC TTC-3'	21
ND4 R	5'-TAA ATT GTC AGC CAG AAT CAA AC-3'	23
adk qPCR F	5'-GGC TTT TTG TTT GAC GGC TT-3'	20
adk qPCR R	5'-GGC GTT TCT TGA CGG TGT-3'	18
adk qPCR P	5'-CTT CCT TGT CGT CTT CGC GCT-3'	21
18S qPCR F	5'-TCC CAG TAA GCG CGA GTC AT-3'	20
18S qPCR R	5'-ACG GGC GGT GTG TAC AAA G-3'	19
18S qPCR P	5'-AGC TCG CGT TGA TTA CGT CCC TGC-3'	24

Før amplifisering ble templat isolert med robot fortynnet 1:10 med Ultra pure distilled water fra Gibco, Invitrogen (Life Technologies, USA). Kit-isolert DNA ble fortynnet til 20-40 ng/ μ L og brukt direkte. De første åtte prøvene ble ikke fortynnet (1B1, 1B2, 2B1, 2B2, C1,

C2, C3, C4). Samme 20 µL reaksjon brukt for både *ND4*-genet og *adk*-genet: 1 µL templat, 2 µL 10x buffer, 1,6 µL 25 mM MgCl₂, 0,4 µL 10 mM dNTP, 0,4 µL 10 µM F-primer, 0,4 µL 10 µM R-primer, 14,05 µL H₂O, 0,15 µL Amplitaq Gold.

Følgende temperatursykluser ble brukt:

ND4-genet: [91 °C i 5 sek; 95 °C i 10 min; 35 sykluser à 91 °C i 5 sek, 94 °C i 20 sek, 58 °C i 30 sek, 72 °C i 1:30 min; deretter 72 °C i 10 min.].

adk-genet, både enkel og nested PRC: [94 °C i 10 min; 40 sykluser à 95 °C i 30 sek, 55 °C i 30 sek, 72 °C i 1 min; deretter 72 °C i 7 min.]. Det ble også forsøkt å gjennomføre PCR med følgende temperatursyklus: [94 °C i 10 min; 3 sykluser à 95 °C i 30 sek, 50 °C i 30 sek, 37 sykluser à 95 °C i 30 sek, 55 °C i 30 sek, 72 °C i 1 min; deretter 72 °C i 7 min.]. Ved nested PCR, ble PCR-produkt fra outer primer fortynnet 1:1000 og brukt som templat for amplifisering med inner primer. PCR-produktet ble undersøkt på agarosegel (0,8 % for *ND4* og 1,5 % for *adk*) for å bekrefte amplifisering av ønsket fragment.

Quantitative PCR: qPCR ble gjennomført i 25 µL reaksjonsvolum: 2 µL templat, 0,5 µL 5x Rox, 0,5 µL 5 µM TaqMan-probe, 0,5 µL 10 µM F-primer, 0,5 µL 10 µM R-primer, 0,5 µL 10 mM dNTP, 0,5 µL AmpliTaq Gold, 2 µL 25 mM MgCl₂, 2,5 µL 10x buffer, 15,5 µL H₂O under følgende betingelser: [95 °C i 10 min; 40 sykluser à 95 °C i 30 sek, 60 °C i 1 min]. Standardkurve for videre beregninger ble laget ved å gjøre en fortynningsrekke: 1, 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷. Ut fra denne ble stigningstall og skjæringspunkt bestemt.

3.4 Sekvensering

Exonuclease I-behandling: For å fjerne ssDNA (primere) ble PCR-produktet behandlet med exonuclease I: 1 µL 5x sekvenseringsbuffer, 0,1 µL ExoI 200/µL, 3 µL H₂O, 1 µL PCR-rxn, totalt 5 µL. Inkubering ved 37 °C i 60 min, med påfølgende 85 °C i 15 min. for å deaktivere nucleasen. 5 µL ExoI-rxn ble tilsatt 2 µL 5x sekvenseringsbuffer, 0,5 µL Big Dye Terminator 3.1, 0,32 µL 10 µM primer og 2,18 µL H₂O.

Sekvensering: Sekvenseringen fant sted under følgende betingelser: [96 °C i 1 min.; 15 sykluser 96 °C i 10 sek., 50 °C i 5 sek., 60 °C i 1:15 min.; 5 sykluser 96 °C i 10 sek., 50 °C i 5 sek., 60 °C i 1:30 min.; 5 sykluser 96 °C i 10 sek., 50 °C i 5 sek., 60 °C i 2 min.].

Felling av DNA: For å felle DNA før kapillær elektroforese ble følgende løsninger anvendt for hver prøve: 1 µL 3M NaOAc, 1 µL 125 mM EDTA, 26 µL 96% EtOH, mix. Sentrifugering ved 4 °C, 3000 x G i 30 min. 35 µL 70% EtOH. Sentrifugering ved 4 °C, 1700 x G i 15 min. 10 µL deionisert formamid.

Sekvensene ble detektert med kapillær elektroforese på ABI Prism 3130xl Genetic Analyser, og dataene ble analysert i CLC Main Workbench (CLCbio, Danmark). MEGA 4 (Tamura et al. 2009) ble brukt til konstruksjon av fylogenetiske trær.

3.5 Fylogenetiske analyser

Fylogenetiske analyser av en familie av sekvenser kan fortelle noe om relasjonene mellom sekvensene, i hvilken rekkefølge de har blitt utledet gjennom evolusjonen, og hvilke sekvenser de er utledet fra. Slektskapet blir billedliggjort som et tre der sekvensene utgjør hver sin yttergrein, mens greinene innover i treet illustrerer graden av slektskap. I vår undersøkelse koblet vi fylogenetiske funn sammen med geografi, og kunne dermed lete etter fylogeografiske sammenhenger. Er sekvensene hos individer fra samme område mer i slekt enn individer fra forskjellig områder?

Maximum parsimony-metoden gir et fylogenetisk tre med et minimalt antall evolusjonære trinn mellom hver sekvens og egner seg godt når man vil analysere sekvenser med stor grad av likhet, derfor ble denne metoden brukt på alle de fylogenetiske trærne som ble konstruert i forbindelse med denne oppgaven. For å konstruere fylogenetisk tre, må man ha sekvenser som er alignet og som er like lange, derfor ble sekvensene både for *adk*-genet og *ND4*-genet kuttet på en slik måte at man kunne bruke flest mulig sekvenser. Likevel måtte noen sekvenser forkastes.

For *ND4* ble 1224 nukleotider klippet bort i starten av sekvensen og 18 sekvenser måtte forkastes, slik at konstruksjon av fylogenetisk tre baserte seg på 65 sekvenser på 280 nukleotider som inneholdt 73 SNPer. For *adk* ble 65 nukleotider fjernet i starten av sekvensen, 135 nukleotider ble klippet bort på slutten og 3 sekvenser måtte forkastes, slik at konstruksjon av fylogenetisk tre baserte seg på 19 sekvenser med lengde 282 nukleotider og som inneholdt 7 SNPer. Det ble konstruert fylogenetisk tre for både bakteriegenet og meitemarkgenet.

Det ble også konstruert to fylogenetiske trær, ett for bakterie og ett for meitemark, for ni sekvenser der sekvensering var vellykket for både *adk*-genet og *ND4*-genet, for å undersøke

om man kunne avsløre et felles mønster for evolusjonen av de to sekvensene hos de to artene.

Nukleotidepolymorfisme (n_p/n_t) ble beregnet for både bakterie og meitemark for å undersøke den genetiske variasjonen i de fire populasjonene hver for seg, beregne variasjonen for to og to populasjoner, og finne variasjonen i det totale prøvematerialet.

3.6 Statistiske analyser

De statistiske metodene som ble brukt for å fastslå om resultatene var signifikante, var enveis ANOVA (Analysis of variance) samt uparet og paret T-test og beregning av korrelasjon. T-tester og beregning av korrelasjon ble gjort i OpenOffice Calc 2.4.1 (Sun Microsystems Inc.), Linux Mint 6.0 x86_64 (www.linuxmint.com).

I tilfeller der det skulle undersøkes om $\log Z$ for to populasjoner var signifikant forskjellig, ble det brukt students T-test. OpenOffice Calc har en funksjon for utregning av T-test, og testen returnerer sannsynligheten for at populasjonene er forskjellige. Denne testen ble utført på forskjellen i mengde bakterier i en gruppe (1) bestående av prøver som gav et spesifikt PCR-produkt (dvs. ett bånd detektert ved gelelektroforese) i forhold til en gruppe (2) bestående av prøver som gav flere bånd og de som ikke gav bånd. Den samme testen ble brukt for å undersøke forskjell i $\log Z$ mellom døde og levende meitemark og mellom individer som døde i løpet av forsøksperioden og de som overlevde. Paret T-test ble utført for å undersøke om det var signifikant forskjell på første og siste måling i undersøkelsen av stabilitet i bakteriemengde.

For å teste om det er forskjell i bakteriemengde hos de forskjellige fylogruppene ble det brukt enveis ANOVA slik den er forklart i Formelsamling for forsøksmetodikk (Fjeldsø, 2004).

4. Resultater

Vi har undersøkt om det finnes sammenhenger mellom fylogeni og geografi både hos meitemarken *Lumbricus terrestris* og hos bakterien *Verminephrobacter*. Dette kan fortelle noe om slektskap mellom meitemark fra forskjellige geografiske områder. For bakteriens vedkommende kan resultatet støtte eller gå imot hypotesen om global distribusjon hos mikroorganismer.

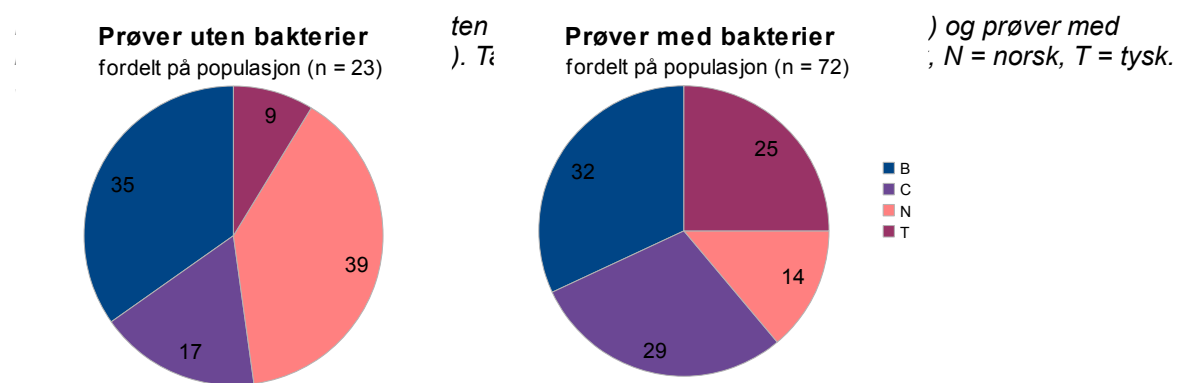
Vi har også undersøkt hvorvidt bakterien *Verminephrobacter*, som er påvist hos flere arter av meitemark, finnes hos alle individer i en populasjon og om mengde bakterier er stabil over tid. Dette kan fortelle noe om symbiosens karakter, med andre ord om symbiosen er mutualistisk eller kommensalistisk. Som en del av forsøkene for å undersøke overføringsprosessen av bakterier mellom individer, har vi behandlet voksne individer med antibiotika. Resultatene herfra kan fortelle hvorvidt voksne meitemark kan kureres for bakterien og om individer som har levd hele sitt liv i en symbiotisk interaksjon kan leve uten bakterien.

4.1 Påvisning av bakterier, qPCR

Som en del av prosjektet ble det konstruert primere for *ND4*-genet hos meitemarken og *adk*-genet hos bakterien for bruk ved vanlig (kvalitativ) PCR og sekvensering. PCR-produktet ble analysert med gel elektroforese som gav ett av tre resultater: ett spesifikt bånd, flere uspesifikke bånd eller ikke noe bånd i det hele tatt. Det ble deretter utviklet TaqMan-prober og primere for 18S rRNA hos *L. terrestris* og for *adk*-genet hos den symbionte bakterien *Verminephrobacter* til bruk ved kvantitativ PCR (qPCR) for å påvise mengde bakterie-DNA i forhold til mengde meitemark-DNA. Vi undersøkte 96 meitemarker fra 4 populasjoner, hhv, fra Canada, Storbritannia, Norge og Tyskland.

Med qPCR ble det påvist bakterier i 72 av 95 prøver, mens det i 23 prøver ikke kunne påvises bakterier. Blant de 72 prøvene der bakterien ble påvist, kom 23 fra britisk mark (31,9 %), 21 fra canadisk (29,2 %), 10 fra norsk (13,9 %) og 18 fra tysk mark (25 %), se figur 1. Sammenligner man mengde bakterier i hver enkelt populasjon, finner vi at det er signifikant forskjell på bakteriemengden hos britisk og tysk populasjon ($p_{B/T} = 0,022$) og mellom norsk og tysk populasjon ($p_{N/T} = 0,012$). Det er ikke signifikant forskjell i bakteriemengde hos de andre populasjonene ($p_{B/C} = 0,758$; $p_{B/N} = 0,374$; $p_{C/N} = 0,394$; $p_{C/T} = 0,127$). Av de 72 prøvene

med bakterier, gav 28 prøver ett spesifikt bånd ved gel elektroforese etter PCR-amplifisering av *adk*-sekvensen, 26 gav uspesifikt produkt (flere bånd ved gel elektroforese) og 18 gav ikke produkt i det hele tatt (tabell 2 og figur 2, s. 27). Det var signifikant forskjell ($p = 0,046$) på mengde bakterier i prøver som gav ett bånd på gelen i forhold til de som gav uspesifikt eller ikke noe amplifiseringsprodukt, det vil si at det var mer bakterier i prøver som gav ett spesifikt bånd på gelen. Grupperer man prøver som gav ett bånd og de som gav uspesifikt produkt og sammenligner med prøver som ikke gav produkt, er det også signifikant forskjell i mengde bakterier ($p = 0,014$), med minst bakterier i prøvene som ikke gav produkt.



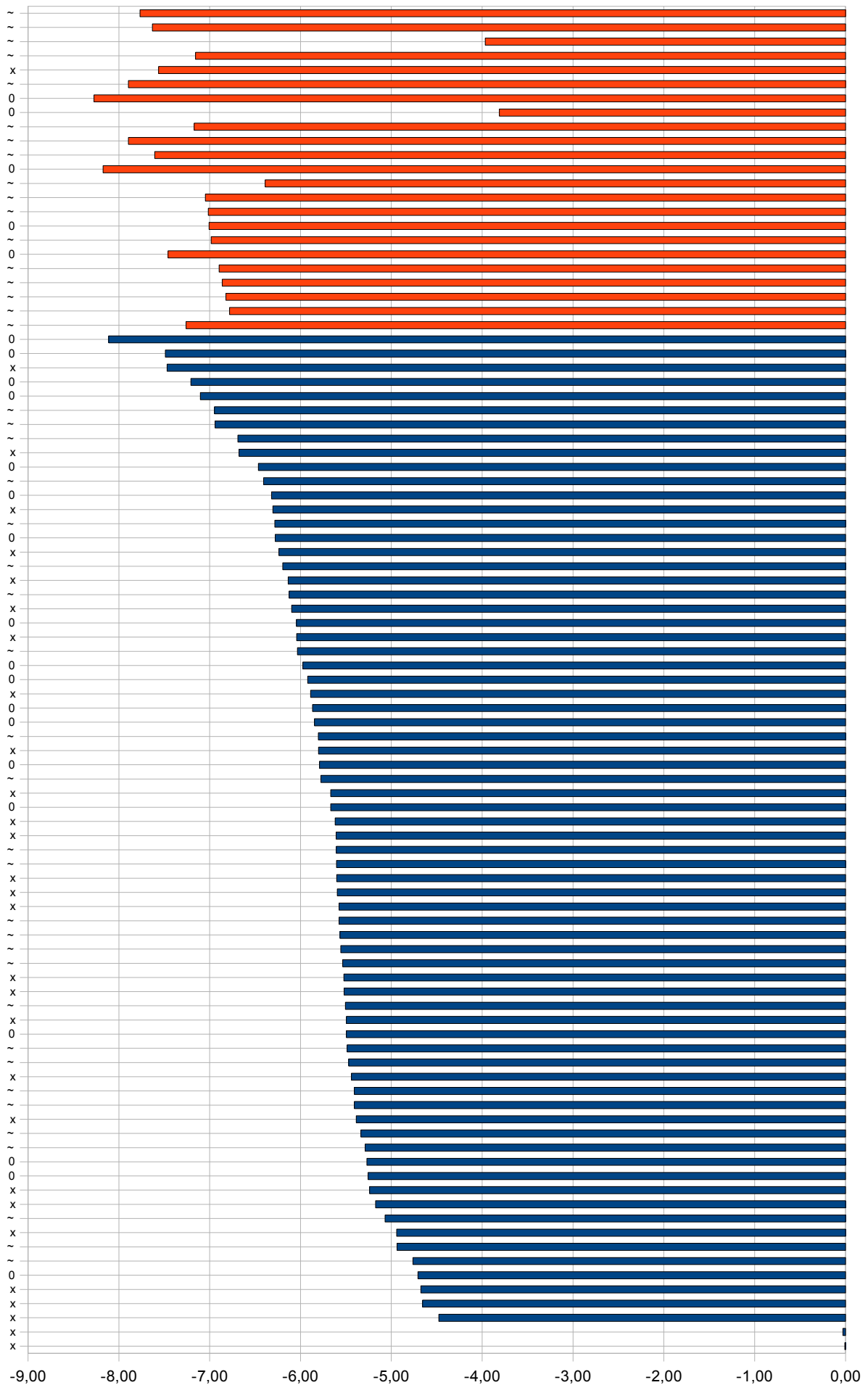
Av de 23 prøvene der qPCR ikke kunne påvise bakterier, gav én prøve ett bånd ved amplifisering av *adk*-genet, 17 gav flere bånd og 5 gav ikke produkt ved amplifisering av *adk* (tabell 2 og figur 2, s. 25). Av de 23 prøvene der qPCR ikke påviste bakterier var 8 britiske (34,8 %), 4 canadiske (17,4 %), 9 norske (39,1 %) og 2 tyske (8,7 %), se figur 1. Prøven som gav ett bånd ved gel elektroforese var britisk.

For hver enkelt populasjon fordeler prøver med og uten bakterier seg slik: britisk 25,8 % uten og 74,2 % med bakterier, canadisk 16 % uten og 84 % med bakterier, norsk 47,4 % uten og 52,6 % med bakterier, tyske 10 % uten og 90 % med bakterier (Figur 3, s. 28).

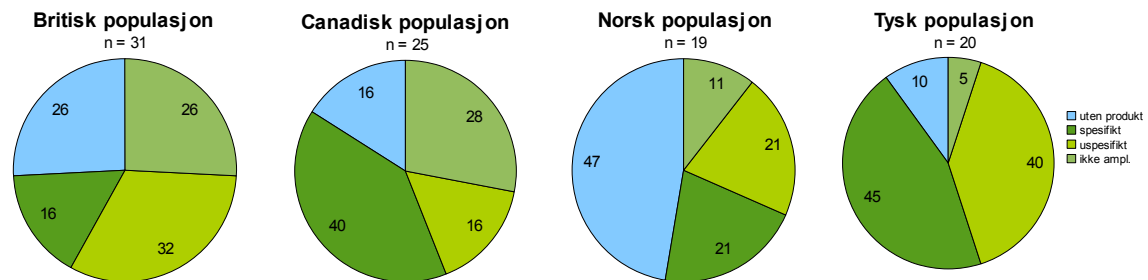
Tabell 2: Oversikt over antall prøver der bakterier er påvist eller ikke, og antall prøver der amplifisering av *adk*-genet gav ett bånd ved gel elektroforese, flere bånd eller ikke noe produkt i det hele tatt. Eks. på utregning av prosent: $\text{Ant.spes.prod/Tot.ant. påvist} \cdot 100$. ($28/72 \cdot 100$).

Bakterier	Totalt ant. prøver	Ett bånd, antall/prosent av total	Flere bånd, antall/prosent av total	Ikke produkt, antall/prosent av total
- påvist	72	28 / 39	26 / 36	18 / 25
- ikke påvist	23	1 / 4	17 / 74	5 / 22

Bakteriemengde vs. amplifisering



Figur 2, s. 27: Figuren viser amplifiseringsprodukt i forhold til logZ-verdi for alle prøvene i forsøket. Amplifiseringsproduktet er anvist med x for prøver som gav ett bånd ved gel elektroforese, ~ for prøver som gav flere bånd og 0 for prøver som ikke gav produkt. Søylene farget røde er prøver der man ikke detekterte bakterie-DNA med qPCR. Her er CT for bakterielt DNA satt til 40 for alle prøvene. logZ er et forholdstall for mengde bakterie-DNA i forhold til mengde meitemark-DNA.



Figur 3: Diagrammene viser prosentvis andel av prøver i hver enkelt populasjon der det ikke ble påvist bakterier (blå) og der det ble påvist bakterier (grønn). Der bakteriene ble påvist er PCR av adk-genet som gav hhv. ett bånd markert med mørkegrønn, flere bånd markert med gulgrønn og prøver som ikke gav produkt er markert grågrønn.

4.1.1 Bakteriemengde hos døde vs. levende meitemark

36 meitemark ble konstatert døde i løpet av forsøksperioden, 9 av disse var britiske (B; 30 % av populasjonen) de fleste av disse tilhørte en eldre populasjon, 3 var canadiske (C; 15 % av populasjonen), 4 var norske (N; 20 % av populasjonen) og 20 var tyske (T). Dette gav en dødsrate (døde pr. 1000 pr. år) på hhv. 300 for britiske, 150 for canadiske og 200 for norske meitemark. Åtte av de britiske markene som døde, døde i løpet av de første to månedene i forsøksperioden, og de kom fra populasjoner som hadde vært i laboratoriet før forsøksperioden startet. Selv om gjennomsnittlig livslengde hos *L. terrestris* er 10 år, kan forhold ved oppbevaringen ha vært medvirkende til at de døde. De fleste individene i den tyske populasjonen var døde da prøvene ble tatt, sannsynligvis på grunn av påkjenninger under transport. Gjennomsnittlig logZ-verdi for de forskjellige populasjonene varierer mellom -6,11 og -5,02 (Tabell 3).

Sammenligner man bakteriemengden i mark som har overlevd forsøksperioden mot alle mark som er døde i løpet av perioden, er det 11 prosent sannsynlighet for at forskjellen i mengde bakterier hos de to populasjonene skyldes tilfeldigheter. Det er ikke signifikant forskjell på mengde bakterier i tyske meitemark i forhold til de andre markene som døde i løpet av forsøksperioden ($p = 0,204$), selv om de tyske var døde da prøvene ble tatt. Slår

man sammen de populasjonene der individene levde da prøvene ble tatt (B, C og N) og sammenligner mengde bakterier her med den tyske populasjonen, er det signifikant forskjell ($p = 0,024$). Blant de 36 markene som døde i forsøksperioden hadde 5 individer ikke målbar mengde bakterier mens 31 hadde bakterier i nefridiene.

Tabell 3: Tabellen viser gjennomsnittlig logZ-verdi for hver enkelt populasjon, samt for gruppa av individer som døde i løpet av forsøksperioden og gruppa som overlevde forsøksperioden. Døde unntatt tyske mark er tatt med fordi de fleste tyske var døde da prøven ble tatt.

	Britisk	Canadisk	Norsk	Tysk	Døde inkl. T	Døde ekskl. T	Levende
Snittverdi	-5,86	-5,75	-6,11	-5,03	-5,36	-5,83	-6,02
Std.avvik	0,54	1,53	0,78	1,33	1,60	1,87	0,66
Antall prøver	23	21	10	18	36	16	59

4.2 Amplifisering og sekvensering

For å fremskaffe sekvenser som videre skulle brukes i fylogenetiske analyser, ble det utført PCR-amplifisering av *adk*-genet hos bakterien og *ND4*-genet fra mtDNA hos meitemarken. *adk*-genet (481 nukleotider) gav ett bånd ved gel elektroforese hos 29 av 96 prøver, mens 43 prøver gav uspesifikt produkt (flere bånd) og 24 prøver lot seg ikke amplifisere. Sekvensering var vellykket hos 22 prøver, én av disse kom fra uspesifikt produkt (Tabell 4).

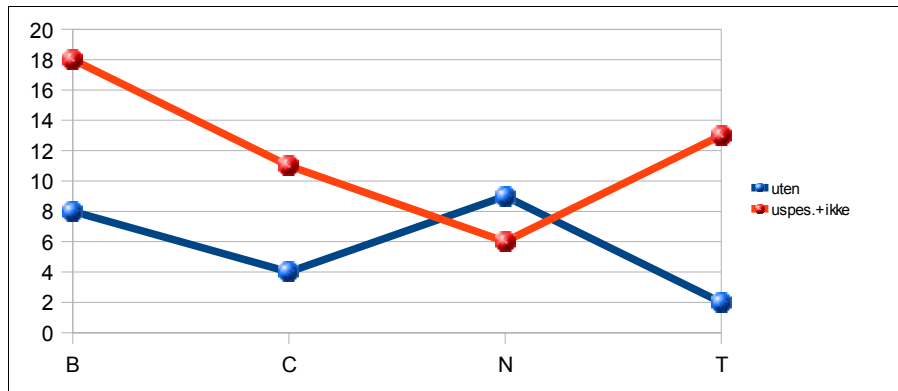
Amplifisering av *ND4*-genet (1500 nukleotider) var vellykket hos 90 av 96 prøver mens 6 ikke lot seg amplifisere. Sekvensering var vellykket hos 81 prøver (Tabell 4).

Uspesifikt produkt betyr her flere enn ett bånd på gelen ved gel elektroforese. Vellykket sekvensering betyr at sekvenseringen gav lesbart produkt med akseptable tracedata. Noen sekvenseringer ble tatt ut av alignmentet fordi viktige deler av sekvensen manglet.

Tabell 4: Oversikten viser antall prøver der amplifisering var vellykket (gav spesifikt bånd ved gel elektroforese) og der sekvensering var vellykket med gode trace-data.

	Britisk	Canadisk	Norsk	Tysk
Ett bånd, adk	4	12	4	9
Flere eller ikke noe bånd, adk	27	13	16	11
Lesbare tracedata, adk	3	11	1	7
Ikke lesbare tracedata, adk	28	14	19	13
Ett bånd, ND4	30	23	20	17
Flere eller ikke noe bånd, ND4	1	2	0	3
Lesbare tracedata, ND4	28	21	19	13
Ikke lesbare tracedata, ND4	3	4	1	7

Ser man på hver enkelt populasjon, er det negativ korrelasjon mellom antall prøver uten bakterier og antall prøver med uspesifikt eller fraværende produkt (Figur 4).



Figur 4: Diagrammet viser antall prøver uten bakterier (blå) og antall prøver der amplifisering ikke gav spesifikt produkt (rød), fordelt på hver enkelt populasjon. B = britisk, C = canadisk, N = norsk, T = tysk. Det er negativ korrelasjon mellom disse to resultatene.

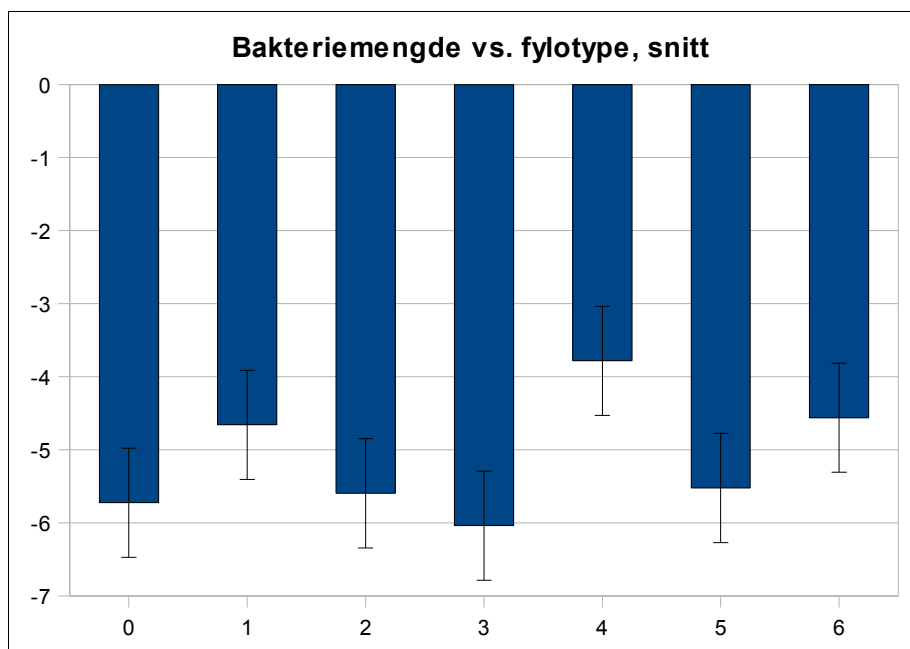
4.2.1 Optimalisering av PCR-reaksjonene

Fire markører for husholdningsgener hos *Verminophrobacter* ble testet ut, *adk*, *fumC*, *icd* og *rpoB*. Tre av de fire markørene gav produkt ved gradientPCR, og det ble valgt å gå videre med markøren *adk*. Primerne for *adk* anealet over et temperaturspekter mellom 50 °C og 60 °C og det ble valgt å bruke 55 °C. Prøver som ikke gav produkt med primerpar 1 (pp1), ble forsøkt amplifisert med primerpar 2 (pp2), primerpar 3 (pp3) og med forskjellige kombinasjoner av pp1, pp2 og pp3. Verken nested PCR, annet enzym (DynaZyme HotStart) eller tre innledende sykluser med lavere anealingstemperatur gav mer spesifikt produkt enn den opprinnelige protokollen.

adk-genet er et husholdningsgen og finnes dermed i alle celler. For å sikre at primerne ikke binder til andre sekvenser enn målsekvensen hos *Verminophrobacter*, ble det gjort BLASTn-søk med primerne mot NCBI's database. Resultatet tilsa ikke at primerne skal binde til andre sekvenser enn målsekvensen.

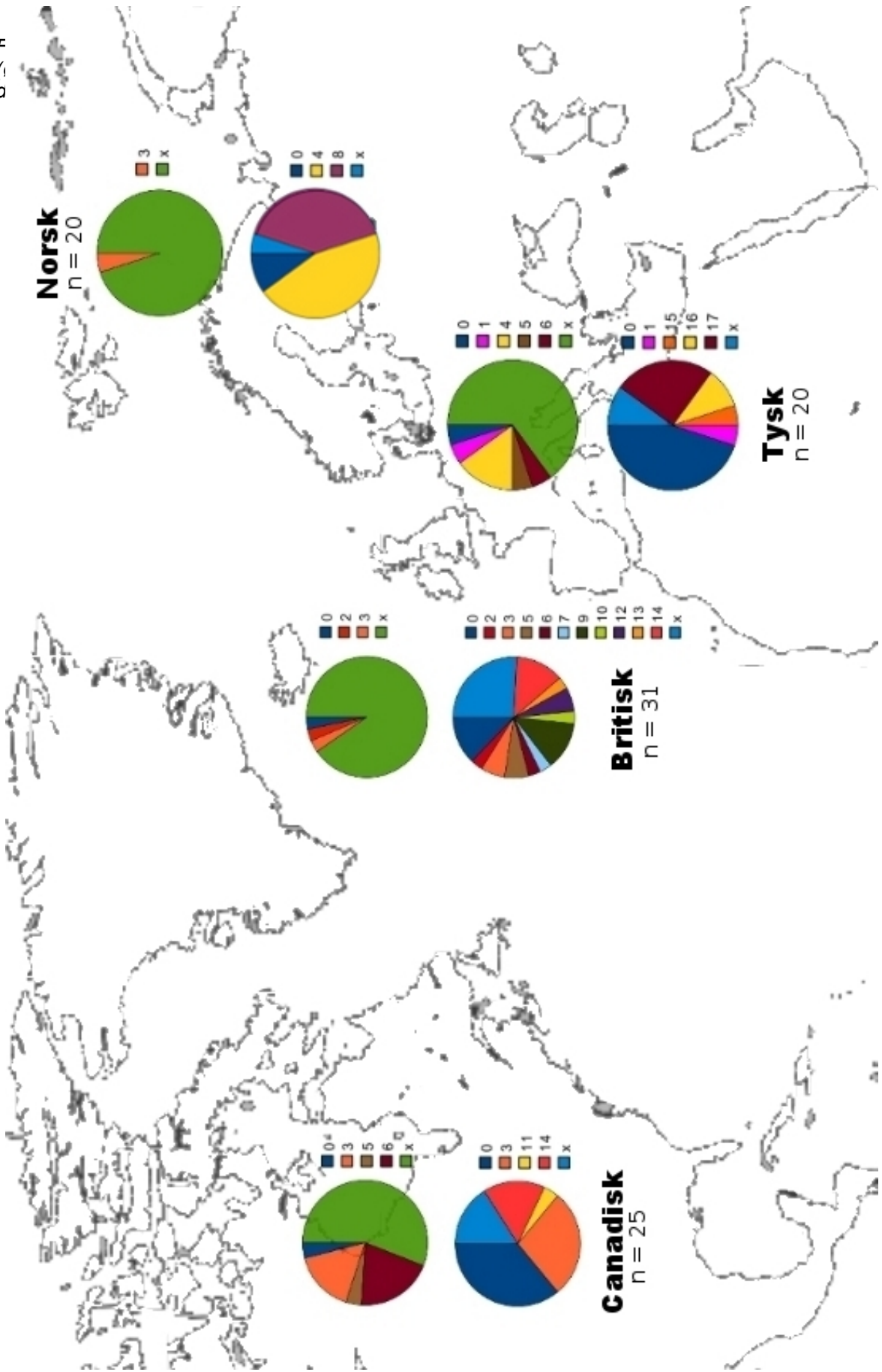
4.3 Bakteriemengde vs. fylogtype

Ved analyse av produktene fra PCR-amplifisering og sekvensering ble det funnet 7 SNPer i *adk*-genet. Disse fordelte bakteriene i 6 fylogrupper. Gjennomsnittlig $\log Z$ -verdi for fylogtype 1 og 2 baserer seg på ett individ hver, fylogtype 3 baserer seg på 6 individer, fylogtype 4 på to individer, fylogtype 5 baserer seg på 2 individer og fylogtype 6 på 5 individer (Figur 5 og 6). Enveis ANOVA gir ingen signifikant forskjell på bakteriemengden hos de forskjellige fylogtypene.



Figur 5: Diagrammet viser gjennomsnittlig $\log Z$ for hver enkelt fylogruppe. Fylogruppe 0 inneholder de sekvensene som ikke lot seg klassifisere. Standardavvik for datasettet = 1,77.

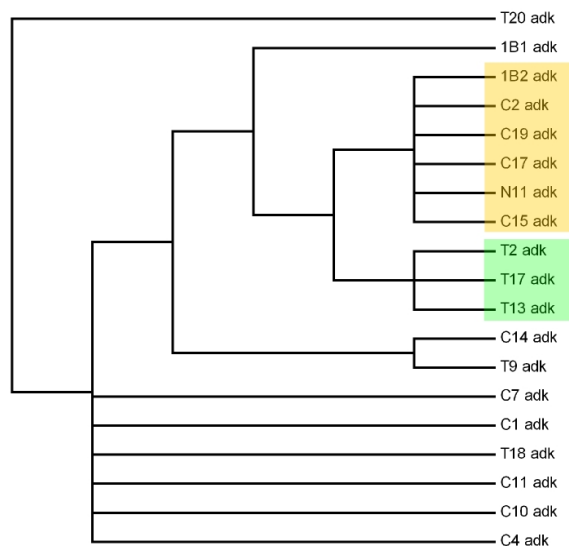
F
(
a



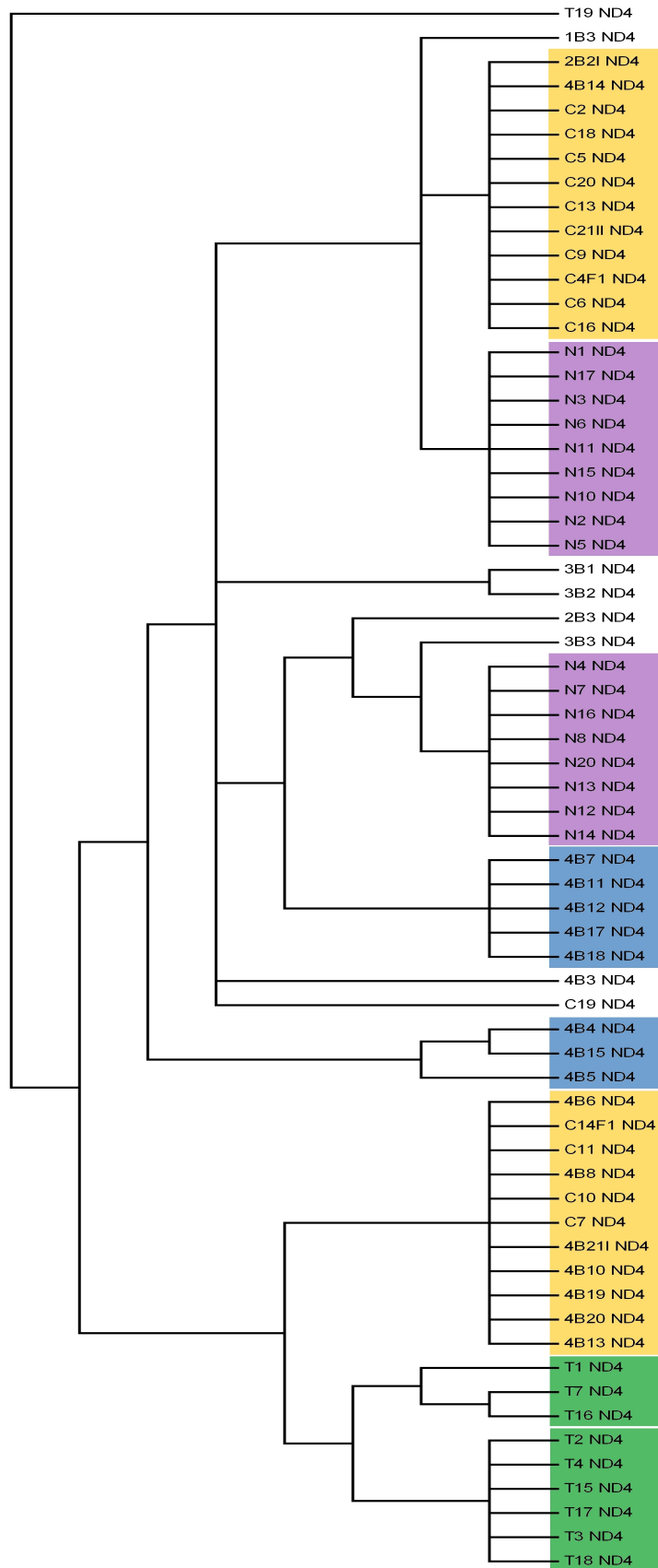
4.4 Fylogeografi

For bakteriens *adk*-sekvens ble et fylogenetisk tre konstruert på bakgrunn av 19 sekvenser på 282 nukleotider. Av disse var 2 britiske, 10 canadiske, 1 norsk og 6 tyske (Figur 6). Sekvensene inneholdt 7 SNPer og representerte 6 fylotyper. Tre av de tyske prøvene danner en egen gruppe, mens fire canadiske danner en gruppe sammen med en britisk og en norsk (Figur 7).

For *ND4*-genet fra meitemarkene var det 65 sekvenser som danner grunnlaget for konstruksjon av et fylogenetisk tre. Sekvensene var fordelt slik: 23 britiske, 15 canadiske, 17 norske, 10 tyske (Figur 6). Totalt inneholdt sekvensene 73 SNPer som representerte 17 fylotyper. Alle de tyske med unntak av én, T19, danner en fylogruppe. De norske delte seg i to grupper. Sekvensene fra 5 britiske prøver danner en egen gruppe, mens 10 canadiske danner en gruppe sammen med to britiske. En av fylogruppene er satt sammen av sekvenser fra 4 canadiske og 7 britiske prøver (Figur 8, s. 34).

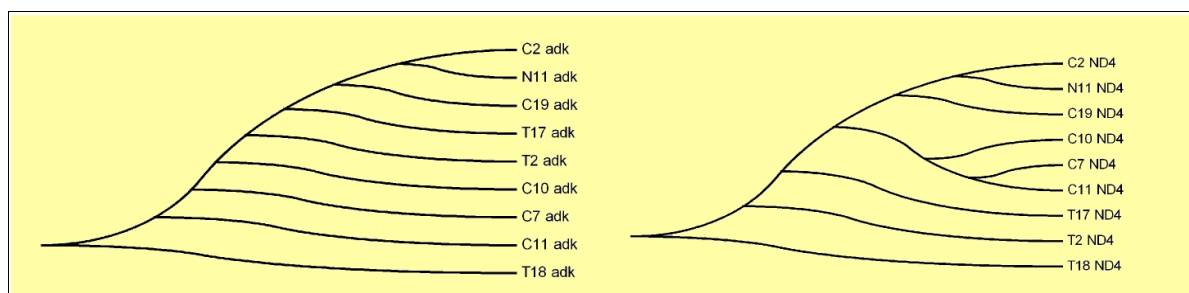


*Figur 7: Maximum parsimony fylogenetisk tre utledet fra et fragment på 282 nukleotider fra *adk*-genet. Prøver fra 19 individer er med i sammenstillingen. T20 og 1B1 danner hver sin fylotype. 1B2, C2, C19, C17, N11 og C15 danner én fylogruppe (gul), T2, T17 og T13 hører til samme fylogruppe (grønn), C14 og T9 danner én gruppe og C7, C1, T18, C11, C10 og C4 danner én fylogruppe*



Figur 8: Maximum parsimony fylogenetisk tre utledet fra et fragment på 280 nukletider fra ND4-genet hos meitemark. Prøver fra 65 individer er med i sammenstillingen og de danner 17 fylogrupper. Tyske (grønn) og norske (lilla) meitemark danner helt egne fylogrupper på samme måte som noen britiske individer (blå). Canadiske meitemark danner to fylogrupper sammen med britiske individer (gul).

To fylogenetiske trær ble konstruert på grunnlag av de ni sekvensene hvor både *adk*-genet og *ND4*-genet ble vellykket sekvensert. Disse danner ingen fylogrupper hos bakterien, men én gruppe hos meitemarken (Figur 9). Grappa hos meitemarken består av sekvenser fra tre canadiske prøver. Greinene som representerer de tyske prøvene ligger nærmere hverandre i treet for meitemarksekvenser i forhold til plasseringen de har i treet som representerer sekvenser fra bakterien.



Figur 9: Fylogenetiske trær konstruert ut fra maximum parsimony med bakgrunn i 9 sekvenser av et fragment på 282 nukleotider fra *adk*-genet (t.v.) og 280 nukleotider fra *ND4*-genet (t.h.). I treet til venstre dannes det ingen fylogrupper, mens i treet til høyre danner C10, C7 og C11 en egen gruppe. Vi ser også at i treet til høyre plasserer de tre tyske prøvene seg nærmere hverandre enn i treet til venstre.

4.5 Nukleotidpolymorfisme

Beregning av nukleotidpolymorfisme (antall polymorfe seter dividert med det totale antall nukleotider i fragmentet) i et fragment på 280 nukleotider fra *ND4*-genet for hver enkelt populasjon viser at den tyske populasjonen har høyest variasjon og den norske har lavest (Tabell 5 og figur 10). For den tyske populasjonen er det vist to beregninger. I populasjonen med lavest nukleotidpolymorfisme er individ T19 utelatt. Sammenligner en denne verdien med de andre populasjonene, har den tyske populasjonen minst variasjon og den britiske har størst. Tilsvarende måling for et fragment på 282 nukleotider fra *adk*-genet hos bakterien viser at variasjonen er tilnærmet lik i de tre målbare populasjonene.

Tabell 5: Tabellen viser nukleotidpolymorfisme for et fragment på 282 nukleotider fra *adk*-genet og 280 nukleotider fra *ND4*-genet for hver enkelt populasjon og for alle populasjonene samlet.

Gen	Britisk	Canadisk	Norsk	Tysk	Totalt
ND4	0,132	0,057	0,054	0,146/0,039*	0,261
Ant. sekv.	23	15	17	10	65
adk	0,014	0,018	-	0,017	0,025
Ant. sekv.	2	10	1	6	19

* Det laveste tallet representerer verdien når individ T19 er utelatt fra beregningen.

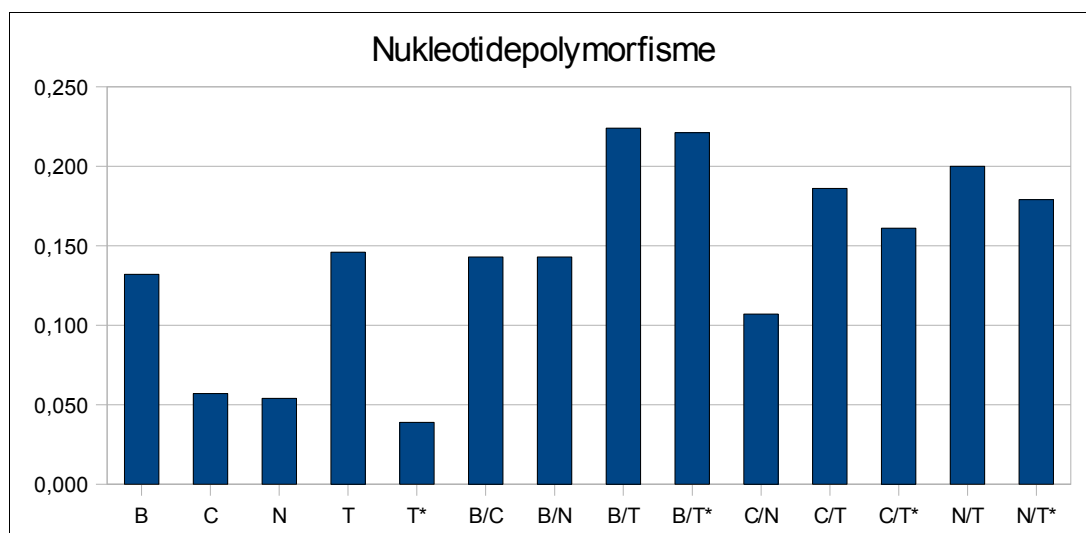
Måler man nukleotidpolymorfisme for to og to populasjoner, kommer kombinasjonen britisk/tysk ut med høyest polymorfisme i fragmentet fra *ND4*-sekvensen, mens kombinasjonen canadisk/norsk har lavest (Tabell 6 og figur 10). Man får sammen resultatet om individ T19 utelates fra beregningene. Når man kombinerer polymorfismen hos de norske og de tyske (inkl. T19), øker polymorfismen med summen av polymorfisme for de to enkeltstående populasjonene.

For *adk*-sekvensen gir kombinasjonen britisk/canadisk og britisk/tysk samme variasjon, 0,025, og kombinasjonene britisk/norsk, canadisk/norsk, canadisk/tysk og norsk/tysk har variasjon, 0,018.

Tabell 6: Tabellen viser nukleotidpolymorfisme for et fragment på 282 nukleotider fra *adk*-genet og 280 nukleotider fra *ND4*-genet for hver to og to populasjoner.

Gen	Brit/Can	Brit/Norsk	Brit/Tysk	Can/Norsk	Can/Tysk	Norsk/Tysk
ND4	0,143	0,143	0,239/0,221*	0,107	0,186/0,161*	0,200/0,179*
Ant. sekv.	38	40	33	32	25	27
adk	0,025	0,018	0,025	0,018	0,018	0,018
Ant. sekv.	12	3	8	11	16	7

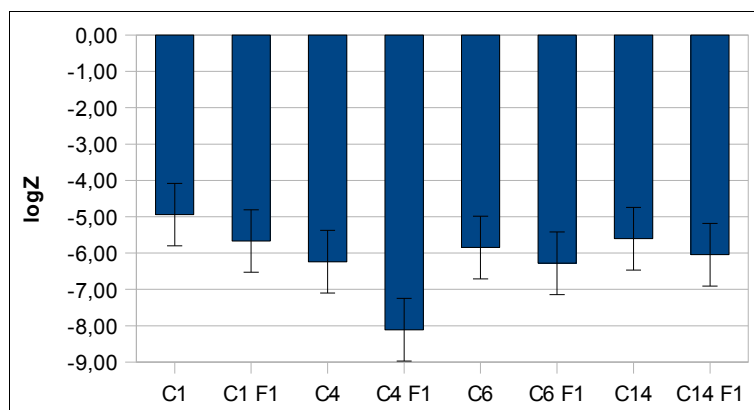
* Det laveste tallet viser verdien der individ T19 er tatt ut av tallmaterialet.



Figur 10: Diagrammet viser nukleotidpolymorfisme for hver enkelt populasjon og for to og to populasjoner sammen. For den tyske populasjonen er det gjort to beregninger, med og uten individ T19. Beregninger uten T19 er merket *.

4.6 Bakteriemengde foreldre vs. avkom

Fire av de canadiske markene fikk avkom (F1), C1, C4, C6 og C14. F1-gruppa hadde lavere logZ enn foreldregruppa, og forskjellen er signifikant med 90 prosent konfidensintervall (Figur 11).



4.7 Behandling med antibiotika

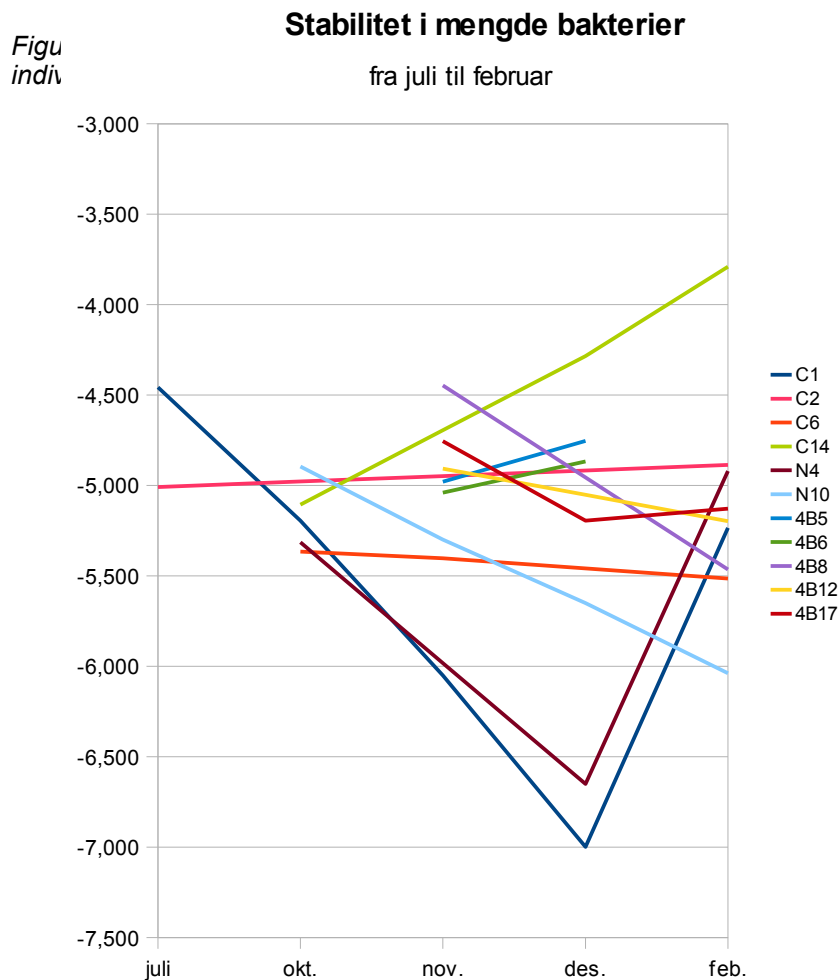
5 meitemark ble matet i 17 dager med fôr tilsatt antibiotika. Resultatene fra qPCR viser at hos ett individ, 1B3, var det ikke målbar mengde bakterier etter behandlingen. Hos to av de andre individene var det nedgang i mengde bakterier, mens hos ett individ, 4B21, var det ikke målbar mengde bakterier verken før eller etter antibiotikabehandlingen. Hos individ C15, som fikk leve 47 dager sammen med en meitemark som var behandlet med antibiotika, men som selv ikke fikk behandling, var det økning i den relative mengden bakterier (Tabell 7). Ett av individene, C22, som ble behandlet med antibiotika, døde før man fikk sikret vevsprøve.

Tabell 7: Oversikten viser logZ-verdi for utvalgte individer før og etter behandling med antibiotika. C15 ble ikke behandlet, men fikk leve i 47 dager sammen med 2B2 som var antibiotikabehandlet (AB).

Prøve	adk/18S, før	adk/18S, etter	Kommentarer
1B3	-6,6333		
2B2	-5,1317	-5,8305	
C21	-4,7069	-6,3934	
4B21			Ikke målbar bakteriemengde verken før eller etter behandling.
C15	-5,6466	-4,9905	Ikke AB-behandlet. Har levd sammen med 2B2.

4.8 Stabilitetsforsøk

15 meitemark, fem fra hver av tre populasjoner var med i dette forsøket. Én av markene døde etter uttak nummer to, slik at det foreligger tre prøver fra 14 meitemarker og to prøver fra én av markene. Forsøk på å amplifisere *adk*-genet i uttak nummer to og tre mislyktes. Resultatene fra qPCR viser at bakteriemengden ikke er stabil over tid, men viser ingen systematikk med hensyn til om mengden bakterier avtar eller øker (Figur 12). Det er heller ingen statistisk signifikans for at bakteriemengden endrer seg fra første til siste prøveuttak når vi ser på alle prøvene under ett. Sammenligner vi bakteriemengden kun i første og siste måling hos gruppen der mengden økte, er det signifikant forskjell med $0,005 < p < 0,01$. Tilsvarende undersøkelser hos gruppen der bakteriemengden avtok gir $0,05 < p < 0,1$.



5. Diskusjon

De viktigste resultatene fra disse undersøkelsene viser at bakterien *Verminiphrobacter* og meitemarkarten *Lumbricus terrestris* har forskjellig fylogeografisk spredningsmønster. Bakterien fantes ikke hos alle meitemarkene og mengde bakterier var ikke stabil over tid. Dessuten ble det observert at bakteriemengden var høyere hos døde mark enn hos levende. Resultatene tilsier at symbiosen mellom *L. terrestris* og *Verminiphrobacter* ikke er obligat for meitemarkens vedkommende.

5.1 Fylogeografisk spredningsmønster

Meitemark fra samme område er nærmere i slekt med hverandre enn med meitemark fra andre områder (Figur 8), men bakteriene i nefridiene hos meitemarkene er ikke nærmere i slekt, selv om de kommer fra samme område (Figur 7).

Det er altså en sammenheng mellom fylotype og geografi hos meitemarkene som var med i denne undersøkelsen. Denne slutningen kan vi trekke fordi vi finner større sekvenslikhet i *ND4*-genet hos individer fra samme område enn mellom individer fra forskjellig geografisk område (Figur 8). Tysk og norsk mark danner rene fylogrupper, uten innslag av individer fra andre geografiske områder. Tiunov et al. (2006) mener at klimatiske faktorer har en sterk påvirkning på nordlig og østlig utbredelse av forskjellige meitemarkarter i Nord-Europa. Selv om man antar at norsk meitemark har sin opprinnelse lengre sør i Europa, tyder våre resultater på at den norske og den tyske populasjonen har vært adskilt lenge nok til å danne egne fylogenetiske grupper. Canadisk og britisk mark, derimot, danner to felles fylogrupper. Dette tilsier større sekvenslikhet mellom canadiske og britiske individer enn mellom de andre populasjonene. Det nære slektskapet mellom canadisk og britisk meitemark er sannsynligvis en følge av at canadisk mark er introdusert fra Storbritannia. Utstrakt handelsvirksomhet og migrasjon mellom Canada og De britiske øyer kan ha forårsaket at meitemarkene har blitt introdusert ved passiv transport av mennesker. Tatt i betraktning at nærmere halvparten av befolkningen i Canada sier at de har sin opprinnelse på De britiske øyer, noe som rimeligvis fører til mye kommunikasjon mellom de to landene, og at 3 prosent av Canadas import kommer fra Storbritannia (Store Norske Leksikon, 2009), er det ikke usannsynlig at *Lumbricus terrestris* har blitt med på lasset, særlig i forbindelse med eksport

av trær og planter. Våre resultater bekrefter tidligere undersøkelser som har funnet at meitemarkarter i Nord-Amerika er introdusert fra Europa (Tiunov et al., 2006).

Tilsvarende undersøkelser av *adk*-genet hos bakterien viser ikke at bakterier fra samme geografiske område har større sekvenslikhet med hverandre enn med bakterier fra andre områder (Figur 7). Man kan altså ikke fastslå at det er nærmere slektskap mellom bakterier hos meitemark som kommer fra samme område enn mellom bakterier hos mark fra forskjellig geografisk område. Fylogenetiske trær for meitemark og bakterier danner forskjellig forgreiningmønster. Undersøkelser gjort av Schramm et al. (2003) viste at det har funnet sted en coevolusjon mellom meitemark og bakterier på artsnivå, idet bakterier hos meitemark av samme art er nærmere beslektet enn bakterier hos meitemark av forskjellig art. Våre analyser viser derimot ingen sammenheng mellom bestemte fylotyper hos meitemark og bestemte fylotyper hos bakterien, så coevolusjonen avspeiles ikke på individnivå.

Våre resultater stemmer overens tidligere undersøkelser og etablerte oppfatninger presentert i enhver lærebok om økologi om at de fleste høyerestående arter viser et fylogeografisk mønster (Awise, 2009). Det har vært større diskusjoner omkring fylogeografi og global distribusjon av mikroorganismer, ikke minst med hensyn til endosymbionte bakterier (Ley, Peterson & Gordon, 2006). Våre resultater understøtter hypotesen om global distribusjon av bakterier som hevder at mikroorganismer ikke viser noe geografisk spredningsmønster. Utbredelsen av bakterier er i større grad bestemt av andre faktorer som fuktighet, pH o.a. (Lozupone & Knight, 2006), men slike faktorer er ikke undersøkt her.

Sekvensering av et fragment fra *ND4*-genet hos 65 meitemarker avdekte 17 fylotyper. Fylotype 4 og 8 fantes bare hos norske meitemarker og type 1, 15, 16 og 17 fantes bare hos tyske individer. Canadiske individer representerte fylotypene 3, 11 og 14. Fylotype 14 fantes også hos britiske meitemark, mens de andre to fylotypene fantes kun hos de canadiske. De resterende fylotypene, 2, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 13 samt 14 fantes hos den britiske populasjonen, som dermed viste seg å være en svært variert gruppe. Dette ble bekreftet av en nukleotidpolymorfisme (np) på 0,132. Ingen av de andre populasjonene hadde np > 0,06. Med hensyn til nukleotidpolymorfisme var den tyske populasjonen et særtilfelle, der ett individ (T19) representerte en forskjell i polymorfisme på 0,107. Utelater man individ T19, var det 11 SNPer i det tyske datasettet, mens det var 41 SNPer dersom man innbefattet T19.

Individ T19 skilte seg så tydelig fra de andre meitemarkene i forsøket at den ble gjenstand for en ekstra analyse. Vi alignet et fragment av T19 på 580 nukleotider med tilsvarende fragment fra fylotype 5. Deretter alignet vi samme fragment fra T19 med sekvensen som ble

annotert av Boore & Brown i 1995. *ND4*-sekvensen hos T19 har mer til felles med marken som Boore & Brown gransket i 1995 (30 SNPer, $np = 0,052$) enn med artsfrendene som ble plukket i samme område og til samme tid i 2008 (82 SNPer, $np = 0,141$). Personlig kommunikasjon med Vawter (som samlet prøvematerialet for Boore & Brown) bekrefter at deres individ ble funnet i Ann Arbor, Michigan, USA en gang i perioden 1987-1995. Man regner med at alle individer av *L. terrestris* i Nord-Amerika er introdusert fra Europa (Schwert, 1990), og våre resultater tyder på at populasjonen i Ann Arbor, Michigan kan stamme fra Tyskland, eller at individ T19 fra Tyskland kan være introdusert fra samme omkringliggende land som meitemarken i Michigan kom fra.

Framstillingen av den fylogenetiske sammenhengen mellom *ND4*-sekvensen fra de forskjellige individene viser at den tyske populasjonen danner tre fylotyper (i tillegg til T19) som alle befinner seg på samme grein i kladogrammet. Det betyr at disse er mer lik hverandre enn fylotyper fra andre geografiske områder. Den norske populasjonen fordeler seg på to fylogrupper der det hos den ene har skjedd minst fem mutasjoner, mens det hos den andre har skjedd minst én mutasjon siden de skilte lag. Gruppen med flest mutasjoner likner mer på fem individer fra den britiske populasjonen enn på den andre norske fylogruppa, men er likevel klart adskilt fra denne. Vi finner også to forholdsvis store fylogrupper (hhv. 12 og 11 individer) bestående av en blanding av canadiske og britiske individer.

De 19 prøvene der sekvenseringen var vellykket for *adk*-genet fordeler seg på 6 fylogrupper. Ser vi nærmere på den geografiske fordelingen av fylogruppene, ser vi at gruppe 1 og 4 kun forekommer i den tyske populasjonen. Fylogruppe 2 forekommer kun hos ett individ og dette er britisk. Fylogruppe 3 finnes i alle populasjoner, unntatt den tyske. Fylogruppe 5 og 6 forekommer i den tyske og den canadiske populasjonen. Denne tilsynelatende tilfeldige fordelingen av fylotyper med hensyn til geografi bekreftes av maximum parsimony fylogenetisk tre. Her danner tre tyske mark én gruppe, men ellers finner vi ingen geografisk sammenheng mellom fylogruppene. Sammenligningene baserer seg på et lavt antall prøver (19 sekvenser) og individene som er med i undersøkelsen representerer kun et lite utvalg av de eksisterende populasjonene i opprinnelseslandene, derfor kan det ikke trekkes noen sikre slutninger på dette grunnlaget, men resultatene antyder en bekreftelse av hypotesen om global distribusjon av bakterier.

5.2 Bakteriens tilstedeværelse

Våre resultater viser at ikke alle meitemark hadde bakterier i nefridiene og fordelingen av individer med og uten bakterier var forskjellig i de ulike populasjonene.

Bakterien ble påvist i 76 prosent av prøvene mens den var fraværende i 24 prosent. Schramm et al. (2003) framholder at symbiosen mellom meitemark og bakteriene i nefridiene er en stabil, verstsspesifikk assosiasjon, men vi har funnet at 24 prosent av meitemarkene ikke hadde bakterien, noe som må bety at symbiosen ikke er livsnødvendig for meitemarkens vedkommende. Schramm et al. framholder videre at bakteriene i nefridiene kan bidra til å lette markens reabsorpsjon av nitrogenforbindelser som ellers ville gått tapt ved ekskresjon. En slik gjenvinning av nitrogen må antas å være en så stor fordel for meitemarken at symbiosen må kunne karakteriseres som mutualistisk, og man ville forvente at alle meitemarker huser symbionten. På den annen side trenger ikke fordelene for individer med bakterier å være så total at individer uten bakterier blir fullstendig utkonkurrert. Vi observerer at meitemark med bakterier er i flertall i alle populasjoner, til og med den norske, selv om forskjellen her er liten (52,6/47,4).

Med bakgrunn i Schramms funn trodde vi i utgangspunktet at symbiosen mellom *L. terrestris* og *Verminephrobacter* var mutualistisk, at bakterien ville finnes i alle meitemarkindivider og at mengden bakterier var stabil over tid. Våre resultater utelukker ikke at symbiosen er mutualistisk, men vi kan fastslå at den ikke er obligat for meitemarken.

De norske individene kom fra en naturlig populasjon, og hadde den jevneste fordelingen av marker med og uten bakterier. Den canadiske populasjonen kom fra et oppdrettsanlegg og hadde en stor overvekt av individer med bakterier. Forskjell i miljø grunnet oppdrett kontra naturlig habitat kan være én årsak til ulik fordeling av individer med og uten bakterier i forskjellige populasjoner. Dersom bakterien er en ulempe for meitemarken, kan de idealiserte og stabile forholdene i et oppdrettsanlegg føre til økt overlevelse hos individer som har bakterien, i forhold til hvilken overlevelse de ville hatt i vill tilstand.

Går man dypere inn i hvilke faktorer som kan tenkes å være grunn til de geografiske ulikhetene med hensyn til ulik fordeling av individer med og uten bakterier, vil disse fordele seg på miljømessige faktorer og egenskaper knyttet til arv. Faktorene er så tett flettet sammen at det vil være svært vanskelig å skille dem fra hverandre dersom man ikke utfører spesifikke tester for å undersøke hver enkelt faktor separat. Miljømessige faktorer som påvirker fordelingen av individer med og uten bakterier kan blant annet være pH, fuktighet,

klima, type fôr og predatorer (dersom bakteriene har innvirkning på meitemarkens adferd). Ettersom tidligere undersøkelser har vist at meitemarkens tarmbakterier påvirkes av fôret (Rudi et al. 2008), kan man også tenke at det samme vil være tilfelle med hensyn til bakteriene i nefridiene. Hvis denne antakelsen stemmer, bør man kunne observere at bakteriene i nefridiene påvirkes av at meitemark fra forskjellige populasjoner lever i forskjellige miljøer og derfor har tilgang til ulike typer fôr. Denne undersøkelsen viser en slik sammenheng. Det er ikke sannsynlig at fôret i forsøksperioden har påvirket målingene av bakterienes tilstedeværelse eller fravær i nefridiene. Dette fordi de fleste prøvene ble tatt idet markene ankom, før fôringen startet, og fordi alle markene i løpet av forsøksperioden ble fôret med samme type mat, både de som hadde bakterier i nefridiene og de som ikke hadde det.

Arvelige egenskaper som kan føre til ulik fordeling av individer med og uten bakterier i forskjellige meitemarkpopulasjoner kan være flere. For det første, dersom vertikal overføring er den eneste muligheten for bakterien til å spre seg i en meitemarkpopulasjon, vil en populasjon med en overvekt av bakteriefrie individer fortsette å ha flest individer uten bakterier, så sant disse ikke har lavere fitness (får færre etterkommere) enn individer med bakterier. En anerkjent hypotese går ut på at symbionter som overføres vertikalt har en mutualistisk symbiose med verten, og at symbiosens karakter defineres ut fra symbiontens virkning på fitness hos verten (Smith, 2007). Mutualistisk symbiose defineres ved at individer som har symbionten vil ha høyere fitness enn individer som ikke har den, mens parasittisk symbiose har negativ virkning på vertens fitness. Vi har ikke gjort målinger som kan fortelle noe om fitness i våre populasjoner, men vi observerer at en stor andel av meitemarkene ikke har bakterier i nefridiene. Dersom vi på dette grunnlaget antar at symbiosen ikke er mutualistisk, og vertikal overføring er ensbetydende med mutualistisk symbiose, må *Verminephrobacter* også kunne overføres horisontalt mellom meitemarkene. På den annen side må vi huske på at målingene i dette forsøket kun gir et øyeblikksbilde av fordelingen av individer med og uten bakterier og at våre populasjoner ikke nødvendigvis er et representativt utvalg av de opprinnelige populasjonene. For det andre, meitemarkene kan ha en reguleringsmekanisme som kan redusere eller fortrenge bakterien i nefridiene hvis bakteriemengden øker over et akseptabelt nivå bestemt av den enkelte meitemarken.

Våre undersøkelser viser at tre firedeler av meitemarkene uten bakterier var norske og britiske. De tyske markene utgjorde bare 8,7 prosent av mark uten bakterier. Det er signifikant forskjell i mengde bakterier hos tysk og britisk meitemark og hos tysk og norsk meitemark, men ikke hos tysk og canadisk mark. Vi kjenner ikke de fysiske egenskapene

ved jorda der meitemarkene har levd, men vi kjenner til en annen variabel som kan ha påvirket bakteriemengden, nemlig at de tyske meitemarkene var døde da prøvene ble tatt. Dersom vi antar at dette er årsaken til at de tyske markene inneholder mer bakterier enn de andre populasjonene, kan vi utelate denne populasjonen og se på den prosentvise andelen av prøver med og uten bakterier i hver av de tre andre populasjonene. Da ser vi at hos den norske populasjonen er fordelingen nesten fifty-fifty (47,4 % uten og 52,6 % med), mens hos den canadiske er fordelingen 16 % uten og 84 % med bakterier. Hele den norske populasjonen kommer fra en vill bestand, mens den canadiske populasjonen i sin helhet kommer fra et oppdrettsanlegg. Den britiske populasjonen består hovedsaklig av oppdrettsmark med innslag av noen frittlevende mark.

5.3 Variasjon i bakteriemengde over tid

Våre resultater viser at mengden bakterier varierer over tid og det er ingen systematikk i hvorvidt mengde bakterier øker eller avtar når man ser hele gruppen under ett (Figur 12).

For noen individer øker mengde bakterier, for andre avtar bakteriemengden, mens for atter andre øker mengden bakterier for deretter å avta ved neste måling. Disse målingene stemmer ikke overens med observasjonene til Schramm et al. (2003) som framholder at symbiosen mellom meitemark og bakteriene i nefridiene er en stabil assosiasjon. Faktorer som påvirker bakteriemengden kan enten være knyttet til fôret eller at meitemarken selv kan påvirke bakteriemengden. Det er vanskelig å trekke en slutning om at fôret alene påvirker bakteriemengden, ettersom alle meitemarkene ble fôret på samme måte med samme type fôr i løpet av forsøksperioden. Variasjonen i mengde bakterier kan ha sin årsak i en gjensidig reguleringsmekanisme mellom bakterier og mark, på samme måte som vi har foreslått i forbindelse med fravær og tilstedeværelse av bakterien. Man kan tenke seg at hvis bakteriemengden øker over et visst nivå (bestemt av den individuelle meitemarken), så har marken en måte å nedregulere mengde bakterier på eller endog utrydde den fra nefridiene. Dette kan bety at symbiosen er parasittisk under visse betingelser, mens den er enten mutualistisk eller kommensalistisk under andre betingelser, og at betingelsen er definert ved mengde bakterier. Variasjoner i symbionters påvirkning på vertens fitness er tidligere diskutert av Leung & Poulin (2008) og knyttes til både miljø og mattilgang. Det kan være usikkerhet knyttet til våre målinger fordi det ble gjennomført qPCR på kun ett DNA-isolat pr. prøve. For større sikkerhet i målingene kunne man isolert DNA fra samme lysat flere ganger, utført qPCR og beregnet en snittverdi.

De tyske meitemarkene, som alle var døde eller døende da prøvene ble tatt, hadde større mengde bakterier enn en gruppe som besto av alle prøvene fra de andre geografiske områdene, der prøvene var tatt fra levende mark. Mark som døde i løpet av forsøksperioden hadde ikke høyere bakterieinnhold enn de som overlevde forsøksperioden, men prøvene av disse ble tatt mens de ennå var friske og levende. Resultatene tilsier at mengde bakterier øker etter at meitemarken er død, noe som kan tyde på at det er en fordel for bakterien at meitemarken dør. Dersom dette er tilfelle, er det nok en faktor som styrker teorien om at symbiosen ikke er mutualistisk, men heller parasittisk eller en veksling mellom disse. Man kan også tenke at dersom den reguleringsmekanismen som er beskrevet ovenfor faktisk finnes, så vil den slutte å virke etter at meitemarken er død, og bakterien kan formere seg uhindret. Ingen tidligere undersøkelser som vi har funnet tilsier at *Verminephrobacter* er dødelig for meitemarken.

Våre resultater baserer seg på svært få målinger, og bare én måling pr. individ pr. tidspunkt. Det vil være aktuelt å gjøre tilsvarende målinger over en lengre periode for å fastslå om en reguleringsmekanisme faktisk er virksom. Dersom en slik mekanisme er til stede, kan det tenkes at hvert enkelt meitemarkindivid har sin egen terskel for hvor mye bakterier den kan leve med, og at en mengde høyere enn dette vil være dødelig. Selv om det ikke er forskjell i mengde bakterier hos mark som døde i løpet av forsøksperioden i forhold til mark som overlevde, observerer vi at det individet som hadde absolutt størst mengde bakterier når det levde (C10), døde i løpet av forsøksperioden.

5.4 Tekniske vurderinger

Årsaken til at bakterien ikke er blitt detektert med qPCR kan enten være at bakterien ikke er til stede, at primer eller probe ikke binder til målsekvensen eller andre forsøktekniske problemer. Det er utført qPCR på kun ett DNA-isolat pr. prøve.

Amplifisering av *adk*-genet var problematisk, og bare 29 av 96 prøver gav ett bånd ved gel elektroforese. Mulige årsaker til at man ikke lykkes i å amplifisere et DNA-fragment kan enten være at målsekvensen ikke er til stede (ingen eller lavt antall bakterier i prøven), problemer med primerne eller andre forsøktekniske problemer. qPCR viser at det var mindre bakterier i prøver der amplifisering enten gav uspesifikt produkt eller ikke noe produkt i det hele tatt enn i prøver der amplifiseringen var vellykket. Én av prøvene der qPCR ikke påviste bakterier gav ett spesifikt bånd ved gel elektroforese av

amplifiseringsprodukt. Båndet er svakt og det forekommer primer-dimer i prøven, så dette anses som et artifakt skapt av uspesifikk binding og en tilfeldig amplifisering av et produkt nær forventet lengde. 17 av de andre prøvene der bakterier ikke kan påvises ved hjelp av qPCR gav flere bånd ved gel elektroforese. Vi anser at amplifiseringen også her skyldes uspesifikk binding og tilfeldig amplifisering av diverse fragmenter.

Av de 72 prøvene der bakterier ble påvist med qPCR var det 28 som gav ett bånd ved gel elektroforese ved amplifisering av *adk*-genet hos bakterien. At vi ikke lyktes å amplifisere det aktuelle fragmentet fra alle prøvene som hadde bakterien, kan skyldes et primerproblem. Den målte nukleotidpolymorfismen for det totale antall prøver ($n = 19$) er ikke særlig høyt, 0,025, men tallet baserer seg på en kort sekvens (282 nukleotider) og få sekvenser. Vi har ingen sekvensinformasjon om den spesifikke bakteriearten i *L. terrestris*, og baserte vår primerdesign på en sekvens fra *Verminephrobacter eiseniae*. Vi vet ikke hvor stor diversitet det er mellom *Verminephrobacter* hos de forskjellige meitemarkartene, og det kan være store forskjeller mellom bakterier hos *Eisenia fetida* og *L. terrestris*. Dersom det finnes to eller flere SNPer i området der primerne skal binde, kan dette være årsaken til våre problemer med å amplifisere det ønskede fragmentet.

6. Konklusjon

Våre resultater tyder på at det er fylogeografisk sammenheng hos meitemarkarten *Lumbricus terrestris*, men ikke hos den symbionte bakterien *Verminephrobacter* som lever i nefridiene hos meitemarken. Bakterien var fraværende fra 24 prosent av meitemarkene. Mengde bakterier varierte over tid og bakteriemengden økte etter at marken var død. Coevolusjonen som har funnet sted mellom meitemark og bakterier avspeiler seg ikke på individnivå. Interaksjonen mellom meitemark og bakterier er ikke obligat for meitemarken.

Vi foreslår at interaksjonen mellom meitemark og bakterier kan veksle mellom parasittisme og mutualisme, avhengig av mengde bakterier. Faktorer som kan avgjøre bakteriemengden kan enten være føret eller en reguleringsmekanisme hos meitemarken. Vi oppfordrer til undersøkelser der det blir gjort gjentatte målinger av mengde bakterier over lengre tid, for å fastslå om mengden stadig varierer eller om den stabiliserer seg på et bestemt nivå. Det bør også isoleres DNA flere ganger fra hvert enkelt lysat. Dermed vil man kunne fastslå om hver enkelt meitemark kan ha en øvre terskel for akseptabel mengde bakterier. Vi oppfordrer også til videre undersøkelser av de miljømessige faktorene som kan påvirke fordelingen av individer med og uten bakterier, såsom pH, fuktighet, temperatur og type fôr. Det bør også gjøres forsøk der bakteriefri meitemark får leve sammen meitemark som har bakterien, for å undersøke om bakterien kan overføres horisontalt.

Litteraturliste

- Addison J (2008). Distribution and impacts of invasive earthworms in Canadian forest ecosystems. *Biological invasions, Volume: 11, Issue, 1, 59-79.*
- Avisé JC (2009). Phylogeography : Retrospect and prospect. *Journal of Biogeography, Volume 36, 3-15.*
- Avisé JC (2000). *Phylogeography : the history and formation of species.* Cambridge, Mass. : Harvard University Press.
- Blakemore RJ. (mai, 2006) *British and Irish earthworms - a checklist of species updated from Sims & Gerard (1999).* Lokalisert 1. mai 2009 på [http://bio-eco.eis.ynu.ac.jp/eng/database/earthworm/Britain & Ireland.pdf](http://bio-eco.eis.ynu.ac.jp/eng/database/earthworm/Britain%20&%20Ireland.pdf)
- Boore JL, Brown WM (1995). Complete sequence of the mitochondrial-dna of the annelid worm *lumbricus-terrestris*. *Genetics, Volume: 141, Issue: 1, 305-319.*
- Borodina TA, Lehrach H & Aleksey, Soldatov AV (2003). DNA purification on homemade silica spin-columns. *Analytical Biochemistry 321, 135-137.*
- Bright M, Giere O (2005). Microbial symbiosis in Annelida. *Symbiosis, Volume: 38, Issue: 1, 1-45.*
- Cameron EK, Bayne EM, Coltman DW (2008). Genetic structure of invasive earthworms *Dendrobaena octaedra* in the boreal forest of Alberta: insights into introduction mechanisms. *Molecular ecology, Volume: 17, Issue: 5, 1189-1197.*
- Chang CH, Lin SM, Chen JH (2008). Molecular systematics and phylogeography of the gigantic earthworms of the *Metaphire formosae* species group (Clitellata, Megascolecidae). *Molecular phylogenetics and evolution, Volume: 49, Issue: 3, 958-968.*
- Cracraft J (1974). Continental drift and vertebrate distribution. *Annual Review of Ecology and Systematics. Vol. 5: 215-261*
- Darby AC, Douglas AE (2003). Elucidation of the transmission patterns of an insect-borne bacterium. *Applied and environmental microbiology, Volume: 69, Issue: 8, 4403-4407.*
- Davidson SK, Stahl DA (2005). Transmission of nephridial bacteria of the earthworm *Eisenia fetida*. *Applied and environmental microbiology, Volume: 72, Issue: 1, 769-775.*
- Davidson SK, Stahl DA (2008). Selective recruitment of bacteria during embryogenesis of an earthworm. *ISME journal, Volume: 2, Issue: 5, 510-518.*
- Dieckmann U, Metz JAJ, Sabelis MW, Sigmund K (Red.) (2005). *Adaptive dynamics of infectious diseases: In pursuit of virulence management.* Cambridge: Cambridge University Press.

- Douglas AE (1994). *Symbiotic interactions*. Oxford: Oxford University Press.
- Dupont L (2008). Perspectives on the application of molecular genetics to earthworm ecology. *Pedobiologia, Volume 52, Issue 3*, 191-205.
- Ewald PW (1987) Transmission modes and evolution of the parasitism-mutualism continuum. *Annals of the New York Academy of Sciences, Volume: 503*, 295-306.
- Field SG, Lange M, Schulenburg H, et al. (2007). Genetic diversity and parasite defense in a fragmented urban metapopulation of earthworms. *Animal conservation, Volume: 10, Issue: 2*, 162-175.
- Fierer N, Jackson RB (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Volume: 103, Issue: 3*, 626-631.
- Finlay BJ, Esteban GF, Olmo JL, et al. (1999). Global distribution of free-living microbial species. *Ecography, Volume: 22, Issue: 2*, 138-144.
- Fjeldsø, N. (2004). *Formelsamling for forsøksmetodikk*. Undervisningshefte.
- Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, et al. (2007). Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environmental microbiology Volume: 9, Issue: 5*, 1101-1111.
- Gray ND, Brown A, Nelson DR, et al. (2007). The biogeographical distribution of closely related freshwater sediment bacteria is determined by environmental selection. *ISME journal, Volume: 1, Issue: 7*, 596-605.
- Halliburton R (2004). *Introduction to population genetics*. Pearson Education, Inc. USA.
- Holdsworth AR, Frelich LE, Reich PB. (2007). Effects of Earthworm Invasion on Plant Species Richness in Northern Hardwood Forests. *Conservation Biology, Vol. 21, Issue 4*, 997-1008.
- James SW (2004) Planetary processes and their interactions with earthworm distribution and ecology. I Edwards CA (red.) *Earthworm ecology* (2. utg.) (s.53-62). New York: CRC Press.
- Kautenburger R (2006). Genetic structure among earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) from different sampling sites in western Germany based on random amplified polymorphic DNA. *Pedobiologia, Volume: 50, Issue: 3*, 257-266.
- King RA, Tibble AL, Symondson WOC (2008). Opening a can of worms: unprecedented sympatric cryptic diversity within British lumbricid earthworms. *Molecular ecology, Volume: 17, Issue: 21*, 4684-4698.
- Knop, J. (1926). Bakterien und Bakteroiden bei Oligochäten. *Zeitschrift für Morphologie und Oekologie der Tiere* 6, 588-624.
- König H (2006). Bacillus species in the intestine of termites and other soil invertebrates. *Journal of applied microbiology, Volume: 101, Issue: 3*, 620-627.

- Lentzsch P, Golldack J (2006). Genetic diversity of Aporectodea caliginosa from agricultural sites in Northeast Brandenburg, Germany. *Pedobiologia*, Volume: 50, Issue: 4, 369-376.
- Leung TLF, Poulin R. (2008) Parasitism, commensalism, and mutualism: Exploring the many shades of symbioses. *Vie et milieu - Life and environment*, Volume: 58, Issue: 2, 107-115.
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI (2006a). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, Volume: 124, Issue: 4, 837-848.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI (2006b). Brief Communications. Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022-1023.
- Lozupone CA & Knight R (2006). Global patterns in bacterial diversity. Sist sett 29. mai, 2009 på: <http://www.pnas.org/content/104/27/11436.full?sid=ed63deb5-f06a-4dbe-a897-d09fe8633468>
- Makeschin F (1997) Earthworms (Lumbricidae: Oligochaeta): Important promoters of soil development and soil fertility. I Benckiser G (red.) *Fauna in soil ecosystems: Recycling processes, nutrient fluxes and agricultural production* (s.173-223). New York: Marcel Dekker Inc.
- Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG (red.) (2000). *Biochemistry* (3. utg.) (s. 426-427 og s. 529-530). San Francisco, Calif. : Benjamin/Cummings.
- May RM & Anderson RM (1983) Parasite-host coevolution, I Futuyama DJ & Slatkin M (red.) *Coevolution* (s.186-206). Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- May RM & Anderson RM (1990) Parasite-host coevolution, *Parasitology*, Volume: 100, S89-S101.
- McFall-Ngai M (2008). Are biologists in 'future shock'? Symbiosis integrates biology across domains. *Nature reviews microbiology*, Volume: 6, Issue: 10, 789-792.
- Mitter C & Brooks DR (1983) Phylogenetic aspects of coevolution, I Futuyama DJ & Slatkin M (red.) *Coevolution* (s.186-206). Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Mount DW (2004) *Bioinformatics: Sequence and genome analysis* (2. utg.). Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- NCBI (2009): Sist sett på <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=30189>, 11.03.09.
- Pinel N, Davidson SK, Stahl DA (2008). Verminephrobacter eiseniae gen. nov., sp nov., a nephridial symbiont of the earthworm Eisenia foetida (Savigny). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, Volume: 58, 2147-2157.
- Pommeresche R, Hansen S & Løes A-K (2007). Artsbestemmelse av meitemark. *Bioforsk tema Vol.2 Nr.4*. Tingvoll: Bioforsk Økologisk.
- Rannala & Michalakis (2003). Population genetics and cospeciation: From process to pattern. I Page RDM (red.) *Tangled trees, phylogeny, cospeciation and coevolution*. Chicago og London: The university of Chicago Press.

-
- Rawls JF, Samuel BS, Gordon JI (2004). Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*, Volume: 101, Issue: 13, 4596-4601.
- Reynolds JW (2004) The status of earthworm biogeography, diversity and taxonomy in North America revisited with glimpses into the future. I Edwards CA (red.) *Earthworm ecology* (2. utg.) (s.63-74). New York: CRC Press.
- Ruby EG (2008). Symbiotic conversations are revealed under genetic interrogation. *Nature reviews microbiology*, Volume: 6, Issue: 10, 752-762.
- Rudi K, Ødegård K, Løkken TT og Wilson R (2008). An earthworm host population gut microbiota ecology switch in response to feeding. *Manuskript*.
- Schramm A, Davidson SK, Dodsworth JA, et al. (2003). Acidovorax-like symbionts in the nephridia of earthworms. *Environmental microbiology*, Volume: 5, Issue: 9, 804-809.
- Schwert DP (1990). Oligochaeta: Lumbricidae. I Dinda DL (red.) *Soil biology guide* (s. 341-356). New York: John Wiley & Sons.
- Smith J (2007). A gene's-eye view of symbiont transmission. *American naturalist*, Volume: 170, Issue: 4, 542-550.
- Spector WS, (red.). (1956). *Handbook of biological data*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Store Norske Leksikon (2009). Sist sett 19. mai 2009 på <http://www.sn.no/Canada>.
- Stürzenbaum SR, Andre J, Kille P, et al. (2008) Earthworm genomes, genes and proteins: the (re)discovery of Darwin's worms. *Proceedings of the Royal Society B - biological sciences*. Volume: 276, Issue: 1658, 789-797.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumars S, (2009). Lokalisert 5. juni 2009 på: <http://www.megasoftware.net/>
- Tiunov AV, Hale CM, Holdsworth AR, et al. (2006) Invasion patterns of Lumbricidae into the previously earthworm-free areas of northeastern Europe and the western Great Lakes region of North America. *Biological invasions*, Volume: 8, Issue: 6, 1223-1234.
- Tortora, G.J., Funke, B.R & Case, C.L. (2007) *Microbiology an introduction* (9. utg.). San Francisco: Pearson Education, Inc., Benjamin Cummings.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, Volume: 444, Issue: 7122, 1027-1031.
- Wade MJ (2007). The co-evolutionary genetics of ecological communities. *Nature reviews genetics* Volume: 8, Issue: 3, 185-195.
- Withers PC (1992). *Comparative animal physiology* (s.838-850). Texas: Saunders College Publ.

DNAisolering:

Isolering av DNA med Qiagen blood and tissue kit og isolering med robot (Tabell X) gav store forskjeller i DNAkonsentrasjon, ifølge målinger med NanoDrop. Robotisolering gav tilsynelatende mye salter i prøvene (data ikke vist).

	Prøver totalt	DNA > 20 ng/μL	DNA < 20 ng/μL	DNA > 50 ng/μL	DNA < 50 ng/μL	DNA > 100 ng/μL	DNA < 100 ng/μL
Robot, ufortynnet	48	13	35	5	43	0	48
Robot, fortynnet	73	13	60	2	71	0	37
Kit, fortynnet	22	22	0	21	1	18	4

Prøvene i stabilitetstesten:

Tabell 8: Tabellen viser resultater for stabilitetstesten. mg = vekt på prøven som ble tatt av hvert individ, ng/uL = DNA-konsentrasjon etter isolering. PCR: x = ett bånd på gelen ved gel elektroforese, ~ = flere bånd på gelen, 0 = ingen bånd på gelen. Seq: x = vellykket sekvensering, 0 = mislykket sekvensering.

	mg	ng/uL	ND4	ND4	adk	adk	adk-18S	adk-18S	adk-18S
			PCR	Seq.	PCR	Seq.	1. prøve	2. prøve	3. prøve
C1	60,7	10,28	x	x	x	x	-4,457	-6,999	-5,234
C2	91,0	11,74	x	x	x	x	-5,009	-	-4,887
C6	64,0	17,26	x	x	0	0	-5,366	-	-5,515
C8	93,0	10,91	x	x	~	0	-	-	-
C14	43,0	12,73	x	0	x	x	-5,106	-	-3,791
N3	49,9	8,77	x	x	~	0	-	-	-6,061
N4	59,1	16,73	x	x	x	0	-5,315	-6,651	-4,920
N7	33,5	32,00	x	x	~	0	-	-	-
N10	72,1	13,48	x	x	x	0	-4,895	-	-6,038
N20	44,8	13,65	x	x	~	0	-	-	-
4B5	42,9	12,35	x	x	~	0	-4,980	-4,753	-
4B6	40,2	12,28	x	x	~	0	-5,040	-4,867	-
4B8	38,7	3,63	x	x	~	0	-4,447	-	-5,465
4B12	36,0	5,24	x	x	~	0	-4,907	-	-5,197
4B17	28,3	7,51	x	x	0	0	-4,755	-5,195	-5,128

Alle prøvene i forsøket:

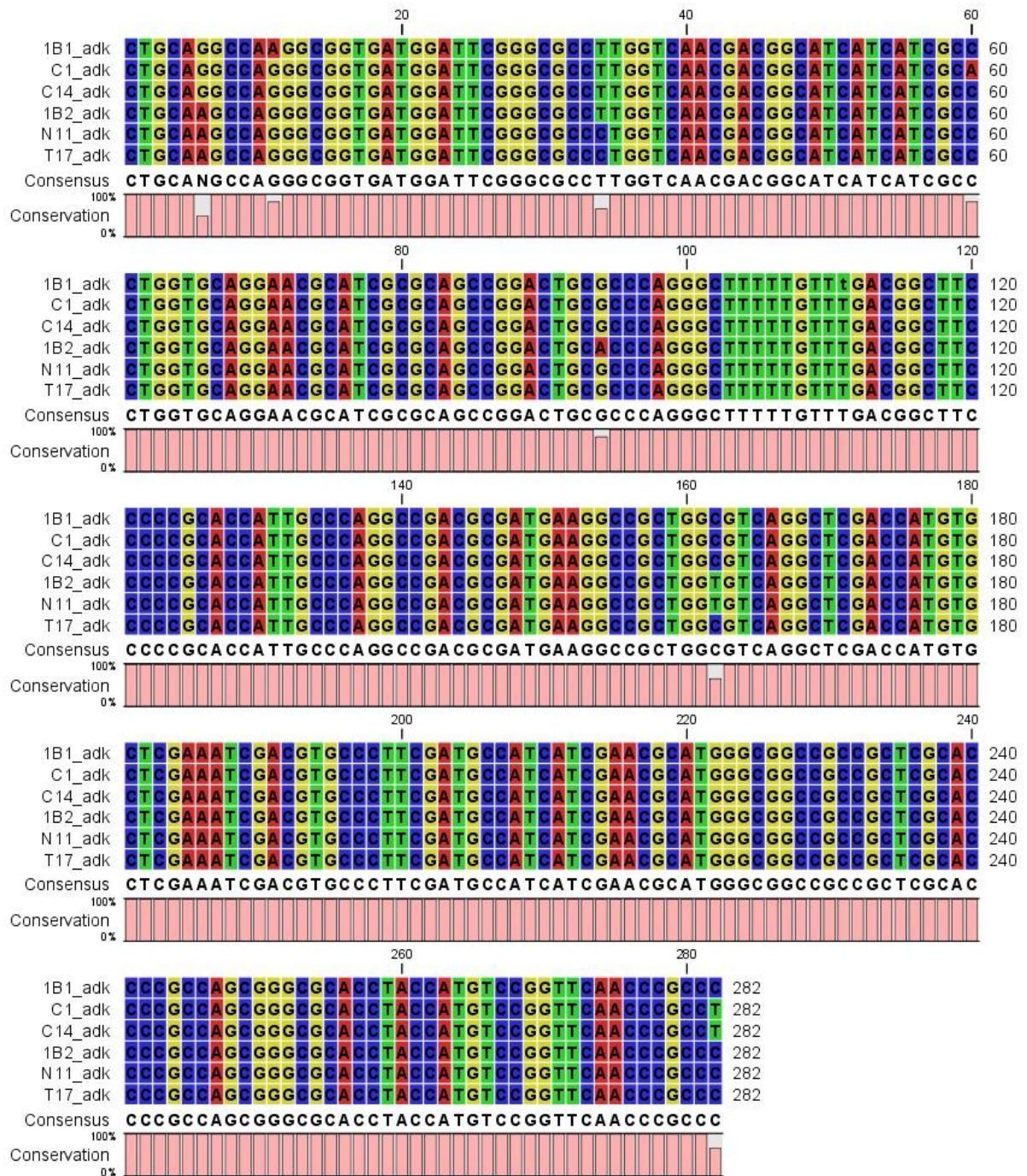
Tabell 9: Tabellen viser logZ for alle individene som var med i forsøkene. mg = vekt på prøven som ble tatt av hvert individ, ng/uL = DNA-konsentrasjon etter isolering. PCR: x = ett bånd på gelen ved gel elektroforese, ~ = flere bånd på gelen, 0 = ingen bånd på gelen.
Seq: x = vellykket sekvensering, 0 = mislykket sekvensering.

Prøve	Levende: x Døde: -	mg	ng/uL	ND4 PCR	ND4 Seq.	adk PCR	adk Seq.	logZ
1B1	-	37,0	14,34	x	x	x	x	-5,59
1B2	-	50,5	9,84	x	x	x	x	-5,89
1B3	x	49,0	137,56	x	x	0	0	-7,10
2B1	-	64,0	25,01	x	x	0	0	-5,79
2B2	x	36,3	19,59	x	x	x	x	-5,61
2B3	-			x	x	0	0	-6,32
3B1	-	107,4	10,34	x	x	0	0	-5,87
3B2	-	83,6	10,24	x	x	0	0	-5,97
3B3	-	81,7	8,87	x	x	0	0	-5,92
3B4	-	65,7	3,61	x	0	0	0	-
4B1	x	64,7	9,61	x	x	x	0	-
4B2	x	61,5	10,00	x	x	~	0	-
4B3	x	50,2	9,71	x	x	~	0	-5,49
4B4	x	47,5	4,56	x	x	~	0	-6,69
4B5	x	42,9	12,35	x	x	~	0	-5,47
4B6	-	40,2	12,28	x	x	~	0	-5,54
4B7	x	39,3	7,73	x	x	~	0	-
4B8	x	38,7	3,63	x	x	~	0	-4,94
4B9	x	37,9	83,69	x		~	0	-
4B10	x	37,3	8,45	x	x	~	0	-
4B11	x	37,2	7,07	x	x	~	0	-5,56
4B12	x	36,0	5,24	x	x	~	0	-5,41
4B13	x	35,5	9,83	x	x	~	0	-5,58
4B14	x	34,9	20,16	x	x	~	0	-6,12
4B15	x	32,1	101,29	x	x	x	0	-5,62
4B16	x	30,7	6,29	x	x	~	0	-6,95
4B17	x	28,3	7,51	x	x	0	0	-5,26
4B18	x	23,0	8,03	x	x	x	0	-5,58
4B19	x	22,5	21,17	x	x	~	0	-
4B20	x	20,0	26,70	x	x	0	0	-6,46
4B21	x	17,9	8,32	0	0	0	0	-

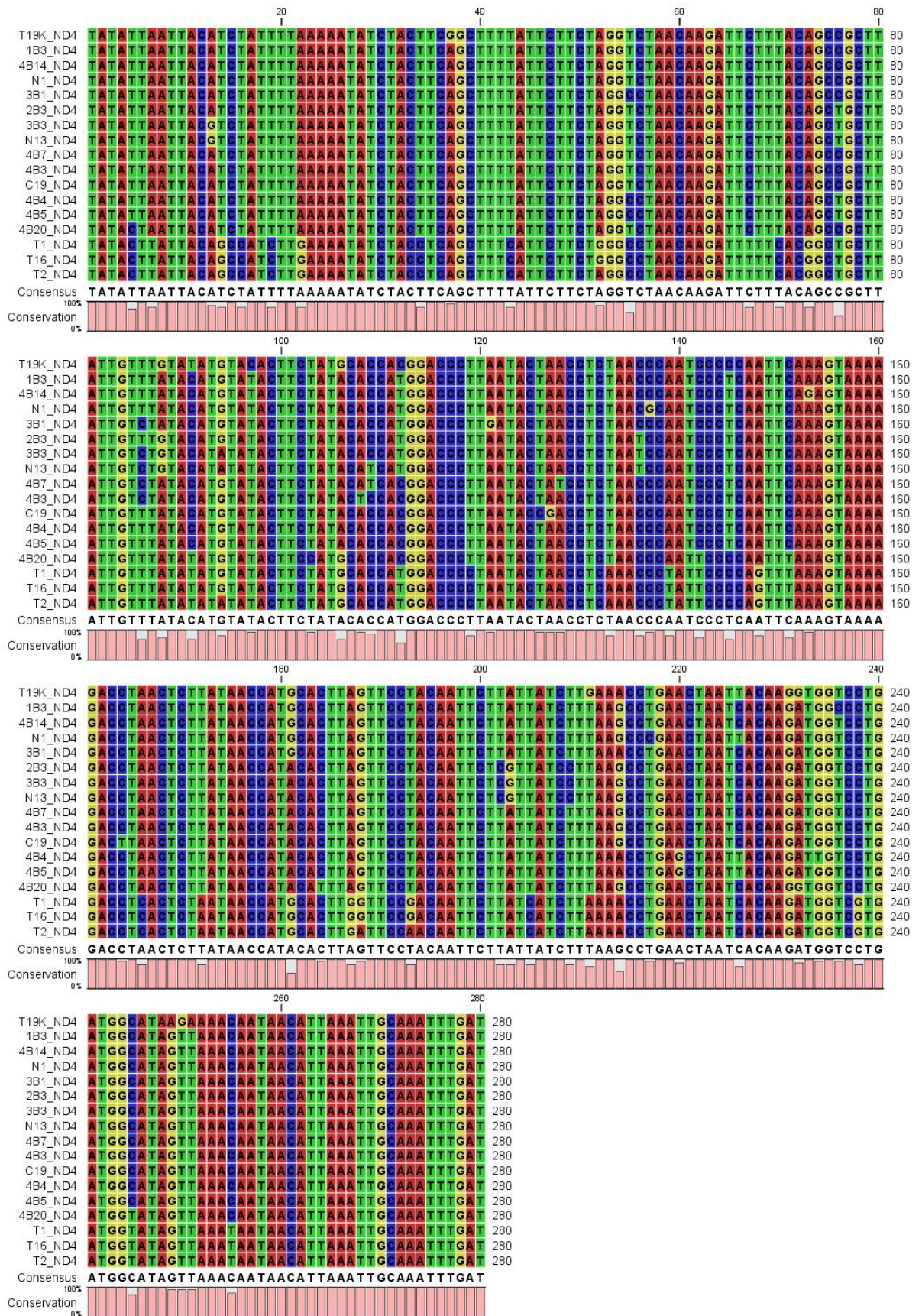
	Levende: x	mg	ng/uL	ND4	ND4	adk	adk	logZ
Prøve	Døde: -			PCR	Seq.	PCR	Seq.	
C1	x	60,7	10,28	x	x	x	x	-4,94
C2	x	91,0	11,74	x	x	x	x	-5,50
C3	x	68,7	14,96	x	x	x	x	-6,04
C4	x	63,2	13,42	x	x	x	x	-6,24
C5	x	129,0	13,96	x	x	0	0	-5,49
C6	x	64,0	17,26	x	x	0	0	-5,85
C7	x	61,0	14,47	x	x	x	x	-5,17
C8	-	93,0	10,91	x	x	~	0	-
C9	x	84,0	11,55	x	x	~	0	-
C10	-	67,0	13,20	x	x	x	x	-0,03
C11	x	95,0	12,51	x	x	x	x	-6,30
C12	x	52,0	13,71	x	x	~	0	-6,20
C13	x	75,0	6,49	x	x	~	0	-6,41
C14	x	43,0	12,73	x	0	x	x	-5,60
C15	x	72,0	9,29	x	x	x	x	-6,14
C16	x	57,0	56,03	x	x	~	0	-6,94
C17	x	72,0	11,71	x	0	~	x	-5,57
C18	x	78,0	26,44	x	x	~	0	-
C19	-	67,0	12,48	x	x	x	x	-7,47
C20	x	81,0	15,46	x	x	0	0	-
C21	x	17,4	144,09	x	x	0	0	-4,7069
C1 F1	x	39,9	224,27	0	0	0	0	-5,67
C4 F1	x	21,5	193,41	x	x	0	0	-8,11
C6 F1	x	34,4	178,65	0	0	0	0	-6,28
C14 F1	x	48,0	155,55	x	x	0	0	-6,04
N1	-	59,8	15,89	x	x	x	0	-6,68
N2	x	43,5	22,44	x	x	~	0	-
N3	x	49,9	8,77	x	x	~	0	-
N4	x	59,1	16,73	x	x	x	0	-5,80
N5	x	28,3	49,74	x	x	~	0	-
N6	x	25,1	78,60	x	x	~	0	-5,80
N7	x	33,5	32,00	x	x	~	0	-
N8	x	38,9	51,41	x	x	~	0	-
N9	-	121,6	35,25	x	0	0	0	-7,21
N10	x	72,1	13,48	x	x	x	0	-5,39
N11	x	45,0	23,09	x	x	x	x	-5,67
N12	x	44,0	10,93	x	x	~	0	-
N13	-	36,8	11,76	x	x	0	0	-7,49
N14	x	46,9	13,70	x	x	~	0	-6,28
N15	x	55,9	94,07	x	x	~	0	-5,41

	Levende: x	mg	ng/uL	ND4	ND4	adk	adk	logZ
Prøve	Døde: -			PCR	Seq.	PCR	Seq.	
N16	x	47,0	10,29	x	x	~	0	-
N17	x	95,7	85,88	x	x	~	0	-5,34
N18	x	51,9	18,98	x	x	0	0	2,37
N19	-	49,8	23,90	x	x	~	0	-
N20	x	44,8	13,65	x	x	~	0	-
T1	-	88,7		x	x	~	0	-5,78
T2	-	159,3	74,73	x	x	x	x	-5,24
T3	-	92,5	19,36	x	x	0	0	-
T4	-	70,1	18,04	x	x	x	x	-5,52
T5	-	140,7		0	0	0	0	-
T6	-	60,0	11,04	x	x	~	0	-5,51
T7	-	74,0	16,96	x	x	~	0	-6,03
T8	-	134,0	49,55	x	0	~	0	-5,07
T9	-	163,0	12,19	x	0	x	x	-5,44
T10	-	95,0	13,75	x	0	~	0	-4,76
T11	-	128,0	9,84	0	0	0	0	-5,27
T12	-	73,0	7,78	x	0	x	0	-5,52
T13	-	70,0	9,84	x	0	x	x	-6,10
T14	-	86,0	4,32	x	x	~	0	-5,60
T15	-	102,0	4,98	x	x	~	0	-5,61
T16	-	97,0		x	x	~	0	-5,29
T17	-	60,0		x	x	x	x	-0,01
T18	-	86,4	8,57	x	x	x	x	-4,68
T19	-	61,4	7,56	0	x	x	0	-4,48
T20	-	97,8	10,27	x	x	x	x	-4,66

Alignment:



Illustrasjon 2: Alignment av fragment på 282 nukleotider fra individer som representerer de seks flytotypene vi fant av *adk*-genet.



Illustrasjon 3: Alignment av fragment på 280 nukleotider fra individer som representerer de 17 fylotypene vi fant av ND4-genet.