

**Partenogeneettisen lajin evoluutiomahdollisuudet – uusia havaintoja
suopursukempiltä, *Cacopsylla ledi*, (Flor 1861) (Hemiptera,
Sternorrhyncha, Psylloidea)**

Peppi Pietarinen

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto
Biologian laitos

*Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti
tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck-järjestelmällä*

TURUN YLIOPISTO
Biologian laitos
Luonnontieteiden ja tekniikan tiedekunta

PIETARINEN, PEPPI: Partenogeneettisen lajin evoluutiomahdollisuudet – uusia havaintoja suopursukempiltä, *Cacopsylla ledi*, (Flor 1861) (Hemiptera, Sternorrhyncha, Psylloidea)

Pro gradu -tutkielma, 33 s. 3 liites.

Genetiikka

Syyskuu 2019

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

Suopursukemppejä (*Cacopsylla ledi*, (Flor 1861)) tavataan pohjoisella pallonpuoliskolla aina Fennoskandiasta Alaskaan. Ne lisääntyvät obligatorisella partenogeneesillä. Tarkemmin ottaen kempit lisääntyvät telytokisesti, eli naaraat tuottavat naarasyksilöitä hedelmöittymättömistä munasoluista. Telytokisten lajien populaatioissa voi esiintyä naaraiden ohella niin kutsuttuja harvinaisia koiraita, joita on löydetty myös suopursukemppien populaatioista. Harvinaiset koiraat voivat olla funktionaalisia, eli ne tuottavat normaaleja toimivia gameetteja, tai ei-funktionaalisia, jolloin niiden gameetit ovat toimimattomia. Suopursukempillä harvinaisten koiraiden lisäksi samaisista populaatioista on löydetty myös harvinaisia diploideja naaraita triploidien partenogeneettisesti lisääntyvien naaraiden ohella. Partenogeneettistä lisääntymistä on pidetty pitkään evolutiivisena umpikujana, sillä syntyvät jälkeläiset ovat emonsa kloonaja. Biseksuaalisen lisääntymisen on todettu antavan lajille suuremman evolutiivisen potentiaalin rekombinaation myötä. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, voisivatko partenogeneettisissä populaatioissa esiintyä harvinaiset funktionaaliset koiraat ja harvinaiset diploidit naaraat lisääntyä keskenään. Tutkimuksen aineistona käytettiin Varinai-Suomesta Lammenrahkalta ja Laustinrahkalta sekä Lapista Sevettijärveltä kerättyjä naaraita ja koiraita. Naaraiden ploidiataso määritettiin sytologisesti, minkä jälkeen niille tehtiin haplotyyppianalyysi. Haplotyyppianalyysissä sekvensoitiin 638 nukleotidin pituinen mitokondriaalinen *COI* -geenialue. Sevettijärven populaation todettiin olevan partenogeneettinen. Lammenrahkan ja Laustinrahkan populaatioista puolestaan löydettiin funktionaalisia koiraita ja diploideja naaraita, jotka edustivat kokonaan omaa haplotyyppiään, mistä voitiin päätellä, että näissä kahdessa populaatiossa esiintyi aitoa biseksuaalista lisääntymistä partenogeneettisen lisääntymisen rinnalla. Kyseessä ovat ensimmäiset partenogeneettisen lajin luonnosta löydetyt populaatiot, joissa biseksuaalinen lisääntyminen on voitu todentaa kromosomianalyysin ja *COI*-haplotyyppianalyysin avulla. Lammenrahkan populaatiossa biseksuaalinen lisääntyminen on lähes syrjäyttänyt partenogeneettisen lisääntymisen, mitä ilmeisimmin paremman sopeutumiskykynsä ansiosta. Partenogeneettisten naaraiden tuottamat harvinaiset funktionaaliset koiraat ja diploidit naaraat antavat lajille mahdollisuuden kehittyä joko uudeksi partenogeneettiseksi, tai jopa biseksuaaliseksi lajiksi.

Asiasanat: Suopursukemppi, *Cacopsylla ledi*, partenogeneesi, triploidia, diploidia, harvinaiset koiraat, biseksuaalinen lisääntyminen, evoluutio

SISÄLLYS

1. JOHDANTO	1
1.1. PARTENOGENEESI	1
1.2. AUTOMIKTIA	3
1.2.1. <i>ARTEMIA PARTHENOGENETICA</i>	3
1.2.2. SAMMALPUNKIT	6
1.3. APOMIKTIA: PARTENOGENEESI KEMPEILLÄ (HEMIPTERA, PSYLLOIDEA).....	7
1.3.1. MUSTIKKAKEMPPI <i>CACOPSYLLA MYRTILLI</i>	7
1.3.2. SUOPURSUKEMPPI <i>CACOPSYLLA LEDI</i>	8
1.4. TUTKIMUKSEN TARKOITUS	9
2. AINEISTO JA MENETELMÄT	10
2.1 AINEISTO	10
2.2 MENETELMÄT	10
2.2.1. KROMOSOMIANALYYSIT	10
2.2.2 DNA:N ERISTYS, PCR JA SEKVENSOINTI.....	12
2.2.3. TILASTOLLISET TESTIT	14
3. TULOKSET	15
3.1 KROMOSOMIANALYYSIT	15
3.1.1 NAARAAT	15
3.1.2. KOIRAAT	17
3.1.2.1 FUNKTIONAALISET KOIRAAT	17
3.1.2.2 EI-FUNKTIONAALISET KOIRAAT	18
3.2 <i>COI</i> -HAPLOTYYPPIANALYYSIT	19
3.3. KOIRAIDEN PARITTELU DIPLOIDIEN JA TRIPLOIDIEN NAARAIDEN KANSSA	20
3.4. KOIRAIDEN JA NAARAIDEN LUKUSUHTEET POPULAATIOITTAIN	21
4. TULOSTEN TARKASTELU	22
4.1. SUOPURSUKEMPPIPOPULAATIOISSA ESIINTYY BISEKSUAALISTA LISÄÄNTYMISTÄ	22
4.2. HARVINAISET KOIRAAT	24
4.3. HARVINAISTEN KOIRAIDEN JA DIPLOIDIN NAARAIDEN EVOLUTIIVINEN MERKITYS	25
4.4. JATKOTUTKIMUKSET	27
5. KIITOKSET	28
6. LÄHTEET	29
7. LIITTEET	34

1. Johdanto

1.1. Partenogeneesi

Eliökunnan lisääntymistyytit jakautuvat kahteen päähaaraan; seksuaaliseen ja aseksuaaliseen. Seksuaalinen lisääntyminen tapahtuu sukusolujen eli gameettien avulla. Gameetit ovat yleensä haploideja, eli niissä on yksinkertainen peruskromosomisto. Biseksuaalisessa lisääntymisessä tuotetaan kahta erilaista, naaras- ja koiraspuolista, gameettityyppiä. Eläimillä naaras- ja koiraspuolisia gameetteja tuottavat useimmiten erillisiä sukupuolia edustavat yksilöt, naaraat ja koiraat. Kun kaksi erilaista gameettia yhtyy hedelmöityksessä, syntyy diploidi tsygootti, jolla on kaksinkertainen peruskromosomisto. Aseksuaalinen lisääntyminen tapahtuu ilman sukusoluja, ja siinä syntyvät jälkeläiset ovat perimältään identtisiä emonsa kanssa, mutaatioita lukuun ottamatta. Aseksuaalista lisääntymistä on esimerkiksi bakteereilla ja hiivoilla tavattava kuroutuminen, sekä kasveilla tavattavan rönnyilyn välityksellä tapahtuva lisääntyminen.

Eräs seksuaalisen lisääntymisen erikoistyypeistä on partenogeneesi, joka on uniseksuaalista lisääntymistä ja jossa uusi yksilö kehittyy hedelmöitymättömästä munasolusta. Näin saksalainen von Siebold (1856) määritteli partenogeenin ensimmäisen kerran. Partenogeneesi on verrattain yleinen lisääntymistapa eläinkunnassa, ja sitä tavataan aina onteloeläimistä (Coelenterata) selkärangkaisiin (Vertebrata) (White 1973; Suomalainen ym. 1987). Partenogeeniä on tutkittu laajasti muun muassa sammalpunkeilla (Acari, Oribatida) (Heethoff ym. 2007), suolalehtijalkaisilla (*Artemia* -suvun edustajat) (Maccari ym. 2014; Nougé ym. 2015; Chang ym. 2016) ja kemppeillä (Hemiptera, Psylloidea) (Nokkala ym. 2008; Nokkala ym. 2013; Nokkala ym. 2015).

Telytokiaksi kutsutaan partenogeenin muotoa, jossa hedelmöitymättömästä munasolusta kehittyy vain naarasyksilöitä. Telytokia voi olla joko automiktistä tai apomiktistä. Automiktiassa munasolu käy läpi normaalin meioosin, jonka jälkeen kaksi meioosin haploideista lopputuotteista yhtyy muodostaen diploidin tsygootin. Apomiktiassa meioosin tilalla on puolestaan muuntunut mitoosi. Automiktiaa kutsutaan myös nimellä meioottinen partenogeneesi, ja apomiktiaa nimellä ameioottinen partenogeneesi. (Suomalainen ym. 1987). Apomiktiseen partenogeneesiin liittyy hyvin usein polyploidia (Suomalainen ym. 1987).

Partenogeneesi voidaan luokitella myös obligatoriseksi tai fakultatiiviseksi. Obligatorisessa partenogeneesissä naaraat lisääntyvät vain partenogeneettisesti eivätkä kykene tuottamaan biseksuaalisesti lisääntyviä jälkeläisiä lainkaan. Fakultatiivisessa partenogeneesissä puolestaan sekä partenogeneesi että biseksuaalinen lisääntyminen ovat mahdollisia samassa populaatiossa, ja lisääntymisen eri muodot vaihtelevat usein sukupolvittain. Tyypillinen esimerkki fakultatiivisesta partenogeneesistä on kirvoilla tavattava syklinen partenogeneesi (Normark 2003).

Obligatorisessa partenogeneesissä kaikki jälkeläiset ovat emonsa klooneja. Kuitenkin useiden obligatorisella partenogeneesillä lisääntyvien eläinlajien populaatioista on löydetty harvalukuisena myös niin sanottuja harvinaisia koiraita (engl. spanandric males, rare males) (Blackman 1972; Palmer & Norton 1990; Butlin ym. 1998; Martens 1998; Rispe ym. 1999; Simon ym. 1999; Delmotte ym. 2001; Snyder ym. 2006; Domes 2007; Engelstädter ym. 2011; Maccari ym. 2013a). Harvinaiset koiraat voivat tuottaa normaaleja haploideja gameetteja, jolloin koiraat ovat funktionaalisia. Meioosi voi myös olla virheellinen, tai tuotetut gameetit aneuploideja, jolloin koiraat ovat ei-funktionaalisia. Normaaleissa, luonnossa esiintyvissä populaatioissa meioosi on kovan valintapaineen alla, minkä seurauksena kaikki mutaatiot, jotka häiritsevät meioosia, poistuvat nopeasti populaatioista (Nokkala ym. 2013). Poikkeuksen tekevät telytokiset partenogeneettiset populaatiot, joissa esiintyy säännöllisesti harvinaisia koiraita, jotka voivat olla ei-funktionaalisia (Lynch 1984; Palmer & Norton 1990).

Partenogeneesi on kehittynyt biseksuaalisesta lisääntymisestä (Suomalainen ym. 1987). Muutos hedelmöitymistä edellyttävästä lisääntymisestä partenogeneesiin edellyttää, että naaraalla kehitty munia, joissa yksilönkehitys alkaa ilman hedelmöitymistä (Seiler 1961; Seiler 1963). Erään teorian mukaan siirtyminen biseksuaalisesta lisääntymisestä partenogeneesiin johtaa ensin automiktiaan, joka voi edelleen kehittyä apomiktiaksi. Ploidiataso kasvaa, kun lähilajien koiraat hedelmöittävät diploidin munasolun (Suomalainen 1950; White 1973; Saura ym. 1993). Toisen teorian mukaan triploidia, apomiktia ja partenogeneesiin siirtyminen biseksuaalisesta lisääntymisestä voisi tapahtua jo yhdessä hybridisukupolvessa (Saura ym. 1993). Korkeammat ploidiatasot voisivat olla seurausta mitoottisista häiriöistä tai myöhemmästä hybridisaatiosta. Molempien teorioiden mukaan siirtyminen biseksuaalisesta lisääntymisestä partenogeneesiin olisi peruuttamatonta (Bell 1982; Suomalainen ym. 1987; Kearney 2006). Partenogeneesiä pidetään tämän vuoksi usein evolutiivisena umpikujana, ja partenogeneettisiä taksoneita evolutiivisesti lyhytikäisinä (Hurst & Peck 1996; Butlin 2002; Normark ym. 2003).

Sekä biseksuaalisesti että partenogeneettisesti lisääntyvien lajien eri lisääntymismuotojen erilaista maantieteellistä esiintymistä kutsutaan maantieteelliseksi partenogeneesiksi. Partenogeneettisesti lisääntyvien lajien on todettu esiintyvän haastavammissa olosuhteissa (pohjoisempana, korkeammalla esim. vuorella tai tunturilla, aavikoilla tai muilla marginaalisilla elinalueilla) kuin lähilajien biseksuaalisesti lisääntyvät edustajat (Vandel 1928; Kearney 2005). Tämän vuoksi Euroopassa jääkausien jälkeen jään vetäytyttyä partenogeneettiset lajit tai niiden muodot ovat levittäytyneet pohjoiseen ensimmäisenä (Vandel 1928).

1.2. Automiktia

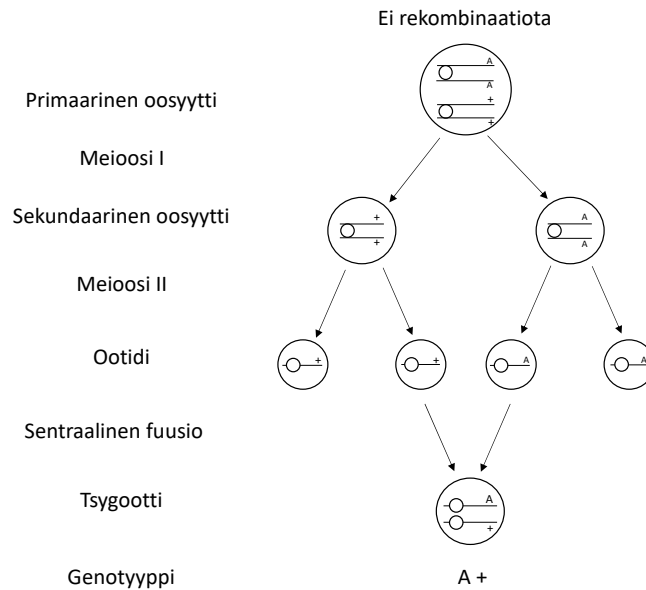
1.2.1. *Artemia parthenogenetica*

Automiktian tunnetuimpia tutkimuskohteita on *Artemia parthenogenetica* -suolalehtijalkainen (Maccari ym. 2014; Nougé ym. 2015; Chang ym. 2016). *Artemia*-suvun jäsenet ovat alkeellisia äyriäisiä, jotka elävät hyvin suolaisessa vedessä ja lisääntyvät sekä biseksuaalisesti että partenogeneettisesti. Kaikki biseksuaalisesti lisääntyvät suolalehtijalkaiset ovat diploideja, mutta partenogeneettisesti lisääntyvät suolalehtijalkaiset voivat olla diploideja, triploideja, tetraploideja tai pentaploideja. Kaikki nämä muodot on yhdistetty taksoniin *A. parthenogenetica* (Sun ym. 1999; Abatzopoulos ym. 2002; Abatzopoulos ym. 2003; Saygı 2004).

Nougén (2015) mukaan diploidin *A. parthenogenetica* -lajin lisääntymistapa on automiktinen partenogeneesi. Automiktiassa diploidia palautuu, kun kaksi meioosin tuloksena syntyneestä neljästä haploidista solusta fuusioituu. Se, tapahtuuko fuusio meioosin ensimmäisen vai toisen jaon jakolinjojen eri puolella olevien solujen välillä, määrittää, kutsutaanko fuusiota sentraaliseksi tai terminaaliseksi. Kuvassa 1 on esitetty sentraalinen fuusio, jossa ei tapahdu rekombinaatiota.

Yleisesti kiasman muodostuksesta voidaan todeta, että se voi muodostua lähelle sentromeeriä, käsivarren keskivaiheille tai miltei käsivarren päähän. Lähelle sentromeeriä muodostuvaa kiasmaa kutsutaan proksimaaliseksi, käsivarren keskivaiheille muodostuvaa kiasmaa mediaaliseksi, ja miltei käsivarren päähän sijoittuvaa distaaliseksi kiasmaksi. Kiasman muodostumiskohta voi olla täysin sattumanvarainen, tai se voi olla lokalisoitu, jolloin kiasma muodostuu aina tiettyyn kohtaan kromosomia bivalentissa, joko lähelle sentromeeriä tai lähelle telomeeriä.

Muodostumisen sattumanvaraisuus voidaan todeta esimerkiksi sytologisista preparaateista.



Kuva 1. Sentraalinen fuusio. Fuusion myötä muodostunut tsygootti on heterotsygootti A+, jos rekombinaatiota ei tapahdu sentromeerin ja lokuksen A välillä.

Sentraalisen ja terminaalisen fuusion pääerona on, että sentraalisessa fuusiossa, jossa rekombinaatiota ei tapahdu, syntyy heterotsygootti lopputuote (A+), jos vastinkromosomeissa on eroja. Terminaalisisessa fuusiossa, jossa ei tapahdu rekombinaatiota, syntyy vastaavassa tilanteessa puolestaan homotsygootti lopputuote (AA tai ++). Molemmissa fuusioissa voi tapahtua myös rekombinaatiota, jolloin terminaalisen fuusion lopputuote voi olla heterotsygootti, ja sentraalisen fuusion lopputuote voi olla joko homo- tai heterotsygootti. Täten sentraalista ja terminaalista fuusiota on käytetty selittämään myös eri sukupuolten lukusuhteita populaatioissa (Nougué ym. 2015).

Lajista riippuen naaraat voivat olla joko homogameettisia XX tai heterogameettisia WZ. Esimerkiksi ihmisellä nainen on sukupuolikromosomien suhteen homotsygootti (XX) ja mies heterotsygootti (XY). *A. parthenogenetica* -suolalehtijalkaisella naaraat ovat heterogameettisia, eli niiden genotyyppi on WZ. Populaatioissa esiintyy myös harvinaisena koiraita, jotka puolestaan ovat homogameettisia, eli genotyypiltään ZZ (Bowen 1963 ja 1965; De Vos ym. 2013). Biseksuaalisesti lisääntyvillä suolalehtijalkaisilla sukupuolien lukusuhte on 1:1, kun taas lajin partenogeneettisillä muodoilla naarassukupuoli hallitsee vahvasti populaatioita (Chang ym. 2016).

Sentraalinen fuusio, johon liittyy vain vähäinen sukupuolta määrävän lokuksen rekombinaatio, ylläpitää maternaalisen heterotsygotian sentromeerin ja crossing-over -kohdan välillä (Pearcy ym. 2006). Korkean maternaalisen heterotsygotia-asteen seurauksena koiraita tuotetaan vain vähäinen määrä, mikä puolestaan selittää, miksi harvinaisten koiraiden frekvenssin on havaittu vaihtelevan 0-1,7 %:n välillä (Maccari ym. 2013a; Nougé ym. 2015). *A. parthenogenetica* -suolalehtijalkaisella on päätelty tapahtuvan rekombinaatiota sen perusteella, että kyseisellä suolalehtijalkaisella on huomattavasti suurempi geneettinen diversiteetti kuin olisi, jos jälkeläiset olisivat vain vanhempiensa klooneja. Geneettinen diversiteetti on myös suurempi kuin apomiktisella tetraploidilla suolalehtijalkaisella (Abreu-Grobois & Beardmore 1982).

Stefani (1960) tutki *A. parthenogenetica* -suolalehtijalkaisen sytologiaa ja havaitsi, että meioosin ensimmäinen jako alkoi normaalisti, mutta ensimmäisessä anafaasissa tumasukkula purkautui keskeltä ja kaksi sukkulan puolikasta muodosti yhdessä uuden metafaasitason. Tämän jälkeen meioosin toinen jako tapahtui normaalisti. Ensimmäinen jako siis keskeytyi puolessa välissä, mikä vastaa sentraalista fuusiota (Asher 1970). Diploidilta *A. parthenogenetica* -suolalehtijalkaiselta on kuitenkin löydetty yllä kuvatun lisäksi ainakin kolmen eri tyyppin automiktiaa (Barigozzi 1944).

Stefani (1964) selitti harvinaisten koiraiden esiintymistä siten, että *A. parthenogenetica* -suolalehtijalkaisella tapahtuisi sentraalisen fuusion lisäksi alhaisella frekvenssillä terminaalista fuusiota. Terminaalisen fuusion seurauksena heterotsygotia vähenisi merkittävästi, joten harvinaisten koiraiden pitäisi olla vähemmän heterotsygoottisia kuin äitiensä. Väittämä kumottiin, kun Abreu-Grobois & Beardmore (2001) sekä Maccari ym. (2013b) totesivat, että harvinaiset koiraat eivät ole vähemmän heterotsygoottisia kuin äitinsä. Harvinaisia koiraita ei siis tuoteta terminaalisen fuusion kautta (Nougé ym. 2015).

Abreu-Grobois & Beardmore (2001) esittivät hypoteesin siitä, että sentraalinen fuusio, johon liittyy vähäinen rekombinaatio, voisi selittää harvinaisten koiraiden synnyn. Jos sukupuolen määrittävä lokus on lähellä sentromeeriä, pysyy se heterotsygoottisena useimmissa tapauksissa. Tällöin syntyy pääasiassa naarasjälkeläisiä. Crossing-overin seurauksena sukupuolen määrittävä lokus saattaa kuitenkin rekombinoitua, jonka seurauksena tuotetaan homotsygoottisia koiraita (genotyyppi ZZ).

Hypoteesia tukevat Changin ym. (2016) havainnot siitä, ettei yhdestäkään heidän tutkimastaan *A. parthenogenetica* -suolalehtijalkaisen polyploidisesta populaatiosta löytynyt harvinaisia koiraita. Tästä päätellen vain diploidit automiktiset naaraat tuottavat

harvinaisia koiraita, sillä vain niillä voi esiintyä sentraalista fuusiota. Täten polyploidiset apomiktiset suolalehtijalkaisnaaraat eivät voi tuottaa koiraita.

A. parthenogenetica -suolalehtijalkaisen harvinaiset koiraat ovat funktionaalisia (Chang ym. 2016). Funktionaaliset koiraat voisivat lisääntyä biseksuaalisesti lisääntyvien lähilajin naaraiden kanssa ja tuottaa partenogeneettisesti lisääntyviä jälkeläisiä (Bowen ym. 1978; Gao 1995; Maccari ym. 2013a; Maccari ym. 2014). Ilmiötä on kutsuttu perinnölliseksi partenogeneesiksi (engl. contagious parthenogenesis). Perinnöllinen partenogeneesi on myös pystytty demonstroimaan laboratorio-olosuhteissa vesikirpuilla (Innes & Hebert 1988), kirvoilla (Blackman 1972) ja suolalehtijalkaisella (Maccari ym. 2014). Suolalehtijalkaisen perinnöllistä partenogeneesiä on perusteltu partenogeneesiä indusoivalla haplotyypillä, jota koiraat levittäisivät paritellessaan (Maccari ym. 2014).

1.2.2. Sammalpunkit

Toinen automiktian tunnetuista tutkimuskohteista ovat sammalpunkit (Acari, Oribatida), joka on sekalainen noin 10 000 lajin ryhmä. Sammalpunkit elävät pääasiassa maaperässä, mutta myös puissa ja akvaattisissa oloissa eläviä punkkeja on tavattu (Heethoff 2009). Kuten *Artemia*-suolalehtijalkaiset, osa sammalpunkeista lisääntyy partenogeneettisesti ja automiktisesti, mutta niillä diploidian palautumisen on ehdotettu tapahtuvan terminaalisen fuusion kautta. Sammalpunkkien kromosomit ovat holosentrisiä eli niissä ei ole lokalisoitua sentromeerialuetta.

Terminaalisella fuusiolla tuotettavien jälkeläisten tulisi olla osin homotsygootteja (Wrensch ym. 1994). Palmer ja Norton (1992) kuitenkin osoittivat, että sammalpunkeilta löytyy runsaasti pysyvää heterotsygotiaa, eikä lainkaan rekombinaatiota. He ehdottivat tämän takia, että sammalpunkeilla olisikin automiktisen terminaalisen fuusion sijasta joko automiktinen sentraalinen fuusio, tai jopa apomiktinen partenogeneesi. Wrensch (1994) puolestaan esitti, että sammalpunkeilla olisi käänteinen meioosi, jonka niiden holosentriset kromosomit mahdollistaisivat, ja joka selittäisi pysyvän heterotsygotian.

Sammalpunkeilla esiintyy suolalehtijalkaisten tapaan harvinaisia koiraita. Käänteinen meioosi ei kuitenkaan selitä, miten harvinaisia koiraita voisi syntyä. Toistaiseksi sammalpunkeilta ei tunneta myöskään sukupuolikromosomeja, eikä ole täyttä varmuutta, onko niillä naaras- vai koiraspuolinen heterogametia. Tämän selvittäminen edellyttää lisätutkimuksia (Heethoff 2009).

Kahdella sammalpunkkilajilla, *Trhrypochthonius tectorum* (Berlese 1896) ja *Platynoethrus peltifer* (Koch 1839) (Acari, Oribatida, Desmonomata), koiraan meioosi oli normaali, mutta spermogeneesi puuttui täysin. Tämän seurauksena koiraat tuottivat vain vähän spermatoforeja (engl. spermatophore), jolloin naaraat jättivät ne huomiotta (Taberly 1988). Sammalpunkkien harvinaiset koiraat eivät tämän perusteella ole funktionaalisia.

Domes ym. (2007) ovat tutkineet sammalpunkkien molekyylyfylogeniaa ja todenneet, että biseksuaalisesta kantamuodosta on kehittynyt uusia biseksuaalisia tai partenogeneettisiä lajeja. Fylogeniasta selviää myös, että partenogeneettisestä kantamuodosta voi kehittyä paitsi uusi partenogeneettinen laji, myös uusi biseksuaalinen laji. Ilmiön taustalla oleva mekanismi on tuntematon, eikä esimerkiksi tiedetä, ovatko harvinaiset koiraat osallistuneet uuden biseksuaalisen lajin syntyyn.

1.3. Apomiktia: Partenogeneesi kempeillä (Hemiptera, Psylloidea)

Apomiktialla tarkoitetaan partenogeneesin muotoa, jossa meioosin on korvannut muuntunut mitoosi (Suomalainen ym. 1987) ja kromosomiluku säilyy diploidina tai polyploidina koko ovogeneesin ajan. Apomiktiaa tavataan mm. Orthoptera- ja Hemiptera-hyönteislahkoissa, kuten *Cacopsylla*-suvun kemppilajeilla. (White 1973; Suomalainen ym. 1987; Nokkala ym. 2008).

Ainakin kahdesta kemppisuvusta, *Cacopsylla* (Ossiannilsson 1975) ja *Trioza* (Foerster 1848), on löytynyt populaatioita, joissa kaikki yksilöt ovat naaraita, minkä perusteella lajien on ajateltu olevan telytokisella partenogeneesillä lisääntyviä. Tällaisia lajeja ovat *C. ledi* (Flor 1861), *C. rara* (Tuthill 1944), *C. myrtilli* (Wagner 1947), *C. myrtilli* ssp. *canadensis* (Hodkinson 1972), *T. pletschi* (Tuthill 1944) ja *T. abdominalis* (Flor 1861) (Hodkinson 1976; Hodkinson 1978; Gegechkori 1985; Ossiannilsson 1992).

1.3.1. Mustikkakemppi *Cacopsylla myrtilli*

Hodkinson (1983) on tutkinut tarkemmin mustikkakemppiä Etelä-Norjasta puurajan yläpuolelta peräisin olevasta populaatiosta. Hän raportoi populaatiossa esiintyvän runsaasti koiraita ja esitti tämän perusteella, että lisääntyminen olisi biseksuaalista. Hodkinson ja Bird (2006) tutkivat mustikkakemppiä pohjois-Ruotsissa, ja löysivät sieltäkin koiraita puurajan yläpuolelta. Myöhemmin havaittiin kuitenkin sytologisesti (Nokkala ym. 2008), että tutkitut naaraat olivat triploideja ($3n = 39$ ($36 + XXX$)) ja

apomiktisiä. Ne lisääntyivät populaatiossa partenogeneettisesti riippumatta siitä, onko populaatiossa läsnä koiraita vai ei. Tämä herätti kysymyksen siitä, mitä Hodkinsonin (1983; Hodkinson & Bird 2006) löytämät koiraat itse asiassa olivat. Olivatko myös naaraat näissä populaatioissa diploideja?

Myöhemmin on havaittu, että Hodkinsonin (1983) sekä Hodkinson ja Birdin (2006) tutkimissa populaatioissa partenogeneettiset naaraat ovat triploideja (Nokkala ym. 2015) ja koiraat ei-funktionaalisia harvinaisia koiraita (Nokkala ym. 2013). Nämä koiraat tuottavat diploideja siittiöitä, sillä niiltä puuttuvat kiasmat meioosissa. Yllättävää on, että sytologinen tutkimus paljasti populaatiosta triploidien naaraiden lisäksi myös diploideja naaraita (Nokkala ym. 2015). Diploidien naaraiden frekvenssi populaatiossa vastasi harvinaisten koiraiden frekvenssiä. Koska populaation koiraat tuottivat diploideja siittiöitä, ne eivät voineet tuottaa diploideja yksilöitä diploidien naaraiden kanssa. Koiraat eivät myöskään paritelleet valikoivasti diploidien naaraiden kanssa, vaan ne parittelivat yhtä usein myös triploidien naaraiden kanssa (Nokkala ym. 2015). Partenogeneesi oli siis diploideista yksilöistä huolimatta obligatorinen lisääntymistapa. Kaikilla kolmella, triploidi naaras, diploidi naaras ja koiras, oli sama *COI*-haplotyyppi. Diploidit siis syntyivät populaatioon jokaisessa sukupolvessa palautumina triploidiasta. Mekanismi, jolla palautuminen tapahtuu, on toistaiseksi tuntematon. Mekanismin tulee olla sellainen, että sekä diploideja naaraita että harvinaisia koiraita syntyy yhtä paljon.

Mustikkakempiltä tunnetaan myös sellaisia harvinaisia koiraita, joilla on normaali meioosi. Nämä koiraat ovat siis funktionaalisia (Nokkala ym. 2013). Koiraita on tavattu alhaisella frekvenssillä populaatioista, jotka on kerätty luoteis-Venäjältä ja Pohjois-Suomesta. Koiraiden *COI*-haplotyyppi eroaa selvästi ei-funktionaalisten koiraiden haplotyyppistä. Myös näissä populaatioissa esiintyy triploidien naaraiden ohella diploideja naaraita, joilla on normaali ovogeneesi. Nokkala ym. (2013) esittävät, että mikäli funktionaalisten koiraiden ja diploidien naaraiden frekvenssi nousisi riittävän korkeaksi, voisivat nämä pariutua keskenään. Pariutuminen voisi suotuisissa olosuhteissa johtaa uuden diploidin biseksuaalisen lajin syntymiseen. Samoin voitaisiin selittää Domesin ym. (2007) havainto sammalpunkkien biseksuaalisen lajin syntymisestä partenogeneettisestä alkumuodosta.

1.3.2. Suopursukemppi *Cacopsylla ledi*

Holarktinen suopursukemppi elää suopursulla (*Ledum palustre*, Linnaeus 1753), ja sitä tavataan ainakin Fennoskandiassa, Baltiassa, Puolassa, Saksassa, Venäjällä,

Japanissa ja Alaskassa (Ossiannilsson 1992). Laji lisääntyy partenogeneettisesti, ja siltä on löydetty populaatioita, joissa esiintyy harvinaisia koiraita (Nokkala ym. 2017). Koiraiden frekvenssi vaihtelee tyypillisesti 0 - 12 %:n välillä. Koiraiden kromosomiluku on $2n = 25 (24 + X)$, joka vastaa aidosti biseksuaalisen kemppilajin kromosomilukua (Kuznetsova ym. 1997; Nokkala ym. 2017). Kemppikoirilla on tyypillisesti kaksi testikulaarista follikkelia testiksissä (Kuznetsova ym. 2012), mutta suopursukemppikoirilla testiksissä on neljä testikulaarista follikkelia (Nokkala ym. 2017).

Suopursukemppipopulaatioista löydettiin naaraita, joilla näkyi kypsissä munissa metafaasissa 39 univalenttia kromosomia. Naaraat olivat siis triploideja. Kyseisten naaraiden todettiin lisääntyvän apomiktisella partenogeneesillä. Suopursukemppipopulaatiosta löydettiin myös naaraita, joilla oli haploidi määrä bivalentteja. Nämä naaraat olivat siis diploideja, ja niillä oli normaali meioosi. Suopursukemppinaarilla yhdessä bivalentissa oli tyypillisesti vain yksi terminaalinen tai submediaalinen kiasma. Diploidien naaraiden frekvenssi vaihteli 2,7- 30 %:n välillä. (Nokkala ym. 2017). Havainnot osoittivat, että suopursukemppi lisääntyy hyvin samankaltaisesti kuin lähilajinsa mustikkakemppi (Nokkala ym. 2015; Nokkala ym. 2017).

1.4. Tutkimuksen tarkoitus

Tähän mennessä tutkituissa suopursukemppipopulaatioissa harvinaisten koiraiden frekvenssin on havaittu olevan korkeintaan 10 %:n luokkaa (Nokkala ym. 2017). Tätä tutkimusta varten kerätyissä populaatioissa yhden populaation koirasfrekvenssi oli edelleen samaa luokkaa kuin aiemmin tutkituissa populaatioissa, joissa esiintyy harvinaisia koiraita. Kerättyjen populaatioiden joukossa oli kuitenkin kaksi populaatiota, joissa koirasfrekvenssi oli moninkertainen muihin verrattuna.

Tutkimuksen tarkoituksena on selvittää, mistä korkeat koirasfrekvenssit johtuvat ja miten ne heijastuvat populaation erilaisten naaraiden frekvensseihin. Onko mahdollisesti kyse biseksuaalisesta lisääntymisestä joko pelkästään tai rinnakkain partenogeneettisen lisääntymisen kanssa? Tutkimuksessa pyritään selvittämään myös, voidaanko partenogeneettinen ja biseksuaalinen lisääntyminen tunnistaa populaation sisällä haplotyyppianalyysin avulla. Jos osoittautuu, että kyseessä on biseksuaalinen lisääntyminen, pyritään selvittämään myös sen alkuperää. Biseksuaalinen lisääntyminen

on voinut syntyä täällä pohjoisessa partenogeneettisestä muodosta, tai se on jääkauden jälkeen kulkeutunut tänne yhdessä partenogeneettisen suopursukempin kanssa.

2. Aineisto ja menetelmät

2.1 Aineisto

Tutkimusaineisto koostui Sevettijärveltä, Laustinrahkalta ja Lammenrahkalta kerätyistä *Cacopsylla ledi* (Flor 1861) -populaationäytteistä (Taulukko 1).

Taulukko 1. *Cacopsylla ledi* -näytteiden keräyspaikat, yksilömäärät, koiraiden osuus populaatioissa sekä keräyspäivämäärät.

Populaatio	Koordinaatit	Naaraita	Koiraita	Koirasfrekvenssi (%)	Keräyspäivämäärä
Inari, Sevettijärvi	69°12'58"N 27°52'14"E	160	10	5,9	17.8.2017
Eura, Laustinrahka	60°53'23"N 22°08'48"E	85	13	13,3	24.8.2018
Pöytyä, Lammenrahka	60°44'37"N 22°25'32"E	182	107	37,0	22.8.2018

2.2 Menetelmät

2.2.1. Kromosomianalyysit

Tutkimuksen ensimmäisessä vaiheessa populaatioista määritettiin diploidien ja triploidien naaraiden osuus valmistamalla naaraista sytologiset preparaattit. Preparaatit valmisteltiin värjäystä varten Nokkalan ym. (2008) esittämällä tavalla. Osa naaraista oli säilötty siten, että niiden pää ja keskiruumis oli etanolissa, ja takaruumis 3:1 (metanoli:etikkahappo) -fiksatiivissa. Yksilön takaruumis oli säilötty fiksatiivissa, jotta siitä saatiin valmistettua sytologiset preparaattit, ja pää sekä keskiruumis alkoholissa, jotta samaisesta yksilöstä saatiin tehtyä myös haplotyyppianalyysi. Sytologisten preparaattien valmistus naaraiden takaruumiista aloitettiin siten, että takaruumis siirrettiin ensin pienelle petrimaljalle, jossa oli samaa 3:1 -fiksatiivia. Sitten takaruumista

avattiin osittain petrimaljalla käyttämällä apuna teroitettuja volframineuloja, jonka jälkeen takaruumis siirrettiin objektilasille pisaraan 45 % etikkahappoa.

Etikkahappopisarassa takaruumis avattiin kokonaan, ja sieltä otettiin yhdestä kolmeen kypsää munaa. Samalla tarkistettiin, oliko siittiösäiliössä (engl. spermatheca) spermaa. Sperman löytyminen siittiösäiliöstä oli merkki siitä, että naaras oli paritellut. Loput takaruumiista poistettiin, ja objektilasille jätettiin vain kypsät munat, jotka katkaistiin neulojen avulla. Vararavinnon muututtua läpikuultavaksi etikkahappopisaran päälle asetettiin peitinlasi. Peitinlasin annettiin laskeutua noin 5 min, jonka jälkeen preparaattia puristettiin kevyesti suodatinpaperin välissä. Puristuksen jälkeen preparaatti siirrettiin hiilihappojälle vähintään 20 minuutiksi.

Peitinlasit poistettiin skalpellilla, ja preparaattit siirrettiin 3:1 (etanoli:etikkahappo) -fiksatiiviin 20 minuutiksi. Tämän jälkeen preparaattit otettiin pois fiksatiivista, ja niitä kuivattiin puhaltimella vähintään 20 min. Kuivia preparaatteja säilytettiin lämpökaapissa 37 °C:ssa vähintään yön yli ennen värjäystä.

Alkoholiin säilötyihin naaraisiin sovellettiin uutta, tätä tutkimusta varten modifioitua jälkifiksointi-menetelmää. Naaraista irrotettiin takaruumis, joka siirrettiin 3:1 (metanoli:etikkahappo) -fiksatiivia sisältävään eppendorffputkeen. Putkia säilytettiin jääkaapissa +4 °C:ssa yön yli. Seuraavana päivänä takaruumiista valmistettiin sytologinen preparaatti yllä kuvatun mukaisesti kuten edellisenä kesänä kerätyistä näytteistä. Yli vuoden alkoholissa säilytetyistä näytteistä saatiin hyviä preparaatteja, kun preparaatin valmistuksessa käytettiin 50 % propionihappoa 45 % etikkahapon tilalla.

Preparaattien värjäys toteutettiin Grozevan ja Nokkalan (1996) esittämällä menetelmällä. Värjäys aloitettiin inkuboimalla preparaatteja huoneenlämpöisessä 1 N HCl-liuoksessa 25 min, jonka jälkeen niitä hydrolysoitiin 60 °C:ssa 1 N HCl-liuoksessa 6 min. Hydrolysoinnista lasit siirrettiin Schiffin reagenssiin (liite 1) värjäytymään 20 minuutiksi, jonka jälkeen ne huuhdeltiin tislattulla vedellä niin monta kertaa, ettei punaista väriä enää irronnut. Seuraavaksi laseja inkuboitiin ensin Sørensenin fosfaattipuskurissa (pH 6.8) (liite 2) 5 min ja värjättiin em. puskuriin valmistetulla 4 % Giemsa-väriliuoksella (liite 3) 20 min. Giemsa-värjäyksen jälkeen lasit huuhdeltiin tislattulla vedellä ja ilmakeivattiin 20 min. Kuivauksen jälkeen näytteet peitettiin Entellaniin (liite 4).

Sytologisia preparaatteja valmistettiin myös tutkittavista koiraista. Valmistukseen sovellettiin Nokkalan ym. (2013) julkaisussa esittämää menetelmää. Koirat oli säilöty

kokonaisuena alkoholissa, joten niitä täytyi ensin jälkifiksoida yön yli 3:1 (metanoli:etikkahappo) -fiksatiivissa. Preparaatit valmistettiin testiksistä 50 % etikkahapossa. Testiksistä poistettiin kypsät siittiökimput ennen peitinlasin laittoa. Peitinlasi poistettiin hiilihappojään avulla, jonka jälkeen preparaatit siirrettiin 3:1 (etanoli:etikkahappo) -fiksatiiviin 20 minuutiksi ja ilmakeivattiin. Kuivia preparaatteja säilytettiin lämpökaapissa 37 °C:ssa. Värjäys toteutettiin samalla menetelmällä kuin naarailla, mutta värjäyksen kestoa muutettiin hieman. Preparaatteja värjättiin hydrolyysin jälkeen Schiffin reagenssilla 25 min, ja 5% Giemsaalla 30 min.

Valmiit preparaatit kuvattiin Nikon Eclipse Ci -mikroskooppiin liitetyllä MQA 18000 DS-Fi3-kameralla käyttäen NIS Elements -ohjelmaa. Kuvat viimeisteltiin tutkielmaa varten Corel Photo-Paint X5 -ohjelmalla.

2.2.2 DNA:n eristys, PCR ja sekvensointi

Kun sytologisesti oli määritetty, onko naaras triploidi vai diploidi, ko. yksilön etanolissa säilytetyistä osista (pää ja kesiruumis) eristettiin DNA mitokondriaalisen *sytokromioksidaasi alayksikkö I (COI)* -geenialueen monistamista ja sekvensointia varten (Nokkala ym. 2015). DNA:n eristys tehtiin Qiagenin DNeasy™ Blood & Tissue Kit:in ohjeita mukaillen. Etanolissa säilytetyjen kempin osien annettiin kuivua ensin noin tunti huoneenlämmössä 1,5 ml:n eppendorfputkessa, jonka jälkeen putkiin lisättiin 90 µl ATL-puskuria. Kempit murskattiin mikrosurvimella, ja sitten putkiin lisättiin toiset 90 µl ATL-puskuria sekä 20 µl proteinaasi K:ta. Näytteet vorteksoitiin ja laitettiin yöksi inkuboitumaan lämpökaappiin 55 °C:een. Näytteitä vorteksoitiin muutaman kerran inkuboinnin aikana.

Seuraavana päivänä näytteet otettiin lämpökaapista huoneenlämpöön, ja niitä vorteksoitiin kutakin 15 s. Putkiin lisättiin 200 µl AL-puskuria, ja sekoitettiin jälleen vorteksoimalla. Tämän jälkeen lisättiin 200 µl 96 % etanolia, ja sekoitettiin jälleen vorteksoimalla. Seos pipetoitiin DNeasy-minipylvääseen, joka oli asetettu keräysputkeen. Näytteitä sentrifugoitiin 8 000 RPM:ssä 1 min. Tämän jälkeen DNeasy-minipylväs siirrettiin uuteen keräysputkeen, ja vanha keräysputki sekä siinä ollut neste heitettiin pois. Pylvääseen lisättiin 500 µl AW1-puskuria, ja näytteitä sentrifugoitiin jälleen 8 000 RPM:ssä 1 min. Pylväs siirrettiin taas uuteen keräysputkeen, ja vanha keräysputki sekä siinä ollut neste heitettiin pois. Pylvääseen lisättiin 500 µl AW2-puskuria, ja näytteitä sentrifugoitiin 13 200 RPM:ssä 3 min, jotta DNeasy-membraani kuivui. Pylväs siirrettiin puhtaaseen 1,5 ml:n eppendorfputkeen, ja vanha keräysputki sekä siinä ollut neste

heitettiin pois. DNA:n eluomiseksi DNeasy-membraanille pipetoitiin 25 µl ddH₂O:ta, ja näytteitä sentrifugoitiin 8 000 RPM:ssä 1 min. Tämän jälkeen membraanille pipetoitiin uudestaan 25 µl ddH₂O:ta, ja sentrifugoitiin jälleen 1 min 8 000 RPM:ssä. DNeasy-minipylväs heitettiin pois, ja eristetty DNA säilytettiin eppendorfputkessa.

Eristettyä DNA:ta puhdistettiin ja konsentroidiin lisäämällä putkiin 4 µl 3 M NaCl:ia ja 400 µl jääkylmää 96 % etanolia. Näytteiden annettiin saostua yön yli -20 °C:ssa. Seuraavana päivänä näytteitä sentrifugoitiin puoli tuntia 4 °C:ssa, jonka jälkeen supernatanttia poistettiin imulla siten, että sitä jäi putken pohjalle noin 50 µl. Sitten putkiin lisättiin 400 µl jääkylmää 70 % etanolia, jonka jälkeen näytteitä sentrifugoitiin uudestaan 4 °C:ssa 30 min. Jälleen supernatanttia poistettiin imulla siten, että jäljelle jäi noin 50 µl. Tämän jälkeen näytteet siirrettiin Eppendorf Concentrator Plus -haihduttimeen, jossa jäljelle jäänyt etanoli haihdutettiin vakuumissa 45 °C:ssa 35 min. Haihdutuksen jälkeen putkissa oli jäljellä vain puhdistettu DNA, joka liuotettiin 15 µl:aan ddH₂O:ta. DNA:n konsentraatio mitattiin NanoDrop2000 -spektrofotometrillä. Eristetty DNA säilytettiin -20 °C:ssa.

Eristetystä DNA:sta monistettiin n. 700 emäsparin mittainen alue *COI*-geenistä PCR-reaktiolla. Alukkeina käytettiin *Cacopsylla*-lajeille spesifisiä alukkeita HybCacoCO 5'-T7Promoter(F)-CTAACCATAARACTATTGGAAC-3' (forward), ja HybHCOMOD 5'-T3-TAAACTTCAGGGTGACAAAAAATCA-3' (reverse) (Nokkala ym. 2015; Nokkala ym. 2017). PCR-reaktiot tehtiin 20 µl:n reaktiilavuudessa, reaktion komponentit sekä niiden määrät ja pitoisuudet on esitetty taulukossa 2. Spesifisiin alukkeisiin liitetyt osat T/Promoter ja T3 ovat oligonukleotideja, joita käytetään yleisesti universaaleina sekvensointialukkeina kaupallisissa sekvensointipalveluissa.

Taulukko 2. *COI*-geenialueen monistamisessa käytetty PCR-reaktioseos.

<i>Ainesosa</i>	<i>Määrä (µl)</i>
ddH ₂ O	15,4
10X DyNAzyme Buffer (valmis seos sis. 1,5 mM MgCl ₂)	2,0
dNTP-seos (10 mM jokainen)	0,4
Aluke FOR (10 pmol / µl)	0,5
Aluke REV (10 pmol / µl)	0,5
DyNAzyme II DNA polymeraasi (2 U / µl)	0,2
Templaatti-DNA [30-50 ng / µl]	1,0

PCR-reaktio tehtiin AB2720-PCR-koneessa. PCR-ohjelma aloitettiin alkudenaturaatiolla (95 °C, 5 min), jonka jälkeen toistettiin 40 kertaa denaturaatio- (95°C, 30 s), annealing- (50°C, 30 s) ja ekstensiovaiheet (72°C, 90 s). Ohjelma lopetettiin 10 minuutin loppuekstensioon 72°C:ssa, jonka jälkeen näytteitä säilytettiin 4°C:ssa.

PCR-reaktion onnistuminen varmistettiin agarosigeelielektroforeesilla. Geelinä käytettiin 0,8 % agarosigeeliä, johon oli lisätty 0,005 % Midori Green Advance -merkkiainetta. Geeli valmistettiin 50 ml:aan 1xTBE-puskuria. Molekyylipainomarkkerina käytettiin New England Biolabsin 100 bp markkeria. Molekyylipainomarkkeri ja näytteet ladattiin kaivoihin, ja geelin annettiin ajautua 50 min 80 V:n jännitteellä. Tämän jälkeen geeli kuvattiin GelDocEZ Imager -laitteella (BioRad).

Kun PCR-reaktion onnistuminen oli varmistettu, PCR-tuotteet puhdistettiin mukaillen Qiagenin QIAquick® PCR Purification Kit:in ohjeita. PCR-reaktioon lisättiin 100 µl PB-puskuria ja sekoitettiin vorteksoimalla. Tämän jälkeen näyte pipetoitiin QIAquick-pylvääseen, joka oli asetettu keräysputkeen, ja sentrifugoitiin 13 000 RPM:ssä 1 min. Keräysputkessa ollut neste heitettiin tämän jälkeen pois, ja pylväs asetettiin takaisin samaan keräysputkeen. Pylvääseen lisättiin 750 µl PE-puskuria, ja sentrifugoitiin jälleen 13 000 RPM:ssä 1 min. Keräysputkessa ollut neste heitettiin pois, ja pylväs asetettiin takaisin samaan keräysputkeen. Tämän jälkeen sentrifugoitiin uudestaan 13 000 RPM:ssä 1 min, jotta kaikki puskurin sisältämä etanoli poistuisi. Pylväs siirrettiin puhtaaseen 1,5 ml:n eppendorfputkeen, ja tuotteen eluoimiseksi membraanille pipetoitiin 33 µl ddH₂O:ta. Näytteitä sentrifugoitiin jälleen 13 000 RPM:ssä 1 min, jonka jälkeen QIAquick-pylväs heitettiin pois. Puhdistettu PCR-tuote säilytettiin -20 °C:ssa. Osa puhdistetusta PCR-tuotteesta lähetettiin sekvensoitavaksi MacroGen-sekvensointipalveluun Hollantiin. Palvelusta saatu sekvenssi käsiteltiin tutkielmaa varten BioEdit-ohjelmalla (Hall 1999).

2.2.3. Tilastolliset testit

Diploidien naaraiden ja harvinaisten koiraiden esiintymistä verrattiin populaatioittain Fisherin nelikenttättestillä. Fisherin nelikenttättestillä testattiin myös, erottivatko koiraat diploidit ja triploidit naarat toisistaan, vai parittelivatko koiraat naaraiden kanssa sattumanvaraisesti.

3. Tulokset

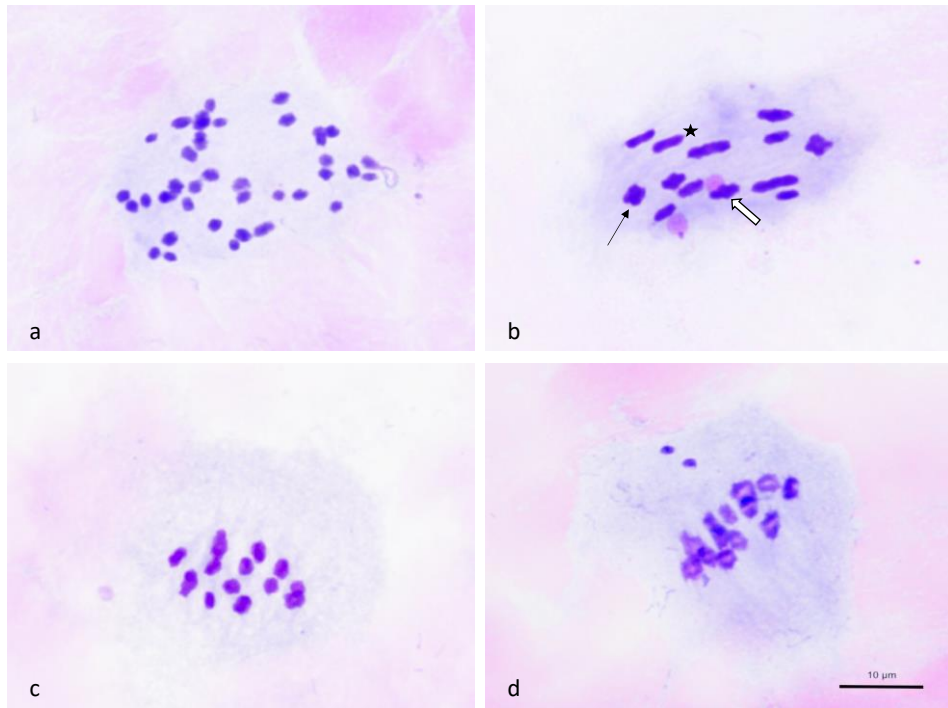
3.1 Kromosomianalyysit

3.1.1 Naaraat

Hyönteisillä ovogeneesin tutkimista vaikeuttaa lähes kypsissä ja täysin kypsissä munissa olevan vararavinnon suuri määrä. Toisaalta tutkimista helpottaa se seikka, että ovarioissa olevissa munissa meioosi pysähtyy ensimmäiseen metafasiin ja jatkuu siitä vasta, kun muna munitaan. Edellä kuvatuilla menetelmillä voidaan kohdemateriaalina käyttää joko fiksoituja tai alkoholiin säilöttyjä naaraita. Koska partenogeneettisessä populaatiossa voi esiintyä naaraita, joilla on erilainen ploidiataso, on olennaisen tärkeää määrittää naaraiden kromosomistot ennen *COI*-haplotyyppimäärittystä.

Triploideilta naarailta löytyi kypsistä munista prometafaasi, jossa oli 39 univalenttia kromosomia, $3n = 36 + XXX$ (Kuva 1 a). Itse asiassa näillä naarailta meioosin tilalla oli muuntunut mitoosi. Triploidien naaraiden voitiin siis todeta olevan apomiktisiä.

Diploideilla naarailta oli normaali ovogeneesi ja ensimmäisessä metafasiin oli 13 bivalenttia ($n = 12 + X$, Kuva 1 b-d). Kuvasta 1 b näkyy, että jokaisessa bivalentissa on yksi kiasma, joka voi olla keskellä vastinkromosomeja (bivalentti ristimäinen), hyvin lähellä telomeeriä (bivalentti sauvamainen) tai jossain näiden välillä (bivalentissa lyhyt sivuosa). Havainto merkitsee sitä, että kiasma ei ole lokalisoitunut vaan kiasma voi muodostua kromosomin pituussuunnassa vapaasti. Kuvassa 1 d on diploidi naaraan metafasi, jossa näkyy bivalenttien ohella kaksi univalenttia niin sanottua ylilukuista kromosomia eli B-kromosomia lähellä toista poolia.



Kuva 1 a-d. Naaraan ovogeenesi. (a) Triploidin naaraan prometafaasi ($3n = 36 + XXX$). (b) Diploidin naaraan prometafaasi ($2n = 12 + XX$). (c) Diploidin naaraan metafafaasi ($2n = 12 + XX$). (d) Diploidin naaraan metafafaasi, jossa bivalenttien lisäksi kaksi univalenttia B-kromosomia ($2n = 12 + XX + B + B$). Kuviin on merkitty bivalentti, jossa on terminaalinen kiasma (tähti), bivalentti, jossa on mediaalinen kiasma (musta nuoli) ja bivalentti, jossa on subterminaalinen kiasma (valkoinen nuoli).

Sevettijärven populaation 40 tutkitusta naaraasta selvä enemmistö eli 36 naarasta oli triploideja ja vain 4 diploideja (Taulukko 3). Havaittu diploidien naaraiden osuus vastaa hyvin ($P > 0,05$) populaatiosta kerättyjen koiraiden osuutta (Taulukko 1). Tilanne oli aivan erilainen Laustinrahkan ja Lammenrahkan populaatioissa. Laustinrahkan populaatiossa naaraista selvä enemmistö eli 59,5 % oli diploideja. Lammenrahkan populaatiossa vieläkin suurempi osa naaraista, eli 97,7 % oli diploideja (Taulukko 3).

Taulukko 3. Triploidien ja diploidien naaraiden esiintyminen Sevettijärven, Laustinrahkan ja Lammenrahkan populaatioissa.

Populaatio	Naaraat yht.	Triploidit	Triploidifrekvenssi (%)	Diploidit	Diploidifrekvenssi (%)
Inari, Sevettijärvi	40	36	90,0	4	10,0
Eura, Laustinrahka	37	15	40,5	22	59,5
Pöytyä, Lammenrahka	43	1	2,33	42	97,7

3.1.2. Koiraat

Vaikka koiraita on kuvattu useista partenogeneettisistä taksoneista, on koiraiden meioosia tutkittu yllättävän vähän. Kuitenkin tutkimalla koiraan meioosi, voidaan hyvin helposti saada selville, onko meioosi normaali, ja onko kyseinen koira funktionaalinen vai ei-funktionaalinen. Molemmat koirastyypit löytyivät tutkittavista populaatioista.

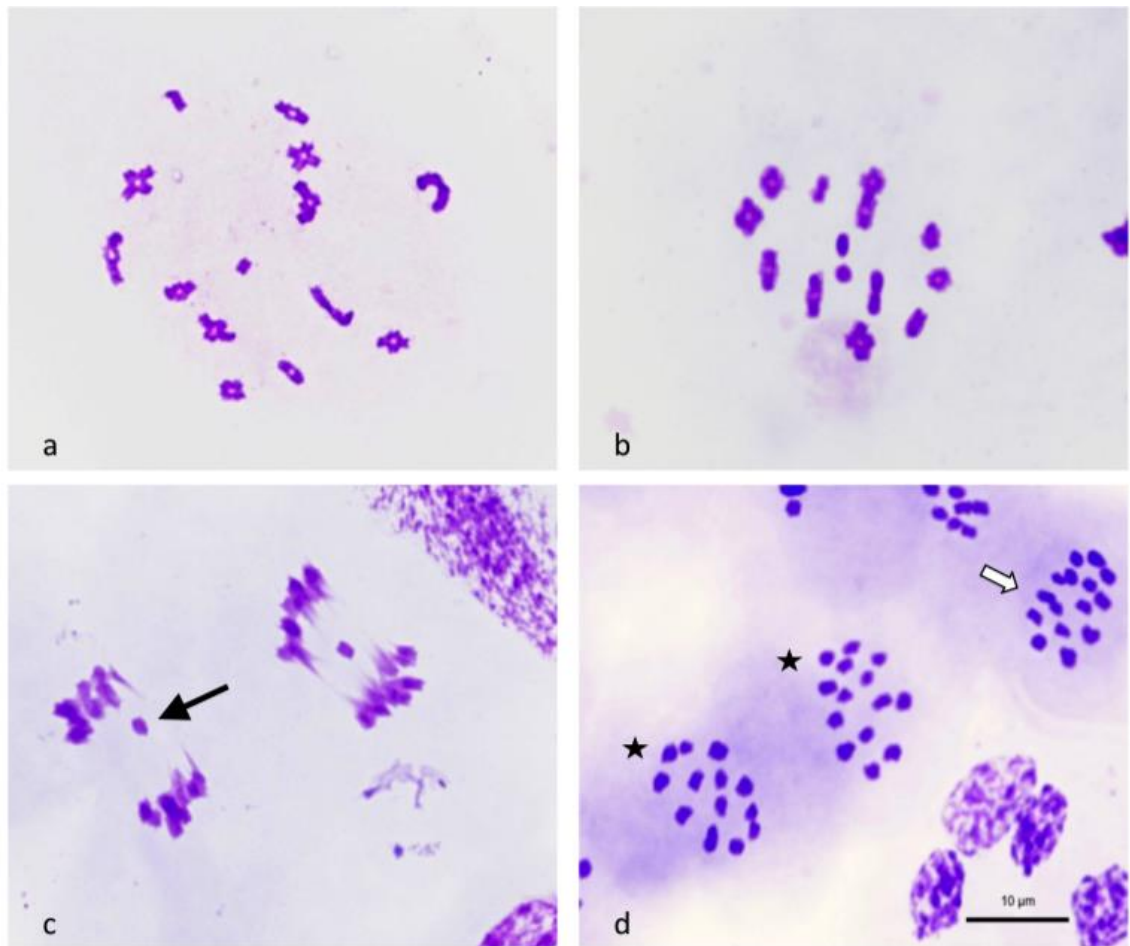
3.1.2.1 Funktionaaliset koiraat

Sevettijärven, Laustinrahkan ja pääosin Lammenrahkan koirilla meioosi ja siittiöiden muodostuminen oli samanlaista (Kuva 2 a-d).

Kuvassa 2 a on esitetty myöhäisen diploteenivaiheen solu, josta on nähtävissä 12 bivalenttia ja kaksi univalenttia. Toinen näistä univalenteista on X-kromosomi ja toinen B-kromosomi. Kuten naarailla, kiasma voi sijaita keskellä vastinkromosomeja, jolloin bivalentit ovat ristimäisiä, tai lähellä telomeerejä, jolloin bivalentit näyttävät sauvamaisilta. Kiasma voi myös sijaita jossain näiden välissä. Tästä päätellen kiasma ei ole lokalisoitu myöskään koirilla, vaan voi muodostua vapaasti koko kromosomin alueella.

Kuvassa 2 b on esitetty ensimmäisen metafasisin solu, josta on nähtävissä 12 bivalenttia ja univalentti X-kromosomi sekä B-kromosomi. Puolibivalentit eroavat toisistaan ensimmäisessä anafasissa (Kuva 2 c). Tyypillisesti univalentti X-kromosomi jää tässä vaiheessa jälkeen anafasiryhmistä jakotason lähelle ns. laggardiksi. Jos solussa olisi B-kromosomi, niin se jäisi tässä vaiheessa X-kromosomin lähelle. Univalentit liikkuvat pooliin vasta telofasissa.

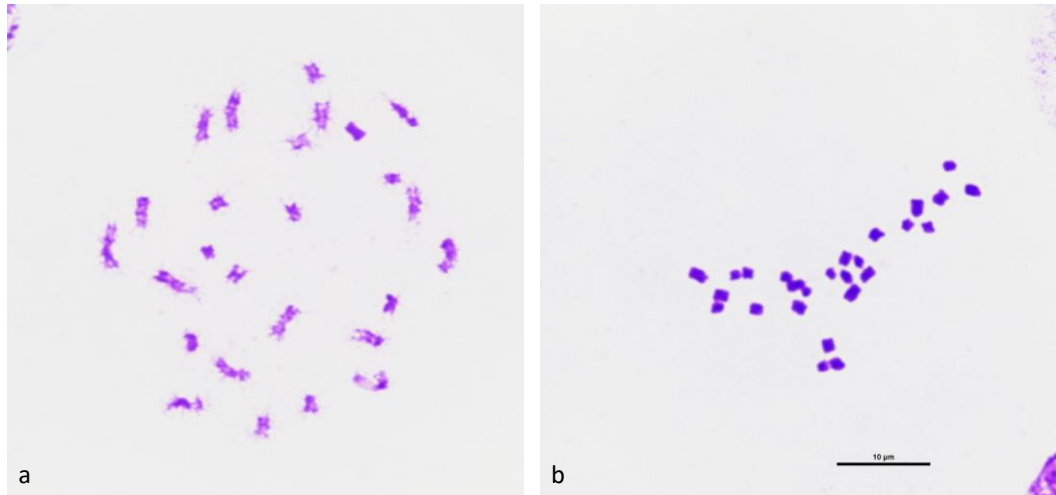
Kuvassa 2 d toisen metafasisin ensimmäisessä jaossa eronneet kromosomit asettuvat jakotasoon. Jos solussa on X-kromosomi, on metafasissa 13 kromosomia. Solussa, josta X-kromosomi puuttuu, on metafasissa vain 12 kromosomia. Muut kromosomiluvut johtuvat B-kromosomeista. Kuvassa 2 d näkyy kaksi solua, joissa on molemmissa 14 kromosomia, ja yksi solu, jossa on 15 kromosomia. 14 kromosomin solussa on X-kromosomin lisäksi yksi B-kromosomi, ja 15 kromosomin solussa kaksi B-kromosomia.



Kuva 2 a-d. Funktionaalisten koiraiden meioosi. (a) Myöhäisen diploteenivaiheen solu ($2n = 12 + X + B$). (b) Ensimmäisen metafasisin solu ($2n = 12 + X + B$). (c) Kaksi ensimmäisen anafasisin solua, jossa X-kromosomi on jäänyt jälkeen anafasisryhmistä, laggardiksi, jakotason läheisyyteen (nuoli). (d) Toisen metafasisin soluja, joissa eri määrät kromosomeja, $n = 14$ (tähti) ja $n = 15$ (nuoli).

3.1.2.2 Ei-funktionaaliset koiraat

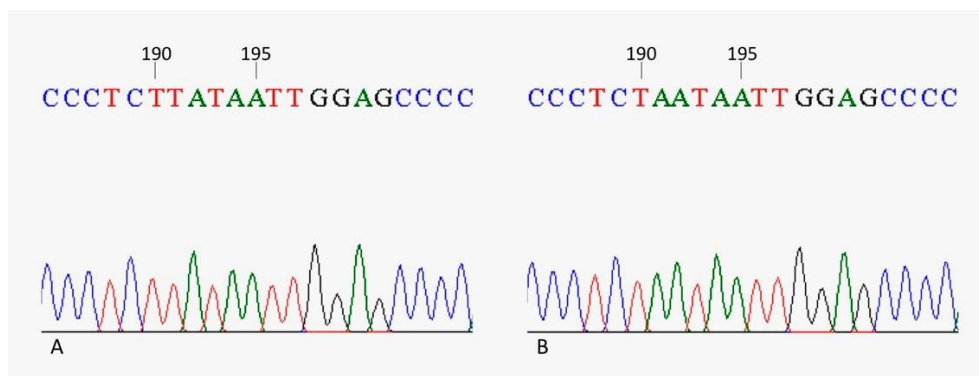
Lammenrahkan populaatiosta löytyi yksi koiras, jolla oli akiasmaattinen meioosi. Kyseisen koiraan diploteenivaiheen solussa oli nähtävissä 26 univalenttia kromosomia $2n = 24 + X + B$ (Kuva 3 a). Kuvassa 3 b näkyy 26 kondensoitunutta univalenttia kromosomia lähellä ensimmäisen metafasisin vaihetta. Kiasmojen puuttuminen johtaa diploidien siittiöiden muodostumiseen, jonka seurauksena koiraat eivät kykene tuottamaan normaaleja, diploideja jälkeläisiä ja ovat näin ollen ei-funktionaalisia (Nokkala ym. 2015).



Kuva 3 a-b. Ei-funktionaalisen koiraan meioosi. (a) Diploteenivaiheen solu ($2n = 24 + X + B$) (b) Ensimmäinen metafaasi ($2n = 24 + X + B$).

3.2 COI-haplotyyppianalyysit

COI -haplotyyppianalyysissä määritettiin populaatioiden kunkin yksilön haplotyyppi. Kaiken kaikkiaan 171 yksilön haplotyyppi selvitettiin sekvensoimalla. Alukkeet valittiin siten, että alukesekvenssien sisäpuolelta voitiin trimmata 638 nukleotidia pitkä DNA-alue, joka vastasi samaa osittaista mitokondriaalista COI -geenialuetta, jota on sekvensoitu jo aiemmin. Kyseiseltä geenin alueelta osoittautui tärkeäksi väli nukleotidi 190 – nukleotidi 195 (Kuvat 4 a-b). Koko geenialueen sekvenssi löytyy liitteestä 5. Tältä alueelta löytyi kaksi erilaista sekvenssiä, joko -TTATAA- (Turku 1 -haplotyyppi, geenipankin (NCBI) tunnus MF978762) tai -TAATAA- (Turku 2 -haplotyyppi, geenipankin (NCBI) tunnus MF978763) (Nokkala ym. 2017).



Kuva 4 a-b. Sekvensointitulokset. A) Haplotyyppi -TTATAA- (Turku 1 haplotyyppi, MF978762) B) Haplotyyppi -TAATAA- (Turku 2 haplotyyppi, MF978763).

Sevettijärven populaatiossa kaikilla triploideilla partenogeneettisillä naarailla ($N = 36$) haplotyyppi oli -TTATAA-. Myös koirilla ($N = 7$) ja diploideilla naarailla ($N = 4$) oli tämä

sama haplotyyppi. Sevettijärven populaatio voidaan todeta aidoksi partenogeneettiseksi populaatioksi, jossa partenogeneettinen naaras tuottaa populaation diploidit yksilöt paulautumana triploidiasta diploidiaan. Haplotyyppi -TTATAA- näyttää siis liittyvän vahvasti partenogeneettiseen lisääntymiseen.

Laustinrahkan populaation kaikilla parteogeneettisillä triploideilla naarailla (N = 15) haplotyyppi oli -TTATAA-. Kaikilla diploideilla naarailla (N = 23) haplotyyppi oli puolestaan -TAATAA-. Koiraista (N = 13) kahdella haplotyyppi oli -TTATAA- ja muilla 11 koiralla haplotyyppi oli -TAATAA-. Haplotyyppit osoittavat, että populaatiossa on partenogeneettistä lisääntymistä, ja partenogeneettinen naaras on tuottanut kaksi koirasta, joilla on haplotyyppi -TTATAA-. Partenogeneettisen lisääntymisen lisäksi populaatiossa esiintyy myös biseksuaalista lisääntymistä haplotyyppin -TAATAA- koiraiden ja naaraiden välillä.

Lammenrahkan populaatiossa biseksuaalinen lisääntyminen oli huomattavasti laajempaa kuin Laustinrahkan populaatiossa. Vain yhdellä naaraalla, joka oli partenogeneettinen triploidi, oli haplotyyppi -TTATAA-. Ilmeisesti tämän haplotyyppin naaras on tuottanut havaitun ei-funktionaalisen koiraan, mutta asiasta ei voida olla täysin varmoja, sillä valitettavasti kyseisen koiraan haplotyyppiä ei voitu määrittää. Populaatio koostui pääosin diploideista naaraista (N = 42), joilla kaikilla oli haplotyyppi -TAATAA-, ja koiraista, joista sekvensoitiin 30. Kaikilta koirailta löytyi haplotyyppi -TAATAA-. Jos haplotyyppi -TTATAA- liittyy partenogeneettiseen lisääntymiseen, niin -TAATAA- liittyy puolestaan vahvasti biseksuaaliseen lisääntymiseen.

3.3. Koiraiden parittelu diploidien ja triploidien naaraiden kanssa

Sevettijärven populaatiossa siittiöiden läsnäolo naaraan siittiösäiliössä tarkistettiin 18 naaraalta. Siittiöitä havaittiin kolmella naaraalla, joista kaksi oli triploideja ja vain yksi diploidi. Selvästikään koiraat eivät valikoi parittelukumppaneitaan. Vielä selvemmin tämä näkyi Laustinrahkan populaatiossa, josta tutkittiin 23 diploidia ja 16 triploidia naarasta. Näistä 9 diploidilla ja 6 triploidilla havaittiin siittiöitä siittiösäiliössä eli koiraat parittelivat sattumanvaraisesti diploidien ja triploidien naaraiden kanssa (Fisherin tarkka todennäköisyys $P = 1$).

Paritteluaktiivisuudessa havaittiin kuitenkin selviä eroja tutkittujen populaatioiden välillä. Sevettijärven populaatiossa siittiöitä löytyi kolmelta naaraalta eli paritelleiden naaraiden osuus oli 3/18 (16,7 %). Laustinrahkan populaatiossa siittiöitä löytyi 15/39 naaraalta

(38,5 %) ja aktiivisimmat koiraat löytyivät Lammenrahkan populaatiosta, jossa siittiötä löytyi 31 naaraalta tutkituista 43 naaraasta (72,1 %).

3.4. Koiraiden ja naaraiden lukusuhteet populaatioissa

Koiraiden ja naaraiden lukusuhteita verrattiin populaatioittain, ja ne on esitetty taulukossa 4. Voidaan todeta, ettei missään populaatioista naaraiden ja koiraiden lukusuhde ole 1:1. Havaitut lukusuhteet ilmentävät kuitenkin erittäin hyvin populaatioiden rakennetta. Lukusuhteeseen vaikuttaa selvästi kaksi tekijää. Ensiksi, lisääntykö populaatio ainoastaan partenogeneettisesti kuten Sevettijärvi. Toiseksi, esiintyykö populaatiossa biseksuaalista lisääntymistä joko vain osittain, kuten Laustinrahkan populaatiossa tai pääosin, kuten Lammenrahkan populaatiossa.

Taulukko 4. Naaraiden ja koiraiden lukusuhteet populaatioittain.

Populaatio	Naaraiden lkm	Koiraiden lkm	Lukusuhde (naaraat:koiraat)
Inari, Sevettijärvi	160	10	16:1
Eura, Laustinrahka	85	13	7:1
Pöytyä, Lammenrahka	182	107	2:1

4. Tulosten tarkastelu

4.1. Suopursukemppipopulaatioissa esiintyy biseksuaalista lisääntymistä

Suopursukemppiä on pidetty pitkään partenogeneettisenä lajina (Ossiannilsson 1975; Hodkinson 1976; Hodkinson 1978; Gegechkori 1985). Triploidien, partenogeneettisesti lisääntyvien naaraiden lisäksi populaatioista on löydetty harvinaisia koiraita, joiden on todettu olevan funktionaalisia (Nokkala ym. 2017). Nyt populaatioista löydettiin harvinaisten funktionaalisten koiraiden lisäksi funktionaalisia diploideja naaraita.

Sevettijärven suopursukemppipopulaatio on tyypillinen partenogeneettinen populaatio, ja se muistuttaa aiemmin tutkittua mustikkakemppi (*C. myrtilli*) -populaatioita (Nokkala ym. 2015). Populaation kaikki yksilöt, eli triploidit naaraat, koiraat sekä diploidit naaraat, edustavat kaikki samaa haplotyyppiä. Triploidit naaraat siis tuottavat sekä koiraat että diploidit naaraat populaatioon vuosittain. Harvinaiset koiraat eivät osoittaneet preferenssiä paritella vain diploidien naaraiden kanssa, vaan ne parittelevat sattumanvaraisesti kummankin naarastyypin kanssa. Vaikka koirailta on Sevettijärven populaatiossa normaali meioosi ja ne ovat funktionaalisia, on niiden frekvenssi vain noin 0,06. Kun diploidien naaraiden frekvenssi on samaa luokkaa, on niiden keskinäisen pariutumisen todennäköisyys vain $0,06^2$ eli 0,0036. Käytännössä populaatiossa ei siis esiinny parittelua diploidien yksilöiden välillä.

Laustinrahkan populaatiossa puolestaan esiintyy sekä partenogeneettistä että biseksuaalista lisääntymistä rinnakkain. Partenogeneettisesti lisääntyvät triploidit yksilöt ovat haplotyyppiä -TTATAA-, kun taas biseksuaalisesti lisääntyvät yksilöt ovat haplotyyppiä -TAATAA-. Haplotyyppianalyysi paljastaa, että triploidit naaraat ovat tuottaneet kaksi koirasta, joilla on myös haplotyyppi -TTATAA-. Muut koiraat ja diploidit naaraat ovat haplotyyppiä -TAATAA-, ja ne lisääntyvät keskenään biseksuaalisesti. Laustinrahkan populaatiosta voidaan myös vahvistaa, että suopursukemppien partenogeneesi on obligatorista. Mikäli partenogeneesi olisi fakultatiivista, esimerkiksi kirvojen syklisen partenogeneesin kaltaista, olisivat kaikki populaation yksilöt samaa haplotyyppiä. Fakultatiivisessa partenogeneesissä partenogeneettiset naaraat tuottaisivat biseksuaalisesti lisääntyvät yksilöt, eikä yksilöiden haplotyyppi muuttuisi biseksuaalisen lisääntymisen myötä.

Lammenrahkan populaatiossa esiintyy Laustinrahkan populaation tapaan kahta lisääntymismuotoa rinnakkain, mutta partenogeneettinen lisääntyminen on todella vähäistä. Vain yksi tutkituista naaraista oli triploidi, ja se edustikin partenogeneettiseen

lisääntymiseen assosioituvaa haplotyyppiä -TTATAA-. Kaikki koiraat ja diploidit naaraat olivat haplotyyppiä -TAATAA-. Erityisesti Lammenrahkan populaation tilanne herättää kysymyksen siitä, miten biseksuaalinen lisääntyminen on onnistunut syrjäyttämään partenogeneettisen lisääntymisen lähes kokonaan. Mitä ilmeisimmin biseksuaalisesti lisääntyvät yksilöt ovat sopeutuneet ympäristöön paremmin kuin partenogeneettiset yksilöt.

Parempi sopeutumiskyky johtunee kahdesta syystä. Ensinnäkin, jääkauden jälkeen pohjois-Eurooppaan levittäytynyt lajin partenogeneettinen muoto on ollut haplotyyppiä -TTATAA-, ja se on tuottanut samaa haplotyyppiä olevia harvinaisia koiraita ja diploideja naaraita populaatioihin. Tämä alkuperäinen partenogeneettinen muoto on sopeutunut erittäin koviin jääkauden jälkeisiin tundramaisiin olosuhteisiin, joita on enää tavattavissa aivan Euroopan pohjoisosissa tunturien huipuilla puurajan yläpuolella. Myöhemmin etelämpänä ilmaston muuttumisen seurauksen kasvillisuus on rehevöitynyt ja monipuolistunut. Muutos on aiheuttanut sen, että partenogeneettisen muodon on ollut pakko alkaa sopeutua muuntuneisiin olosuhteisiin. Toiseksi, jossain vaiheessa tätä suopursukempillä on tapahtunut mutaatio, jonka seurauksena on syntynyt haplotyyppiin -TAATAA- triploidi partenogeneettinen muoto. Tämän -TAATAA-haplotyyppiin triploidin naaraan tuottamat harvinaiset koiraat ja diploidit naaraat ovat erittäin aktiivisia parittelemaan, ja niiden määrä on ollut aktiivisuuden lisäksi riittävän suuri myös biseksuaaliseen lisääntymiseen. Kuten tässä tutkimuksessa on havaittu, näillä diploideilla on kattava rekombinaatio kummallakin sukupuolella. Toistaiseksi ei tiedetä, onko haplotyyppiin -TAATAA- triploidi syntynyt jääkauden jälkeen täällä pohjoisessa vai jo aiemmin jääkaudella suopursukempin eteläisillä refugia-alueilla.

On varsin hyvin tiedossa, että jos lajin populaatiossa esiintyy rinnakkain partenogeneettistä ja biseksuaalista lisääntymistä, valinta suosii biseksuaalista lisääntymistä sopeutumisen tarpeen ollessa voimakas (Barbuti ym. 2012; Becks & Agrawal 2012). Koska sopeutumiseen tarvittavat geneettiset muutokset tapahtuvat partenogeneettisillä triploideilla naarilla erittäin hitaasti, biseksuaalisesti lisääntyvät yksilöt syrjäyttävät aikaa myöten uniseksuaalisesti lisääntyvät muodot populaatiossa. Ilmeisesti Lammenrahkan populaatiossa haplotyyppiin -TAATAA- biseksuaalisesti lisääntyviä diploideja on ollut jo pidemmän aikaa, ja siksi partenogeneettiset yksilöt ovat häviämässä populaatiosta. Laustinrahkan populaatiossa biseksuaalisesti lisääntyviä diploideja on ollut vähemmän aikaa kuin Lammenrahkan populaatiossa, minkä takia partenogeneettisten yksilöiden määrä on vielä huomattavasti suurempi kuin Lammenrahkan populaatiossa.

4.2. Harvinaiset koiraat

Harvinaisten koiraiden syntyperä on ollut pitkään hämärän peitossa, mutta viimeaikaisten tutkimusten perusteella voidaan todeta, että harvinaiset koiraat syntyvät eri mekanismeilla apomiktisessä ja automiktisessä systeemissä.

Apomiktisessä systeemissä, jossa naaraat ovat triploideja, harvinaiset koiraat ja diploidit naarat syntyvät triploidian purkautumana diploidiaksi. Tämä voidaan selvästi todeta mustikkakempillä (*C. myrtilli*). Nokkala ym. (2015) tutkivat korkealla (1000 m) tunturissa sijaitsevaa populaatiota Etelä-Norjassa. Populaatiossa oli 10 % harvinaisia koiraita, ja nämä koiraat olivat ei-funktionaalisia tuottaen vain diploideja siittiöitä. Populaatiosta löytyi myös 10 % diploideja naaraita, joilla oli normaali ovogeneesi. Jos nämä ei-funktionaaliset koiraat ja diploidit naaraat lisääntyisivät keskenään, tuloksena ei olisikaan diploidi, vaan triploidi jälkeläistö diploidien jälkeläisten sijaan. Ainoaksi selitykseksi jää, että triploidi naaras aika ajoin ”hukka” yhden peruskromosomiston, ja tuloksena on yhtä usein koiras tai diploidi naaras.

Automiktisessä systeemissä koiraat syntyvät rekombinaation seurauksena. Ehkä tarkimmin on tutkittu *Artemia parthenogenetica* -suolalehtijalkaisen diploidien yksilöiden partenogeneesi. *Artemia*-suvun edustajilla on naaraspuolinen heterogametia eli biseksuaalisilla lajeilla naaraat ovat WZ ja koiraat ZZ (Saavedra & Amat 2005; De Vos ym. 2013). Partenogeneettiset diploidit tuottavat naaraat sentraalisella fuusiolla. Sentraalinen fuusio säilyttää heterotsygotian sukupuolta määräävän lokuksen ohella koko kromosomialueella lokuksesta sentromeeriin. Heterotsygotia on voitu osoittaa tutkimalla mikrosatelliittilokuksia, jotka säilyvät heterotsygootteina sukupolvesta toiseen (Nougué ym. 2015). *Artemia*-suvun edustajilla sentraalisessa fuusiossa tapahtuu kuitenkin myös vähäistä rekombinaatiota sukupuolta määräävän lokuksen ja sentromeerin välillä. Rekombinaatio johtaa homotsygotiaan, eli harvinaisten koiraiden (ZZ) syntyyn.

Nougué ym. (2015) esittivät, että koska harvinaisia koiraita esiintyy populaatioissa frekvenssillä 0-1,7 %, sukupuolta määräävä locus olisi 0-6,8 cM:n etäisyydellä sentromeeristä, eli käytännössä aivan sentromeerin lähellä (Kuva 6 a). Hypoteesi pitää sisällään oletuksen, että crossing over voi tapahtua sattumanvaraisesti koko kromosomin alueella. Tämän seurauksena hypoteesi ei enää selitäkään havaintoja siitä, että pääosassa koko kromosomia säilyy heterotsygotia, vaan että heterotsygotia säilyy vain ja ainoastaan sentromeerin ja sukupuolta määräävän lokuksen välillä.

Ilmeinen vaihtoehtoinen selitys olisi, että partenogeneettisellä *Artemia*-lajilla olisikin distaalinen kiasmalokalisatio, eli kiasma (crossing over) syntyisi bivalenteissa aina lähelle telomeeriä. Tällä alueella sijaitisi myös sukupuolta määräävä W/Z-lokus (Kuva 6 b). Jos kiasma muodostuu W/Z-lokuksen ja telomeerin välille, sentraalinen fuusio johtaisi naaraan syntymiseen, ja lokuksesta sentromeeriin välinen alue säilyisi heterotsygoottisena. Jos puolestaan kiasma muodostuisi W/Z-lokuksen sentromeeripuolelle, voisi sentraalisen fuusion tuloksena syntyä ZZ-koiras. Koiraita syntyisi edelleen 0-1,7 % ja geneettinen etäisyys lokuksen ja sentromeerin väillä olisi 6,8 cM, koska kromosomialueen, jonka sisällä ei tapahdu crossing overia lainkaan geneettinen pituus on 0 cM. Jatkotutkimuksissa olisi erittäin tärkeää saada suoria sytologisia havaintoja kiasmojen lokalisaatiosta bivalenteissa.

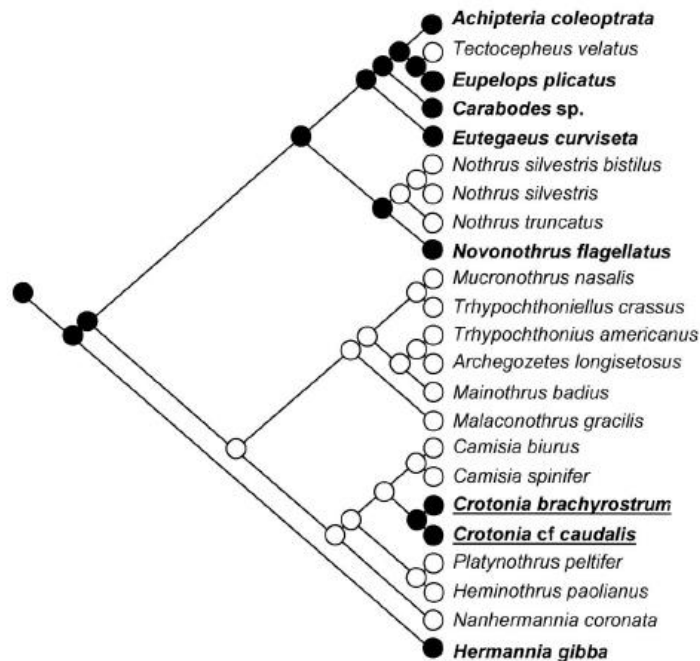


Kuva 6 a-b. Sukupuolta määräävän lokuksen sijainti kromosomissa. A) Lokus sijaitisi hyvin lähellä sentromeeriä (Nougué ym. 2015). B) Vaihtoehtoinen sijainti, jossa sukupuolta määräävä lokus sijaitsee lähellä kromosomin telomeerialuetta.

4.3. Harvinaisten koiraiden ja diploidin naaraiden evolutiivinen merkitys

Partenogeneesiä on pidetty pitkään evolutiivisena umpikujana. Vaikka partenogeneesi on seksuaalisen lisääntymisen erityismuoto, tapahtuu siinä huomattavasti vähemmän geneettistä muuntelua kuin normaalissa biseksuaalisessa lisääntymisessä. Tämän seurauksena partenogeneettisen lajin kehitysmahdollisuudet evolutiivisesta näkökulmasta ovat hyvin suppeat.

Domes ym. (2007) tutkivat sammalpunkkien fylogeniaa, ja huomasivat, että lajin partenogeneettisestä muodosta oli kehittynyt paitsi uusia partenogeneettisiä mutta myös biseksuaalisia lajeja (Kuva 7). He eivät kuitenkaan voineet osoittaa pelkän fylogenian avulla, kuinka uusi biseksuaalinen laji oli muodostunut.



Kuva 7. Desmonomata-lajien kladogrammi (Domes ym. 2007). Kladogrammista näkyy hyvin, miten biseksuaalisista lajeista (musta ympyrä) voi kehittyä uusi biseksuaalinen tai uusi partenogeneettinen laji (valkoinen ympyrä). Partenogeneettiset lajista voi kehittyä uusi partenogeneettinen laji tai jopa uusi biseksuaalinen laji, kuten *Crotonia*-lajit kuvassa.

Harvinaisten funktionaalisten koiraiden merkitys uuden lajin synnyssä on tärkeä, sillä kyseiset koiraat voivat lisääntyä lähilajin diploidien naaraiden kanssa. Tällöin saattaa syntyä kokonaan uusi partenogeneettisesti lisääntyvä laji. Ilmiö tunnetaan nimellä perinnöllinen partenogeneesi, jonka Maccari ym. (2013a) kuvasivat tutkiessaan *Artemia*-suvun suolalehtijalkaisia.

Apomiktisessä partenogeneettisessä populaatiossa esiintyvät harvinaiset funktionaaliset koiraat ja harvinaiset diploidit naaraat avaavat lajin kannalta vielä enemmän mahdollisuuksia, kuin jos populaatiossa esiintyisi vain harvinaisia funktionaalisia koiraita. Funktionaaliset koiraat ja diploidit naaraat voivat paritella paitsi lähilajien koiraiden ja naaraiden kanssa, myös keskenään ja voisivat saada aikaan uuden biseksuaalisen lajin kehittymisen. Biseksuaalinen lisääntyminen mahdollistaisi lajin sopeutumisen muuttuviin olosuhteisiin nopeammin kuin jos se lisääntyisi partenogeneettisesti. Toisaalta lajin partenogeneettinen muoto saattaa selviytyä paremmin marginaalisilla elinalueilla. Lajilla, jolla on sekä partenogeneettinen muoto, että mahdollisuus muodostaa uusi biseksuaalisesti lisääntyvä muoto, on puolestaan likimain rajoittamattomat mahdollisuudet adaptaation suhteen. Partenogeneettistä lisääntymistapaa ei siis voida enää pitää evolutiivisena umpikujana, sillä harvinaiset funktionaaliset koiraat sekä diploidit naaraat antavat lajille suuren evolutiivisen potentiaalin.

4.4. Jatkotutkimukset

Vaikka parempi sopeutumiskyky selittää erittäin hyvin biseksuaalisesti lisääntyvien diploidien osuuden vaihtelun partenogeneettisissä populaatioissa, tarvitaan silti selviin havaintoihin perustuvaa tietoa siitä, missä Suomen alueella partenogeneettisen *C. ledi*-naaraiden lisääntyminen on optimaalista ja miten niiden lisääntymisen tehokkuus laskee etelään/pohjoiseen mentäessä.

Jatkotutkimuksissa pitää myös kartoittaa, kuinka laajalla alueella Suomessa esiintyy populaatioita, joissa diploideilla yksilöillä on sama haplotyyppi kuin tässä tutkimuksessa havaituilla biseksuaalisesti lisääntyvillä naarailla ja koirilla. Samalla voisivat löytyä myös triploidit partenogeneettiset naaraat, jotka tuottavat kyseiset diploidit naaraat ja koiraat populaatioihin. Kartoitustyötä helpottaa huomattavasti tämän tutkimuksen havainto siitä, että koiraiden ja naaraiden lukusuhteen avulla voidaan hyvin nopeasti saada selville alustavaa tietoa kerätyn populaation todennäköisestä rakenteesta.

Nykyisissä tutkimuksissa on huomattu myös eroja koiraiden paritteluaktiivisuudessa partenogeneettisten ja biseksuaalisten populaatioiden välillä. Jatkotutkimuksissa tulisi selvittää, mistä tämä ero johtuu.

5. Kiitokset

Vuolaat kiitokset tutkielmani ohjaajille, dosenteille Christina ja Seppo Nokkalalle, projektiin mukaan pääsystä sekä koko tutkielman mahdollistamisesta. Erityiskiitoksen haluaisin osoittaa Sepolle, jota ilman koko tutkielmasta ei mitä luultavimmin olisi tullut yhtään mitään. Kiitos tiiviistä yhteistyöstä, pitkästä pinnasta, ja ajoittaisesta eteenpäin potkimisesta. Parempaa ohjaajaa saa hakea kissojen ja koirien kanssa. Oli ilo tehdä töitä kanssasi.

Haluaisin kiittää myös Suomen Hyönteistieteellistä seuraa, jonka myöntämällä apurahalla osa tämän tutkielman sekvensoinneista saatiin toteutettua. Kiitos myös perheelleni ja ystävilleni, jotka jaksoivat kuunnella vouhotustani kempeistä ja itse partenogeneesistä. Erityisesti Kiira, kiitos kaikesta viisaudesta tutkielmaan liittyen.

6. Lähteet

Abatzopoulos, T.J.; Beardmore, J.A.; Clegg, J.S.; Sorgeloos, P. (2002) *Artemia: Basic and Applied Biology. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.*

Abatzopoulos, T.J.; El-Bermawi, N.; Vasdekis, C.; Baxevanis, A.D.; Sorgeloos, P. (2003) Effects of salinity and temperature on reproductive and life span characteristics of clonal *Artemia*. (International Study on *Artemia*. LXVI). *Hydrobiologia*, 492: 191-199.

Abreu-Grobois, F.A. & Beardmore, J.A. (1982) Genetic differentiation and speciation in the brine shrimp *Artemia*. In: *Mechanisms of Speciation* (C. Barigozzi, ed.). *Alan R. Liss, New York.*, s. 345-376.

Abreu-Grobois, F.A. & Beardmore, J.A. (2001) The generation of males by diploid parthenogenetic *Artemia* cannot occur in the way Stefani suggested. In: *Proceedings of the 4th International Large Branchiopod Symposium* (A.M. Maeda-Martinez, B.V. Timms, D.C. Rogers, G. Murugan & A. Abreu-Grobois, eds). *La Paz, Baja California, Mexico.*

Asher, J.H. (1970) Parthenogenesis and genetic variability .2. one-locus models for various diploid populations. *Genetics*, 66(2): 369-

Barbuti, R.; Mautner, S.; Carnevale, G.; Milazzo, P.; Rama, A.; Sturmbauer, C. (2012) Population dynamics with a mixed type of sexual and asexual reproduction in a fluctuating environment. *BMC Evolutionary Biology*, 12:49.

Barigozzi, C. (1944) I fenomeni cromosomici delle cellule germinale in *Artemia salina*. *Chromosoma*, 2: 549-575.

Becks, L. & Agrawal, A.F. (2012) The Evolution of Sex Is Favoured During Adaptation to New Environments. *PLoS Biology*, 10(5): e1001317.

Bell, G. (1982) *The masterpiece of nature. The evolution and genetics of sexuality. Univ. Calif. Press, Berkeley, CA*, s. 635

Blackman, R.L. (1972) The inheritance of life-cycle differences in *Myzus persicae* (Sulz.) (Hem: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*, 62: 281–294.

Bowen, S.T. (1963) The genetics of *Artemia salina*. II. White eye, a sex-linked mutation. *The biological bulletin*, 124(1): 17-23.

Bowen, S.T. (1965) The genetics of *Artemia salina*. V. Crossing over between the X and Y chromosomes. *Genetics*, 52(3): 695–710.

Bowen, S.T.; Durkin, J.P.; Sterling, G.; Clark, L.S. (1978) *Artemia* hemoglobins: Genetic variation in parthenogenetic and zygogenetic populations. *The Biological Bulletin*, 155(2): 273-287.

Butlin, R.K.; Shoen, I.; Martens, K. (1998) Asexual reproduction in nonmarine ostracods. *Heredity*, 81: 473–480.

Butlin, R.K. (2002) The costs and benefit of sex: new insights from old asexual lineages. *Nat. Rev. Genet.*, 3: 311–317.

- Chang, M.S.; Asem, A.; Sun, S-C. (2016) The incidence of rare males in seven parthenogenetic *Artemia* (Crustacea: Anostraca) populations. *Turkish Journal of Zoology*, 41: 138-143.
- De Vos, S.; Bossier, P.; Van Stappen, G.; Vercauteren, I.; Sorgeloos, P.; Vuylsteke, M. (2013) A first AFLP-Based Genetic Linkage Map for Brine Shrimp *Artemia franciscana* and Its Application in Mapping the Sex Locus. *PLoS ONE*, 8(3): e57585.
- Delmotte, F.; Leterme, N.; Bonhomme, J.; Rispe, C.; Simon, J-C. (2001) Multiple routes to asexuality in an aphid species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268: 2291–2299.
- Domes, K.; Norton, A.R.; Maraun, M.; Scheu, S. (2007) Reevolution of sexuality breaks Dollo's law. *PNAS*, 104(17): 7139-7144.
- Engelstädter, J.; Sandrock, C.; Vorburger, C. (2011) Contagious parthenogenesis, automixis, and a sex determination meltdown. *Evolution*, 65: 501–511.
- Gao, M.J.; Cheng, J.J.; Cai, Y.N. (1995) The roles of rare males in populations of the brine shrimp *Artemia parthenogenetica*. *Chinese Science Bulletin*, 40(22): 1917-1921.
- Gegechkori, A.M. (1985) Nekotorye aspekty evolutsii psyllid. *Tbilisi*, s. 306 (venäjäksi).
- Grozeva, S. ja Nokkala, S. (1996) Chromosomes and their meiotic behavior in two families of the primitive infraorder Dipsocoromorpha (Heteroptera). *Hereditas*, 125: 31-36.
- Hall, A.T. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Heethoff, M.; Laumann, M.; Bergmann, P. (2007) Adding to the reproductive biology of the parthenogenetic oribatid mite *Archezogetes longisetosus* (Acari, Oribatida, Trhypochthoniidae). *Turkish Journal of Zoology*, 31: 151-159.
- Heethoff, M.; Norton, R.A.; Scheu, S.; Maraun, M. (2009) Parthenogenesis in oribatid mites (Acari, Oribatida): Evolution without sex. *Springer Science+Business Media B.V.*, 241-257.
- Hodkinson, I.D. (1976) New Psyllids (Insecta-Homoptera-Psyloidea) from Canada. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 58(4): 321-330.
- Hodkinson, I.D. (1978) Psyllids (Homoptera Psyloidea) of Alaska. *Systematic Entomology*, 3(4): 333-360.
- Hodkinson, I.D. (1983) Facultative parthenogenesis in *Psylla myrtilli* Wagner (Hom., Psyllidae): the saga continues in Norway. *Fauna norv.*, (B) 30:1–2.
- Hodkinson, I.D.; Bird, J.M. (2006) Facultative parthenogenesis in *Cacopsylla myrtilli* (Wagner) (Homoptera: Psyloidea) in northern Sweden: possible explanations for the occurrence of males. *Entomologisk Tidskrift*, 127: 157–160.
- Hurst, L.D. & Peck, J.R. (1996) Recent advances in understanding of the evolution and maintenance of sex. *TREE*, 11:46–52.
- Innes, D.J. & Hebert, P.D.N. (1988) The origin and genetic-basis of obligate parthenogenesis in *Daphniapulex*. *Evolution*, 42(5): 1024-1035.

- Kearney, M. (2005) Hybridization, glaciation and geographical parthenogenesis. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(9): 495-502.
- Kearney, M. (2006) Response to Lundmark: Polyploidization, hybridization and geographical parthenogenesis. *Trends in Ecology and Evolution*, 21(1):10.
- Kuznetsova, V.G.; Nokkala, S.; Maryanska-Nadachowska, A. (1997) Karyotypes, sex chromosome systems, and male meiosis in Finnish psyllids (Homoptera: Psylloidea). *Folia Biologica-Krakow*, 45(3-4): 143-152.
- Kuznetsova, V.G.; Labina, E.S.; Shapoval, N.A.; Maryanska-Nadachowska, A.; Lukhtanov, V.A. (2012) *Cacopsylla fraudatrix* sp.n. (Hemiptera: Psylloidea) recognised from testis structure and mitochondrial gene COI. *Zootaxa*, 3547: 55-63.
- Lynch, M. (1984) Destabilizing hybridization, general-purpose genotypes and geographic parthenogenesis. *Q. Rev. Biol.*, 59:257–290.
- Maccari, M.; Amat, F.; Gómez, A. (2013a) Origin and Genetic Diversity of Diploid Parthenogenetic *Artemia* in Eurasia. *PLoS ONE*, 8(12): e83348.
- Maccari, M.; Gómez, A.; Hontoria, F.; Amat, F. (2013b) Functional rare males in diploid parthenogenetic *Artemia*. *Journal of Evolutionary Biology*, 26: 1934-1948.
- Maccari, M.; Amat, F.; Hontoria, F.; Gómez, A. (2014) Laboratory generation of new parthenogenetic lineages supports contagious parthenogenesis in *Artemia*. *PeerJ*, 2: e439.
- Martens, K. (1998) Sex and ostracods: a new synthesis. In: Schön I, Martens, K. (Eds) Sex and Parthenogenesis: Evolutionary Ecology of Reproductive Modes in Non-Marine Ostracods. *Backhuys Publishers, Leiden*, 295–322.
- Nokkala, C.; Kuznetsova, V.G.; Nokkala, S. (2013) Meiosis in rare males in parthenogenetic *Cacopsylla myrtilli* (Wagner, 1947) (Hemiptera, Psyllidae) populations from northern Europe. *Comparative Cytogenetics*, 7(3): 241-251.
- Nokkala, C.; Kuznetsova, V.G.; Nokkala, S. (2015) Rare diploid females coexist with rare males: a novel finding in triploid parthenogenetic populations in the psyllid *Cacopsylla myrtilli* (W. Wagner, 1947) (Hemiptera, Psylloidea) in northern Europe. *Genetica*, 143: 589-595.
- Nokkala, S.; Kuznetsova, V.G.; Nokkala, C. (2017) Characteristics of parthenogenesis in *Cacopsylla ledi* (Flor, 1861) (Hemiptera, Sternorrhyncha, Psylloidea): cytological and molecular approaches. *Comparative Cytogenetics*, 11(4): 807-817.
- Nokkala, S.; Maryanska-Nadachowska, A.; Kuznetsova, V.G. (2008) First evidence of polyploidy in Psylloidea (Homoptera, Sternorrhyncha): a parthenogenetic population of *Cacopsylla myrtilli* (W. Wagner, 1947) from northeast Finland is apomictic and triploid. *Genetica*, 133: 201-205.
- Normark, B.B. (2003) The evolution of alternative genetic systems in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 48: 397-423.
- Normark, B.B.; Judson, O.P.; Moran, N.A. (2003) Genomic signatures of ancient asexual lineages. *Biol. J. Linnean Soc.*, 79: 69-84.

- Nougué, O.; Rode, N.O.; Jabbour-Zahab, R.; Ségard, A.; Chevin, L.M.; Haag, C.R.; Lenormand, T. (2015) Automixis in *Artemia*: Solving a century-old controversy. *Journal of Evolutionary Biology*, 28: 2337-2348.
- Ossiannilsson, F. (1975) On the male of *Psylla myrtilli* W. Wagner with a description of a new *Psylla* species from the Far East (Homoptera: Psyllidae). *Entomologica Scandinavica*, 6: 102–106.
- Ossiannilsson, F. (1992) The Psylloidea (Homoptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomol. Scand. (Kristensen NP ed)*, 26: 347.
- Palmer, S.C. & Norton, R.A. (1990) Further experimental proof of thelytokous parthenogenesis in Oribatid mites (Acari: Oribatida: Desmonomata). *Experimental and Applied Acarology*, 8: 149–159.
- Palmer, S.C. & Norton, R.A. (1992) Genetic diversity in thelytokous Oribatid mites (Acari, Acariformes, Desmonomata). *Biochemical systematics and ecology*, 20(3): 219-231.
- Pearcy, M.; Hardy, O.; Aron, S. (2006) Thelytokous parthenogenesis and its consequences on inbreeding in an ant. *Heredity*, 96: 377-382.
- Rispe, C.; Bonhomme, J.; Simon, J-C. (1999) Extreme lifecycle and sex ratio variation among sexually produced clones of the aphid *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae). *Oikos*, 86: 254–264.
- Saavedra, C. & Amat, F. (2005) Maternal effects on encystment in crosses between two geographic strains of *Artemia franciscana*. *Journal of Heredity*, 96(6): 713-717.
- Saura, A.; Lokki, J.; Suomalainen, E. (1993) Origin of polyploidy in parthenogenetic weevils. *J. Theor. Biol.*, 163:449–456.
- Saygı (Başbuğ), Y. (2004) Characterization of parthenogenetic *Artemia* populations from Çamaltı (Izmir, Turkey) and Kalloni (Lesbos, Greece): survival, growth, maturation, biometrics, fatty acid profiles and hatching characteristics? *Hydrobiologia*, 527: 227-239.
- Seiler, J. (1961) Untersuchungen über die entstehung der parthenogenese bei *solenobia triquetrella* F.R. (Lepidoptera, Psychidae) .3. die geographische verbreitung der drei rassen von *solenobia triquetrella* (bisexuell, diploid und tetraploid parthenogenetisch) in der schweiz und in angrenzenden landern und die beziehungen zur eiszeit – Bemerkungen über die entstehung der parthenogenese. *Zeitschrift für vererbungslehre*, 92(3): 261-
- Seiler, J. (1963) Untersuchungen über die entstehung der parthenogenese bei *solenobia triquetrella* F.R. (Lepidoptera, Psychidae) .4. wie besamen begattete diploid und tetraplois parthenogenetische weibchen von *S. triquetrella* ihre eier – schicksal der richtungskörper im unbesamten und besamten ei – vergleich der ergebnisse mit fi-aufzuchten und beziehungen zur genese der parthenogenese. *Zeitschrift für vererbungslehre*, 94(1): 29-
- Simon, J-C.; Leterme, N.; Latorre, A. (1999) Molecular markers linked to breeding system differences in segregating and natural populations of the cereal aphid *Rhopalosiphum padi* L. *Molecular Ecology*, 8: 965–973.
- Snyder, D.W.; Opperman, C.H.; Bird, D.M. (2006) A method for generating *Meloidogyne incognita* males. *Journal of Nematology*, 38: 192–194.

- Stefani R. (1960) L'Artemia salina pathenogenetica a Cagliari. *Rivista di Biologia*, 53: 463-490.
- Stefani, R. (1964) The origin of males in parthenogenetic populations of Artemia salina. *Riv. Biol.*, 57: 147.
- Sun, Y.; Zhong, Y.C.; Song, W.Q.; Zhang, R.S.; Chen, R.Y. (1999) Detection of genetic relationships among four Artemia species using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Int. J. Salt Lake Res.*, 8: 139-147.
- Suomalainen, E. (1950) Parthenogenesis in animals. *Adv. Genet.*, 3:193–253.
- Suomalainen, E.; Saura, A.; Lokki, J. (1987) Cytology and evolution in parthenogenesis. *CRC Press*.
- Taberly, G. (1988) Researchs on the thelytokous parthenogenesis of 2 species of oribatid mites – Trhypochthonius tectorum (Berlese) and Platynohrus peltifer (Koch) .4. Observations on atavic males. *Acarologia*, 29(1): 95-107.
- Vandel, A. (1928) La parthénogenèse géographique. Contribution à l'étude biologique et cytologique de la parthénogenèse naturelle. *Bull. Biol. France Belg.*, 62: 164–281.
- von Siebold, C. (1856) Wahre Parthenogenesis bei Schmetterlingen und Bienen. *Engelmann, Leipzig*.
- White, M.J.D. (1973) Animal cytology and evolution, 3rd ed. *Cambridge University Press, Cambridge UK*
- Wrensch D.L.; Kethley J.B.; Norton R.A. (1994) — Cytogenetics of holokinetic chromosomes and inverted meiosis: keys to the evolutionary success of mites, with generalizations on eukaryotes—In: Houck M.A. (Ed). Mites: Ecological and Evolutionary Analyses of Lifehistory Patterns. New York: Chapman and Hall. p.282-343.

Liitteet

1. Schiffin reagenssin valmistaminen

Kuumennetaan 200 ml tislattua vettä kiehuvaan (muistettava käyttää kiehumakiviä !!!). Lisätään 1g basic fuchsinia (esim Merk 1.15937.0100) 1g. Ravistellaan huolellisesti ja annetaan liuoksen jäähtyä n. 60 asteiseksi. Lisätään liuokseen ensin 10 ml 1N HCl, ravistellaan ja lisätään 1 g kaliumdisulfiittia ($K_2S_2O_7$), ravistellaan huolellisesti muutaman minuutin ajan, jotta disulfiitti liukenee liuokseen. Peitetään pullo korkilla ja säilytetään pulloa huoneen lämmössä pimeässä yli yön. Seuraavana päivänä lisätään liuokseen 5 teelusikallista aktiivihiiltä, ravistellaan hyvin ja annetaan aktiivihiilen laskeutua liuoksessa n. tunnin ajan. Suodatetaan liuos kaksinkertaisen suodatinpaperin läpi ruskeaan säilytyspulloon. Suodoksen tulee olla väritön. (Huom. Vaikka valmis liuos on väritön, värjää se esim. iholle joutuessaan ihon voimakkaasti magentan punaiseksi). Punaisen värin saa pois lasiastioista ja iholta huuhtelemalla ensin 1N HCl-liuoksella ja heti sen jälkeen runsaalla vesijohtovedellä.

2. Sørensenin fosfaattipuskuri

Kantaliuokset.

A) 1/15 M KH_2PO_4

B) 1/15 M $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$

pH 6.8, A + B 1:1

3. Giemsa-väriliuos (Merck, 1.09204.0500)

4. Entellan (Merck, 1.07960.0500)

5. Tutkitun COI-geenialueen sekvenssi

Lyhenteiden selitykset.

SevJ = Sevetijärvi, LauR = Laustinrahka, LamR = Lammenrahka

F = Naaras (Female), M = Koiras (Male)

Esim. 46 = Sekvensoidun yksilön numeron populaatioittain

T = Triploidi, D = Diploidi

Esim. 1D34KAA007 = Macrogeenin sekvensointikoodi

```

      10      20      30      40      50      60
C.ledi SevJ F46T 1D34KAA007 TTGGAGTATGGTCAGGATTAAGGCTTTCCCTTAGTATAAATTATTCGACTAGAATTAA
C.ledi SevJ F22D 1AB2KAA062 TTGGAGTATGGTCAGGATTAAGGCTTTCCCTTAGTATAAATTATTCGACTAGAATTAA
C.ledi SevJ M7 1AB2KAA073 TTGGAGTATGGTCAGGATTAAGGCTTTCCCTTAGTATAAATTATTCGACTAGAATTAA
C.ledi LauR F1T 1C52KAA052 TTGGAGTATGGTCAGGATTAAGGCTTTCCCTTAGTATAAATTATTCGACTAGAATTAA
C.ledi LauR F56D 1C59KAA057 TTGGAGTATGGTCAGGATTAAGGCTTTCCCTTAGTATAAATTATTCGACTAGAATTAA
C.ledi LauR M2 1C52KAA097 TTGGAGTATGGTCAGGATTAAGGCTTTCCCTTAGTATAAATTATTCGACTAGAATTAA
C.ledi LauR M9 1D34KAA055 TTGGAGTATGGTCAGGATTAAGGCTTTCCCTTAGTATAAATTATTCGACTAGAATTAA
C.ledi LamR F11T 1C59KAA068 TTGGAGTATGGTCAGGATTAAGGCTTTCCCTTAGTATAAATTATTCGACTAGAATTAA
C.ledi LamR F53D 1D34KAA046 TTGGAGTATGGTCAGGATTAAGGCTTTCCCTTAGTATAAATTATTCGACTAGAATTAA
C.ledi LamR M1 1C52KAA093 TTGGAGTATGGTCAGGATTAAGGCTTTCCCTTAGTATAAATTATTCGACTAGAATTAA

      70      80      90      100     110     120
C.ledi SevJ F46T 1D34KAA007 GACAGTCTTCCCTGTTTTAATAAATGATCAAATTTATAAATACTATTGTAACCTCCCATG
C.ledi SevJ F22D 1AB2KAA062 GACAGTCTTCCCTGTTTTAATAAATGATCAAATTTATAAATACTATTGTAACCTCCCATG
C.ledi SevJ M7 1AB2KAA073 GACAGTCTTCCCTGTTTTAATAAATGATCAAATTTATAAATACTATTGTAACCTCCCATG
C.ledi LauR F1T 1C52KAA052 GACAGTCTTCCCTGTTTTAATAAATGATCAAATTTATAAATACTATTGTAACCTCCCATG
C.ledi LauR F56D 1C59KAA057 GACAGTCTTCCCTGTTTTAATAAATGATCAAATTTATAAATACTATTGTAACCTCCCATG
C.ledi LauR M2 1C52KAA097 GACAGTCTTCCCTGTTTTAATAAATGATCAAATTTATAAATACTATTGTAACCTCCCATG
C.ledi LauR M9 1D34KAA055 GACAGTCTTCCCTGTTTTAATAAATGATCAAATTTATAAATACTATTGTAACCTCCCATG
C.ledi LamR F11T 1C59KAA068 GACAGTCTTCCCTGTTTTAATAAATGATCAAATTTATAAATACTATTGTAACCTCCCATG
C.ledi LamR F53D 1D34KAA046 GACAGTCTTCCCTGTTTTAATAAATGATCAAATTTATAAATACTATTGTAACCTCCCATG
C.ledi LamR M1 1C52KAA093 GACAGTCTTCCCTGTTTTAATAAATGATCAAATTTATAAATACTATTGTAACCTCCCATG

      130     140     150     160     170     180
C.ledi SevJ F46T 1D34KAA007 CTTTTATTATAAATTTTTTTATAACCATGCCAATTAATTATGGAGGATTCGGAATTTGAT
C.ledi SevJ F22D 1AB2KAA062 CTTTTATTATAAATTTTTTTATAACCATGCCAATTAATTATGGAGGATTCGGAATTTGAT
C.ledi SevJ M7 1AB2KAA073 CTTTTATTATAAATTTTTTTATAACCATGCCAATTAATTATGGAGGATTCGGAATTTGAT
C.ledi LauR F1T 1C52KAA052 CTTTTATTATAAATTTTTTTATAACCATGCCAATTAATTATGGAGGATTCGGAATTTGAT
C.ledi LauR F56D 1C59KAA057 CTTTTATTATAAATTTTTTTATAACCATGCCAATTAATTATGGAGGATTCGGAATTTGAT
C.ledi LauR M2 1C52KAA097 CTTTTATTATAAATTTTTTTATAACCATGCCAATTAATTATGGAGGATTCGGAATTTGAT
C.ledi LauR M9 1D34KAA055 CTTTTATTATAAATTTTTTTATAACCATGCCAATTAATTATGGAGGATTCGGAATTTGAT
C.ledi LamR F11T 1C59KAA068 CTTTTATTATAAATTTTTTTATAACCATGCCAATTAATTATGGAGGATTCGGAATTTGAT
C.ledi LamR F53D 1D34KAA046 CTTTTATTATAAATTTTTTTATAACCATGCCAATTAATTATGGAGGATTCGGAATTTGAT
C.ledi LamR M1 1C52KAA093 CTTTTATTATAAATTTTTTTATAACCATGCCAATTAATTATGGAGGATTCGGAATTTGAT

      190     200     210     220     230     240
C.ledi SevJ F46T 1D34KAA007 TAGTCCCTCTTAATTTGGAGCCCAGATATAGCTTTCCACGGTTAAATAATCTTAGCT
C.ledi SevJ F22D 1AB2KAA062 TAGTCCCTCTTAATTTGGAGCCCAGATATAGCTTTCCACGGTTAAATAATCTTAGCT
C.ledi SevJ M7 1AB2KAA073 TAGTCCCTCTTAATTTGGAGCCCAGATATAGCTTTCCACGGTTAAATAATCTTAGCT
C.ledi LauR F1T 1C52KAA052 TAGTCCCTCTTAATTTGGAGCCCAGATATAGCTTTCCACGGTTAAATAATCTTAGCT
C.ledi LauR F56D 1C59KAA057 TAGTCCCTCTTAATTTGGAGCCCAGATATAGCTTTCCACGGTTAAATAATCTTAGCT
C.ledi LauR M2 1C52KAA097 TAGTCCCTCTTAATTTGGAGCCCAGATATAGCTTTCCACGGTTAAATAATCTTAGCT
C.ledi LauR M9 1D34KAA055 TAGTCCCTCTTAATTTGGAGCCCAGATATAGCTTTCCACGGTTAAATAATCTTAGCT
C.ledi LamR F11T 1C59KAA068 TAGTCCCTCTTAATTTGGAGCCCAGATATAGCTTTCCACGGTTAAATAATCTTAGCT
C.ledi LamR F53D 1D34KAA046 TAGTCCCTCTTAATTTGGAGCCCAGATATAGCTTTCCACGGTTAAATAATCTTAGCT
C.ledi LamR M1 1C52KAA093 TAGTCCCTCTTAATTTGGAGCCCAGATATAGCTTTCCACGGTTAAATAATCTTAGCT

      250     260     270     280     290     300
C.ledi SevJ F46T 1D34KAA007 TTTGGATACTTATTCCATCTCTTTACCTCCTTTTAAATAAGAAGATTAGTTGATCAAGGAG
C.ledi SevJ F22D 1AB2KAA062 TTTGGATACTTATTCCATCTCTTTACCTCCTTTTAAATAAGAAGATTAGTTGATCAAGGAG
C.ledi SevJ M7 1AB2KAA073 TTTGGATACTTATTCCATCTCTTTACCTCCTTTTAAATAAGAAGATTAGTTGATCAAGGAG
C.ledi LauR F1T 1C52KAA052 TTTGGATACTTATTCCATCTCTTTACCTCCTTTTAAATAAGAAGATTAGTTGATCAAGGAG
C.ledi LauR F56D 1C59KAA057 TTTGGATACTTATTCCATCTCTTTACCTCCTTTTAAATAAGAAGATTAGTTGATCAAGGAG
C.ledi LauR M2 1C52KAA097 TTTGGATACTTATTCCATCTCTTTACCTCCTTTTAAATAAGAAGATTAGTTGATCAAGGAG
C.ledi LauR M9 1D34KAA055 TTTGGATACTTATTCCATCTCTTTACCTCCTTTTAAATAAGAAGATTAGTTGATCAAGGAG
C.ledi LamR F11T 1C59KAA068 TTTGGATACTTATTCCATCTCTTTACCTCCTTTTAAATAAGAAGATTAGTTGATCAAGGAG
C.ledi LamR F53D 1D34KAA046 TTTGGATACTTATTCCATCTCTTTACCTCCTTTTAAATAAGAAGATTAGTTGATCAAGGAG
C.ledi LamR M1 1C52KAA093 TTTGGATACTTATTCCATCTCTTTACCTCCTTTTAAATAAGAAGATTAGTTGATCAAGGAG

```

```

          310      320      330      340      350      360
C.ledi SevJ F46T 1D34KAA007 TAGGTACAGGATGAACCGTATATCCCCCTCTATCCAACCTCAATATTCATAGTGGATATT
C.ledi SevJ F22D 1AB2KAA062 TAGGTACAGGATGAACCGTATATCCCCCTCTATCCAACCTCAATATTCATAGTGGATATT
C.ledi SevJ M7 1AB2KAA073 TAGGTACAGGATGAACCGTATATCCCCCTCTATCCAACCTCAATATTCATAGTGGATATT
C.ledi LauR F1T 1C52KAA052 TAGGTACAGGATGAACCGTATATCCCCCTCTATCCAACCTCAATATTCATAGTGGATATT
C.ledi LauR F56D 1C59KAA057 TAGGTACAGGATGAACCGTATATCCCCCTCTATCCAACCTCAATATTCATAGTGGATATT
C.ledi LauR M2 1C52KAA097 TAGGTACAGGATGAACCGTATATCCCCCTCTATCCAACCTCAATATTCATAGTGGATATT
C.ledi LauR M9 1D34KAA055 TAGGTACAGGATGAACCGTATATCCCCCTCTATCCAACCTCAATATTCATAGTGGATATT
C.ledi LamR F11T 1C59KAA068 TAGGTACAGGATGAACCGTATATCCCCCTCTATCCAACCTCAATATTCATAGTGGATATT
C.ledi LamR F53D 1D34KAA046 TAGGTACAGGATGAACCGTATATCCCCCTCTATCCAACCTCAATATTCATAGTGGATATT
C.ledi LamR M1 1C52KAA093 TAGGTACAGGATGAACCGTATATCCCCCTCTATCCAACCTCAATATTCATAGTGGATATT

```

```

          370      380      390      400      410      420
C.ledi SevJ F46T 1D34KAA007 CTGTTGATACAGCTATTTTTTCTCTTCATTTAGCCGGAATCTCCTCAATTCTTGGAGCCA
C.ledi SevJ F22D 1AB2KAA062 CTGTTGATACAGCTATTTTTTCTCTTCATTTAGCCGGAATCTCCTCAATTCTTGGAGCCA
C.ledi SevJ M7 1AB2KAA073 CTGTTGATACAGCTATTTTTTCTCTTCATTTAGCCGGAATCTCCTCAATTCTTGGAGCCA
C.ledi LauR F1T 1C52KAA052 CTGTTGATACAGCTATTTTTTCTCTTCATTTAGCCGGAATCTCCTCAATTCTTGGAGCCA
C.ledi LauR F56D 1C59KAA057 CTGTTGATACAGCTATTTTTTCTCTTCATTTAGCCGGAATCTCCTCAATTCTTGGAGCCA
C.ledi LauR M2 1C52KAA097 CTGTTGATACAGCTATTTTTTCTCTTCATTTAGCCGGAATCTCCTCAATTCTTGGAGCCA
C.ledi LauR M9 1D34KAA055 CTGTTGATACAGCTATTTTTTCTCTTCATTTAGCCGGAATCTCCTCAATTCTTGGAGCCA
C.ledi LamR F11T 1C59KAA068 CTGTTGATACAGCTATTTTTTCTCTTCATTTAGCCGGAATCTCCTCAATTCTTGGAGCCA
C.ledi LamR F53D 1D34KAA046 CTGTTGATACAGCTATTTTTTCTCTTCATTTAGCCGGAATCTCCTCAATTCTTGGAGCCA
C.ledi LamR M1 1C52KAA093 CTGTTGATACAGCTATTTTTTCTCTTCATTTAGCCGGAATCTCCTCAATTCTTGGAGCCA

```

```

          430      440      450      460      470      480
C.ledi SevJ F46T 1D34KAA007 TTAATTTTATCACCACAATTTAATAATACGAAGAAAACCTACACACAATAGAAAAATTAC
C.ledi SevJ F22D 1AB2KAA062 TTAATTTTATCACCACAATTTAATAATACGAAGAAAACCTACACACAATAGAAAAATTAC
C.ledi SevJ M7 1AB2KAA073 TTAATTTTATCACCACAATTTAATAATACGAAGAAAACCTACACACAATAGAAAAATTAC
C.ledi LauR F1T 1C52KAA052 TTAATTTTATCACCACAATTTAATAATACGAAGAAAACCTACACACAATAGAAAAATTAC
C.ledi LauR F56D 1C59KAA057 TTAATTTTATCACCACAATTTAATAATACGAAGAAAACCTACACACAATAGAAAAATTAC
C.ledi LauR M2 1C52KAA097 TTAATTTTATCACCACAATTTAATAATACGAAGAAAACCTACACACAATAGAAAAATTAC
C.ledi LauR M9 1D34KAA055 TTAATTTTATCACCACAATTTAATAATACGAAGAAAACCTACACACAATAGAAAAATTAC
C.ledi LamR F11T 1C59KAA068 TTAATTTTATCACCACAATTTAATAATACGAAGAAAACCTACACACAATAGAAAAATTAC
C.ledi LamR F53D 1D34KAA046 TTAATTTTATCACCACAATTTAATAATACGAAGAAAACCTACACACAATAGAAAAATTAC
C.ledi LamR M1 1C52KAA093 TTAATTTTATCACCACAATTTAATAATACGAAGAAAACCTACACACAATAGAAAAATTAC

```

```

          490      500      510      520      530      540
C.ledi SevJ F46T 1D34KAA007 CTTTATTTGTATGATCAGTATTAATTACAGCTTTCCTTCTCCTGTTAGCTCTCCAGTAC
C.ledi SevJ F22D 1AB2KAA062 CTTTATTTGTATGATCAGTATTAATTACAGCTTTCCTTCTCCTGTTAGCTCTCCAGTAC
C.ledi SevJ M7 1AB2KAA073 CTTTATTTGTATGATCAGTATTAATTACAGCTTTCCTTCTCCTGTTAGCTCTCCAGTAC
C.ledi LauR F1T 1C52KAA052 CTTTATTTGTATGATCAGTATTAATTACAGCTTTCCTTCTCCTGTTAGCTCTCCAGTAC
C.ledi LauR F56D 1C59KAA057 CTTTATTTGTATGATCAGTATTAATTACAGCTTTCCTTCTCCTGTTAGCTCTCCAGTAC
C.ledi LauR M2 1C52KAA097 CTTTATTTGTATGATCAGTATTAATTACAGCTTTCCTTCTCCTGTTAGCTCTCCAGTAC
C.ledi LauR M9 1D34KAA055 CTTTATTTGTATGATCAGTATTAATTACAGCTTTCCTTCTCCTGTTAGCTCTCCAGTAC
C.ledi LamR F11T 1C59KAA068 CTTTATTTGTATGATCAGTATTAATTACAGCTTTCCTTCTCCTGTTAGCTCTCCAGTAC
C.ledi LamR F53D 1D34KAA046 CTTTATTTGTATGATCAGTATTAATTACAGCTTTCCTTCTCCTGTTAGCTCTCCAGTAC
C.ledi LamR M1 1C52KAA093 CTTTATTTGTATGATCAGTATTAATTACAGCTTTCCTTCTCCTGTTAGCTCTCCAGTAC

```

```

          550      560      570      580      590      600
C.ledi SevJ F46T 1D34KAA007 TTGCAGGAGCTATCACAATACTACTAACTGATCGAAATATAAACACCACCTTTTTTGACC
C.ledi SevJ F22D 1AB2KAA062 TTGCAGGAGCTATCACAATACTACTAACTGATCGAAATATAAACACCACCTTTTTTGACC
C.ledi SevJ M7 1AB2KAA073 TTGCAGGAGCTATCACAATACTACTAACTGATCGAAATATAAACACCACCTTTTTTGACC
C.ledi LauR F1T 1C52KAA052 TTGCAGGAGCTATCACAATACTACTAACTGATCGAAATATAAACACCACCTTTTTTGACC
C.ledi LauR F56D 1C59KAA057 TTGCAGGAGCTATCACAATACTACTAACTGATCGAAATATAAACACCACCTTTTTTGACC
C.ledi LauR M2 1C52KAA097 TTGCAGGAGCTATCACAATACTACTAACTGATCGAAATATAAACACCACCTTTTTTGACC
C.ledi LauR M9 1D34KAA055 TTGCAGGAGCTATCACAATACTACTAACTGATCGAAATATAAACACCACCTTTTTTGACC
C.ledi LamR F11T 1C59KAA068 TTGCAGGAGCTATCACAATACTACTAACTGATCGAAATATAAACACCACCTTTTTTGACC
C.ledi LamR F53D 1D34KAA046 TTGCAGGAGCTATCACAATACTACTAACTGATCGAAATATAAACACCACCTTTTTTGACC
C.ledi LamR M1 1C52KAA093 TTGCAGGAGCTATCACAATACTACTAACTGATCGAAATATAAACACCACCTTTTTTGACC

```

```

          610      620      630
C.ledi SevJ F46T 1D34KAA007 CTGCAGGGGGAGGAGACCCATTTTTATATCAACACCTG
C.ledi SevJ F22D 1AB2KAA062 CTGCAGGGGGAGGAGACCCATTTTTATATCAACACCTG
C.ledi SevJ M7 1AB2KAA073 CTGCAGGGGGAGGAGACCCATTTTTATATCAACACCTG
C.ledi LauR F1T 1C52KAA052 CTGCAGGGGGAGGAGACCCATTTTTATATCAACACCTG
C.ledi LauR F56D 1C59KAA057 CTGCAGGGGGAGGAGACCCATTTTTATATCAACACCTG
C.ledi LauR M2 1C52KAA097 CTGCAGGGGGAGGAGACCCATTTTTATATCAACACCTG
C.ledi LauR M9 1D34KAA055 CTGCAGGGGGAGGAGACCCATTTTTATATCAACACCTG
C.ledi LamR F11T 1C59KAA068 CTGCAGGGGGAGGAGACCCATTTTTATATCAACACCTG
C.ledi LamR F53D 1D34KAA046 CTGCAGGGGGAGGAGACCCATTTTTATATCAACACCTG
C.ledi LamR M1 1C52KAA093 CTGCAGGGGGAGGAGACCCATTTTTATATCAACACCTG

```