



Luspen  
GYMNASIET  
Storuman

# Är sex ett onödigt ont?

## -Indikationer från olika vivlars evolution

Lovisa Lindh

Handledare: Magnus  
Lundmark, Umeå  
universitet  
Handledare: Per-Daniel  
Liljegren,  
Luspengymnasiet,  
Storuman  
Luspengymnasiet  
2004-05-21

## Abstract

The organisms that propagate through sexual reproduction have always been assumed to have an advantage over the asexual organism, because of the variation that sex creates. The variation is created because of the genetic make-up that the offspring gets from both parents and when so-called overcrossing happen during meiosis. An asexual organism on the other hand creates an identical copy of themselves through cloning. You can say that they have left males behind. It has however been shown that very many species has return to asexual reproduction. Some species has survived millions of years without sexual reproduction and the number is just increasing. How can these organisms survive whiteout sex? This study is made on weevils that have both sexual and asexual forms. The asexual forms of these weevils have wider distribution than the sexual forms, and are more dominating. The higher number of chromosomes is a very important factor for their clonal success. My analysis indicates that clones have arisen through hybridisation.

Key words: parthenogenesis, weevils, polyploidi, clonal

# Innehållsförteckning

<b>Introduktion</b> .....	3
- <i>Bakgrund</i> .....	3
- <i>Mutationer</i> .....	4
- <i>Fördelar/Nackdelar med partenogenes</i> .....	5
- <i>Vivlar</i> .....	5
- <i>DNA</i> .....	6
- <i>Art och ploidbestämning</i> .....	7
- <i>Preparering av DNA</i> .....	7
- <i>PCR</i> .....	7
- <i>Gel separering</i> .....	8
- <i>Sekvensering</i> .....	8
- <i>Fylogenetisk analys</i> .....	9
<b>Syfte och frågeställningar</b> .....	10
<b>Metod och Material</b> .....	11
<b>Resultat</b> .....	12
<b>Diskussion</b> .....	13
<b>Referenser</b> .....	15
<b>Ordlista</b> .....	17
<b>Appendix I</b> .....	18
<b>Appendix II</b> .....	19
<b>Appendix III</b> .....	20
<b>Appendix IV</b> .....	21
<b>Appendix V</b> .....	22
<b>Appendix VI</b> .....	23
<b>Appendix VII</b> .....	24
<b>Appendix VIII</b> .....	25

# Introduktion

## *Bakgrund*

*“It is not true that evolution is a law it is just a phenomenon”* (J. Monod)

När man talar om evolution och asexualitet så finns det en allmän uppfattning är att asexuella organismer inte kan utvecklas. Inom insektsvärlden är dock partenogenes ganska vanligt. Det finns även ryggradsdjur som är klonala som till exempel flera ödlor och fiskar. Under de senaste 10 000 åren har det alltså uppkommit allt fler klonalt förökande arter. Dessa har dessutom utvecklats från sexuella arter (Stenberg, P).

Det finns två huvudtyper av fortplantning, asexuell och sexuell. Vid asexuell förökning blir avkommans genetiska uppsättning identisk med eller åtminstone mycket lik moderindividens. Hos de flesta flercelliga organismer finns dock sexuell förökning, vilket innebär att genetiskt material från två olika celler blandas. Den sexuella förökningen ser alltså till att det uppstår en slumpvis kombinerings av arvsanlag, vilket ger upphov till biologisk variation. Den process som ansvarar för detta kallas för meios och produkten av denna blir gameterna (könsceller). Gameten har en enkel kromosomuppsättning d.v.s. endast ett arvsanlag av varje slag (hanliga eller honliga) d.v.s. att den är haploid. Vid befruktningen sammansmälter hon- och hangameten till en så kallad zygot, som är den första cellen av organismens diploida stadium. Vid den asexuella fortplantningen bildas ett embryo från en obefruktad äggcell. Detta fenomen kallas för partenogenes och hos djur även för jungfrufödsel. På grund av det inte sker någon parning hos partenogenetiska djur är hanar mycket ovanliga eller saknas helt. Men i vissa fall krävs det en hane för att försätta honan i rätt humör för att utvecklingen av äggcellen skall inledas. Det sker dock aldrig något utbyte av arvs massa i dessa fall. I vissa fall kan även en hona utföra detta uppdrag. Dessutom finns det arter som kan skifta mellan sexuell och asexuell fortplantning beroende på vad som passar bäst just då. (Tamarin, R, H) Beroende på bland annat den genetiska mekanismen kan partenogenes delas in i en rad typer som t.ex. automixis och apomixis. När en organism är automiktisk så innebär det att ägget genomgår en meios och resultatet blir fyra celler med halva antalet kromosomer i varje. Två av dessa celler kan då fogas samman och återställa kromosom antalet. Om organismen är apomiktisk så sker ingen meios. Istället sker en vanlig mitos, men det blir dock ingen genetisk variation i detta fall. Avkomman blir en exakt kopia av modern med undantag för mutationer. Härefter kommer jag emellertid enbart att koncentrera mig på apomiktiska organismer, eftersom ingen av de automikta organismerna helt har lämnat sexuell förökning bakom sig. Apomixis förekommer ofta i samband med polyploid och är en av de vanligaste och mest utvecklade formerna av partenogenes hos djur.

Nästan alla sexuella organismer är diploida och de har ett jämt kromosomantal för att meiosen ska fungera. Hos de organismer som klonar sig behöver kromosomantalet däremot inte vara jämt för att en mitos ska kunna genomföras. Däremot har många av dem en hög polidivån. Anledningen till att det sker förändringar i ploidinivån hos partenogena organismer kan bero på två saker. Den första orsaken är att det kan ha skett en felaktig fördelning av kromosomer vid celledelning. På grund av detta kan antingen en ökning eller en minskning i ploidinivån ske. En hane kan också ha haft ett finger med i spelet. Hanens sperma tränger in i ett redan producerat ägg. Vilket gör så att ploidinivån stiger, men enbart ett steg i taget. På detta sätt blir det även ny genetisk variation i den klonala härstamningen (Adams, P., Benton, M., Burnie, D). En enda population kan innehålla ett flertal olika ploidinivåer.

Trots att det finns så många olika partenogenetiska organismer så är väldigt lite forskning utförd om hur den klonala förökningen har uppkommit. I de allra flesta fall med goda underlag så har man kommit fram till att orsaken till övergång från sexuell till klonal förökning har varit hybridisering mellan två sexuella arter.

## Mutationer

Den största nackdelen för de klonala organismerna är att det blir en liten genetisk variation i deras avkommor eftersom klonala organismer endast förändras genom mutationer. Detta gör att de även har en låg anpassningshastighet vid en förändring i omgivande miljö och större sårbarhet mot parasiter och sjukdomar. Mutationer uppkommer spontant med en liten sannolikhet för varje enskild cell. Det finns olika slags mutationer, genmutation och kromosommutation. Vid nybildningen av DNA i samband med celledelningen uppkommer spontana mutationer som en följd av till synes slumpmässiga felaktigheter (Gonick, L., Wheelis, M.). När en s.k. "missens"-mutation uppkommer bildas en tripplett som kodar för en annan aminosyra än den ursprungliga t.ex. alanin istället för glycin. Effekten blir vanligtvis mindre allvarlig om de båda aminosyrorerna har likartade egenskaper.

Vid en nonsens-mutation uppkommer ett stoppkodon. Detta gör att proteinet som kodas av genen blir förkortat. Och vid en frame shift-mutation har det skett en insättning eller ett bortfall av en nukleotid, vilket ändrar sammansättningen hos efterföljande basstripletter. På grund av detta uppkommer ett protein med en helt annorlunda sammansättning än det som kodas av den normala genen.

Beroende på hur den i DNA lagrade informationen påverkas kan mutationer ha mycket varierande effekt på individens funktionsduglighet. En neutral effekt har ingen inverkan på individen men om viktiga reglerande funktioner sätts ur spel kan det medföra individens död. Variation som är betydelsefull för anpassningen kan påverka enzyms funktion, fysiologiska processer, individens könsmodnhet, storlek och yttre form.

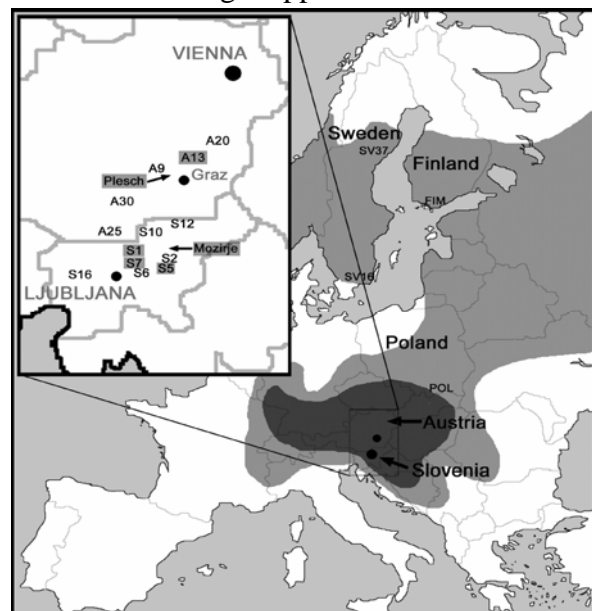
Polyploida organismer kan i regel klara av ett stort antal mutationer innan de negativa effekterna tar övertaget då de har fler kopior av de olika generna (Ekman, A.).

## Fördelar/nackdelar med partenogenes

Ett annat bekymmer som klonerna kan stötta på är att de i det långa loppet får det svårt att överleva på grund av parasiter. Parasiterna gynnas nämligen av att alla avkommorna är identiska och inte fortsätter att utvecklas. De klonala organismer har inte den fördelen att kunna producera avkommor som kan hantera nya situationer, vilket de sexuella har.

En del asexuella organismer har dock överlevt i miljontal år utan sexuell förökning och i naturen finns det ett stort antal av klonala organismer. Många av dessa har dessutom utkonkurrerat sina sexuella förfäder. En av de stora fördelarna med kloner är att de kan reproducera sig dubbelt så snabbt än de sexuella organismerna, eftersom varje individ är självproducerande.

Men i verkligheten så gör de inte alltid det. En annan fördel är att klonerna har det lättare att sprida sig geografiskt. Om en klon t.ex. följer med ett träd som transporterats av människor från de Österrikiska skogarna till Sverige så har den lättare att sprida sig eftersom den inte behöver hitta en hane/hona för att kunna reproducera sig. Det räcker



**Figur 1.** Spridning av *Otiorynchus scabers* olika former. Den tetraploida formen har störst spridning (ljus grå området). Både triploida och tetraploida formerna lever det mörkgrå området. I de svarta prickarna lever samlever alla klonala former med de sexuella.

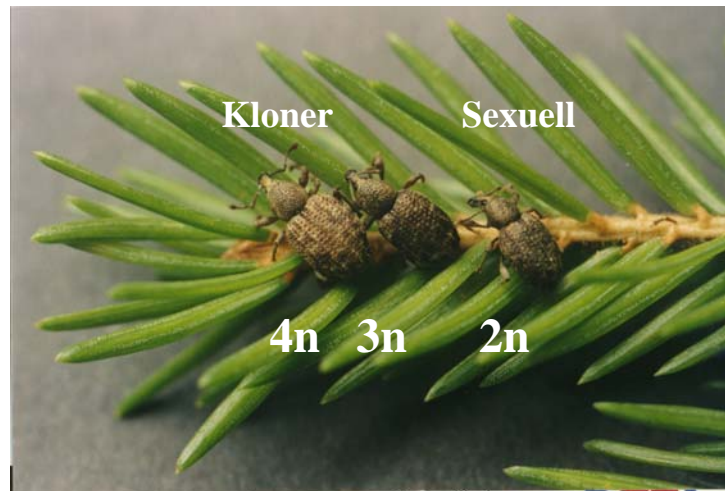
med en klonal hona för att grunda en helt ny population. Kloner behöver inte heller använda någon tid till att attrahera och finna en partner. De kan om de vill använda all sin energi till att reproducera sig.

Man kan också se en geografisk distribution mellan de sexuella organismerna och klonerna ( se figur 1) och ( appendix 1 figur A ). Kloner och sexuella samlever ofta i ett litet centralt område. Utanför detta område finns enbart kloner. Den klonala spridningen är dessutom mer placerad till de norra och högre belägna områdena. Denna fördelning kan man se hos både växter och djur världen över (Stenberg, P).

### Vivlar

Av de 900 kända asexuella insekterna är 200 vivlar. Vivlar är en familj skalbaggar som har en världsvid utbredning. De är 1-60 mm långa och många har reducerade bakvingar och sammanväxta täckvingar. Deras huvud är utdraget till ett kort eller långt snyte och antennerna är knäböjda. De föder på rötter av tall och blåbär och mesta delen av året lever de under jorden (Ekman, A.). Det kan vara svårt att upptäcka dem eftersom de oftast gömmer sig på

dagarna och äter under natten. Men under två veckor varje vår kommer de upp för att äta av de fräscha tallskotten. Under denna tid parar de sig även på tallens grenar. Alla asexuella vivlar som hitintills har studerats har visats sig vara apomikta och har därmed lämnat meios och rekombinationen bakom sig. Vivlar finns i både sexuella och asexuella former. På grund av detta är vivlar perfekta till att studera klonal reproduktion. Något som också är vanligt är att de vivlar med polyploid kromosom uppsättning är större än de med diploid kromosom uppsättning (se



Figur 2. Tre olika former av *Otiorhynchus scaber*

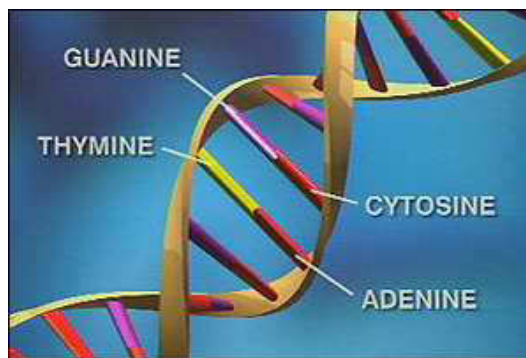
ett känt släkte inom vivlar är *Otiorhynchus scaber*. Man har märkt att hanarna har blivit allt färre och svårare att få tag på inom denna art. De diploida sexuella av detta släkte finns i små areor i Österrike och i lite större utsträckning i Slovenien. Inom dessa areor samlever alla former men de polyploida har en större spridning. De tetraploida är spridna ända upp till den latitud som Umeå ligger på. En art som har liknande utbredning som *O.scaber* är *Otiorhynchus lepidopterus*. Det finns sexuella diploida i alperna och runt om finns de polyploida klonerna. Än så länge vet man lite om dem men det finns mycket variation i hur de ser ut rent morfologiskt. *O.lepidopterus* och *Otiorhynchus salicis* är en och samma art men *O.salicis* är det äldre namnet som används om de sexuella.

Inom *Otiorhynchus sulcatus* är alla individer partenogenetiska d.v.s. man känner inte till några sexuella eller diploida baggar inom denna art. Dessutom har alla de kloner man studerat varit triploida. Arten finns över större delen av världen. *O.sulcatus* favorit föda är en speciell sorts ljug men den är en skadegörare på massa olika grödor. Trots studier av *O.sulcatus* från både USA, Tyskland, Holland och England så har ingen mitokondriell variation funnits. Denna nivel bland många andra kan göra stor skada på skogen särskilt när den är plantningsstadiet (Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook.)

## Arvs massa

*”Gener är arvsanlag. Gener är ett kemiskt språk, som allt levande på jorden har gemensamt. Gener är framförallt obegripligt små och gömmer sig inuti nästan lika små celler. Gener är kort sagt svåra att ha att göra med för vanligt folk.”*(Arnesson-Westerdahl, A., Olsson, R.)

DNA eller *deoxiribonukleinsyra* är en komplicerad makromolekyl som utgör arvs massan hos alla kända levande organismer det är också huvudkomponenten i kromosomer. Man kan likna DNA-molekylen vid en planritning efter vilken proteinerna och cellerna i en organism byggs upp. Att DNA-molekylen kan kopiera sig själv är en grundförutsättning för att överföring av genetisk information från en generation till en annan. DNA består av tusentals nukleotider, vilka i sin tur består av en fosfatgrupp, en sockergrupp samt fyra möjliga kvävebaser: adenin (A), tymin (T), guanin (G) eller cytosin (C). Nukleotiderna är bundna till varandra i en lång kedja med kovalenta bindningar (se figur 3). Det är dock ordningsföljden mellan dessa baser i kedjan som utgör grunden för en informationskod, ett genetiskt språk. Med hjälp av detta språk uttrycks hur ett protein ska byggas upp. En kod består av tre bokstäver tex: ATT som kodar för en speciell aminosyra. Ordningsföljden på dessa koder bestämmer också hur aminosyror ska vara bundna till varandra i proteinet. Budskapet överförs från DNA i cellkärnan till ribosomerna i cytoplasman där syntesen av proteiner sker med hjälp av en annan nukleinsyra nämligen RNA, ribonukleinsyra.



**Figur 3.** DNA-spiral (Ekman, A.)

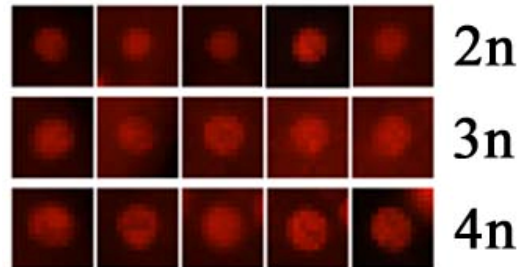
Avläsningen sker genom att mRNA (messenger-RNA) byggs upp som en avgjutning av cellkärnans DNA. Vanligen förekommer DNA som en dubbelspiral, detta betyder att två DNA kedjor är bundna till varandra genom vätebindningar. Dessa bindningar skapas enbart mellan adenin och tymin samt mellan guanin och cytosin. När DNA reproduceras spjälkas de två kedjorna från varandra före celledelningen. Sedan är varje enkelkedja mall för uppbyggandet av en ny dubbelkedjig DNA-molekyl. Nya nukleotider ansluts och binds samman med hjälp av enzym. Resultatet blir två dubbelspiraler som är exakta kopior av den ursprungliga DNA-molekylen.

Det är inte bara kärn- DNA som är unikt, även det mitokondriella DNA-et ger unika möjligheter till identifikation av arter eller populationer. Mitokondrien är en cellorganell och ligger i cellens cytoplasma. Den har till uppgift att omvandla den kemiskt bundna energin i födan till ATP. När det gäller släktskapsanalys så skiljer sig det mitokondriella DNA-et sig på många sätt från kärn-DNA och uppvisar flertalet fördelar. För det första genomgår det mitokondriella DNA-et igen meios utan nyproduktionen sker genom direkt delning s.k. mitos. För det andra finns det mitokondriella DNA:t i många kopior, ofta fler än 500 kopior per cell. Detta gör det möjligt att utvinna genetiskt material ur en mycket begränsad vävnads massa. För det tredje så ärvs det mitokondriella

DNA-et endast från modern, vilket gör att man har samma uppsättning som sin mor och sina syskon. Slutligen är mitokondriellt DNA haploid. Detta förenklar direkt sekvensering av amplifierat DNA. (Ekman, A.)

### Art- och ploidbestämning

För att bestämma ploidinivån i en individ använder man sig av en mycket enkel metod. Metoden går ut på att man jämför cellstorleken mellan olika individer (Stenberg, P). En cellkärna som är triploid är nämligen större än en cellkärna som är diploid (se figur 4). Först är man dock tvungen att artbestämma och könsbestämma vivlarna. Hanarna har en inbuktning under magen och klor på frambenen vilket honorna saknar. För att kunna titta på vivlarna när de är i livet använder man sig av en koldioxidkudde som gör att de blir dåsiga. När man bestämt vilket kön och vilken art skalbaggen är så försöker man att få ut de malfigiska kärnen. På den bakre delen av skalbaggen finns det en flik som man prövar att greppa med en pincett och böjer upp. När man fått fliken att lossna från skalbaggen försöker man att ta tag i den och dra den bort med allt som följer med den. Nu kan man se små vita kärn vilka man försöker att skilja bort från resten av innandömet. Alla de små kärnen flyttar man sedan över till en konkav glasplatta med två ämnen som färgar in kärnen så att man kan fotografera dem med en digitalkamera. På detta sätt kan man titta på cellerna och jämföra deras kärnstorlekar mot varandra. Bara de minsta cellerna fotograferas för jämföring (Stenberg, P).



Figur 4. Cellkärnor från diploida triploida och tetraploida *Otiorhynchus scaber*

### Preparering av DNA

Proceduren där man renar fram DNA sker i olika steg och man använder olika tillsatser. Eftersom DNA är inneslutet i cellen så måste man först ta sig igenom cellens vägg. Man gör detta genom att lysera cellväggen dvs. att man gör hål i den. Vid detta kommer även cellkärnans och mitokondriernas väggar att förstöras. Nästa dag extraheras DNAt. Provet centrifugeras och av detta kommer det att bli olika skikt, en övre vattenfas med DNA, ett mellanskikt med lipider och underst ett skikt med proteiner. Vattenfasen med DNA förs över till ett nytt rör och fälls sedan ut. Allt som inte är DNA tas sedan bort och den vita pelleten (DNA) renas med etanol. Pelleten kan sedan lösas upp med destillerat vatten (Hartl, D, L.).

### PCR

PCR-metoden (eng. polymerase chain reaction) används för att mångfaldiga en specifik DNA-sekvens. I DNA proverna tillsätter man Taq polymeras (*Thermus aquaticus*) som är ett enzym från en termofilbakterie vilket lever i varma källor och är därmed värmestabil. PCR är en snabb cell-fri metod som kommit att bli mycket viktig i den moderna gentekniken och har fått många användningsområden, alltifrån medicinsk behandling och forskning till rättsmedicin. Metoden består av tre stora skeden: denaturering, annealing och extension. Under denatureringen används värme för att få stopp på all enzymaktivitet och DNA denatureras från en dubbel till två enkelsträngade spiraler. Detta sker i temperaturer mellan 90-95°C.

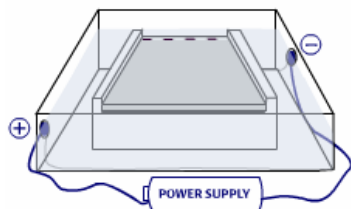
Vid nästa skede, annealing sänks temperaturen så att två syntetiskt framställda DNA-bitar, oligonukleotider (*primers*) kan binda sig till specifika bindningsställen på den denaturerade DNA-molekylen. Denna procedur sker i temperaturer mellan 50-70°C. Längden på primerna spelar en betydande roll, eftersom en för kort primer kan passa in på flera ställen på sekvensen, medan en för långprimer gör att det går mycket sakt för den att passa in och

resultatet kan bli felaktigt. Primerna behöver inte passa perfekt utan huvudsaken är att en stabil bindning bildas. Den ska vara så att säga komplementär.

Under det sista skedet så arbetar enzymet Taq polymeras för att replikera DNA utifrån de två oligonukleotider. Arbetet sker mellan temperaturerna 70-75°C och tillslut fås två dubbelsträngade DNA-molekyler utifrån den ursprungliga. De båda DNA-molekylerna denatureras och hela förökningsproceduren utförs på nytt igen, och denna cykel kan utföras flertalet gånger (Tamarin, R, H).

### Gelseparering

Efter att man har kört en PCR på sina prover så pipetteras de ner i små brunnar i en gel, vilket sedan körs genom en gelelektrofores för att detektera förekomsten av PCR produkter. Gelen som användes reagerar inte med molekylerna vilket gör det möjligt att separera med avseende på molekylernas storlek och elektriska laddning utan att de separerade komponenterna blandas ihop igen. Man gjuter gelen så att flera prover kan separeras samtidigt bredvid varandra (se figur 5). Gelen är ett komplext nätverk som innehåller smala slingrande passager och på detta sätt passerar mindre DNA-molekyler enklare igenom. Farten ökar alltså allt



Figur 5. Bild av en gelelektrofores.

eftersom molekyl vikten avtar. Etidiumbromid tillsätts vilket fäster vid DNA och verkar fluorescerande vid UV-belysning. Gelelektroforesen fungerar på så sätt att DNA-molekylerna vandrar i det elektriska fältet eftersom de är negativt laddade. DNA vandrar mot den positiva delen, anoden och därför ska man ha brunnarna närmast den negativa delen, katoden.

Farten som DNA-molekylerna kommer att hålla beror alltså på vilken styrka det elektriska fältet har och på molekylernas vikt. Efter att gelelektroforesen är slutförd

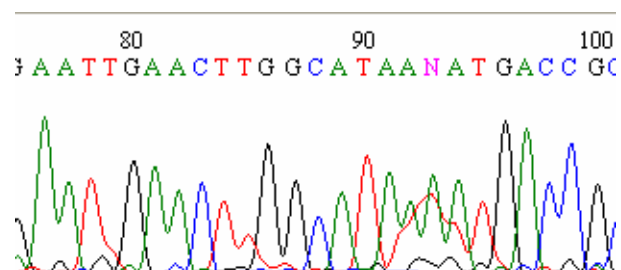
får man ut olika regioner och varje sådan region kallas för ett band. Längst till vänster har man dessutom ett band som kallas för en stege vilket man kontrollerar och jämför de andra banden med, alltså en sorts standard.

Efter att proverna har körts ut på gel så vill man kunna använda detta DNA. Därför använder man sig av en metod där man utnyttjar den större lösligheten hos en eller flera av komponenterna. Detta kallas för att man utför en rening av gelen. När man har renat provet så kan man sätta det på sekvensering

### Sekvensering

Sekvensering är en effektiv metod för att bestämma nukleotidernas ordningsföljd i DNA.

Denna metod har varit revolutionerande den biologiska forskningen, eftersom den gör det möjligt att skildra olika typer av mutationer samt att förutsäga sammansättningen hos det protein som en gen kodar för. DNA-tråden är alltför liten för att kunna avläsas med mikroskopiska tekniker. I stället används en kombination av kemiska, enzymatiska och fysikaliska metoder vid avläsningen. Det man gör är att man tillsätter en



Figur 6. Sekvens av en vivel

fluorescerande vätska och placerar DNA sekvenserna i en gel. Sedan låter man fragmenten beroende på storlek passera förbi en laser som finns i slutet av gelen. Varje nukleotid avger ett färgat ljus av en karakteristisk våglängd, vilket blir sparad som ett färgat band på en simulerad

gelbild. Ett dataprogram tar in data och skapar vågor med färgade toppar (se figur 6). Varje färg representerar en bokstav i sekvensen. Om det i sekvensen står ett N så betyder det att det är en nukleotid som den inte kan bestämma (Karolinska Institutet)..

### *Fylogenetisk analys*

Av alla de hundratals miljoner arter som har bildats på jorden beräknar man att 99 % har dött ut. Allt detta liv har ett gemensamt ursprung. Man kan därför se livet som ett stort träd med massor av förgreningar, där grenarna alltid förenas om man går bakåt i tiden och där de allra längst bak förenas i en punkt eller i detta fall en rot. Ständigt dör kvistar och grenar som ramlar av men hela tiden bildas det också nya.

Ett fylogenetiskt träd är en hypotes om hur olika besläktade taxa (sing. taxon) har utvecklats från en gemensam förfader. En av de metoder som används flitigt inom fylogenetisk analys är emellertid den kladistiska metoden. För att identifiera det gemensamma ursprunget för en taxa är nyckeln att identifiera karaktärer som alla taxa i en grupp har gemensamt, men som inte finns hos några andra taxa (Fagerström, T).

För att konstruera ett fylogenetiskt träd kan vi anta att vi ska försöka att rekonstruera hur utvecklingen har skett fram till de tre arterna: X, Y och Z som har kommit ifrån en gemensam anfader. De tre karaktärer som finns tillgängliga är a-c. I arterna finns karaktärerna i två varianter  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $b_1$ ,  $b_2$  och  $c_1$ ,  $c_2$ . Det har alltså skett evolutionära förändringar som har lett fram till de tre arterna. En av varianterna är den ursprungliga och en är den härledda, yngre varianten. De tre arternas gemensamma anfader har däremot alla de ursprungliga varianterna av a-c. För att få reda på vilken som är den ursprungliga och vilken som är den härledda varianten så tar man hjälp av en så kallade utgrupp. Detta gör man genom att jämföra våra arter, ingruppen, med utgruppen som är mer avlägset släkt med ingruppen än vad arterna i ingruppen är med varandra. Karaktärsvarianter som endast finns hos ingruppen men inte i utgruppen räknas som härledda, medan karaktärsvarianter som även finns i utgruppen räknas som ursprungliga. Man behöver en utgrupp för att analysen ska kunna resultera i ett fylogenetiskt träd även om den inte behövs för själva släktskapsanalysen i sig, d.v.s. man kan utan en utgrupp se hur nära släkt olika taxa är men inte hur de har utvecklats till det dom nu är. I detta fall får vi fram att  $a_1$ ,  $b_1$  och  $c_1$  är de ursprungliga varianterna av karaktärerna a-c. Utgruppen får således vara roten på det fylogenetiska trädet. De tre olika arterna har alla olika uppsättningar av karaktärerna tex:

U	$a_1$	$b_1$	$c_1$
X	$a_2$	$b_1$	$c_1$
Y	$a_2$	$b_2$	$c_2$
Z	$a_1$	$b_2$	$c_2$

Utifrån detta kan man konstruera tre möjliga träd som kan beskriva hur arterna X,Y,Z har utvecklats från U.

För att få fram vilket av dessa träd som är den mest troliga används parsimonimetoden. Denna metod går ut på att man söker det träd som kräver minst antal förändringar.

I detta exempel betyder det att man letar efter det träd där övergångar från ursprungliga till härledda är så få som möjligt. Samma egenskaper kan dock utvecklas oberoende i olika taxa, vilket kallas för parallell evolution av egenskaper. Men en egenskap kan även ha utvecklats vid roten och sedan återgått till det ursprungliga. Båda dessa händelser gör det svårare att räkna ut hur evolutionen har skett (Skelton, P., Smith, A). När två arter har liknande karaktärer som de båda har ärvt från en gemensam förfader kallas det för homologi. Däremot kallas det för homoplasi när två arter har liknande karaktärer på grund av sammanstrålad evolution. Bara nyligt delade homologier är bevis på att två organismer är nära släkt. På ett

träd kallas det totala antalet karaktärsförändringar för längden (L) eller antalet steg som är nödvändiga för att stödja släktskapen mellan organismer i ett träd. Det relativa antalet homologa karaktärer i ett träd kan bli mätt med hjälp av CI (consistency index), vilket betyder att man tar antalet möjliga steg och dividerar det med det aktuella antalet av steg i trädet och slutligen multiplicerar man det med ett hundra.

Det andra måttet på det relativa antalet homoplasi i ett träd är RI (retention index). Med denna metod beräknar man antalet förväntade synapomorfier. I detta tar man det maximala antalet steg i ett träd och subtraherar det med samma data som i CI. Man kan även köra Boot-strap som visar hur många gånger en viss gren uppkommer när man dumpar viss data.

När man ska skapa ett fylogenteiskt träd så kommer man ofta fram till att flera träd är lika parsimona och därför skapar man ett konsensusträd. Detta träd visar de relationer som alla de parsimona träden har gemensamt. Den vanligaste metoden att göra detta på är att kombinera enbart de delar från ett träd som finns i alla de ursprungliga träden. Däremot kommer detta träd aldrig att bli lika parsimoniskt som något av de andra träden (Lipscomb, D.). Antalet olikheter som finns mellan arterna ger ett relativt mått på hur lång tid som gått efter arternas uppdelning. Detta sätt att tidsbestämma kallas för den *evolutionära klockan*. Den evolutionära klockans hastighet (mutationsfrekvensen hos olika arter) kan dock variera vilket gör att man mer kan se den som en uppskattning av maximal ålder av ett taxa (Ekman, A.).

## Syfte och frågeställning

Anledningen till att jag valde att arbeta om detta var att få en djupare förståelse inom genetiken och molekylärbiologin eftersom detta intresserar mig. Jag ville även få pröva på att utföra labbarbete. Därför ansåg jag att detta område skulle passa mig alldeles perfekt. Under tiden som jag har blivit allt mer insatt så har jag även ställt mig själv frågorna; Vilken betydelse för artutvecklingen för vivlar har sexuell respektive asexuell förökning? Hur har övergången från sex till kloning skett?

## Material och Metod

Skalbaggarna som användes var *Otiorhynchus scaber*, *Otiorhynchus salicis/lepidopterus*, *Otiorhynchus singularis*, *Otiorhynchus nodosus*, *Otiorhynchus chrysocomus*, *Otiorhynchus niger*, *Otiorhynchus subpubescence* och *Otiorhynchus sulcatus*. *Tribolium castaneum* och *Strophosoma melanogrammum* användes som utgrupper.

Skalbaggarnas ploidnivån bestämdes genom att jämföra individerna och deras cellstorlek. DNA preparerades med Wizard genomic DNA purification kit (Promega). Skalbaggarna mosades i ett provrör innehållande proteinase-K. Provet skakas om och inkuberas i 55 grader C under natten. Vid extraktionen tillsattes RNase Solution och Protein precipitation. DNA fälldes ut med sopropanol. Pelleten löstes upp med destillerat vatten.

Mitokondriegensekvensen amplifierades COIII (cytochrome oxidase 3) med primerna (mtDNA-21/CO3a: TTATTTATTGCATCAGAAGT och mtDNA-22/CO3b: TCAACAAAGTGTCAGTATCA) under 15 cyklar med 95grader C (30s), 55 grader C (30s, 0,5 grader C avtagande/cykel), 72 grader C (1min), 20 cykler 95 grader (30s), 48 grader C (30s), 72grader C (1min) och en cykel vid 72 grader C (3min). Vid genomförandet av PCR nyttjades PCR Ready- To- Go Beads (Amersham Pharmacia Biotech Inc). En PCR pärla innehåller puReTaq DNA polymerase.

Proverna kördes ut på en 1% agarosgel och belystes med UV-ljus. Banden skars ut och DNA renades med JETquick.

Proverna sekvenserades med hjälp av DYEnamic ET terminator kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) och en ABI Prism 377 apparatus (Perkin Elmer). Sekvenserna alingerades med hjälp av dataprogrammen Bioedit v. 5.0.9 och ClustalW1.4. Boot-strap analyser kördes på träden.

## Resultat

11

Appendix 2, alla individer (vivlarna) och deras ploidinivå

Konsensus träd färre vivlar se appendix 3

226 oinformativa karaktärer togs bort

RI = 83

CI = 54

L = 491

Träd med färre vivlar (226 oinformativa karaktärer togs bort) se appendix 4

RI = 85

CI = 57

L = 466

Konsensus träd alla vivlar se appendix 5 ( appendix 6 är samma träd men med bilder)

RI = 85

CI = 54

L = 413

Alla de fyra träden (166 oinformativa karaktärer togs bort) se appendix 7, 8

166 oinformativa karaktärer stryktes.

RI = 87

CI = 55

L = 364

Resultatet som framgår av konsensus träden tyder på att det har bildats en hybrid eftersom *O.lepidopterus*-1 sexuell hona har väldigt många karaktärer som är överensstämmande med *O.sulcatus* triploid (app. 3 och 5).(Siffrorna bakom artnamnen finns enbart där för identifikation av vivlarna.

## Diskussion

### *Fylogenetisk analys*

Jag fick som resultat fyra fylogenetiska träd som alla hade lika antal förändringar. För att bestämma vilket av de fyra träden som stämde bäst tog jag bort alla individer med korta sekvenser för att kunna få fler karaktärer att gå på. Därför finns det i resultatet ett träd med fler och ett träd med färre individer. Jag gjorde detta främst eftersom jag var nyfiken på att få veta var individerna från arterna *Otiorhynchus lepidopterus* och *Otiorhynchus sulcatus* skulle befinna sig eftersom de fyra första träden visade mycket olikt i denna fråga (app. 7 och 8). Genom detta kom jag fram till att konsensusträdet där alla individerna var med stämde bra ihop med det konsensusträd där färre individer var med och därför är det troligt att denna fylogeni (släktskap) stämmer bäst med verkligheten (app. 3 och 5). Utifrån konsensus träden kan man då se att *O.lepidopterus*-1 sexuell hona har väldigt många karaktärer som är överensstämmande med *O.sulcatus* triploid som enbart har hittats i klonal form. Man skulle därför kunna tänka sig att *O.sulcatus* är klonal, eftersom två sexuella arter tillsammans har fått en hybrid avkomma. Den ena av dessa sexuella arter skulle då kunna vara en *O.lepidopterus* hona. Hybrider har i regel inte så stor chans att överleva och chansen avtar dessutom ju mindre släkt arterna är med varandra. Men om nu en av alla hybrider överlever måste den för att kunna klara av stora skillnaderna mellan sig och sina släktingar kunna klona sig själv, eftersom det inte finns någon av dess egen sort som den skulle få möjlighet att fortplanta sig med. Den måste alltså klara av att fortplanta sig själv för att kunna sprida sina gener vidare. Men det kanske är bara en på fler hundra av avkommorna som föds med egenskapen att kunna göra detta. Resultatet tyder således på att det har bildats en hybrid men detta förutsätter också att konsensusträdet stämmer (app. 3 och 5). Jag fick ganska så höga RI-värden på alla träden så på så sätt så är de tillistbara. Placeringen av *O.lepidopterus*-1-baggen pekar alltså på att en *O.lepidopterus* hona och någon annan vivel hybridiserat och gett upphov till de klonala *O.sulcatus* individerna då man inte tror att kloner kan utveckla så mycket variation själva som finns på den grenen i trädet. Ser man sen på *O.sulcatus*- klonerna som inte har någon variation alls även om de är samlade från olika delar av Europa, så kan man ju undra hur mycket variation som verkligen behövs för att vara framgångsrik. Att de är så framgångsrika är mycket underligt med tanke på att de borde vara mindre framgångsrika på grund av avsaknaden av variation i jämförelse med de sexuella. Ser man också på utbredningen av vivlarna så upptäcker man ju att de sexuella inte har någon stor utbredning alls (app.1. figur A). En del kloner har spridit sig ända upp till Umeå och klimatet är väldigt annorlunda mellan de södra delarna av Österrike och Sveriges norra delar. På det sättet verkar det som de har förändrats för att kunna leva även i vårt klimat.

Om man tittar på hur många förändringar i karaktärer som har skett inom vivlarna så ser det ut som att de klonala organismerna inte har så mycket sämre förutsättningar. Allmänt brukar man säga detta eftersom de inte får någon genetisk variation genom asexuell fortplantning, men som sagt har det inte uppstått några förändringar alls mellan *O.sulcatus*-klonerna. Hos de andra klonerna kan det ha skett en hel del mutationer som gör att de får genetiska förändringar på detta sätt istället. Dessutom så ser det ju ut som om de klonala klarat sig mycket bättre eftersom de har betydligt större spridning än de sexuella.

De resultat som jag kommit fram till är relativt säkra eftersom det ganska snart märks om man har gjort något fel antingen vid gelelektroforesen eller efter sekvenseringen. Vid

gelelektroforesen så får man inte fram något band om det har hänt något. Sekvensen kan man inte använda om man får skräpiga signaler. Hur man konstruerar fylogenin är så olika så det finns många olika skolbildningar som strider mot varandra. Den metod som jag har använt är den kladistiska som är den som dominerar idag. De finns också svårigheter med att veta vilka data man ska lägga in och även med att kunna tolka resultat som man kommer fram till genom sin metod. Fylogenin som förklaringsmodell för släktskap har dessutom tappat mark genom att det har varit så många olika tycken. Den håller emellertid på att arbeta sig in i vetenskapen igen som ett bra instrument för att reda ut släktskaps samband. Att använda sig av storlekskillanden på cellkärnorna för att avgöra ploidinivån kan verka ganska svårt, eftersom man måste avgöra och tolka vilka cellkärnor som är de allra minsta osv. Men i all forskning så är man ju tvungen att ta beslut och avgöra hur saker och ting ska tolkas. På så sätt så är dessa beslut inte så betydligt mycket svårare än andra.

### *Allmän*

I en värld som förändras är variation av yttersta vikt. Variationen gör att det kanske åtminstone finns några individer med de genetiska förutsättningar som behövs för att klara varje ny situation. Hos arter med ett enda kön kan en motsvarande dramatisk förändring i värsta fall leda till att hela arten dör ut då kanske inga individer har rätt genetiska förutsättningar för att klara situationen. Att kunna växla mellan två reproduktionsstrategier är kanske den optimala lösningen för att klara av en föränderlig miljö.

Utvecklingen till den värld vi lever i idag har ju inte varit helt groftri precis och troligen kommer inte den fortsatta utvecklingen att vara det heller. Vår utvecklige sker kanske i riktningen mot ett könlöst människosamhälle men då kommer frågan om hur en sådan värld skulle se ut.

Tittar man på vivlar så verkar det som om klonal förökning uppkommer ofta och att det går bättre för klonerna än för dom sexuella. Inte för så mycket mer än en vecka sedan presenterades dessutom den lilla musen Kaguyan för världen. Kaguyan var det första däggdjuret som är ett resultat av en jungfrufödsel. De som skapade musen Kaguyan har visat att det verkligen går att kringgå de mekanismer som gör att däggdjur inte kan jungfruföda. Steget mellan att skapa en jungfrufödd avkomma av en människa och en mus är inte så förfärligt långt men frågan är hur bra det skulle bli? Bara kvinnor som styr och föder upp sina barn själva. För det första så tycker jag att det skulle bli ganska så tråkigt och barnauppfostran skulle nog bli allt svårare med en värld med enbart ensamstående mödrar. Fast det är ju förstås svårt att säga hur det skulle bli. Det kanske skulle visa sig att det går alldeles utmärkt med tanke på att det oftast är männen som startar och genomför krig.

Men varför måste vi människor, och många andra däggdjur ägna oss åt sex? Det är ju sådant slöseri i vårt samhälle med att det behövs två individer för att framställa en avkomma. Hälften av alla människor kan ju inte föda barn bara bidra med arvsanlag. Vi skulle få helt nya möjligheter att breda ut oss om alla individer kunde producera en egen avkomma. Inte för att det är nödvändigt att kunna göra detta i människosamhälle. Kunde alla individer dock producera en egen avkomma skulle en enda svår sjukdom kunna drabba oss på så sätt att troligtvis inte allt för många skulle överleva. Anledningen till att vi har sex delar jag med många andra biologer. Nämligen att med sex så finns det alltid någon som är bättre lämpad för nya miljöer, och kan föra arten vidare.

På de frågor som jag själv ställde mig har jag inte fått något tydligt svar men jag har åtminstone fått vissa indikationer på vad som verkar rimligt. Mina resultat tydde ju på att kloner har uppkommit genom hybridisering men med så lite underlag så kan man inte fastställa något. Däremot kan man lätt se att det har så stor betydelse för vivlarna om de är sexuella eller om de är kloner. Detta genom att titta på alla de olikheter som uppstår både

geografiskt och förökningsmässigt. Utvecklingen ser ut att gynna de asexuella eftersom de sprider sig allt mer och nästan utkonkurrerar de sexuella.

## Referenser

1. Adams, P., Benton, M., Burnie, D. 1986. The evolution of life. Oxford.
2. Arnesson-Westerdahl, A., Olsson, R. 1992. Genvägar. Naturskyddsföreningen. Eskilstuna
3. Fagerström, T. 1995. Den skapande evolutionen, Forskningens frontlinjer, Lund
4. Gonick, L., Wheelis, M. 1996. Genetik i bild och bubblor. Göteborgs Universitet.
5. Hartl, D, L. 1996. Essential Genetics. Harvard University, London.
6. Kitching, I, J., Forey, P, L., Humphries, C, J., Williams, D, M. 1998. Cladistics, Second Edition, The theory and practice of parsimony analysis. Oxford University.
7. Lawrence, E. 2000. Henderson`s dictionary of biological terms. Edinburgh, England.
8. Lipscomb, D. 1998. Basics of Cladistic Analysis, George Washington University
9. Mortiz, C., Hills, D, M., Mable, B, K. 1996. Molecular Systematics second edition, Canada.
10. Rasmuson, M. 1997. Evolution. Stockholm.
11. Simon, C., Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entomol. Soc. Am. 87:651–701.
12. Skelton, P., Smith, A. 2002. Cladistics a Practical Primer on CD-ROM. Cambridge, UK
13. Smith, M, J. 1976. The Evolution of Sex. Cambridge University.
14. Stenberg, P. 2003. Origin and evolution in parthenogenetic weevils, Umeå University
15. Tamarin, R, H. 1996. Principles of Genetics, Fifth Edition. Boston University
16. Williams, G, C. 1975. Sex and Evolution. Princeton, New Jersey.
17. Ekman, A. 2004. Nationalencyklopedin.  
[http://www.ne.se/jsp/search/article.jsp?i\\_art\\_id=160943&i\\_word=elektrofores](http://www.ne.se/jsp/search/article.jsp?i_art_id=160943&i_word=elektrofores)  
[http://www.ne.se/jsp/search/article.jsp?i\\_art\\_id=154884&i\\_word=dna](http://www.ne.se/jsp/search/article.jsp?i_art_id=154884&i_word=dna)

[http://www.ne.se/jsp/search/article.jsp?i\\_art\\_id=165842&i\\_word=evolution](http://www.ne.se/jsp/search/article.jsp?i_art_id=165842&i_word=evolution)

18. Jewert, J., Röhl, A., Nystrand, A. 2004. Ny Biologi,  
<http://www.forskning.se/nyabiologin/ks/navigation.html>
19. Karolinska Institutet. uppdaterad 2003-12-18.  
<http://www.ki.se/molmed/utbildning/demo/geneapps.html>
20. Koehler, F. 2000. Fotogalerie Coleoptera. Uppdaterad 30April 2004.  
<http://www.koleopterologie.de/gallery/fh11/fh111.html>
21. Throne, J. September 30 2003.  
<http://bru.gmpc.ksu.edu/proj/tribolium/>

## Ordlista

Automixis = asexuell förökningsort där meios fortfarande sker

16

Apomixis = asexuell förökning helt utan meios och hanar, d.v.s. ”äkta” kloner

Diploid = individ med två genuppsättningar (det normala hos sexuella organismer)

Eukaryot = sägs en organism vara vars celler innehåller membranavgränsade cellkärnor.

Fluorescerande = utvecklar ljus av ngt. slag

Hybridisering = parning mellan två individer av olika arter

Meios = reduktionsdelning, den typ av celledelning där överkorsning sker och genmaterialet halveras, gameter (könsceller) är resultatet. Sker bara i könsvävnad.

Mitos = asexuell celledelning som ej halverar genmaterialet. Sker i normal kroppsvävnad vid t.ex. tillväxt och vid klonal förökning

Mutationer = genetiska förändringar

Polyloid = individ med mer än två genuppsättningar

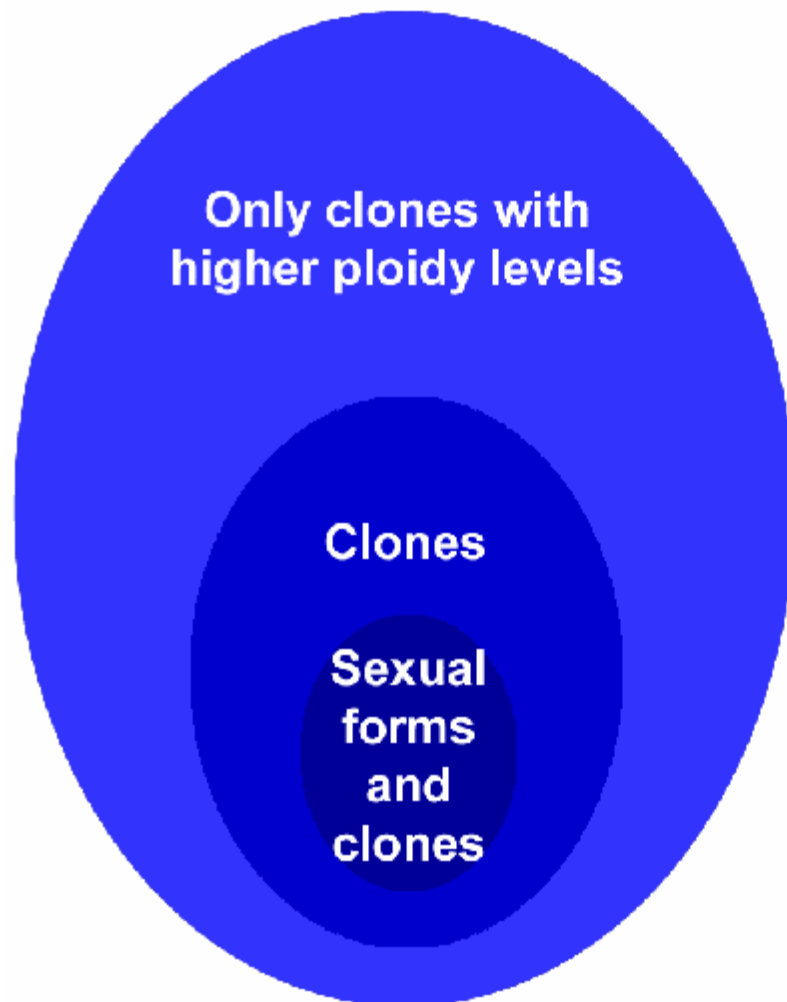
Prokaryot = sägs en organism vara vars celler inte innehåller membranavgränsade cellkärnor.

Synapomorfier = Evolutionära nyutvecklingar inom ett taxa som förenar dess avkomma i en grupp, t.ex. ryggsträng (nerverna i ryggraden) hos alla djur med ryggrad

Triploid = individ med tre genuppsättningar

Taxon = art, population, sort eller individ beroende på vilken nivå man undersöker i en studie (art i denna)

Fylogeni = teori om släktskap



**Figur A.** Spridning av sexuella och klonala former i geografiska partenogenes.

