



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Epichloë-endofyytin vaikutus ruokonadan (*Festuca arundinacea*) leviämiseen

Kaisa Honkanen

Ekologia

Pro gradu -tutkielma

Laajuus: 30 op

Ohjaajat:

Marjo Helander

Miika Laihonen

9.3.2022

Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pro gradu -tutkielma

Pääaine: Ekologia

Tekijä: Kaisa Honkanen

Otsikko: *Epichloë*-endofyytin vaikutus ruokonadan (*Festuca arundinacea*) leviämiseen

Ohjaajat: Marjo Helander ja Miika Laihonen

Sivumäärä: 32 sivua

Päivämäärä: 9.3.2022

Monet abioottiset ja bioottiset tekijät voivat rajoittaa kasvien leviämisen avulla saavutettua maantieteellistä esiintymisaluetta eli levinneisyyttä. Endofyytit elävät symbionteina tiiviissä vuorovaikutussuhteessa kasvilajien kanssa ja ovat bioottisia tekijöitä, jotka voivat vaikuttaa isäntäkasvien kelpoisuuteen ja täten mahdollisuuksiin levitä uusille levinneisyysalueille. Useilla heinälajeilla esiintyy Clavicipitaceae-heimoon kuuluvan *Epichloë*-suvun sienien endofyyttejä, jotka siirtyvät vertikaalisesti siementen mukana uusiin isäntäkasveihin. *Epichloë*-suvun endofyytit toimivat maataloudessa usein heinien mutualistisina symbionteina, jotka voivat vaikuttaa isäntäkasvien kasvuun ja lisääntymiseen sekä suojata niitä tuottamiensa alkaloidien avulla kasvinsyöjiltä. Heinien pohjoisilla levinneisyysrajoilla esiintyvien populaatioiden endofyyttifrekvenssien on havaittu olevan korkeita, mikä viittaa endofyytin toimivan siellä valintaetuna.

Tässä tutkielmassa tutkin ruokonadan systeemisen vertikaalisesti siementen mukana siirtyvän *Epichloë*-suvun endofyytin vaikutuksia ruokonadan (*Festuca arundinacea*) leviämiseen. Tarkastelin perustajapopulaation läheisyyteen levinneen (osa)populaation endofyytillisten ruokonatojen osuuden muutosta perustajapopulaation tunnetusta endofyyttifrekvenssistä keräämällä levinneiden ruokonatojen siemeniä ja selvittämällä mikroskoppoinnilla niiden endofyyttistatuksen. Pyrin selittämään endofyyttifrekvenssin muutosta tutkimalla eroja endofyytillisten ja endofyytittömien ruokonatojen siementuotossa, siementen itävyydessä ja kilpailukyvyssä. Tutkin siementuottoa arvioimalla ruokonatojen yhden siemenen ja siementen kokonaispainon perusteella tuotetun siemenmäärän. Toteutin idätyskokeen kasvihuoneessa idättämällä istutuspurkeissa ruokonatojen siemeniä. Tutkin kilpailukykyä kenttäkokeessa, jossa ruokonadat kilpailivat niittykasvillisuuden kanssa.

Endofyytillisten ruokonatojen osuus oli kasvanut koealan läheisyyteen levinneessä (osa)populaatiossa verrattuna perustajapopulaatioon, eli endofyytti toimi todennäköisesti valintaetuna ruokonadan leviämisessä. Vain endofyytillisten kasvien suurempi siementuotto tuki endofyyttifrekvenssin kasvua, eikä muiden tutkittujen ominaisuuksien, itävyyden ja kilpailukyvyn, tarkastelu tukenut oletusta ja havaintoa endofyyttifrekvenssin kasvusta. Endofyytti lisäsi ruokonadan siementuottoa ja aiempien tutkimusten perusteella vähentää tuottamiensa alkaloidien avulla kasvinsyöntiä. Ehdotan endofyytin toimivan näiden ominaisuuksien suhteen valintaetuna ruokonadan leviämisessä sen levinneisyysalueen pohjoisrajalla.

Avainsanat: leviäminen, symbioosi, endofyytti, ruokonata, *Epichloë*, *Festuca arundinacea*, siementuotto, itävyys, kilpailukyky

Sisällys	
1. Johdanto	1
1.1. Kasvien leviäminen	1
1.2. Endofyytit	2
1.3. Endofyyttien lisääntyminen ja siirtyminen	2
1.4. <i>Epichloë</i> -suvun endofyytit	3
1.5. <i>Epichloë</i> -suvun vertikaalisesti siirtyvien endofyyttien hyödyt isäntäkasveille.....	5
1.6. <i>Epichloë</i> -suvun vertikaalisesti siirtyvien endofyyttien ja isäntäkasvien vuorovaikutussuhteet vaihtelevat	6
1.7. Endofyyttien populaatiodynamiikka	7
1.8. Tutkimuksen tavoite.....	8
2. Aineisto ja menetelmät	8
2.1. Tutkimuslaji	8
2.2. Levinneiden ruokonatojen havainnointi.....	9
2.3. Siementuoton tarkastelu.....	10
2.4. Idätyskoe	11
2.5. Kilpailukoe.....	12
2.6. Tilastolliset menetelmät	13
3. Tulokset.....	14
3.1. Levinneet ruokonadat.....	14
3.2. Siementuoton tarkastelu.....	15
3.3. Idätyskoe	17
3.4. Kilpailukoe.....	17
4. Pohdinta	18
4.1. Endofyytin vaikutukset ruokonadan siemeniin.....	19
4.2. Endofyytin vaikutus ruokonadan kilpailuun	21
4.3. Muut endofyyttifrekvenssin kasvua selittävät tekijät.....	22
4.4. Endofyytin merkitys ruokonadan leviämisessä pohjoisella levinneisyysrajalla	25
Kiitokset.....	26
Lähteet	27

1. Johdanto

1.1. Kasvien leviäminen

Kasvit ovat paikallaan pysyviä eli sessiileitä eliöitä, jotka voivat vain rajallisesti vaikuttaa kasvupaikkaansa tai siirtymiseen sopivampaan elinympäristöön (Howe & Westley 1986). Kasvin tulee käyttää pysyvän kasvupaikkansa rajalliset resurssit tehokkaasti eri toimintoihin, kuten kasvuun ja lisääntymiseen niin, että kasvin kelpoisuus eli sen tuottamien lisääntymiskelpoisten jälkeläisten määrä on mahdollisimman suuri (Vuorisalo & Mutikainen 1999). Resurssien sijoittaminen lisääntymiseen lisää todennäköisyyttä sille, että joku jälkeläisistä itää, kasvaa, selviytyy ja lisääntyy itse. Sessiileinä eliöinä kasvien leviäminen tapahtuu pääasiassa vain yhden elinkierron vaiheen eli lisääntymisen aikana (Eriksson & Kiviniemi 1999). Leviäminen on tärkeä prosessi kasvien ja kasvipopulaatioiden siirtymisessä kohti elinympäristöjä, joissa niiden kelpoisuus voi olla suurempi (MacArthur 1972).

Kasvien leviäminen on syntyvyyden ja levittäytymisen yhteistulosta. Levittäytymisessä lisääntymisyksikkö (jatkossa: siemen) siirtyy syntypaikastaan toiseen paikkaan. Kun siemen saavuttaa levittäytymisen kautta lajille uuden alueen, jolle se vakiintuu onnistuneesti, tapahtuu lajin leviämistä. Vakiintuminen alueelle edellyttää siemenen itämistä ja taimen selviytymistä. Pääpiirteittäin voidaan siis sanoa, että mitä suurempi on syntyvyyttä kuvaava tuotettu siemenmäärä eli mitä enemmän siemeniä levittäytyy, sitä suurempi mahdollisuus lajilla on levitä uusille alueille, joissa se ei vielä esiinny (Eriksson & Kiviniemi 1999; Colautti ym. 2006).

Monet abioottiset ja bioottiset tekijät voivat rajoittaa kasvien leviämisen avulla saavutettua maantieteellistä esiintymisaluetta eli levinneisyyttä. Abioottisia eli elottomia ympäristötekijöitä voivat olla esimerkiksi ilmasto eli valon määrä, lämpö ja sademäärä, erikokoiset fyysiset esteet, kuten meret ja vuoret, ja häiriöt, kuten maastopalot ja tulvat. Bioottisia eli elollisia tekijöitä voivat olla kilpailu resursseista saman lajin yksilöiden tai eri lajien välillä, allelopatia eli vieruskasvien tuottamat haitalliset yhdisteet, kasvinsyöjät, eloperäisen jätteen määrä, loiset, mutualistit ja maternaaliset siemenen ominaisuudet (Cheplick 1998; Gaston 2003). Symbiontit, kuten typensitojabakteerit, mykorritsat ja endofyytit, elävät tiiviissä vuorovaikutussuhteessa toisen lajin kanssa ja ovat bioottisia tekijöitä, jotka voivat vaikuttaa isäntäkasvien kelpoisuuteen ja täten mahdollisuuksiin levitä uusille alueille.

1.2. Endofyytit

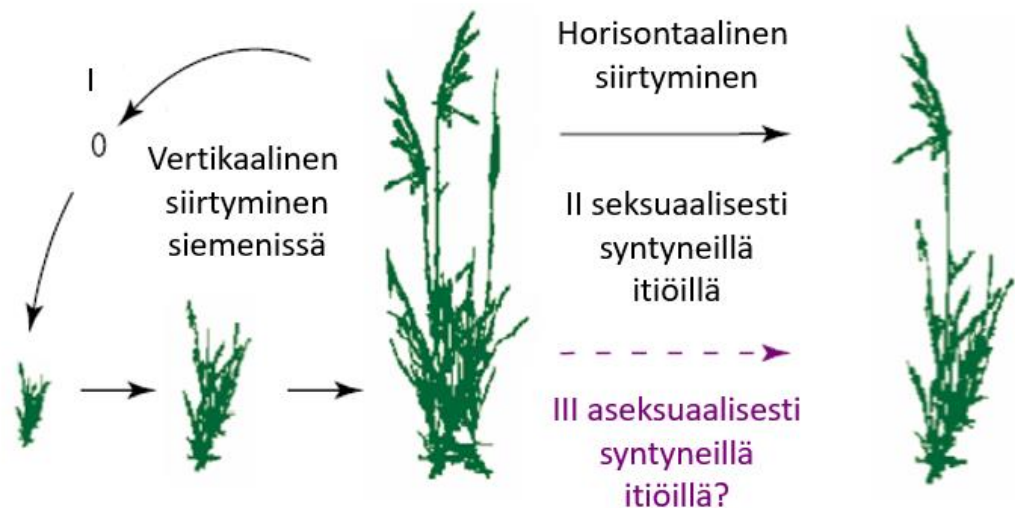
Endofyytit ovat sieniä tai bakteereita, jotka elävät symbiontteina kasvien solukoissa koko elinkiertonsa tai osan siitä huomaamattomina ja aiheuttamatta taudin oireita (Wilson 1995). Endofyyttiset sienet ja bakteerit ovat kiistatta tärkeä osa maailman ekosysteemejä (Harrison & Griffin 2020), sillä kaikilla kasveilla on jonkinlaisia endofyyttejä (Saikkonen ym. 2020). Endofyyttien ja isäntäkasvien väliset vuorovaikutukset ovat hyvin monimuotoisia ja vaihtelevat ympäristön, populaation ja eliöyhteisön mukaan loisivista eli endofyytille hyödyllisistä ja kasveille haitallisista aina mutualistisiin eli molemmille osapuolille hyödyllisiin vuorovaikutussuhteisiin (Saikkonen ym. 1998, Saikkonen ym. 2020). Endofyyttisiä sieniä on havaittu kaikilla tutkituilla kasvilajeilla (Clay 1988; Saikkonen ym. 1998; Arnold ym. 2000).

Endofyyttiset sienet jaetaan usein Clavicipitaceae-heimon endofyytteihin ja toiseen polyfyleettiseen endofyyttien ryhmään (*engl. non-clavicipitaceous*), jolla ei ole ryhmää määrittelevää yhteistä esi-isää (Rodriguez ym. 2009). Clavicipitaceae-heimon sieniendofyyttejä havaitaan yleensä heinillä (Poaceae), joissa ne esiintyvät pääasiassa systeemisesti koko isäntäkasvissa, sen lehdissä, varsissa ja lisääntymissolukossa (Saikkonen ym. 1998). Toisen ryhmän lajeja on havaittu kaikilla suurilla maalla elävien kasvien linjoilla, ja ne esiintyvät pääasiassa paikallisina lehdissä, kaarnassa, varressa tai juurissa (Saikkonen ym. 1998; Rodriguez ym. 2009).

1.3. Endofyyttien lisääntyminen ja siirtyminen

Endofyyttiset sienet voivat siirtyä uusiin isäntäkasveihin horisontaalisesti tai vertikaalisesti. Horisontaalisessa siirtymisessä isäntäkasviin kasvaa seksuaalisesti syntyneitä kuroumaitiöitä sisältävä solukko, jonka itiöiden vapautuessa sieni siirtyy uuteen isäntään (Kuva 1 II). Vähemmän tunnettu, mutta mahdollinen siirtymistapa on horisontaalinen siirtyminen aseksuaalisesti syntyneiden kuroumaitiöiden avulla (Kuva 1 III; Clay & Schardl 2002; Saikkonen ym. 2004). Koska seksuaalisesti lisääntyvät sieniendofyytit ovat hyvin yleisiä ja monimuotoisia, on kaikilla kasveilla joitakin horisontaalisesti siirtyviä endofyyttejä (Rodriguez ym. 2009). Aseksuaalisessa vertikaalisessa siirtymisessä endofyytin sienirihma kasvaa isäntäkasvin kehittyvään kukkavarteen ja siemeniin ja siirtyy näin maternaalisesti periytyen uusiin kasviyksilöihin (Kuva 1 I; Clay & Schardl 2002; Saikkonen ym. 2004). Useimmat endofyyttiset sienet

lisääntyvät vain seksuaalisesti, ja siirtyvät horisontaalisesti, ja aseksuaalinen lisääntyminen ja vertikaalinen siirtyminen on tunnetusti harvinaisempaa (Clay & Schardl 2002).



Kuva 1. Endofyyttien siirtyminen uusiin isäntäkasveihin voi tapahtua kolmella eri tavalla I aseksuaalinen vertikaalinen siirtyminen siementen mukana II horisontaalinen siirtyminen seksuaalisesti syntyneillä itiöillä III horisontaalinen siirtyminen aseksuaalisesti syntyneillä itiöillä (Saikkonen ym. 2004, suom. Kaisa Honkanen)

1.4. *Epichloë*-suvun endofyytit

On arvioitu, että jopa 20–30 %:ssa heinälajeista esiintyy Clavicipitaceae-heimoon kuuluvan *Epichloë*-suvun (Leuchtmann ym. 2014) endofyyttejä (Leuchtmann 1992). *Epichloë*-suvun lajit voivat siirtyä uusiin isäntiin vertikaalisesti tai horisontaalisesti. Horisontaalisessa siirtymisessä endofyytti tuottaa isännän kukkavarteen kuroumaitiöitä sisältävän solukon, mikä aiheuttaa kukkavarren abortoitumisen. Suurin osa lajeista siirtyy vain vertikaalisesti uusiin isäntiin (Clay & Schardl 2002; Saikkonen ym. 2004; Saikkonen ym. 2016b). Aseksuaalisesti lisääntyvien, vertikaalisesti siirtyvien *Epichloë*-suvun lajien sopeutumislevittäytymisen on havaittu olevan yhteydessä viileään ilmaston heinien Pooideae-alaheimon evoluutioon (Schardl 1996).

Yhteisevoluutiossa kahdessa lajissa tapahtuvat muutokset vaikuttavat vastavuoroisesti toisiinsa. Yleinen oletus on, että evolutiivinen polku Pooideae-alaheimon heinien ja *Epichloë*-suvun endofyyttien symbioosiin on alkanut loisinnasta ja muuttunut

yhteisevoluution vuorovaikutusten kautta mutualismiksi. Edelleen seksuaalisesti lisääntyvien *Epichloë*-suvun lajien suhde isäntäkasviin on usein loisiva eli isännälle haitallinen (Clay & Schardl 2002). Kuroumaitioita sisältävän solukon muodostuminen aiheuttaa kukkavarren abortoitumisen, mikä vähentää isäntäkasvin lisääntymistä eli kelpoisuutta, mutta mahdollistaa endofyytin itiöiden leviämisen ja siirtymisen uusiin kasviyksilöihin (Saikkonen ym. 2016b). Isännän seksuaalisen lisääntymisen vähentäminen on endofyytille eduksi, sillä se estää uusien geneettisten ominaisuusyhdistelmien muodostumisen isännässä ja täten mahdollisuuden tuottaa uusia endofyytille vastustuskykyisempiä yksilöitä. Yhteisevoluution vuorovaikutuksissa isännän valintapaineena on todennäköisesti ollut puolustus endofyytin seksuaalista lisääntymistä vastaan ja endofyytin valintapaineena suuri taudinaiheuttamiskyky, joka vähentää isännän seksuaalista lisääntymistä (Cheplick & Faeth 2009b). Vertikaalinen siirtyminen on todennäköisesti madaltanut endofyytin taudinaiheuttamiskykyä. Mikäli endofyytti siirtyy pelkästään vertikaalisesti siementen mukana, se ei säily populaatiossa, mikäli se laskee isännän lisääntymiskykyä verrattuna endofyytittömiin yksilöihin (Clay & Schardl 2002). On esitetty, että vertikaalinen siirtyminen on ollut eri lajien hybridisaation eli risteytymisen tuotoksena syntyneille endofyyteille ainoa mekanismi siirtyä uuteen isäntään, koska hybridisaatio on estänyt seksuaalisen lisääntymisen (Selosse & Schardl 2007). Seksuaalisen lisääntymiskyvyn menettäneille, vain vertikaalisesti siirtyville *Epichloë*-suvun lajeille symbioosi isäntäkasvin kanssa on välttämätön kaikissa elinkierron vaiheissa. Ne ovat täysin riippuvaisia isäntäkasvista sen juurien ottamien veden ja ravinteiden ja lehtien yhteyttämistuotteiden saannin suhteen, mutta myös lisääntymisen eli kelpoisuuden suhteen. Endofyytti lisääntyy eli siirtyy uusiin isäntiin silloin, kun isäntäkasvi tuottaa siemeniä, ja käytännössä kaikki siemenet eli jälkeläiset ovat endofyytillisiä (Clay & Schardl 2002; Selosse & Schardl 2007). Endofyytti elää isäntäkasvissa koko sen elämän ajan (Clay & Schardl 2002). Vertikaalisessa siirtymisessä endofyytin genotyyppi eli geneettinen materiaali pysyy samanlaisena, koska seksuaalista lisääntymistä ja uusien ominaisuusyhdistelmien muodostumista ei tapahdu. Toisten kasviyksilöiden kanssa lisääntyvän ristipölytteisen isäntäkasvin genotyyppi sen sijaan muuttuu. Osalla isäntäkasvin ja endofyytin genotyyppien yhdistelmistä voi olla parempi kelpoisuus, jolloin genotyyppiyhdistelmistä voi kehittyä yhteisevoluutiossa omia kehityslinjoja (Cheplick & Faeth 2009d).

1.5. *Epichloë*-suvun vertikaalisesti siirtyvien endofyyttien hyödyt isäntäkasveille

Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että heinäkasveissa elävät *Epichloë*-suvun vertikaalisesti siirtyvät endofyyttiset sienet voivat vaikuttaa merkittävästi isäntäkasvien kasvuun ja lisääntymiseen sekä suojata niitä taudinaiheuttajilta ja kasvinsyöjiltä (Saikkonen ym. 1998). *Epichloë*-suvun endofyyttejä on tutkittu paljon niiden maataloudellisen merkityksen vuoksi, sillä niitä esiintyy useissa laidunnuksessa ja rehuheininä käytetyissä lajeissa, kuten nurminadassa (*Festuca pratensis* Huds.), ruokonadassa (*Festuca arundinacea* Schreb.), lampaannadassa (*Festuca ovina* L.) ja englanninraiheinässä (*Lolium perenne* L.). Endofyytit voivat vaikuttaa erityisesti jalostettujen heinälajikkeiden eri ominaisuuksiin ja tuottavuuteen (Saikkonen 2000; Clay & Schardl 2002; Kauppinen ym. 2016; Saikkonen ym. 2016a).

Endofyyttisten kasvien on havaittu kasvavan suuremmiksi kuin endofyyttittömien kasvien (Faeth 2009; Saikkonen ym. 2016a) ja tuottavan enemmän kukkavarsia (Saikkonen ym. 2016a) ja siemeniä (Saari ym. 2010). Endofyytti voi myös parantaa isäntäkasvin kilpailukykyä (Clay & Schardl 2002). Kasvien kilpailukykyyn vaikuttavat useat eri ominaisuudet, kuten kasvutahti, koko ja lisääntymiskyky. Kilpailussa selviytyminen edellyttää resurssien nopeaa ja tehokasta käyttöä tai sopeutumista resurssien vähyteen (Cheplick & Faeth 2009b). Suurin osa kasvien kuolleisuudesta johtuu abioottisten olosuhteiden lisäksi todennäköisesti naapurikasvien aiheuttamasta kilpailusta (Watkinson 1986). Rudgers ja kumppanit (2005) havaitsivat endofyytin parantavan ruokonadan taimien selviytymistä monimuotoisessa preeriakasvien yhteisössä, ja Saikkonen ja muut (2013) endofyyttisten nurminatojen olevan kilpailukykyisempiä kuin endofyyttittömät nurminadat. Endofyytin vaikutuksen on arveltu perustuvan sen tuottamiin kasvua sääteleviin yhdisteisiin, kuten hormoneihin (Cheplick & Faeth 2009e).

Endofyyttien on havaittu tuottavan alkaloideja eli typpipitoisia kasviemäksiä, kuten peramiinia, loliineja, lolitreemeja ja torajyväalkaloideja, joista yleisimmin kasveissa havaitaan peramiinia ja torajyväalkaloideja (Siegel ym. 1990; Clay & Schardl 2002). Endofyyttien tuottaman peramiinin ja loliinien on havaittu vaikuttavan haitallisesti isäntäkasvilla ruokaileviin selkärangattomiin kasvinsyöjiin ja torajyväalkaloidien selkärankaisiin kasvinsyöjiin (Saikkonen ym. 2016b). Kotieläimillä, kuten lehmillä, alkaloidit voivat aiheuttaa myrkytystilan ja kuoleman (Bacon 1977), ja villieläinten on

havaittu suosivan endofyytittömiä kasveja (Conover 1998) tai niiden siemeniä (Madej & Clay 1991). Selkärangattomissa eläimissä ilmenevät vaikutukset vaihtelevat kasvinsyöjän ja kasvin alkaloidikoostumuksen mukaan (Clay & Schardl 2002). Alkaloidit karkottavat kasvinsyöjiä, mikä lisää isäntäkasvin sekä siinä elävän vertikaalisesti siirtyvän endofyytin kelpoisuutta, koska isäntäkasvi ei menetä yhteyttämissolukkoaan tai kehittyviä lisääntymiselimiään kasvinsyöjän ravinnoksi ja tuottaa potentiaalisesti enemmän resursseja lisääntymistä varten (Saikkonen ym. 1998).

1.6. *Epichloë*-suvun vertikaalisesti siirtyvien endofyyttien ja isäntäkasvien vuorovaikutussuhteet vaihtelevat

Epichloë-suvun vertikaalisesti siirtyvien endofyyttien ja isäntäkasvien tiukan mutualistinen vuorovaikutussuhde on kyseenalaistettu. Luonnonolosuhteissa eliöille tarjolla olevat resurssit ovat lähes aina rajalliset. Siksi niiden tulee jakaa resurssit eri toimintojen, kuten kasvun, lisääntymisen tai symbionttien ylläpidon kesken. Tätä kutsutaan resurssiallokaatioksi. Mikäli resurssien kohdistaminen yhteen toimintoon vähentää muihin toimintoihin kohdistettavien resurssien määrää, kutsutaan sitä allokaatiokustannukseksi (Stearns 1992). Allokaatiokustannukset voivat muuttaa isäntäkasvin ja endofyytin vuorovaikutussuhteen mutualistisesta kommensalistiseksi eli vain endofyytille hyödylliseksi tai jopa loisinnaksi eli isäntäkasville haitalliseksi, mikäli endofyytin ylläpito vie suuren osan rajallisista resursseista. Ei ole epätavallista, että symbiontit, kuten mykorritsat ja typensitojabakteerit, käyttävät suhteellisen suuren osan isäntäkasvin yhteyttämistuotteista (Fitter 1986), ja valintapaineet suosivat ilman symbiontteja eläviä kasveja, mikäli symbiontin kustannukset ylittävät siitä saatavat hyödyt (Gurevitch ym. 2006).

Endofyyttien tutkimus on keskittynyt jalostettujen maatalouslajikkeiden tarkasteluun hyvin yksipuolisissa abioottisissa olosuhteissa, joissa kasveille tarjotaan hyvät olosuhteet kasvulle. Optimaalisissa olosuhteissa isäntäkasvin omien toimintojen ja endofyytin välillä ei synny allokaatiokustannuksia, koska resursseja on riittävästi molemmille (Saikkonen ym. 2006). Tästä syystä tutkimusten taustalla on ollut laajalti ajatus siitä, että endofyytin ja isännän vuorovaikutussuhde on mutualistinen (Cheplick & Faeth 2009a). Uudemmat julkaisut ovat nostaneet esille, että luonnossa mutualistiset vuorovaikutukset isäntäkasvin ja endofyytin välillä ovat harvinaisia (Saikkonen ym. 2006). Endofyyttien

tuottamat alkaloidiyhdisteet sisältävät paljon typpeä (Clay & Schardl 2002), ja matalissa ravinnepitoisuuksissa endofyytti oletettavasti kuluttaa rajallisesti käytettävissä olevaa typpeä aiheuttaen allokaatiokustannuksen isäntäkasvin omien toimintojen ja endofyytin välillä (Saikkonen ym. 2006). Onkin havaittu, että alkaloidien tarjoama vastustuskyky kasvinsyöjiä vastaan on luonnossa hyvin vaihteleva (Saikkonen ym. 1998), mikä johtuu todennäköisesti resurssien rajallisesta määrästä ja niiden epätasaisesta jakautumisesta luonnonympäristöissä.

Vaikka tutkimuksissa on havaittu isäntäkasvin ja endofyytin vuorovaikutuksen olevan mutualistinen tai isäntäkasville haitallinen ja endofyytille hyödyllinen, voi vuorovaikutussuhteen kokonaisvaltainen arviointi olla haastavaa. Useat endofyyttien isäntäkasvit ovat monivuotisia, mikä tekee koko eliniän aikaisten hyötyjen ja haittojen ja vuorovaikutussuhteen todellisen luonteen arvioimisesta haastavaa, sillä olosuhteet voivat vaihdella isännän eliniän aikana. Suhde on mutualistinen, jos isäntäkasvin kelpoisuus on suurempi endofyytin kanssa kuin ilman sitä (Cheplick & Faeth 2009d).

1.7. Endofyyttien populaatiodynamiikka

Endofyyttifrekvenssi eli endofyytillisten isäntäkasvien osuus voi vaihdella kasvipopulaatiossa 0 %:sta, jolloin populaatiossa ei esiinny lainkaan endofyyttiä, aina 100 %:iin, jolloin kaikilla populaation yksilöillä on endofyytti. Endofyytillisten ja endofyyttittömien kasvien välillä on todennäköisesti kelpoisuuseroja, mikäli endofyyttifrekvenssi muuttuu. Endofyyttifrekvenssin oletetaan kasvavan kasvipopulaatiossa vuorovaikutussuhteen mutualistisen luonteen takia (Clay & Schardl 2002). Tutkimukset ovat osoittaneet, että vertikaalisesti siirtyvien endofyyttien frekvenssi kasvipopulaatiossa on usein lähes 100 %, mikä osoittaa endofyytin tarjoavan jonkinlaisen valintaedun (Clay 1997; Saikkonen ym. 2000; Spyreas ym. 2001; Clay & Schardl 2002). Useissa tutkimuksissa on havaittu populaation endofyyttifrekvenssin kasvavan ajan myötä, ja kasvinsyöjien ruokailun tehostavan tätä kasvua (Cunningham ym. 1993; Clay & Schardl 2002; Clay ym. 2005).

Endofyytti on todennäköisesti tärkeä valintaetu silloin, kun isäntäkasvi on voimakkaan abioottisen ja bioottisen stressin alaisena (Clay & Schardl 2002). Endofyytti voisi siis osoittautua tärkeäksi valintaeduksi kasvin levitessä pohjoisen levinneisyysalueen rajalla. Tähän viittaava havainto on löydetty esimerkiksi suomalaisista punanadoista (*Festuca*

rubra L.), joiden eteläiset populaatiot ovat endofyytittömiä, mutta pohjoisissa populaatioissa endofyyttifrekvenssi on jopa 80 %. Ruokonadan levinneisyyden pohjoisrajalla elävissä ahvenanmaalaisissa populaatioissa endofyyttifrekvenssit ovat 90–100 % (Saikkonen ym. 2000; Saari ym. 2010).

1.8. Tutkimuksen tavoite

Tämän tutkimuksen tarkoituksena on selvittää, onko ruokonadan systeemisellä vertikaalisesti siementen mukana siirtyvällä *Epichloë*-suvun endofyytillä vaikutusta ruokonadan leviämiseen. Tutkimuskysymykset ovat:

1. Eroaako koealan lähiympäristöön levinneiden ruokonatayksilöiden muodostaman (osa)populaation endofyyttifrekvenssi tunnetusta koealan perustajapopulaation endofyyttifrekvenssistä?
2. Eroaako ruokonadan endofyytillisten (E+) ja endofyytittömien (E-) yksilöiden tuottamien siementen paino, määrä tai itävyys?
3. Eroaako ruokonadan E+ ja E- yksilöiden kasvu ja lisääntyminen kilpailutilanteessa niittykasvillisuuden kanssa?

Hypoteesina on, että lähiympäristöön levinneiden ruokonatayksilöiden endofyyttifrekvenssi on suurempi kuin perustajapopulaation, ja endofyytti tarjoaa valintaedun ruokonadan leviämisessä. Tätä hypoteesia voisivat selittää tutkimuksessa testattavat oletukset siitä, että E+ kasvien siemenmäärä ja itävyys sekä kilpailutilanteessa tapahtuva kasvu ja lisääntyminen ovat suurempia kuin E- kasvien.

2. Aineisto ja menetelmät

2.1. Tutkimuslaji

Tutkimuslajini ruokonata (*Festuca arundinacea*) on monivuotinen 45–120 cm korkea heinä, joka kuuluu heinäkasvien (Poaceae) heimoon (Gibson & Newman 2001). Ruokonata esiintyy Suomessa luonnonvaraisena levinneisyytensä pohjoisrajalla ja kasvaa pääasiassa Ahvenanmaalla sekä hajanaisesti Lounais- ja Etelä-Suomessa, mutta on levinnyt viljelyperäisenä myös pohjoiseen satunnaisina havaintoina (Saikkonen ym. 2000; Lampinen & Lahti 2019; Suomen lajitietokeskus 2022.). Keski-Euroopassa ruokonata on yleinen niittylaji (Saikkonen ym. 2000). Euroopassa ruokonadan suosimat elinympäristöt ovat kosteita, ravinteikkaita niittyjä ja laitumia. Se esiintyy kuitenkin myös

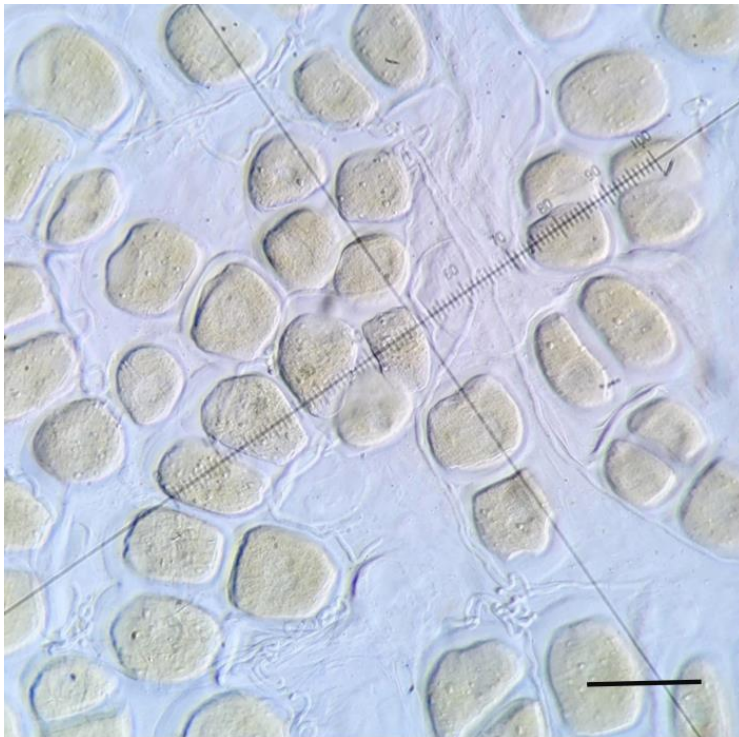
rannikoilla. Suomessa ruokonadan on havaittu esiintyvän hajanaisissa populaatioissa avoimilla merenrannoilla ja sisäsaaristossa (Saikkonen ym. 2000). Ruokonadan siemenet leviävät muiden heinien tavoin tuulten, vesivirtojen, eläinten tai ihmisten mukana vihneiden avulla (Cheplick 1998). Lähes kaikki siemenet itävät hyvin pian, noin 22 päivää kukintahuipun jälkeen, eivätkä säily pitkään maaperän siemenpankissa (Gibson & Newman 2001).

Ruokonadalla esiintyy symbionttinen sieniendofoyytti *Epichloë coenophiala* (Leuchtmann ym. 2014). Endofyytitöntä kasvia kuvataan lyhenteellä E- ja endofyytillistä E+. *E. coenophialan* on havaittu lisääntyvän aseksuaalisesti ja siirtyvän uusiin kasviyksilöihin vain vertikaalisesti isäntäkasvin tuottamien siementen mukana. *Epichloë*-endofyyttiä tavataan yleisesti ruokonadan luonnonpopulaatioissa (Saari ym. 2010). Ruokonata on Euroopassa yleinen viljelylaji (Saikkonen ym. 2000), mutta eurooppalaisissa viljelyalkuperissä systeeminen, siementen mukana siirtyvä endofyytti on harvinainen (Saari ym. 2010; Kauppinen ym. 2016). Endofyytti on yleinen viljelyalkuperissä, joita kasvatetaan Yhdysvalloissa ja Uudessa-Seelannissa (Saikkonen 2000; Johnson ym. 2013).

2.2. Levinneiden ruokonatojen havainnointi

Havainnoin tutkimuksessa ruokonadan luontaista leviämistä istutetun koealan ulkopuolelle. Turun Ruissalossa (60°26'06"N 22°10'29"E) sijainneella ja vuosina 2006–2016 käytetyllä koealalla oli ruokonatoja monista eri alkuperistä ja molemmista endofyyttistatuksista (E+, E-). Koealalle istutetut ruokonadat oli kerätty Ruotsin rannikon, Gotlannin ja Ahvenanmaan luonnonpopulaatioista, joiden lisäksi koealalla kasvoivat myös amerikkalainen viljelylajike Kentucky-31 ja suomalainen endofyytitön viljelylajike Retu. Muista alkuperistä paitsi Retusta oli sekä E+ että E- yksilöitä. Ruokonataa ei luonnostaan esiintynyt tutkimusalueen lähiympäristössä ennen koealan perustamista. Koealan endofyyttifrekvenssi tunnetaan hyvin, koska sinne istutetut ruokonatojen taimet oli kasvatettu siemenistä, joiden endofyyttistatus tunnettiin. Koska tunnen entisen koealan kasvien endofyyttifrekvenssin, voin kaikkien koealan välittömään lähiympäristöön levinneiden, kukkivien ruokonatojen siementen endofyyttistatuksen selvityksellä todeta, noudattaako levinneiden ruokonatojen endofyyttifrekvenssi oletettua koealan eli perustajapopulaation jakaamaa. Keräsin heinäkuussa 2020 siemeniä yhteensä 125 ruokonadasta entisen koealan aidan ulkopuolelta 63 metrin matkalta. Laitoin

jokaisesta kasvista pehmenemään vähintään viisi siementä endofyyttistatuksen selvitystä varten. Pidin siemeniä yön yli liuoksessa, joka sisälsi 95 ml vettä, 5 ml etanolia ja 2,5 g natriumhydroksidia. Menetelmää käytetään yleisesti siementen endofyyttistatusten selvityksessä (Wilson ym. 1991). Seuraavana päivänä huuhtelin siemenet vedellä ja preparoin ne aluslaseille näytteen tarkastelua varten. Tarkistin jokaisen emokasvin endofyyttistatuksen vähintään kahdesta siemenestä, mikäli endofyytti ei olisi kasvanut täydellisesti aivan jokaiseen siemeneseen (Do Valle Ribeiro 1993). Tutkin jokaisen kasvin siementen endofyyttistatuksen valomikroskoopilla käyttäen 400-kertaista suurennosta. Tarkastelin kaksi siementä sisältävää näytettä enintään kuusi minuuttia. Mikäli en havainnut endofyyttiä, totesin kasvin statuksen olevan E-. E+ siemenissä sieniendoftytin rihmastoa oli havaittavissa siemenen alkion solujen välissä (Kuva 2).



Kuva 2. Mikroskooppikuvassa endofyytin sienirihmasto siemenen alkion solujen välissä. Janan pituus 4 μm .

2.3. Siementuoton tarkastelu

Koealan läheisyyteen levinneiden E+ ruokonatojen osuuden poikkeama perustajapopulaation tunnetusta frekvenssistä voi olla seurausta endofyytin vaikutuksesta isäntäkasvin siementuottoon, siementen menestykseen tai jälkeläisten selviytymiseen erilaisissa valintapaineissa. Tutkiakseni endofyytin mahdollisia vaikutuksia isäntäkasvin

leviämisessä arvioin E+ ja E- ruokonatojen siemenmäärän. Käytin arvioinnissa Ruissalon nykyisen koealan kasvien siemeniä. Kyseisen koealan ruokonadat on kasvatettu ahvenanmaalaisten luonnonpopulaatioiden kasvien siemenistä, joiden endofyyttistatus tunnettiin. Ahvenanmaalaisten ruokonatojen siementuotto saattaa vastata muidenkin vanhan koealan perustajapopulaatioissa kasvaneiden eri alkuperää olevien ruokonatojen siementuottoa. Keräsin kaikki siemenet koealan 64 ruokonadalta (32 E+, 32 E-) pusseihin yksilöittäin heinäkuun 2020 lopussa siementen kypsyttyä (Baskin & Baskin 2014a). Laskin satunnaisesti valitun 20 siemenen yhteispainon avulla jokaiselle 64 kasviyksilölle yhden siemenen keskimääräisen painon. Siemenet punnittiin analyysivaa'alla (Mettler Toledo AX204) 0,01 gramman tarkkuudella. Keskimääräinen siemenpaino kertoo siemenen sisältämien resurssien runsaudesta, ja painavammat siemenet itävät yleensä paremmin (Baskin & Baskin 2014b). Arvioin siemenen painon ja siementen kokonaispainon perusteella kasviyksilöjen tuottaman siemenmäärän.

2.4. Idätyskoe

Tutkiakseni endofyytin mahdollisia vaikutuksia ruokonatojen leviämiseen arvioin E+ ja E- kasvien siementen itävyyttä. Käytin idätyskokeessa siementuoton arviointia varten punnitsemiani 20 siementä jokaisesta Ruissalon koealan 64 ruokonadasta (32 E+, 32 E-). Tarkistin idätyskoetta varten, että jokainen idätyskokeeseen valittu siemen oli täysin kehittynyt pelkän tyhjän siemenkuoren sijaan. Baskin & Baskin (2014a) ovat ehdottaneet, että idätyskokeissa tulisi olla useita pieniä toistoja yhden suuren toiston sijaan. Idätyskokeeni eri käsittelyissä (E+, E-) olikin siemeniä useasta eri kasvista. Toteutin idätyskokeen Turun yliopiston kasvitieteellisen puutarhan tutkimuskasvihuoneessa, jonka lämpötila ja valaistusolosuhteet asetettiin sopiviksi itämistä varten (päivälämpötila 17 °C, yölämpötila 15 °C, ilmankosteus 66 %, hajavallo). Laitoin jokaisen 64 kasvin 20 siementä itämään kasviyksilöittäin 7 cm x 7 cm istutuspurkkeihin kasvualustaan (Kekkilä Professional HS R8017 kylvöseos) noin sentin syvyyteen tasaisin välimatkoin. Asetin E+ ja E- kasviyksilöiden istutuspurkit shakkiruutuasetelmaan kasvihuoneen mahdollisten gradienttien aiheuttaman vaihtelun vaikutusten vähentämiseksi (Kuva 3).



Kuva 3. Idätyskokeen asetelma.

Kasvualustan kosteus pidettiin tasaisena. Laskin siementen itävyuden kolmen viikon jälkeen, kun suurin osa itäneiden siementen versoista oli jo noin 10 cm pitkiä. Baskinin ja Baskinin (2014a) mukaan kahden viikon idätyskokeiden on havaittu toimivan hyvin ja idätyskokeen lopetus tulisi tehdä viimeistään neljän viikon jälkeen.

2.5. Kilpailukoe

Tutkiakseni endofyytin mahdollisia vaikutuksia isäntäkasvin leviämisessä arvioin E+ ja E- ruokonatojen kasvua ja lisääntymistä kilpailussa niittykasvillisuuden kanssa. Endofyytin vaikutuksia on tutkimuksissa tarkasteltu usein kontrolloiduissa olosuhteissa, joissa vesi tai ravinteet eivät ole olleet rajoittavia tekijöitä (Cheplick & Faeth 2009b). Tarkastelin kilpailukokeessa ruokonatojen kilpailua olosuhteissa, joissa kasvit elivät luonnollisen abioottisen stressin alaisina. Tutkimuspellon maaperä oli savinen, ja kilpailevat lajit olivat pääasiassa muita luonnossa esiintyviä heiniä, esimerkiksi nurmipuntarpäitä. Koeala perustettiin kesällä 2020 Turun Ruissaloon. Kilpailukokeessa oli mukana 101 ruokonataa (50 E+, 51 E-). Taimet oli kasvatettu Ruissalon nykyisen koealan ahvenanmaalaisten ruokonatojen siemenistä. Kilpaileva yksilö istutettiin niitetyn niittykasvillisuuden sekaan ja kontrolloivaksi sen viereen käännetylle, avoimelle maalle, joka pidettiin mahdollisimman vapaana rikkaruohoista kilpailun vähentämiseksi (Kuva 4). Koerivit sijoitettiin pellon kummallekin reunalle pohjois-etelä-gradientin vaikutuksen vähentämiseksi. Istutuksen jälkeen kaikkia kasveja kasteltiin tarvittaessa parin viikon ajan kuolleisuuden vähentämiseksi. Leikkasin kesän 2021 alussa kilpailevan puolen kasvillisuuden siimaleikkurilla koekasveja lukuun ottamatta noin 30–50 cm korkuiseksi, jotta koekasvien tarkastelu helpottuisi. Keräsin heinäkuussa 2021 tiedon kasvien lisääntymisestä laskemalla kukkavarret ja elokuun lopussa tiedon kasvusta leikkaamalla

kasvien maanpäällisen biomassan. Kuivatun biomassat kasvitieteellisen puutarhan kuivatushuoneessa ja punnitsin ne syyskuussa. Heinien kasvua kuvataan usein maanpäällisen biomassan kuivapainolla (Körner 1991).



Kuva 4. Kilpailukoealaa heinäkuussa 2021. Kilpailevien ruokonatojen rivistö ympyröitynä.

2.6. Tilastolliset menetelmät

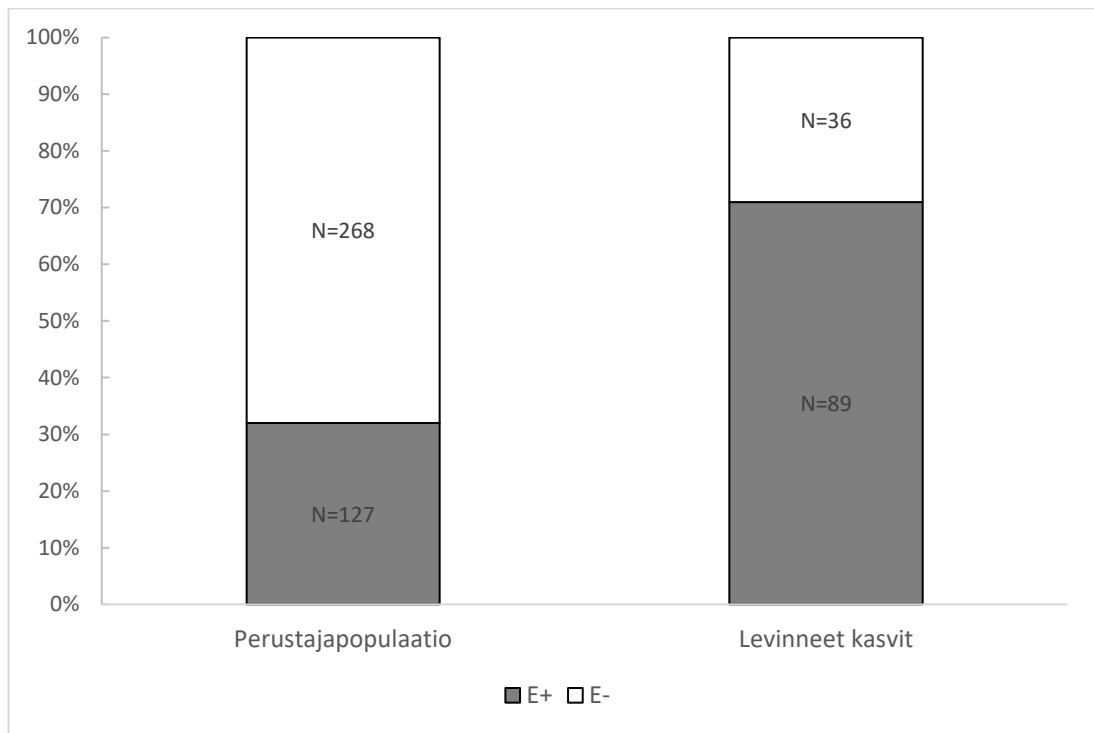
Analysoin aineistot SAS Enterprise Guide 8.2 tilasto-ohjelmistolla (SAS Institute Inc. 2019). Tarkastelin eroa perustajapopulaation ja levinneiden yksilöiden endofyyttifrekvensseissä yhteensopivuuden testauksella χ^2 -testillä. Tarkastelin eroja E+ ja E- ruokonatojen siemenpainossa ja siementen määrässä GLM-proseduurin varianssianalyseilla, joissa selittävänä luokkamuuttujana oli endofyyttistatus. Tarkastelin eroa E+ ja E- ruokonatojen itäneiden siementen määrässä logistisella

regressiolla GLIMMIX-proseduurin tapahtumia/yrityksiä-lauseella (*engl.* events/trials) käyttäen binomijakaumaa ja logit-linkkifunktiota. Selittävänä muuttujana itämistodennäköisyydelle oli endofyyttistatus. Tarkastellessani mallin sopivuutta havaitsin ylihajontaa kuvaavan parametrin (Pearsonin khiin neliö/vapausasteet) olevan merkittävästi yhtä suurempi, joten sisällytin malliin skaalauslauseen, joka vähensi varianssia. Tarkastelin E+ ja E- ruokonatojen biomassojen eroja GLIMMIX-proseduurin varianssianalyysillä, jossa selittävinä luokkamuuttujina olivat endofyyttistatus ja kilpailukäsittely. Kilpailumuuttujan ryhmien varianssit olivat erisuuret eli aineisto oli heteroskedastinen. Jäännösvaihtelu oli merkittävästi suurempaa ryhmässä, jossa kasvit eivät kilpailleet. Tästä syystä tein mallista heterogeenisten varianssien mallin kilpailumuuttujan suhteen, jolloin jäännösvaihtelu laskettiin erikseen kilpaileville ja kilpailemattomille ruokonadoille. Tarkastelin E+ ja E- ruokonatojen eroja kukkavarsien määrissä GLIMMIX-proseduurin yleistetyllä lineaarisella mallilla käyttäen negatiivista binomijakaumaa ja log-linkkifunktiota. Selittävinä luokkamuuttujina olivat endofyyttistatus ja kilpailukäsittely.

3. Tulokset

3.1. Levinneet ruokonadat

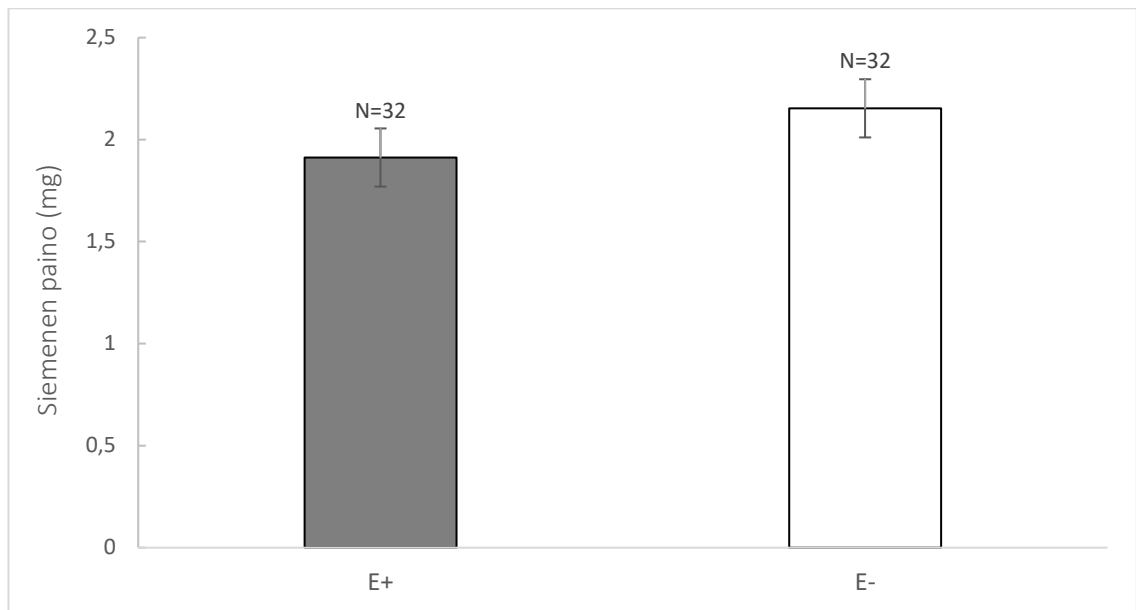
E+ ja E- ruokonatojen osuudet olivat levinneiden ruokonatojen (osa)populaatiossa lähes päinvastaiset kuin perustajapopulaatiossa: perustajapopulaatiossa osuudet olivat 32 % (E+) ja 68 % (E-) ja levinneessä (osa)populaatiossa noin 72 % (E+) ja 28 % (E-) (Kuva 5). Perustajapopulaation lähiympäristöön levinneiden ruokonatojen (osa)populaation endofyyttifrekvenssi erosi tilastollisesti merkitsevästi perustajapopulaation endofyyttifrekvenssistä ($\chi^2= 88,2721$, $DF=1$, $p<0,0001$).



Kuva 5. Endofyytillisten (E+) ja endofyytittömien (E-) ruokonatojen prosentuaaliset osuudet ja otoskoot perustajapopulaatiossa ja levinneiden kasvien (osa)populaatiossa.

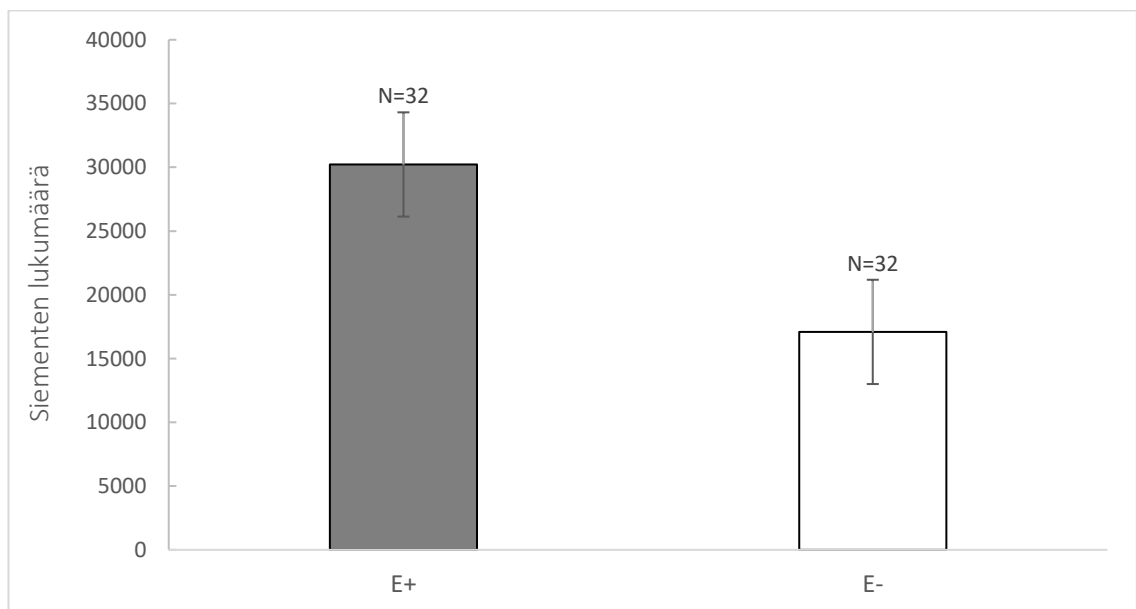
3.2. Siementuoton tarkastelu

E+ ruokonatojen siemenet painoivat keskimäärin 11 % vähemmän kuin E- ruokonatojen (Kuva 6). Yksittäisen siemenen keskimääräinen paino oli tilastollisesti merkitsevästi pienempi E+ ruokonadoilla verrattuna E- ruokonatoihin ($F_{1, 62}=5,72, p=0,019$).



Kuva 6. Endofyytillisten (E+) ja endofyytittömien (E-) ruokonatojen siementen painot (keskiarvo ja 95 % luottamusväli).

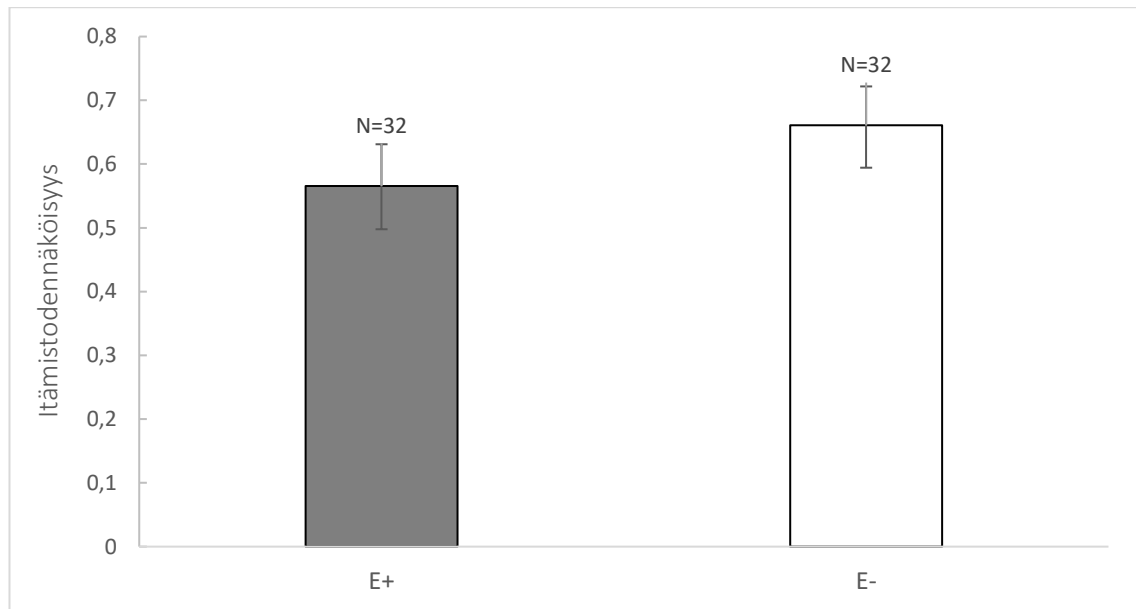
E+ ruokonadat tuottivat keskimäärin noin 77 % enemmän siemeniä kuin E- ruokonadat (Kuva 7). E+ ruokonatojen siementen määrä oli tilastollisesti merkitsevästi suurempi kuin E- ruokonatojen ($F_{1, 62}=20,6$, $p<0,001$).



Kuva 7. Endofyytillisten (E+) ja endofyytittömien (E-) ruokonatojen siemenmäärä (keskiarvon ja 95 % luottamusväli).

3.3. Idätyskoe

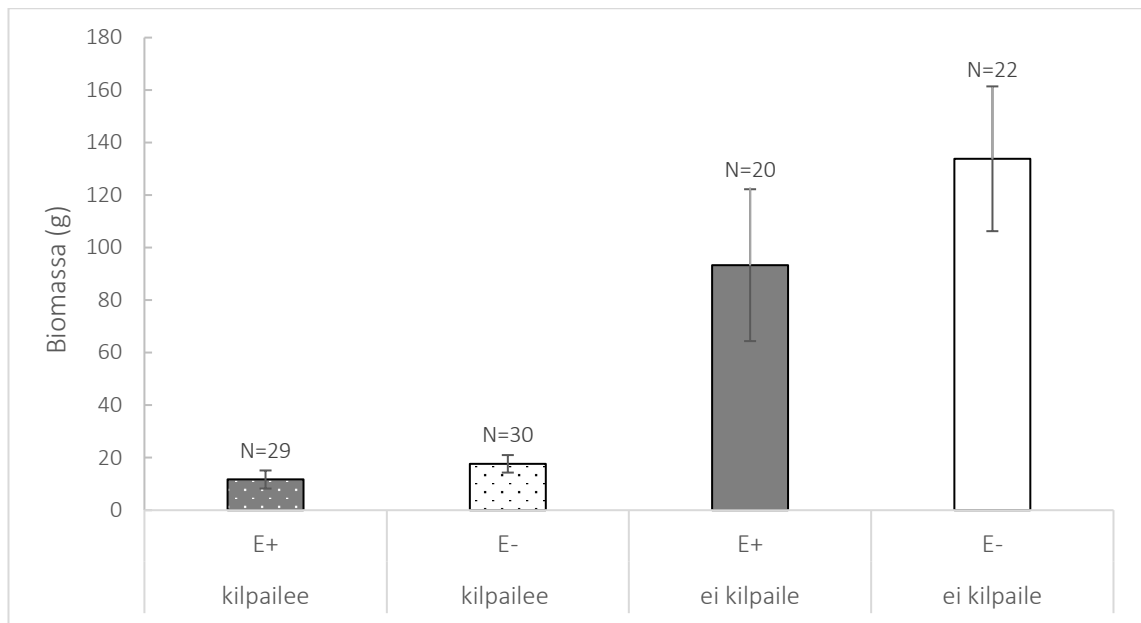
E+ ruokonatojen siemenillä oli noin 14 % pienempi todennäköisyys itää (Kuva 8). E+ ruokonatojen siementen itämistodennäköisyys oli tilastollisesti merkitsevästi pienempi kuin E- ruokonatojen ($F_{1,62}=4,17, p=0,0455$).



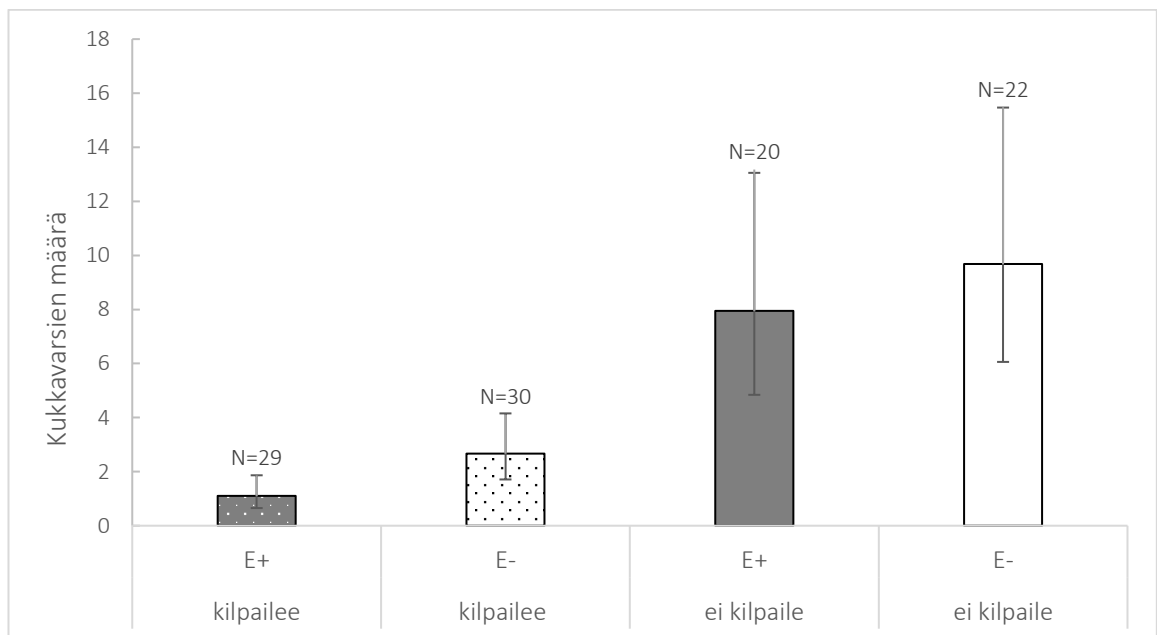
Kuva 8. Endofyytillisten (E+) ja endofyyttömien (E-) ruokonatojen 20 siemenen itämistodennäköisyys (keskiarvo ja 95 % luottamusväli)

3.4. Kilpailukoe

E+ ruokonadat tuottivat kilpailussa keskimäärin 33 % vähemmän ja ilman kilpailua keskimäärin 30 % vähemmän maanpäällistä biomassaa verrattuna E- ruokonatoihin (Kuva 9). E+ ruokonadat tuottivat kilpailussa keskimäärin yhden kukinnon vähemmän ja ilman kilpailua keskimäärin kaksi kukintoa vähemmän kuin E- ruokonadat (Kuva 10). Endofyyttistatuksella oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus sekä ruokonatojen biomassaan ($F_{1,98}=7,22, p=0,0085$) että kukkavarsien määrään ($F_{1,98}=4,77, p=0,0313$). Kilpailussa sekä ruokonatojen kasvu että lisääntyminen olivat heikompia, ja kilpailukäsittely vaikutti tilastollisesti merkitsevästi biomassaan ($F_{1,98}=95,15, p<0,0001$) ja kukkavarsien määrään ($F_{1,98}=42,28, p<0,0001$). Endofyyttistatuksen ja kilpailukäsittelyn välillä ei ollut merkitsevää yhteisvaikutusta biomassaan ($F_{1,97}=2,91, p=0,091$) eikä kukkavarsien määrään ($F_{1,97}=1,97, p=0,16$) eli E+ ja E- ruokonadat eivät reagoineet merkitsevästi eri tavalla kilpailukäsittelyyn.



Kuva 9. Endofyytillisten (E+) ja endofyytittömien (E-) kasvien maanpäällisten osien kuivabiomassa kilpailussa ja ilman kilpailua (keskiarvo ja 95 % luottamusväli).



Kuva 10. Endofyytillisten (E+) ja endofyytittömien (E-) kasvien kukkavarsien määrä kilpailussa ja ilman kilpailua (keskiarvo ja 95 % luottamusväli)

4. Pohdinta

Tutkimukseni tukee oletusta, että *Epichloë*-endofyytti edesauttaa ruokonadan leviämistä. E+ ruokonatojen suurempi osuus koalan läheisyyteen levinneessä (osa)populaatiossa verrattuna perustajapopulaatioon tukee siten oletusta ruokonadan ja sen vertikaalisesti siirtyvän endofyytin mutualistisesta suhteesta, joka parantaa E+ ruokonatojen

kelpoisuutta suhteessa E- yksilöihin (Clay & Schardl 2002). Tutkimuksissa on aiemmin havaittu ruokonatapopulaatioiden sisäinen endofyyttifrekvenssin kasvu (Clay ym. 2005). Tulosten perusteella vain E+ kasvien suurempi siementuotto selittää endofyyttifrekvenssin kasvua. Muiden E+ ja E- ruokonatojen ominaisuuksien, siemenpainon, itävyyden ja kilpailukyvyn, tarkastelu ei tue oletusta ja havaintoa endofyyttifrekvenssin kasvusta. Endofyytti vaikuttaa siis ruokonadan siementuotantoon sekä mahdollisesti muihin tutkimuksessa tarkastelematta jääneisiin ominaisuuksiin, kuten ruokonadan kohtaamaan kasvinsyöntiin tuottamiensa alkaloidien kautta, ja voisi siis näiden ominaisuuksien suhteen vaikuttaa ruokonadan leviämiseen sen levinneisyysalueen reunalla.

Tarkastelin levinneen (osa)populaation endofyyttifrekvenssiä keräämällä siemeniä kukkivista ruokonadoista. Havaitsemani E+ kasvien kasvanut osuus saattoi johtua myös siitä, että E- kasviyksilöt eivät keräyshetkellä kukkineet tai kukkivat hyvin vähän välttyen E+ kasveja todennäköisemmin otostamiselta, jolloin E- kasvien osuus jäisi virheellisesti pienemmäksi. Faeth (2009) havaitsi tutkimuksessaan, että pienempi osuus E- nadoista (*Festuca arizonica* Vasey) lisääntyi niiden ensimmäisenä kasvukautena verrattuna E+ natoihiin. Oletan havaitsemani endofyyttifrekvenssin olevan todenmukainen, koska esimerkiksi kilpailukokeessa E- ruokonadat tuottivat enemmän kukkavarsia kuin E+ ruokonadat.

4.1. Endofyytin vaikutukset ruokonadan siemeniin

E+ ruokonadat tuottivat 77 % enemmän siemeniä kuin E- ruokonadat, mutta tuotetut siemenet olivat 11 % kevyempiä ja itivät 14 % pienemmällä todennäköisyydellä. Resurssien allokaatio jälkeläisten laatuun jälkeläisten määrän kustannuksella on tärkeä osa eliöiden allokaatiostrategiaa (Stearns 1992). Jälkeläisten laatu liittyy kasveilla lajinsisäisesti usein siemenen suurempaan kokoon eli siemenen sisältämien resurssien runsauteen ja täten itämistodennäköisyyteen ja taimen selviytymiseen (Baskin & Baskin 2014b). Ruokonadoilla on tuotettujen siementen määrän ja yksittäisten siementen laadun välillä todennäköisesti allokaatiokustannus. E+ ruokonadat sijoittavat enemmän resursseja suurempaan siemenmäärään siementen laadun kustannuksella eli yksittäisten siementen sisältämät resurssit, jota voidaan kuvata siemenpainolla, ovat pienemmät. Koska siemenen sisältämien resurssien määrä vaikuttaa sen itävyyteen, selittää E+ siementen kevyempi siemenpaino niiden heikomman itävyyden. Tuloksissa esitettyjen

itävyyttä ja siemenmäärää kuvaavien keskiarvoestimaattien perusteella laskettu itävien siementen määrä on E+ ruokonadoilla 51 % suurempi verrattuna E- ruokonatoihin. Endofyytti siis todennäköisesti lisää ruokonadan lisääntymiskelpoisten jälkeläisten määrää eli kelpoisuutta ainakin tiettyssä eliniän vaiheessa. Endofyytti lisää ruokonadan lisääntymiseen allokoitavia resursseja todennäköisesti siksi, että endofyytin kelpoisuus eli siirtyminen uusiin isäntiin kasvaa isäntäkasvin siementuotannon kasvaessa. Tarkastelin endofyytin vaikutusta ruokonadan siementuottoon ja itävyyteen vain ahvenanmaalaista alkuperää olevilla ruokonadoilla. En voi olla varma, vastasiko kyseisen alkuperän tarkastelu muita alkuperiä, joita esiintyi levinneessä perustajapopulaatiossa. Endofyytti saattaisi siis parantaa itävyyttä tai heikentää siementuotantoa muissa alkuperissä, sillä endofyytin tuottamien hyötyjen on havaittu vaihtelevan isäntäkasvin genotyypistä riippuen (Cheplick & Faeth 2009d).

Resurssiallokaatioteorian mukaan resurssirajoitteisissa ympäristöissä lisääntyminen vähentää muihin toimintoihin, kuten kasvuun, käytettävissä olevia resursseja ja voi vaikuttaa myös seuraavaa kasvukautta varten varastoitujen resurssien määrää. Mikäli kasvi lisääntyy tehokkaasti ensimmäisenä kasvukautena, on sen kasvu todennäköisesti heikompaa toisena kasvukautena (Fitter 1986). Faeth (2009) havaitsi E+ natojen (*Festuca arizonica*) allokoivan enemmän resursseja siementuotantoon kuin E- natojen niiden ensimmäisenä ja toisena kasvukautena. Resurssien allokointi lisääntymiseen kasvin ensimmäisinä kasvukausina voi tulevaisuudessa johtaa heikompaan kasvuun tai lisääntymiseen (Faeth 2009). Ilmiö on havaittu esimerkiksi E+ kijasorsimoilla (*Puccinellia distans* L.) (Olejniczak & Lembicz 2007). Tämä endofyytin aiheuttama muutos resurssiallokaatiossa voi olla monivuotiselle heinälle jopa haitallista. Mikäli eliö lisääntyy useita kertoja elinkaarensa aikana, voi suuri lisääntymisallokaatio ja lisääntymisen aikaistuminen vähentää koko eliniän kelpoisuutta (Reekie 1999). Endofyytin kannalta on mahdollisesti hyödyllistä lisätä isäntäkasvin siementuotantoa isäntäkasvin koko elinikäisen kelpoisuuden laskusta huolimatta, jotta se varmistaa siirtymisen uusiin isäntiin.

Endofyytin vaikutukset ruokonadan lisääntymiseen ovat nykyisen koealan ja kilpailukokeen kasvien välillä ristiriitaisia. Tarkastelin siementuottoa Ruissalon nykyisen koealan ruokonadoilta, jotka ovat kasvaneet useiden vuosien aikana kookkaiksi. Kilpailukokeen ruokonadat istutettiin pieninä taimina, eivätkä ne vuodessa kasvaneet yhtä suuriksi kuin nykyisen koealan kasvit. Nykyisen koealan suuret ruokonadat ovat

todennäköisesti kasvattaneet laajan juuriston, jonka avulla veden ja ravinteiden otto on tehokasta. Kilpailukokeen pienikokoiset ruokonadat ottivat maaperän resursseja ehkä heikommin. Isäntäkasvin ja endofyytin väliset allokaatiokustannukset ovat mahdollisesti yleisempiä kasvien ollessa pieniä, ja maaperän ravinnepitoisuuden ollessa alhainen (Saikkonen ym. 2006). Lisäksi kilpailukokeessa laskettu kukintojen eli kukkavarsien määrä ei välttämättä kerro lisääntymispanoksesta täysin yksiselitteisesti. Esimerkiksi kukinnan korkeuden on joillakin heinillä havaittu olevan yhteydessä tähkylöiden eli kukkarakenteiden määrään (Norris 1992). En siis tarkastellut kilpailukokeen ruokonatojen lisääntymistä samanlaisella tarkkuudella kuin nykyisen koealan kasvien siementuottoa.

4.2. Endofyytin vaikutus ruokonadan kilpailuun

E+ ruokonadat menestyivät E- ruokonatoja huonommin sekä kilpailussa niittykasvillisuuden kanssa että ilman kilpailua, mikä ei tue oletustani E+ ruokonatojen paremmasta kilpailukyvyistä. Endofyytti ei toiminut kilpailukokeessa tarkasteltujen ominaisuuksien suhteen mutualistisena symbionttina. Kilpailukoe toteutettiin olosuhteissa, joissa kasvit elivät luonnollisen abiottisen stressin alaisina. Olosuhteet saattoivat olla ravinnepitoisuuden ja muiden abiottisten stressitekijöiden suhteen symbioosille epäedulliset, minkä seurauksena ruokonadan ja endofyytin välinen kilpailu rajallisista resursseista aiheutti allokaatiokustannuksen, joka heikensi ruokonadan kasvua ja lisääntymistä. Perustajapopulaatioista levinneen (osa)populaation kasvupaikka ja kilpailukokeen kasvupaikka saattoivat erota olosuhteiltaan. Vanhan perustajapopulaation koealan ulkopuolelle on saattanut valua sadevesien mukana koealalle levitettyjä ravinteita. E+ kasvien on havaittu menestyvän paremmin korkeammassa ravinnepitoisuudessa, koska isäntäkasvin ja endofyytin väliset allokaatiokustannukset todennäköisesti vähenevät (Saikkonen ym. 2006)

Oletin, että endofyytti auttaisi ruokonataa menestymään paremmin kilpailun aiheuttamassa stressissä. Endofyyttistatuksen ja kilpailukäsittelyn välillä ei kuitenkaan ollut yhdysvaikutusta eli kilpailu ei vaikuttanut eri tavoin E+ ja E- ruokonatojen menestykseen, vaan endofyytin vaikutus biomassaan ja kukintojen määrään pysyi samana sekä kilpailussa että ilman sitä. Tulosteni perusteella en voi todeta E+ ruokonatojen olevan heikompia kilpailijoita, vaan ne menestyvät kilpailukoetta vastaavissa olosuhteissa kasvun ja lisääntymisen osalta yleisesti heikommin kuin E- ruokonadat. E+

kasvien heikompi tai samanveroinen kilpailukyky E- kasveihin verrattuna on havaittu muissakin tutkimuksissa, joissa tutkimuslajeina ovat olleet eri natalajit (Marks ym. 1991; Faeth ym. 2004).

Tarkastelin endofyytin vaikutusta ruokonadan kilpailuun vain ahvenanmaalaista alkuperää olevilla ruokonadoilla. Havaitsemani E+ ruokonatojen heikompi kasvu ja lisääntyminen ei välttämättä ole yleistettävissä kaikkiin alkuperiin tai muihin perustajapopulaatioissa kasvaneisiin alkuperiin tai yleisesti muihin genotyyppiyhdistelmiin. Endofyytti saattaa siis parantaa kilpailukykyä muissa alkuperissä, sillä endofyytin tuottamien hyötyjen on havaittu vaihtelevan isäntäkasvin genotyypistä riippuen (Cheplick & Faeth 2009d). Tutkimuksissa E+ kasvien lajikkeen eli jalostetun linjan on havaittu vaikuttavan kilpailukykyyn (Marks ym. 1991). Endofyytin isäntäkasvilleen tarjoamat hyödyt voivat riippua kasvin ja endofyytin genotyypin yhteensopivuudesta sekä genotyyppien vuorovaikutuksesta ympäristön kanssa. Osa genotyyppiyhdistelmistä voi menestyä paremmin kilpailussa (Cheplick & Faeth 2009d). Malinowskin ja kumppaneiden (1999) tutkimuksessa E+ ruokonadat menestyivät kasvullisesti huonommin kuin E-, mutta yksi E+ genotyyppi heikensi sen kanssa kilpailevan puna-apilan kasvua. He ehdottivat, että kyseisen genotyypin korkeat alkaloidipitoisuudet aiheuttaisivat allelopaattisesti haittaa puna-apilan kasvulle (Malinowski ym. 1999).

Kilpailu itsessään vaikutti sekä E+ että E- ruokonatojen menestykseen, mikä oli odotettavissa kilpailun vähentäessä ruokonadalle tarjolla olevia resursseja. Kilpailukoe toteutettiin pellolla, joka oli ollut pitkään hoitamattomana. Hoitamattomilla niityillä edellisen kesän kasvillisuus maatuu ja ravitsee maaperää, jonka seurauksena kilpailullisesti vahvat lajit, kuten koiranputki, vuohenputki, timotei ja koiranheinä, runsastuvat (Jylhänkangas & Esala 2002). Kilpailevien ruokonatojen seassa kasvoi useita kilpailullisesti vahvoja lajeja. Ruokonata ei luonnonvaraisena yleensä esiinny vallitsevana lajina sen elinympäristöissä, eikä se ole kovin voimakas kilpailija (Saari ym. 2010).

4.3. Muut endofyyttifrekvenssin kasvua selittävät tekijät

Endofyytin tuottamien alkaloidien on useissa tutkimuksissa havaittu olevan kasvinsyöjille haitallisia ja karkottavan niitä (Cheplick & Faeth 2009c; Saikkonen ym.

2010). Tämän seurauksena E+ kasvien on usein havaittu menestyvän E- kasveja paremmin (Breen 1994; Saikkonen ym. 2006). Mutualistisen vuorovaikutussuhteen ajatellaan perustuvan endofyytin tuottamien alkaloidien luomaan valintaetuum (Saikkonen 2016b). Populaatioiden endofyyttifrekvenssien on aiemmissa tutkimuksissa havaittu kasvavan elinympäristöissä, joissa esiintyy paljon kasvinsyöntiä (Clay 1988; Clay ym. 2005; Cheplick & Faeth 2009a). Alkaloidit voivat vaikuttaa kasvien selviytymiseen erityisesti taimivaiheessa (Ruppert ym. 2017), jolloin kasvit ovat erityisen haavoittuvaisessa vaiheessa. Heinäkasvit ovat yleisesti erittäin sietokykyisiä kasvinsyöjien aiheuttamaa vahinkoa vastaan. Heinien kasvupisteet sijaitsevat lähellä maata, ja ne kasvattavat yleensä laajan juuriston, jonka avulla keräävät resurssit maanpäällisen osan uudelleenkasvuun varten (Moore & Johnson 2017). Taimivaiheessa kasvi on kuluttanut siemenen sisältämät resurssit loppuun, mutta ei ole ehtinyt kasvattaa vielä laajaa juuristoa, joka auttaisi sitä sietämään kasvinsyöjien aiheuttamaa vahinkoa. Fuchs kumppaneineen (2017) on havainnut, että jo vuoden ikäisten E+ englanninraiheinien alkaloidipitoisuudet olivat hyönteisille haitallisella tasolla, ja Ruppert ja muut (2017) ovatkin havainneet E+ englanninraiheinien kohtaavan taimivaiheessa vähemmän kasvinsyöntiä. Myös Czarnołęski ja muut (2010) havaitsivat kotiloiden ruokailevan vähemmän E+ kuin E- kujasorsimon taimilla. Czarnołęski ja muut 2010 olettivat, että myös resurssiallokaatio siementen suureen määrään niiden laadun sijaan liittyisi alkaloideihin ja taimivaiheen selviytymiseen. Heidän mukaansa E+ kasvit käyttävät vähemmän resursseja yksittäisten siementen laatuun, koska endofyytti karkottaa kasvinsyöjiä ja näin lisää siemenistä kehittyvien taimien selviytymismahdollisuuksia. Sen sijaan E- kasvien tulee sijoittaa resursseja siementen laatuun niiden määrän sijaan, sillä siemenistä kasvavilla taimilla ei ole alkaloidien tarjoamaa suojaa kasvinsyöjiltä (Czarnołęski ym. 2010). Suuremmista siemenistä kasvaneet taimet sietävät lehtikatoa paremmin kuin pienistä siemenistä kasvaneet, koska suuremmat siemenet sisältävät enemmän resursseja kasvuun (Armstrong & Westoby 1993).

Alkaloidit voisivat vaikuttaa myös siementen selviytymiseen ennen niiden itämistä. Esimerkiksi E+ punanatojen siemenissä on havaittu pieniä määriä torajyväalkaloideja ja peramiinia ja italianraiheinien siemenissä loliineja (Gundel ym. 2018). Alkaloidit voivat karkottaa ja olla haitallisia siemensyöjille, mikä voi parantaa E+ siementen selviytymistä itämiseen asti. Madej ja Clay (1991) ovat valintakokeissaan havainneet lintujen ruokailevan todennäköisemmin E- kuin E+ siemenillä, ja ruokintakokeissa E+ siementen

olevan huonolaatuisempaa ravintoa. Saari ja kumppanit (2010) ovat havainneet E+ ruokonatojen siemenissä vähemmän heinäkiiltokoin ruokailujälkiä kuin E- ruokonatojen siemenissä.

Alkaloidien tarjoaman suojan on ajateltu olevan syynä E+ kasvien paremmaksi havaittuun kilpailukykyyn. Clay ja muut (2005) havaitsivat endofyyttifrekvenssin kasvavan ja E+ ruokonatojen menestyvän E- ruokonatoja paremmin erityisesti silloin, kun kasvinsyöntiä tapahtui. Endofyytin tuottamien alkaloidien merkitys voi ilmentyä ympäröivään kasviyhteisöön kasvinsyönnin ja kilpailun vuorovaikutuksena. E+ ruokonatojen määrän on havaittu kasvavan kasviyhteisössä useiden vuosien aikana todennäköisesti siksi, että kasvinsyöjien ruokailu kohdistui haitallisten alkaloidien takia kasviyhteisön muihin kasvilajeihin (Cheplick & Faeth 2009a). Koska tässä tutkimuksessa toteutetussa kilpailukokeessa ei huomioitu kasveihin kohdistuvan kasvinsyönnin määrää, ei sen mahdollisia vaikutuksia kasvien väliseen kilpailuun voida poissulkea.

Tutkimuksissa on havaittu endofyytin vaikuttavan myös muihin tässä tutkimuksessa huomioimattomiin ominaisuuksiin, jotka voivat toimia valintaetuna ruokonadan leviämässä. En tarkastellut idätyskokeessa siementen itämisnopeutta, joka voi vaikuttaa endofyyttifrekvenssin muutokseen. Pienet ajalliset erot siementen itämisessä voivat vaikuttaa kasvutilan eli kasvuun ja lisääntymiseen tarvittavien resurssien saavuttamiseen (Ross ja Harper 1972). Mittasin ruokonatojen kasvua kilpailukokeessa vain maanpäällisellä biomassalla. Endofyytti saattoi vaikuttaa juurien kasvuun allokoitujen resurssien määrään, minkä seurauksena kasvuun ja lisääntymiseen allokoitujen resurssien määrä saattoi olla pienempi. Heinien kilpailukyky perustuu juurien suhteellisen suureen biomassaan ja tehokkaaseen veden ja ravinteiden ottoon (Wilson 1998), ja havaitsemani heikompi kasvu saattaa kompensoitua varastoiduilla resursseilla. Malinowski ja muut (1997) havaitsivat E+ nurminatojen tuottavan enemmän juuribiomassaa kuin E-, mutta Cheplick (2007) taas huomasi E+ englanninraiheinien allokoivan vähemmän resursseja juuriin kuin E-, kun resurssit olivat rajalliset.

Korkeita endofyyttifrekvenssejä on mahdollista havaita populaatioissa, vaikka endofyytin ja isäntäkasvin välillä ei ole tiukan mutualistista vuorovaikutussuhdetta. Endofyytti saattaa toimia valintaetuna vain tietyissä tilanteissa tai isäntäkasvin kriittisissä elinkierron vaiheissa. Mikäli endofyytin tuottamat alkaloidit lisäävät taimivaiheen selviytymistä, voidaan populaatioissa havaita korkeita endofyyttifrekvenssejä, vaikka

endofyytti toimisi lisääntymisvaiheessa oleville kasveille näennäisesti kustannuksena. Endofyytin vaikutus kasvin kelpoisuuteen voi silti olla positiivinen (Cheplick & Faeth 2009d). Endofyytti on myös voinut olla populaatiossa aiemmin hyödyllinen symbiontti, mutta olosuhteiden muuttuessa se ei tarjoa enää valintaetua isäntäkasville. Maternaalisesti siirtyvänä symbionttina kommensalistinen tai jopa loisiva endofyytti vähenisi populaatiossa todennäköisesti hitaasti, erityisesti endofyytin lisätessä resurssiallokaatiota siementuottoon.

4.4. Endofyytin merkitys ruokonadan leviämisessä pohjoisella levinneisyysrajalla

Tarkastelemieni ominaisuuksien perusteella sienien endofyytti *E. coenophiala* ei ole ruokonadalle tiukan mutualistinen symbiontti, sillä E+ ruokonadat menestyvät tarkastelluissa olosuhteissa heikommin kuin E- ruokonadat. Luonnonvaraisissa kasveissa geneettinen vaihtelu on suurta, minkä takia endofyytin vaikutukset isäntäkasvissa voivat olla hyvin vaihtelevia (Cheplick & Faeth 2009d). Maatalouslajikkeiden tutkimuksissa mutualistisiksi havaitut aseksuaaliset endofyytit paljastuvatkin luonnonvaraisissa kasveissa usein vuorovaikutussuhteeltaan loisiviksi (Faeth & Sullivan 2003). Havaitsin endofyytin kuitenkin lisäävän ruokonadan resurssiallokaatiota siementuottoon, mikä voisi selittää perustajapopulaation leviämisessä havaitun endofyyttifrekvenssin kasvun.

Endofyytin kelpoisuus eli siirtyminen uusiin isäntiin kasvaa isäntäkasvin siementuotannon kasvaessa. Mikäli eliöiden selviytyminen on epätodennäköistä, suosii luonnonvalinta usein niiden lisääntymistä kelpoisuuden maksimoimiseksi (Fitter 1986). Koska kasvien kuolleisuus on suurinta yleensä syntymän jälkeen ja vähenee vuosien mittaan (Watkinson 1986), on endofyytin kannalta mahdollisesti hyödyllistä lisätä isäntäkasvin siementuotantoa varmistaakseen siirtymisensä uusiin isäntiin. Isäntäkasvin suuri lisääntymisallokaatio saattaa johtaa tulevaisuudessa heikompaan lisääntymiseen ja elinikäisen kelpoisuuden pienenemiseen, mutta todellisia vaikutuksia on vaikea arvioida. Lisääntymisen aiheuttamat allokaatiokustannukset ja haitat elinikäiselle kelpoisuudelle voivat vaihdella lajin, populaation, kasvin genotyypin, resurssien määrän ja kasvin iän mukaan (Reekie 1999). Luonnonvalinta on todennäköisesti kohdistunut isäntäkasvin ja endofyytin genotyyppiyhdistelmiin suosien niitä, joissa endofyytti lisää isännän lisääntymisallokaatiota, ja isäntäkasvin ja endofyytin kelpoisuus eli lisääntyvien jälkeläisten määrä on kaikista suurin.

Saari ja kumppanit (2010) ovat ehdottaneet, että suuremman siementuotannon sijaan alkaloideista johtuvat erot E- ja E+ kasvien alttiudessa joutua kasvin- tai siemensyönnin kohteeksi toimisivat E+ kasvien valintaetuna pohjoiseurooppalaisissa ruokonatapopulaatioissa. Ahvenanmaalaisten ruokonatojen on tutkimuksessa havaittu tuottavan gotlantilaisia ja ruotsalaisia alkuperiä enemmän torajyvääalkaloideja ravinnekäsittelyissä (Helander ym. 2016). Alkaloidien tuottama puolustus oletettavasti lisää sekä isäntäkasvin että endofyytin kelpoisuutta, koska isäntäkasvi säilyttää kehittyvät lisääntymiselimensä sekä yhteyttämissolukonsa, jolla tuottaa resursseja lisääntymistä varten (Saikkonen ym. 1998). Kasvin ja endofyytin genotyypit ja ympäristön olosuhteet voivat vaikuttaa alkaloidien tuotantoon (Saikkonen ym. 1998; Helander ym. 2016) ja näin myös endofyytin isäntäkasville tuottamaan hyötyyn. Mikäli elinympäristön ravinnepitoisuus rajoittaa kasvin yhteyttämistä, saattaa endofyytti toimia kasville haitallisena loisena (Saikkonen ym. 1998). Mikäli resursseja riittää molemmille, tarjoavat endofyytin tuottamat alkaloidit todennäköisesti suojaa kasvinsyöjiltä, ja yhteyttämissolukon uudelleenkasvun sijaan resurssit voidaan sijoittaa lisääntymiseen. Endofyytin vaikutus isäntäkasvin lisääntymisallokaatioon ja kelpoisuuteen kasvaa siis todennäköisesti olosuhteissa, joissa endofyytin ylläpito ei aiheuta merkittäviä allokaatiokustannuksia isäntäkasville, ja alkaloidien tuotantoon vaadittua tyyppiä on tarjolla tarpeeksi. Ehdotan ruokonadan leviämisessä havaitsemani endofyyttifrekvenssin kasvun olevan seurausta endofyytin vaikutuksista isännän lisääntymiseen ja puolustukseen kasvinsyöjiä vastaan, ja endofyytin toimivan valintaetuna ruokonadan leviämisessä sen pohjoisella levinneisyysrajalla. Tulee myös huomioida mahdollisuus siihen, että endofyytin ja isäntäkasvin väliset mutualistiset vuorovaikutukset ilmenevät vain tietyissä ympäristöissä, genotyyppiyhdistelmissä tai isäntäkasvin elinkierron vaiheissa.

Kiitokset

Haluan osoittaa suurimmat kiitokset ohjaajilleni Marjo Helanderille ja Miika Laihoselle, joiden erinomainen opastus ja neuvot mahdollistivat tämän työn valmistumisen. Eipä koko työtä olisi ilman Miikan ideoita, joista tutkimus sai alkunsa. Kiitos myös Kari Saikkoselle avustasi prosessini aikana. Haluan osoittaa kiitokset myös Ruissalon tiimille, erityisesti Lauri Heikkoselle ja Ida Palmroosille heidän avustaan aineiston keräämisessä ja koealan perustamisessa.

Lähteet

- Armstrong DP, Westoby M (1993) Seedlings from larger seeds tolerate defoliation better: a test using phylogenetically independent contrasts. *Ecology* 74:1092–1100.
- Arnold, AE, Maynard Z, Gilbert GS, Coley PD, Kursar TA (2000) Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters* 3:267–274.
- Bacon CW, Porter JK, Robbins JD, Luttrell ES (1977) *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology* 34:576–581.
- Baskin CC, Baskin JM (2014a) Ecologically meaningful germination studies. Teoksessa: *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination* (Baskin CC, Baskin JM toim.) s. 7–31. Academic Press, London.
- Baskin CC, Baskin JM (2014b) Variation in seed dormancy, germination and size within and between Individuals. Teoksessa: *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination* (Baskin CC & Baskin JM toim.) s. 350–370. Academic Press, London.
- Breen JP (1994) *Acremonium* endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. *Annual review of entomology* 39:401–423.
- Cheplick GP (1998) Seed dispersal and seedling establishment in grass populations. Teoksessa: *Population Biology of Grasses* (Cheplick GP, toim.) s. 84–105. Cambridge University Press, Cambridge.
- Cheplick GP (2007) Costs of fungal endophyte infection in *Lolium perenne* genotypes from Eurasia and North Africa under extreme resource limitation. *Environmental and Experimental Botany* 60:202–210.
- Cheplick GP, Faeth S (2009a) Introduction. Teoksessa: *Ecology and Evolution of Grass-Endophyte Symbiosis* (Cheplick GP, Faeth S toim.) s. 13–14. Oxford University Press, Oxford.
- Cheplick GP, Faeth S (2009b) Effects of endophytes on their hosts. Teoksessa: *Ecology and Evolution of Grass-Endophyte Symbiosis* (Cheplick GP, Faeth S toim.) s. 24–45 Oxford University Press, Oxford.
- Cheplick GP, Faeth S (2009c) Endophytes and host-plant herbivore relationships. Teoksessa: *Ecology and Evolution of Grass-Endophyte Symbiosis* (Cheplick GP, Faeth S toim.) s. 54–60 Oxford University Press, Oxford.

- Cheplick GP, Faeth S (2009d) Evolutionary ecology of grass-endophyte interactions. Teoksessa: *Ecology and Evolution of Grass-Endophyte Symbiosis* (Cheplick GP, Faeth S toim.) s. 118–134 Oxford University Press, Oxford.
- Cheplick GP, Faeth S (2009e) Future directions. Teoksessa: *Ecology and Evolution of Grass-Endophyte Symbiosis* (Cheplick GP, Faeth S toim.) s. 174 Oxford University Press, Oxford.
- Clay K (1988) Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* 69:10–16.
- Clay K (1997) Fungal endophytes, herbivores and the structure of grassland communities. Teoksessa: *Multitrophic interactions in terrestrial systems* (Gange AC & Brown VK, toim.), s. 151–169. Blackwell, Oxford.
- Clay K, Schardl C (2002) Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist* 160:99–127.
- Clay K, Holah J, Rudgers JA (2005) Herbivores cause a rapid increase in hereditary symbiosis and alter plant community composition. *PNAS* 102:12465–12470.
- Colautti RI, Grigorovich IA, MacIsaac HJ (2006) Propagule pressure: a null model for biological invasions. *Biological invasions* 8:1023–1037.
- Conover MR (1998) Impact of consuming tall fescue leaves with the endophytic fungus, *Acremonium coenophialum*, on meadow voles. *Journal of Mammalogy* 79: 457–463.
- Cunningham PJ, Foot JZ, Reed KFM (1993) Perennial ryegrass (*Lolium perenne*) endophyte (*Acremonium lolii*) relationships: the Australian experience. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 44:157–168.
- Czarneński M, Olejniczak P, Mikołajczak P, Lembicz M, Kozłowski J (2010) Fungal endophytes protect grass seedlings against herbivory and allow economical seed production. *Evolutionary Ecology Research* 12:769–777.
- Do Valle Ribeiro MAM (1993) Transmission and survival of *Acremonium* and the implications for grass breeding. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 44:195–213.
- Eriksson O, Kiviniemi K (1999) Evolution of plant dispersal. Teoksessa: *Life history evolution in plants* (Vuorisalo TO, Mutikainen PK toim.) s. 215–216 Kluwer Academic, Dordrecht.
- Faeth SH (2009) Asexual fungal symbionts alter reproductive allocation and herbivory over time in their native perennial grass hosts. *The American Naturalist* 173: 554–565.

- Faeth SH, Sullivan TJ (2003) Mutualistic asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. *The American Naturalist* 161(2):310–325.
- Faeth SH, Helander ML, Saikkonen KT (2004) Asexual *Neotyphodium* endophytes in native grass reduce competitive abilities. *Ecology Letters* 7:304–313.
- Fitter AH (1986) Acquisition and utilization of resources. Teoksessa: *Plant Ecology* (Crawley MJ toim.) s. 393–401 Blackwell, Oxford.
- Fuchs B, Krischke M, Mueller MJ, Krauss J (2017) Plant age and seasonal timing determine endophyte growth and alkaloid biosynthesis. *Fungal Ecology* 29:52–58.
- Gaston KJ (2003) Range edges. Teoksessa: *The Structure and Dynamics of Geographic Ranges* (Gaston KJ, toim.) s. 20–65. Oxford University Press, Oxford.
- Gibson DJ, Newman JA (2001) *Festuca arundinacea* Schreber (*F. elatior* L. ssp. *arundinacea* (Schreber) Hackel). *Journal of Ecology* 89:304–324.
- Gundel PE, Seal CE, Biganzoli F, Molina-Montenegro MA, Vázquez-de-Aldana BR, Zabalgogezcoa I, Bush LP, Martínez-Ghersa MA, Ghersa CM (2018) Occurrence of alkaloids in grass seeds symbiotic with vertically-transmitted *Epichloë* fungal endophytes and its relationship with antioxidants. *Frontiers in Ecology and Evolution* 6:211.
- Gurevitch J, Scheiner SM, Fox GA (2006) Soils, mineral nutrition, and belowground interactions. Teoksessa: *The Ecology of Plants* (Gurevitch J, Scheiner SM, Fox GA toim.) s. 92–95 Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Harrison JG, Griffin EA (2020) The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny and host tissues: how far have we come and where do we go from here? *Environmental Microbiology* 22:2107–2123.
- Helander M, Phillips T, Faeth SH, Bush LP, McCulley R, Saloniemi I, Saikkonen K (2016) Alkaloid quantities in endophyte-infected tall fescue are affected by the plant-fungus combination and environment. *Journal of chemical ecology* 42:118–126.
- Howe HF, Westley LC (1986) Ecology of pollination and seed dispersal. Teoksessa: *Plant Ecology* (Crawley MJ toim.) s. 185–186 Blackwell, Oxford.
- Johnson LJ, de Bonth ACM, Briggs LR, Caradus JR, Finch, SC, Fleetwood DJ, Fletcher LR, Hume DE, Johnson RD, Popya AJ, Tapper BA, Simpson WR, Voisey CR, Card SD, Stadler M, Hyde KD (2013) The exploitation of *Epichloë* endophytes for agricultural benefit. *Fungal Diversity* 60:171–188.

- Jylhänkangas T, Esala M (2002) Niittykasvien kasvupaikkavaatimukset maaperän suhteen. *MTT:n selvityksiä* 3. s. 14.
- Kauppinen M, Saikkonen K, Helander M, Pirttilä AM, Wäli PR (2016) *Epichloë* grass endophytes in sustainable agriculture. *Nature Plants* 2:15224.
- Körner C (1991) Some often overlooked plant characteristics as determinants of plant growth: a reconsideration. *Functional Ecology* 5:162–173.
- Lampinen R, Lahti T (2019) Kasviatlas 2018. -- Helsingin Yliopisto, Luonnontieteellinen keskusmuseo, Helsinki. <<http://koivu.luomus.fi/kasviatlas>> [Luettu 10.11.2020]
- Leuchtmann A (1992) Systematics, distribution, and host specificity of grass endophytes. *Natural Toxins* 1:150–162.
- Leuchtmann A, Bacon CW, Schardl CL, White Jr JF, Tadych M (2014) Nomenclatural realignment of *Neotyphodium* species with genus *Epichloë*. *Mycologia* 106:202–215.
- MacArthur RH (1972) Species distributions. Teoksessa: *Geographical ecology: Patterns in the distribution of species* (MacArthur RH, toim.) s. 144–149. Harper & Row, New York.
- Madej CW, Clay K (1991) Avian seed preference and weight loss experiments: the effect of fungal endophyte-infected tall fescue seeds. *Oecologia* 88:296–302.
- Malinowski DP, Leuchtmann A, Schmidt D, Nösberger J (1997) Growth and water status in meadow fescue is affected by *Neotyphodium* and *Phialophora* species endophytes. *Agronomy Journal* 89:673–678.
- Malinowski DP, Belesky DP, Fedders JM (1999) Endophyte infection may affect the competitive ability of tall fescue grown with red clover. *Journal of Agronomy and Crop Science* 183:91–101.
- Marks S, Clay K, Cheplick GP (1991) Effects of fungal endophytes on interspecific and intraspecific competition in the grasses *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne*. *Journal of Applied Ecology* 28:194–204.
- Moore BD, Johnson SN (2017) Get tough, get toxic, or get a bodyguard: identifying candidate traits conferring belowground resistance to herbivores in grasses. *Frontiers in Plant Science* 7:1925.
- Norris RF (1992) Relationship between inflorescence size and seed production in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Weed Science* 40:74–78.
- Olejniczak P & Lembicz M (2007) Age-specific response of the grass *Puccinellia distans* to the presence of a fungal endophyte. *Oecologia* 152:485–94.

- Reekie EG (1999) Allocation, trade-offs, and reproductive effort. Teoksessa: *Life history evolution in plants* (Vuorisalo TO, Mutikainen PK toim.) s. 177–180 Kluwer Academic, Dordrecht.
- Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182:314–330.
- Ross MA, Harper JL (1972) Occupation of biological space during seedling establishment. *Journal of Ecology* 60:77–88.
- Rudgers JA, Mattingly WB, Koslow JM (2005) Mutualistic fungus promotes plant invasion into diverse communities. *Oecologia* 114:463–471.
- Ruppert KG, Matthew C, McKenzie CM, Popay AJ (2017) Impact of *Epichloë* endophytes on adult argentine stem weevil damage to perennial ryegrass seedlings. *Entomologia experimentalis et applicata* 163:328–337.
- Saari S, Helander M, Faeth SH, Saikkonen K (2010) The effects of endophytes on seed production and seed predation of tall fescue and meadow fescue. *Microbial Ecology* 60:928–934.
- Saikkonen K (2000) Kentucky 31, far from home. *Science* 287:1887–1887.
- Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ (1998) Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29:319–343.
- Saikkonen K, Ahlholm J, Helander M, Lehtimäki S, Niemeläinen O (2000) Endophytic fungi in wild and cultivated grasses in Finland. *Ecography* 23:360–366.
- Saikkonen K, Wäli P, Helander M, Faeth SH (2004) Evolution of endophyte–plant symbioses. *Trends in Plant Science* 9:275–280.
- Saikkonen K, Lehtonen P, Helander M, Koricheva M, Faeth SH (2006) Model systems in ecology: dissecting the endophyte–grass literature. *TRENDS in Plant Science* 11:1360–1385.
- Saikkonen K, Saari S, Helander M (2010) Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? *Fungal Diversity* 41:101–113.
- Saikkonen K, Ruokolainen K, Huitu O, Pedro G, Piltti T, Hamilton C, Helander M (2013) Fungal endophytes help prevent weed invasions. *Agriculture Ecosystems & Environment* 165:1–5.
- Saikkonen K, Phillips TD, Faeth SH, McCulley RL, Saloniemi I, Helander M (2016a) Performance of endophyte infected tall fescue in Europe and North America. *PLOS ONE* 11:e0157382.

- Saikkonen K, Young CA, Helander M, Schardl CL (2016b) Endophytic *Epichloë* species and their grass hosts: from evolution to applications. *Plant molecular biology* 90:665–675.
- Saikkonen K, Nissinen R, Helander M (2020) Toward comprehensive plant microbiome research. *Frontiers in Ecology and Evolution* 8:61.
- SAS Institute Inc. (2019) SAS Enterprise Guide 8.2. Cary, North Carolina, United States.
- Selosse MA, Schardl CL (2007) Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytologist* 173:452–458.
- Siegel M, Latch G, Bush L, Fannin F, Rowan D, Tapper B, Bacon CW, Johnson MC (1990) Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. *Journal of Chemical Ecology* 16:3301–3315.
- Spyreas G, Gibson DJ, Basinger M (2001) Endophyte infection levels of native and naturalized fescues in Illinois and England. *Journal of the Torrey Botanical Society* 128:25–34.
- Stearns SC (1992) Trade-offs. Teoksessa: *The Evolution of Life Histories* (Stearns SC toim.) s. 72–89. Oxford University Press, New York.
- Suomen lajitietokeskus (2022) Ruokonata – *Schedonorus arundinaceus* <<https://laji.fi/taxon/MX.40436>> [Luettu 2.11.2020]
- Vuorisalo TO, Mutikainen PK (1999) Modularity and plant life histories. Teoksessa: *Life history evolution in plants* (Vuorisalo TO, Mutikainen PK toim.) s. 6–7 Kluwer Academic, Dordrecht.
- Watkinson AR (1986) Plant population dynamics. Teoksessa: *Plant Ecology* (Crawley MJ toim.) s. 146–164 Blackwell, Oxford.
- Wilson D (1995) Endophyte—the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73:274–76.
- Wilson SD (1998) Competition between grasses and woody plants. Teoksessa: *Population Biology of Grasses* (Cheplick GP toim.) s. 231–254 Cambridge University Press, Cambridge.
- Wilson AD, Clement SL, Kaiser WJ (1991) Survey and detection of endophytic fungi in *Lolium* germplasm by direct staining and aphid assays. *Plant Disease* 75:169–173.