



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

**Lannoitteen mukana kulkeutuneen
glyfosaattivalmisteen ylivuotiset vaikutukset mansikan
sienijuuriin, kasvuun, lisääntymiseen ja kasvinsyöjien
aiheuttamiin vaurioihin.**

Lauri Heikkonen

Ekologia

Pro gradu -tutkielma

Laajuus: 30 op

Ohjaajat:

Marjo Helander

Anne Muola

Sari Timonen

27.5.2022

Turku

Pro gradu -tutkielma

Pääaine: Ekologia

Tekijä: Lauri Heikkinen

Otsikko: Lannoitteen mukana kulkeutuneen glyfosaattivalmisteen ylivuotiset vaikutukset mansikan (*Fragaria x vesca*) sienijuuriin, kasvuun, lisääntymiseen ja kasvinsyöjien aiheuttamiin vaurioihin.

Ohjaajat: Marjo Helander, Anne Muola ja Sari Timonen

Sivumäärä: 33 sivua

Päivämäärä: 27.5.2022

Glyfosaatti on maailman käytetyin rikkakasvientorjunta-aine ja sitä käytetään tehoaineena erilaisissa glyfosaattipohjaisissa kasvinsuojeluvalmisteissa eli herbisideissä (GPH). Glyfosaatin teho perustuu kasveille elintärkeän sikimaattikierron estämiseen ja siten se tehoaakin lähes kaikkiin vihreisiin kasveihin. Glyfosaatin väitetään olevan haitaton eläimille, muille eliöille ja ympäristölle, koska vain kasveilla ja joillakin mikrobeilla on sikimaattikierto, ja glyfosaatin hajoamisaika on lyhyt. Glyfosaatin ja sen hajoamistuotteiden on havaittu säilyvän maaperässä pidempiä aikoja kuin on oletettu ja vaikuttavan maaperän mikrobeihin sekä viljeltäviin kasveihin. Glyfosaattia ja sen hajoamistuotteita voi päätyä ravintoketjuihin sen normaalin käytön yhteydessä, mutta myös epäsuorasti esimerkiksi tuotantoeläimille syötettävän rehun kautta. Glyfosaatin on havaittu jopa tiivistyä siipikarjan ulosteeseen, jos niille syötettävä rehu sisältää jäämiä glyfosaatista ja sen hajoamistuotteista. Lannoitteeksi käytettävän siipikarjan lanta saattaa sisältää torjunta-aineista, joita niiden syömä rehu sisältää ja niiden pitoisuuksia ei valvota. Tällä tavoin viljeltävät kasvit saattavat epäsuorasti altistua glyfosaatille ja sen hajoamistuotteille. Tutkimuksessa tutkittiin lannoitteen mukana kulkeutuneiden GPH-jäämien ja niiden hajoamistuotteiden ylivuotisia vaikutuksia mansikan sienijuuriin, kasvuun, lisääntymiseen ja kasvinsyöjien aiheuttamiin vaurioihin. Koe toteutettiin levittämällä GPH-jäämiä sisältävää ulostetta lannoitteeksi tutkimuskasveina käytetyille mansikoille. Varsinainen glyfosaatille ja sen hajoamistuotteille altistuminen tapahtui siis edellisen kasvukauden aikana ja aineiden pitoisuudet olivat odotetusti huomattavasti matalammat tutkimusvuonna. Vuonna jona lannoitteet levitettiin koepellolle GPH-käsittelykasvit jäivät pienemmiksi kuin kontrolliryhmän kasvit. Koska mansikka on monivuotinen viljelykasvi sen edellisen vuoden kasvulla voi olla vaikutusta seuraavan vuoden kasvuun ja lisääntymiseen. Tuloksissa ei havaittu eroa mitatuissa muuttujissa kontrolliryhmän ja GPH-käsittelyn kasvien välillä. Tässä kokeessa havaittiin kuitenkin edellisen vuoden kasvun vaikuttaneen tämän vuoden tuloksiin, mutta eroa GPH-käsittelyn ja kontrolliryhmän kasvien välillä ei kuitenkaan havaittu.

Avainsanat: Glyfosaatti, mansikka, lannoite, sienijuuri, kasvu, lisääntyminen, herbivoria

	Sisällys	
1	Johdanto	1
1.1	Glyfosaatti ja sen käyttö	1
1.2	GPH:t ja glyfosaatti maanviljelyssä	3
1.3	GPH:t ja glyfosaatti maaperässä	5
1.4	Sienijuuret ja keräsienet	7
1.5	Kiertotalous	9
1.6	GPH:iden ja glyfosaatin vaikutukset viljeltäviin kasveihin	9
1.7	Tutkimuksen tavoite	10
2	Aineisto ja menetelmät	10
2.1	Koe-asetelma	10
2.2	Kasvun mittaus	13
2.3	Lisääntymisen mittaus	13
2.4	Kasvinsyöjien aiheuttamien vaurioiden mittaus	14
2.5	Sienijuurinäytteiden keräys, värjäys ja mikroskopointi	14
2.5.1	Näytteiden keräys	14
2.5.2	Värjäys	15
2.5.3	Mikroskopointi	16
2.6	Tilastolliset analyysit	17
3	Tulokset	18
3.1	Kasvu	20
3.2	Lisääntyminen	20
3.3	Kasvinsyöjien aiheuttamat vauriot	21
3.4	Sienijuuret	22
4	Tulosten tarkastelu	23
4.1	Kasvu	24
4.2	Lisääntyminen	25
4.3	Kasvinsyöjien aiheuttamat vauriot	26
4.4	Sienijuuret	26
4.5	Glyfosaattijäämät	27
5	Yhteenveto	28
	Kiitokset	28
	Lähteet	28

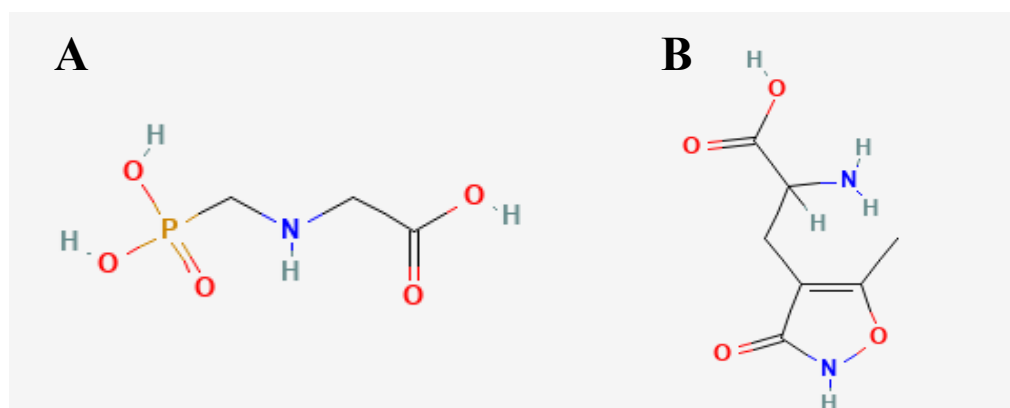
1 Johdanto

1.1 Glyfosaatti ja sen käyttö

Glyfosaatti on maailmanlaajuisesti eniten käytetty rikkakasvientorjunta-aine. Aineen tultua markkinoille 1974 sen käyttö on ollut jatkuvassa kasvussa. Vuonna 2014 maailmanlaajuisesti glyfosaattia käytettiin maanviljelyssä noin 747 000 tonnia ja Suomessa noin 710 tonnia (Benbrook 2016; Antier ym. 2020). Glyfosaattipohjaisia torjunta-aineita eli herbisidejä (GPH) myydään useilla eri kauppanimillä, joista tunnetuin on Roundup (Benbrook 2016; Myers ym. 2016). Suurimmat määrät ainetta käytetään maanviljelyssä, mutta sitä käytetään myös esimerkiksi rikkakasvien torjunnassa julkisilla paikoilla, tienvarsilla ja harrastepuutarhoissa (Benbrook 2016). GPH:iden käyttö on lisääntynyt viimeisen kolmenkymmenen vuoden aikana, koska ne ovat halpoja, tehokkaita ja tehoavat hyvin erityisesti monivuotisiin rikkakasveihin. Oikein käytettynä niiden ei pitäisi olla haitallisia ihmiselle tai muille eliöille lukuun ottamatta kasveja ja joitakin mikrobeja (Duke & Powles 2008; Williams ym. 2000). Glyfosaatti kehitettiin korvaamaan muita kasvientorjunta-aineita, jotka olivat haitallisia ympäristölle, ihmisille ja viljelykasveille (Duke & Powles 2008, Myers 2016).

Glyfosaatin (Kuva 1) vaikutus perustuu kasveille elintärkeän biokemiallisen sikimaattikierron estymiseen (Baylis 2000 ; Helander ym. 2012). Glyfosaatti estää 5-enolipyruvyyilisikimaatti-3-fosfaattisyntaasi (EPSPS) -nimisen entsyymin toiminnan kasvin sikimaattireitissä. EPSPS-entsyymin inaktivoituminen estää kasveille välttämättömien aminohappojen kuten tryptofaanin, fenyyialaniinin ja tyrosiinin tuotannon. Kasvit tarvitsevat näitä välttämättömiä aminohappoja esimerkiksi kasvunestäjien ja puolustusyhdisteiden tuotantoon (Helander ym. 2012). Glyfosaatti vaikuttaa välillisesti myös moniin muihin kasvien kemiallisiin ja fysiologisiin prosesseihin. Näitä ovat esimerkiksi fotosynteesin heikkeneminen, lehtivihreän hajoaminen ja muutokset auksiinin kuljetuksessa (Baylis 2000). EPSPS-entsyymin inaktivoitumisen aiheuttama vaje tiettyjen aminohappojen tuotannossa voi myös aiheuttaa häiriöitä kasvien puolustukselle tärkeiden kasvihormonien ja yhdisteiden tuotannossa (Fuchs ym. 2021). Ihmisillä ja muilla eläimillä tätä reaktioketjua ei ole ja glyfosaatin on väitetty olevan yksi vähiten eläimille myrkyllisistä torjunta-aineista (Duke & Powles 2008). Monilla mikrobeilla ja sienillä kuitenkin on sikimaattikierto (Leino ym.

2021). Monet tutkimukset ovat osoittaneet, että glyfosaatilla ja GPH:lla voi olla arvaamattomia vaikutuksia niin viljeltäviin kasveihin kuin muihinkin eliöihin (Laitinen ym. 2006; Simonsen ym. 2008; Kremer & Means 2009; Helander ym.2012; Cecilia & Maggi 2018; Helander ym. 2018; Helander ym. 2019; Ruuskanen ym. 2020; Muola ym. 2021). Esimerkiksi on arvioitu, että esitumallisista eliöistä arkeoneista 82 % ja bakteereista 57 % ovat potentiaalisesti herkkiä glyfosaatille (Leino ym. 2021).



Kuva 1. Glyfosaatin (A) ja aminometyylifosfonihapon (AMPA) (B) molekyylikaavat.

Glyfosaatin oletetaan hajoavan maaperässä kahden viikon aikana ja sitoutuvan maaperään tehokkaasti (Duke & Powles 2008). Maaperään glyfosaattia päätyy ainakin rikkakasvien torjunnan yhteydessä, kohdekasvien juurien kautta ja niiden kuoltua kasvimateriaalin hajoamisen yhteydessä (Laitinen ym. 2007; Mamy ym. 2016). Glyfosaatti hajoaa maaperässä maaperämikrobien hajottamana ja sen pääasiallinen hajoamistuote on aminometyylifosfonihappo (AMPA) (Kuva 1). AMPA ei vaikuta kasvien sikimaattireittiin, mutta on muuten haitallinen kasveille (Reddy ym. 2004). AMPA ei sitoudu maaperään samalla tavalla kuin glyfosaatti ja huuhtoutuukin maaperästä helpommin (Kjær ym. 2003; Duke & Powles 2008). Huuhtoutuessa pois maaperästä AMPA voi päätyä vesistöihin. Glyfosaatti tai AMPA eivät itsessään ole kovinkaan myrkyllisiä vesistöissä, mutta GPH:issa käytetyt apuaineet taas ovat (Rodrigues ym. 2019).

Kaupallisissa rikkakasvientorjunta-aineissa kuten GPH:issa on vaikuttavan aineen lisäksi erilaisia apuaineita. Apuaineita voidaan lisätä kasvientorjunta-aineisiin myös vasta ennen ruiskutusta tankissa, josta se ruiskutetaan kohdekasveille. Toimiakseen tehokkaasti kasvientorjunta-aineen täytyy olla riittävässä kontaktissa kohdekasveihin, imeytyä kasvin sisään ja kulkeutua siellä oikeaan paikkaan kuitenkin menettämättä tehoaan. Tähän

voivat vaikuttaa ympäristöolosuhteet kuten valon määrä ja lämpötila, torjunta-aineissa käytettävät apuaineet ja torjunta-aineisiin sekoitettavan veden laatu (Sullivan ym. 1980). Kasvitorjunta-aineita, jotka ovat heikkoja happoja kuten glyfosaatin emohappo, muunnellaan myös usein aineen käsittelyn helpottamiseksi ja stabiiliuden lisäämiseksi. Tämän takia glyfosaattia on tarjolla erilaisissa muodoissa kuten isopropyylimiini-, monoammnium-, kalium-trimetyylifonium ja seskvinatriumsuoloina (Travlos ym. 2017). Yleisimmin apuaineina käytetään pinta-aktiivisia aineita, jotka lisäävät glyfosaatin imeytymistä kasvin sisään niiden pinnalta läpäisemällä kasvin pintakerroksen (Miller ym. 2013). Glyfosaatin eri muotojen ja apuaineiden vuorovaikutukset ovat kuitenkin vaihtelevia ja glyfosaatin teho eri yhdistelmillä vaihtelee. Myös eri kohdekasveilla on saatu erilaisia tuloksia samoilla glyfosaatin kemiallisella muodolla ja apuaineyhdistelmällä (Travlos ym. 2017). Viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että GPH:issa käytettävät apuaineet voivat olla ympäristölle ja ei-kohdeliöille vähintään yhtä haitallisia ja usein haitallisempia kuin itse vaikuttava-aine (Helander ym. 2019; Rodrigues ym. 2019).

1.2 GPH:t ja glyfosaatti maanviljelyssä

GPH:iden käyttö maanviljelyssä on ollut jatkuvassa kasvussa sen jälkeen, kun ne tulivat markkinoille vuonna 1974 (Benbrook 2016). Käyttömäärien lisääntymiselle on useita syitä. Glyfosaatille vastustuskykyisten viljelykasvien kehittäminen ja erilaiset viljelymenetelmät ovat erityisesti vaikuttaneet käytön lisääntymiseen. Vuonna 1995 ennen geenimuunneltujen glyfosaatille vastustuskykyisten viljelykasvien käyttöönottoa glyfosaattia käytettiin maanviljelyssä maailmanlaajuisesti noin 51 000 tonnia vuodessa ja vuoteen 2014 mennessä määrä oli noussut 747 000 tonniin vuodessa (Benbrook 2016). Geenimuunneltujen glyfosaatille vastustuskykyisten viljelykasvilajikkeiden käyttö onkin globaalisti merkittävin tekijä GPH:iden käytön lisääntymiselle maataloudessa (Benbrook 2016; Duke 2018). Ennen geenimuunneltujen glyfosaatille vastustuskykyisten viljelykasvien käyttöönottoa aineen käyttöä rajoitti sen laaja-alaisuus ja tehokkuus. Pienellekin määrälle glyfosaattivalmistetta altistuminen rikkakasvien torjunnan yhteydessä saattoi vahingoittaa tai tappaa viljelykasveja (Duke 2018). Glyfosaatille vastustuskykyisiin viljelykasveihin on siirretty geeni, jonka avulla ne kestävät glyfosaattia. Vastustuskyvyn ansiosta glyfosaattia voidaan käyttää myös viljelykasvien kasvukauden aikana, jopa useita kertoja sekä suuria määriä kerralla (Duke & Powles 2008; Green 2009). Kolme tärkeintä glyfosaatille vastustuskykyistä geenimuunneltua

viljelylajia ovat soija, maissi ja puuvilla. Vuonna 2012 noin 40 % kaikesta maataloudessa käytetystä glyfosaatista käytettiin pelkästään glyfosaatille vastustuskykyisen soijan viljelyssä ja 56 % kaikkien glyfosaatille vastustuskykyisten viljelykasvien viljelyyn (Benbrook 2016). EU:n alueella geenimuunneltujen viljelykasvien viljely on tiukasti säänneltyä ja pääasiassa kiellettyä (Benbrook 2016; Duke 2018).

Kaikissa Euroopan unionin maissa sekä Sveitsissä, Serbiassa, Norjassa ja Turkissa glyfosaatin myyntimäärät vaihtelivat vuosien 2013–2017 välillä noin 47 981 ja 49 427 tonnin välillä, eikä selkeää kasvua käyttömäärissä ollut havaittavissa. Tarkasteltuna aikana glyfosaatin markkinaosuus kaikista kasvintorunta-aineista vaihteli 15–69 %. Suomessa glyfosaatin osuus kaikista myydyistä kasvintorjunta-aineista oli vuonna 2017 66 % ja glyfosaattia käytettiin vuosina 2013-2017 550-860 tonnia vuodessa (Antier ym. 2020).

GPH:iden jatkuvasti kasvaneet käyttömäärät ja -kerrat ovat johtaneet siihen, että jotkin rikkakasvit ovat kehittäneet vastustuskyvyn glyfosaatille (Powles & Preston 2006; Heap 2014). Vastustuskyvyn kehittyminen on seurausta luonnonvalinnasta, jossa vastustuskyvyn aiheuttavat geenimutaatiot yleistyvät useiden glyfosaattialtistusten myötä. Tämän seurauksena suositellut käyttömäärät glyfosaattia eivät enää vaikuta halutulla tavalla rikkakasveihin ja glyfosaatin käyttömääriä lisätään (Heap 2014). Glyfosaatille vastustuskykyisillä rikkakasveilla vastustuskyvyn kehittyminen voi perustua ainakin kahteen eri mekanismiin. Yksi tapa, jolla rikkakasvit ovat kehittäneet vastustuskyvyn glyfosaatille on muutokset kohdemolekyylissä. Mutaatio aiheuttaa kohde-entsyymien (EPSPS) aminohappo-proliinin korvautumisen seriinillä tai treoliinilla, joka tekee entsyymistä lievästi vastustuskyvyn glyfosaatille. Toinen tapa, jolla rikkakasvit ovat kehittäneet vastustuskyvyn glyfosaatille on muutos aineen kulkeutumisessa kasvin sisällä. Vastustuskykyisillä kasveilla glyfosaatti kertyy käsiteltyjen lehtien kärkiin, kun taas muilla kasveilla glyfosaatti kulkeutuu kasvin alempiin osiin (Powles & Preston 2006). Glyfosaatin kulkeutuminen kasvin eri osiin on keskeistä sen tehokkaan toiminnan kannalta, joten muutokset aineen kulkeutumisessa kasvissa voivat aiheuttaa vastustuskyvyn glyfosaatille (Powles & Preston 2006).

GPH:ita voidaan käyttää ennen viljeltävien kasvien kylvämistä, joka mahdollistaa suorakylvämisen (Van Bruggen ym. 2018). Suorakylvössä viljeltävät kasvit voidaan kylvää maahan ilman, että sitä muokataan. Maan muokkaus lisää eroosiota, ravinteiden huuhtoutumista ja voi häiritä maaperän normaalia toimintaa (Duke & Powles 2008).

Suorakylvön edut viljelyssä ovat osaltaan kasvattaneet GPH:en suosiota (Heap 2014; Benbrook 2016; Myers ym. 2016).

GPH:ita käytetään yleensä ruiskuttamalla ainetta kasvien lehdille, josta se kulkeutuu kasvien sisälle. Glyfosaattia voidaan pitää hitaasti vaikuttavana kasvientorjunta-aineena ja sen vaikutukset eivät aina ole kuolettavia kasveille. Tätä hyödynnetään eri tavoin eri kasvien viljelyssä lähinnä sadonkorjuun helpottamiseksi (Baylis 2000). Pakkotuleennuttaminen eli viljelykasvien samanaikainen kypsyttäminen ja kuivaaminen on yksi tapa, jossa glyfosaattia hyödynnetään helpottamaan eri viljelykasvien sadonkorjuuta (Benbrook 2016). Pakkotuleennuttamisessa glyfosaattivalmistetta ruiskutetaan viljeltäville viljakasveille vähän ennen sadonkorjuuta. GPH:t tappavat viljeltävät viljakasvit, jolloin vilja kypsyy tasaisesti samaan aikaan. Pakkotuleennuttaminen tai muut vastaavat toimenpiteet, joissa glyfosaattia käytetään vähän ennen sadonkorjuuta lisäävät jäämiä sadossa huomattavasti. Tämän seurauksena torjunta-aineen sallittuja määriä sadossa on nostettu viljelykasveilla, joilla pakkotuleennutusta käytetään (Benbrook 2016). Joissakin maissa kuten Saksassa, sadonkorjuuta helpottava glyfosaatin käyttö on kokonaan kielletty (Benbrook 2016) ja Suomessa ruokaviljan pakkotuleennutus on kielletty, mutta rehuviljaa viljeltäessä juolavehnän (*Elytrigia repens* Gould) torjuminen glyfosaatilla juuri ennen sadonkorjuuta on kuitenkin sallittua (VYR ry 2016).

1.3 GPH:t ja glyfosaatti maaperässä

Maaperässä glyfosaatilla, GPH:illa ja niiden hajoamistuotteilla voi olla monenlaisia vaikutuksia. Glyfosaattia päätyy maaperään sen normaalissa käytössä ruiskutuksen yhteydessä, kasvien juurien kautta, kuolleiden kasvien hajotessa ja mahdollisesti myös lannoitteen mukana (Laitinen ym. 2007; McKinnon 2014; Mamy ym. 2016; Muola ym. 2021). Glyfosaatti sitoutuu tehokkaasti maaperän mineraaleihin ja sen ei pitäisi huuhtoutua maaperästä. Maaperän mikrobit hajottavat glyfosaatin maaperästä suhteellisen nopeasti, mutta ympäristön ja maaperän olosuhteet voivat vaikuttaa merkittävästi hajoamisen nopeuteen (Helander ym. 2012).

Glyfosaatti ja fosfaatti sitoutuvat maaperän mineraalipartikkeleihin samalla mekanismilla ja kilpailevat samoista vapaista sitoutumispaikoista keskenään (Gimsing ym. 2004; Hébert ym. 2019). Glyfosaatin sitoutumiseen maaperässä vaikuttaa ensisijaisesti maaperän on pH, mutta myös maaperän fosfaatin määrällä on tärkeä rooli glyfosaatin

sitoutumiseen (Gimsing ym. 2004). Pelloilla, joilla käytetään runsaasti fosfaattilannoitteita samanlainen sitoutumismekanismi voi aiheuttaa joko glyfosaatin, AMPA:n tai fosfaatin huuhtoutumista (Gimsing ym. 2004). Koska fosfaatti ja glyfosaatti kilpailevat sitoutumispaikoista maaperässä, runsas fosfaattilannoitus voi johtaa sitoutumispaikkojen kyllästymiseen fosfaatilla, jolloin glyfosaatti jää vapaana maaperään. Glyfosaatti sitoutuu maaperään tehokkaasti verrattuna muihin kasvintorjunta-aineisiin (Mamy & Barriuso 2005), mutta sen pääasiallinen hajoamistuote AMPA taas ei (Kjær ym. 2003; Duke & Powles 2008) ja jäämiä AMPA:sta on löydetty maaperästä vielä 1,5 vuotta glyfosaatin käytön jälkeenkin (Laitinen ym. 2006).

Glyfosaatti hajoaa maaperässä pääasiassa kahdella eri tavalla. Ainakin *Pseudomonas*-suvun bakteerien tiedetään hajottavan glyfosaattia maaperässä (Gimsing ym. 2004; Borggaard & Gimsing 2007) mutta myös muut mikrobit todennäköisesti osallistuvat prosessiin (Forlani ym. 1999). Mikrobit hajottavat glyfosaattia sarkosiiniksi ja fosfaatiksi. Koska mikrobit käyttävät maaperän fosfaattia aineenvaihdunnassaan, runsaasti fosfaattia sisältävässä maaperässä tämä reaktioreitti ei ole mikrobeille tarpeellinen. Maaperässä sarkosiini voi hapettua aerobisissa olosuhteissa glysiiniksi ja formaldehydiksi, ja anaerobisissa oloissa metyyliamiiniksi, hiilidioksidiksi ja etanaatiksi (Cecilia & Maggi 2018). Toisessa mahdollisessa reaktiossa mikrobit hajottavat glyfosaatin aminometyylifosfonihapoksi (AMPA) ja glyoksylaatiksi, jota mikrobit voivat käyttää energian ja hiilen lähteenä. AMPA taas voi aerobisissa oloissa hydrolysoitua metyyliamiiniksi, fosfaatiksi ja vetyioneiksi. AMPA voi myös kiinnittyä mangaanimineraalin $((\text{Na},\text{Ca})_0.5(\text{Mn}^{4+},\text{Mn}^{3+})_2\text{O}_4 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O})$ pinnalle (Cecilia & Maggi 2018). Molemmat edellä kuvatut mikrobien tavat hajottaa glyfosaattia ovat aerobisia, joten anaerobisissa olosuhteissa glyfosaatin hajoaminen voi pysähtyä.

Koska suurimmalla osalla maaperämikrobeista on kasvien tapaan sikimaattireitti, glyfosaatti voi vaikuttaa myös niihin (Baylis 2000; Leino ym. 2021). Varsinkin toistuva altistuminen saattaa muuttaa mikrobiyhteisön rakennetta sekä toimintaa ja glyfosaatille herkkien mikrobien osuus voi pienentyä (Nguyen ym. 2016). Glyfosaatin kokonaisvaltaiset vaikutukset maaperässä ovat osittain epäsuoria. Kun mikrobiyhteisön rakenne muuttuu myös niiden tuottamat prosessit kuten eri ravinteiden ja aineiden kierrot saattavat muuttua. Muutokset aineiden kierroissa vaikuttavat puolestaan mikrobiyhteisöihin. GPH:t voivat vaikuttaa mikrobien aktiivisuuteen maaperässä (Busse

ym. 2001) ja lisätä kasveille haitallisten taudinaiheuttajamikrobien esiintymistä. Esimerkiksi *Fusarium*-homesienisuvun infektioiden on havaittu lisääntyvän glyfosaatille altistetuilla kasveilla (Johal & Huber 2009; Kremer & Means 2009). GPH:iden on havaittu vähentävän kasvien juuristossa symbioosissa elävien keräsienten kolonisaatiota, niiden muodostamien sienirakenteiden määriä sekä heikentäneet keräsienten itiöiden elinvoimaisuutta (Druille ym. 2013a; Druille ym. 2013b; Helander ym. 2018).

1.4 Sienijuuret ja keräsienet

Sienijuuri on kasvin juuren ja maassa elävän sienien muodostama rakenne. Vihreät kasvit pystyvät yhteyttämään ja sienet taas ovat taas tehokkaita irrottamaan ravinteita maaperästä. Kasvi ja sieni elävät symbioosissa sienijuurien välityksellä. Symbioosissa kasvi saa sieneltä ravinteita, joista on hyötyä esimerkiksi kasvin kasvulle ja puolustukselle, ja sieni saa kasvilta vastineeksi kasvin tuottamia yhteyttämistuotteita. Yhdisteiden vaihto symbionttien välillä tapahtuu juuren sisällä. Juuren ulkopuolella sieni levittäytyy maaperään rihmastoverkkona, joka kattaa huomattavasti suuremman alueen ravinteiden ottamiseen verrattuna pelkkään juuristoon (Vestberg ym. 2018).

Sienijuuret voidaan luokitella kolmeen eri päätyyppiin perustuen siihen tunkeutuvatko sienijuuret isäntäkasvin juurisolujen seinän läpi vai eivät. Nämä kolme eri päätyyppiä ovat sisäsienijuuret, pintasienijuuret ja sekatyypin sienijuuret. Sisäsienijuurien rihmat läpäisevät soluseinän ja muodostavat rakenteita solukalvon ja soluseinän väliin. Sisäsienijuuriin kuuluvat keräsienijuuret, kanervasienijuuret ja kämmekkäsienijuuret. Pintasienijuurien rihmat kasvavat isäntäkasvin solujen välissä, mutta eivät tunkeudu soluseinän läpi solujen sisälle muodostaen tyypillisesti juuren pinnalle sienivaipan. Pintasienijuuria tavataan puuvartisilla kasveilla ja ne ovat lähinnä kanta- ja kotelosieniä. Sekatyypin sienijuuret muodostavat sisä- ja pintasienijuurille tyypillisiä rakenteita (Vestberg ym. 2018). Tässä tutkimuksessa keskityttiin tutkimaan vain keräsieniä, joten muiden sienijuurityyppien rakenteita ja toimintaa ei esitellä tarkemmin.

Keräsienijuuret ovat luonnossa sienijuurityypeistä yleisimpiä ja niitä esiintyy kaikissa kasvien kaarissa. Keräsienten lisääntymisyksikkönä voi toimia keräsienen itiö, kolonisoitunut juurenpätkä tai rihmastoverkosto. Keräsienten itiöt voivat itää ilman isäntäkasvia, mutta isäntäkasvin maahan erittämät yhdisteet voivat vaikuttaa itämiseen. Myös monet ulkoiset tekijät kuten maan pH, lämpötila, hiilidioksidi, ravinteet ja juuristovyöhykkeen muut mikrobit ovat tekijöitä, jotka voivat vaikuttaa itiöiden

itämiseen. Keräsienijuuret muodostavat juuren sisälle rihmastoja, keräsiä ja varastorakkuloita. Juuren ulkopuolelle keräsieni muodostaa juuren ulkopuolista rihmaa (Vestberg 2018).

Keräsienen muodostama rihma tunkeutuu ensin kasvin päällysketosolun seinämän läpi ja lopulta juuren kuorisolujen väleihin ja soluseinien läpi. Rihma ei kuitenkaan koskaan kasva kasvin solukalvojen läpi tai johtosolukkoon. Kun sienirihma on tunkeutunut kasvin kuorisolujen soluseinien sisäpuolelle, se haarautuu monta kertaa kahtia ja alkaa muodostaa keräsiä. Sienen ja kasvin välinen ravinteiden vaihto tapahtuu pääosin keräsissä. Kasvi muodostaa kerästen ympärille ympäriskalvon jatkumona kasvin solukalvolle. Keräset hajoavat noin 5–10 päivän jälkeen muodostumisesta, ja vaikka kuorisolu palautuu hajoamisen jälkeen sienikolonisaatioita edeltävään tilaan, sama kuorisolu voi myöhemmin kolonisoitua uudelleen. Jotkin keräsienet muodostavat soluväleihin ja kasvin soluseinien sisäpuolelle varastorakkuloita, jotka toimivat sienen varastorakenteina. Juuren ulkopuolinen rihmasto kehittyy samaan aikaan kerästen kanssa. Ensimmäinen sieni muodostaa isoja juoksurihmoja, joiden avulla se voi kasvaa pitkiä matkoja juurien välillä. Juuren ulkopuolinen rihma voi yhdistää useita kasveja toisiinsa. Koska keräsienet ovat vain osittain kasvilajikohtaisia, eri kasvilajit yhdistyvät usein samaan rihmastoverkoston. Kun juoksurihma on kasvanut kauemmaksi juuresta, se alkaa jakautumaan kahtia muodostaen viuhkamaisen rihmastoverkoston. Jakautumisen myötä rihmat pienenevät jopa vain 2 µm-kokoisiksi. Pienimmät rihmat ovat erityisen aktiivisia veden ja ravinteiden otossa (Vestberg 2018).

Ravinteiden ja veden oton lisäksi keräsienet voivat vaikuttaa kasvien kykyyn puolustautua erilaisia kasvinsyöjiä ja taudinaiheuttajia vastaan (Pozo & Azcón-Aguilar 2007). Kasvien puolustuskyvyn vahvistuminen keräsienisymbioosin myötä ei kuitenkaan johdu ainoastaan parantuneesta ravinteiden saannista. Keräsienet voivat myös parantaa kasvien kykyä reagoida taudinaiheuttajien ja kasvinsyöjien aiheuttamaan stressiin eri tavoin (Pozo & Azcón-Aguilar 2007). Keräsienellisillä kasveilla on esimerkiksi havaittu vähemmän *Fusarium*-suvun sienten infektoita (Benhamou ym. 1994). Keräsienten on havaittu myös vaikuttavan epäsuorasti kasvien puolustautumiseen. Guerriri ja muut. (2004) havaitsivat keräsienellisten kasvien houkuttelevan enemmän kasvinsyöjien parasitoideja verrattuna keräsienettömiin kasveihin. Tiettyjen keräsienten on myös havaittu vähentävän kasveihin kohdistuvaa kasvinsyöntiä (Roger ym. 2013).

1.5 Kiertotalous

Kiertotalous mahdollistaa resurssien tehokkaan käyttämisen ja erilaisten ohivirtojen hyödyntämisen (Deselnicu ym. 2018). Siipikarjan lanta sisältää paljon orgaanisessa muodossa olevia ravinteita ja sitä suositellaankin käytettäväksi lannoitteena. Lannoitteeksi käytettävä siipikarjan lanta saattaa kuitenkin sisältää jäämiä erilaisista lääkeaineista sekä torjunta-aineista, jotka ovat päätyneet lantaan rehun mukana (McKinnon 2014). Eläinrehussa käytetään usein soijaa lisäämään rehun proteiinipitoisuutta. Suurin osa maailmassa tuotetusta soijasta on glyfosaatille vastustuskykyiseksi geenimuunneltua, jolloin soijakasvustoa voidaan käsitellä GPH:illa useita kertoja kasvukauden aikana (Benbrook 2016; Myers ym. 2016). Geenimuunnellun rehun mahdollistamat kasvukauden aikana tapahtuvat ruiskutukset lisäävät torjunta-aineen jäämiä sadossa (Bøhn & Millstone 2019). Vaikka geenimuunneltua soijaa ei kasvateta EU:n alueella, Yhdysvalloista ja Latinalaisesta Amerikasta tuodaan huomattavia määriä soijaa rehuksi ja elintarvikkeiksi EU:n alueelle (Bøhn & Millstone 2019). Glyfosaattijäämät voivat päätyä rehun kautta esimerkiksi siipikarjan lantaan, koska glyfosaatti ei hajoa siipikarjan ruoansulatuksessa vaan saattaa jopa tiivistyä ulosteeseen (Ruuskanen ym. 2020). Lannoitteeksi käytettävän lannan torjunta-ainejäämien pitoisuuksia ei valvota riittävän tarkasti ja lannoitteen välityksellä viljelykasvit saattavat altistua glyfosaattijäämille.

1.6 GPH:iden ja glyfosaatin vaikutukset viljeltäviin kasveihin

GPH:t ja niiden hajoamistuotteet voivat vaikuttaa viljeltäviin kasveihin monella eri tavalla. Jos ravinteiden kierto tai muut vastaavat mekanismit maaperässä muuttuvat, kasvien ravinteiden saanti voi heikentyä. GPH:n on havaittu esimerkiksi madaltavan siementen ja lehtien mineraalipitoisuuksia (Cakmak ym. 2009), heikentävän kasvien kasvua ja siementen itävyyttä (Helander ym. 2019; Muola ym. 2021), mutta myös pieninä määrinä lisäävän kasvien kasvua (Velini ym. 2008). GPH:iden on havaittu myös aiheuttavan epämuodostumia mansikan kukissa ja marjoissa (Lieten 2006). Vaikutukset voivat johtua useista eri tekijöistä. GPH:t ja niiden hajoamistuotteet voivat vaikuttaa suoraan kasveihin, ravinteiden kiertoon maaperässä tai maaperän mikrobien välityksellä esimerkiksi vähentämällä sienijuurikolonisaatiota heikentäen kasvien mikroravinteiden saantia. Heikentynyt ravinteiden saanti puolestaan heikentää kasvien kasvua,

lisääntymistä ja kasvien kykyä puolustautua kasvinsyöjiä ja taudinaiheuttajia vastaan (Roger ym. 2013).

1.7 Tutkimuksen tavoite

GPH:t ja niiden hajoamistuotteet voivat muuttaa maaperän mikrobien toimintaa ja yhteisöjen koostumusta (Busse ym. 2001; Nguyen ym. 2016), ravinteiden kiertoa maaperässä (Gimsing ym. 2004), häiritä kasvien kasvua ja lisääntymistä (Lieten 2006; Helander ym. 2019; Muola ym. 2021) sekä vaikuttaa kasvien kykyyn tuottaa puolustusyhdisteitä (Fuchs ym. 2021). Vaikutukset ei-kohde kasveihin eivät ole aina suoria, vaan saattavat johtua muutoksista maaperän mikrobiyhteisöissä ja ravinteiden kierrosta. Aineille altistuminenkin saattaa tapahtua vahingossa, lannoitteen tai maaperään kertymisen kautta (Laitinen ym. 2006; Muola ym. 2021).

Tutkimuksen tarkoituksena on selvittää vaikuttavatko lannoitteen mukana kulkeutueet GPH:n ja sen hajoamistuotteiden jäämät ylivuotisesti mansikan (*Fragaria x vescana* A.Bauer & Rud.Bauer) kasvuun, lisääntymiseen, kasveihin kohdistuneeseen kasvinsyöntiin tai mansikan sienijuuriin. Hypoteesina on, että GPH-käsittelyllä olisi kasvua, lisääntymistä ja sienijuuria vähentäviä vaikutuksia sekä kasvinsyöntiä vähentävä vaikutus.

2 Aineisto ja menetelmät

2.1 Koe-asetelma

Kokeessa tutkittiin lannoitteen mukana kulkeutuvan GPH:n ja sen hajoamistuotteiden ylivuotista vaikutusta mansikan (*Fragaria x vescana*) sienijuuriin, kasvuun, lisääntymiseen ja kasvinsyöjien aiheuttamiin vaurioihin. Koe toteutettiin Ruissalossa Turun yliopiston kasvitieteellisellä puutarhalla (60°26' N, 22°10' E) sijaitsevalla koepellolla kesällä 2020. Koepelto perustettiin syksyllä 2018. Pellolle levitettiin lannoitteeksi japaninviiriäisen (*Coturnix japonica* Temminck & Schelgel) ulostetta sisältävää kuiviketta. Kuivike kerättiin kokeesta, jossa japaninviiriäisiä oli ruokittu rehulla, joka oli käsitelty Roundup Flex -nimisellä glyfosaattivalmisteella ja se sisälsi glyfosaattijäämiä (Ruuskanen ym. 2019, 2020). Kontrollikäsitteilyn lannoite oli peräisin saman kokeen kontrolliryhmän viiriäisiltä, joiden ruoka ei sisältänyt glyfosaattia.

Viiriäisiä ruokittiin luomurehulla ("Luonnon punahelppä" Danish Agro, Tanska), johon sekoitettiin glyfosaattipohjaista Roundup Flex® -rikkakasvintorjunta-ainetta. Roundup Flex® -glyfosaattivalmisteessa glyfosaatti on kaliumsuolana. Rehua ja glyfosaattivalmistetta sekoitettiin suhteessa, jolla rehun glyfosaattipitoisuudeksi saatiin noin 160 mg glyfosaattia / kg. Määrä vastaa 12–20 mg / paino kg päivittäistä saantia täysikasvuiselle japaninviiriäiselle. Euroopan elintarviketurvallisuusviraston (EFSA) mukaan siipikarjalle päivittäisen saannin enimmäismäärä kuivarehussa on 33,4 mg / kg ja 2,28 mg / paino kg, mutta haitaton annostaso (NOAEL) 100 mg / paino kg (EFSA 2018). Lintuja ruokittiin glyfosaattivalmisteella käsitellyllä rehulla 10 päivän iästä 12 kuukauden ikäisiksi. 12 kuukauden altistuksen jälkeen keskimääräinen glyfosaatin määrä lintujen eritteissä oli 199 mg/kg (SE = ±10,5 mg/kg). Kontrolliryhmän eritteissä ei havaittu mitattavia määriä glyfosaattia. Linnut kasvatettiin pareittain 1 m² kokoisissa lattiahäkeissä. Häkkejä oli yhteensä 38 kappaletta ja lintuja 76 kappaletta. Häkkien pohjalle oli levitetty kuivikkeeksi puulastuja. Kuivikkeet, joihin sekoitettiin ulostetta ja pieniä määriä rehua, vaihdettiin häkeistä joka toinen viikko (Ruuskanen ym. 2019, 2020).

Tätä koetta varten kuivike kerättiin talteen neljän kuukauden ajalta sen jälkeen, kun linnut olivat altistuneet GPH:lla käsitellylle rehulle kahdeksan kuukautta. Tämän neljän kuukauden ajan lintujen altistuminen glyfosaatille jatkui. Kuivike kerättiin talteen sen vaihtamisen yhteydessä. Kuivike säilöttiin suljetuissa muovisäkeissä enimmillään kahdeksan kuukauden ajan kuivassa ja pimeässä varastossa +6 °C lämpötilassa. Kerättyä kuiviketta käytettiin lannoitteena peltokokeessa. Ennen lannoitteiden levittämistä koepelto jaettiin 6 x 6 ruudukkoon eli yhteensä 36 noin 1 m² kokoiseen ruutuun. Ruudut erotettiin toisistaan hamppukuidusta valmistetulla kätteellä. Kontrolli- ja käsittelyruudut järjestettiin shakkiruudukko-asetelmaan niin, että joka toiselle ruuduista levitettiin lannoitteeksi kuiviketta, joka sisälsi glyfosaattia ja joka toiselle ruudulle kontrollikäsittelyssä kasvaneilta linnuilta kerättyä kuiviketta (Kuva 2). Kuivikkeet levitettiin koepellolle kahdessa vaiheessa 31.8.2018 ja 7.5.2019. Jokaiselle ruudulle levitettiin yhteensä noin 25 l kuiviketta, joka painoi noin 3,8 kg.



Kuva 2. Kuva koepellosta kesällä 2019.

Keväällä 2019 kuivikkeiden levittämisen jälkeen kuivikkeesta otettiin näytteet, joista analysoitiin glyfosaatin ja sen hajoamistuotteiden pitoisuuksia. Ruuduilla, joille oli levitetty glyfosaattia sisältävää lannoitetta, glyfosaattia oli 158 mg/kg, glufosinaattia < 0,01 mg/kg ja AMPA:aa 1,3 mg/kg. Kontrolliruuduilla vastaavat arvot olivat 0,17 mg/kg, < 0,01 mg/kg ja 0,05 mg/kg. Keväällä 2020 noin vuosi kuivikkeiden levittämisen jälkeen pellolta otettiin maaperänäytteet maaperäkairalla noin 12 cm syvyydestä. Maaperänäytteissä glyfosaatin ja sen hajoamistuotteiden pitoisuudet olivat huomattavasti matalammat kuin kuivikkeesta otetuissa näytteissä. Glyfosaattia oli jäljellä enää 0,13 mg/kg, glufosinaattia < 0,01 mg/kg ja AMPA:aa 0,23 mg/kg. Kontrolliruutujen näytteistä ei löytynyt jäämiä. Kaikki näytteet analysoitiin Groen Agro Control:in laboratoriossa (<https://agrocontrol.nl/en/home-en/>).

Tutkimuskasvina käytettiin Saaranmansikka (*Fragaria x vescana*) -nimistä mansikkalajiketta. Lajike on ahomansikan ja puutarhamansikan risteytys. Jokaiseen ruutuun istutettiin kaksi mansikkaa 27.9.2018 eli yhteensä kasveja oli 72 kappaletta. Vaikka kasvit oli istutettu pareittain ruutuihin, jokaista kasvia käsiteltiin toistona, koska ruudut oli järjestetty shakkiruudukko-asetelmaan, jolloin ympäristötekijöiden vaikutus oli satunnaistettu.

2.2 Kasvun mittaus

Kasvien kasvua tutkittiin mittaamalla kasvien kokoa kolmena ajankohtana kasvukauden aikana ja biomassaa punnittiin kokeen päättyessä. Kasvien kokoa mitattiin tilavuusindeksillä. Tilavuusindeksi laskettiin mittaamalla lehtiruusukkeeseen halkaisija ja korkeus (cm) ja kertomalla ne keskenään. Tilavuusindeksiä käytettiin kasvien koon mittaamiseen myös edellisenä kesänä (Muola ym. 2021). Ensimmäinen mittaus tehtiin kasvukauden alussa 22.5.2020. Seuraavan kerran kokoa mitattiin kasvukauden puolivälissä 16.7.2020. Kolmas mittaus suoritettiin 17–19.8.2020. Kasvien biomassaa mitattiin sienijuurinäytteiden keräyksen yhteydessä 20–21.8.2020. Puolet kasveista eli 36 kasvia kaivettiin maasta juurineen sienijuurinäytteiden keräämistä varten ja näistä kasveista mitattiin myös juurien ja verson biomassaa punnitsemalla. Versojen biomassat punnittiin yhteensä 29 kasvista. Versot kerättiin 36 kasvista mutta seitsemän näytettä hävisi kuivauksen ja punnituksen välissä kasveja siirrettäessä paikasta toiseen. Juurien biomassat punnittiin kaikista 36 kerätystä kasvista. Juuret ja versot kuivattiin ja varastoitiin kasvien kuivaushuoneessa, jossa oli tehokas ilmanvaihto ja noin 22 °C lämpötila. Ennen punnitsemista kasvit kuivattiin vielä kuivausuunissa 40 °C lämpötilassa 24 tunnin ajan.

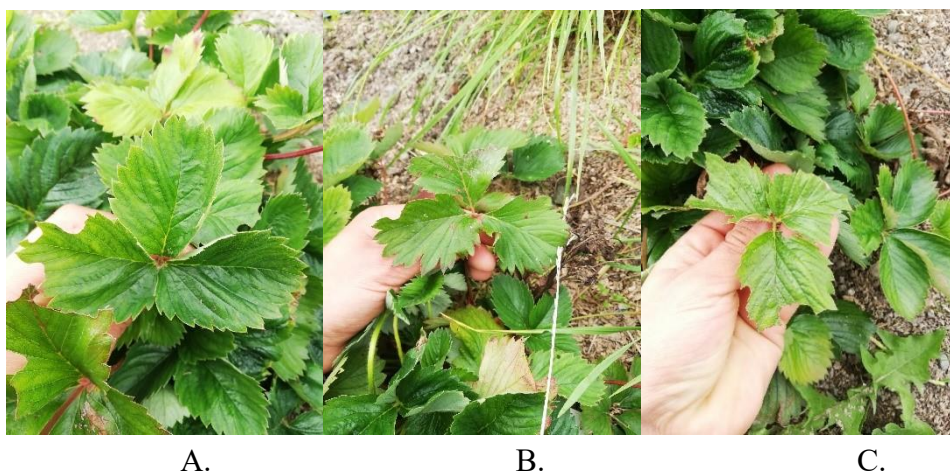
2.3 Lisääntymisen mittaus

Kasvien suvullista lisääntymistä mitattiin laskemalla kukkien ja marjojen lukumäärät. Vegetatiivista lisääntymistä mitattiin punnitsemalla rönsyjen biomassaa. Kukkien ja marjojen lukumäärän lisäksi laskettiin myös epämuodostuneet marjat ja kukat erikseen. Kukat laskettiin epämuodostuneeksi, jos ne eivät olleet symmetrisiä. Marjat laskettiin epämuodostuneiksi, jos ne eivät olleet symmetrisiä tai niiden siemenet eivät olleet marjan pinnalla. Epämuodostuneiden kukkien ja marjojen lukumäärät laskettiin, koska pölyttäjät saattavat välttää epämuodostuneita kukkia ja epämuodostuneiden marjojen siemenet eivät välttämättä ole yhtä elinvoimaisia tai niitä ei välttämättä ole yhtä paljon kuin normaaleissa marjoissa. Molemmissa tapauksissa epämuodostumilla siis voi olla vaikutusta lisääntymiseen. Kukkien laskeminen tehtiin kolmessa vaiheessa 4.6, 11.6 ja 18.6.2020, koska kaikki kukat eivät kehittyneet samaan aikaan. Marjat laskettiin ja kerättiin kahdessa vaiheessa 17.7 ja 24.7.2020, koska nekään eivät kehittyneet samaan aikaan. Saman koeruudun kahden kasvin marjat punnittiin yhdessä, koska niiden määrä oli niin suuri, että jokaisen kasvin marjojen säilyttäminen erillisessä rasiassa olisi vaatinut liian paljon tilaa. Marjat säilytettiin keräämisen jälkeen pakastimessa ennen punnitsemista. Rönsyt

kerättiin kasveista 23.7.2020, jonka jälkeen ne kuivattiin ja punnittiin. Kuivaus tapahtui huoneenlämpöisessä (20 °C) kuivaushuoneessa, jossa oli tehostettu ilmanvaihto.

2.4 Kasvinsyöjien aiheuttamien vaurioiden mittaus

Kasvinsyöntiä mitattiin lehdistä, kukista ja marjoista. Lehtiin kohdistunutta kasvinsyöntiä tutkittiin 17-19.8.2020 laskemalla vaurioituneiden lehtien lukumäärä. Lehdet, joissa oli selkeästi vaurioita, jaettiin kolmeen luokkaan vaurion määrän perusteella: 10 % <, 10-20 % ja > 20 % vaurioita per lehti (Kuva 3). Vaurion määrä arvioitiin silmämääräisesti. Vauriot lehdistä olivat pääosin pureskelevien hyönteisten aiheuttamia (Hymenoptera, Lepidoptera ja Coleoptera). Kukkiin ja marjoihin kohdistunutta kasvinsyöntiä mitattiin laskemalla vaurioituneiden kukkien ja marjojen lukumäärä. Kukista arviointi tehtiin 17.6.2020 ja marjoista 17.7.2020. Kukissa ja marjoissa vaurion määriä ei arvioitu vaan kukka tai marja laskettiin vaurioituneeksi, jos siinä oli selkeästi vaurioita, kuten reikiä terälehdissä tai marjan pinta oli hajonnut. Marjoihin kohdistunut kasvinsyönti oli rastaslintujen (Turdidae) aiheuttamaa.



Kuva 3. Lehtiä syövien hyönteisten vaurioittamia mansikanlehtiä. Kuvissa näkyvät vauriot ovat pääasiassa sahapistiäisten (Symphyta) toukkien aiheuttamia. Kuvassa A lehdessä vaurioita <10 %, B 10–20 % ja C > 20 %.

2.5 Sienijuurinäytteiden keräys, värjäys ja mikroskopointi

2.5.1 Näytteiden keräys

Sienijuurinäytteet kerättiin 20-21.8.2020. Näytteenotto toteutettiin kaivamalla kasvi juuristoineen ylös maasta. Juuret pestiin vedellä suihkuttelemalla ja huljuttelemalla vedellä täytetyssä saavissa. Tämän jälkeen pieni osa juurista irrotettiin juuristosta ja

pestiin tarkemmin. Kun noin 20–30 cm juuria oli pesty huolellisesti, ne jaettiin kahteen osaan 2 ml Eppendorf-putkiin. Toinen putkista säilöttiin pakastamalla -20 °C ja toinen täytettiin 50 % etanolilla ja säilöttiin huoneenlämmössä

2.5.2 Värjäys

Juuret värjättiin sovelletulla Philips & Haymanin menetelmällä (1970). Ensimmäiseksi tehtiin testivärjäys menetelmän soveltuvuuden testaamiseksi. Testivärjäyksessä käytettiin yhtä pakastettua näytettä ja yhtä 50 % etanolissa huoneenlämmössä säilöttyä näytettä.

Ensimmäiseksi juuret käsiteltiin kaliumhydroksidilla (10 %), jonka jälkeen ne siirrettiin tyhjiin Eppendorf-putkiin ja peitettiin kaliumhydroksidiliuoksella (10 %). Putket laitettiin 15 minuutin ajaksi 90 °C lämpötilaan. Käsitelyn tarkoituksena oli vaalentaa ja pehmentää juuria preparaattien valmistusta ja mikroskopointia varten. Seuraavaksi juuret käsiteltiin suolahapolla (0,1 M). Kaliumhydroksidi poistettiin Eppendorf-putkista pipetoimalla ja tilalle pipetoitiin suolahappoliuosta niin, että juuret peittyivät. Näytteitä pidettiin suolahappoliuoksessa 10 minuutin ajan. Suolahappokäsittelyn tarkoitus oli neutraloida juuret, jotta ne värjäytyisivät paremmin.

Suolahappoliuuskäsittelyn jälkeen näytteet värjättiin 0,05 % trypaaninsini-laktoglyseroli-liuoksella. Liuoksessa käytetty laktoglyseroli oli 50 % maitohappoa ja 50 % glyserolia. Suolahappo poistettiin putkista pipetoimalla ja tilalle pipetoitiin 0,05 % trypaaninsini-laktoglyseroli-liuos. Näytteitä sekoitettiin lyhyesti Vortex-koeputkiravistelijalla, jotta väriaine tarttuisi joka puolelle juuria. Seuraavaksi näytteet laitettiin 60 minuutin ajaksi 100 °C lämpötilaan (Grant QBT2 -inkubaattori).

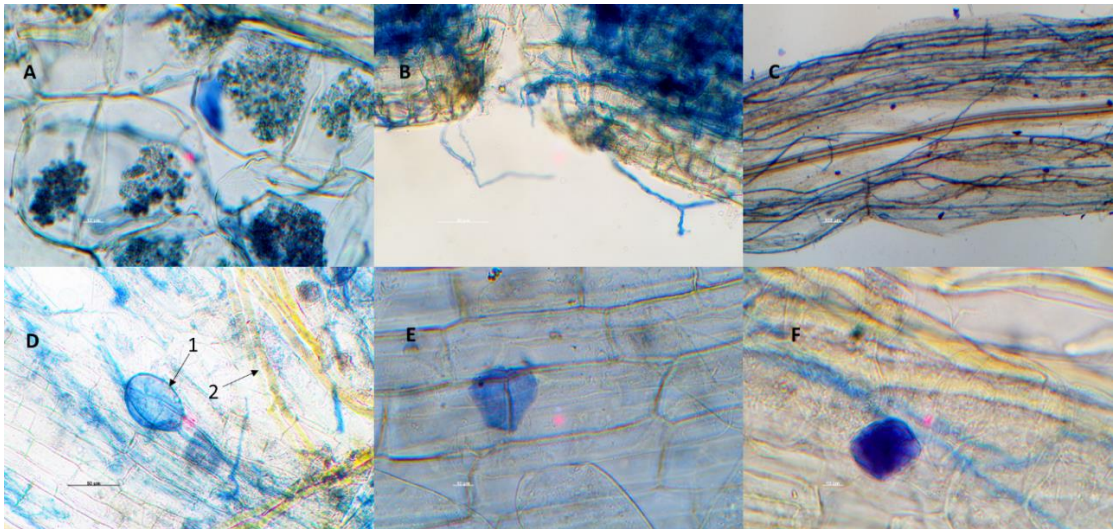
Suolahappokäsittelyn jälkeen värjäytyneet juuret siirrettiin uusiin Eppendorf-putkiin, jotka täytettiin säilytysliuoksella ja sekoitettiin lyhyesti Vortex-koeputkiravistelijalla. Säilytysliuoksena käytettiin 50 % laktoglyseroliliuosta ja näytteet säilöttiin huoneenlämmössä.

Testivärjäyistä näytteistä tehtiin kolme kappaletta testipreparaatteja, joihin laitettiin eri paksuisia juuria. Testipreparaattia mikroskopoidessa huomattiin, että ohuimmista juurista sienirakenteet erottuivat paremmin kuin paksuista. Eri tavalla säilöttyjen näytteiden välillä ei ollut huomattavaa eroa sienirakenteiden määrässä tai siinä, miten ne näkyivät mikroskopoidessa. Etanolissa säilötyt näytteet värjättiin noudattaen edellä mainittua protokollaa. Tarkasteltaessa näytteistä tehtyjä preparaatteja huomattiin, että

näytteet eivät olleet värjäytyneet yhtä hyvin kuin testikierroksella. Protokollaa muokattiin ja tehtiin uusi testivärjäys. Suolahappoliuoskäsittely tehtiin kaksi kertaa, jotta väriaine tarttuisi sienijuuriin paremmin. Ensin juuria pidettiin liuoksessa 10 minuuttia, jonka jälkeen liuos vaihdettiin uuteen ja pidettiin juuria uudessa liuoksessa toiset 10 minuuttia. Trypaaninsini-värjäyksessä käytettiin uutta väriainetta. Aikaisemmin käytetty väriaine oli kertaalleen käytettyä eli väriainetta oli käytetty juurien värjäykseen ja pipetoitu takaisin säilytyspulloon. Toisella testikerralla juuret värjäytyivät paremmin kuin aikaisemmin ja seuraavaksi värjättiin kaikki pakastetut näytteet ja osasta niistä valmistettiin preparaattit mikroskopointia varten. Preparaatit valmistettiin levittämällä objektilasille muutama pisara säilöntäliuosta ja asettelemalla noin 10 cm pituudelta juuren paloja lasille. Juurien päälle painettiin 22 mm x 22 mm kokoinen peitinlasi niin, että juuret liiskaantuivat hieman ja ylimääräinen säilytysliuos poistettiin imupaperilla. Peitinlasin reunat tiivistettiin kynsilakalla ilmatiiviiksi. Kaikissa näytteissä ei ollut tarpeeksi ohuimpia juuria, joten vain osasta näytteistä valmistettiin preparaattit. Yhteensä 24 näytteestä valmistettiin preparaattit. Näistä 10 oli peräisin kontrollikäsittelystä ja 14 glyfosaattikäsittelystä.

2.5.3 Mikroskopointi

Näytteet mikroskoipoitiin McGoniglen ja muiden (1990) ”The magnified intersection method”-menetelmän mukaisesti valomikroskoopilla 200 x suurennoksella (10 x okulaari ja 20 x objektiivi). Jos rakenteet eivät erottuneet selkeästi käytettiin välillä 400 x (10 x okulaari ja 40 x objektiivi) suurennosta niiden tarkempaan tarkasteluun. Näytteet käytiin läpi asettamalla mikroskoopin näkymä preparaatin oikeaan yläreunaan ja näkymää liikutettiin edestakaisin. Aina preparaatin reunalla näkymää siirrettiin niin, että aikaisemman näkymän reunasta tuli uuden näkymän keskipiste. Jokaisesta juurinäkymästä, joka osui okulaarin ristikon pystyviivaan, laskettiin juuren pinnalla ja soluissa näkyvät sienirakenteet ja -rihmat. Lasketut rakenteet luokiteltiin 7 eri ryhmään, joita olivat keräset, sienirihma, ruskea sienirihma, vesikkelit, sienirihma juuren ulkopuolella, pyöreät rakenteet ja tuntemattomat rakenteet (Kuva 4). Rakenteet laskettiin vain, jos juuresta pystyi erottamaan johtojänteen ja erottamaan selkeästi juuren ulkopinnan. Jokaisesta näytteestä laskettiin yhteensä 50 juurinäkymää (McGoniglen ym. 1990).



Kuva 4. Trypaaninsinisellä värjättyjä mansikan juuria ja sienirakenteita. A) keräsiä, B) juuren ulkopuolista rihmaa, C) kokonainen juurinäkymä, D) 1 vesikkeli, 2 ruskeaa rihmaa, E) tuntematon rakenne, F) pallomainen rakenne ja sienirihmaa.

2.6 Tilastolliset analyysit

Tilastolliset analyysit suoritettiin SAS Enterprise Guide -tilasto-ohjelmalla. Datan hallinointiin käytettiin Microsoft Excel -ohjelmaa. Eroja eri muuttujissa vertailtiin käsittelyiden välillä GLIMMIX-proseduurilla (*Generalized Linear Mixed Models*) muodostetuilla yleistetyillä lineaarisilla malleilla. Kaikissa analyyseissä käytettiin käsittelyä selittävänä tekijänä. Kasvien kasvua kuvaavassa mallissa käytettiin toistomallia, koska kasvua mitattiin kolme kertaa kasvukauden aikana. Kasvua, lisääntymistä ja kasvinsyöntiä kuvaavien muuttujien, verson ja juurten biomassa, marjojen ja kukkien lukumäärä, epämuodostuneiden kukkien ja marjojen määrä, vegetatiivista lisääntymistä kuvaavan rönsyjen biomassa ja vaurioituneiden lehtien lukumäärien residuaalit olivat normaalisti jakautuneita, joten malleissa käytettiin normaalijakaumaa. Kasvien kokoa ja lisääntymistä kuvaavissa malleissa käytettiin kovariaattina vuoden 2019 kokoa, koska monivuotisena kasvina mansikan edellisen vuoden kasvu voi vaikuttaa seuraavan vuoden kasvuun ja lisääntymiseen. Kasvinsyöjien aiheuttamiin vaurioihin liittyvissä malleissa käytettiin kovariaattina vuonna 2020 elokuussa mitattua kokoa, koska suurempiin kasveihin on havaittu kohdistuvan enemmän kasvinsyöntiä. Jos kovariaatin ja muuttujan välinen interaktio ei ollut tilastollisesti merkitsevä tai pelkän kovariaatin vaikutus ei ollut merkitsevä, ne jätettiin pois mallista. Jos kovariaatilla oli tilastollisesti merkitsevä vaikutus muuttujalla ja kovariaatilla tehtiin regressio analyysi reg -proseduurilla ja korrelaation suunta tarkistettiin. Sienijuuri-kolonisaation analysointiin käytettiin myös GLIMMIX-proseduurilla muodostettuja

yleistettyjä lineaarisia malleja, mutta koska eri rakenteiden lukumäärät näytteissä ei voitu olettaa olevan normaalijakautuneita malleissa käytettiin negatiivista binomijakaumaa. Sienirihmojen esiintyvyyksiä kuvaavissa malleissa käytettiin normaalijakaumaa.

3 Tulokset

Glyfosaatin ja sen hajoamistuotteiden AMPA:n ja glufosinaatin määrät olivat vuonna 2020 maaperässä huomattavasti pienemmät verrattuna aikaisemman vuoden 2019 kuivikkeesta mitattuihin pitoisuuksiin (Taulukko 1).

Taulukko 1. Glyfosaatin ja sen hajoamistuotteiden AMPA:n ja glufosinaatin pitoisuudet vuosina 2019 ja 2020.

Vuosi	2019	2020
glyfosaatti mg/kg	158	0,13
AMPA mg/kg	1,3	0,23
glufosinaatti mg/kg	< 0,01	< 0,01

Taulukko 2. Lineaaristen mallien tulokset glyfosaattipohjaisen herbisidin (GPH) jäämien ylivuotista vaikutuksista mansikan (*Fragaria x vesca*) kasvuun, lisääntymiseen ja kasvinpsyöjen aiheuttamiin vaurioihin. Kasvua mitattiin volyymi-indeksillä ja versojen ja juurien biomassalla. Lisääntymistä mitattiin laskemalla kukkien ja marjojen lukumääriä ja rönkyjen biomassalla. Kasvinpsyöjen aiheuttamaa vauriota arvioitiin laskemalla vaurioituneiden lehtien lukumääriä

Muuttuja	F	Ndf, ddf	p	käsittely	keskiarvo estimaatti	alempi keskiarvo- estimaatti	ylempi keskiarvo- estimaatti	alempi luotta- musra- ja	ylempi luotta- musra- ja	Kovanaaatti	Ndf, ddf	F	p
Koko	0,01	1, 68	0,9094	GPH	961,93	922,14	1001,73	39,79	39,8	Kasvin koko 2019	1,68	26,73	<0,0001
				Kontrolli	964,03	924,47	1003,6	39,56	39,57				
Verson biomassa	0,54	1, 25	0,4698	GPH	148,21	130,35	166,07	17,86	17,86	Kasvin koko 2019	1,25	14,73	0,0007
				Kontrolli	139,39	122,8	155,99	16,59	16,60				
Juurien biomassa	2,7	1, 32	0,11	GPH	14,4431	12,84	16,0423	1,60	1,60	Kasvin koko 2019	1, 32	14,73	0,0007
				Kontrolli	12,6345	11,08	14,1882	1,55	1,55				
Kukkien lkm.	0	1, 68	0,9743	GPH	100,05	87,15	112,95	12,90	12,90	Kasvin koko 2019	1, 68	16,09	0,0002
				Kontrolli	99,7534	87,04	112,46	12,71	12,71				
Marjojen lkm.	0,02	1, 68	0,8935	GPH	38,9635	32,2	45,725	6,76	6,76	Kasvin koko 2019	1, 68	9,31	0,0033
				Kontrolli	39,6188	32,95	46,281	6,67	6,66				
Rönkyjen biomassa	0,00	1, 69	0,9631	GPH	43,387	39,91	46,8598	3,48	3,47	Kasvin koko 2019			
				Kontrolli	43,2735	39,84	46,6977	3,43	3,42				
Kaiikkien vaurioituneiden lehtien lkm.	3,46	1, 69	0,067	GPH	49,6695	44,41	54,9214					27,78	<0,0001
				Kontrolli	56,6083	51,35	61,8602	5,26	5,25	Koko elokuu 2020	1, 69		
< 10 % vauriolehtien lkm.	3,61	1, 67	0,0617	GPH	43,9762	39,74	48,2049					26,55	<0,0001
				Kontrolli	49,681	45,45	53,9097	4,24	4,23	Koko elokuu 2020		1,67	
10- 20 % vauriolehtien lkm.	0,45	1, 67	0,5029	GPH	4,1101	2,48	5,7403	1,63	1,63	Kasvin koko elokuu 2020		6,65	0,0121
				Kontrolli	4,8899	3,25	6,52	1,64	1,63				
> 20 % vauriolehtien lkm.	0,88	1, 68	0,3524	GPH	1,3714	0,76	1,9742	0,61	0,60				
				Kontrolli	0,9714	0,36	1,5742	0,61	0,60				
Syötyjenmarjojen lkm.	0,52	1, 70	0,4726	GPH	1,4722	0,97	2,2121						
				Kontrolli	1,8056	1,22	2,6661	0,50	0,74				
Vaurioituneiden kukkien lkm.	0,08	1, 69	0,7734	GPH	1,3398	0,99	1,7996	0,35	0,46	Kasvin koko elokuu 2020		4,48	0,0379
				Kontrolli	1,2606	0,92	1,7114	0,34	0,45				
Epämuodostuneiden marjojen lkm.	2,4	1, 69	0,1257	GPH	26,6302	22,32	30,9369	4,31	4,31	Kasvin koko 2019	1, 69	31,88	<0,0001
				Kontrolli	31,3698	27,06	35,6766	4,31	4,31				
Epämuodostuneiden kukkien lkm.	3,2	1, 70	0,078	GPH	5,1667	4,22	6,1085	0,95	0,94				
				Kontrolli									

Taulukko 3. Lineaaristen mallien tulokset glyfosaattipohjaisen herbisidin (GPH) jäämien ylivuotista vaikutuksista mansikan (*Fragaria x vescana*) sienijuuriin. Sienijuurista laskettiin kolonisaatioprosentti ja eri sienirakenteiden määrät

Muuttuja	F	Ndf, ddf	p	käsittely	keskiarvo estimaatti	alempi keskiarvo- estimaatti	ylempi keskiarvo- estimaatti	alempi luotta- musra- ja	ylempi luotta- musra- ja
Sienirihman prosentiosuudet	3,36	1, 22	0,0804	GPH	0,9429	0,91	0,9744	0,03	0,03
				Kontrolli	0,986	0,94	1,0233	0,05	0,04
Vesikkeliemien lkm.	1,75	1, 22	0,1998	GPH	13,2857	5,89	29,9382	7,40	16,65
				Kontrolli	29,5	11,38	76,4311	18,12	46,93
Kerästen lkm.	0,63	1, 22	0,436	GPH	92,2858	70,13	121,44	22,16	29,15
				Kontrolli	78,3999	56,58	108,62	21,82	30,22
Ruskeanrihman lkm.	0,09	1, 22	0,7656	GPH	18,7858	13,38	26,3591	5,41	7,57
				Kontrolli	17,3999	11,62	26,0367	5,78	8,64
Juuren ulkopuolisen rihman lkm.	0,01	1, 22	0,9086	GPH	1,2857	0,58	2,8294	0,71	1,54
				Kontrolli	1,2	0,46	3,0904	0,74	1,89
Tuntemattomien rakenteiden lkm.	0,33	1, 22	0,5719	GPH	3,3571	2,41	4,6646	0,95	1,31
				Kontrolli	2,9	1,91	4,3887	0,99	1,49
Pallomaisten rakenteiden lkm.	0,02	1, 22	0,8834	GPH	7,9286	3,8	16,5321	4,13	8,60
				Kontrolli	8,6	3,61	20,4665	4,99	11,87

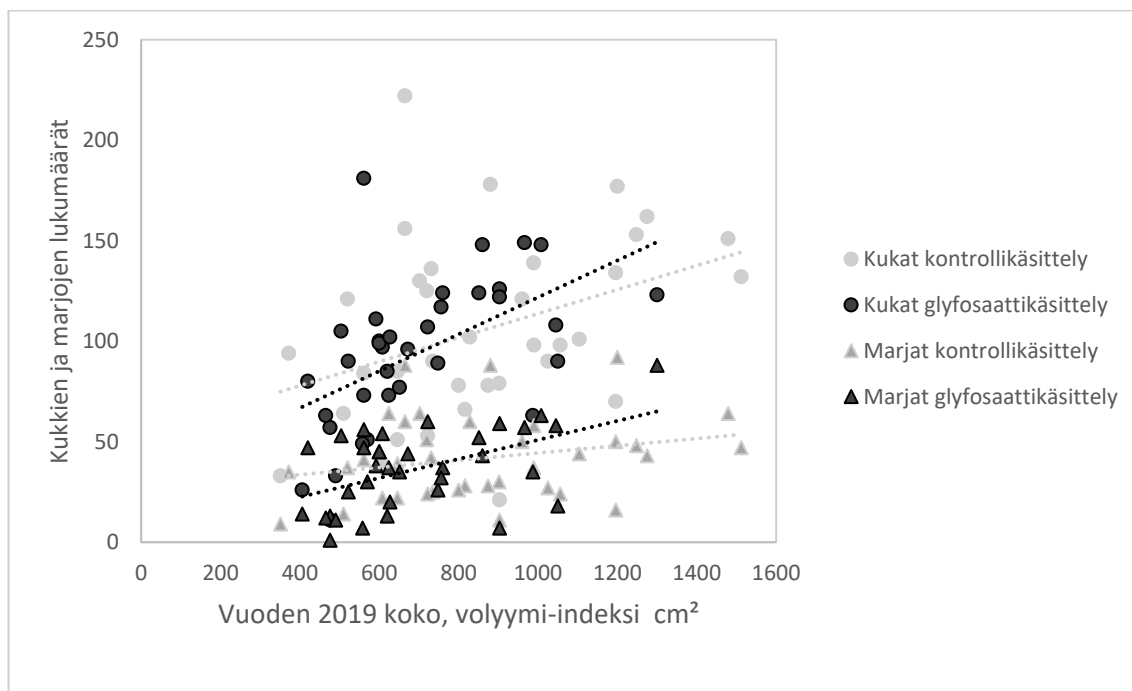
3.1 Kasvu

Kokoa kuvaavissa muuttujissa ei ollut olleet tilastollisesti merkitseviä eroja käsittelyiden välillä (Taulukko 2). Kontrolliryhmän kasvit kasvoivat keskimäärin 964 cm² kokoisiksi ja GPH-käsittelyssä 961 cm² kokoisiksi (Taulukko 2). Versojen biomassaa kasvit tuottivat GPH-käsittelyssä keskimäärin 148 g ja kontrolliryhmän kasvit 139 g (Taulukko 2). Kontrolliryhmän kasvit tuottivat juuribiomassaa keskimäärin 12,6 g ja GPH-käsittelyssä 14,4 g (Taulukko 2). Tilastomalleissa käytetyllä vuoden 2019 koolla oli merkitsevä vaikutus kaikissa kasvien koko kuvaavissa malleissa (Taulukko 2.) Myös 2019 koon ja mittauskerran välinen yhdysvaikutus oli tilastollisesti merkitsevä kasvien kokoa kuvaavassa toistomittausmallissa ($F_{2, 68} = 9,97, p = <0,001$).

3.2 Lisääntyminen

Lisääntymistä kuvaavien muuttujien välillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja käsittelyiden välillä (Taulukko 2). GPH-käsittelyssä kasvit tuottivat kukkia keskimäärin 100 kpl ja kontrolliryhmän kasvit 99,7 kpl (Taulukko 2). GPH-käsittelyssä kasvit tuottivat marjoja keskimäärin 38,9 kpl ja kontrolliryhmän 39,6 kpl (Taulukko 2). Kukkien ja marjojen määriä kuvaavissa malleissa kovariaattina käytetyllä, vuoden 2019 koolla, oli positiivinen korrelaatio molempien kanssa eli vuonna 2019 suuremmiksi

kasvaneet kasvit tuottivat enemmän kukkia ja marjoja (Kuva 5, Taulukko 2). GPH-käsittelyssä kasvit tuottivat rönsybiomassaa keskimäärin 43,4 g ja kontrolliryhmän kasvit 43,3 g (Taulukko 2). GPH-käsittelyssä kasvit tuottivat epämuodostuneita kukkia keskimäärin 5,1 kpl ja kontrolliryhmän kasvit 4 kpl (Taulukko 2). GPH-käsittelyssä kasvit tuottivat epämuodostuneita marjoja keskimäärin 26,6 kpl ja kontrolliryhmän kasvit 31,4 kpl (Taulukko 2).

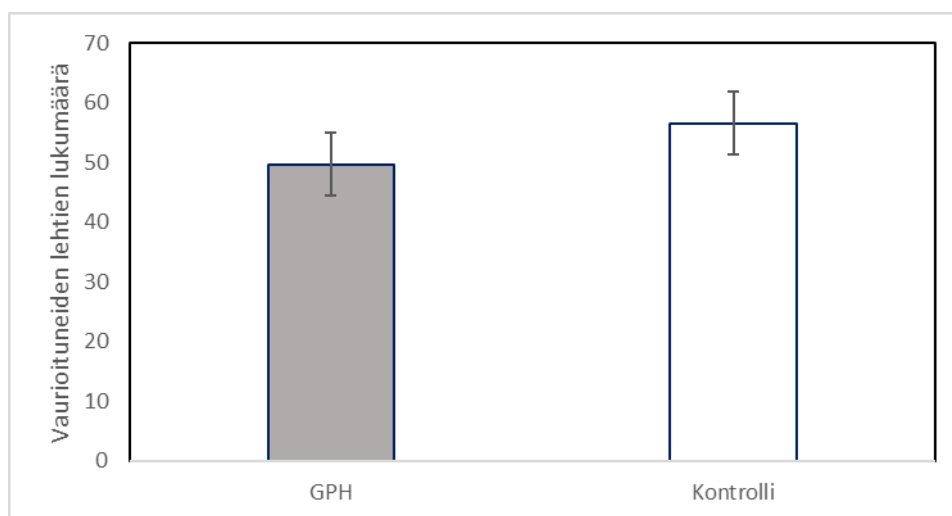


Kuva 5. Glyfosaattipohjaisen herbisidi-käsittelyn (GPH) ja kontrolliryhmän kukkien ja marjojen lukumäärien välinen korrelaatio vuoden 2019 koon kanssa.

3.3 Kasvinsyöjien aiheuttamat vauriot

Kasvin syöjien aiheuttamien vaurioiden määrissä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja käsittelyiden välillä (Taulukko 2). GPH-käsittelyssä kaikkien vaurioituneiden lehtien lukumäärä oli keskimäärin 49,7 kpl ja kontrolliryhmän kasveilla 56,6 kpl (Taulukko 2, kuva 6). GPH-käsittelyssä lehtien lukumäärä, joissa vauriota oli < 10 %, oli keskimäärin 44 kpl ja kontrolliryhmän kasveilla 49,7 kpl (Taulukko 2). GPH-käsittelyssä lehtien lukumäärä, joissa vauriota oli 10–20 %, oli keskimäärin 4,1 kpl ja kontrolliryhmän kasveilla 4,9 kpl (Taulukko 2). GPH-käsittelyssä lehtien lukumäärä, joissa vauriota oli > 20 %, oli keskimäärin 1,3 kpl ja kontrolliryhmän kasveilla 1 kpl (Taulukko 2). GPH-käsittelyssä vaurioituneiden kukkien lukumäärä oli keskimäärin 1,3 kpl ja kontrolliryhmän kasveilla 1,2 kpl (Taulukko 2). GPH-käsittelyssä vaurioituneiden marjojen lukumäärä oli keskimäärin 1,5 kpl ja kontrolliryhmän kasveilla 1,8 kpl (Taulukko 2). Kaikkien vauriolehtien lukumäärää, lehtien, joissa vauriota oli < 10 % lukumäärää, lehtien, joissa vauriota oli 10–20 % lukumäärää ja vaurioituneiden kukkien

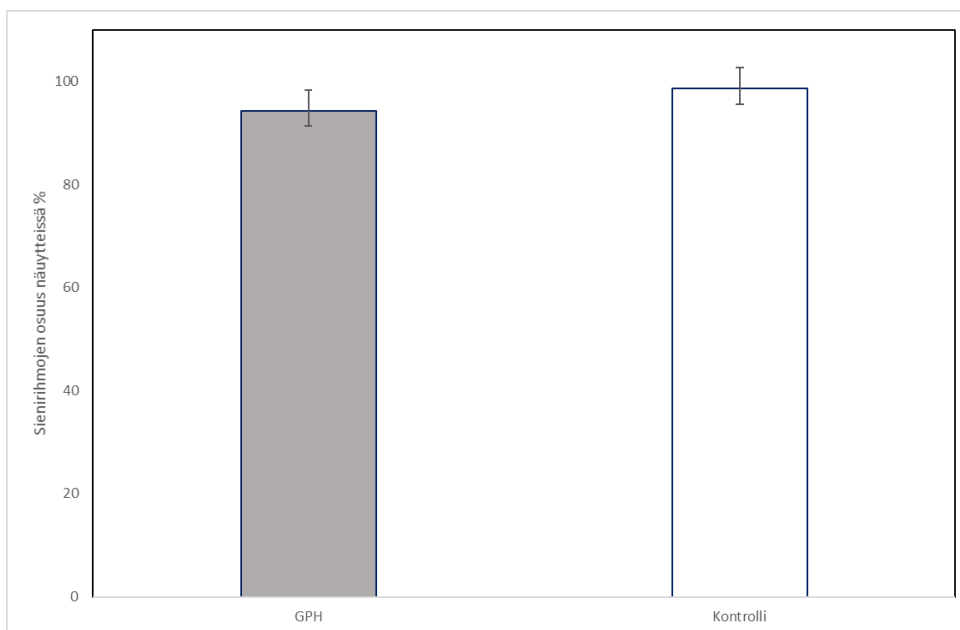
lukumääriä kuvaavissa malleissa kovariaattina käytetyllä kasvien koolla oli positiivinen korrelaatio muuttujien kanssa eli suuremmissa kasveissa oli enemmän näitä kasvinsyöjien aiheuttamia vaurioita.



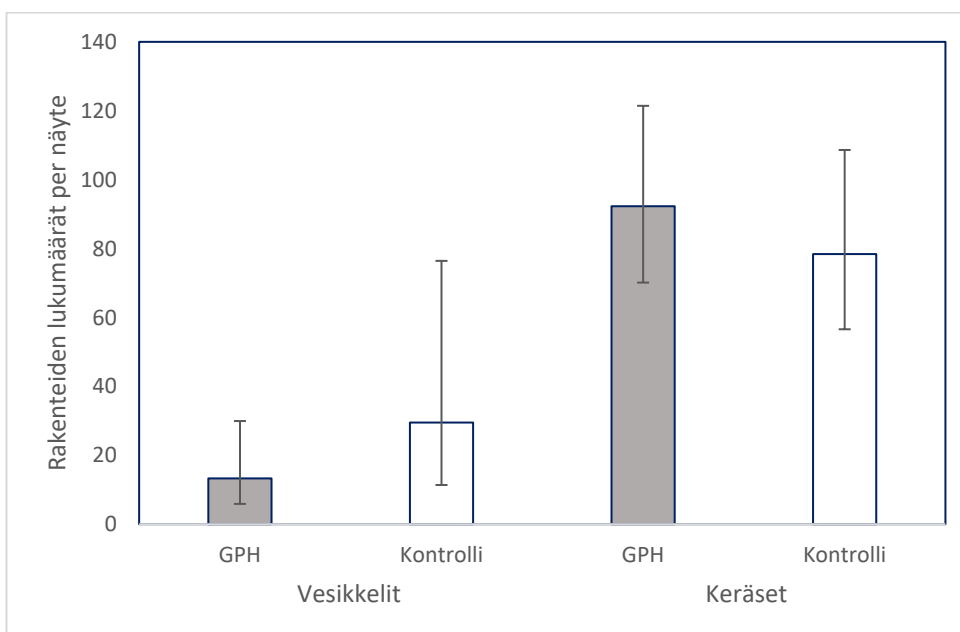
Kuva 6. Kaikkien vaurioituneiden lehtien lukumäärien keskiarvot glyfosaattipohjaisen herbisidi-käsittelyn (GPH) ja kontrolliryhmän kasveilla. Virhepalkit kuvaavat 95 % luottamusvälejä.

3.4 Sienijuuret

Sienirihmojen esiintyvyyden prosenttiosuuksissa ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja eri käsittelyjen välillä. Keräsienikolonisaatioprosentti oli molemmissa käsittelyryhmissä korkea. GPH-käsittelyssä keräsienikolonisaatioprosentti oli keskimäärin 94 % ja kontrolliryhmän kasveilla 99 % (Taulukko 3, kuva 7). Sienijuurinäytteissä havaittujen eri rakenteiden lukumäärissäkään ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja käsittelyiden välillä GPH-käsittelyssä vesikkelien lukumäärä oli keskimäärin 13,3 kpl ja kontrolliryhmän kasveilla 29,5 kpl (Taulukko 3, kuva 8). GPH-käsittelyssä kerästen lukumäärä oli keskimäärin 92,3 kpl ja kontrolliryhmän kasveilla 78,4 kpl (Taulukko 3, kuva 8). GPH-käsittelyssä ruskean rihman lukumäärä oli keskimäärin 18,8 kpl ja kontrolliryhmän kasveilla 17,4 kpl (Taulukko 3). GPH-käsittelyssä juuren ulkopuolisen rihman lukumäärä oli keskimäärin 1,3 kpl ja kontrolliryhmän kasveilla 1,2 kpl (Taulukko 3). GPH-käsittelyssä tuntemattomien rakenteiden lukumäärä oli keskimäärin 3,4 kpl ja kontrolliryhmän kasveilla 2,9 kpl (Taulukko 3). GPH-käsittelyssä pallomaisten rakenteiden lukumäärä oli keskimäärin 7,9 kpl ja kontrolliryhmän kasveilla 8,6 kpl (Taulukko 3).



Kuva 7. Sienirihmojen osuuksien keskiarvot glyfosaattipohjaisen herbisidi-käsittelyn (GPH) ja kontrolliryhmän kasveilla. Virhepalkit kuvaavat 95 % luottamusvälejä.



Kuva 8. Vesikkelien ja kerästen lukumäärien keskiarvot per näyte glyfosaattipohjaisen herbisidi-käsittelyn (GPH) ja kontrolliryhmän kasveilla. Virhepalkit kuvaavat 95 % luottamusvälejä.

4 Tulosten tarkastelu

Tutkimushypoteeseista poiketen mitatuissa muuttujissa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja käsittelyiden välillä. Tuloksia voi selittää ainakin se, että glyfosaatin ja sen hajoamistuotteiden pitoisuudet olivat odotetusti huomattavasti matalammat vuonna 2020 verrattuna 2019 pitoisuuksiin. Myös tavallisesta poikkeava tapa, jolla kasvit altistuivat glyfosaatille voi selittää osaltaan tuloksia. Vaikka aikaisemmissa kokeissa glyfosaatin ja erilaisten GPH:iden on havaittu vaikuttavan kasveihin ja sienijuuriin (Druille ym. 2013a; Druilleym.2013b; Helander ym. 2018; Helander ym. 2019; Muola

ym. 2021), tässä kokeessa glyfosaatille altistuminen tapahtui hyvin tavallisesta poikkeavalla tavalla. Glyfosaatti oli alun perin GPH:ssa kaliumsuolana (Ruuskanen ym. 2019, Ruuskanen ym. 2020), mutta sen jälkeen se on kulkenut viiriäisen ruoansulatuskanavan läpi. Lannan mukana tulleen glyfosaatin pitoisuutta on myös hyvin vaikea verrata ruiskutuksella tapahtuviin altistuksiin. Myös lannan sisältämät orgaaniset ravinteet ovat todennäköisesti vaikuttaneet kasvien kasvuun ja lisääntymiseen. Siipikarjanlanta on yleisesti käytetty lannoite ja sen vaikutus saattoi osittain kompensoida glyfosaattivalmisteen ja sen hajoamistuotteiden ylivuotisia vaikutuksia kasveihin. Tulokset voi myös selittää osittain toistojen pieni määrä. Varsinkin keräsienien muodostamien sienirakenteiden vesikkelien ja kerästen määrissä hajonta oli suurta ja suuremmalla otoskoolla tilastollisia eroja olisi saattanut löytyä.

4.1 Kasvu

Kasvien kasvussa ei ollut eroja GPH-käsittelyn ja kontrolliryhmän kasvien välillä. Tämä poikkeaa aikaisemman vuoden tuloksista, joiden mukaan kontrollikasvit kasvoivat suuremmiksi kuin GPH-käsittelyn kasvit (Muola ym. 2021). Tulosta voisi selittää sillä, että aikaisempina vuonna glyfosaatin ja sen hajoamistuotteiden pitoisuudet kuivikkeessa olivat korkeammat kuin tutkimusvuonna maaperässä ja niiden vaikutus kasvuun vaikuttaviin tekijöihin oli suurempi. Tänä vuonna pitoisuudet olivat huomattavasti pienemmät ja niiden vaikutus kasvuun ei vastaavasti ollut niin suuri. Mansikka on monivuotinen viljelykasvi ja sen edellisen vuoden kasvu voi vaikuttaa seuraavan vuoden kasvuun merkittävästi. Vuoden 2019 koolla olikin positiivinen korrelaatio vuoden 2020 mitattujen kokojen kanssa. Tästä huolimatta tutkimusvuonna 2020 GPH-käsittelyn ja kontrolliryhmän kasvien välillä ei ollut eroa kasvun suhteen. GPH-käsittelyn kasvit pystyivät siis kompensoimaan aikaisemman vuoden pienemmän koon vuoden 2020 aikana.

GPH:t voivat vaikuttaa suoraan ja epäsuorasti kasvien kasvuun usealla eri tavalla. Ensinnäkin glyfosaatin estämän EPSPS-entsyymin inaktivoituminen vaikuttaa suoraan kasvin kasvuun heikentävästi (Duke & Powles 2008). Epäsuorasti GPH:t voivat vaikuttaa maaperän eri mikrobien välityksellä, muuttamalla niiden yhteisön koostumusta ja sitä kautta esimerkiksi ravinteiden kiertoa ja saatavuutta kasveille. Sienijuuret ovat merkittävä maaperämikrobien ryhmä, jonka kautta glyfosaatti voi vaikuttaa kasvien kasvuun. Myös monilla muilla mikrobeilla tai niiden yhteisön rakenteella voi olla suoria ja epäsuoria vaikutuksia kasvien kasvuun (Nguyen 2016). GPH:iden mahdollisesti aiheuttamat muutokset maaperämikrobien yhteisörakenteessa voivat vaikuttaa ravinteiden kiertoon

maaperässä. Glyfosaatin vaikutukset maaperässä riippuvat monesta eri tekijästä. Maaperän koostumus, pH, ravinteiden, varsinkin fosforin ja sen eri muotojen pitoisuudet ovat kaikki tekijöitä, jotka osaltaan voivat vaikuttaa siihen, miten GPH:t ja niiden hajoamistuotteet vaikuttavat maaperässä (Nguyen 2016). Esimerkiksi mikrobien aktiivisuus voi lisääntyä GPH-altistuksen jälkeen, jos maaperän pH on matala, mutta maaperän pH:n ollessa neutraali mikrobien aktiivisuus voi vähentyä (Nguyen 2016).

4.2 Lisääntyminen

Strandberg ja muut (2019) havaitsivat GPH:n vähentävän kasvien tuottamien kukkien määriä eri kasvilajeilla. Strandberg ja muut tutkivat GPH-ruiskutusten yhteydessä kasvien mahdollisen altistumisen vaikutuksia kasvien kukintaan ja havaitsivat GPH:lle altistumisen vähentävän kasvien tuottamien kukkien määrää puna-apilalla (*Trifolium repens* Linne) ja keltamaitteella (*Lotus corniculatus* Linne). Kyseisessä kokeessa altistuminen tapahtui kesken kasvukauden ja glyfosaatin määrät olivat hyvin pieniä. Tässä kokeessa edellisen vuoden glyfosaattialtistuksella ei ollut vaikutusta kasvien lisääntymiseen tutkimusvuonna. Kukkien ja marjojen määrien ja vuoden 2019 koon välillä oli kuitenkin positiivinen korrelaatio. Kasvit, jotka olivat vuonna 2019 suurempia tuottivat siis enemmän kukkia ja marjoja verrattuna pienempiin kasveihin. Tätä selittää, että mansikoilla kukka-aiheet kehittyvät jo edeltävänä vuonna (Jahn & Dana 1970). Vuonna 2019 suuremmiksi kasvaneilla kasveilla oli siis paremmin resursseja lisääntymiseen seuraavalle vuodelle. Aikaisempina vuonna kasvien vegetatiivisessa lisääntymisessä oli selkeä ero. Kontrollikäsittelyn kasvit tuottivat huomattavasti enemmän rönsyjä verrattuna GPH-käsittelykasveihin (Muola ym. 2021). Tutkimusvuonna vastaavanlaista vaikutusta ei kuitenkaan havaittu.

GPH:t saattavat myös aiheuttaa kukkien epämuodostumia. Lieten (2006) havaitsi glyfosaatille altistettujen mansikoiden (*Fragaria x ananassa* Duchense) tuottavan epämuodostuneita kukkia ja marjoja. Kokeessa kasvualustaan lisättiin glyfosaattia ennen mansikoiden istuttamista, josta se kulkeutui kasveihin. Myös muilla kasveilla on havaittu samanlaisia tuloksia. Shimada ja Kimura (2007) havaitsivat myös GPH:lle altistetuilla *Petunia corollas* kasveilla kukkien epämuodostumia. Tässäkin kokeessa havaittiin kukkien sekä marjojen epämuodostumia, mutta ei eroja käsittelyryhmien välillä.

4.3 Kasvinsyöjien aiheuttamat vauriot

GPH:iden vaikutuksista kasvien puolustusyhdisteiden tuotantoon tai niihin kohdistuneeseen kasvinsyöntiin on saatu vaihtelevia tuloksia (Fuchs ym. 2021). GPH:t voivat vaikuttaa kasvien puolustusyhdisteiden tuotantoon, jolla olisi voinut olla vaikutuksia tässäkin kokeessa (Fuchs ym. 2021). GPH:iden on toisaalta havaittu häiritsevän kirvojen kehittymistä ja esimerkiksi juurikaskirvojen (*Aphis fabae* Scopoli) on havaittu valitsevan mieluummin glyfosaatilla käsittelemättömiä kasveja ravinnoksi (Lipok 2009). Toisaalta GPH:iden on havaittu myös lisäävän kirvoja ainakin glyfosaattiresistentillä ruokajuurikkailla (*Beta vulgaris* Linne) (Dewar ym. 2000). Abo El Ghar (1994) havaitsi krysanteemiyökkösen (*Spodoptera littoralis* Boisduval) toukkien heikentynyttä kasvua, koteloitumista ja täysikasvuisten yksilöiden esiintymistä, kun ne käyttivät ravintona GPH:lla käsiteltyjen risiinin (*Ricinus communis* Linne) lehtiä. Selityksinä heikentyneelle kasvulle tai kehityshäiriöille GPH:illa käsiteltyjen kasvien ravintona käyttäneille hyönteisille voisi olla kasvien heikentynyt mikroravinteiden saanti (Cakmak 2009) tai muutokset kasvien hormonitoiminnassa (Fuchs ym. 2021).

Sienijuuret voivat vaikuttaa isäntäkasvien puolustusyhdisteiden tuotantoon (Pozo & Azcon-Aguilar 2007, Roger ym. 2013). Sienijuurten on havaittu vähentävän erityisesti kasvien juuria vahingoittavia kasvinsyöjiä ja taudinaiheuttajia. Kasvin maanpäällisiä osia vahingoittaviin taudinaiheuttajiin ja kasvinsyöjiin sienijuurien aiheuttamat vaikutukset ovat erilaisia riippuen vahingon aiheuttajasta. Sienijuuret voivat esimerkiksi edistää jasmiinihapolla toimivia puolustusmekanismeja isäntäkasveilla sekä vaikuttaa niiden haihtuvien yhdisteiden eli volatiilien tuotantoon (Pozo & Azcon-Aguilar 2007). Kasvit tuottavat jasmiinihappoa puolustuksena kuolleita kasvin osia infektoivia taudinaiheuttajia ja pureskelevia kasvinsyöjiä hyönteisiä vastaan (De Vos ym. 2005).

4.4 Sienijuuret

Kaikilla kasveilla oli juurissa keräsieniä ja kolonisaatioprosentti vaihteli näytteissä 80–100 % välillä. Aikaisemmissa kokeissa on kuitenkin havaittu, että glyfosaatti on vähentänyt sienijuurien määrää kasveilla (Druille ym. 2013; Helander ym. 2018). Tässä kokeessa vastaavanlaisia tuloksia ei kuitenkaan havaittu. Druille ja muut. (2013) havaitsivat GPH:n myös vähentävän sienijuurien itiöiden elinkelpoisuutta. Itiöiden elinkelpoisuus on taas yhteydessä eri lajien osuuksiin maaperässä, joka on tärkeä tekijä juurten kolonisaation ja symbioosien toimivuuden kannalta (Druille ym. 2013). Vaikka

selkeästi suurin osa juurista oli kolonisoitunut, keräsienten toiminta saattaa silti häiriintyä GPH:n ja niiden hajoamistuotteiden vaikutuksista. Tässä kokeessa ei selvitetty eroja yhteisön koostumuksessa tai itiöiden elinkelpoisuuksissa, joten mahdolliset erot niissä jäivät huomioimatta.

Kokeissa, joissa glyfosaatin on havaittu vaikuttavan keräsienten kolonisaatioon tai eri keräsienirakenteiden määriin on käytetty erilaisia GPH:ita eri pitoisuuksilla. Esimerkiksi Druillen ja kumppanien. (2016) käyttämät pitoisuudet vastasivat suositeltua määrää ja 26 % suositellusta määrästä Glacoxan nimistä glyfosaattivalmistetta, jossa glyfosaatti on isopropyylimiinin suolana. Tässä kokeessa glyfosaattialtistus tapahtui kuitenkin hyvin eri tavalla. Glyfosaatti oli alun perin kaliumsuolana ja sen pitoisuutta on vaikea verrata ruiskutuksilla tapahtuvien altistusten pitoisuuksiin. Lisäksi tuloksia voi selittää se, että lannan käyttäminen lannoitteena lisää sienijuuria ja tehostaa merkittävästi kasvin ja sienien välisen symbioosin tehokkuutta (Vestberg & Kahiluoto, 2018). Tämä johtuu lannan sisältämästä orgaanisesta tyypestä ja fosforista. Keräsienet pystyvät hyödyntämään maaperässä ja sinne lisätyistä lannoitteista peräisin olevia ravinteiden orgaanisia muotoja tehokkaasti. Kasvit pystyvät hyödyntämään esimerkiksi fosforia vain sen liukoisessa muodossa, jolloin kasvi hyötyy sienijuurista erityisesti, kun maaperässä on paljon ravinteita orgaanisessa muodossa (Vestberg & Kahiluoto, 2018). Koepellolle levitetty lintujen ulostetta sisältänyt kuivike on saattanut lisätä sienijuurien määrää niin merkittävästi, että GPH:n ja sen hajoamistuotteiden vaikutus keräsieniin jäi hyvin vähäiseksi.

4.5 Glyfosaattijäämät

Erot glyfosaatin ja sen hajoamistuotteiden pitoisuuksissa ovat selitettävissä sillä, että osa aineista on hajonnut maaperän mikrobien hajotustoiminnan vaikutuksesta ja osa on saattanut huuhtoutua pois koepelloilta (Duke & Powles 2008). Glyfosaatin ja sen hajoamistuotteiden pitoisuuksien pieneminen oli odotettavissa, koska glyfosaatin pitäisi ainakin normaalisti käytettäessä hajota maaperässä jo kahden viikon aikana (Baylis 2000, Duke & Powles 2008). Kylmissä oloissa, kuten Suomen ilmastossa hajoaminen voi kuitenkin olla oletettua hitaampaa ja pysähtyä talvella jopa kokonaan (Laitinen ym. 2006). Vaikka glyfosaatin ja sen hajoamistuotteiden pitoisuudet olivat huomattavasti matalammat maaperässä verrattuna kuivikkeesta mitattuihin pitoisuuksiin noin 1,5 vuotta kuivikkeen levittämisen jälkeen, pieniä määriä aineita havaittiin silti maaperässä. Tämä vahvistaa käsitystä siitä, että glyfosaatti ja sen hajoamistuotteet eivät hajoa ainakaan Suomen ilmasto oloissa niin nopeasti kuin on oletettu ja saattavat vaikuttaa maaperässä

pitkän aikaa (Helander ym. 2012). Tässä kokeessa oli myös tarkoitus tutkia epäsuoran GPH:lle altistumisen ylivuotisia vaikutuksia, joten glyfosaatin ja sen hajoamistuotteiden pienet pitoisuudet olivat odotettavissa.

5 Yhteenveto

Pro gradu -tutkielmani tavoitteena oli selvittää lannoitteen mukana kulkeutuneen GPH:n ylivuotisia vaikutuksia mansikan kasvuun, lisääntymiseen, kasvinsyöntiin ja sienijuuriin. Tulokset osoittivat, että vaikka aikaisempina vuonna lannoitteen mukana kulkeutuneena GPH-jäämien havaittiin selkeitä vaikutuksia mansikoiden kasvuun ja vegetatiiviseen lisääntymiseen (Muola ym. 2021), seuraavana vuonna erot eri käsittelyryhmien välillä olivat tasoittuneet. Glyfosaatin ja sen hajoamistuotteiden pitoisuudet olivat laskeneet edeltävästä vuodesta huomattavasti ja se selittääkin tuloksia. Vaikka glyfosaatti ja sen hajoamistuotteet saattavat kertyä maaperään, varsinkin Suomen ilmasto-olosuhteissa (Helander ym. 2012) tässä kokeessa pitoisuudet laskivat huomattavasti vuoden aikana. Koska kokeessa glyfosaatille altistuminen tapahtui tavallisesta poikkeavalla tavalla ja erilaisten glyfosaattivalmisteiden vaikutukset eri tekijöihin voivat vaihdella, lannoitteen mukana kulkeutuvan glyfosaatin ja sen hajoamistuotteiden vaikutuksia viljeltäviin kasveihin olisi hyvä tutkia vielä lisää. Toisaalta tutkimuksen tulokset vaikuttaisivat siltä, että lannoitteen mukana kulkeutuvilla GPH-jäämillä ei olisi selkeitä ylivuotisia vaikutuksia mansikoihin.

Kiitokset

Kiitos Suomen Biologian Seura Vanamo ry:lle ja Kuopion Luonnon Ystävien Yhdistykselle heidän myöntämistään apurahoista työtäni varten. Haluan myös erityisesti kiittää ohjaajiani Marjo Helanderia, Anne Muolaa ja Sari Timosta heidän antamastaan ohjauksesta työn kaikissa vaiheissa. Kiitokset myös koko Ruissalon tiimille, erityisesti Kaisa Honkaselle, Lyydia Leinolle ja Ida Palmroosille heidän avustaan koelan ylläpidossa ja aineiston keruussa.

Lähteet

Abo El-Ghar, G.E.S. (1994) Effects of herbicides on consumption, growth and food utilization by cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae. Anz.

Schadlingskde. *Pflanzenschutz Umweltschutz* 67, 143–146.

- Antier, C., Kudsk, P., Reboud, X., Ulber, L., Baret, P. V., & Messéan, A. (2020). Glyphosate use in the European agricultural sector and a framework for its further monitoring. *Sustainability (Switzerland)*, 12(14), 1–22. <https://doi.org/10.3390/su12145682>
- Baylis, A. D. (2000). Why glyphosate is a global herbicide: Strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science*, 56(4), 299–308. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200004\)56:4<299::AID-PS144>3.0.CO;2-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200004)56:4<299::AID-PS144>3.0.CO;2-)
- Benbrook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, 28(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
- Benhamou, N., Fortin, J.A., Hamel, C., St-Arnaud, M. & Shatilla, A. (1994) Resistance responses of mycorrhizal Ri T-DNA-transformed carrot roots to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. *Phytopathology* 84, 958–968.
- Borggaard, O. K. & Gimsing, L. (2007). Fate of glyphosate in soil and possibility of leaching to ground and surface waters : review. *Pest Management Science*, 64:441-456.
- Bøhn, T. & Millstone, E. (2019). The Introduction of Thousands of Tonnes of Glyphosate in the food Chain—An Evaluation of Glyphosate Tolerant Soybeans. *Foods*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/foods8120669>
- Busse, M. D., Ratcliff, A. W., Shestak, C. J., & Powers, R. F. (2001). Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(12–13), 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00103-1)
- Cakmak, I., Yazici, A., Tutus, Y., & Ozturk, L. (2009). Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non-glyphosate resistant soybean. *European Journal of Agronomy*, 31(3), 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2009.07.001>
- De Vos M., Van Oosten V.R., Van Poecke RMP, Van Pelt J.A, Pozo MJ, Mueller MJ, Buchala AJ., Metraux, JP. & Van Loon, L.C. (2005). Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Mol Plant Microbe Interact* 2005, 18, 923-937.
- Deselnicu D., Militaru G., Deselnicu V., Zainescu G. & Albu L. 2018. Towards a circular economy- a zero waste programme for Europe. *ICAMS 2018-7th International conference on advanced materials and systems*: 563-568
- Dewar, A.M., Haylock, L., A., Bean, K., M. & May, M., J. (2000). Delayed control of weeds in glyphosate-tolerant sugar beet and the consequences on aphid infestation and yield. *Pest Management Science*. 56, 345–350
- Druille, M., Cabello, M. N., Omacini, M., & Golluscio, R. A. (2013a). Glyphosate reduces spore viability and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology*, 64, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.10.007>
- Druille, M., Omacini, M., Golluscio, R. A., & Cabello, M. N. (2013b). Arbuscular mycorrhizal fungi are directly and indirectly affected by glyphosate application. *Applied Soil Ecology*, 72, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.06.011>

- Duke, S. O. (2018). The history and current status of glyphosate. *Pest Management Science*, 74(5), 1027–1034. <https://doi.org/10.1002/ps.4652>
- Cecilia, D., & Maggi, F. (2018). Analysis of glyphosate degradation in a soil microcosm. *Environmental Pollution*, 233, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.017>
- Forlani, G., Mangiagalli, A., Nielsen, E., & Suardi, C. M. (1999). Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: Evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(7), 991–997. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00010-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00010-3)
- Fuchs, B., Saikkonen, K., & Helander, M. (2021). Glyphosate-Modulated Biosynthesis Driving Plant Defense and Species Interactions. *Trends in Plant Science*, 26(4), 312–323. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.11.004>
- Gimsing, A. L., Borggaard, O. K., & Bang, M. (2004). Influence of soil composition on adsorption of glyphosate and phosphate by contrasting Danish surface soils. *European Journal of Soil Science*, 55(1), 183–191. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.2003.00585.x>
- Green, J. M. (2009). Evolution of Glyphosate-Resistant Crop Technology. *Weed Science*, 57(1), 108–117. <https://doi.org/10.1614/ws-08-030.1>
- Guerrieri E, Lingua G, Digilio MC, Massa N, Berta G: Do interactions between plant roots and the rhizosphere affect parasitoid behaviour? (2004) *Ecol Entomol* 2004, 29, 753-756.
- Heap, I. (2014). Global perspective of herbicide-resistant weeds. *Pest Management Science*, 70(9), 1306–1315. <https://doi.org/10.1002/ps.3696>
- Hébert, M. P., Fugère, V., & Gonzalez, A. (2019). The overlooked impact of rising glyphosate use on phosphorus loading in agricultural watersheds. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 17(1), 48–56. <https://doi.org/10.1002/fee.1985>
- Helander, M., Pauna, A., Saikkonen, K., & Saloniemi, I. (2019). Glyphosate residues in soil affect crop plant germination and growth. *Scientific Reports*, 9(1), 15–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56195-3>
- Helander, M., Saloniemi, I., Omacini, M., Druille, M., Salminen, J. P., & Saikkonen, K. (2018). Decreases mycorrhizal colonization and affects plant-soil feedback. *Science of the Total Environment*, 642, 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.377>
- Helander, M., Saloniemi, I., & Saikkonen, K. (2012). Glyphosate in northern ecosystems. *Trends in Plant Science*, 17(10), 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.008>
- Johal, G. S., & Huber, D. M. (2009). Glyphosate effects on diseases of plants. *European Journal of Agronomy*, 31(3), 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2009.04.004>
- Kjær, J., Olsen, P., Ullum, M., & Grant, R. (2003). *Vadose Zone Processes and Chemical Transport Leaching of Glyphosate and Amino-Methylphosphonic Acid from Danish Agricultural Field Sites*. 608–620.
- Kremer, R. J., & Means, N. E. (2009). Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms. *European Journal of Agronomy*, 31(3), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2009.06.004>

- Jahn, O. L., & Dana, M. N. (1970). Crown and inflorescence development in the strawberry, *Fragaria ananassa*. *American Journal of Botany* Vol:57. No:6, 1970.
- Laitinen, P., Rämö, S. & Siimes, K. (2007). Glyphosate translocation from plants to soil - Does this constitute a significant proportion of residues in soil? *Plant and Soil*, 300(1–2), 51–60. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9387-1>
- Laitinen, P., Siimes, K., Eronen, L., Rämö, S., Welling, L., Oinonen, S. & Ruohonen-Lehto, M. (2006). Fate of the herbicides glyphosate, glufosinate-ammonium, phenmedipham, ethofumesate and metamitron in two Finnish arable soils. *Pest Management Science*, 62(6), 473–491. <https://doi.org/10.1002/ps.1186>
- Leino, L., Tall, T., Helander, M., Saloniemä, I., Saikkonen, K., Ruuskanen, S., & Puigbò, P. (2021). Classification of the glyphosate target enzyme (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) for assessing sensitivity of organisms to the herbicide. *Journal of Hazardous Materials*, 408(October 2020), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124556>
- Lieten, P. (2006) Effect of metosulam and glyphosate on flower abnormalities of strawberry. *Acta Horticulturae* 708:401-404
- Lipok, J. (2009) Dual action of phosphonate herbicides in plants affected by herbivore—Model study on black bean aphid *Aphis fabae* rearing on broad bean *Vicia faba* plants. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 1701–1706
- Mamy, L., & Barriuso, E. (2005). Glyphosate adsorption in soils compared to herbicides replaced with the introduction of glyphosate resistant crops. *Chemosphere*, 61(6), 844–855. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.04.051>
- Mamy, L., Barriuso, E., & Gabrielle, B. (2016). Glyphosate fate in soils when arriving in plant residues. *Chemosphere*, 154, 425–433. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.104>
- McGonigle, T., Miller, M., Evans, D., Fairchild, G. & Swan, J. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115: 495-501.
- McKinnon, K., Serikstad, G.L. & Eggen, T. (2014). Contaminants in manure - a problem for organic farming? Rahmann, G., Aksoy, U. (Eds.), Proceedings of the 4th ISOFAR Scientific Conference, "Building Organic Bridges" at the Organic World Congress 2014, 1315 Oct., Istanbul, Turkey.
- Miller, T. I. M., Vernon, M., Vernon, M., Hanson, B., Boydston, R. & Al-khatib, K. (2013). *Glyphosate Stewardship : Maintaining the Effectiveness of a Widely Used Herbicide*. (July).
- Muola, A., Fuchs, B., Laihonon, M., Rainio, K., Heikkonen, L., Ruuskanen, S. Saikkonen, K. & Helander, M. (2021). Risk in the circular food economy: Glyphosate-based herbicide residues in manure fertilizers decrease crop yield. *Science of the Total Environment*, 750, 141422. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141422>
- Myers, J. P., Antoniou, M. N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L. G. & Benbrook, C. M. (2016). Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: A consensus statement. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>
- Nguyen, D. B., Rose, M. T., Rose, T. J., Morris, S. G. & van Zwieten, L. (2016). Impact of

- glyphosate on soil microbial biomass and respiration: A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 92, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.09.014>
- O Duke, S. & B Powles, S. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 63(11), 1100–1106. <https://doi.org/10.1002/ps>
- Philips J. & Hayman D. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infectoin. *Transactions of The British Mycological Society* 55: 158-161.
- Powles, S. B. & Preston, C. (2006). Evolved Glyphosate Resistance in Plants: Biochemical and Genetic Basis of Resistance. *Weed Technology*, 20(2), 282–289. <https://doi.org/10.1614/wt-04-142r.1>
- Pozo, M. J. & Azcón-Aguilar, C. (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.05.004>
- Reddy, K. N., Rimando, A. M. & Duke, S. O. (2004). Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5139–5143. <https://doi.org/10.1021/jf049605v>
- Rodrigues, L., Gonçalves Costa, G., Lundgren Thá, E., da Silva, L. R., de Oliveira, R., Morais Leme, D. & de Oliveira, G. A. R. (2019). Impact of the glyphosate-based commercial herbicide, its components and its metabolite AMPA on non-target aquatic organisms. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842(April), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.002>
- Roger, A., Gétaz, M., Rasmann, S. & Sanders, I. R. (2013). Identity and combinations of arbuscular mycorrhizal fungal isolates influence plant resistance and insect preference. *Ecological Entomology*, 38(4), 330–338. <https://doi.org/10.1111/een.12022>
- Ruuskanen, S., Rainio, M. J., Kuosmanen, V., Laihonen, M., Saikkonen, K., Saloniemi, I. & Helander, M. (2019). Female Preference and Adverse Developmental Effects of Glyphosate-Based Herbicides on Ecologically Relevant Traits in Japanese Quails [Research-article]. *Environmental Science & Technology*, 54, 1128–1135. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07331>
- Ruuskanen, S., Rainio, M. J., Uusitalo, M., Saikkonen, K., & Helander, M. (2020). Effects of parental exposure to glyphosate-based herbicides on embryonic development and oxidative status: a long-term experiment in a bird model. *Scientific Reports*, 10(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63365-1>
- Shimada, A. & Kimura, Y. (2007) Nitrogen Metabolism and Flower Symmetry of Petunia Corollas Treated with Glyphosate. *Zeitschrift für Naturforschung C*, vol 62, no. 11-12, 2007, 849-856. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-11-1213>
- Simonsen, L., Fomsgaard, I. S., Svensmark, B. & Spliid, N. H. (2008). Fate and availability of glyphosate and AMPA in agricultural soil. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 43(5), 365–375. <https://doi.org/10.1080/03601230802062000>
- Sullivan, P. A. O., Donovan, J. T. O. & Hamman, W. M. (1981). Influence of non-ionic surfacants, ammonium, sulphate, water quality and spray volume on the

- phytotoxicity of glyphosate. *Canadian Journal of Plant Science* 61, 391-400.
- Stranberg, B., Boutin, C., Carptender, D., Mathiassen, S., K., Damgaard, C., F., Sorensen, P., B., Bruus, M., Dupont, Y., L., Bossi, R., Andersen, D., K., Baaturp-Pedersen, A. & Larsen, E., L. (2019). Pesticide effects on non-target terrestrial plants at individual, population and ecosystem level (PENTA). The Danish Environmental Protection Agency.
- Travlos, I., Cheimona, N. & Bilalis, D. (2017). Glyphosate efficacy of different salt formulations and adjuvant additives on various weeds. *Agronomy*, 7(3).
<https://doi.org/10.3390/agronomy7030060>
- Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R. & Morris, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment*, 616–617, 255–268.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>
- Velini, E., D., Alves, E., Godoy, M., A., Meschede, D., K., Souza, T., R., O Duke, S. (2008). Glyphosate at low doses can stimulate plant growth. *Pest Management Science* 64, 489-496.
- Vestberg, M., Timonen, S. & Lehto, T. (2018) Teoksessa: Rihman kiertämät - Kasvien ja sienten erottamaton elämä (Vestberg & Timonen toim.) s.13-23.
- Vestberg, M. (2018). Keräsienijuuri. Teoksessa: Rihman kiertämät - Kasvien ja sienten erottamaton elämä (Vestberg & Timonen toim.) s.65-77.
- Vestberg, M. & Kahiluoto, H. (2018). Keräsienijuurisymbioosin merkitys maataloudessa. Teoksessa: Rihman kiertämät - Kasvien ja sienten erottamaton elämä (Vestberg & Timonen toim.) s.277-289.
- Vilja-alan yhteistyöryhmä VYR ry. (2016). Puitavien peltokasvien hyvät tuotanto- ja varastointitavat. <<https://www.vyr.fi/fin/viljelytietoa/tuotanto-opas/>> [Luettu 23.3.2022]
- Williams, G. M., Kroes, R., & Munro, I. C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31(2 1), 117–165.
<https://doi.org/10.1006/rtp.1999.1371>