

**Perinnöllisen muuntelun määrän vaikutus  
käärmeenpistoyrtin lisääntymismenestykseen ja  
puolustukseen**

**Alba Martin Fernandez**

**Pro gradu -tutkielma**

**Turun yliopisto**

**Biologian laitos**

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

# Tiivistelmä

TURUN YLIOPISTO

Biologian laitos

**ALBA MARTIN FERNANDEZ: Perinnöllisen muuntelun määrän vaikutus käärmepistoyrtin lisääntymismenestykseen ja puolustukseen**

Pro gradu -tutkielma, 34s.

Ekologia

Huhtikuu 2021

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

-----

Perinnöllisen muuntelun määrä populaatiotasolla on tärkeä tekijä populaatioiden selviytymisessä muuttuvissa olosuhteissa ja populaation kelpoisuudella on vahva positiivinen yhteys perinnöllisen muuntelun määrän kanssa. Yksilötasolla perinnöllisen muuntelun määrän vaikutus yksilön kelpoisuuteen on vaihteleva. Tässä opinnäytetyössä tutkin käärmepistoyrtin (*Vincetoxicum hirundinaria*) perinnöllisen muuntelun määrän, eli kasvin lokusten heterotsygotia-asteen, vaikutusta yksilöiden lisääntymispotentiaaliin ja puolustukseen erikoistuneita kasvinsyöjiä vastaan. Lisäksi selvitin matemaattisesti, käyttäen Hardy-Weinbergin lakia ja tutkimuskasvien geneettistä dataa, onko tutkimuksen kohteena ollut käärmepistoyrttipopulaatio satunnaisesti lisääntyvä. Tein tutkimuksen kesällä 2014 Lammasluodon saarella hyväksikäyttäen paikallisia kasviyksilöitä, joiden perinnöllisen muuntelun määrä oli tiedossa. Kokeen käsittely - ja kontrollikasvit olivat halkaisun avulla luotuja klooneja toisistaan. Käsittelyynä oli lisätty herbivoria, jonka sain aikaan harmosuomuyökkösen (*Abrostola asclepiadis*) muninnalla lisääntymishäikeissä. Mittasin kasveilta koon ja lisääntymisen määritteitä ja seurasin harmosuomuyökkösen munien määrää, katoamista, loisintaa ja steriiliyttä sekä käärmepistoyrtin kokemaa kasvinsyönnin määrää. Perinnöllisen muuntelun määrällä oli merkitystä kasvin lisääntymispotentiaaliin. Pienillä kasveilla suurempi perinnöllisen muuntelun määrä ennusti pienempää kukkivien versojen määrää, eli tulokset antoivat viitteitä geneettisestä yhteensopimattomuudesta lisääntymisen suhteen. Keskikokoisilla ja suurilla kasveilla suhde on melko neutraali. Käärmepistoyrtin puolustukseen perinnöllisen muuntelun määrällä ei näiden tulosten valossa ole vaikutusta. Kasvinsyönnin määrää kasveilla tai kasvilla steriileiksi jääneiden harmosuomuyökkösten munien määrää ei selittänyt perinnöllisen muuntelun määrä, tai mikään muukaan tutkituista muuttujista. Kasvilta loisittujen munien määrää selitti kasvin koko ja munien määrä kasvilla ja kasvilta kadonneiden munien määrää selitti vain munien määrä kasvilla. Tulokseni osoittavat, että käärmepistoyrtin Lammasluodon populaatio on satunnaisesti lisääntyvä ja sen perinnöllisen muuntelun määrällä on vaikutusta sen lisääntymiseen, mutta ei sen puolustukseen. Käärmepistoyrtti vaikuttaa siis kuuluvan lajeihin, joilla geneettisen muuntelun suuri määrä ei tarkoita yksilön parempaa kelpoisuutta.

**AVAINSANAT:** kasvi—kasvinsyöjä-vuorovaikutus, *Vincetoxicum hirundinaria*, *Abrostola asclepiadis*, sisäsiitosheikkous, geneettinen yhteensopimattomuus, Hardy-Weinbergin laki

# Sisällysluettelo

1. Johdanto.....	1
1.1. Kasvien perinnöllisen muuntelun määrän merkitys ja syyt muuntelun määrään .....	1
1.2. Sisäsiitosheikkous ja geneettinen yhteensopimattomuus.....	2
1.3. Kasvin sisä- ja sukusiittoisuuden määrittely .....	4
1.4. Geneettisen variaation merkityksen tutkimus .....	5
1.5. Tutkimus käärmeenpistoyrtillä .....	6
2. Tutkimuskysymykset .....	8
3. Menetelmät .....	10
3.1 Tutkimuslajit.....	10
3.2. Koealue .....	12
3.3. Koekasvit ja koeasetelma.....	13
3.4. Tilastolliset analyysit .....	18
4. Tulokset.....	20
4.1 Käärmeenpistoyrtin lisääntymisen satunnaisuus Lammasluodolla .....	20
4.2 Käärmeenpistoyrtin geneettisen muuntelun määrän vaikutus lisääntymismenestykseen .....	22
4.3.1 Käärmeenpistoyrtin geneettisen muuntelun määrän vaikutus kasviin kohdistuneeseen kasvinsyöntiin.....	24
4.3.2 Käärmeenpistoyrtin geneettisen muuntelun määrän vaikutus munien tuhoutumiseen kasvilta .....	25
5. Tulosten tarkastelu .....	27
6. Kiitokset .....	31
7.Lähteet .....	31

# 1. Johdanto

## 1.1. Kasvien perinnöllisen muuntelun määrän merkitys ja syyt muuntelun määrään

Perinnöllistä, eli geneettistä, muuntelun määrää voidaan tarkastella sekä yksilö- että populaatiotasolla ja nämä kaksi yleensä korreloivat vahvasti (Lacy 1997). Lacy (1997) määrittelee perinnöllisen muuntelun määrän, eli variaation, yleisesti yksilötasolla tarkoittavan sitä, kuinka suuri prosentti yksilön lokuksista on heterotsygoottisia, eli kuinka suuri on yksilön heterotsygotia-aste. Populaatiotasolla variaatiolla puolestaan tarkoitetaan joko lokuksen mahdollisten alleelien määrää, lokuksen eri alleelien frekvenssejä tai sitä, kuinka suuri osa lajin lokuksista on monimuotoisia.

Populaatiotasolla variaation merkitys on yleisesti tunnustettu lajien evoluutiota ajavana voimana, ja erityisesti riittävän korkeaa geneettistä variaatiota pidetään edellytyksenä lajien muuttuviin ympäristöihin sopeutumiselle (Lacy 1997; Campbell 2008 s.1246). Leimu ym. (2006) totesivat review-artikkelissaan, että populaation kelpoisuudella ja populaation geneettisellä variaatiolla on selvä positiivinen yhteys.

Yksilötasolla variaation merkityksestä ei olla aivan yhtä yksimielisiä. Yleisesti yksilön kelpoisuuden katsotaan keskimäärin kasvavan sen heterotsygotia-asteen kasvaessa (Turelli & Ginzburg 1983). Esimerkiksi Schaal ja Levin (1976) totesivat punatähkiin kuuluvalla monivuotisella kasvilla (*Liatris Cylindracea*) suuremman heterotsygotia-asteen korreloivan kasvavan jälkeläistuoton, eliniän ja kehitysnopeuden kanssa. Kuitenkin monissa tutkimuksissa on myös todettu, että yksilötasolla korkea heterotsygotia-aste ei välttämättä korreloi yksilön kelpoisuuden kanssa lähes lainkaan (Britten 1996).

Siihen, kuinka paljon kasvien eri lokuksilla on erilaisia alleeleja lajitasolla, vaikuttaa moni tekijä. Geneettisen muuntelun määrään vaikuttavat eniten kasvin elinhistorian eri aspektit, eli sen maantieteellinen sijoittuminen, lisääntymistapa, siementen leviämistapa, kasvin taksonominen status, kasvin elinkaari ja näiden yhdysvaikutukset (Hamrick & Godt 1996). Käytännössä tekijät, jotka siirtävät geneettistä materiaalia, eli siitepölyä tai siemeniä, mahdollisimman laajalle alueelle ja mahdollisimman monen saman lajin kasvin välillä, lisäävät geneettisen muuntelun määrää kasvipopulaatioissa. Tällöin mutaatiot kasvien eri geneeissä pääsevät leviämään populaatioissa ja niiden säilymistodennäköisyys on suurempaa ja vähemmän sattumasta riippuvaista.

Hamrickin ja Gottin tutkimus (1996) avaa eri tekijöiden vaikutuksia perinnöllisen variaation vaihteluun seuraavilla tavoilla: Maantieteellinen sijoittuminen, eli se, elävätkö kasvit suurissa, keskenään vuorovaikutuksessa olevissa populaatioissa vai ovatko populaatiot maantieteellisesti erillään toisistaan, vaikuttaa muuntelun määrään siten, että ensimmäisessä tapauksessa geneettisen muuntelun määrä on pienempää kuin toisessa. Ristisiittoisesti lisääntyvien kasvien geneettinen variaatio on suurempaa kuin itsesiittoisesti lisääntyvillä kasveilla. Sekamallisen lisääntymistavan kasveilla, eli kasveilla, jotka lisääntyvät sekä itsesiittoisesti että ristisiittoisesti, variaatio on pienempää kuin vain ristisiittoisesti lisääntyvillä kasveilla, mutta suurempaa kuin vain itsesiittoisesti lisääntyvillä kasveilla. Kasveilla, joiden siemenet jäävät emokasvin lähelle, geneettinen variaatio on pienempää kuin kasveilla, joiden siemenet kulkeutuvat kauemmaksi tuulen tai eläinten mukana. Kun siemenet kulkeutuvat kauemmaksi, seuraavan sukupolven kasvit lisääntyvät geneettisesti itsestään poikkeavampien yksilöiden kanssa kuin siinä tapauksessa, että ne olisivat jääneet emoyksilön lähelle. Puuvartisten kasvien geneettinen muuntelu on pienempää kuin ruohovartisten. Tämä johtuu siitä, että puuvartistet kasvit ovat pitkäikäisempiä kuin ruohovartistet, joiden nopeat lisääntymissyklit mahdollistavat mutaatioiden nopeamman synnyn ja paremman selviytymisen lisääntymisikään. Taksonomiastatus vaikuttaa geneettiseen variaatioon siten, että paljassiemenisillä on eniten geneettistä variaatiota, yksisirkkaisilla seuraavaksi eniten ja kaksisirkkaisilla kasvilajeilla vähiten. Paljassiemeniset kasvit ovat evolutiivisesti vanhimpia, joten alleelimutaatioita on ehtinyt kertyä lajeille enemmän kuin evolutiivisesti nuoremmille kaksisirkkaisille kasvilajeille. Gitzendanner ja Soltis (2000) toteavat myös populaation koon korreloivan vahvasti lajin geneettisen muuntelun määrän kanssa. Mitä pienempiä lajin populaatiot tai osapopulaatiot ovat, sitä pienempää on lajin sisäisen geneettisen muuntelun määrä, kun taas suurten populaatioiden kasveilla geneettisen muuntelun määrä on suurta (Gitzendanner & Soltis 2000).

## **1.2. Sisäsiitosheikkous ja geneettinen yhteensopimattomuus**

Eräs perinnöllisyyden ja kasvien lisääntymisstrategioiden tärkeä aspekti on sisäsiitosheikkous (englanniksi inbreeding depression). Sisäsiitosheikkoudella tarkoitetaan itse- tai sukusiitoksen aiheuttamaa eliön kelpoisuuden heikkenemistä, esimerkiksi lisääntymisen tai selviytymisen laskua (Futuyma 2005 s.201–2002). Sisäsiitosheikkoudesta on kaksi vallitsevaa teoriaa (Charlesworth & Charlesworth 1987). Klassiseksi kutsutun teorian mukaan heterotsygotia, eli se, että eliön alleelit

geenipareissa ovat eri alleelimuotoisia, valmistaa eliötä ympäristön muutoksiin paremmin kuin homotsygotia, eli se, että eliön geeniparit ovat samaa alleelimuotoa, joka kehittyy eliön sisä- tai sukusiittoisuudesta. Charlesworthien (1987) ”uudeksi” nimittämän teorian mukaan sisäsiitoksessa eliön genomiin fiksaantuu poistuvia tai osittain poistuvia resessiivisiä alleeliyhdistelmiä, jotka tekevät yksilöistä heikompia heterotsygoottisiin lajitovereihinsa verrattuna.

Eri kasvilajeilla on löydetty eri sisäsiitosheikkouden muotoja useissa tutkimuksissa. Esimerkiksi Bello-Bedoy ja Núñez-Farfán (2010) totesivat, että sisäsiittoiset hulluruohot (*Datura stramonium*) kärsivät sisäsiitosheikkoudesta sekä lisääntymisen että puolustuksen suhteen. Sisäsiittoisilla hulluruohoilla oli ristisiittoisiin lajitovereihinsa verrattuna enemmän kasvinsyöntivaurioita, vähemmän hedelmiä ja vähemmän siemeniä per hedelmä. Yleisesti verrattaessa sisäsiittoisia kasveja ristisiittoisiin, on havaittu mm. siementen pienempää itävyyttä, heikompaa selviytymistä taimesta aikuiseksi yksilöksi, siementen ja itujen pienempää kokoa, koko populaation heikompaa selviämistä sekä kukkien ja siementen pienempää lukumäärää (Keller & Waller 2002). Eliöiden elinhistorialla on kuitenkin suuri vaikutus siihen, miten paljon ne kärsivät sisäsiitosheikkoudesta. Historiallisesti suurilla ja ristisiittoisilla populaatioilla on sisäsiitosheikkoutta paljon enemmän kuin populaatiolla, joiden elinhistoriassa on ollut pullonkaulailmiötä, jossa yli 50 % populaatiosta on tuhoutunut, tai pölytyksen epäonnistumista (Lande & Schemske 1985; Johnson ym. 2015).

Fisher osoitti artikkelissaan ”Average excess and average effect of a gene substitution” (1941), että ilman sisäsiitosheikkoutta kasvi, jolle on kehittynyt geeni, joka aiheuttaa kasvilla sisäsiitosta, lisääntyisi 50 % tehokkaammin kuin yksilöt, joilla ei tätä geeniä ole ja näin koko populaatio muuttuisi sisäsiittoiseksi hyvin nopeasti. Tämä johtuu siitä, että ristisiitos kuluttaa paljon kasvin resursseja, koska iso osa tuotetusta siitepölystä menee pölytyksessä hukkaan (Lande & Schemske 1985). Sisäsiitosheikkous onkin suurissa ristisiittoisissa populaatioissa ainut yleinen tekijä, joka on tarpeeksi vahva estämään sisäsiittoisuuden yleistymisen suureessa osassa lajeista (Charlesworth & Charlesworth 1987). Sisäsiitosheikkoutta ei kuitenkaan aina kasveilla ole (Strauss & Karban 1994). Sisäsiittoisuutta voi lisätä pölyttäjäin puute, uusien alueiden kolonisointi ja paikallinen sopeutuminen (Lande & Schemske 1985).

Geneettinen yhteensopimattomuus (englanniksi outbreeding depression) on tiettyssä mielessä sisäsiitosheikkouden vastavoima. Geneettinen yhteensopimattomuus tarkoittaa kahden erillisen populaation risteytysten heikompaa kelpoisuutta erityisesti kasvun ja lisääntymisen suhteen (Frankham ym. 2010). Sitä on havaittu erityisesti toisistaan hyvin erillään olevien populaatioiden välillä ja sitä pidetäänkin tietynlaisena

lajiutumisen esiasteena (Lynch 1991). Geneettistä yhteensopimattomuutta aiheuttavat päämekanismit ovat paikallinen sopeutuminen ja sisäsyntyinen yhteissopeutuminen (englanniksi intrinsic coadaptation) (Fischer & Matthies 1997). Paikallisessa sopeutumisessa kasvit ovat sopeutuneet alueensa abioottisiin ja bioottisiin olosuhteisiin geeniensä osalta ja niiden jälkeläiset eivät pärjää uudella alueella yhtä hyvin kuin kyseiselle alueelle sopeutuneet yksilöt. Sisäsyntyinen yhteissopeutuminen puolestaan on geenien sopeutumista eliön sisällä geneettiseen ympäristöönsä ja uusien alleeliyhdistelmien yhteensopimattomuutta tähän geneettiseen ympäristöön, kun kaksi geneettisesti yhteensopimatonta eliötä pyrkii lisääntymään. Geneettistä yhteensopimattomuutta ei ole havaittu, varsinkaan kasvitieteessä, yhtä usein kuin sisäsiitosheikkoutta (Lynch 1991; Frankham ym. 2010). Toisaalta sitä ei ole myöskään tutkittu yhtä paljon kuin sisäsiitosheikkoutta, vaan sen tutkiminen on keskittynyt tilanteisiin, joissa pohditaan pienten, sukupuuton partaalla olevien, populaatioiden elvyttämistä ristisiittämällä populaatioita (Fischer & Matthies 1997; Frankham ym. 2010).

Saman lajin yksilöt voivat kärsiä samanaikaisesti sisäsiitosheikkoudesta ja geneettisestä yhteensopimattomuudesta (Lynch 1991). Esimerkiksi Fisherin ja Matthiesin artikkeli (1997) selvittää ripsikatkeroa (*Gentranella germanica*) koskevaa tutkimusta, jossa sillä havaittiin sekä sisäsiitosheikkoutta että geneettistä yhteensopimattomuutta. Samanlaisia tuloksia löysivät Leimu tutkimusryhmineen käenkukalla (*Lychnis flos-cuculi*) tehdyssä kasvihuonekokeessa (Leimu ym. 2008).

### 1.3. Kasvin sisä- ja sukusiittoisuuden määrittely

Sitä, missä määrin erilaisia alleeliyhdistelmiä populaatiossa esiintyy, eli mikä on populaation yksilöiden heterotsygotia-aste, selittää vuonna 1908 julkaistu Hardy-Weinbergin laki, saman nimisiltä tutkijoilta. Lain mukaan silloin, kun samaa geeniä koodaa kaksi eri alleelia, voidaan populaatioissa syntyvien alleeliparien yhdistelmämahdollisuuksien frekvenssit laskea seuraavalla kaavalla:  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ , jossa  $p$  = alleeli 1:n frekvenssi ja  $q$  = alleeli 2:n frekvenssi. Kun alleelivaihtoehtoja on enemmän kuin kaksi, voidaan frekvenssit laskea neliöstä  $(p_1 + \dots + p_n)^2 = 1$ , jossa  $p_1$  on alleeli 1:n frekvenssi,  $p_2$  on alleeli 2:n frekvenssi jne. Eli kun tietyn alleelin frekvenssi populaatiossa on 0,3–0,7, tasapainolakia noudattavassa populaatiossa heterotsygootteja on enemmän kuin homotsygootteja.

Futuyma (2005) mukaan Hardy-Weinbergin laki perustuu kuitenkin oletuksiin populaation koosta ja lisääntymistavasta. Lisääntymisen tulee olla satunnaista, eli pölytys tai lisääntyvien kasvien genetiikka ei suosi mitenkään tiettyjen sukusolujen yhdistymistä ja kaikilla yksilöillä on oltava yhtäläinen todennäköisyys selviytyä ja lisääntyä. Populaatiokoon tulee olla niin suuri, että se voidaan käsittää äärettömän kokoisena. Eli jos populaation heterotsygotia-aste ei noudata tasapainolakia, ja homotsygootteja on enemmän kuin heterotsygootteja, on todennäköistä, että populaatio on hyvin pieni, suku- tai itsesiittoinen tai molempia. Jain ja Marshall osoittivat vuonna 1967 julkaisemassaan tutkimuksessa sisäsiitteisestä villikaurasta (*Avena fatuata*) sisäsiitoksen vaikuttavan heterotsygotia-asteeseen siten, että sisäsiitteisellä kasvilla homotsygotia on paljon Hardy-Weinbergin lain laissa oletettua yleisempää ja heterotsygotia harvinaisempaa. Myöskin letaalialleelit, eli alleelit, jotka homotsygootteina aiheuttavat yksilön kuoleman, aiheuttavat vinoumaa tasapainolain oletuksiin ja tällöin heterotsygootit ovat kaavan asettamaa oletusta yleisempiä (Futuyma 2005 s.192–201).

#### **1.4. Geneettisen variaation merkityksen tutkimus**

Tutkimuksissa kasvin kelpoisuuden määrittäjinä ovat yleensä kasvin jälkeläisten genotyypit, jälkeläisten itäminen, selviytyminen ja lisääntyminen. Lisäksi kasviyksilön siemen- tai kukkamäärää voidaan käyttää sen lisääntymispotentialin ja näin myös sen kelpoisuuden määrittäjinä. Erb (2018) määritteli, että funktionaalisessa mielessä kasveilla puolustukset ovat tekijöitä, jotka vähentävät kasvinsyöjien vaikutusta kasvin lisääntymiseen. Kasvin puolustusta mitataan usein kasvinsyöjien yksilöiden kasvulla, selviytymisellä ja syömispreferensseillä sekä kasvin kokemilla vaurioilla, kasvin kasvulla ja biomassalla (Erb 2018).

Kasvien genetiikkaan keskittyneissä kokeissa on perinteisesti tutkittu joko vaikutusta kasvin kokemaan kasvinsyöntiin tai lisääntymiseen (Keller & Waller 2002; Johnson ym. 2015). Lisääntymisjärjestelmät ja puolustus kasvinsyöjiä vastaan eivät kuitenkaan välttämättä kehity toisistaan riippumattomasti (Strauss & Whittall 2006). Kukkien ominaisuudet houkuttavat pölyttäjien lisäksi kasvinsyöjiä ja geenit, jotka kontrolloivat kukkien ominaisuuksia, voivat pleiotrooppisesti vaikuttaa koko kasvin puolustukseen (Strauss & Whittall 2006). Sisäsiitos lisää koko kasvin homotsygotiaa, mikä vaikuttaa lisääntymiseen liittyvien geenien lisäksi puolustusta koodaaviin geeneihin. Kasvinsyönti voi suurentaa sisäsiitosheikkouden vaikutusta kasvien kelpoisuuteen. Näin tutkimukset



lisääntymisestä ja puolustuksesta yhdessä tuottavat uutta näkemystä eläin – kasvi interaktioiden ekologiaan ja evoluutioon (Johnson ym. 2015).

Johnsonin ym. (2015) mukaan kasvinsyönnin rooli kasvien lisääntymistavoissa voi olla kahdenlainen. Ensinnäkin erilaiset kasvinsyöntivahingot sisäsiitteisillä ja ristisiitteisillä kasveilla voivat vaikuttaa kasvin sisäsiitoskustannuksiin kasvattavasti ja näin aiheuttaa kasvinsyöjävaikutteista sisäsiitosheikkoutta. Toisaalta kasvinsyöjien aiheuttamat muutokset kasvin kukilla voivat vähentää pölyttäjien määrää kasvin kukilla, jolloin sisäsiitos on tehokkaampi tapa lisääntyä. Kasvin elinkaaren eri vaiheissa kasvinsyöjillä voi olla myös erilaiset valintapaineet kasville (Watson 1995). Leimu ym. (2008) tuo esiin myös mahdollisuuden siitä, että kasvinsyönnin aiheuttama stressi kasville peittää sisäsiitosheikkouden vaikutuksen kasvin lisääntymiselle. Esimerkiksi käenkukalla geneettinen variaatio vaikuttaa kasvien puolustukseen generalistikasvinsyöjää kohtaan, mutta sisäsiitosheikkoutta lisääntymisen suhteen näkyi vain kontrollikasveilla, joilla ei ollut kasvinsyöntiä. Ristisiitteisillä käenkukilla oli sisäsiittoisia käenkukkia vahvempi puolustus kotiloita vastaan. Kun käenkukalla ei ollut kasvinsyöntiä, sen kelpoisuus kasvoi sen heterotsygotia-asteen kasvaessa.

Kasvin puolustus ja siihen liittyvät geneettiset tekijät eivät rajoitu vain toiselle trofiatasolle, kasvinsyöjiin. Kasvit voivat reagoida niille munittuihin muniin muuttamalla lehtikemiaansa niin, että ne houkuttelevat kasvinsyöjien loisia tai petoja paikalle tai steriloiivat lehdille munittuja munia (Hilker & Meiners 2006). Sisäsiitosheikkous voi vaikuttaa näiden kemiallisten yhdisteiden vapautumiseen (Kariyat ym. 2012). Tämän vuoksi, kuten esim. Kalske (2014a) esittää, geneettisen variaation vaikutusta tulisi myös tarkastella kolmannella trofiatasolla, eli kasvin kasvinsyöjien luontaisten vihollisten suhteen. Esimerkiksi karoliinankoisolla (*Solanum carolinense*) ristisiittoiset kasvit houkuttelevat enemmän kasvinsyöjiensä petoja kuin sisäsiittoiset kasvit (Kariyat ym. 2012).

## 1.5. Tutkimus käärmeenpistoyrtillä

Käärmeenpistoyrttiä (*Vincetoxicum hirundinaria*, Apocynaceae) esiintyy Suomessa pääosin lounaisessa saaristossa ja sen populaatiot ovat pääosin melko pieniä. Kuitenkin populaatioiden välillä on geenivirtaa. Populaatiot eivät siis ole geneettisesti kovin eristyneitä toisistaan (von Numers & van der Maarel 1998; Leimu & Mutikainen 2005). Geenivirran määrää selittävät sekä kasvien siementen leviämispotentiaali, ne voivat levittäytyä tuulen mukana ja selvitä itämiskykyisinä murtovedessä kaksi viikkoa

(Leimu 2004), että suurten pölyttäjien potentiaaliset kulkumatkat saarien välillä. Muola ym. (2021) toteavat, että vuonna 2008 luonnollista itsesiitosta löydettiin vain parilla yksilöllä Suomen saariston tutkituista kasveista. Sukusiitoksen määrä kasveilla vaihteli saaresta riippuen 1,1 %:n ja 6,1 %:n välillä. Tutkimuksessa vahvistetaan myös jo aiemmin todettu geenivirta populaatioiden välillä. Itsesiitosta ja sukusiitosta mahdollisesti kuitenkin tapahtuu uusissa populaatioissa, joita maankohoamisen vuoksi voi ilmestyä 76 uudelle saarelle seuraavan 80–90 vuoden aikana, mutta vakiintuneissa populaatioissa itsesiitosta ei juuri ole (Muola ym. 2021). Sitä, miksi Leimu ja Mutikainen (2005) löysivät enemmän sisäsiitosta kuin Muola ym. (2021), selittää todennäköisemmin se, että siinä missä Leimu ja Mutikainen genotyypasivat saarten aikuisten kasvien lehtiä, uudempi tutkimus käytti saarten kasvien siemenistä kasvatettuja taimia. Leimun ja Mutikaisen (2005) genotyypaus siis kertoo kasvien lisääntymisestä kymmeniä vuosia sitten ja niiden selviämisestä sukukypsään aikuisuuteen, kun Muola ym. (2021) tutkimus taas kattaa paremmin nykytilanteen.

Paikallisen sopeutumisen määrä vaihtelee käärmeenpistoyrttipopulaatioiden välillä. Lammasluodon kasvipopulaatio, johon tämä tutkimus perustuu, on kuitenkin paikallisesti sopeutunut ympäristöönsä ja saaren kasvinsyöjiin: harmosuomuyökkösiin (*Abrostola asclepiadis*) ja tanhukärpäsiin (*Euphranta connexa*) (Kalske ym. 2012). Myös saaren sisällä on viitteitä paikallisesta sopeutumisesta metsä- ja kallio-osapopulaatioiden välillä (Martin 2020).

Geneettisen variaation merkitystä käärmeenpistoyrtin puolustukseen on tutkittu aikaisemmin (Muola ym. 2010) käyttämällä 23 kasviyksilöä, jotka oli jaettu useaan osaan. Näin oli saatu aikaan kasvikooneja tutkimusta varten. Kyseisessä tutkimuksessa todettiin, että kukintojen määrä korreloi vahvasti kukan siemenmäärän kanssa, mikä vahvistaa käsitystä siitä, että kukintojen määrä on hyvä lisääntymisen määrite käärmeenpistoyrtillä. Kyseisessä tutkimuksessa kasvin harmosuomyökkösen aiheuttamat kasvinsyöntivauriot eivät olleet riippuvaisia kasvin genotyypistä.

Tämän tutkielman kannalta merkittävimmät käärmeenpistoyrtin sisäsiitosta käsittelevät artikkelit pohjautuvat tutkimuksiin käsin hedelmöitetyistä kasveista. Näin on saatu tuotettua sisäsiittoisia ja ristisiittoisia yksilöitä. Näistä tutkimuksista Muolan ym. (2011) tutkimus keskittyy sisäsiittoisten ja ristisiittoisten siementen itämiseen, kasvuun ja nuorien yksilöiden kokemaan harmosuomuyökkösen aiheuttamaan kasvinsyöntiin. Kalskeen ym. (2014a; 2014b) tutkimukset puolestaan keskittyvät harmosuomuyökkösten munintapreferenssiin sisäsiittoisten ja ristisiittoisten kasvien kesken ja siihen, miten yökkösten luontaiset viholliset tuhoavat munia kasvin siitostavasta riippuen. Näissä edellä mainituissa tutkimuksissa löydettiin viitteitä

sisäsiitosheikkoudesta, joka vaihteli kasvin elinkaaren mukaan. Sisäsiitosheikkoutta ilmeni nuorilla kasveilla, mutta ei vanhoilla. Sisäsiittoiset kasvit olivat ristisiittoisia heikommin itäviä, pienempiä ja niiden lehtimassasta suurempi osa syötiin harmosuomyökkösten toimesta. Vaikka sisäsiittoisia kasveja syötiin enemmän, sisäsiitosheikkoutta kasvinsyönnistä selviytymisen suhteen ei ilmennyt. Yökkösten todettiin suosivan muninnassaan ristisiittoisia kasveja, vaikka ne kasvoivatkin suuremmiksi sisäsiittoisilla kasveilla. Kasvin siitostapa ei kuitenkaan vaikuttanut siihen, miten paljon kasvilta tuhoutui munia loisinnan, steriiliyden tai katoamisen, eli syödyksi tulemisen, vuoksi. Tämä viittaa siihen, että kasvien geneettinen variaatio ei vaikuta siihen, miten ne houkuttelevat kasvinsyöjiensä petoja lehtikemiallisesti paikalle.

## 2. Tutkimuskysymykset

Tämä tutkielma on jatkumoa aiempiin käärmeenpistoyrtin geneettisen variaation vaikutuksia käsitteleviin tutkimuksiin. Erona aiempiin tutkimuksiin (Muola ym. 2010; Muola ym. 2011; Kalske ym. 2014a) on se, että tämän tutkielman kokeissa tarkasteltiin yhden populaation luontaisen geneettisen vaihtelun vaikutusta kasvin lisääntymiseen ja puolustukseen. Tutkimuskasvit on genotyypattu 15 lokuksen suhteen ja genotyypin pohjalta on kullekin kasville laskettu heterotsygotia-aste ja näin on päästy tarkastelemaan luonnollista geneettistä vaihtelua populaation sisällä. Toisena erona on se, että kokeessa on käytetty aikuisia lisääntymiskykyisiä kasviyksilöitä nuorten sijasta. Aiemmissä tutkimuksissa kasvien geneettiseen variaatioon on vaikutettu siittämällä kasvit käsipölytteisesti tai vaihtoehtoisesti geneettisen variaation vaikutusta on tarkasteltu usean saman kasvin kloonin avulla. Kummassakaan tapauksessa kasvin geneettinen variaatio ei ole ollut tiedossa alleelifrekvenssitasolla.

Jo aiemmin on ollut vahva oletus siitä, että Lammasluodon kasvipopulaatio saa geenivirtaa muilta läheisiltä populaatioilta (von Numers & van der Maarel 1998; Leimu & Mutikainen 2005), ja myös saaren ja populaation koon vuoksi on oletettu, että kasvit eivät olisi erityisen sisä- tai sukusiittoisia. Tässä tutkielmassa pyritään selvittämään matemaattisesti genotyypausdatan pohjalta, ovatko Lammasluodon käärmeenpistoyritit todella vapaasti lisääntyviä vai sisä- tai sukusiittoisia kasveja.

Tieto heterotsygotia-asteesta antaa myös mahdollisuuden tunnistaa kasvit, joiden toinen emokasvi on mahdollisesti toisesta populaatiosta tai jotka ovat kulkeutuneet siemenenä Lammasluodolle muualta. Näillä kasveilla olisi erityisen suuri heterotsygotia-aste ja/tai alleelimuotoja, joita ei juuri kohtaa muissa genotyypatuissa

kasveissa. Tämä mahdollistaa myös mahdollisen geneettisen yhteensopimattomuuden tarkastelun suhteessa kasvin lisääntymiseen ja puolustukseen paremmin kuin aiemmissa tutkimuksissa, joissa poikkeavien yksilöiden tunnistaminen oli hankalaa. Käärmeenpistoyrtille tehdyissä aiemmissa sisäsiitoskokeissa on käytetty vain yhden populaation kasveja sisä- ja ristisiitosyksilöiden tuottamista varten, jolloin geneettistä yhteensopimattomuutta ei edes pitäisi löytyä, ellei kasvi lisääntynyt pääosin sisäsiitteisesti, mitä se ei käärmeenpistoyrtin tapauksessa tee (Leimu & Muola 2014; Leimu 2004).

Tämän tutkielman tutkimuskysymykset ovat:

1. Onko käärmeenpistoyrtin lisääntyminen Lammasluodolla sisä- tai sukusiittoa vai satunnaista?
2. Vaikuttaako käärmeenpistoyrtin geneettisen muuntelun määrä sen lisääntymismenestykseen?
3. Vaikuttaako käärmeenpistoyrtin geneettisen muuntelun määrä sen puolustukseen suhteessa:
  - a. kasvin kokemaan kasvinsyönteihin?
  - b. munien tuhoutumiseen kasvilta?

Aiempiin tutkimuksiin ja omiin henkilökohtaisiin huomioihini käärmeenpistoyrtistä ja sen kasvinsyöjistä pohjautuen hypoteesini tutkimuskysymyksiin liittyen ovat:

1. Lammasluodon kasvien lisääntymisen tulisi olla satunnaista.
2. Yksilöiden geneettisen muuntelun määrä, eli variaatio, vaikuttaa kasvin lisääntymiseen. Kasvit, joiden heterotsygotia-aste on matala, lisääntyvät heikommin verrattuna kasveihin, joiden heterotsygotia-aste on korkea.
3. Yksilöiden geneettinen variaatio saattaa vaikuttaa kasvin puolustukseen kasvinsyönnin määrän osalta, mutta ei välttämättä harmosuomuyökkösten munien tuhoutumisen osalta. Kasvit, joiden heterotsygotia-aste on matala kärsivät enemmän kasvinsyöntivaurioita verrattuna kasveihin, joiden heterotsygotia-aste on korkea.

### 3. Menetelmät

#### 3.1 Tutkimuslajit

Käärmeenpistoirtti (*Vincetoxicum hirundinaria*) (Kuva 1) kuuluu oleanterikasvien heimoon (Apocynaceae). Se on ruohovartinen monivuotinen kasvi. Kasvi on myrkyllinen, mikä johtuu kasvin sisältämistä alkaloidista ja fenolisista yhdisteistä. Kasvi kasvaa yleisenä Euraasian kalkkipitoisilla mailla. Suomessa sitä esiintyy lounaisessa saaristossa yli 700 saarella ja muutama populaatio löytyy myös etelärannikolta. Käärmeenpistoirtti on hyvin pitkäikäinen. Yksilöt voivat elää monta kymmentä vuotta ja niistä tulee sukukypsiä vasta usean vuoden ikäisinä. (Leimu & Muola 2014 s.119)



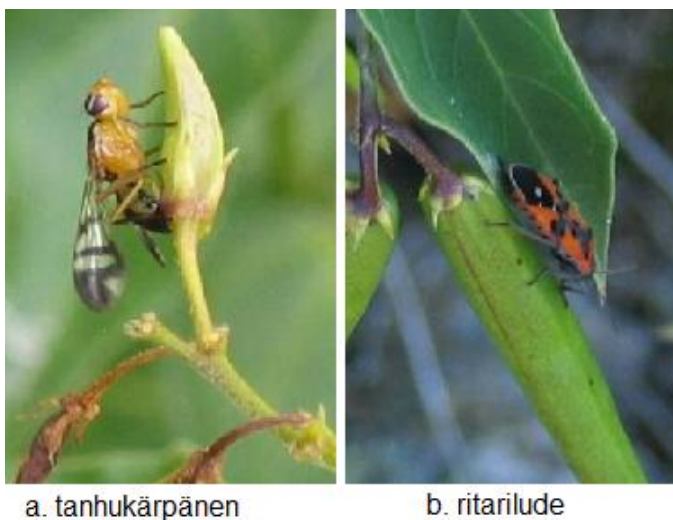
Kuva 1. Käärmeenpistoirtin kukinto

Kuva: Aino Kalske

Käärmeenpistoirtti kukkii kesä-heinäkuussa ja on hyönteispölytteinen (Leimu & Muola 2014 s.119). Kukkiensa siitepöly sijaitsee pölymyhkyissä, ja niillä on viisi emiputkea ja kaksi sikiäintä. Emiputkista kolme vie yhteen sikiäimeen ja kaksi toiseen (Monteiro & Demarco 2017). Tutkimusta nimenomaan käärmeenpistoirtin pölyttäjästä ei ole, mutta yleisesti *vincae*-tribusta, eli sukuryhmää, johon käärmeenpistoirtit kuuluvat, pölyttävät lähinnä mehiläiset ja generalistihyönteiset (Ollerton ym. 2019). Myös ritariluteilla on havaittu raajoissa käärmeenpistoirtin pölymyhkyjä muiden käärmeenpistoirttiä tutkivien kokeiden aikana (Muola, suullinen tiedoksianto), mutta julkaistua tutkimusta siitä, kuinka paljon ritariluteet varsinaisesti pölyttävät kasveja, ei ole. Luonnossa käärmeenpistoirtti on pääpainotteisesti ristipölytteinen, mutta Suomessa, erityisesti lounaisemmassa saaristossa, kasvit kykenevät myös itse-pölytykseen (Leimu 2004).

Alle 10 % kasvin kukista tuottaa siemenpalon, ja kasvin kukkien määrä tai pölyttäjien poistama pölymyhkyjen määrä ei selitä palkojen syntymistä kasvilla (Leimu & Syrjänen 2002). Kasvin koon on todettu korreloivan positiivisesti emokasvin lisääntymismenestyksen kanssa, kun kasvipopulaatio on suuri (Leimu & Syrjänen 2002).

Myrkyllisyyden takia käärmeenpistoyrttiä käyttää ravinnokseen vain muutama laji, joista Suomessa tavataan yökkösten heimoon kuuluva harmosuomuyökkönen (*Abrostola asclepiadis*, Noctuidae), tanhukärpästen (Tephritidae) heimoon kuuluva, suomenkielistä nimeä vailla oleva, *Euphranta connexa* (Kuva 2a) ja varjoluteisiin kuuluva ritarilude (*Lygaeus equestris*, Lygaeidae) (Kuva 2b) (Leimu & Muola 2014 s.119). Tanhukärpäset ja ritariluteet käyttävät ravinnokseen käärmeenpistoyrtin paloissa kasvavia siemeniä. Harmosuomuyökkönen on Suomessa ainut hyönteinen, joka käyttää ravintonaan käärmeenpistoyrtin lehtiä. Se munii munansa käärmeenpistoyrtin lehtien alapinnoille ja sen toukat syövät lehtiä koteloitumiseen asti.



Kuva 2. Käärmeenpistoyrtin kasvinsyöjiä sen paloilla

Kuvat: Turun yliopiston KÄMY-projekti

Föraren ja Enqvistin (1996) mukaan harmosuomuyökköset (Kuva 3) yleensä viihtyvät viileämissä metsiköissä, mutta munivat myös avoimella kalliolla oleville kasveille. Osasy metsikössä viihtymiseen voi olla niiden suojaisuus tuulelta, jolloin yökkösten on helpompi lentää. Aurinkoisilla kalliolla sijaitsevista kasveista munat löytyvät usein kasvin varjoisimmasta osasta. Yökköset myös suosivat pienempikokoisia kasveja muninnassaan. Niiden munat ovat helmiäisen värisiä ja useimmiten löytyvät lehtien alapinnalta. Yhdessä rykelmässä niitä on yleensä 1–20. Munat kuoriutuvat keskimäärin 10 päivän kuluessa muninnasta (Muola 2010). Harmosuomuyökkösen luontaisia

vihollisia ovat munissa loisivat pistiäissuvun (*Telenomus* sp.) ja munakiilukaissuvun (*Trichogamma* sp.) hyönteiset, munia syövät muurahaiset (*Formicidae*), hämähäkit (*Araneae*) ja verkkosiipisten toukat (*Neuroptera*) (Kalske ym. 2014a).

Harmosuomuyökkösen aiheuttamat lehtivauriot heikentävät huomattavasti käärmeenpistoyrttien kelpoisuutta (Leimu & Lehtilä 2006). Muolan (2010) mukaan Turun saaristossa harmosuomuyökkösten aiheuttamat lehtivauriomäärät käärmeenpistoyrteillä vaihtelevat muutaman prosentin ja jopa 90 prosentin välillä vuodesta ja populaatiosta riippuen. Tosin vain muutaman prosentin vauriot ovat paljon tyypillisempiä kuin lähes koko lehtimassan katoamiset. Lähes totaalinen lehtien syönti on yleisempää nuorilla kasveilla kuin aikuisilla, sukukypsillä, yksilöillä.

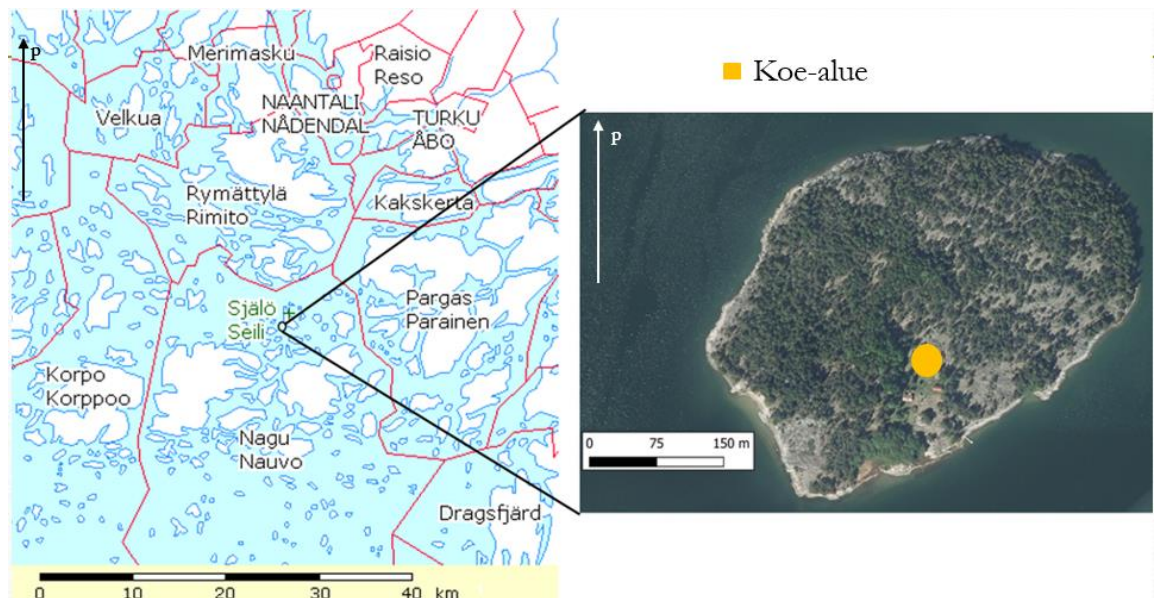


Kuva 3. Harmosuomuyökkösen elinkaari

Kuvat: Aino Kalske ja Liisa Laukkanen

### 3.2. Koealue

Toteutin kokeen Seilin saaren lähetyvillä Lammasluodolla (Kuva 4). Lammasluodolla sijaitsee suuri käärmeenpistoyrtin luontainen populaatio, jonka koko on yli 5200 kasviyksilöä (Muola ym. 2021) ja joka on levittäytynyt laajasti saaren eteläpuoliselle alueelle. Kasvin luontainen populaatio on saarella jakautunut kallio-osapopulaatioihin ja metsäosapopulaatioihin, joiden välillä on viitteitä paikallisesta sopeutumisesta (Martin 2020). Koealue perustettiin suurten populaatioiden välissä sijaitsevalle niitylle. Niitty oli valoisa ja ympäröivien metsien suojaamana melko vähätuulinen.

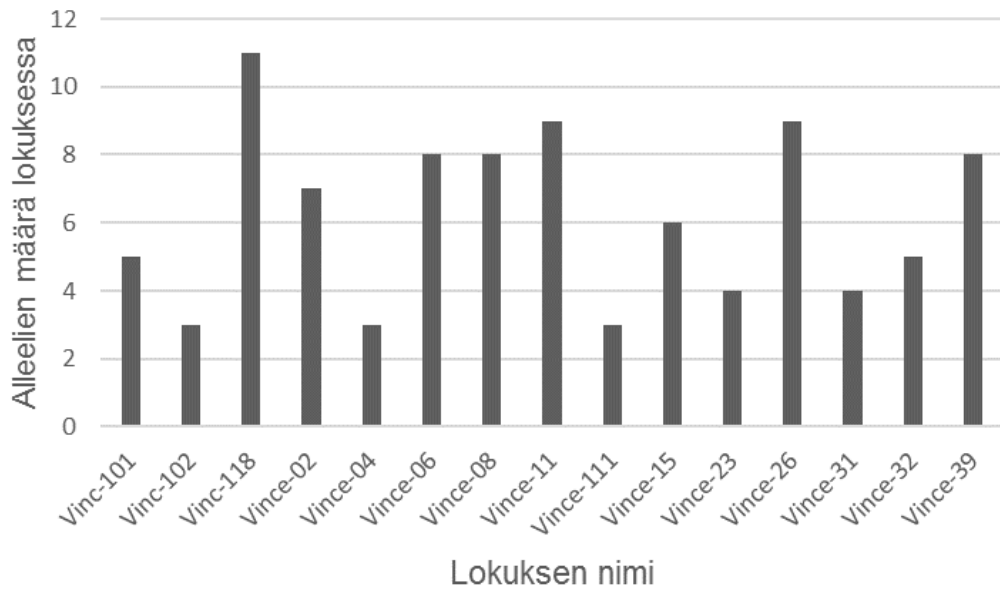


Kuva 4. Lammasluodon saari (60.23° N 21.94° E) ja koealue  
cc. mml 2018

### 3.3. Koekasvit ja koeasetelma

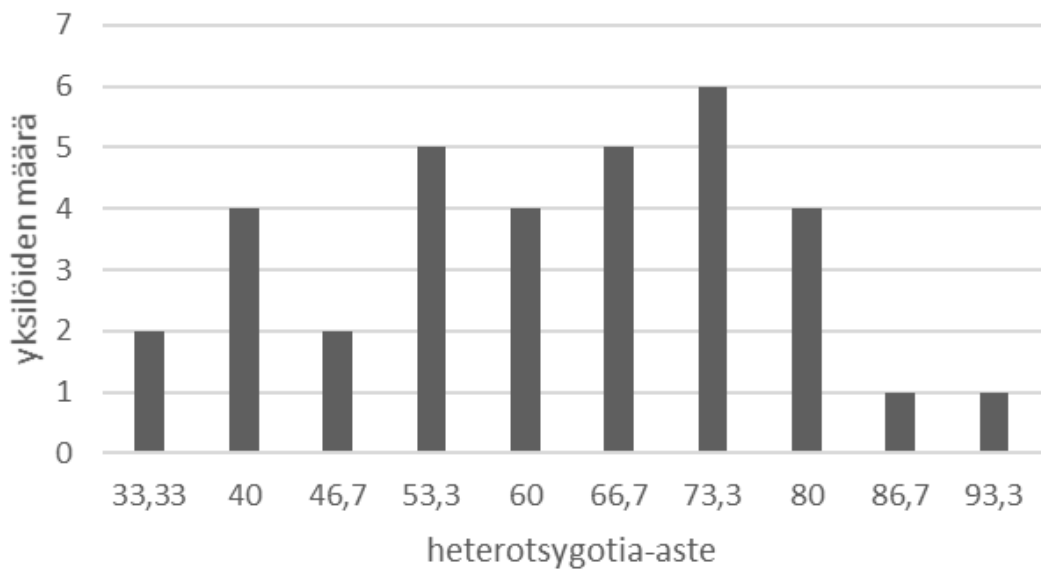
Tutkielman kohteena olevan kokeen kasvit ovat peräisin Lammasluodolta vuonna 2013 satunnaisesti valitusta ja maasta kaivetusta 80 kasvista. Kasveja käytettiin käärmeenpistoyrtin mikrosatelliitti genotyypin menetelmien kehittelyyn, jonka Muola ym. (2021) teki yhteistyössä Turun yliopiston evoluutiobiologian sovelluskeskuksen ja ranskalaisen Genoscreenin kanssa. Kasvit genotyypattiin mikrosatelliittimarkkereiden avulla 15 lokuksen suhteen. Alleelien määrä vaihteli eri lokuksissa 3 ja 11 alleelin välillä (Kuva 5) ja keskiarvo alleelimäärille eri lokuksissa oli 6,2. Genotyypaus tehtiin käyttämällä kasvien vuoden 2013 lehtiä. Ruukutettuja ylös kaivettuja kasveja säilytettiin Ruissalon kasvitieteellisessä puutarhassa talven yli. Genotyypausdatan pohjalta näille kasveille laskettiin heterotsygotia-asteet (eli kuinka suuri osa kasvin lokuksista on heterotsygoottisia), jotka vaihtelivat 33 % ja 97 % välillä.





Kuva 5. Alleelien määrät eri käärmeenpistoyrtin lokuksissa

Valitsin kokeeseen 34 kasviyksilöä aiemmin mainituista 80 genotyypatuista yksilöistä. Yksilöitä valitsin satunnaisesti lähes tasaisen määrän kustakin heterotsygotia-asteesta, mutta osassa heterotsygotia-asteita ei tosin ollut enempää kuin 1–2 kasviyksilöä (Kuva 6).



Kuva 6. Koekasvien määrät ja heterotsygotia-asteet

Huhtikuussa 2014 halkaisin kasvit juurakon perusteella kahteen suunnilleen samankokoiseen palaan ja istutin ne uusiin ruukkuihin, joiden tilavuus oli 3,5 litraa (Kuva 7). Näin sain aikaan koe- ja kontrollikasvit, jotka ovat keskenään geneettisesti

identtisiä. Suoritin halkaisun ennen kuin kasvin monivuotinen juurakko oli ehtinyt kasvattaa kesän versoja, jotta vaurio ja stressi olisivat kasville mahdollisimman pieniä ja niillä olisi mahdollisimman kauan aikaa toipua halkaisusta. Halkaistut kasvit eivät siis kasvaessaan olleet täysin samankokoisia.



Kuva 7. Käärmeenpistoyrttien halkaisu ja istutus uusiin ruukkuihin Lammasluodolla

Kuva: Alba Martin

Kesäkuun 2014 toisella viikolla mittasin kaikista kasveista koon määritteitä (versojen määrä, pisimmän verson pituus, lehtien määrä pisimmässä versossa). Lisääntymisen määritteitä (kukallisten versojen määrä, kukintojen määrä suurimmassa kukallisessa versossa ja vielä kukkien määrä suurimmassa kukinnossa) mittasin kesäkuun kolmannella viikolla.

Kesäkuussa, mittausten jälkeen, laitoin kaikki kasvit 1–4 kasvin ryhmissä satunnaisesti lisääntymishäkkeihin (Kuva 8). Koe- ja kontrollikasvit pidettiin eri häkeissä. Myöhemmin koekasveille lisättiin hamosuomuyökkösiä lisääntymään, jotta luontaisen hamosuomuyökkösen populaatiokannan vaihtelusta riippumatta voitaisiin varmistaa, että ainakin osalla kasveista on munia kasvin puolustuksen mittauksen mahdollistamiseksi. Lisääntymishäkki oli pleksimuovista itse tehty, metrin korkuinen ja läpimitaltaan hieman yli metrin levyinen, sylinteri, jonka pohja ja päällys peitettiin kuminauhan avulla kangasharsolla. Näin häkkeihin ei päässyt kokeen alussa hyönteisiä. Häkit olivat varjoisessa metsikössä alle 50 metrin päässä lopullisesta

koealueniitystä. Lisäntymishäkkien läheisyydessä ei ollut luontaisia käärmepistoyrttejä.

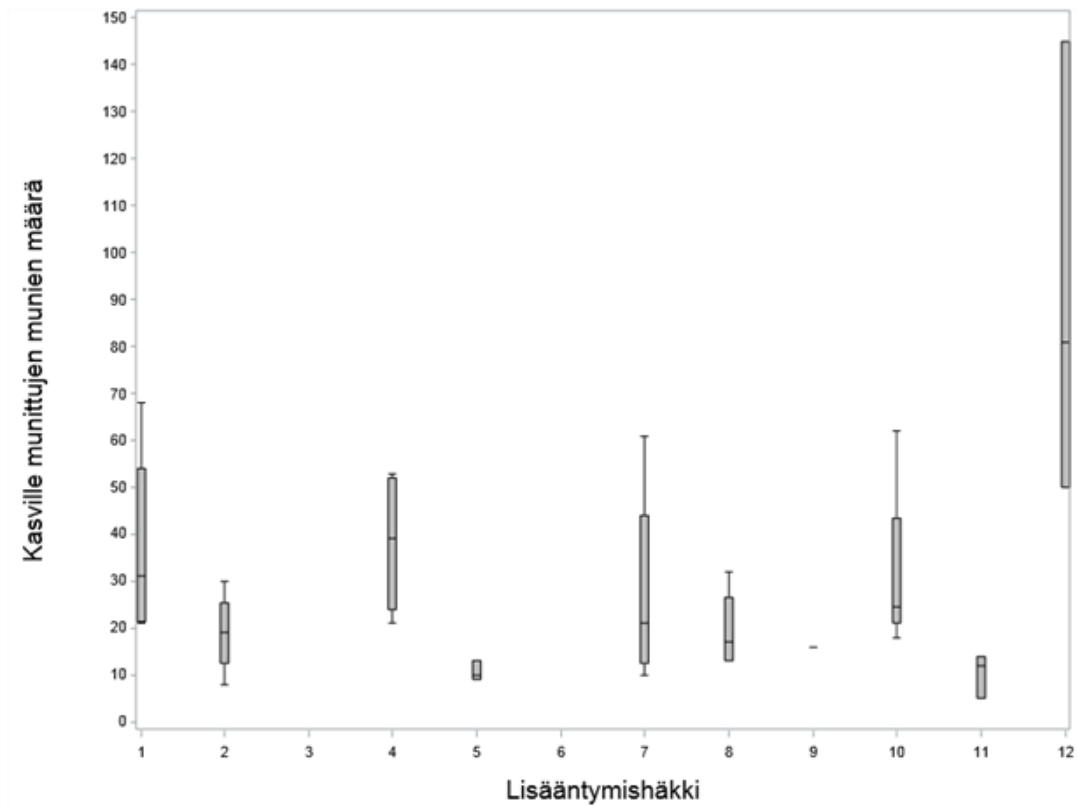


Kuva 8. Kokeen lisäntymishäkit toisessa käärmepistoyrttiä tutkivassa kokeessa

Kuva: Anne Muola

Koekasveille lisäsin munintaa niin, että kun olin jakanut ne satunnaisesti 10 lisäntymishäkkiin, laitoin kuhunkin häkkiin vastakuoriutuneita hamosuomuyökkösiä munimaan kasvin lehdille.

Hamosuomuyökköset oli kerätty munina vuonna 2013 Lammassuodolta. Vuonna 2013 ne olivat olleet mukana syöttökokeessa, jossa toukille syötettiin eri saarten populaatioista peräisin olevia käärmepistoyrtin lehtiä. Talven aikana niille oli tehty sukupuolimääritykset kotelon perusteella. Laitoin kuhunkin lisäntymishäkkiin 2-4 koirasta ja 3-4 naarasta kesäkuun viimeisellä viikolla, sitä mukaa kun kotelot kuoriutuivat. Kun hamosuomuyökköset olivat lisääntyneet ja munineet kasvien lehtien alapinnalle, rapsutin osasta kasveista munia pois sen verran, että kullekin kasville jäi n. 20–25 munaa. Munien poistolla pyrin tasaamaan eroja lisätyn muninnan kasvien välillä, sillä kuten kuvasta 9 voidaan nähdä, kussakin häkissä oli hyvin erilaisia munamääriä. Tämän jälkeen sekä lisätyn muninnan kasvit että kontrollikasvit siirrettiin niitylle heinäkuun toisen viikon aikana.



Kuva 9. Laatikkojana-kuvaaja munien määrien jakaumasta (mediaani) ja hajonnasta (ylä- ja alakvartiilit sekä minimiit ja maksimit) eri lisääntymishäkeissä (häkit 3 ja 6 olivat kontrollikasvihäkkejä)

Munien määriä sekä tuhoutuneiden munien määriä (loisitut munat muuttuvat mustiksi (Kuva 10), steriilit munat eivät koskaan kuoriudu ja niiden pinta pysyy ehjänä ja kadonneet munat ovat nimensä mukaan kadonneet kasvilta) seurasin lisätyn muninnan aikana häkeissä lähes päivittäin ja heinäkuun toisen viikon lopusta alkaen kerran viikossa elokuun ensimmäiselle viikolle asti. Kasvinsyönnin määrää tarkastelin elokuun alkupuoliskolla kahdesti, niin että tarkasteluväli oli viikon. Kasvinsyönnin määrän mittasin arvioimalla silmämääräisesti, kuinka suuri osa koko kasvin lehtimassasta oli syöty.



Kuva 10. Harnosuumuyökkösen loisittuja (musta) ja kuoriutuneita munia osittain syödyllä käärmeenpistoirtin lehdellä

Kuva: Liisa Laukkanen

Alkujaan oli tarkoitus mitata lisääntymismenestystä kunkin kasvin palkojen ja siementen määrän perusteella sekä mahdollisesti myös itämiskokeilla, mutta kaikista tutkimuskasveista vain yksi teki yhden palon. Tämän vuoksi ei voitu myöskään mitata tanhukärpästen tai ritariluteen aiheuttamaa vauriota siemeniin, joten tutkielmassa ja analyyseissa keskitytään harnosuumuyökkösen aiheuttamiin vaurioihin.

### 3.4. Tilastolliset analyysit

Kasvien mahdollista sukusiittoisuutta tutkin alkuperäisen 80 kasvin genotyypausdatan perusteella. Hardy-Weinbergin laki (Hardy 1908) antaa matemaattisen kaavan, jolla voi laskea odotukset kasvipopulaation alleelipariyhdistelmille, kun tiedetään kunkin alleelin frekvenssit populaatiossa. Tasapainolain odotukset pitävät paikkansa, kun kasvipopulaatio on suuri ja sen lisääntyminen ei ole rajoitettua. Suuret poikkeamat näistä odotuksista viittaavat joko sisä- tai sukusiitokseen, vahvaan geenivirtaan toisesta populaatiosta tai letaaliilleleihin. Lammasluodon käärmeenpistoyrttipopulaatio on melko suuri, yli 5200 kasvia, joten mahdolliset erot odotettujen ja todellisten alleelipariyhdistelmämaerien välillä voidaan katsoa johtuvan lisääntymistavasta, eli siitä, ovatko kasvit lisääntyneet sisäsiittoisesti, sukusiittoisesti tai satunnaisesti.

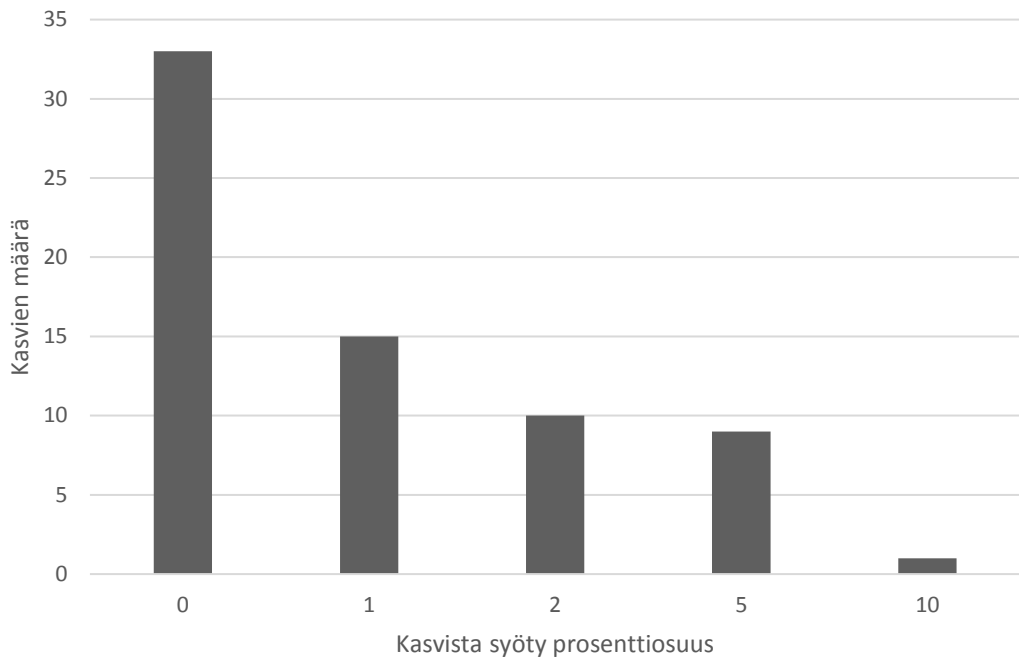
Valitsin neljä lokusta ja laskin Hardy-Weinbergin lain odotukset alleelipariyhdistelmien määrille, kunkin lokuksen eri geenien frekvenssien pohjalta. Vertasin tätä odotusta 80

genotyypatun kasvin todellisiin alleeliyhdistelmiin kunkin lokuksen osalta erillisen parittaisen t-testin avulla, sillä kaikki muuttujat olivat normaalisti jakautuneita. Tilastolliset testit tein SAS-ohjelmiston versiolla 9.4.

Eri tekijöiden selittävyttä kasvin lisääntymiseen, kasvin kokemaan kasvinsyöntiin, munien määrään kasveilla ja munien tuhoutumiseen kasvulla tarkastelin eri mallien avulla riippuen siitä, oliko selitettävä tekijä binäärimuuttuja, normaalisti jakautunut tai ei normaalisti jakautunut. Eniten tarkastelussa kiinnosti heterotsygotia-asteen merkitys selittävänä tekijänä ja sen interaktio muiden mahdollisten selittävien tekijöiden kanssa alustavissa analyyseissä. Jos heterotsygotia-asteella ei ollut tilastollisesti merkitsevää interaktiota muiden tekijöiden kanssa, yksinkertaistin selittävää mallia.

Kasvin lisääntymistä kuvaavaksi tekijäksi valitsin kasvin fertiilien versojen määrän, eli sen, kuinka paljon kullakin kasvulla oli kukkivia versoja. Fertiilien versojen määrä kertoo kasvin lisääntymispotentiaalista enemmän kuin kypsien palkojen tai siementen määrä, joka kertoisi onnistuneesta pölytyksestä. Yleisen lineaarisen mallin, MIXED-proseduurin, avulla tarkastelin sitä, vaikuttaako kasvien fertiilien versojen määrään kasvin koko (eli kaikkien versojen määrä), heterotsygotia-aste ja koko\*heterotsygotia-aste, eli koon ja heterotsygotia-asteen interaktio. kasvikkoonia käytettiin mallissa satunnaistekijänä. Kokeilin myös toista, muuten identtistä mallia, paitsi että siinä tarkastelin heterotsygotia-asteen potenssia kahteen pelkän heterotsygotian sijasta, mutta sen AIC-arvo (Akaike information criterion) oli suurempi kuin nykyisen mallin. AIC on matemaattinen malli, jonka avulla vertaillaan tilastollisia malleja ja niiden sopivuutta pohjadataan tarkasteluun. Mitä pienempi AIC-arvo, sitä paremmin malli ennustaa tulevia arvoja, eli sopii datan mallintamiseen. Tämän vuoksi käytin lopulta analyysissäni nykyistä koko, heterotsygotia-aste, ja koko\*heterotsygotia-astemallia.

Kasvin kokemaa kasvinsyöntiä tapahtui koko kokeessa hyvin vähän ja 33 kasvulla sitä ei ollut lainkaan (Kuva 11). Siksi päätin muuttaa kasvinsyönnin prosenttiarvon binäärimuuttujaksi eli 0:ksi, kun kasvinsyöntiä ei ollut lainkaan ja 1:ksi, kun kasvinsyönti oli vähintään 1 %, eli koko kasvin lehtimassasta oli syöty arviolta 1 prosentti. Kasvinsyönnin toteutumista tarkastelin yleistetyllä lineaarisella mallilla, GLIMMIX-proseduurilla, jossa selittäviksi muuttujiksi asetin kasvin versojen määrän, heterotsygotia-asteen, kokeeseen lisättyjen munien määrän ja sen, oliko kasviyksilö koekasvi vai kontrollikasvi. Kasviyksilöä käytettiin mallissa satunnaistekijänä.



Kuva 11. Kasvinsyönnin määrän jakautuminen kasvien kesken

Erilaisia munien tuhoutumisia (loisitut munat, steriilit munat ja kadonneet munat) kasvilla tarkastelin yleistetyllä lineaarisella mallilla, GENMOD-proseduurilla, sillä minkään tarkastelun kohteena olleen tuhoutumistavan arvojen jakauma ei ollut normaali. Tältä osin tarkastelin vain lisätyn muninnan kasveja, sillä luontaisia munia ei tullut kontrollikasveille eikä lisätyn muninnan kasveille lähes lainkaan. Selittävinä muuttujina kaikille tuhoutumistavoille käytettiin testissä heterotsygotia-astetta, kasvin kokoa (eli versojen määrä) ja munien määrää kasveilla silloin, kun ne siirrettiin lisääntymishäkistä kontrollikasvien luo niitylle.

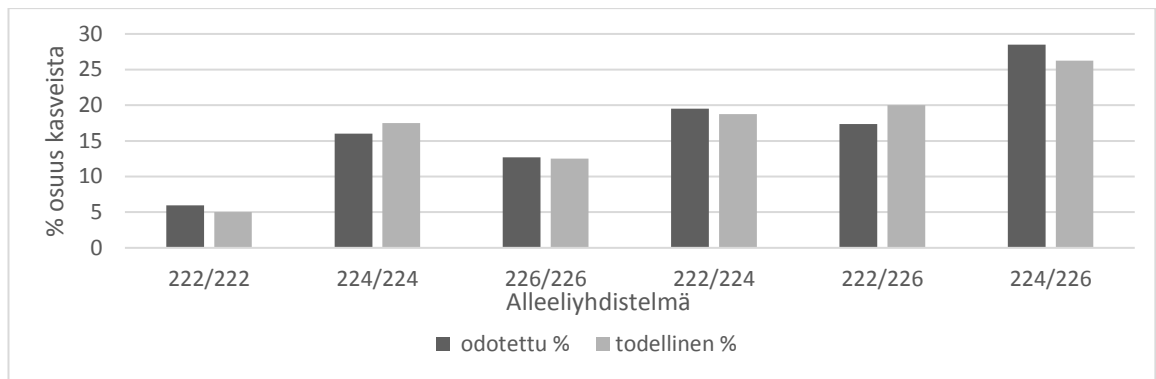
## 4. Tulokset

### 4.1 Käärmeenpistoyrtin lisääntymisen satunnaisuus

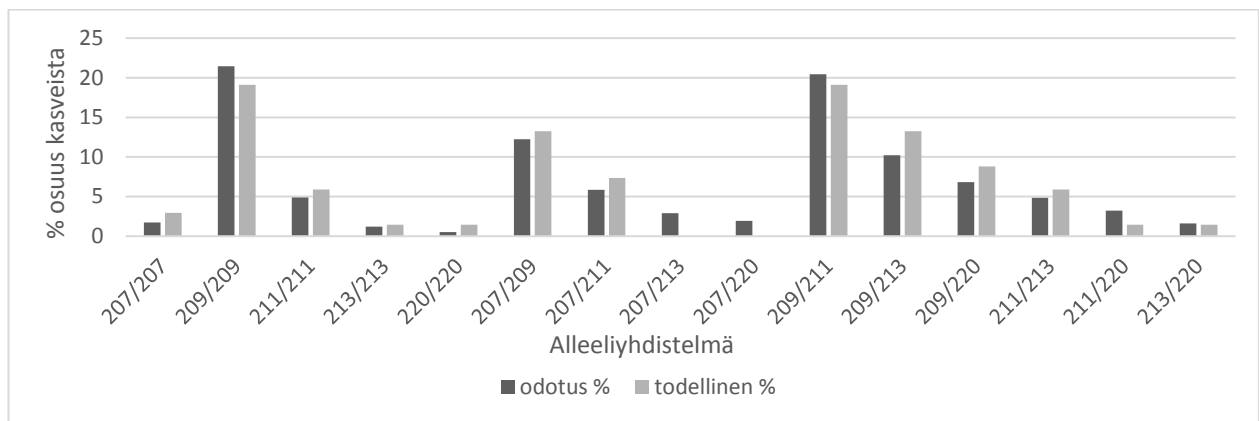
#### Lammasluodolla

Jokaisen tarkastelussa olleen lokuksen kohdalla odotus alleeliyhdistelmäfrekvensseistä oli hyvin lähellä todellisia alleeliyhdistelmäfrekvenssejä (Kuvat 12-15). Myös parittaiset t-testit osoittivat, että näiden neljän lokuksen kohdalla odotetuilla ja todellisilla arvoilla ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa ( $P > 0.05$ ; Taulukko 1). Kasvit ovat siis satunnaisen, lähinnä ristisiittoisen, lisääntymisen tulosta, eivätkä sisä- tai sukusiittoisia,

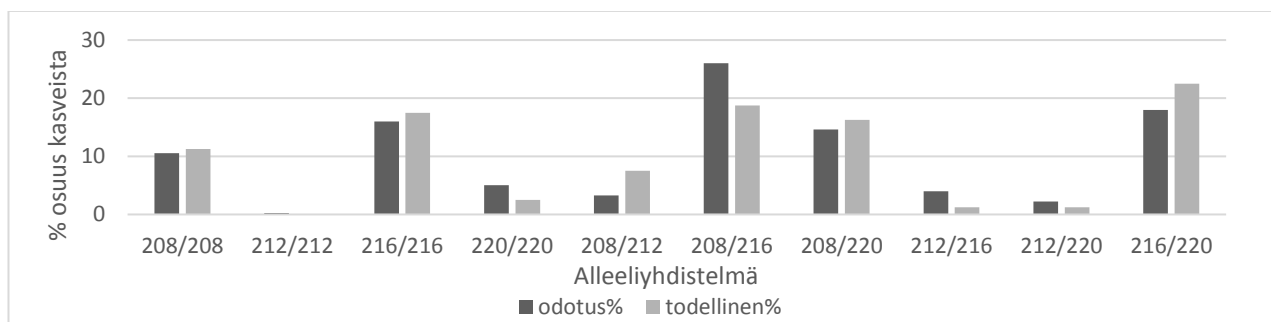
koska niiden todelliset alleeliparifrekvenssit noudattavat Hardy-Weinbergin lain matemaattista mallia.



Kuva 12. Lokuksen vince-04 eri alleeliyhdistelmien osuudet tutkimuskasveissa

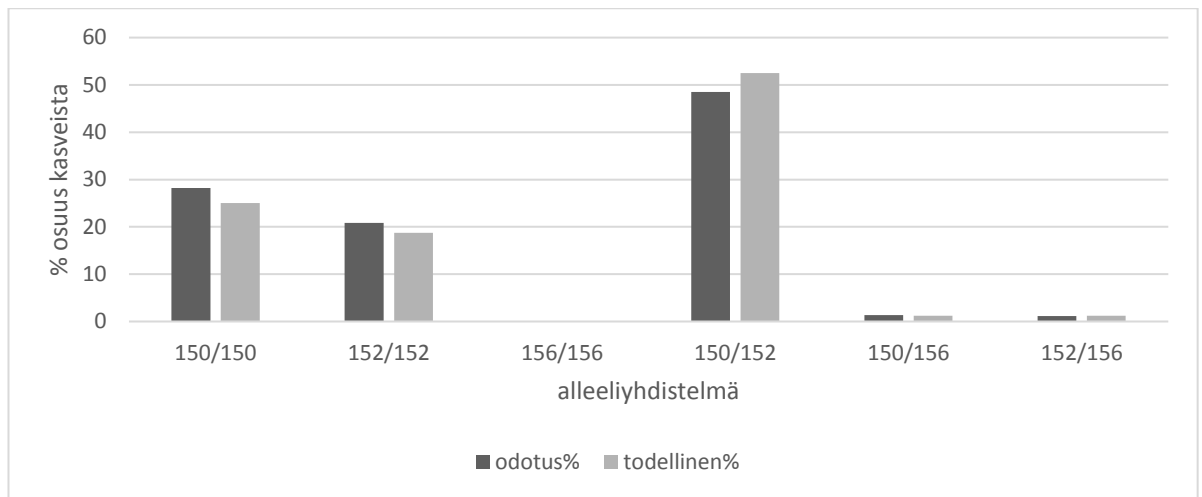


Kuva 13. Lokuksen vince-32 eri alleeliyhdistelmien osuudet tutkimuskasveissa



Kuva 14. Lokuksen vince-31 eri alleeliyhdistelmien osuudet tutkimuskasveissa





Kuva 15. Lokuksen vince-14 eri alleeliyhdistelmien osuudet tutkimuskasveissa

Taulukko 1. Parittaiset t-testit eri lokusten todellisen ja odotetun arvon eroavaisuudesta.

lokus	vapausasteet	t-arvo	p-arvo
vince-04	5	-0,00	1,00
vince-32	14	0,22	0,827
vince-31	9	-0,11	0,913
vince-14	5	-0,21	0,840

## 4.2 Käärmeenpistoyrtin geneettisen muuntelun määrän vaikutus lisääntymismenestykseen

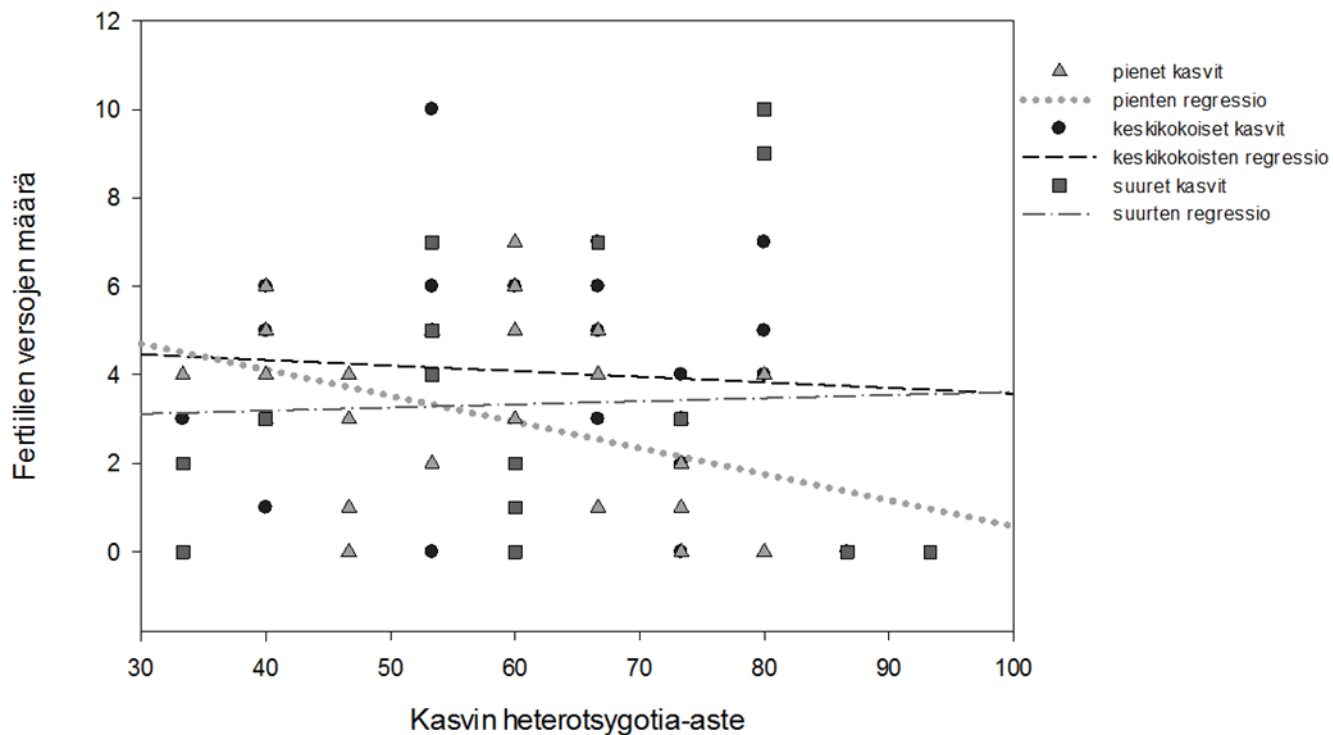
Tarkasteltaessa kasvin versojen määrän, heterotsygotia-asteen ja näiden kahden interaktion vaikutusta kasvin kukkivien versojen määrään havaitsin, että kaikki kolme tekijää vaikuttivat kasvin lisääntymiseen tilastollisesti merkitsevästi (Taulukko 2).

Taulukko 2. Kasvin versojen määrän ja heterotsygotia-asteen vaikutus kasvin kukkivien versojen määrään.

selittävä muuttuja	vapausaste	f-arvo	p-arvo
heterotsygotia-aste	63	9,23	0,004*
versojen määrä	63	6,00	0,017*
heterotsygotia-aste : versojen määrä	63	8,96	0,004*

Pienillä kasveilla, joissa oli 4–9 versoa, suuri heterotsygotia-aste ennusti vähäistä määrää fertiilejä versoja (Kuva 16). Yhteys kasvin koon ja heterotsygotia-asteen välillä oli siis vahvasti negatiivinen pienillä kasveilla. Keskikokoisilla ja suurilla kasveilla taas kasvin fertiilien versojen määrän ja kasvin heterotsygotia-asteen suhde oli melko

neutraali. Kun tarkastelin visuaalisesti vain heterotsygotia-asteen merkitystä fertiilien versojen määrälle (Kuva 16), havaitsin, että eniten fertiilejä versoja oli kasveilla, joiden heterotsygotia-aste oli 50 % ja 80 % välillä. Kuvan 16 perusteella on viitteitä siitä, että parhaiten lisääntyivät ne kasvit, joiden heterotsygotia-aste oli melko korkea, mutta jotka eivät kuitenkaan olleet täysin heterotsygoottisia eri geeninsä suhteen. Tilastollisesti tästä ei kuitenkaan ole varmuutta. Tilastollisessa testausvaiheessa kokeilemallani mallilla, jossa tarkasteltiin heterotsygotia-asteen potenssia selittävänä muuttujana, AIC-arvo oli hieman suurempi kuin lopullisessa mallissa. Eli tämä malli, jonka pohjalta olisin voinut päätellä, että keskimääräisen heterotsygotia-asteen kasvit tuottavat eniten kukkivia versoja oli olemassa olevan datan mallintamiseen hieman huonompi kuin nykyinen malli.



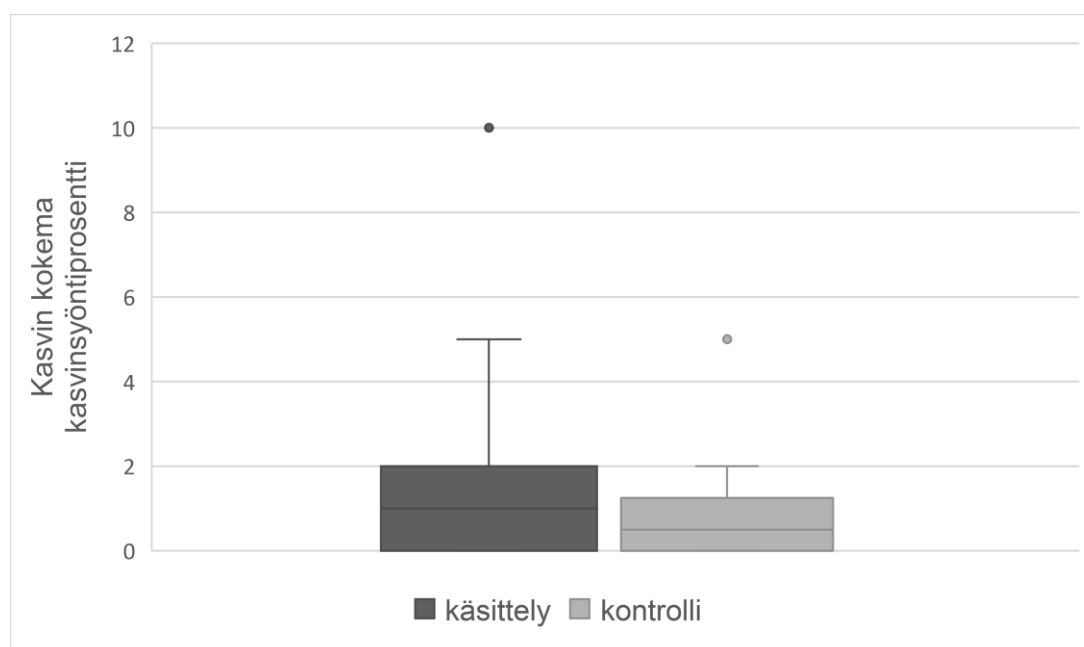
Kuva 16. Kasviyksilön kokoluokan ja heterotsygotia-asteen yhteys kasvin fertiilien versojen määrään.

### 4.3.1 Käärmeenpistoyrtin geneettisen muuntelun määrän vaikutus kasviin kohdistuneeseen kasvinsyöntiin

Sitä, löytyikö kasvilta kasvinsyönnin merkkejä, ei selittänyt mikään testatuista tekijöistä (Taulukko 3). Lisätyn muninnan koekasveja oli kuitenkin syöty hieman enemmän kuin kontrollikasveja (Kuva 17). Keskimäärin käsittelyn kasveja oli syöty 1,38 % ja kontrollin kasveja 1,26 %. Ero ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevää. Lisätyn muninnan jälkeen kasvien lehdille ilmestyi luontaisia muna vain 11 kasville yhteensä 39 munaa, eikä niistä yksikään kuoriutunut.

Taulukko 3. Heterotsygotia-asteen, versojen ja kuoriutuneiden munien määrän sekä sen, onko kasvi koe- tai kontrolliyksilö, vaikutus siihen, oliko kasvilla kasvinsyönnin merkkejä

selittävä muuttuja	nimittäjän vapausasteet	osoittajan vapausasteet	f-arvo	p-arvo
heterotsygotia-aste	1	63	0,05	0,8304
koe-kontrollikasvi	1	63	0,01	0,9085
versojen määrä	1	63	0,05	0,8247
kuoriutuneiden munien määrä kasvilla	1	63	1,36	0,2471



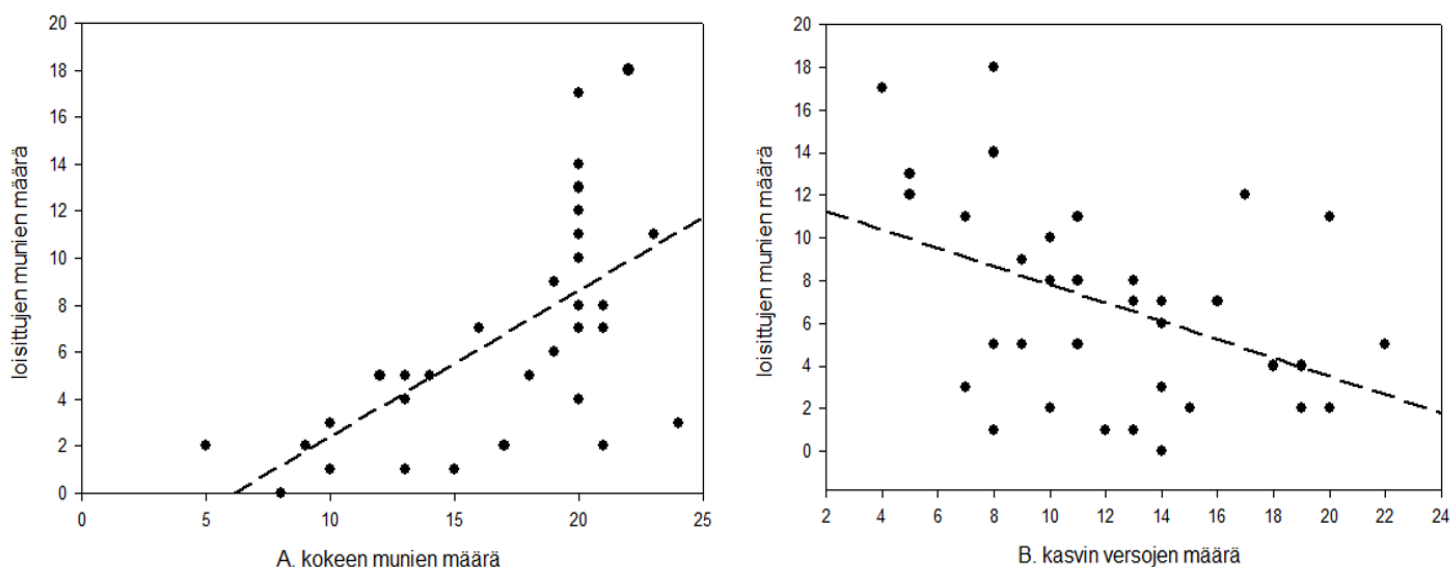
Kuva 17. Kasvien kokemat kasvinsyöntiprosentit käsittelyn ja kontrollin välillä. Laatikot kuvaavat kasvien kokeman kasvinsyönnin jakaumaa (alakvartiili, mediaani, yläkvartiili ja maksimi) ja pisteet ovat todelliset maksimit.

### 4.3.2 Käärmeenpistoyrtin geneettisen muuntelun määrän vaikutus munien tuhoutumiseen kasvilta

Loisittujen munien määrää, joka oli 234 munaa eli noin 40 % kokeen 584 munasta, selitti kasvin versojen määrä ja kokeen munien määrä, eli lisätyn muninnan kokeessa koekasville kertyneiden munien määrä, mutta ei kasvin heterotsygotia-aste (Taulukko 4). Mitä enemmän kasvilla oli ollut munia, kun se siirrettiin lisätyn muninnan käsittelystä niitylle, sitä suurempi osuus näistä munista oli myöhemmin loisittuja (kuva 18A). Toisaalta kasvin koon kasvaessa loisittujen munien määrä pieneni kasvilla (Kuva 18B).

Taulukko 4. Heterotsygotia-asteen, versojen määrän ja kokeen munien määrän vaikutus kasvin loisittujen munien määrään.

selittävä muuttuja	nimittäjän vapausasteet	osoittajan vapausasteet	f-arvo	p-arvo
heterotsygotia-aste	1	30	0,5	0,4868
versojen määrä	1	30	5,63	0,0243*
kokeen munien määrä	1	30	19,03	0,0001*

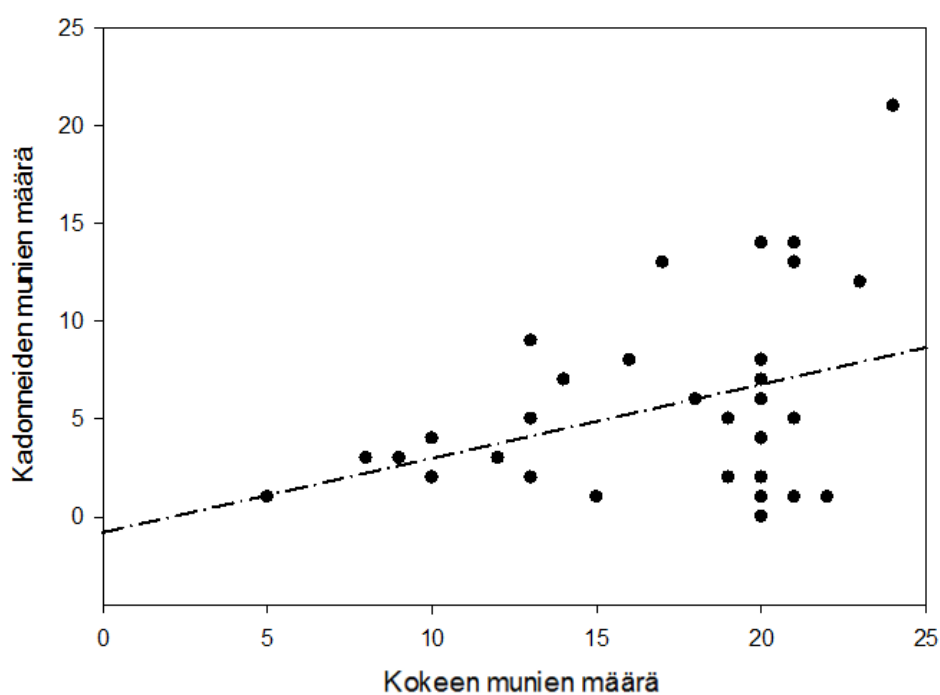


Kuva 18. Kasvilta löytyneiden loisittujen munien määrä verrattuna kasvin kokeen munien määrään (A) ja kasvin versojen määrään (B).

Kadonneiden munien määrää, joka oli 194 munaa eli noin 33 % kokeen munista, selitti tilastollisesti merkitsevästi vain koekasvin munien määrä (Taulukko 5). Kasvin koko saattaa myös selittää kadonneiden munien määrää, sillä versojen määrä oli lähellä tilastollisesti merkitsevää p-arvoa 0,05. Mitä enemmän kasvilla oli munia, kun se siirrettiin lisätyn muninnan käsittelystä niitylle, sitä suurempi määrä niitä katosi (Kuva 19).

Taulukko 5. Heterotsygotia-asteen, versojen määrän ja kokeen munien määrän vaikutus kasvilta kadonneiden munien määrään.

selittävä muuttuja	nimittäjän vapausasteet	osoittajan vapausasteet	f-arvo	p-arvo
heterotsygotia-aste	1	30	0,02	0,8870
versojen määrä	1	30	3,38	0,0760 †
kokeen munien määrä	1	30	6,67	0,0148*



Kuva 19. Kasvilta kadonneiden munien määrä verrattuna kasvin kokeen munien määrään

Sterilien munien määrää, joka oli 141 munaa eli noin 24 % kokeen munista, ei selittänyt mikään testatuista muuttujista (taulukko 6).

Taulukko 6. Heterotsygotia-asteen, versojen määrän ja kokeen munien määrän vaikutus kasvin steriileiden munien määrään.

selittävä muuttuja	nimittäjän vapausasteet	osoittajan vapausasteet	f-arvo	p-arvo
heterotsygotia-aste	1	30	0,34	0,5617
versojen määrä	1	30	0,02	0,8988
kokeen munien määrä	1	30	0,35	0,5595

## 5. Tulosten tarkastelu

Käärmeenpistoyrttien lisääntyminen Lammasluodon saarella on satunnaista. Tämä tukee aiempien tutkimusten tuloksia käärmeenpistoyrttipopulaatioiden välisestä geenivirrasta ja lisääntymisestä (von Numers & van der Maarel 1998; Leimu 2004; Muola ym. 2021), joissa on todettu, että käärmeenpistoyrtti lisääntyy lähinnä ristisiittoisesti, vaikka myös sisäsiitosta tapahtuu, ja populaatioiden välillä on geenivirtaa. Onkin spekuloitu, että sisäsiitos on käärmeenpistoyrteillä yleisempää uusissa kuin vanhoissa ja vakiintuneissa populaatioissa (Muola ym. 2021). Lammasluodon kasvipopulaatio onkin melko vanha (teoreettinen maksimi-ikä, perustuen maannousemiseen, on yli 3000 vuotta) ja kooltaan suuri, yli 5200 kasvia. 80 genotyyppatusta kasvista vain kahdella heterotsygotia-aste oli suurempi kuin 85 % ja muutamia eri alleeleja oli eri lokuksissa vain yksi tai kaksi kappaletta. Tämä viittaa siihen, että toinen näiden kasvien emokasveista saattaa olla jostain muusta populaatiosta.

Ainut testatuista muuttujista, jolle geneettinen variaatio on tilastollisesti merkitsevä selittäjä, on kasvin lisääntymispotentiaali, eli kukkivien versojen määrä kasvilla. Erityisesti pienikokoisilla kasveilla on nähtävissä geneettistä yhteensopimattomuutta. Niiden fertiilien versojen määrä vähenee kasvin heterotsygotia-asteen kasvaessa selvästi. Koska Lammasluodon käärmeenpistoyrtti on paikallisesti sopeutunut (Kalske ym. 2012) ja geneettistä yhteensopimattomuutta ilmenee erityisesti paikallisesti sopeutuneilla kasveilla (Fischer & Matthies 1997), ei ole yllättävää, että tutkimuskasveilla löytyi viitteitä geneettisestä yhteensopimattomuudesta. Kasvien elinkaaren eri vaiheissa voi olla erilaisia valintapaineita, ja kasvilla voi olla esimerkiksi sisäsiitosheikkoutta jossakin tietyssä kehitysvaiheessa, mutta ei toisessa (Watson 1995). Muola ym. (2011) toteavatkin, että käärmeenpistoyrtillä ilmenee sisäsiitosheikkoutta nuorilla kasveilla, mutta ei vanhoilla. Jos kasvin nuoruus, johon liittyy pienikokoisuus, on vaihe, jolloin on löydettävissä sisäsiitosheikkoutta, niin tällöin

on mahdollisesti parhaiten nähtävissä myös geneettinen yhteensopimattomuus kasvin lisääntymispotentiaalin suhteen. Siksi mahdollisesti pienillä kasveilla löytyi tarkastelussa geneettistä yhteensopimattomuutta enemmän kuin suuremmilla kasveilla.

Kun tarkastellaan visuaalisesti kuvaa 16 kasvien lisääntymispotentiaalista, voidaan huomata, että eniten kukkivia versoja näyttää olevan kasveilla, joiden heterotsygotia-aste on melko korkea, mutta ne eivät kuitenkaan ole täysin heterotsygoottisia eri geeniensä suhteen. Tämä saattaa olla viite sisäsiitosheikkoudesta geneettisen yhteensopimattomuuden lisäksi. Forrest ym. (2011) totesivat australialaisella lintupölytteisellä kasvilla *Grevillea mucronulata* olevan sekä sisäsiitosheikkoutta että geneettistä yhteensopimattomuutta. *Grevillea mucronulata* kasvit, joiden vanhemmat olivat toisistaan keskiarvoisen välimatkan päässä, osoittivat parempaa lisääntymiskelpoisuutta kuin kasvit, joiden vanhemmat olivat lähekkäin tai vaihtoehtoisesti kaukana toisistaan. Tilastollisesti ei näillä tuloksilla kuitenkaan ole varmuutta, onko tilanne sama myös käärmeenpistoyrtillä. Tulokset herättävät silti kiinnostusta tarkastella asiaa enemmän.

Kasvinsyönnin määrälle ei löydetty tilastollisesti merkitsevää selittäjää. Muolan ym. (2010) tutkimuksessa geneettinen variaatio ei myöskään vaikuttanut käärmeenpistoyrttien puolustukseen harmosuomuyökkösiä vastaan. Uskon siis, että kasvinsyönnin määrää kasveilla selittää tässä kokeessa mittaamatta jäänyt tekijä, kuten esimerkiksi harmosuomuyökkösten populaatiokannan vaihtelut tai harmosuomuyökkösyksilöiden oma kelpoisuus.

Kokeen kasveja oli ylipäättään syöty hyvin vähän. Keskimäärin kaikkien kasvien lehtimassasta oli syöty 1,3 %. Harmosuomuyökkösillä tiedetään olevan suuria populaatiokoon vaihteluita, minkä vuoksi eri käärmeenpistoyrttipopulaatioiden lehtimassan katoamisprosentti vaihtelee 0–60 % (Kalske ym. 2014a). Kokeen kasvinsyöntiprosentti on tavanomaisen kasvinsyönnin alarajalla, vaikka lisätyn muninnan vuoksi puolella kasveista oli yhteensä 584 munaa. Näistä munista kuitenkin loisittiin 40 %, 33 % katosi ja 24 % jäi steriiliksi eikä kuoriutunut. Tilastollisesti merkitseviä eroja kasvin kokeman kasvinsyönnin suhteen ei löydetty edes lisätyn muninnan tai kontrollikasvien, joille ei ilmestynyt munia kokeen aikana kuin pari, välillä. Kasvit olivat niityllä ilman suojaavia pussituksia, ja sen vuoksi toukat ovat voineet liikkua kasvien välillä. Näin on ilmeisesti myös tapahtunut, koska vaikka lisätyn muninnan kasveja oli syöty enemmän kuin kontrollikasveja, niin myös kontrollikasveja oli syöty luontaisten munien puutteesta huolimatta. Kasvin geneettisellä variaatiolla ei

siis ole merkitystä sen kokemaan kasvinsyöntiin silloin, kun toukat saavat vapaasti kulkea kasvien välillä.

Käärmeenpistoyrtin tiedetään voivan pudottaa lehtiään ennenaikaisesti, jos ne ovat kokeneet kasvinsyöntivaurioita (Kalske ym. 2014b). Mittauskertojen välillä 14 tutkimuskasvia, 7 kontrolliyksilöä ja 7 koeyksilöä, oli kesämyrskyn jälkeen pudottanutkin osan lehdistään. Näistä osalla toisen mittauskerran lehtivaurion määrä oli verrattuna jäljellä oleviin lehtiin pienempi kuin ensimmäisellä mittauskerralla. Mittauskertojen väli oli viikon, jonka aikana lehtivauriota on voinut syntyä paljonkin, mutta ikävä kyllä sitä ei voitu tarkastella. Tällöin kasvinsyönnin mittaustulokset eivät välttämättä olleet täysin varmoja ja on mahdollista, että siksi selittävää tekijää ei kasvinsyönnin määrälle löytynyt tässä kokeessa.

Kavinsyönnin määrän vähyyttä saattaa selittää niitty, jolla kasveja pidettiin. Se on käärmeenpistoyrtille epätyypillinen kasvupaikka, ja yleensä kasvit suosivat metsää tai kalliota. Voi olla, että saaren harmosuomuyökköset suosivat näitä ympäristöjä muninnassaan ja siksi munia ja täten kasveja syöviä toukkia oli niityllä vähän lisätyn muninnan kasvien munia lukuun ottamatta. On myös täysin mahdollista, että harmosuomuyökkösen luontaisen populaatiokoon vaihtelun vuoksi kesällä 2014 Lammasluodolla ei juuri ollut harmosuomuyökkösiä, minkä vuoksi luontaisia munia ei juuri ilmestynyt kasveille. Kasvit ovat saattaneet olla Lammasluodon luontaisille harmosuomuyökkösille myöskin vähemmän houkutteleva munintavaihtoehto kuin ympäristön kasvit, koska ne oli halkaistu. Kasveista vain yksi tuotti siemenpalon, mikä viittaa siihen, että kasvit ovat kärsineet halkaisuista ainakin lisääntymisen suhteen. Tekemässäni toisessa kokeessa, jossa käytettiin halkaistuja kasveja paikallisen sopeutumisen tarkasteluun (Martin 2020), havaitsin, että kokeen Lammasluodon kasveille munittiin vain keskimäärin 0,7 munaa ja niiden lehtimassasta oli syöty keskimäärin 0,67 %. Kahdessa eri käärmeenpistokokeessa, jossa kasvit oli halkaistu, kasvien kokemat kasvinsyöntivaurioiden arvot olivat hyvin alhaiset. Siis, vaikka usein harmosuomuyökköset suosivatkin muninnassaan pienempiä kasveja (Förare & Engqvist 1996), on mahdollista, että ne välttävät halkaistuja kasveja ja kasvien halkaisun vaikutukset peittävät mahdolliset geneettisen variaation vaikutukset kasvinsyöntiin.

Munien loisintaa, katoamista tai steriiliyttä ei selittänyt kasvin geneettinen variaatio, mikä tukeekin Kalskeen ym. (2014a) löydöksiä. Steriilien munien määrälle ei ylipäättään löydetty selittäjää. Koska geneettinen variaatio ei selitä steriilien munien määrää, käärmeenpistoyrtin kemialliset yhdisteet eivät luultavammin sterilisoineet munia, mikä on kasveilla mahdollinen selitys steriilien kasvinsyöjien munien määrälle (Hilker &



Meiners 2011). Munien steriiliys selittyi sitä vastoin luultavammin ne munineen emoyksilön kelpoisuudella. On kiinnostavaa pohtia sitä, kuinka paljon munia loisittiin (40 %) ja katosi (33 %). Kasvillisuusmäärät ennustavat hyönteisten määrää alueella (Schaffers ym. 2008) ja suomalaiset perinnemaisemaniityt, jollainen koealue oli, ovat runsaslajisia elinympäristöjä niin kasvillisuuden kuin hyönteistenkin suhteen (SYKE 2019). On siis mahdollista, että munien suuret loisinta- ja katoamismäärät johtuivat vilkkaasta hyönteisliikenteestä kasvien läheisyydessä. Kasvin koolla oli kuitenkin merkitystä siihen, kuinka paljon siinä olevia munia loisittiin. Mitä pienempi kasvi, sitä suurempi osa sille munituista munista oli loisittu. Munat ovat todennäköisesti olleet helpommin löydettävissä pienissä, ei niin lehtevissä, kasveissa. Tämä herättääkin kysymyksen, miksi sitten hamosuomuyökköset suosivat muninnassaan pienempiä kasveja (Förare & Engqvist 1996).

Tämän gradun kirjoituksen aikaan kokeesta ja kasvien halkaisusta on kulunut 6 vuotta. Jos kasvien halkaisu on aiheuttanut kasveille jälkivaikutuksia, jotka ovat peittäneet geneettisen variaation vaikutuksia lisääntymiseen tai kasvin puolustukseen kokeen aikana, nämä jälkivaikutukset ovat luultavasti tässä ajassa huomattavasti heikentyneet. On mahdollista, että kokeen kasvit tuottaisivat palkoja muiden ympäristön aikuisten kasvien tapaan. Koe voisi olla tulevaisuudessa toistettavissa muuten samanlaisena, mutta olisi mahdollista saada tietoa myös käärmeenpistoyrttien geneettisen variaation vaikutuksesta siemenmääriin ja siementen kokemiin siemenvaurioihin. Toisaalta, jos toistaisiin nyt kokeen, suurentaisiin lisääntymishäkkien kokoa, niin että yhdessä häkissä olisi enemmän kasveja. Voisin näin testata myös hamosuomuyökkösten munintapreferenssiä eri heterotsygotia-asteen kasvien välillä. Kokeen toistossa myös siirtäisin lisätyn muninnan jälkeen kasvit luonnollisten kasvien läheisyyteen metsään, jotta mahdollisen epätyypillisen kasvialueen vaikutus kokeen tuloksiin olisi mahdollisimman pieni. Koska käärmeenpistoyrtit saattavat pudottaa vaurioituneita lehtiään, mittaisin kasvinsyöntiä prosenttiarvion lisäksi myös tarkastelemalla sitä, kuinka monessa lehdessä ylipäättään on vaurioita per kasvi. Näin kasvinsyöntivaurioita voitaisiin tarkastella analyyseissä mahdollisimman perusteellisesti.

Toinen koevaihtoehto näille kasveille olisi kasvihuonekoe. Siinä voitaisiin kontrolloida pussituksen avulla hamosuomuyökkösen toukkien määrää kullakin kasvilla ja mahdollisesti voitaisiin nähdä, onko kasvin geneettisellä variaatiolla tällaisessa tilanteessa vaikutusta kasvin kokemaan kasvinsyöntiin. Myöskin toukkien koko olisi mitattavissa eri kasvien syönnin jälkeen. Kasvihuonekokeen ongelma tosin olisi se, että siellä ei voitaisi tarkkailla hamosuomuyökkösten luontaisten vihollisten toimintaa samoin kuin luonnossa.

## 6. Kiitokset

Kiitos ohjaajalleni Aino Kalskeelle, joka aina saa aikaan minussa syvempää pohdintaa. Sekä myös Anne Muolalle ja J.F Scheepensille tutkimuskasveista ja genotyypausdatasta, jonka pohjalta koe oli mahdollinen. Aino Kalske ja Anne Muola olivat suurena apuna kokeen perustamisessa ja aineiston käsittelyssä. Kiitos myös tämän tutkielman kielentarkastuksesta Eija Grundströmille ja Paula Martinille.

## 7.Lähteet

- Bello-Bedoy, R, & Núñez-Farfán, J (2010) Cost of inbreeding in resistance to herbivores in *Datura stramonium*. *Annals of Botany* 105, s.747-753.
- Britten HB (1996) Meta-analyses of the association between multilocus heterozygosity and fitness. *Evolution* 50, s.2158-2164.
- Campbell NA, Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, & Jackson RB (2008) *Biology* s.1246. San Francisco, Pearson Benjamin Cummings.
- Charlesworth D & Charlesworth B (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, s.237-268.
- Erb M (2018) Plant defenses against herbivory: Closing the fitness gap. *Trends in Plant Science* 23, s.187-194.
- Fischer M & Matthies D (1997) Mating structure and inbreeding and outbreeding depression in the rare plant *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *American Journal of Botany* 84, s.1685-1692.
- Fisher RA (1941) Average excess and average effect of a gene substitution. *Annals of Eugenics* 11, s.53-63.
- Förare J & Engqvist L (1996) Suboptimal patch and plant choice by an ovipositing monophagous moth: An insurance against bad weather? *Oikos* 77, s.301-308.
- Frankham R, Ballou JD, Eldridge MDB, Lacy RC, Ralls K, Dudash MR & Fenster CB (2011) Predicting the probability of outbreeding depression. *Conservation Biology* 25, s.465-475.
- Forrest C, Ottewell K, Whelan R, & Ayre D (2011) Tests for inbreeding and outbreeding depression and estimation of population differentiation in the bird-pollinated shrub *Grevillea mucronulata*. *Annals of Botany* 108, s.185-195.
- Futuyma DJ (2015) *Evolution*. Massachusetts U.S.A: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Gitzendanner MA & Soltis PS (2000) Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany* 87, s.783-792.
- Hamrick JL & Godt M (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 351, s.1291-1298.
- Hardy GH (1908) Mendelian proportions in a mixed population. *Science* 28, s.49-50.

- Hilker M & Meiners T (2011) Plants and insect eggs: How do they affect each other? *Phytochemistry* 72, s.1612-1623.
- Jain SK & Marshall DR (1967) Population studies in predominantly self-pollinating species.X. Variation in natural populations of *Avena Fatua* and a Barbata. *American naturalist*. 101, s.19-33.
- Johnson MTJ, Campbell SA, & Barrett SCH (2015) Evolutionary interactions between plant reproduction and defense against herbivores. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 46, 191-213.
- Kalske A, Leimu R, Scheepens JF, & Mutikainen P (2016) Spatiotemporal variation in local adaptation of a specialist insect herbivore to its long-lived host plant. *Evolution* 70, s.2110-2122.
- Kalske A, Muola A, Laukkanen L, Mutikainen P, & Leimu R (2012) Variation and constraints of local adaptation of a long-lived plant, its pollinators and specialist herbivores. *Journal of Ecology* 100, s.1359-1372.
- Kalske A, Muola A, Mutikainen P, & Leimu R (2014a) Preference for outbred host plants and positive effects of inbreeding on egg survival in a specialist herbivore. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 281, 20141421
- Kalske A, Mutikainen P, Muola A, Scheepens JF, Laukkanen L, Salminen J, & Leimu R. (2014b) Simultaneous inbreeding modifies inbreeding depression in a plant-herbivore interaction. *Ecology letters*. 17, s.229-238
- Kariyat RR, Mauck KE, De Moraes CM, Stephenson AG, & Mescher MC (2012) Inbreeding alters volatile signalling phenotypes and influences tri-trophic interactions in horsenettle (*Solanum carolinense* L.). *Ecology Letters* 15, s.301-309.
- Keller LF & Waller DM (2002) Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution* 17, s.230-241.
- Lande R & Schemske DW (1985) The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants .1. Genetic Models. *Evolution* 39, s.24-40.
- Lacy RC (1997) Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *Journal of Mammalogy* 78, s.320-335.
- Laukkanen L, Kalske A, Muola A, Leimu R, & Mutikainen P (2018) Genetic drift precluded adaptation of an insect seed predator to a novel host plant in a long-term selection experiment. *PLoS One* 13, e0198869.
- Laukkanen L, Mutikainen P, Muola A, & Leimu R (2014) Plant-species diversity correlates with genetic variation of an oligophagous seed predator. *PLoS One* 9, e94105.
- Leimu R (2004) Variation in the mating system of *Vincetoxicum hirundinaria* (Asclepiadaceae) in peripheral island populations. *Annals of Botany* 93, s.107-113.
- Leimu R & Lehtilä K (2006) Effects of two types of herbivores on the population dynamics of a perennial herb. *Basic and Applied Ecology* 7, s.224-235.
- Leimu R, Mutikainen P, Koricheva J, & Fischer M (2006) How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? *Journal of Ecology* 94, s.942-952.
- Leimu R & Mutikainen P (2005) Population history, mating system, and fitness variation in a perennial herb with a fragmented distribution. *Conservation Biology* 19, s.349-356.

- Leimu R & Syrjanen K (2002) Effects of population size, seed predation and plant size on male and female reproductive success in *Vincetoxicum hirsutum* (Asclepiadaceae). *Oikos* 98, s.229-238.
- Leimu R, Kloss L, & Fischer M (2008) Effects of experimental inbreeding on herbivore resistance and plant fitness: the role of history of inbreeding, herbivory and abiotic factors. *Ecology Letters* 11, s.1101-1110.
- Leimu R, & Muola A (2014) Kasvien ja niitä syövien hyönteisten sopeutuminen saariston pirstoutuneisuuteen. Teoksessa *Seili: Saaristomeren tutkimusta 50 vuotta* (Vuorinen I, Juusti T, Koivula T, Soikkeli M, Toim.) s.115-133 Suomen yliopistopaino Oy, Turun yliopisto.
- Lynch M (1991) The Genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. *Evolution* 45, s.622-629.
- Martin A (2020) Käärmeenpistoyrtin paikallinen sopeutuminen metsä- ja kalliipopulaatioiden välillä. Luk-tutkielma, Turun yliopisto.
- Monteiro MM & Demarco D (2017) Corona development and floral nectaries of Asclepiadeae (Asclepiadoideae, Apocynaceae). *Acta Botanica Brasilica* 31, s.420-432.
- Muola A, Mutikainen P, Laukkanen L, Lilley M, & Leimu R (2010) Genetic variation in herbivore resistance and tolerance: the role of plant life-history stage and type of damage. *Journal of Evolutionary Biology* 23, s.2185-2196.
- Muola A, Scheepens JF, Laukkanen L, Kalske A, Mutikainen P, & Leimu R (2021) Strong gene flow explains lack of mating system variation in the perennial herb, *Vincetoxicum hirsutum*, in a fragmented landscape. *Nordic Journal of Botany* 39, e03008
- Muola A, Mutikainen P, Laukkanen L, Lilley M, & Leimu R (2011) The role of inbreeding and outbreeding in herbivore resistance and tolerance in *Vincetoxicum hirsutum*. *Annals of Botany* 108, s.547-555.
- Ollerton J, Liede-Schumann S, Endress ME, Meve U, Rech AR, Shuttleworth A, Keller HA, Fishbein M, Alvarado-Cardenas LO, Amorim FW (2019) The diversity and evolution of pollination systems in large plant clades: Apocynaceae as a case study. *Annals of Botany* 123, s.311-325.
- Schaal BA & Levin DA (1976) Demographic genetics of *Liatris-Cylindracea Michx* (Compositae). *American Naturalist* 110, s.191-206.
- Schaffers AP, Raemakers IP, Sýkora KV & ter Braak, Cajo JF (2008) Arthropod assemblages are best predicted by plant species composition. *Ecology* 89, s.782-794.
- Strauss SY, Karban R (1994) The significance of outcrossing in an intimate plant–herbivore relationship. 1. Does outcrossing provide an escape from herbivores adapted to the parent plant. *Evolution* 48, s.454–464.
- Strauss S & Whittall J (2006) Non-pollinator agents of selection on floral traits. *Ecology and Evolution of Flowers* 208
- SYKE-Suomen Ympäristökeskus, Suomen Lajitietokeskus & IUCN. Suomen lajien Punaisen kirjan verkkopalvelu 2019 *punainenkirja.laji.fi* [Luettu 29.12.2020]
- Turelli M & Ginzburg LR (1983) Should individual fitness increase with heterozygosity. *Genetics* 104, s.191-209.

von Numers M & van der Maarel E (1998) Plant distribution patterns and ecological gradients in the Southwest Finnish archipelago. *Global Ecology and Biogeography* 7, s.421-440.

Watson M (1995) Sexual differences in plant development phenology affect plant-herbivore interactions. *Trends in Ecology & Evolution* 10, s.180-182.