

Piileekö salalantiainen (*Aphodius pedellus*) Suomessa?



Mirjami Smalén

Pro gradu -tutkielma

Ekologia ja evoluutiobiologia

Biotieteiden laitos

Helsingin yliopisto

huhtikuu 2012

Kannen salalantiaisen (*Aphodius pedellus*) on kuvannut Pekka Malinen.

Tiivistelmä

Valtaosa maapallon eliölajeista odottaa yhä tieteellistä kuvausta. Perinteisten menetelmien soveltaminen miljoonien nimeämättömien lajien kuvaamiseen on kuitenkin hidasta ja edellyttää enemmän taksonomista työvoimaa, kuin mitä todellisuudessa lienee koskaan saatavilla. Uutena ongelmana morfologisin menetelmin kuvattujen lajien sisältä on yhä enenevässä määrin paljastunut jopa useita piileviä eli kryptisiä lajeja, jotka eroavat merkittävästi muilta kuin ulkoisilta ominaisuuksiltaan. Ratkaisuksi näihin haasteisiin on ehdotettu DNA-taksonomiaa; lyhyiden, vakioitujen DNA-sekvenssien käyttöä uusien lajien tunnistamiseksi ja kryptisten lajien erottamiseksi. Tähän tarkoitukseen soveltuvaksi alueeksi eläimille on osoittautunut osa sytokromi c oksidaasi I (COI) -geeniä. Tutkielmassani tarkastelen DNA-taksonomian soveltuvuutta vastikään kuvattun, ulkoisin tuntomerkein vaikeasti eroteltavan lajiparin *Aphodius fimetarius* (pihalantiainen) ja *Aphodius pedellus* (salalantiainen) lajinmääritykseen. Kysyn: Onko näiden kromosomituntomerkein erotettujen lajien tunnistaminen mahdollista COI -geenin sekvenssierojen avulla? Voiko lajit tunnistaa aiemmin esitetyin ulkoisin tuntomerkein? Mikä on tutkimuslajien maailmanlaajuinen levinneisyys? Kumpi lajeista esiintyy Suomessa, ja millainen on tämän lajin geneettinen populaatiorakenne?

Selvittääkseni tutkimieni lantakuoriaisyksilöiden lajin käytin kahta geneettistä menetelmää: kromosomipreparaatteja ja COI-geenin sekvenssejä, sekä vähäisiin ulkoisiin tuntomerkkeihin perustuvaa määrityskaavaa. Selvitykseni salalantiaisen esiintymisestä Suomessa perustui kahteen koko maan kattavaan lantakuoriaisaineistoon, sekä itse Etelä- ja Länsi-Suomesta keräämääni aineistoon. Käytössäni oli myös museonäytteitä maailmalta, sekä GenBankissa julkaistuja COI-sekvenssejä.

COI-sekvensseissä havaitsemani erot jakoivat aineiston kahdeksi toisistaan merkittävästi eroavaksi lajiksi: lajien välillä oli 8,1 % ero emäsjärjestyksessä, mutta lajien sisältä löytyi vain vähän muuntelua (0,2–0,7 %). Sekvenssituntomerkit erottelivat salalantiaisen ja pihalantiaisen samoiksi lajeiksi kuin aiemmin kuvattut kromosomituntomerkit. Määrityskaava sijoitti yli puolet yksilöistä samoihin ryhmiin kuin sekvenssitkin, mutta monilla yksilöillä oli kummankin lajin tuntomerkkejä. Kehittämäni DNA-lajitunnisteet osoittivat, että Suomessa esiintyy tutkituista lajeista vain salalantiainen, ei pihalantiainen. COI-tuntomerkein tunnistin salalantiaisen ensimmäisenä täysin varmana havaintona myös Pohjois-Amerikasta sekä Nepalista. Suomessa tavatuista salalantiaisen 27 COI-haplotyypistä yksi on yleinen ja laajalle levinnyt, muut harvinaisempia ja levinneisyydeltään paikallisia. Suomalaisen haplotyypiverkoston tähtimäinen muoto viittaa siihen, että salalantiainen olisi vastikään nopeasti levittäytynyt uusille alueille.

Kokonaisuudessaan tulokset osoittivat DNA-lajitunnisteet tarkaksi työkaluksi piha- ja salalantiaisen erottelemiseksi. DNA-tuntomerkkien toimivuus perustuu siihen, että lajien välinen sekvenssivaihtelu on merkittävästi lajinsisäistä vaihtelua runsaampaa. Soveltamalla uutta tunnistustyökalua laajaan aineistoon osoitin yhden maamme yleisimmän kovakuoriaisen kuuluvan eri lajiin kuin aiemmin on oletettu, ja tämän lajin olevan maailmalla laajalle levinnyt. Ilman COI-sekvenssien tarjoamaa erottelukykä morfologiset tuntomerkit eivät olisi riittäneet asian selvittämiseen. Tulevaisuudessa olisi kiinnostavaa selvittää kehittämiäni tuntomerkkejä näiden lajien maailmanlaajuisen levinneisyyden entistä tarkempaan selvittämiseen. Vertailu kotimaiseen museoaineistoon voisi valaista, onko pihalantiainen kuitenkin joskus asuttanut maamme ja kenties joutunut väistymään nopeasti levittäytyvän sisarlajinsa tieltä. Tähän lajitunnisteet tarjoavat nopean ja varman keinon.

Avainsanat: pihalantiainen, *Aphodius fimetarius*, kryptiset lajit, DNA-sekvenssi, mitokondrio-DNA, COI, lajitunniste, haplotyyppi, karyotyyppi

Sisällys

Tiivistelmä

1. Johdanto	1
1.1 Kryptiset lajit	1
1.2 DNA-taksonomia	2
1.3 Tavoitteet	3
2. Aineisto ja menetelmät	3
2.1 Lajipari pihalantiainen ja salalantiainen	4
2.2 Mitä salalantiaisen levinneisyydestä tiedetään?	6
2.3 Tutkielman pohjana käytetty lantakuoriaisaineisto	6
2.3.1 Suomalaisaineisto	7
2.3.2 Maailmanlaajuinen aineisto	9
2.4 Määrittämisessä käytetyt tuntomerkit	10
2.4.1 Karyotyypit	10
2.4.2 COI-sekvenssit	11
2.4.3 Ulkoiset tuntomerkit	14
3. Tulokset	14
3.1 Pihalantiaisen ja salalantiaisen erottavat tuntomerkit	14
3.1.1 Karyotyypit	15
3.1.2 COI-sekvenssit	16
3.1.3 Ulkoiset tuntomerkit	19
3.2 Pihalantiaisen ja salalantiaisen maailmanlaajuinen levinneisyys	22
3.3 Salalantiaisen geneettinen populaatorakenne Suomessa	23
4. Tulosten tarkastelu	25
4.1 Pihalantiainen ja salalantiainen ovat hyviä lajeja	25
4.2 Miten pihalantiaisen ja salalantiaisen erottaa?	26
4.3 Missä pihalantiainen ja salalantiainen esiintyvät?	27
4.4 Mitä pihalantiaisen ja salalantiaisen sekvenssit kertovat?	28
4.5 Johtopäätökset	29
5. Kiitokset	30
6. Kirjallisuus	31
Liitteet	34

1. Johdanto

Tiedeyhteisön yli 250 vuoden ponnisteluista huolimatta vasta noin 1,7 miljoonaa eliölajia on kuvattu tieteellisesti (Costa & Carvalho 2010). Valtaosa planeettamme miljoonista lajeista odottaa siis yhä löytymistään. Ihminen kuitenkin kiihdyttää lukuisin tavoin sukupuuttotahtia (Jackson ym. 2001; Root ym. 2003), joten monet lajit saattavat kadota ennen kuin ehdimme saada niistä mitään tietoa. Vähimmäisvaatimuksena voisi pitää yksiselitteisen nimen antamista jokaiselle eliökunnan lajille. Eliöiden nimeämistyö vaatisi kuitenkin valtavan määrän taksonomista asiantuntemusta, sillä yksistään hyönteisiä lienee lähes 10 miljoonaa lajia (esim. Novotny ym. 2007). Erityisesti huonosti tunnettujen, sekä kaikkein lajirikkaimpien elinympäristöjen jokaisen kasvi- ja eläinlajin kuvaaminen morfologisin perustein on epärealistinen tavoite (Valentini ym. 2008). On myös huomattu, että joissain tapauksissa morfologiset tuntomerkit eivät tarjoakaan luotettavaa keinoa lajirajojen määrittelyyn — jo tunnetut lajit voivatkin muodostua jopa useista samannäköisistä lajeista (esim. Knowlton 1993; Manguin ym. 2007; Lumley & Sperling 2010).

1.1 Kryptiset lajit

Kryptiset lajit ovat ulkomuodoltaan lähes identtisiä, mutta todellisuudessa erillisiä eliölajeja, jotka on virheellisesti luokiteltu saman lajinimen alle (Bickford ym 2006; Detwiler ym. 2010). Tällaisten piilo- eli kryptisten lajien erottaminen morfologisin perustein toisista samannäköisistä lajeista on usein hankalaa, ellei joissain tapauksissa lähes mahdotonta (esim. Colborn ym 2001). Morfologisten tuntomerkkien käyttö on ongelmallista etenkin sellaisilla lajeilla, joilla fenotyypinen plastisuus on suurta erilaisten ympäristötekijöiden, kuten ravinnonsaannin seurauksena (Tan ym. 2009). Joidenkin kryptisten lajien tiedetään eriytyneen jo miljoonia vuosia sitten ilman havaittavien morfologisten tai edes ekologisten erojen muodostumista (Colborn ym. 2001). Erään arvion mukaan yli 2000 nisäkäslajia on tunnistamatta, sillä perinteinen morfologinen lajikäsité ei kykene erottelemaan niitä (Baker & Bradley 2006). Kryptisten lajien löytyminen voi muuttaa tietojamme jo hyvin tunnettuina pidettyjen lajien ekologiasta, kuten niiden levinneisyydestä ja runsaudesta, sekä suojelun tarpeesta (Ashrafi ym. 2010). Niin voi käydä mikäli laajalle levinnyt ja yleinen laji koostuu todellisuudessa useista paikallisemmista lajeista (Hebert ym. 2004). Kryptiset lajit voivat paljastua aivan sattumalta esimerkiksi kromosomitutkimusten yhteydessä (Wilson 2001; Falahee & Angus 2010). Tosin yhä useammin näitä piilolajeja osataan jo etsiä tiettyjä geenialueita vertailemalla

(Fontaneto ym. 2010; Kaartinen ym. 2010). Tavallisesti kryptisten lajien vähäiset morfologiset erot huomataan vasta kun lajit on ensin erotettu jonkin muun ominaisuuden perusteella (Glaw & Vences 2002). Silloinkin ulkoiset tuntomerkit lajien välillä voivat mennä osittain päällekkäin, jolloin erotteluanalyysi usealla morfologisella muuttujalla voi osoittautua tehokkaaksi välineeksi (Ashrafi ym. 2010; Lumley & Sperling 2010).

1.2 DNA-taksonomia

Edellä kuvailtujen ilmiöiden valossa on selvää, että maapallon lajirikkauden selvitys vaatii aiempaa tehokkaampia menetelmiä. DNA-sekvenssien vaihtelu tarjoaa monenlaisia menetelmiä lajiutumisen ja lajirajojen tutkimiseen. Erityisesti viimeisen kahden vuosikymmenen aikana DNA-sekvensointi on kehittynyt yhä nopeammaksi ja edullisemmaksi menetelmäksi (Dasmahapatra & Mallet 2006). Nämä edistysaskeleet ovat johtaneet siihen, että useat genomiprojektit ovat ansiokkaasti selvittäneet joidenkin mallilajien koko genomien sekvenssijärjestyksen (Costa & Carvalho 2010). Nykyään automatisoidut sekvensointikoneet voivat tuottaa noin tuhat tuhannen emäsparin pituisia sekvenssiä päivässä. Tulevaisuudessa yleistynevät niin sanotut seuraavan sukupolven sekvensointikoneet, jotka käsittelevät vähintään satoja tai tuhansia näytteitä samanaikaisesti (Valentini ym. 2008).

DNA-taksonomian idea perustuu lyhyiden, vakioitujen DNA-sekvenssien käyttöön uusien lajien tunnistamiseksi ja kryptisten lajien erottamiseksi (Hebert ym. 2003a; Valentini ym. 2008). DNA-taksonomian pohjalta on käynnistetty laaja hanke tarkoituksena tuottaa yksilölliset lajitunnisteet kaikille maapallon eukaryoottilajeille (Barcode of Life -hanke 2012). Lajitunnisteita on 12.3.2012 mennessä kertynyt jo yli 1,5 miljoonalle lajille (Ratnasingham & Hebert 2007). Utta ja osin kiistanalaistakin on idea käyttää pientä aluetta yhdestä tietystä geenistä taksonomisesti laajalle eliöjoukolle (Dasmahapatra & Mallet 2006). Näiden suhteellisen lyhyiden DNA-sekvenssien on kuitenkin osoitettu sisältävän riittävästi muuntelua luotettavan lajinmäärityksen saamiseksi (Hebert ym. 2003a; Costa & Carvalho 2010; Fontaneto ym. 2010).

DNA-pohjaisilla lajitunnisteilla on jo havaittu olevan useita etuja sekä sovelluksia: Toisin kuin useimmissa määrityskaavoissa, elämänkierron eri vaiheissa olevat yksilöt voidaan tunnistaa, eliöiden fenotyypin plastisuus ei tuota ongelmia ja uusia kryptisiä taksononeita voi löytyä (Hebert ym. 2003a). Menetelmä soveltuu myös monenlaiseen ekologiseen tutkimukseen, kuten lajikoostumuksen selvittämiseen eri-ikäisistä ympäristönäytteistä (Valentini ym. 2008), tai lajien välisten troofisten suhteiden paljastamiseen ravintoverkoissa (Kaartinen ym. 2010).

Eläimille hyvin soveltuvaksi lajitunnisteeksi on osoittautunut mitokondriossa sijaitsevan sytokromi *c* oksidaasi 1 -geenin (COI) alkuosa (esim. Folmer ym. 1994; Valentini ym. 2008). Lähes poikkeuksetta lajien välinen vaihtelu COI-geenin emäsjärjestyksessä on lajinsisäistä sekvenssivaihtelua suurempaa (esim. Hebert ym. 2003b). Ainoastaan sienieläimille ja eräille polttiaiseläimille soveltuvaa geeniä vielä etsitään (Costa & Carvalho 2010). COI-geenialueen monistamiseen on kehitetty monilla taksonilla toimivia alukkeita (esim. Folmer ym. 1994).

1.3 Tavoitteet

Tässä tutkielmassa tarkastelen DNA-pohjaisten lajitunnisteiden käyttökelpoisuutta kryptisten lajien erotteluun. Esimerkkinä käytän lajiparia *Aphodius fimetarius* ja *Aphodius pedellus*, ja kysyn: Onko näiden kromosomituntomerkein erotettujen lajien tunnistaminen mahdollista COI-geenin sekvenssierojen avulla? Entä voidaanko lajit aidosti tunnistaa aiemmin esitetyin ulkoisin tuntomerkein? Mikä on tutkimuslajien maailmanlaajuinen levinneisyys? Kumpi lajeista esiintyy Suomessa, ja millainen on tämän lajin geneettinen populaatorakenne?

2. Aineisto ja menetelmät

Pihalantiainen *Aphodius fimetarius sensu lato* (Linnaeus, 1758) on yleinen kovakuoriainen, joka esiintyy koko palearktisella, orientaalisella sekä australialaisella alueella (Dellacasa & Dellacasa 2003). Se esiintyy myös tulokkaana eteläisessä Kanadassa, kaikkialla Yhdysvalloissa sekä Pohjois-Meksikossa. Pihalantiainen lienee yleisimpiä lantakuoriaisia niin Pohjois-Amerikassa (Gordon & Skelley 2007) kuin Euroopassakin (Tomas Roslin, Maataloustieteiden laitos, Helsingin yliopisto, keskustelu toukokuussa 2011). Suomessa sitä tavataan lähes koko maassa aivan pohjoisinta Lappia lukuun ottamatta (Roslin & Heliövaara 2009).

Kooltaan pihalantiainen edustaa *Aphodius*-suvun keskikokoaa (5,5–8,2 mm). Tämän mustaselkäisen ja punasiipisen kovakuoriaisen voi tavata mitä moninaisimmista elinympäristöistä: pihalantiainen viihtyy niin lehmän-, hevosen- kuin riistaeläintenkin lannassa. Lisäksi sille kelpaavat raadot sekä lahoava kasviaines (Roslin & Heliövaara 2009). Pihalantiaisen on havaittu lisääntyvän menestyksekkäästi jopa perunalla (Gordon & Skelley 2007). Lähes kaikista muista lantakuoriaisistamme poiketen pihalantiaisen voi löytää vuoden vanhasta, jo kuivahtaneesta

lannasta ja toukat voivat ilmeisesti kehittyä hyvin eri-ikäisissä läjissä. Se ei siis ole lisääntymispaikkansa suhteen valikoiva, mutta mitä avoimempi ympäristö, sitä runsaammin yksilöitä sieltä yleensä löytyy. Pihalantiainen tuottaa useita sukupolvia vuodessa, ja niinpä aikuisia yksilöitä voi tavata kaikkina vuodenaikoina. Suurimmat esiintymät ajoittuvat kuitenkin alkukesään ja syksyyn. Pihalantiaiset talvehtivat useimmiten aikuisina, vaikka muutkin kehitysasteet pystyivät talvehtimaan (Roslin & Heliövaara 2009).

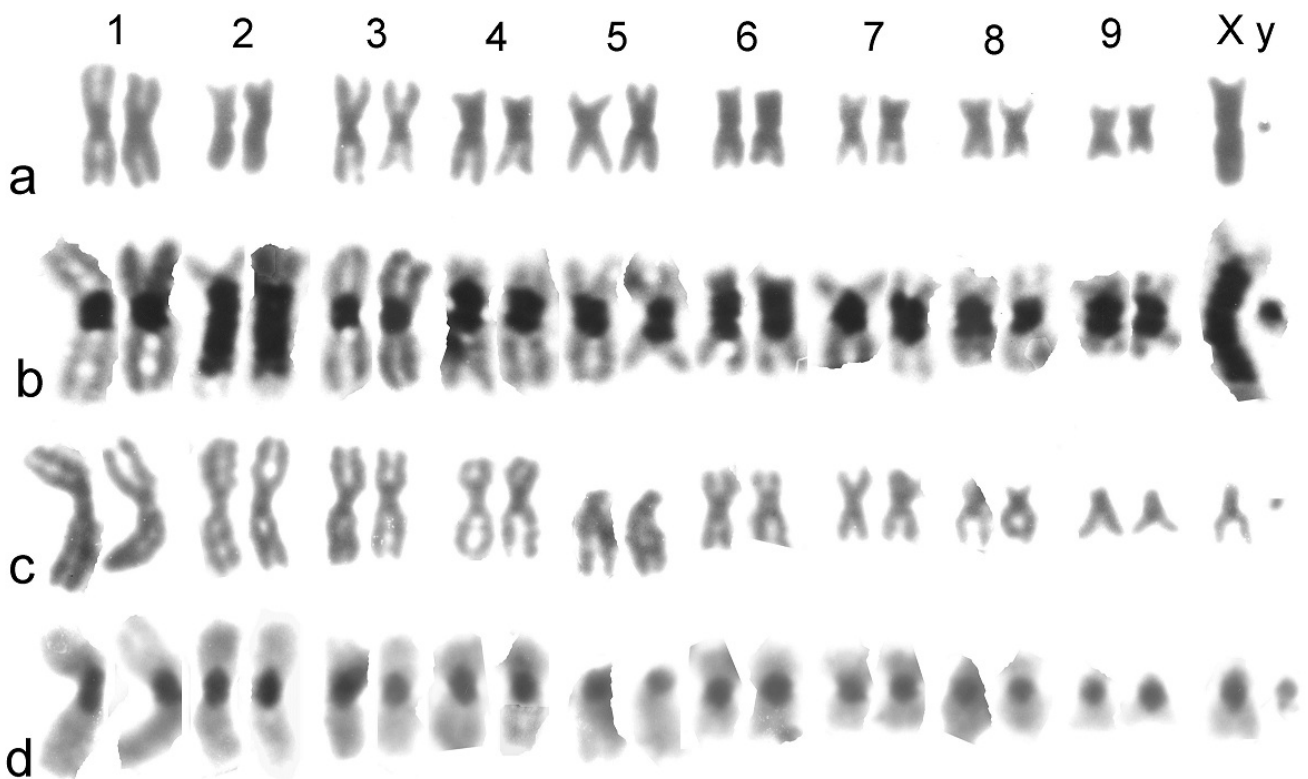
2.1 Lajipari pihalantiainen ja salalantiainen

Pihalantiaisesta *sensu stricto* on hiljattain erotettu sisarlaji, joka nimettiin suomeksi salalantiaiseksi (Roslin & Heliövaara 2007). Salalantiaisen tieteelliseksi nimeksi valittiin *Aphodius pedellus* (DeGeer 1774), koska lajin *A. fimetarius* vanhin synonyymi on *Scarabaeus pedellus* DeGeer (Wilson 2001). Uusi laji paljastui yllättäen, kun jatko-opiskelija Christine Wilson valmisti preparaatteja erinäisten lantakuoriaislajien kromosomistoista. Tällöin hän huomasi englantilaisten pihalantiaisnäytteiden sisältävän kahta, huomattavasti toisistaan poikkeavaa, karyotyyppiä (Wilson 2001, kuva 1). Valtaosa alan tutkijoista pitää jo salalantiaista omana lajina (T. Roslin, keskustelu keväällä 2011), mutta lajinimien synonymisointiakin on puollettu (Bordat 2002).

Vaikka piha- ja salalantiainen esiintyvät säännöllisesti rinnakkain (Wilson 2001; Jason Maté, Hyönteistieteen osasto, Lontoon luonnonhistoriallinen museo, sähköpostikeskustelu 11.3.2011), niiden risteytymisestä ei ole löytynyt mitään merkkejä. Hybridiyksilön karyotyypissä yhdistyisivät molempien lajien tunnusomaiset piirteet, joten sellainen olisi helppo huomata. Tämä on Wilsonin ja Angusin (2004) mukaan yksi painavimpia todisteita sille, että *A. fimetarius* ja *A. pedellus* ovat erillisiä lajeja. Wilson (2001) kuvailee myös useita lajit erottavia ulkoisia tuntomerkkejä, mutta niiden toimivuus on asetettu kyseenalaiseksi (esim. Bordat 2002).

Tietolaatikko 1. Karyotyypit

Karyotyypillä tarkoitetaan mitoosin metafaasivaiheen kromosomiston rakenteellisia ominaisuuksia. Niitä ovat esimerkiksi kromosomien lukumäärä, koko ja morfologia. Karyotyypianalyysiä varten solut aktivoidaan jakautumaan, minkä jälkeen mitoosi keskeytetään. Seuraavaksi metafaasivaiheen kromosomit erotellaan ja valokuvataan. Erinäköisiä kromosomeja jaotellaan sentromeerin sijainnin perusteella: Jos sentromeeri sijaitsee kromosomin keskivaiheilla, puhutaan **meta-** ja **submetasentrisistä** kromosomeista. Sen sijaan **akro-** tai **subakrosentrisissa** kromosomeissa sentromeeri sijaitsee lähellä kromosomin toista päätä. Mikäli karyotyypitutkimuksessa halutaan saada näkyviin muitakin tuntomerkkejä, kromosomit voidaan värjätä jollain monista raitavärjäysmenetelmistä. Esimerkiksi C-värjäys paljastaa **heterokromatiinisegmenttejä**. **B-kromosomit** ovat kromosomiston ylimääräisiä elementtejä, eivätkä ne yleensä sisällä aktiivisia geenejä. Niitä pidetään eräänlaisina DNA:n loisina, joiden alkuperä on epäselvä ja luultavasti vaihteleva. Geneettisesti vaimennettujen B-kromosomien esiintyminen on kovakuoriaisilla melko tavallista ja usein B-kromosomit muuttuvat evoluution kuluessa lopulta heterokromatiiniksi.



Kuva 1. Pih- ja salalantiaisen karyotyypit. Karyotyypit a ja b kuuluvat pihalantiaiselle, c ja d salalantiaiselle. Kromosomit on lajiteltu preparaateista vastinkromosomipareiksi. Pihalantiaisen kromosomit ovat aina metasentrisiä tai submetasentrisiä (Tietolaatikko 1). Salalantiaisella kromosomit 5, 8 ja 9 ovat akro- tai subakrosentrisiä (vertaa pihalantiaista a ja salalantiaista c). Pihalantiaisella 2. kromosomissa ja X-kromosomissa näkyy leveät C-raidat (b), jotka salalantiaiselta puuttuvat (d). Salalantiaisen suuret X- ja 2-kromosomit ovat kaventuneet sentromeerin kohdalta. Pihalantiaisella samojen kromosomien käsivarret ovat ”liimautuneet” yhteen heterokromatiiniosien pituudelta, jolloin kaventuminen ei ole yhtä selvää. Salalantiaiselta voidaan löytää myös yhdestä kahteen B-kromosomia: Ne ovat kooltaan ja muodoltaan 6. ja 7. autosomin kaltaisia, mutta käsivarsien päät ovat lähellä toisiaan. Kuvan salalantiaisella B-kromosomeja ei ole. Kuva Robert Angus.

2.2 Mitä salalantiaisen levinneisyydestä tiedetään?

Salalantiainen on tähän mennessä tavattu Ison-Britannian lisäksi Ranskasta, luultavasti Itä-Siperiasta (Wilson 2001), Espanjasta (Wilson & Angus 2004), Italiasta, Slovakiasta ja Sloveniasta (Whitehead 2006). Robert Angusin saamien tietojen mukaan ruotsalainen laji olisi salalantiainen, mitä tukee myös hänen hiljattain kromosomein varmistamansa havainnot Öölannista. Hän arvelee myös suomalaisen lajin luultavimmin olevan salalantiainen (R. Angus, Biologinen tiedekunta, Lontoon yliopisto, sähköpostikeskustelu 31.5.2011). Wilson (2001) on tulkinnut Virkin (1951) piirroksen suomalaisen yksilön kromosomistosta kuuluvan salalantiaiselle. Todellinen tilanne on kuitenkin tutkimatta. Myös Amerikan mantereen osalta salalantiaisen esiintyminen on pysynyt arvoituksena: Pohjois-Amerikan Aphodiinae-lajistoa koskevassa selvityksessä Gordon ja Skelley (2007) viittaavat lajiparin piha- ja salalantiainen muuttuneeseen luokitteluun, mutta käsittelevät lajit varmuuden vuoksi edelleen toistensa synonyymeinä. Kirjassaan he eivät silti sulje pois mahdollisuutta molempien karyotyypin esiintymisestä Pohjois-Amerikassa. Amerikkalaiseen museoaineistoon tutustuttuaan Wilson (2001) arvioi morfologian perusteella kaikkien yksilöiden luultavimmin olevan salalantiaisia. Vuonna 2004 kuitenkin havaittiin Kaliforniasta elävänä kerättyjen yksilöiden olevan kromosomistoiltaan pihalantiaisia (Wilson & Angus 2004). Pihalantiainen on löytynyt hiljattain myös Koloradon osavaltioista (R. Angus, sähköpostikeskustelu 26.10.2011).

2.3 Tutkielman pohjana käytetty lantakuoriaisaineisto

Kokosin laajan aineiston piha- ja salalantiaisen muodostamasta lajiparista kolmeen käyttötarkoitukseen: kromosomipreparaattien valmistamiseen, COI- sekvenssien tuottamiseen geneettisten lajitunnisteiden testaamiseksi, sekä Whiteheadin (2006) esittämien morfologisten tuntomerkkien tarkastelemiseen. Koska tavoitteenani oli selvittää kattavasti salalantiaisen mahdollinen esiintyminen Suomessa, tarvitsin suuren määrän yksilöitä eri puolilta maata. Tarkoitusta varten sain käyttöön vuosina 2008 ja 2011 kerätyt laajat lantakuoriaisaineistot. Lisäksi keräsin runsaasti täydentävää aineistoa kesäkuussa 2011. Saadakseni lisäselvyyttä lajien maailmanlaajuiseen levinneisyyteen tarkastelin myös ulkomailta kerättyjä piha- ja salalantiaisia.

Lantakuoriaisten etsimiseen käyttämäni keruumenetelmä on yksinkertainen, mutta erittäin tehokas (Roslin & Heliövaara 2009: 57–62): Laitumelta valitaan sopivanikäisiä, mieluiten kolmesta viiteen päivään vanhoja lehmänläjiä. Ne lapioidaan yksitellen noin 10-litraisiin, vedellä

täytettyihin ämpäreihin niin, että läjä jää kokonaan pinnan alle. Lannassa elävät hyönteiset nousevat pintaan, josta kohdelajit on helppo poimia talteen. Koska piha- tai salalantiaiset viihtyvät usein syvällä lannan sisällä tai läjän alapinnalla (ja kaivautuvat etenkin sadesäällä myös maahan lannan alle), niiden löytymiseksi täytyy näytteeseen yleensä kuopaista mukaan myös ohuelti maata.

2.3.1 Suomalaisaineisto

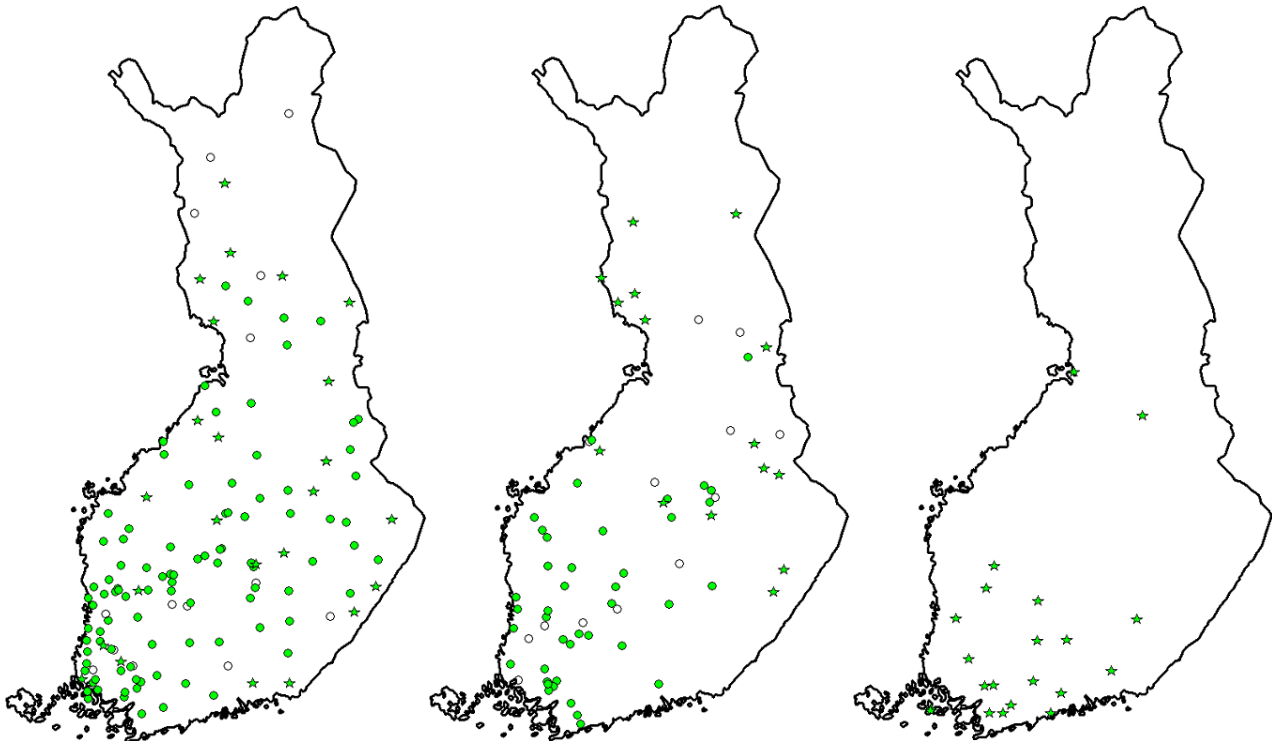
LANTAKUORIAISHANKKEET 2008 JA 2011 – Selvittääkseni tutkimuslajien levinneisyydet Suomessa, käytin kahta laajaa lantakuoriaisaineistoa. Ensimmäinen perustui kesällä 2008 toteutettuun maanlaajuiseen hankkeeseen, jossa kerättiin lantakuoriaisia 133 tilalta ympäri Suomen. Keruun tulos, yli 12 000 lantakuoriaista, on ollut pohjana selvityksille maatalouden muutosten vaikutuksista suomalaisen lantakuoriaislajistoon (Lantakuoriaiset 2012). Vuoden 2008 aineisto loi ainutlaatuisen pohjan työlleni, sillä piha- tai salalantiaisia löydettiin 119 tilalta ja kaikkiaan 2820 yksilöä. Aineiston yksilöt säilöttiin keruupaikoilla denaturoituun etanoliin ja postitettiin välittömästi Helsinkiin, jossa säilytysneste vaihdettiin puhtaaseen etanoliin. Alustavien laboratoriotulosten perusteella kuitenkin huomasimme, että säilytysnesteeseen sisältyvä denaturointiaine voi aiheuttaa ongelmia sekä DNA:n eristyksessä että monistamisessa. Myös säilytysputken tilavuuteen nähden suuri yksilömäärä voi heikentää DNA:n säilymistä. Siksi valikoin loput sekvensoitavat yksilöt sellaisista säilytysputkista, joissa oli vähän yksilöitä. Tämän aineiston läpikäyminen antoi tärkeää tietoa morfologisten tuntomerkkien käyttämisestä lajien erottelussa.

Toinen käyttämäni aineisto koostui kesällä 2011 kerätystä lantakuoriaisista. Lähes koko Suomen kattavalla hankkeella testattiin lantakuoriaislajiston vaikutusta lehmänlajien hajoamiseen laitumilla (Lantakuoriaiset 2012). Sain käyttööni aineiston piha- tai salalantiaiset (829 yksilöä, yhteensä 56 tilalla) täydentämään selvitystäni salalantiaisen esiintymisestä Suomessa. Tämä aineisto oli 2008 vuoden tapaan alun perin säilötty denaturoituun alkoholiin, mutta näytteet oli siirretty vieläkin nopeammin puhtaaseen alkoholiin Helsingissä. Kattavan levinneisyystiedon saavuttamiseksi valikoin näytteitä lähinnä Itä- ja Pohjois-Suomesta (Kuva2). Kultakin tilalta valitsin sekvensoitavaksi keskimäärin kaksi yksilöä.

KESÄLLÄ 2011 KERÄTTY OMA AINEISTO – Vuoden 2008 aineistosta saadut DNA-pitoisuudet osoittautuivat monissa tapauksissa alhaisiksi. Siksi päätin kerätä täydentävää aineistoa kesällä 2011. Keräsin piha- tai salalantiaisia aikavälillä 15.–16.6. sekä 18.–19.6. mahdollisimman laajalta alueelta ympäri Etelä- ja Länsi-Suomea. Valikoin tutkitut tilat pääasiassa sillä perusteella, että niistä oli

vuoden 2008 näytteenotossa löytynyt runsaasti piha- tai salalantiaisia. Saavuttaakseni maantieteellisesti kattavan näytteenoton valitsin myös muutaman lisätilan vuonna 2008 vähemmän tutkituilta alueilta (Kuva 2). Keräsin tutkimiltani tiloilta mahdollisuuksien mukaan kymmeniä yksilöitä; vain harvoissa tapauksissa kohdelajien yksilöitä löytyi vähemmän. Osan yksilöistä löysin lantaläjän alta maata kaivamalla ja eräältä tilalta keräsin yksilöitä myös hevosenlannasta. Säilöin löytämäni lantiaiset keruupaikalla puhtaaseen etanoliin.

Kävin mikroskoopin avulla läpi koko keräämäni aineiston ja valikoin kustakin paikasta ulkonäöltään mahdollisimman erilaisia yksilöitä sekvensoitavaksi. Sisällytin sekvensoitavien yksilöiden joukkoon myös ulkoisten tuntomerkkien perusteella vaikeasti määritettäviä yksilöitä, eli sellaisia kovakuoriaisia, joiden tuntomerkit sopivat osittain kumpaankin lajiin. Näin pääsin arvioimaan, toimiiko sekvenssitietoon perustuva lajinmääritys perinteistä määrittäyskaavaa paremmin näissä epäselvissä tapauksissa (luku 3.1.3). Jotta otos olisi maantieteellisesti mahdollisimman kattava (Kuva 2), pyysin vielä lisäyksilöitä oululaiselta kovakuoriaistutkijalta, Mikko Pentinsaarelta. Hän lähetti kesän aikana (15.6.–21.8.2011) keräämiään lantiaisia Oulusta sekä Paltamosta. Kromosomipreparaattien valmistusta varten Riikka Kaartinen ja Ika Österblad keräsivät 5.–10.9.2011 eläviä yksilöitä Korppoosta Wattkastin saarelta.



Kuva 2. Lajiparin pihalantiainen/salalantiainen levinneisyys vuosina 2008 (vasemmalla; n=133 tilaa), 2011 (keskellä; n=86 tilaa) ja 2011 (oikealla; n=21 tilaa) kerätyissä lantakuoriaisaineistoissa. Näytteitä otettiin tarkasti vakioituin menetelmin kaikilta kuvaan merkityiltä mautiloilta. Tyhjät ympyrät ovat tiloja, joilta ei näytteenotossa löytynyt piha- tai salalantiaisia, täytetyt symbolit sellaisia joilta löytyi tämän lajiparin edustajia. Tähdet edustavat tiloja, joilta valitsin yksilöitä DNA-sekvensointiin.

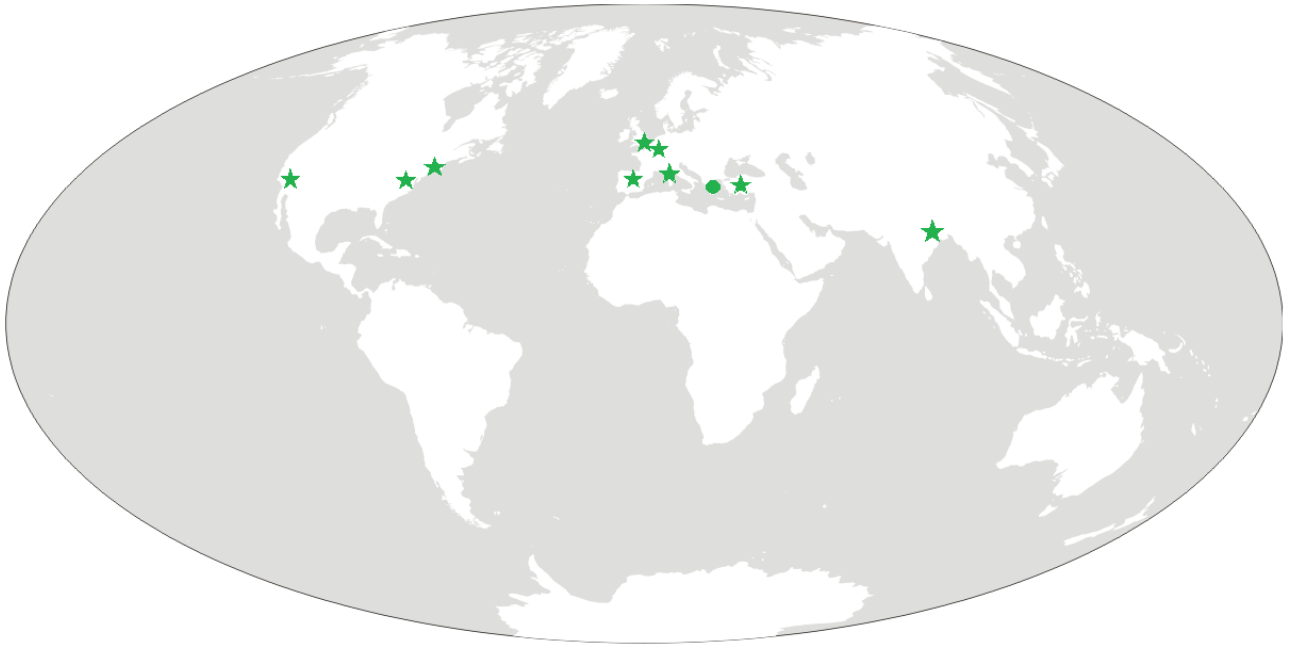
2.3.2 Maailmanlaajuinen aineisto

Saadakseni käsityksen piha- ja salalantiaisen lajinsisäisestä muuntelusta käytin Jason Matén (Hyönteistieteen osasto, Lontoon luonnonhistoriallinen museo) lähettämiä yksilöitä. Tarkastelin aineiston avulla määrityskaavassa (Whitehead, 2006) esitettyjä morfologisia lajituntomerkkejä, sekä valikoin useita yksilöitä sekvensoitavaksi geneettisten lajitunnisteiden tuottamiseksi.

Vertailuaineisto sisälsi piha- ja salalantiaisia enimmäkseen Espanjasta mutta myös muualta maailmasta. Valitsin sekvensoitavaksi kymmenen yksilöä Espanjasta (Madrid ja Guijuelo), kaksi Turkista (Ihsaniye), yhden Nepalin vuoristosta (Phakding, 2460 m), viisi Pohjois-Amerikasta (New York, Länsi-Virginia ja Kalifornia) sekä kaksi Christine Wilsonin (2001) kromosomituntomerkein määrittämää pihalantiaista Isosta-Britanniasta (Camber). Lisäksi sain tutkittavaksi kaksi kreikkalaista museonäytettä Olof Biströmiltä (Eläinmuseo, Luonnontieteellinen keskusmuseo, Helsingin yliopisto), joita tarkastelin vain ulkoisten tuntomerkkien osalta.

KARYOTYYPITETTY KORSIKALAIKSIKSI – Nähdäkseni, erottelevatko DNA-sekvenssit ja kromosomituntomerkit yksilöt samoiksi lajeiksi, halusin sekvensoida sekä piha- että salalantiaisiksi karyotyypitettyjä yksilöitä. Aineistossani ei kuitenkaan ollut yhtään kromosomituntomerkein varmistettua salalantiaista. Siksi Robert Angus lähetti pyynnöstäni karyotyypittämänsä korsikalaisen salalantiaisen. Näin sain tutkittavakseni yksilön, joka oli varmistettu salalantiaiseksi samalla menetelmällä jolla laji oli alun perinkin löydetty ja johon muun aineiston COI-sekvenssejä voitiin myöhemmin verrata. Yksilö tarjosi myös arvokkaan lisän ulkoisten tuntomerkkien tarkastelua varten.

JULKAISTUT SEKVENSIT – Kullakin sekvenssillä on GenBankin® tietokannassa yksilöllinen tunnisteensa. Löysin GenBankista neljä Jason Matén ja Alfried Voglerin julkaisemaa COI-sekvenssiä (Benson ym. 2006 [tunnisteet AY132533.1, AY132532.1, AY132527.1 ja EF487730.1]). Löytääkseni aineistoani vastaavia COI-sekvenssejä tein GenBankista haun myös Geneious-ohjelmalla. Näin pyrin saamaan lisää tietoa piha- ja salalantiaisen välisestä geneettisestä etäisyydestä, maailmanlaajuisesta levinneisyydestä sekä populaatorakenteesta.



Kuva 3. Tutkielmassa käyttämäni maailmanlaajuinen aineisto. Kartassa tähdet merkitsevät paikkoja joista valikoin yksilöitä DNA-sekvensointiin (USA, Iso-Britannia, Espanja, Turkki, Korsika ja Nepal) tai joista oli julkaistu valmis COI-sekvenssi GenBankissa® (Saksa). Ympyrällä on merkitty pelkän määrityskaavan avulla tarkasteltuja yksilöitä (Kreikka). Kartta on muokattu sivustolta <http://www.freeworldmaps.net/>.

2.4 Määrittäksessä käytetyt tuntomerkit

Selvittääkseni tutkimieni lantakuoriaisyksilöiden laji-identiteetit käytin kolmea toisiaan täydentävää menetelmää: kahta geneettisiin tuntomerkkeihin perustuvaa menetelmää 1a) lajien välisiä kromosomieroja ja 1b) COI-geenin sekvenssejä sekä 2) vähäisiin ulkoisiin tuntomerkkeihin perustuvaa ”perinteistä” määrityskaavaa.

2.4.1 Karyotyypit

Todistaakseni kumpaa lajia suomalaiset lantiaiset edustavat, lähetin yhdeksän elävää piha- tai salalantiaista Englantiin kromosomipreparaatteihin erikoistuneelle Robert Angusille. Kuusi yksilöä (neljä koirasta ja kaksi naarasta) oli kerätty lehmänlannasta ja kolme hirvenlannasta (yksi koiras ja kaksi naarasta). Säilytin lantiaisia jääkaapissa kostealla talouspaperilla täytetyissä pakasterasioissa Lontooseen lähettämiseen saakka. Viisi karyotyypitettyä suomalaisyksilöä jäi Lontoon luonnonhistoriallisen museon kokoelmiin, muut neljä palautettiin lapuille liimattuina Suomeen

sekvensoitavaksi. Näin saimme COI-sekvenssit karyotyypitetystä suomalaisyksilöistä, johon vertasimme myöhemmin muuta suomalaisaineistoa. Robert Angusin soveltamat karyotyypiselvityksen työvaiheet on julkaistu kirjassa *Coleopterist's Handbook* (Angus 2006).

2.4.2 COI-sekvenssit

Varmistin DNA-menetelmin, onnistuiko lajintunnistus määrityskaavan (Whitehead 2006) tuntomerkkien perusteella. Monistimme ja sekvensoimme COI-geenistä 710 emäsparin pituisen alueen (Folmer ym. 1994). Laboratoriotöissä minua avusti Andreia Miraldo Metapopulaatiobiologian huippuyksiköstä.

DNA-ERISTYS – Valitsin DNA-eristykseen ja mitokondriaalisen COI-kohdegeenin sekvensointiin yhteensä 190 piha- tai salalantiaista. Eristin DNA:ta lantiaisten päästä ja keskiruumiista, mukaan lukien etummaisesta raajaparista (Liite 1). Uputin lantakuoriaisyksilöistä erottelemani kudokset 1,5 ml Eppendorf-putkissa nestemäiseen tyypeen ja murskasin ne mekaanisesti mahdollisimman hienojakoisiksi, jotta solukalvot hajottava entsyymi pääsisi vaikuttamaan kaikkialle kudokseen. Eristin DNA:n käyttämällä kaupallista NucleoSpin[®] Tissue -eristyspakkausta (Macherey-Nagel, Düren, Saksa). Jätin näytteet yön yli 56 °C:een, jotta proteinaasi-K -entsyymi ehtisi varmasti toimia. Eristyspakkauksen ohjeesta poiketen inkuboin näytteitä huoneenlämmössä yhden minuutin sijaan noin neljä minuuttia DNA-eristyksen viimeisessä vaiheessa. Eristyksen jälkeen mittasin DNA-pitoisuuden ja -puhtauden NANODROP 2000 -spektrofotometrillä (Thermo SCIENTIFIC), NanoDrop 2000/2000c -ohjelmalla (Thermo Fisher SCIENTIFIC Inc., Waltham, MA, USA).

POLYMEERAASIKETJUREAKTIO – 710 emäsparin pituisen mitokondriaalisen COI-alueen monistamiseen käytin lukuisilla selkärangattomilla toimivia alukkeita: LCO1490 (5'-ggtaacaaatcataaagatattgg-3') ja HCO2198 (5'-taaacttcagggtgaccaaataatca-3'; Folmer ym. 1994). Samoja alukkeita on käytetty menestyksellä myös madagaskarilaiseen lantakuoriaislajistoon (Andreia Miraldo, keskustelu kesäkuussa 2011). Niiden muutamien yksilöiden kohdalla, joilla geenin monistaminen ei ensimmäisellä alukeparilla onnistunut, käytimme alukkeita F₁-Brent ja R₁-Brent. Reaktiutilavuus 20 µl sisälsi 13,3 µl vettä (Milli-Q®), 2,0 µl reaktiopuskuria, 1,6 µl vapaita nukleotideja (dNTP Mix, Finnzymes, Thermo SCIENTIFIC), 1 µl (10 µM) molempia alukkeita, 0,1 µl DNA-polymeraasientsyymiä (KAPATaq, KAPABIOSYSTEMS, Woburn, MA, USA) sekä 1 µl DNA:ta. Niissä tapauksissa joissa DNA-pitoisuus oli hyvin alhainen, käytin reaktiossa 2 µl DNA:ta

ja vähensin vastaavasti veden määrää 12,3 mikrolitraan. Varmistaakseni, ettei näytteissä esiintynyt kontaminaatiota, sisällytin PCR-reaktioon mukaan myös negatiivisen kontrollin. Kontrolli sisälsi samat reagenssit kuin varsinaiset näytteetkin, mutta DNA:n tilalla oli vettä (Milli-Q®).

Polymeraasiketjureaktion vaiheet on lueteltu taulukossa 1.

Taulukko 1. Polymeerasiketjureaktion vaiheet

-
- 1) Inkubointi 95 °C 4 minuuttia
 - 2) Inkubointi 95 °C 1 minuutti
 - 3) Inkubointi 49 °C 30 sekuntia
 - 4) Inkubointi 72 °C 1 minuutti
 - 5) 2-, 3- ja 4-vaiheen toistaminen 39 kertaa
 - 6) Inkubointi 72 °C 3 minuuttia
 - 7) Inkubointi 15 °C kunnes siirto jääkaappiin (4°C) seuraavia käsittelyjä varten.
-

Varmistin halutun geenialueen monistumisen 1 % agaroosigeelielektroforeesin avulla. Samalla tarkistin negatiivisen kontrollin, joka oli kaikissa tapauksissa puhdas. Poistimme jäljelle jääneet nukleotidit ja alukkeet PCR-tuotteista ExoSAP-IT® - puhdistuspakkauksella (USB® Products, Affymetrix®, Inc., Santa Clara, CA, USA). Käytimme puhdistusliuosta ohjeessa mainittua pienemmässä suhteessa (10 µl PCR-tuotetta + 1 µl liuosta); muuten toimimme pakkauksen ohjeen mukaan.

SEKVENSOINTI – Sekvensointireaktiossa käytimme BigDye® Terminator v1.1 -pakkausta ohjeen mukaan (Applied Biosystems™, Carlsbad, CA, USA). PCR-tuotteiden voimakkuudesta riippuen käytimme kussakin reaktiossa neljää eri tilavuutta (0,3, 0,5, 1,0 tai 1,5 µl) puhdistettua malli-DNA:ta, niin että lopullinen reaktiutilavuus oli 10 µl. Toteutimme reaktion erikseen molemmille alukkeille. Sekvensointireaktion jälkeen puhdistimme kiinnittymättä jääneet nukleotidit sekä suolat Montage SEQ₉₆-pakkauksella ohjeen mukaan (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Sekvenssoimme COI-geenialueen Sangerin menetelmällä laitteella MegaBACE1000™ (GE Healthcare Fairfield, CT, USA). Saadaksemme luotettavan emäsjärjestyksen sekvenssoimme kohdegeenin molempiin suuntiin. Siten sekvenssien linjausvaiheessa oli jokaisesta yksilöstä käytössä kaksi sekvenssiä COI-geenin samalta alueelta, siltä varalta että jommankumman sekvenssin emäsjärjestys olisi hankalasti tulkittava.

SEKVENSSIEN LINJAUS JA ANALYSOINTI – Linjasin COI-sekvenssit silmämääräisesti yksilö kerrallaan Geneious v5.3-ohjelmalla (Drummond ym. 2010), molempia sekvenssejä yhtäaikaaisesti tarkastellen. Nähdäksemme, millä geenialueilla esiintyi muuntelua yksilöiden välillä, linjasimme tämän jälkeen kaikkien 128 yksilön sekvenssit toisiaan vasten. Tarkastelin samalla, oliko havaittu

sekvenssivaihtelu vaikuttanut aminohappojärjestykseen. Lopuksi tasasimme kaikki sekvenssit samanpituisiksi leikkaamalla molemmista päistä osan emäsekvenssistä pois. Tuloksena saavutimme luotettavat ja keskenään vertailukelpoiset geenialueet, joiden pituus oli 649 emäsparia.

Aineiston haplotyyppikoostumuksen selvittämiseksi käytin TCSv1.21-ohjelmaa (Clement ym. 2000): Lopullisen kuvan aineiston sisältämistä haplotyypeistä ja niiden muodostamasta verkostosta laadin Hapstar-ohjelmalla (Teacher & Griffiths 2010). Laskin aineiston geneettiset etäisyydet Arlequin 3.5.1.2 -ohjelmalla (Excoffier & Lischer 2010). Jotta tulos olisi vertailukelpoinen Hebert ym. (2003b) kanssa, valitsin Kimuran kahden parametrin mallin. Tein myös lajitunnistekuvat linjattujen sekvenssien emäskoostumuksesta, mihin sovelsin FINGERPRINT-ohjelmaa (Lou & Golding 2007).

Eristin 20.2.2012 GenBankista® (Benson ym. 2006) Matén ja Voglerin julkaisemat COI-sekvenssit ja linjasin ne Geneious v5.3 -ohjelmalla toisiaan vasten. Nämä sekvenssit oli tuotettu sellaisilla alukkeilla, jotka monistavat alueen COI-geenin loppupäästä (3'-pää). Siten en voinut linjata ja vertailla niitä muihin sekvensseihin. Sekvenssit olivat vaihtelevan pituisia (697–795 emäsparia). Tasasin sekvenssien päät samanpituisiksi ja muodostin niistä erillisen haplotyyppiverkoston Hapstar-ohjelmalla (Teacher & Griffiths 2010).

Tietolaatikko 2. Haplotyytit

Otoksessa esiintyvää uniikkia, eli jonkin tai joidenkin emästen suhteen muista eroavaa, DNA-sekvenssiä kutsutaan **haplotyyppiksi** (Posada & Crandall 2001). **Haplotyyppiverkostoja** käytetään yleisesti havainnollistamaan DNA-sekvenssien keskinäisiä geneettisiä etäisyyksiä (esim. Merilä ym. 1997; Roslin 2001; Craft ym. 2008; Hanski ym. 2008; Miraldo ym. 2011). Verkostot sopivat puumaisia esitystapoja paremmin erityisesti populaatioiden väliseen vertailuun; muun muassa siksi, että populaatiotasolla yleisimmin esiintyvä uniikki sekvenssi on usein vanhin haplotyyppi (Clement ym. 2000). Monet ohjelmat, kuten TCS (Clement ym. 2000) ja Arlequin (Excoffier & Lischer 2010) laskevat automaattisesti aineiston haplotyyppikoostumuksen ohjelmaan syötetyn sekvenssitiedoston perusteella. Näistä haplotyypeistä verkostot rakennetaan yleisesti siten, että sekvenssien tai haplotyyppien välille oletetaan pienin mahdollinen määrä mutaatioita. TCS-ohjelman muodostamassa haplotyyppiverkostossa näkyy välittömästi kunkin haplotyyppin yleisyys aineistossa. Jos monien haplotyyppien väliset geneettiset erot ovat hyvin pieniä, ei aina ole yksiselitteistä mitkä haplotyytit ovat toisilleen läheisintä sukua (tai mikä haplotyyppi on kehittynyt mistäkin). Esimerkiksi Hapstar-ohjelma tarjoaa kaksi vaihtoehtoista tapaa rakentaa haplotyyppiverkosto: joko 1) siten, että kaikki mahdolliset haplotyyppien väliset sukulaisuussuhteet ovat näkyvissä tai 2) niin, että algoritmi valitsee reitin geneettisesti yhtä kaukaisten haplotyyppien välillä sattumanvaraisesti mutta johdonmukaisesti, muodostaen aineistosta yhden mahdollisen puumaisen verkoston (Teacher & Griffiths 2011).

2.4.3 Ulkoiset tuntomerkit

Whitehead (2006) esitteli järjestyksessään toisen määrityskaavan piha- ja salalantiaisen erottamiseksi toisistaan: Kaavan mukaan lajit voi erottaa peitinsiipien värin ja useiden muiden peitinsiivissä sijaitsevien tuntomerkkien avulla (Taulukko 2). Vaikka määrityskaava on julkaistu suomennettunakin (Roslin & Heliövaara 2009), sen luotettavuudesta ei ole tähän mennessä saatu täyttä varmuutta. Siksi kokeilin kaavan käyttöä yli tuhanteen vuonna 2008 kerättyyn lantakuoriaisyksilöön, jolloin vertasin niitä samalla Jason Matén määrittämiin yksilöihin. Tavoitteenani oli löytää 2820 yksilön suomalaisaineistosta molempia lajeja myöhempää sekvensointia varten. Määrittäksessä käytin 10- ja 30-kertaista suurennosta.

Alkoholisäilytys hankaloitti määrittystä, sillä etanolin täydellinen haihtuminen kudoksista kestää muutamia päiviä. Vasta tämän jälkeen yksilön todellinen väri ja peitinsiipien pisteiden sekä uurteiden erottuvuus tulivat kunnolla näkyviin. Kokeilin määrittystä myös alkoholissa petrimaljalla, mutta se osoittautui mahdottomaksi tehtäväksi koska, 1) tuntomerkkien erottuvuus oli huono 2) monet vertailuyksilöt olivat kuivuneita ja siten aivan erinäköisiä.

Taulukko 2. Whiteheadin (2006) määrityskaava piha- ja salalantiaisen erottamiseksi toisistaan (suomennus lähteestä Roslin & Heliövaara 2009).

Salalantiainen (*Aphodius pedellus*)

- Peitinsiivet syvän punaiset.
- Uurteet kapeat, matalat, uurteiden kuoppapisteet pienet, lähekkäin, huomaamattomimmat, pisteiden reunat huonommin erottuvat.
- Peitinsiipien kärjessä uurteiden väliset harjanteet litteät, uurteet tuskin levenevät, saumasta laskettuna ensimmäinen uurre häviää kärjessä. Peitinsiipien kärjen poikkileikkaus melko tasainen.

Pihalantiainen (*Aphodius fimetarius*)

- Peitinsiivet kellertävän punaiset.
- Uurteet leveämmät ja syvemmät, muodostaen selvät kanavat, joissa pisteiden reunat terävät, uurteet levenevät kohti kärkeään ja ensimmäinen uurre ulottuu kärkeen saakka.
- Peitinsiipien kärjen poikkileikkaus aaltoilevampi syvempien urien ja korkeampien harjanteiden vuoksi.

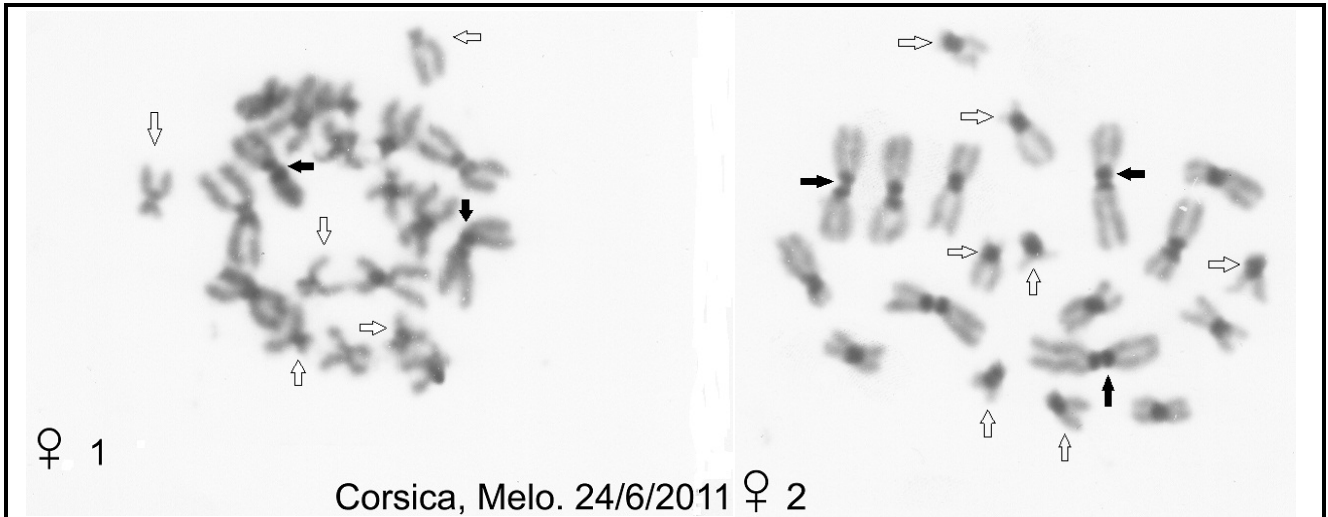
3. Tulokset

3.1 Pihalantiaisen ja salalantiaisen erottavat tuntomerkit

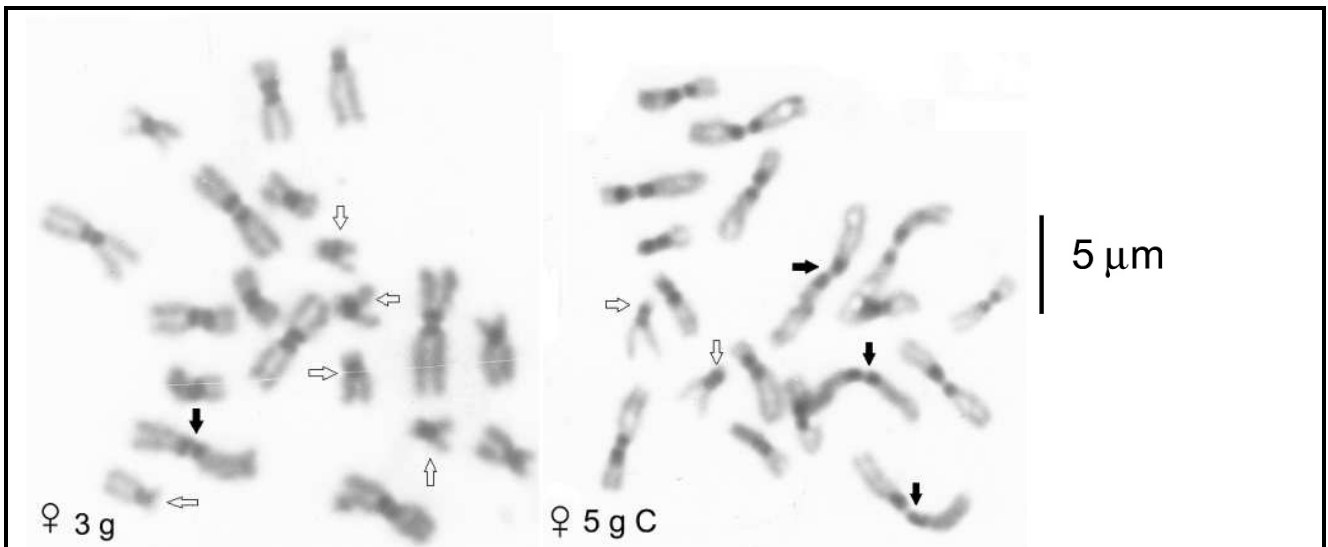
Pihalantiainen ja salalantiainen erosivat toisistaan sekä kromosomien, COI-sekvenssien, että ulkoisten tuntomerkkien osalta. Lajien väliltä löytämieni erojen avulla selvitin Suomessa esiintyvän lajin olevan salalantiainen (*Aphodius pedellus*).

3.1.1 Karyotyypit

Korsikalaisten lantiaisten karyotyypit osoittivat yksilöt varmuudella salalantiaisiksi (R. Angus, sähköpostikeskustelu 16.7 2011; kuva 4). Myös Korppoosta kerätty yhdeksän suomalaista yksilöä olivat karyotyypianalyysin perusteella salalantiaisia (R. Angus, sähköpostikeskustelu 15.9 2011; kuva 5). Tämä tulos on ensimmäinen varma havainto salalantiaisen esiintymisestä maassamme.



Kuva 4. Kahden korsikalaisen salalantiaisen karyotyypit. Kromosomipreparaatit on C-värjätty ja kuvattu mikroskoopin alla. Naaras 1 myös sekvensoitiin, mutta numero 2 on säilötty Lontoon luonnonhistoriallisen museon kokoelmiin. Kuvissa näkyvät salalantiaisen karyotyypin ominaispiirteet, kuten akro- tai subakrosentriset kromosomit (valkoiset nuolet) ja suurten 2- ja X-kromosomien ”nipistyminen” sentromeerin kohdalta (mustat nuolet). Huomaa myös, ettei C-värjäys tuota pihalantiaiselle ominaisia leveitä heterokromatiiniraitoja (Kuva 1b). Kuvat Robert Angus.



Kuva 5. Kahden suomalaisen salalantiaisen C-värjätty karyotyypit (g = ”gut”, joka tarkoittaa että preparaatti on valmistettu ruuansulatuskanavan mitoosivaiheen soluista). Nuoliilla on osoitettu tyypilliset lajituntomerkit, eli akro- tai subakrosentriset kromosomit (valkoiset nuolet) ja suurten kromosomien muoto (mustat nuolet). Yksilöillä ei tässäkään näy leveitä heterokromatiiniraitoja (Kuva 4 ja 1b). Kuvat Robert Angus.

3.1.2 COI-sekvenssit

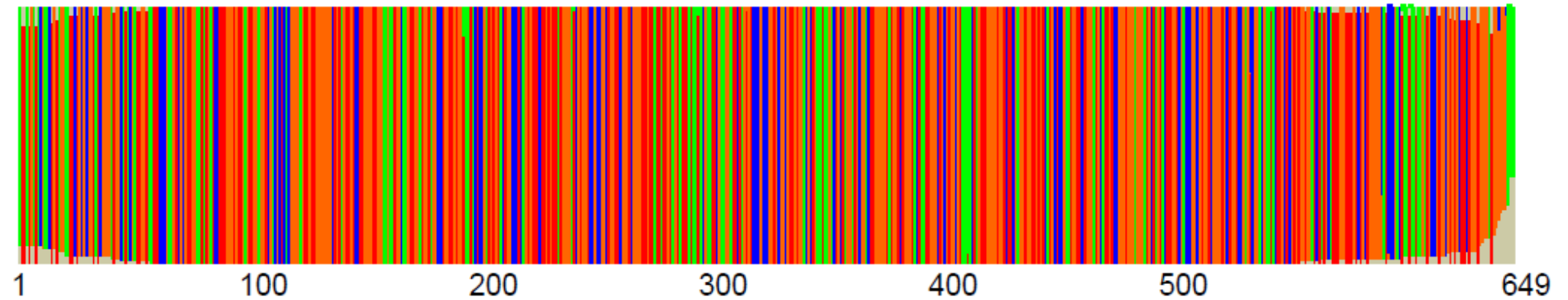
Sekvensointi tuotti 128 hyvälaatuista, 649 emäsparin pituista, COI-sekvenssiä. Emäsvaihtelua esiintyi kaikkiaan 64 emäsparin alueella. Sekvenssierojen suhteen yksilöt jakautuivat kahteen lajiin, joista kahdeksan yksilöä (kaikki ulkomaisia näytteitä) osoittautui pihalantiaisiksi ja loput 120 (sisältäen suomalaisia ja ulkomaisia näytteitä) salalantiaisiksi. Sekvenssien linjaus paljasti merkittävän eron mitokondriaalisessa COI-geenissä salalantiaisen ja pihalantiaisen välillä: 649 emäsparin pituisen sekvenssin alueella lajeja erotti yhteensä 44 emässubstituutiota (Kuvat 6 ja 7). Kimuran kahden parametrin mallin mukaan etäisyys kaikkien pihalantiaisten ja salalantiaisten välillä oli keskimäärin 52,4 emässubstituutiota, joka vastaa 8,1 prosentin eroa emässekvenssissä. COI-geenin emäserojen perusteella aineistoni jakautui 27 haplotyyppiin (nimetty esim. A11, A23, A134 jne.). Näistä kuusi kuului pihalantiaisille ja 21 haplotyyppiä salalantiaisille (Kuva 7).

Karyotyypitetut yksilöt (kaksi pihalantiaista ja kymmenen salalantiaista) kuuluivat DNA-erojenkin mukaan kahteen eri lajiin (Kuva 7). Korppoosta kerättyjen, karyotyypitettyjen salalantiaisten ja muiden suomalaisten sekvensoitujen yksilöiden COI-sekvenssit olivat lähes identtiset. Tämä osoitti salalantiaisen esiintyvän laajalla alueella kautta Suomen.

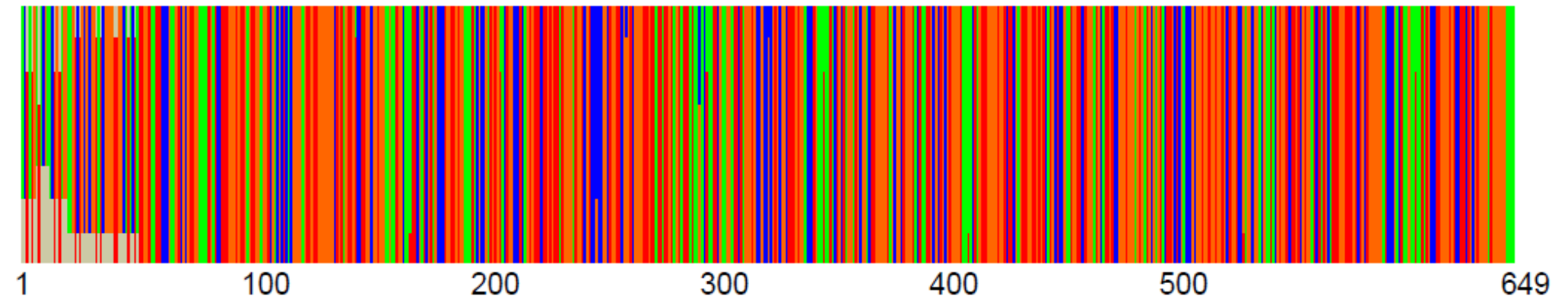
Lajien sisältä löytyi vähän emäsvaihtelua COI-geenin alueella: 120 salalantiaisen otoksessa 649 emäksen pituisella alueella vaihtelua esiintyi 13 emäsparissa. Pihalantiaisten (n=8) sekvenssivaihtelu oli samaa luokkaa, sillä emässubstituutioita löytyi 12 emäsparin alueelta. Lajien sisällä geneettiset etäisyydet olivat pieniä. Salalantiaisen lajinsisäinen geneettinen etäisyys oli keskimäärin 1,47 emässubstituutiota (0,2 %) ja pihalantiaisen 4,23 emässubstituutiota (0,7 %). Pihalantiaisilla vain yksi kahdestatoista emässubstituutiosta oli transversio, muut yksitoista olivat transitioita. Myös salalantiaisilla suurin osa substituutioista oli transitioita (Taulukko 3).

Vaikka lajien välillä esiintyi runsaasti yksittäisiä emässubstituutioita, ne eivät kuitenkaan muuttaneet COI-proteiinin aminohapposekvenssiä. Myöskään lajinsisäiset mutaatiot eivät vaikuttaneet aminohappoketjuun. Etenkin salalantiaisen haplotyyppiä erotti vähäinen määrä mutaatioita. Esimerkiksi korsikalainen haplotyyppi (A104) erosi otokseni toiseksi yleisimmästä, Suomessa melko laajalle levinneestä, haplotyyppistä (A11) vain kahden emäsparin suhteen (Kuva 7). Espanjalaiset (A12, A13 ja A25), sekä nepalilainen haplotyyppi (A151) olivat myös samankaltaisia suomalaisten haplotyyppien kanssa (Kuva 7). Yllättäen Suomen yleisin haplotyyppi (A178) esiintyy myös Espanjassa ja Pohjois-Amerikassa. Pihalantiaisilla sekvenssivaihtelu oli myös alueellisesti suurempaa kuin salalantiaisilla: Yhdysvalloista (Kalifornia) kerättyjen kahden pihalantiaisen haplotyyppin välillä oli kuuden nukleotidin ero, Isosta-Britannasta (Camber) kerättyjä kahta haplotyyppiä erotti yhdeksän emässubstituutiota.

Salalantiainen, *Aphodius pedellus* (n=120 yksilöä)



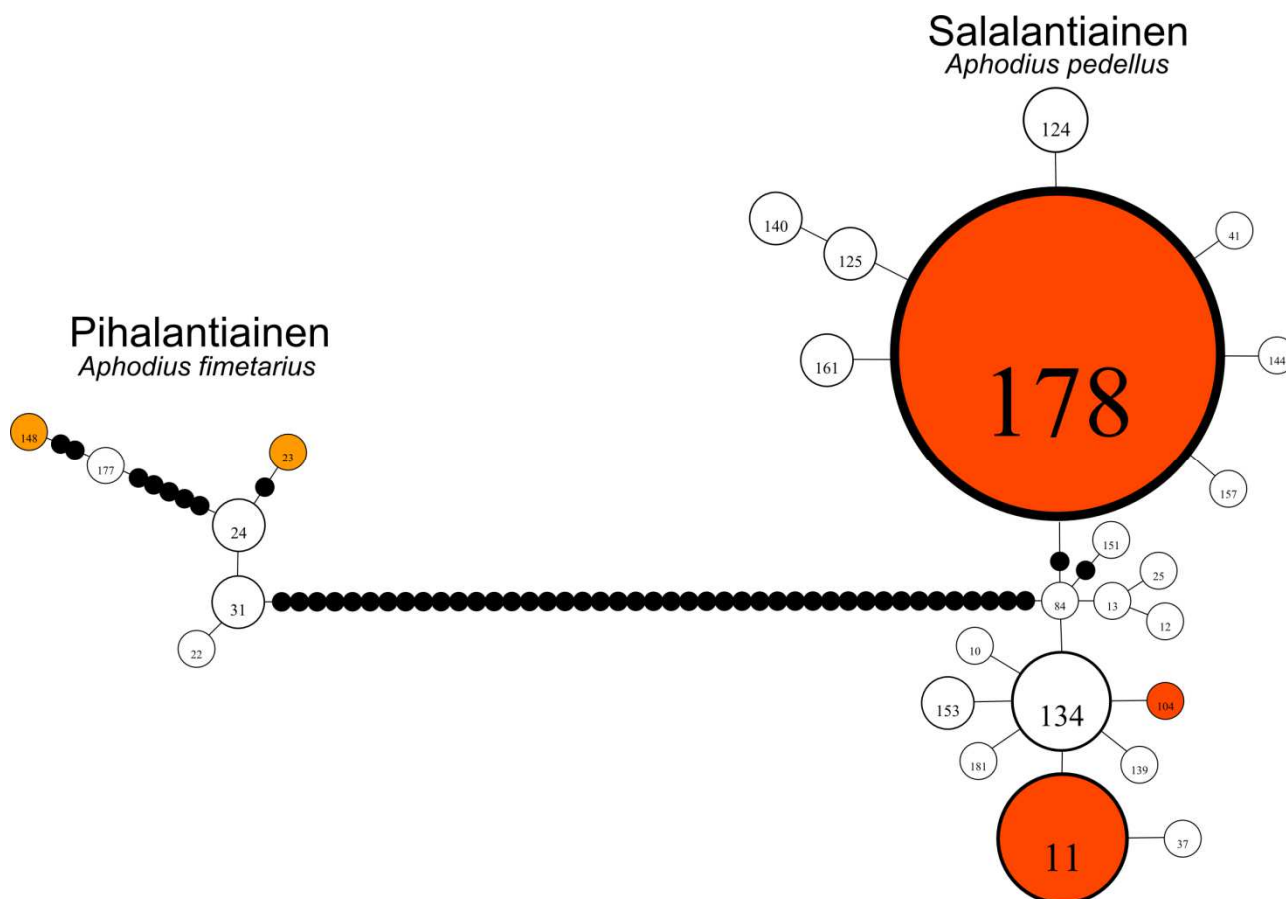
Pihalantiainen, *Aphodius fimetarius* (n=8 yksilöä)



Nukleotidit:

■ G ■ A ■ T ■ C

Kuva 6. COI-sekvenssien vaihtelu 649 emäsparin alueella salalantiaisella (yllä) ja pihalantiaisella (alla). Kuvassa kukin neljästä emäksestä (G, A, T ja C) on esitetty omalla värillään. Sekvenssin kunkin kohdan emäskoostumus on esitetty prosenttiosuuksina pystysuuntaan: Jos tietyssä kohdassa ei esiinny lainkaan muuntelua, palkki on yksivärinen. Huomaa erityisesti, kuinka vähän emäsvaihtelua salalantiaisten COI-emässekvenssissä esiintyy. Muutamien sekvenssien alku- ja/tai loppuosan emäsjärjestys ei ole varmuudella tiedossa, jolloin kyseinen kohta on merkitty harmaalla. Kuva on tuotettu ohjelmalla FINGERPRINT (Lou & Golding 2007).

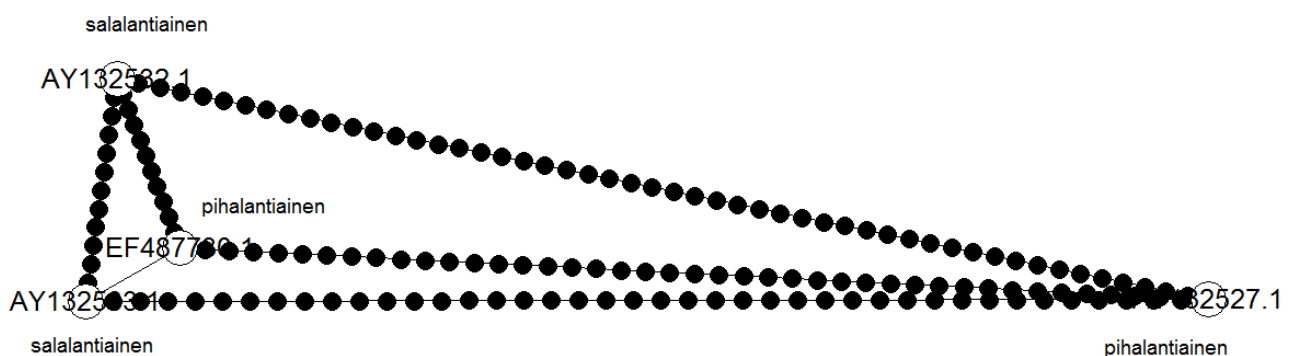


Kuva 7. Piha- ja salalantiaisen sekvenssierot. Kuva edustaa yhtä mahdollista verkostoa haplotyyppien välillä. Kukin numeroitu ympyrä edustaa yhtä otoksessa esiintyvää haplotyyppiä. Ympyrän pinta-ala vastaa kunkin haplotyyppin suhteellista runsautta otoksessa; suurin ympyrä edustaa 77 yksilöä ja pienin yhtä yksilöä. Verkostossa haplotyyppien välillä oletetaan pienin mahdollinen määrä mutaatioita. Jokainen kuvassa näkyvä viiva tarkoittaa yhtä emässubstituutiota eli mutaatiota yksilöiden välillä. Mustat ympyrät puolestaan merkitsevät otoksesta ”puuttuvaa haplotyyppiä” (Teacher & Griffiths 2011). Kuvassa erottuu selkeästi otoksen 27 haplotyyppin jakautuminen kahdeksi toisistaan geneettisesti etäällä olevaksi lajiksi. Lajien välillä on 44 emässubstituutiota, mutta lajinsisäiset etäisyydet ovat pieniä. Oikeanpuoleiset haplotyyppit ovat salalantiaisia ja vasemmanpuoleiset pihalantiaisia. Punaisella on merkitty haplotyyppit, jotka sisältävät karyotyypiltään tunnetun salalantiaisen, oranssit haplotyyppit puolestaan sisältävät karyotyypiltään tunnetun pihalantiaisen. Haplotyyppit on numeroitu kuten taulukossa 3 ja kuvassa 10.

Hakuni GenBankista® tuotti COI-sekvenssin tunnisteella JF889615. Sekvenssi oli emäsjärjestykseltään 91,8 % samankaltainen kuin aineistoni salalantiaiset ja peräti 99,5 % identtinen aineistoni pihalantiaisten kanssa. Yksilön tietojen yhteydessä ollut kuva lisäksi varmisti sen olevan jompi kumpi tutkimistani lajeista. Sekvenssin vertailu oman aineistoni yksilöihin paljasti tämän Saksasta kerätyn, vielä lajilleen nimeämättömän yksilön olevan ilman muuta pihalantiainen.

Vertasin keskenään Jason Matén ja Alfried Voglerin GenBankissa® julkaisemia pihalantiaisen (tunnisteet AY132527.1 ja EF487730.1) ja salalantiaisen (tunnisteet AY132533.1 ja AY132532.1) COI-sekvenssejä. Kiinnostavaa kyllä, käyttämäni menetelmät paljastivat vähintään yhden näistä neljästä olevan väärin määritetty: COI-sekvenssien vertailu osoitti pihalantiaisen tunnuksella AY132527.1 eroavan huomattavasti muista kolmesta yksilöstä. Lisäksi eri lajeiksi

määritetyt salalantiainen (AY132533.1) ja pihalantiainen (EF487730.1) erosivat vain yhden emäsparin suhteen tarkastelemallani 659 emäsparin pituisella COI-alueella. Sen sijaan pihalantiaisen AY132527.1 ja salalantiaisen AY132532.1 välillä havaitsin peräti 51 emässubstituutiota, mikä vastaa 7,7 % eroa emäsjärjestyksessä. Eri alukkeista johtuen vertailu itse sekvenssoimiini piha- ja salalantiaisiin ei ollut mahdollista. Siksi en voi luotettavasti arvioida, mitkä näistä yksilöistä todellisuudessa ovat pihalantiaisia ja mitkä salalantiaisia. Missään tapauksessa yksilöitä ei kuitenkaan ole määritetty täysin oikein, vaan näyttää siltä että kolme yksilöä on keskenään samaa lajia ja yksi kuuluu toiseen lajiin (Kuva 8). Tulos on vertailukelpoinen muusta aineistosta löytämäni sekvenssivaihtelun kanssa, sillä Hebert ym. (2003b) mukaan COI-geenin 5'- ja 3'-päiden sisältämä nukleotidivaihtelu on hyvin samansuuruista.



Kuva 8. Haplotypeverkosto GenBankissa® julkaistuista pihalantiaisen (AY132527.1 ja EF487730.1) ja salalantiaisen (AY132533.1, AY132532.1) COI-sekvensseistä. Kuvassa on huomioitu kaikki vaihtoehtoiset sukulaisuussuhteet haplotyyppien välillä. Oikeanpuolimmainen pihalantiainen eroaa emäsjärjestykseltään selvästi muita haplotyyppiä edustavista yksilöistä. Kyseinen pihalantiainen AY132527.1 eroaa toisesta pihalantiaiseksi määritetystä yksilöstä (EF487730.1) 51 emässubstituution suhteen. Eri lajeiksi määritetyt EF487730.1 (pihalantiainen) ja AY132533.1 (salalantiainen) puolestaan eroavat toisistaan vain yhden emäksen suhteen. Kuvassa yksilöitä erottavat emässubstituutiot on havainnollistettu viivoilla. Mustat pallot tarkoittavat aineistosta "puuttuvia haplotyyppiä" (Teacher & Griffiths 2011), eli sellaisia haplotyyppiä jotka eivät sisälly otokseen.

3.1.3 Ulkoiset tuntomerkit

Määrityskaavan (Whitehead 2006) käyttö osoittautui haastavaksi ja tein useita virhemääriytyksiä. Korjasin sen avulla kuitenkin muutamien ulkomaalaisten salalantiaisten lajinmääriytyksen, jotka Jason Matén aineistossa oli etiketoitu pihalantiaisiksi. Esimerkiksi yksi Jason Matén määrittämä espanjalainen pihalantiainen sekä nepalilainen yksilö paljastuivat ulkonäkönsä perusteella salalantiaisiksi, ja myöhemmin sekvenssitieto varmisti asian. Korsikalaisen karyotyypitetyn salalantiaisen ulkonäkö oli myös hyvin yhdenmukainen kaavassa kuvaillun salalantiaisen kanssa.

Tarkastelin kahta kreikkalaista yksilöä pelkän määrityskaavan avulla. Toisen yksilön tuntomerkit viittasivat kaikilta osin pihalantiaiseen. Toinenkin yksilö lienee pihalantiainen, mutta peitinsiivet olivat edellistä punertavammat ja harjanteet matalammat, mikä viittaa salalantiaisen tuntomerkkeihin. Ilman sekvenssitietoa määrittäminen jää toistaiseksi epävarmaksi.

Ensimmäisiin sekvenssintietoihin valitsemistani 77 suomalaisesta yksilöstä määritin 40 salalantiaiseksi, 23 pihalantiaiseksi ja 14 yksilön kohdalla en voinut sijoittaa niitä kumpaankaan lajiin ristiriitaisten tuntomerkkien takia. Näistä yhteensä 58 yksilöstä saatiin hyvälaatuinen sekvenssi. Tulos paljasti sekvenssoitujen yksilöiden olevan lähes identtisiä keskenään, sekä eroavan huomattavasti varmoiksi tiedetyistä, karyotyypitetystä pihalantiaisista. Näistä 38 yksilöä olin alun perinkin määrittänyt salalantiaiseksi, 14 pihalantiaiseksi ja 6 oli jäänyt lajiparin tasolle. Suomalaisen aineiston osalta kaava vei siis useita salalantiaisia pihalantiaiseksi tai yksilöissä oli molempien lajien tuntomerkkejä. Näissä tapauksissa oikea laji varmistui vasta sekvenssitietoja vertailemalla. Päätin olla määrittämättä enempää suomalaisyksilöitä kaavan avulla, sillä ulkomuodoltaan vaihtelevimmatkin yksilöt olivat vastoin odotustani kaikki samaa lajia.

Määrityskaavan tuntomerkeistä käyttökelpoisimmaksi osoittautui peitinsiipien poikkileikkauksen aaltoilevuus, etenkin yhdistettynä peitinsiipien väriin. Poikkeuksia kuitenkin oli (Kuva 9b ja c). Pihalantiaisen peitinsiivet ovat usein huomattavan uurteiset ja korkeiden harjanteiden vuoksi rakenne muistuttaa ”aaltopeltiä” (Kuva 9d). Uurteet ovat syvemmät ja leveämmät, sekä uurteiden väliset harjanteet korkeammat, kuin salalantiaisella. Uurteet ovat havaintojeni perusteella usein harjanteisiin verrattuna suunnilleen yhtä leveät, kun salalantiaisella harjanteet ovat lähes aina selvästi uurteita leveämmät. Tuloksena salalantiaisen peitinsiipien pinta näyttää monesti lähes tasaiselta (ei kuitenkaan peitinsiipien kärjestä). Salalantiaisen peitinsiivet näyttävätkin usein hyvin sileiltä ja kiiltäviltä, sillä uurteet muodostuvat usein vain matalien kuoppapisteiden jonoista, eikä varsinaisia teräväreunaisia uurteita yleensä ole havaittavissa.

Salalantiaisten väri vaihteli tummanpunaisesta jopa hyvin kellertävään (Kuva 9a ja b). Useilla yksilöillä oli peitinsiipien ulkoreunojen viereisissä uurteissa selkeitä, tummia täplämaisia pisteitä jotka levenivät peitinsiipien kärkeen. Joillain salalantiaisilla saumasta laskien ensimmäinen uurre jatkui kärkeen saakka, toisin kuin määrityskaavassa kuvaillaan (Kuva 9a).



Kuva 9a. Salalantiainen (*Aphodius pedellus*). Vasemmalta oikealle A147: Paltamo, tuntomerkit kuten Whitehead 2006, A151: Nepal, hyvin roteva, kuten Whitehead 2006, mutta uurteiden pisteet todella erottuvat, A178: USA, kuten Whitehead 2006, mutta ensimmäinen uurre reunasta laskien jatkuu kärkeen. Kuvaaja Pekka Malinen (9a–d).



Kuva 9b. Salalantiainen (*Aphodius pedellus*). Vasemmalta oikealle A1: Nilsia, määritin ensin Whitehead 2006 mukaan pihalantiaseksi, sillä väri kellertävä sekä leveät pisteuurteet, A16: Espanja, kellertävä, Jason Maté oli määrittänyt pihalantiaseksi, korjasin määrittymisen Whitehead 2006 mukaan salalantiaseksi, A54: Ulvila, uurteinen kärjestä, suuria täplämäisiä pisteitä siiven ulkoreunassa, määritin ensin Whitehead 2006 mukaan pihalantiaseksi.



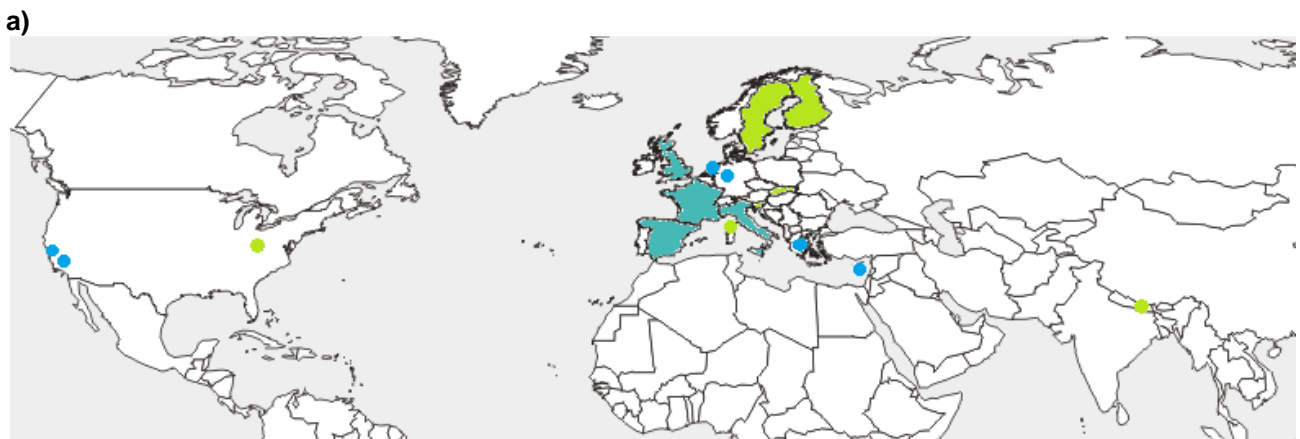
Kuva 9c. Pihalantiainen (*Aphodius fimetarius*). Vasemmalta oikealle A31: Espanja, Whitehead 2006 mukaan voisi olla salalantiainen, A148: Iso-Britannia, kromosomein määritetty, kuitenkin lähinnä vain kellertävä väri viittaa pihalantiaseen, A177: USA, kellertävä, mutta uurteiden kapeus ja huomaamattomat pisteet kuten salalantiaseella.



Kuva 9d. Pihalantiainen (*Aphodius fimetarius*). Vasemmalta oikealle A23: Iso-Britannia, kromosomein määritetty, kuten Whitehead 2006, huomaa erityisesti leveät uurteet ja kärjessä selvästi koholla olevat harjanteet, A22: Espanja, kuten Whitehead 2006, huomaa "aaltopeltimäinen" peitinsiiven pinta, A24: USA, kuten Whitehead 2006, huomaa varsinkin uurteiden leveneminen kärkeä kohti.

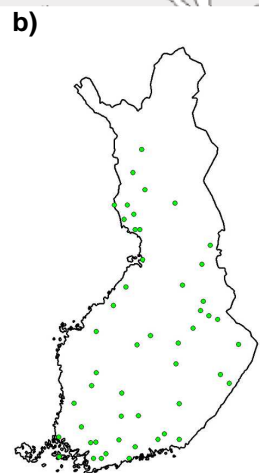
3.2. Pihalantiaisen ja salalantiaisen maailmanlaajuinen levinneisyys

Keräämäni aineisto salli ensimmäisen kerran piha- ja salalantiaisen levinneisyyden arvioinnin (Kuva 10a). Suomessa esiintyy siis lähes koko maan kattavan selvitykseni pohjalta pelkkä salalantiainen (Kuva 10b). Lisäksi tein ensimmäisen täysin varman havainnon salalantiaisen esiintymisestä Pohjois-Amerikassa (R. Angus, sähköpostikeskustelu 2.12.2011). Tutkimukseni myötä salalantiainen löytyi myös Nepalista, jossa lajia ei ole tietojeni mukaan aiemmin havaittu. Aineistossani oli piha- ja salalantiaisia myös Espanjasta ja Isosta-Britanniasta, sekä yksi salalantiainen Korsikalta. Hakuni tuotti yhden Saksasta peräisin olevan pihalantiaisen COI-sekvenssin, mutta muita samalta geenialueelta julkaistuja COI-sekvenssejä ei löytynyt. Siten GenBank ei tarjonnut paljoakaan lisätietoa pihalantiaisen ja salalantiaisen levinneisyyteen. Kreikasta kerätyistä kahdesta yksilöstä ainakin toinen on ulkoisten tuntomerkkien perusteella hyvin todennäköisesti pihalantiainen.



Kuva 10a. Piha- ja salalantiaisen levinneisyys. Kuvassa on huomioitu myös aiempi kirjallisuus. Yksittäiset tai paikalliset havainnot on merkitty pisteillä, useita havaintoja saaneet alueet on varjostettu kauttaaltaan. Salalantiaisen levinneisyys on merkitty vihreällä, pihalantiaisen esiintymisalueet sinisellä. Maat, joissa molemmat lajit esiintyvät rinnakkain, on väritetty sinivihreällä. Kokonaislevinneisyydeltään lajipari *A. fimetarius/pedellus* kattaa lähes koko maailman, mutta tässä kartassa ei ole huomioitu alueita, joista ei ole varmaa tietoa paikallisen lajin identiteetistä (vrt. 2.1). Maailmankartta on muokattu sivustolta <http://www.freeworldmaps.net/>.

Kuva 10b. Salalantiaisen levinneisyys Suomessa. Levinneisyytiedot perustuvat tutkielmassani tuotettuihin DNA-lajitunnisteisiin: jokaisesta karttapisteestä on siis selkeä salalantiaisen COI-sekvenssi.



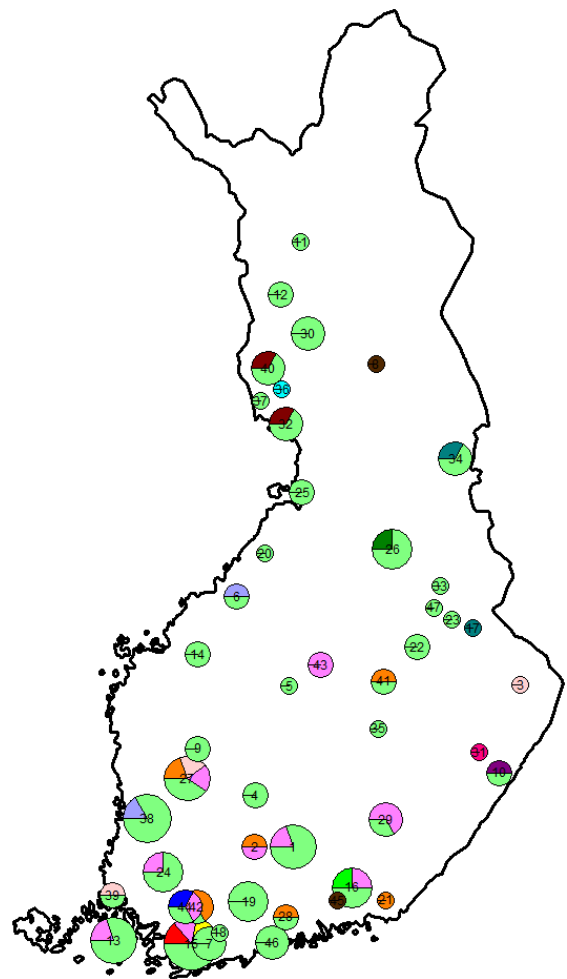
3.3 Salalantiaisen geneettinen populaatiorakenne Suomessa

Suomessa esiintyvä kattavan maantieteellisen selvitykseni perusteella vain toinen tutkimistani lajeista, salalantiainen (*Aphodius pedellus*). Onnistuin tuottamaan hyvälaatuisia COI-sekvenssejä yhteensä 113 yksilöstä ja 47 keruupaikasta ympäri Suomen. Nämä sekvenssit olivat lähes identtisiä: muuntelua oli yhteensä vain 12 emäsparin suhteen 649 emäksen pituisella geenialueella. Yksilöiden väliset erot olivat ainoastaan yhdestä neljään nukleotidia. Suurin osa emäsubstituutioista oli laadultaan transitoita (A vaihtunut G:ksi tai päinvastoin ja T vaihtunut C:ksi tai päinvastoin), kun taas transversioita (A tai G vaihtunut C:ksi tai T:ksi ja C tai T vaihtunut A:ksi tai G:ksi) esiintyi vain kahdessa kohtaa emäsekvenssiä (Taulukko 3). Sekvensoidusta otoksesta löytyi yhteensä 16 haplotyyppiä. Näistä yksi (A178) oli hyvin yleinen (66 % yksilöistä) ja laajalle levinnyt (81 % keruupaikoista), muut ovat harvinaisempia ja paikallisia haplotyyppiä (Kuva 11 sekä Taulukko 3).

Haplotyytit



Kuva 11. Suomessa esiintyvien haplotyyppien (n=16) levinneisyys ja paikallinen runsaus. Kunkin ympyrän pinta-ala vastaa COI-sekvenssien lukumäärää (n=1–7) kyseisestä paikasta, ja kunkin ympyrän sisällä kunkin haplotyyppin runsaus on esitetty omalla värikoodillaan. Luvut ympyröiden sisällä tarkoittavat paikkakuntia, ja ne on numeroitu kuten taulukossa 3. Haplotyyppien numerointi kuten kuvassa 7 ja taulukossa 3.



Taulukko 3. Suomalaisen haplotyyppien (n=16) emäskoostumus ja levinneisyys (n=47 paikkakuntaa). Taulukon vasemmassa osassa haplotyyppien välistä nukleotidivaihtelua COI-sekvenssissä on verrattu aineiston yleisimpään haplotyyppiin (A178): Tässä pystysuuntainen numero ilmoittaa COI-sekvenssin emäsnumeron, jossa vaihtelua esiintyy (n=12 muuntelevaa nukleotidia). Oikealla puolella on esitetty kunkin haplotyyppin runsaus kussakin aineiston keruupaikassa. Haplotyytit ja paikkakunnat on numeroitu kuten kuvissa 7 ja 11.

Haplotyyppi	Emäsnumero 1 2 3 4 5 5 6 6 6 6 9 4 9 1 1 3 9 9 0 0 4 4 4 2 6 7 3 6 3 6 2 5 4 7	Paikkakunta																																															Σ						
		1 2 3 4 5 6 7 8 9 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 4 4 4 4 4 4 4 4 4																																																					
A178	A A A A G A C C A A T T	4	0	0	2	1	1	3	0	2	1	1	2	4	2	4	2	0	1	4	1	0	2	1	3	2	3	2	1	1	3	0	2	1	2	1	0	1	5	1	2	1	1	0	1	0	3	1	75						
A10	. . G . . C T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1				
A11	G C T	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12			
A124 C .	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3			
A125 A . . . N . . .	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2			
A134 C T	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7			
A139	. G . . . C T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1			
A140 C C	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2			
A144 G . .	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
A153 C T T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
A157 G . . .	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
A161	. . . G	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
A181 A C T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
A37	G A C T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
A41 T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
A84 T T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Σ		5	2	1	2	1	2	3	1	2	2	1	2	5	2	7	4	1	1	4	1	1	2	1	4	2	4	5	2	3	3	1	3	1	3	1	1	1	6	2	3	2	3	2	3	1	3	1	3	1	113	113			

- | | | | | |
|----------------|------------------|----------------|------------------|-----------------|
| 1: Asikkala | 11: Kittilä | 21: Miehikkälä | 31: Rääkkylä | 41: Siilinjärvi |
| 2: Hämeenlinna | 12: Kolari | 22: Nilsia | 32: Simo | 42: Somero |
| 3: Ilomantsi | 13: Korppoo | 23: Nurmes | 33: Sotkamo | 43: Viitasaari |
| 4: Juupajoki | 14: Korttesjärvi | 24: Oripää | 34: Suomussalmi | 44: Salo |
| 5: Kannonkoski | 15: Koski | 25: Oulu | 35: Suonenjoki | 45: Elimäki |
| 6: Kannus | 16: Kouvola | 26: Paltamo | 36: Tervola | 46: Viikki |
| 7: Karjalohja | 17: Lieksa | 27: Parkano | 37: Tornio | 47: Valtimo |
| 8: Kemijärvi | 18: Lohja | 28: Pornainen | 38: Ulvila | |
| 9: Kihniö | 19: Loppi | 29: Ristiina | 39: Uusikaupunki | |
| 10: Kitee | 20: Merijärvi | 30: Rovaniemi | 40: Ylitornio | |

4. Tulosten tarkastelu

Tässä tutkielmassa olen osoittanut DNA-lajitunnisteiden erottelevan piha- ja salalantiaisen tarkasti toisistaan. Käyttämäni COI-sekvenssit antoivat yksiselitteisen tiedon tutkimusyksilöiden identiteetistä, koska lajien välinen sekvenssivaihtelu oli merkittävästi lajinsisäistä vaihtelua runsaampaa. Kehittämäni lajitunnisteet osoittivat yhden maamme yleisimmän kovakuoriaisen kuuluvan kokonaan toiseen lajiin kuin aiemmin on oletettu, ja tämän lajin olevan maailmalla laajalle levinnyt. Menetelmä myös paljasti ensimmäisen kerran salalantiaisen esiintyvän varmuudella Pohjois-Amerikan mantereella. Lisäksi DNA-tunnisteet toivat ilmi salalantiasten geneettisen yhdenmukaisuuden niin Suomessa kuin laajalti muuallakin. Yllättävästi morfologiaan perustuva määrittyskaava toimi vain hieman yli puolessa tapauksista.

4.1 Pihalantiainen ja salalantiainen ovat hyviä lajeja

Tulosteni mukaan pihalantiainen ja salalantiainen on helppo erottaa toisistaan yhtä hyvin COI-sekvenssien kuin kromosomituntomerkkienkin avulla. Lajien väliltä löytämäni 8,1 % ero emäsjärjestyksessä on samaa suuruusluokkaa kuin hyönteisillä aiemmin tavatut COI-geenin erot (esim. Hebert ym. 2003b). Keskimääräinen geneettinen etäisyys pihalantiasten sisällä (4,23 emässubstituutiota) oli hieman suurempi kuin salalantiaisilla (1,47 emässubstituutiota), mutta jäi selvästi lajien välisen keskimääräisen etäisyyden (52,4 emässubstituutiota) alle. Jatkossa pihalantiainen ja salalantiainen voidaan siis tunnistaa luotettavasti pelkästään COI-lajitunnisteiden pohjalta. Yhdistettynä aiempiin havaintoihin piha- ja salalantiaisen kromosomieroista (Wilson 2001; Wilson & Angus 2004) sekä morfologisista eroista (Wilson 2001; Whitehead 2006) tulokseni tukee yleisvaikutelmaa, että kyseessä on kaksi jo pitkään erillään ollutta lajia.

Toisinaan sekvenssitiedon hyödyntäminen voi johtaa vastakkaisiin päätelmiin: Madagaskarilaiset sisarajat *Helictopleurus neoamplicollis* ja *H. littoralis* eroavat ruumiinkoon ja joidenkin vähäisten morfologisten piirteiden osalta, mutta ekologisia eroja ei tunneta. Todellinen tilanne paljastui, kun ”lajien” huomattiin jakavan samoja COI-haplotyypejä. Siten niiden välillä esiintyy geenivirtaa kautta levinneisyysalueiden. Tämän tiedon seurauksena Hanski ym. (2008) päätyivät yhdistämään lajit *H. neoamplicollis* -nimen alle.

4.2. Miten pihalantiaisen ja salalantiaisen erottaa?

Kokemukseni mukaan Whiteheadin (2006) kaavan soveltaminen lajien erottelemiseksi vaihtelee helposta ja nopeasta tunnistuksesta täysin mahdottomaan. Ensimmäisten sekvensointitulosten valmistuminen osoitti, että 14 pihalantiaiseksi määrittämäni suomalaisyksilöä olivatkin salalantiaisia. Tuntomerkit sopivat usein yhtä hyvin kumpaankin lajiin, jolloin jätin määrittämisen lajiparin tasolle. Myöhemmin sekvenssitieto paljasti oikeat laji-identiteetit ja sain paremman käsityksen piha- ja salalantiaisen ulkomuodon muuntelusta.

Määrittämissä on huomioitava, että lantakuoriaiset ovat kooltaan hyönteisistä kenties eniten muuntelevia (T. Roslin, keskustelu keväällä 2011). Niiden määrittämistä vaikeuttaa myös ilmiö nimeltä allometria, joka tarkoittaa joidenkin ruumiinosien kasvamista eri suhteissa yksilön muuhun ruumiinkokoon nähden (esim. Tirri ym. 2006). Olisi kiinnostavaa selvittää vaikuttaako koon muuntelu jollain tavalla myös peitinsiipien tuntomerkkeihin.

Kaikki aineistoni pihalantiaiset olivat kellertäviä, mutta myös jotkin salalantiaiset olivat hyvin kellertäviä tai oranssinpunaisia, enemmän kuin kirkkaanpunaisia. Tämä johtui mahdollisesti siitä, että vastakuoriutuneet lantakuoriaisyksilöt ovat alkuun hyvin vaaleita, sillä pigmentin muodostumiseen menee joitain päiviä. Vaikka Jason Maté on käyttänyt lähinnä Wilsonin (2001) määrittämissä kaavaa, hänestä Whiteheadin (2006) esittämä peitinsiipien värituntomerkki on toimiva etenkin maasto-oloissa, sekä erityisen hyvin säilytyillä yksilöillä ja sen avulla voisi tunnistaa ehkä 70–80 % yksilöistä. (J. Maté, sähköpostiviesti 11.3.2011). Värituntomerkin luotettavuutta pitäisi mielestäni tarkastella lisää suurella määrällä kummankin lajin samalla tavalla säilytetyillä yksilöillä. Ulkoisten tuntomerkkien lisätutkimus on yleensäkin tarpeen; voisi esimerkiksi testata useaan morfologiseen ominaisuuteen perustuvaa erotteluanalyysiä (Ashrafi ym. 2010, Lumley & Sperling 2010). Tosin vaikeimmissa tapauksissa siitäkään ei ole mitään apua, vaan tällöin sekvenssierot ovat ainoa varma tunnistuskeino (Packer ym. 2009)

Molekyyliomenetelmien tehokkuus on todettu monissa sellaisissa tapauksissa joissa morfologia ei kykene täysin erottelemaan lajeja toisistaan (esim. Manguin ym. 2008; Mata ym. 2010). DNA-tuntomerkkien käyttö on myös merkittävä edistysaskel suhteessa lajien alkuperäiseen erottamiseen käytettyihin kromosomimenetelmiin. Kromosomipreparaattien valmistus on huomattavan työlästä muun muassa siksi, että kromosomit tulee eristää elävistä yksilöistä, värjätä ja vielä lajitella mikroskoopin avulla. Näyttemäärät pysyvät siksi vääjäämättä pieninä. Sen sijaan DNA:ta voi kohtuullisen helposti eristää moninkertaisesta määrästä kuolleita yksilöitä, kunhan ne on säilytetty asianmukaisesti. Varmin tapa on säilöä yksilöt puhtaassa alkoholissa, mieluiten valolta (UV-säteily hajottaa DNA:ta) ja kuumuudelta suojattuna.

Näyttää siltä, ettei pihalantiaisen ja salalantiaisen erottaminen onnistu luotettavasti pelkän morfologian avulla. Tästä osoituksena COI-sekvenssit paljastivat jopa alan tunnetun asiantuntijan, Jason Matén, määrittäneen ainakin kaksi yksilöä virheellisesti. Tosin Maté itsekin suhtautuu tämän lajiparin tunnistamiseen varauksella; arviolta joka kymmenennen yksilön määrittäminen hän arvioi olevan lähinnä arpapeliä (J. Maté, sähköpostikeskustelu 11.3.2011). On kuitenkin oletettavaa, että hän on julkaissut vain hyvin varmoina pitämiään määrittämiään GenBankissa. Tunnistamisen vaikeutta kuvaa osuvasti Packer ym. (2009) vapaasti suomennettuna: ”Huolimatta 33 vuoden kokemuksesta mehiläisten tunnistuksen parissa, tutkija voi usein viettää yli tunnin pystymättä määrittämään tiettyä näytettä, johon tunnistuskaava on olemassa”.

4.3. Missä pihalantiaisen ja salalantiaisen esiintyvät?

Tulosten pohjalta vaikuttaa vahvasti siltä, että pihalantiaisen (*Aphodius fimetarius*), ei ole koskaan kuulunutkaan Suomen lajistoon. Suomessa esiintyvä laji onkin siis kaiken aikaa ollut pihalantiaisen kryptinen sisarlaji salalantiaisen. Erehdys on ymmärrettävä, sillä lajipari on hyvin yhdennäköinen ja salalantiaisen paljastui omaksi lajikseen vasta kymmenisen vuotta sitten. Kotimaiseen museoaineistoon tutustuminen toisi tähän lopullisen varmistuksen.

Kun tutkielmani tulokset yhdistää aiemmassa kirjallisuudessa mainittuihin lajien levinneisyystietoihin, näyttää siltä, että pihalantiaisen esiintyminen Euroopassa rajoittuu lähinnä Keski- ja Etelä-Eurooppaan (Kuva 10a). Espanjassa, Ranskassa ja Isossa-Britanniassa lajit esiintyvät säännöllisesti yhdessä. Salalantiaisen levinneisyysalue ulottuu huomattavasti pihalantiaista pohjoisemmaksi, varmuudella Ruotsiin ja Suomeen saakka. Suomen itärajan takana tilanne jää epäselväksi, tosin salalantiaisen on arveltu löytyvän Itä-Siperiasta (Wilson 2001). Nepalilainen salalantiaisen vahvistaa lajin joka tapauksessa löytyvän Aasiasta. Pohjois-Amerikassa esiintyvät havaintojeni valossa molemmat lajit, mutta tarkempi lajikohtainen levinneisyys jää myöhemmin selvitettäväksi. Australiassa esiintyy pihalantiaisen nimellä jompikumpi tai kummatkin lajit.

Wilson (2001) ja Whitehead (2006) ovat esittäneet salalantiaisen olevan laajalle levinnyt, vaihtelevia lämpötiloja sietävä holarktinen laji, joka kykenee asuttamaan myös vuoristoalueita. Salalantiaisia onkin löytynyt korkeuseroiltaan vaihtelevilta alueilta, muutamista sadoista metreistä esimerkiksi Slovakian Karpaattien 1250 metrin korkeuteen saakka, Italian puolelta jopa 1500 metristä (Whitehead 2006). Sekvensoimani nepalilainen salalantiaisen oli kerätty vuoristosta 2460 metrin korkeudelta.

Siitä, onko piha- ja salalantiaisen välillä ekologisia eroja esiintyy ristiriitaista tietoa. Koska lajit elävät säännöllisesti rinnakkain, ekologisia eroja on mahdollisesti kehittynyt. Whitehead (2006) arvelee piha- ja salalantiaisen välttävän suoraa kilpailua. Hän oli alustavissa tutkimuksissaan löytänyt pihalantiaista Isossa-Britanniasta lähinnä yksittäin, kun taas salalantiainen vaikutti olevan hallitseva laji ainakin suurten ruohonsyöjien jätöksillä. Wilson (2001) päinvastoin arvioi pihalantiaisen olevan valtalaji Isossa-Britanniassa. Jason Matén mukaan pihalantiainen on kenties ympäristön kuivuuden, kuumuuden tai molempien suhteen kestävämpi (sähköpostiviesti 11.3.2011). Maté on havainnut enemmän piha- kuin salalantiaisia ja arvelee salalantiaisen viihtyvän paremmin Atlantin ilmanalassa. Toukkien välillä on hänen mukaansa myös joitain eroja.

4.4. Mitä pihalantiaisen ja salalantiaisen sekvenssit kertovat?

Tulosten pohjalta on ilmeistä, että etenkin salalantiaisen lajinsisäiset erot COI-geenin emäsekvenssissä ovat pieniä (keskimäärin vain 0,2 %). Salalantiaisen haplotyyppidiversiteetti Suomessa on huomattavan suuri, mutta suurin osa yksilöistä edustaa yhtä, koko maassa esiintyvää haplotyyppiä. Myös suomalaisilla ukkolantiaisilla (*Aphodius fossor*) on todettu mittava haplotyyppidiversiteetti, mutta lajin paikalliskantojen välinen geneettinen eriytyminen on kuitenkin vähäistä (Roslin 2001). Yksilöiden liikkuvuus populaatioiden välillä oli oletettua suurempaa, sillä ainoastaan Ahvenanmaalla havaittiin mantereesta poikkeava haplotyyppikoostumus COI-geenissä. Salalantiaisen haplotyyppien maantieteellisestä jakaumasta Suomessa on vaikea päätellä mitään, sillä COI-sekvenssien lukumäärä vaihteli keruupaikasta riippuen (vaihteluväli 1–7 sekvenssiä, keskiarvo 2,4). Luultavasti joidenkin Pohjois-Suomessa esiintyvien haplotyyppien puuttuminen Etelä-Suomesta johtuu lähinnä sattumasta. Asia tulisi kuitenkin varmistaa suuremmalla otoskoolla.

Mitokondrio-DNA:n haplotyyppidiversiteetti kuvastaa populaatioiden historiaa: esimerkiksi usealla alueella esiintyvät haplotyyppit osoittavat viimeaikaista levittäytymistä (Craft ym. 2010). Selvitykseni mukaan sekä Pohjois-Amerikassa (Länsi-Virginia) että Suomessa esiintyy sama salalantiaisen haplotyyppi, vaikka etäisyys on melkoinen. Craft ym. (2010) havaitsivat Uuden-Guinean perhosilla useita tapauksia, joissa yksittäisiä haplotyyppiejä löytyi tuhansien kilometrien säteeltä. Eräs Uudessa Guineassa esiintyvä haplotyyppi löytyi myös Taiwanista ja Australiasta, jopa 5340 kilometrin etäisyydeltä.

Aivan kuten salalantiaisella, ukkolantiaisellakin Suomessa ja Espanjassa esiintyi samoja haplotyyppiejä (Roslin 2001). Tiedetään että Espanja yhdessä Portugalin kanssa on toiminut tärkeänä refugiona kvartäärikauden vaihtelevissa ilmasto-oloissa (Miraldo ym. 2011). Pohjois-

Eurooppa on uudelleenasetettu jääkausien jälkeen pääasiassa juuri Iberian ja Balkanin refugioista, tosin tarkat leviämisreitit vaihtelevat eliöryhmien välillä, eikä idästä tapahtuneesta levittäytymisestä tiedetä vielä tarpeeksi (Taberlet ym. 1998). Monilla lajeilla populaatioiden geneettinen monimuotoisuus on kuitenkin vähäisempää hiljattain jäältä vapautuneilla alueilla, kuin seuduilla joita populaatiot ovat asuttaneet pitempään (Merilä ym. 1997). Merilä ym. (1997) havaitsivatkin viherpeippon (*Carduelis chloris*) geneettisen monimuotoisuuden Euroopassa vähenevän voimakkaasti etelästä pohjoiseen. Haplotyyppiverkoston havaittiin viherpeipolla olevan tähdenmuotoinen, minkä selitti parhaiten jääkaudenjälkeinen nopea levittäytyminen. Salalantiaisen niin ikään tähdenmuotoinen haplotyyppiverkosto viittaa siihen, että laji on hiljattain laajentanut voimakkaasti levinneisyyttään.

Sopiva vertailukohta tutkimalleni lajiparille löytyy myös madagaskarilaisten lantakuoriaisten viimeaikaisesta sopeutumisesta uudenlaiseen ravintoon: *Helictopleurus neoampicollis* ja *H. marsyas* -lantakuoriaisten laskettiin siirtyneen metsistä avoimiin elinympäristöihin noin 1500 vuotta sitten karjatalouden rantauduttua Madagaskarille (Hanski ym. 2008). Nämä lajit laajensivat nopeasti elinalueitaan ympäri saaren, mikä on jättänyt jälkensä niiden COI-haplotyyppiverkoston: Suurin osa lajien yksilöistä edustaa yhtä laajalle levinnyttä haplotyyppiä. Lisäksi löytyi muutamia vähälukuisempia haplotyyppisiä, jotka erosivat yleisimmästä tyyppistä vain muutaman nukleotidin suhteen. Sen sijaan useimmat muut lajit ovat pysytelleet alkuperäisessä ravinnonlähteessä (makimaisten puoliapinoiden lannassa) jo kymmeniä miljoonia vuosia. Tällaisten lajien haplotyyppiverkostat koostuivat useista maantieteellisesti eriytyneistä haplotyypeistä joiden välillä oli tapahtunut useita mutaatioita. Lisäksi mikään niistä ei ollut merkittävästi muita yleisempi (Hanski ym. 2008). Pihalantiaisen haplotyyppiverkoston tarkastelu antaa viitteitä siitä, että laji on pysytellyt esiintymisalueillaan jo pitempään, jolloin populaation sisälle on ehtinyt kertyä geneettisiä eroja. Pihalantiaisten lajinsisäinen geneettinen etäisyys oli aineistossani keskimäärin 0,7 %, siis hieman suurempi kuin salalantiaisella, mutta kuitenkin pieni verrattuna lajien väliseen etäisyyteen (8,1 %). Pihalantiaisen populaatorakenteen perinpohjainen selvitys vaatii lisäyksilöiden sekvenssointia, sillä yksilöitä oli otoksessa vähän verrattuna salalantiaisiin, ja ne olivat peräisin laajalta maantieteelliseltä alueelta (vrt. kuvat 7 ja 10a).

4.5 Johtopäätökset

Tässä tutkielmassani olen osoittanut DNA-lajitunnisteiden erotteluvan piha- ja salalantiaisen tarkasti toisistaan. Käyttämäni COI-sekvenssit antoivat yksiselitteisen tiedon tutkimusyksilöiden

identiteetistä, sillä lajien välinen sekvenssivaihtelu oli merkittävästi lajinsisäistä vaihtelua runsaampaa. Tämä tulos mahdollistaa myös tulevaisuudessa lajien nopean ja varman tunnistamisen.

Morfologiaan perustuva määrittyskaava ei yksinään tarjonnut luotettavaa työkalua lajien erotteluun, sillä vaikka ulkoisia eroja löytyy, osalla yksilöistä on molempien lajien piirteitä. Whiteheadin (2006) julkaisema määrittyskaava toimi varmuudella vain noin puolessa tapauksista, joten tarvetta kaavan kehittämiseen selvästi on. DNA-tunnisteiden tarkkuus osoitti, että Wilsonin (2001) kaavankaan soveltaminen ei toimi aukottomasti edes alan tunnetulla asiantuntijalla. Siksi onkin varmintä käyttää DNA-pohjaista tunnistusta morfologian tilalla.

Pihalantiaista on lajina pidetty jo pitkään hyvin tunnettuna. Samalla se on eräs maamme yleisimmistä hyönteislajeista. Tällaisen lajin vaihtuminen kokonaan toiseen lajiin on siten melkoinen yllätys. Väistämättä tämä antaa kuvan siitä, kuinka huonosti tunnettu maapallon biodiversiteetti yhä on. Etenkin tropiikin lajikirjon kartoittaminen voi olla paljon kuviteltua mittavampi haaste. Kaikeksi onneksi sekvenssoinnin nopea kehittyminen avaa uusia mahdollisuuksia tulevaisuudessa käsitellä valtavia näytemääriä kerralla. Tämä nopeuttaa entisestään jo hyväksi havaittujen DNA-lajitunnisteiden käyttöä taksonomian apuna.

5. Kiitokset

Kiitän ohjaajaani Tomas Roslinia jännittävästä tutkimusaiheesta sekä avusta ja hyvistä ideoista työn kaikissa vaiheissa. Kiitos Andreia Miraldolle vankasta tuesta laboratoriossa ja neuvoista aineiston käsittelyssä. Kiitokset Robert Angusille korvaamattomasta vaivannäöstä kromosomipreparaattien valmistuksessa. Suuri kiitos Pekka Maliselle valokuvausavusta. Aineistonkeruumatkoista erityisen hauskoja tekivät ystäväni Hetta-Mari Rajapuro sekä puolisoni Atte Rajapuro. Atelle lisäksi kiitos teknisestä (ja henkisestä) tuesta. Suurkiitos kuuluu aineistonkeruun mahdollistaneille ystävällisille karjatilallisille! Kiitos Mikko Pentinsaarelle, joka lähetti minulle lantakuoriaisia Oulusta ja Paltamosta. Aineistonkeruussa auttoivat ystävällisesti myös Bess Hardwick, Riikka Kaartinen ja Ika Österblad. Riikalle kiitos myös hyvistä kirjallisista kommentteista. Kiitokset Jason Matélle taustatiedoista laboratoriotöiden ja määrittäksen suhteen, sekä Hannu Pietiäiselle hyödyllisistä kommentteista työn kirjoitusvaiheessa. Suuri kiitos hanketta taloudellisesti tukeneille Helsingin Hyönteistieteelliselle Yhdistykselle, Kuopion Luonnon Ystävien Yhdistykselle, Societas pro Fauna et Flora Fennicalle sekä Suomen Hyönteistieteelliselle Seuralle. Kiitokset myös Olof Biströmille, Silvija Budaviciutelle, Ilkka Hanskille ja Metapopulaatiobiologian huippuyksikölle, Helena Korpelaiselle, Gunilla Ståhls-Mäkelälle, Niklas Wahlbergille, Eero Vesteriselle ja MES-laboratoriolle. Lopuksi erityiskiitos Hiialle ihan kaikesta!

6. Kirjallisuus

- Angus, R.B. 2006: Chromosome differences: — Kirjassa: Cooter, J. & Barclay, M.V.L. (toim.), *A Coleopterist's Handbook, 4. painos, The Amateur Entomologist 11*: 346–351. Cravitz Printing Company Ltd., Essex. 439 s.
- Ashrafi, S., Bontadina, F., Kiefer, A., Pavlinic, I. & Arlettaz, R. 2010: Multiple morphological characters needed for field identification of cryptic long-eared bat species around the Swiss Alps. — *Journal of Zoology* 281: 241–248.
- Baker, R.J. & Bradley, R.D. 2006: Speciation in mammals and the genetic species concept. — *Journal of Mammalogy* 87: 643–662.
- Barcode of life -hanke 2012: Kansainvälisen Barcode of Life-konsortion (CBOL) verkkosivusto, luettu 7.4.2012. — <http://www.barcodeoflife.org/>.
- Benson, D.A., Mizrachi, I.K., Lipman, D.J., Ostell, J. & Wheeler, D.L. 2006: GenBank. — *Nucleic Acids Research* 35: D21–D25.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K. & Das, I. 2006: Cryptic species as a window on diversity and conservation. — *Trends in Ecology and Evolution* 22: 148–155.
- Bordat, P. 2002: A propos de quelques espèces d'Aphodiens de la faune de France. — *Coléoptériste* 5: 129–130.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. 2000: TCS: a computer program to estimate gene genealogies. — *Molecular Ecology* 9: 1657–1659.
- Colborn, J., Crabtree, R.E., Shaklee, J.B., Pfeiler, E. & Bowen, B.W. 2001: The evolutionary enigma of bonefishes (*Albula* spp.): Cryptic species and ancient separations in a globally distributed shorefish. — *Evolution* 55: 807–820.
- Costa, F.O., & Carvalho, G.R. 2010: New insights into molecular evolution: prospects from the Barcode of Life Initiative (BOLI). — *Theory in Biosciences* 129: 149–157.
- Craft, K.J., Pauls, S.U., Darrow, K., Miller, S.E., Hebert, P.D.N., Helgen, L.E., Novotny, V. & Weiblen, G.D. 2010: Population genetics of ecological communities with DNA barcodes: An example from New Guinea Lepidoptera. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 5041–5046.
- Dasmahapatra, K.K. & Mallet, J. 2006: DNA barcodes: recent successes and future prospects. — *Heredity* 97: 254–255.
- Dellacasa, M. & Dellacasa, G. 2003: Review of the genus *Aphodius* (Coleoptera: Aphodiidae). — *Folia Heyrovskyana* 11: 173–202.
- Detwiler, J.T., Bos, D.H. & Minchell, D.J. 2010: Revealing the secret lives of cryptic species: Examining the phylogenetic relationships of echinostome parasites in North America. — *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 611–620.
- Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Moir R., Stones-Havas S., Sturrock, S., Thierer, T. & Wilson, A. 2010: Geneious v5.3, saatavissa osoitteesta <http://www.geneious.com>.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. 2010: Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. — *Molecular Ecology Resources* 10: 564–567.
- Falahee, S.L. & Angus, R.B. 2010: Chromosomal separation of difficult species of *Copris* Geoffroy, 1762 and *Onthophagus* Latreille, 1802 (Coleoptera, Scarabaeidae), with discussion of *O. massai* Baraud as a British Pleistocene fossil. — *ZooKeys* 34: 17–32.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. — *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294–299.

- Fontaneto, D., Iankovenko, N., Eyres, I., Kaya, M., Wyman, M. & Barraclough, T. G. 2011: Cryptic diversity in the genus *Adineta* Hudson & Gosse, 1886 (Rotifera: Bdelloidea: Adinetidae): a DNA taxonomy approach. — *Hydrobiologia* 662: 27–33.
- Glaw F., & Vences, M. 2002: A new cryptic frog species of the *Mantidactylus boulengeri* group with a divergent vocal sac structure. — *Amphibia-Reptilia* 23: 293–304.
- Gordon, R.D. & Skelley, P.E. 2007: A monograph of the Aphodiini inhabiting the United States and Canada (Coleoptera: Scarabaeidae: Aphodiinae), — *Memoirs of the American Entomologist Institute*, 79, 580 s.
- Hanski, I., Wirta, H., Nyman, T. & Rahagala, P. 2008: Resource shifts in Malagasy dung beetles: contrasting processes revealed by dissimilar spatial genetic patterns. — *Ecology Letters* 11: 1208–1215.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & deWaard, J.R. 2003a: Biological identifications through DNA barcodes. — *Proceedings of the Royal Society B*. 270: 313–321.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H. & Hallwachs, W. 2004: Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101: 14812–14817.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. & deWaard, J.R. 2003b: Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. — *Proceedings of the Royal Society B*. 270: S96–99.
- Jackson, J.B.C., Kirby, M.X., Berger, W.H. ym. 2001: Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems — *Science* 293: 629–638.
- Kaartinen, R., Stone, G.N., Hearn, J., Lohse, K & Roslin, T. 2010: Revealing secret liaisons: DNA barcoding changes our understanding of food webs. — *Ecological Entomology* 35: 623–638.
- Knowlton, N. 1993: Sibling species in the sea. — *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 24: 189–216.
- Lantakuoriaiset 2012: Helsingin yliopiston verkkosivusto, luettu 7.4.2012. — <http://www.helsinki.fi/foodwebs/lantakuoriaiset/>.
- Lumley, L.M. & Sperling, F.A.H. 2010: Integrating morphology and mitochondrial DNA for species delimitation within the spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) cryptic species complex (Lepidoptera: Tortricidae) — *Systematic Entomology* 35: 416–428.
- Lou, M. & Golding, G.B. 2007: FINGERPRINT: Visual depiction of variation in multiple sequence alignments. — *Molecular Ecology Notes* 7: 908–914.
- Manguin, S., Garros, C., Dusfour, I., Harbach, R.E. & Coosemans, M. 2008: Bionomics, taxonomy, and distribution of the major malaria vector taxa of *Anopheles* subgenus *Cellia* in Southeast Asia: An updated review. — *Infection, Genetics and Evolution* 8: 489–503.
- Mata, J., Setamou, M., French, J., V. & Louzada, E. 2010: Molecular Fingerprinting and Population Dynamics of *Brevipalpus* Mites on Texas Citrus. — *Annals of the Entomological Society of America* 103: 898–907.
- Merilä, J., Björklund, M. & Baker, A. 1997: Historical demography and present day population structure of the greenfinch, *Carduelis chloris* — an analysis of mtDNA control-region sequences. — *Evolution* 51: 946–956.
- Miraldo, A., Hewitt, G.M, Paulo, O.S. & Emerson, B.C. 2011: Phylogeography and demographic history of *Lacerta lepida* in the Iberian Peninsula: multiple refugia, range expansions and secondary contact zones. — *BMC Evolutionary Biology* 11: 1471–2148.
- Novotny, V., Miller, S.E., Hulcr, J., Drew, R.A.I., Basset, Y., Janda, M., Gregory, P. Setliff, G.P., Darrow, K., Stewart, A.J.A., Auga, J., Isua, B., Molem, K., Manumbor, M., Tamtiai, E., Mogia, M. & Weiblen, G.D. 2007: Low beta diversity of herbivorous insects in tropical forests. — *Nature* 448: 692–695.

- Packer, L., Gibbs, J., Sheffield, C. & Hanner, R. 2009: DNA barcoding and the mediocrity of morphology. — *Molecular Ecology Resources* 9: 42–50.
- Posada, D., & Crandall, K., A. 2001: Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. — *Trends in Ecology and Evolution* 16: 37–45.
- Ratnasingham, S. & Hebert, P.D.N. 2007: BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). — *Molecular Ecology Notes* 7, 355–364.
- Root, T.L., Price, J.T., Hall, K.R., Schneider, S.H., Rosenzweig, C. & Pounds, J.A. 2003: Fingerprints of global warming on wild animals and plants. — *Nature* 421: 57–60.
- Roslin, T. 2001: Spatial population structure in a patchily distributed beetle. — *Molecular Ecology* 10: 823–837.
- Roslin, T. & Heliövaara, K. 2009: *Suomen lantakuoriaiset – opas santiaisista lantiaisiin*. — Gaudeamus Helsinki University Press, 244 s.
- Tan, D.S.H., Ang, Y., Lim, G.S., Ismail, M.R.B. & Meier, R. 2010: From ‘cryptic species’ to integrative taxonomy: an iterative process involving DNA sequences, morphology, and behaviour leads to the resurrection of *Sepsis pyrrhosoma* (Sepsidae: Diptera). — *Zoologica Scripta* 39: 51–61.
- Teacher, A.G.F. & Griffiths, D.J. 2010: HapStar: automated haplotype network layout and visualization. — *Molecular Ecology Resources* 11: 151–153.
- Tirri, R., Lehtonen, J., Lemmetyinen, R., Pihakaski, S. & Portin, P. 2006: *Biologian sanakirja* — Kustannusosakeyhtiö Otava, 888 s.
- Valentini, A., Pompanon, F. & Taberlet P. 2008: DNA barcoding for ecologists. — *Trends in Ecology and Evolution* 24: 110–117.
- Virkki, N. 1951: Zur Zytologie einiger Scarabaeiden (Coleoptera). Studien an der Spermatogenese. — *Annales Zoologici Societas Zoologicae Botanicae Fennicae "Vanamo"* 14: 1–104.
- Whitehead, P.F. 2006: *Aphodius* (A.) *fimetarius* (L., 1758) and *Aphodius* (A.) *pedellus* (DeGeer, 1774) (Col., Ahpodiidae) are distinct species with new evidence for their European distribution. — *Entomologist's Monthly magazine* 142: 85–86.
- Wilson, C.J. 2001: *Aphodius pedellus* (DeGeer), a species distinct from *A. fimetarius* (Linnaeus) (Coleoptera: Aphodiidae). — *Tijdschrift voor Entomologie* 144: 137–143.
- Wilson, C.J. & Angus, R.B. 2004: A chromosomal analysis of the West European species of *Aphodius* Illiger, subgenus *Aphodius* s. str. (Coleoptera: Aphodiidae). — *Tijdschrift voor Entomologie* 147: 259–264.

Liitteet

1. DNA-eristysmenetelmän valinta

DNA:n eristäminen ei aina ole täysin suoraviivaista. Tämän liitteen tarkoitus onkin olla hyödyksi vastaavissa tulevissa töissä. Eristysmenetelmän toimivuuteen vaikuttaa muun muassa eliön rakenne (esimerkiksi sen kitiinipitoisuus), sekä miten näytteitä on säilytetty. Onnistunut eristys antaa hyvät lähtökohdat myöhemmille työvaiheille. Siksi esittelen alla tarkasti miten tässä työssä toimittiin.

DNA:n eristämiseksi hyönteisistä on tavallista käyttää vain yhtä tai kahta takajalkaa. Alustavissa eristyksissä huomasimme kuitenkin DNA-pitoisuuden jäävän tällä menetelmällä alhaiseksi jopa aivan tuoreista yksilöistä. Päädyimme siksi käyttämään suuremman määrän kudosta. Silmäpigmenttien on arveltu häiritsevän DNA-eristystä, ja mahdollisesti aiheuttavan ongelmia myöhemmissäkin vaiheissa. *Aphodius*-suvun lantakuoriaisilla on kuitenkin aiemmin saatu hyviä sekvenssejä päästä eristetystä DNA:sta (Roslin 2001).

Koko yksilön hajottamista halusin välttää kolmesta syystä: Ensiksi käyttämäni morfologiset tuntomerkit sijaitsevat peitinsiivissä, jotka halusin säästää mahdollista myöhempää tarkastelua varten. Toiseksi halusin säästää kaksi takimmaista raajaparia, joista eristystä voitaisiin yrittää tarvittaessa uudelleen. Kolmanneksi tarpeettoman suuri DNA-pitoisuuskaan ei ollut toivottavaa: Monisatakertaiset erot pienimpien ja suurimpien pitoisuuksien välillä teettäisivät lisätyövaiheen jälkimmäisten laimentamiseksi, sillä hyvin vahvojen PCR-tuotteiden tulkinta geelielektroforeesilla voisi olla hankalaa, ja sekvensointi saattaisi epäonnistua (Andreia Miraldo, keskustelu kesällä 2011).

Näihin harkintoihin perustuen päädyin eristämään DNA:ta lantiaisten päästä ja keskiruumiista, mukaan lukien etummaisesta raajaparista. Säilöin kunkin yksilön takaruumiin ja siivet keruutietoineen puhtaaseen etanoliin (Etax Aa, Altia, Rajamäki) myöhempää tarkastelua varten.