

Pro gradu -tutkielma

**Männyn (*Pinus sylvestris*) pihka-ainepitoisuuden
vaikutus pilkkumäntypistiäisen (*Diprion pini*) kykyyn
puolustautua loisia ja petoja vastaan**

Heli Huttunen



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ekologia ja ympäristöhoito

19.5.2008

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Ekologia ja ympäristöhoito

HUTTUNEN, H.: Männyn (*Pinus sylvestris*) pihka-ainepitoisuuden vaikutus pilkkumäntypistiäisen (*Diprion pini*) kykyyn puolustautua loisia ja petoja vastaan

Pro Gradu -tutkielma: 27 s.
Työn ohjaajat: Prof. Johanna Mappes, FM Carita Lindstedt
Tarkastajat: Dos. Leena Lindström, Prof. Johanna Mappes
Toukokuu 2008

Hakusanat: Diprionidae, enkapsulaatio, kemiallinen puolustus, loisinta, pihka-aine, pilkkumäntypistiäinen, saalistus

TIIVISTELMÄ

Pilkkumäntypistiäisen (*Diprion pini*) toukat puolustautuvat saalistajiaan vastaan ryhmittymällä, tekemällä pelotteluliikkeitä sekä erittämällä pihkaista puolustusnestettä. Toukkien ravintona käyttämien männyn neulasten korkean pihka-ainepitoisuuden on havaittu lisäävän toukkien puolustusnesteen tuottoa mikä tehostaa puolustautumista petoja vastaan. Tämän tutkimuksen ensisijaisena tavoitteena oli selvittää, vaikuttaako ravinnon pihka-ainepitoisuus toukan puolustautumiseen loisia vastaan. Tutkimus toteutettiin laboratorio-olosuhteissa, jossa toukkia kasvatettiin pihka-ainepitoisuudeltaan eroavilla kahdella ravintokäsittelyllä täyssisaruskoeasetelmassa. Toukkien loispuolustustehokkuutta tutkittiin toukkaan asetettavalla keinotekoisella loisella. Loisen avulla pystyttiin mittaamaan toukan enkapsulaatioreaktiota, joka on hyönteisten sisäinen puolustusmenetelmä loisia vastaan. Petopuolustusta tutkittiin mittaamalla toukan erittämän puolustusnesteen määrä. Tulosten perusteella pystyttiin selvittämään näiden puolustusmekanismien välisiä vuorovaikutuksia ja puolustautumisstrategioiden vaikutusta toukan kasvuun ja kehitykseen. Tutkimuksessa huomioitiin myös geneettisen taustan merkitys toukkien puolustautumisessa loisia vastaan. Tutkimuksessa käytetyt toukat syntyivät joko seksuaalisesti, paritelleen naaraan tuottamina tai aseksuaalisesti, parittelemattoman naaraan tuottamina, joten myös lisääntymistavan vaikutus puolustustehokkuuteen ja elinkierto-ominaisuuksiin otettiin huomioon. Tulosteni mukaan ravinnon pihka-ainepitoisuus ei vaikuta pilkkumäntypistiäistoukkien enkapsulaatioreaktion tehokkuuteen ja siten loispuolustukseen. Sen sijaan seksuaalisesti tuotettujen toukkien loispuolustustehokkuudessa oli geneettistä vaihtelua. Petopuolustustehokkuuteen ravinnon pihka-ainepitoisuus vaikutti, sillä pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa ravintoa syöneet toukat tuottivat enemmän puolustusnestettä. Keinotekoinen loisinta kuitenkin laski toukkien puolustusnesteen tuottoa. Loispuolustus näyttäisi verottavan petopuolustusta, vaikka toukkien kasvu ja kehitys eivät kärsineet keinotekoisesta loisinnasta. Myöskään pihka-ainepitoisuudeltaan korkea ravinto ei vaikuttanut negatiivisesti toukkien kasvuun ja kehitykseen. Sen sijaan seksuaalisesti tuotetut toukat kasvoivat aseksuaalisesti tuotettuja toukkia nopeammin. Tämän kolme trofiatasoa käsittävän tutkimuksen perusteella pilkkumäntypistiäistoukkien loisten menestykseen ei voida vaikuttaa isäntäkasvin pihka-aineiden kautta. Yleisesti pilkkumäntypistiäisen puolustuskyky loisia vastaan oli kuitenkin heikko, joten loisia voisi ajatella käytettävän niiden biologiseen torjuntaan.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Science

Department of Ecological and Environmental Science

HUTTUNEN, H.: Effect of resin acid concentration on the defence capacity of common pine sawfly (*Diprion pini*) against parasitoid and predator
Master of Science Thesis: 27 p.
Supervisors: Prof. Johanna Mappes, MSc Carita Lindstedt
Inspectors: Docent Leena Lindström, Prof. Johanna Mappes
May 2008

Key Words: Diprionidae, *Diprion pini*, chemical defence, encapsulation, parasitoids, predation, resin acid

ABSTRACT

Pine sawfly (Diprionidae) larvae exhibit multicomponent defensive repertoires against birds and invertebrate predators. They are gregarious and unpalatable. When disturbed, the larva shows defensive movements, like rearing of the front end and emission of the droplet of resinous fluid. Larvae feed on pine needles and oral effluent represents resin derived from the host plant. High needle resin acid concentration has dual impact; it reduces growth and survival, but also enhances defence capability against ants. However, there is only little evidence that needle resin acid concentration affects the defensive mechanism against parasitoids. The aim of this study was to find out if the needle resin acid concentration (treatments: high/low) affects the efficacy of encapsulation response i.e. parasitoid defence capacity of *Diprion pini*. Encapsulation response was studied by using artificial nylon implants mimicking the real parasitoids. By rearing full-sibs from sexually and asexually produced clutches in high and low resin acid diets, I tested if there are trade-offs between predator defence and parasitoid defence or between these defence mechanisms and life history traits. Moreover, full-sib design enabled me to study the possible variation in the defensive traits among families. According to my results, no difference in encapsulation response between larvae reared on high/low diet treatments (needle resin acid concentration) was found. However, the encapsulation reaction varied genetically in sexually produced larvae suggesting that their ability to respond on selection by parasitoids was better than in asexually produced larvae. In contrast to parasite defence, high resin acid concentration of the diet increased larvae's defence capacity against predators as larvae fed on high resin acid diet produced larger defence droplets than larvae fed on low resin acid diet. However, the parasitisation decreased the predator defence capacity i.e. amount of defence fluid produced, suggesting that larvae cannot invest simultaneously to parasite defence and predator defence. I did not find any differences between high/low diet treatments in the growth indices of the larvae. Parasitized larvae also grew similarly compared to those ones without an artificial parasitoid. Instead, I found that sexually produced larvae grew better than asexually produced larvae but there were no differences in the efficacy of defensive traits in sexual or in asexual broods. In general, pine sawfly larvae's encapsulation efficiency was quite low in comparison to the other species suggesting that parasitoids could be a potential biological control agent during *D. pini* outbreak.

SISÄLTÖ

1. JOHDANTO	5
2. AINEISTO JA MENETELMÄT	9
2.1 Tutkimuslaji	9
2.2 Tutkimuksen toteutus.....	10
2.2.1 Ravintokäsittelyt	10
2.2.2 Loispuolustustehokkuuden (enkapsulaatioreaktio) mittaus	10
2.2.3 Petopuolustuksen (puolustusnesteen määrä) mittaus.....	11
2.2.4 Elinkiertopiirteiden mittaus	11
2.3 Tilastolliset menetelmät	12
3. TULOKSET	12
3.1 Ravinnon laadun ja lisääntymistavan vaikutus loispuolustustehokkuuteen	12
3.2 Ravinnon laadun, loispuolustuksen ja lisääntymistavan vaikutus petopuolustustehokkuuteen.....	14
3.3 Ravinnon laadun, lisääntymistavan ja puolustautumisen aiheuttama vaihtelu elinkiertopiirteissä	15
4. TULOSTEN TARKASTELU	18
4.1 Ravinnon laadun ja lisääntymistavan vaikutus loispuolustustehokkuuteen	18
4.2 Ravinnon laadun, loispuolustuksen ja lisääntymistavan vaikutus petopuolustustehokkuuteen.....	20
4.3 Ravinnon laadun, puolustautumisen ja lisääntymistavan aiheuttama vaihtelu elinkiertopiirteissä	21
5. JOHTOPÄÄTÖKSIÄ	22
KIITOKSET	23
KIRJALLISUUS	24

1. JOHDANTO

Luonnossa kaikki eliöt ovat alttiita saalistukselle, kuten pedoille ja loisille. Parantaakseen selviytymismahdollisuuksiaan useimmille eliöille on kehittynyt erilaisia puolustusmekanismeja saalistusta vastaan (Ruxton ym. 2004). Puolustusmekanismit voivat perustua eliön rakenteellisiin ja morfologisiin ominaisuuksiin, kemialliseen puolustukseen tai käyttäytymiseen (Pearson 1985, Endler 1988). Puolustautumisstrategiat voidaan jakaa karkeasti primaarisiin ja sekundaarisiin puolustusmenetelmiin (Ruxton ym. 2004). Primaariset puolustautumismekanismit, kuten taustaan sulautuva suojaväri, toimivat ennen saaliin havaitsemista (Endler 1991, Pearson 1989, Merilaita ym. 2001, Ruxton ym. 2004). Sekundaarisia puolustautumismekanismeja, jotka vaikuttavat saaliin havaitsemisen jälkeen tai hyökkäyksen aikana, ovat muun muassa ryhmittäytyminen, pelottelu- ja puolustusliikkeet (Eisner ym. 1974, Kalin & Knerer 1977, Larsson ym. 1986, Hunter 2000), erilaiset varoitusvärit (Cott 1940, Ruxton ym. 2004, Marples ym. 2005) ja kemiallinen puolustus (Eisner ym. 1974, Pearson 1989, Ruxton ym. 2004). Usein saaliseläimet käyttävät useampaa puolustautumisstrategiaa samanaikaisesti, sillä erilaiset puolustuskeinot voivat voimistaa toisiaan, suojata saalistuksen eri vaiheissa tai parantaa puolustuskykyä eri saalistajia vastaan (Endler & Mappes 2004, Ruxton ym. 2004, Mappes ym. 2005).

Kemiallinen puolustautuminen perustuu saaliin kykyyn erittää (Eisner ym. 1974, Pasteels ym. 1983, Franzl & Naumann 1985, Larsson ym. 1986, Marples ym. 1989, Eisner ym. 1997a, Ruxton ym. 2004) tai varastoida (Scudder ym. 1986, Frick & Wink 1995, Kellner & Bettner 1995, Suomi ym. 2001, Nieminen ym. 2003) yhdisteitä, jotka tekevät siitä saalistajalle vastenmielisen tai haitallisen ravinnonlähteen. Hyönteiset voivat varastoida puolustusyhdisteitä esimerkiksi kehonsa kuorikerrokseen (Scudder ym. 1986, Frick & Wink 1995), siipiin, rasvaan (Frick & Wink 1995) tai hemolymfaan (Kellner & Bettner 1995). Saalistajan uhatessa osa kemiallisesti puolustautuvista hyönteisistä erittää aktiivisesti puolustusnestettä suoraan pinnassaan olevista erityisrahasista (Prestwich 1978, Eisner ym. 1997b) tai suun kautta erityisistä erityispusseista (Eisner ym. 1974, Larsson ym. 1986). Hyökkäytilanteessa jotkut hyönteiset voivat myös vuotaa hemolymfapisaroiita (englanniksi reflex bleeding) esimerkiksi peitinsiiven juuresta (Eisner ym. 1997a). Kemiallinen puolustautuminen on usein tehokkainta, kun se on yhdistynyt toiseen ennen hyökkäystä varoittavaan signaaliin. Esimerkiksi varoitusväri, ryhmittäytyminen ja/tai pelottelukäyttäytyminen vahvistavat kemiallista puolustusta ja nopeuttavat saalistajan oppimista välttää haitallinen saalis (Hunter 2000, Riipi ym. 2001, Mappes ym. 2005).

Puolustuskemikaalit voivat syntyä eliön oman aineenvaihdunnan tuotteina, mutta useat herbivori- eli kasvinsyöjähyönteiset hyödyntävät ravintokasvinsa puolustuskemikaaleja ja syntetisoivat niistä oman puolustusaineensa (Eisner ym. 1974, Pasteels ym. 1983, Hunter 2000, Ruxton ym. 2004). Koska kasvien puolustuskemikaalit ovat niiden aineenvaihdunnan sivutuotteina syntyviä sekundaariyhdisteitä, joiden pitoisuudessa on vaihtelua sekä lajien välillä (Barbosa & Krischik 1987, Denno ym. 1990, Codella & Raffa 1995b) että sisällä (Cates ym. 1983, Zalucki ym. 1990), voi vaihtelu ravinnon laadussa heijastua myös herbivorin kemiallisen puolustuksen tasoon. Hyönteistoukkien on esimerkiksi havaittu erittävän enemmän ja vahvempaa puolustusnestettä, jos ravinnossa on runsaasti puolustusnesteen tuotantoon tarvittavia yhdisteitä (Smiley ym. 1985, Björkman & Larsson 1991, Codella & Raffa 1995b, Soetens ym. 1998, Hunter 2000). Lisääntynyt puolustusnesteen erityys voi parantaa puolustusta petoja vastaan (Smiley ym. 1985, Larsson ym. 1986, Björkman & Larsson 1991). Puolustukseen voi mahdollisesti vaikuttaa myös puolustusnesteen vahvempi pitoisuus tai siitä johtuva tahmeampi koostumus (Björkman & Larsson 1991). Ravinnon korkealla puolustusyhdisteiden pitoisuudella voi olla herbivorille myös negatiivisia vaikutuksia, jotka näkyvät esimerkiksi hidastuneena kasvuna (Larsson ym. 1986, Björkman & Larsson

1991, Codella & Raffa 1995b) tai alentuneena hedelmällisyytenä (Rosenthal & Janzen 1979, Björkman & Larsson 1991).

Petojen lisäksi eliöiden pitää puolustautua myös loisia vastaan. Hyönteisloiset eli parasitoidit munivat lajin mukaan hyönteisen muniin, toukkiin tai koteloihin, joissa niiden jälkeläiset kehittyvät isäntäeliön kustannuksella (Godfray 1994). Kemiallisesti puolustautuvat hyönteistoukat voivat puolustautuvat hyökkäävää loista kuten petoakin vastaan erittämällä puolustusainetta (Prop 1960). Jos loinen kuitenkin onnistuu munimaan toukkaan, sen pitää turvautua sisäiseen puolustusjärjestelmäänsä. Enkapsulaatio on hyönteisten ensisijainen puolustuskeino parasitoideja vastaan (Godfray 1994). Enkapsulaatiossa hyönteisen ruumiinontelossa kiertävät solut tunnistavat loisen ja muodostavat sen ympärille kapselin, joka estää hapen ja ravinteiden saannin aiheuttaen loisen kuoleman (Godfray 1994). Soluista muodostuvan kapselin massa sisältää tummaa pigmenttiä, melaniinia (Carton & Nappi 1997), jonka tummuutta mittaamalla voidaan arvioida enkapsuloituneen materiaalin määrä (König & Schmid-Hempel 1995, Schmid-Hempel & Schmid-Hempel 1998).

Myös hyönteisen ravintokasvilla voi olla vaikutusta loispuolustukseen. Kasvien sekundaarisiin yhdisteisiin kuuluu haitallisten yhdisteiden lisäksi myös hyödyllisiä antioksidantteja, joilla on tärkeä merkitys hyönteisten stressitilojen kuten infektioiden haitallisten vaikutusten vähentämisessä (Ouchane ym. 1997). On havaittu, että ravinnon korkea antioksidanttipitoisuus voi tehostaa enkapsulaatiota (Ojala ym. 2005) ja siten vahvistaa loispuolustusta. Lisäksi on tuloksia, joissa ravintokasvin puolustusyhdisteet, ja usein niiden korkea pitoisuus, ovat vähentäneet herbivorin loisintaa tai parantaneet selviytymistä siitä (Thorpe & Barbosa 1986, van Nouhyus & Hanski 1999, Nieminen ym. 2003, Singer & Stireman 2003, Björkman ym. 1997, Karban & English-Loeb 1997). Ravintokasvin yhdisteillä voi olla myös epäsuora vaikutus herbivorin loisintaan. Isäntäkasvin haihtuvat yhdisteet voivat esimerkiksi houkuttaa loisia ja nostaa siten loisinta-alttiutta (Havill & Raffa 2000, Lill ym. 2002). Näin ollen on tärkeää, että tarkasteltaessa isännän ja loisen välisiä vuorovaikutussuhteita myös isännän ravintokasvin vaikutukset huomioitaisiin. Siten pystytään muodostamaan kokonaisvaltaisempi kuva isännän ja loisen populaatiodynamiikkaan vaikuttavista evolutiivisista ja ekologisista tekijöistä.

Massaesiintymiä kehittävät mäntypistiäiset (Diprionidae) ovat esimerkki lajiryhmästä, joilla ravintokasvin vaikutus peto- ja loispuolustukseen voisi olla merkittävä. Aikaisempien tutkimusten perusteella tiedetään, että mäntypistiäisen toukat puolustautuvat saalistajia, kuten muurahaisia ja lintuja, vastaan kemiallisesti, ryhmittymällä ja tekemällä puolustusliikkeitä (Eisner ym. 1974, Larsson ym. 1986, Björkman & Larsson 1991, Codella & Raffa 1995b, 1996, Larsson ym. 2000, Lindstedt ym. 2006). Puolustuskemikaalit mäntypistiäisen toukat saavat ravintona käyttämistään männyn neulasista, joiden pihka sisältää männyn kemiallisia puolustusyhdisteitä (Eisner ym. 1974, Ikeda ym. 1977, Codella & Raffa 1995b, 1996, Larsson ym. 2000). Pihka koostuu pihka-aineista, jotka muodostuvat suurimmaksi osaksi diterpenoihin kuuluvista hartsihapoista (Eisner ym. 1974). Toukka varastoi terpeenipitoisen puolustusnesteen ruumiinontelon alkupäässä olevaan kahteen umpinaiseen erityspussiin (Eisner ym. 1974). Kun toukkaa häiritään, se erittää suustaan pisaran pihkaista puolustusnestettä ja tekee samalla puolustusliikkeitä heilauttelemalla kohotettua etupäätänsä. Saalistajan hyökkäykseen toukka reagoi nopeasti koskettamalla sitä tahmealla pisaralla. Mäntypistiäisen toukat elävät ryhmässä ja usein koko pesue alkaa toistaa puolustusliikkeitä häirinnän jatkuessa (Viitasaari & Varama 1987).

Monilla hyönteislajeilla kemialliseen puolustautumiseen on yhdistynyt näkyvä varoitusväri, kuten monarkkiperhosella (*Danaus plexippus*) (Calvert ym. 1979), hietakiitäjillä (*Cicindelidae*) (Pearson 1985, Pearson 1988) ja seitsenpistepirkolla (*Coccinella septempunctata*) (Marples ym. 1989). Mäntypistiäiset ovat kuitenkin

monivaiheisesta (ryhmittymisen, puolustusliikkeet, kemiallinen puolustus) puolustautumisstrategiastaan huolimatta melko hyvin taustansa sulautuvia eli kryptisiä (Larsson ym. 1986, Björkman & Larsson 1991, Codella & Raffa 1995a, 1995b, 1996, Larsson ym. 2000). Yksi syy kryptiseen väritykseen voisi olla heikko puolustuskyky loisista vastaan, sillä monipuolinen puolustautuminenkaan ei välttämättä tehoa parasitoideihin samoin kuin petoihin (Gross 1993, Gentry & Dyer 2002). Jos isäntäeliön silmiinpistävä ulkonäkö houkuttaa parasitoideja, jotka aiheuttavat merkittävää kuolleisuutta, ympäristöön sulautuva väritys voi olla kannattavampi (Endler & Mappes 2004).

Mäntypistiäisiä loisivat useat loispistiäiset (*Ichneumonidae*) ja loiskärpäset (*Tachinidae*) (Pschorn-Walcher & Eichhorn 1973, Pschorn-Walcher 1987, Larsson & Tenow 1984). Parasitoidien esiintyminen ja runsaus riippuvat mäntypistiäisen tiheyden vaihteluista (Pschorn-Walcher 1987). Hyönteistoukan puolustusmekanismit, jotka toimivat petopuolustuksessa, ovat usein melko tehottomia specialisti parasitoideja vastaan (Gross 1993, Gentry & Dyer 2002). Osa mäntypistiäisen toukkia loisivista lajeista munii toukan päälle taakse (Prop 1960, Björkman & Gref 1993), johon se ei yllä torjumaan puolustusnestepisarallaan (Eisner ym. 1974). Myös isännän löytämiskyvyssä on eroja parasitoidilajien välillä (Pschorn-Walcher 1987, Herz & Heitland 1999). Mäntypistiäisellä toukkien ryhmäkoolla ei ole paljonkaan merkitystä puolustuksessa parasitoideja vastaan, sillä loisintaluvun ei ole havaittu vaihtelevan erikokoisten ryhmien välillä (Herz & Heitland 1999).

Männyn neulasten pihka-ainepitoisuudet eroavat merkittävästi sekä puiden välillä että sisällä (Larsson ym. 1986, Grew & Tenow 1987, Björkman ym. 1998). Useilla mäntypistiäislajeilla ravinnon pihka-aineiden korkean pitoisuuden on havaittu vähentävän toukkien joutumista muurahaisten saaliiksi (Björkman & Larsson 1991, Larsson ym. 1986, Lindstedt ym. 2006). Pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa ravintoa syöneet mäntypistiäisen toukat tuottavat esimerkiksi suuremman ja tahmeamman puolustusnestepisaran verrattuna toukkiin, jotka syövät pihka-ainepitoisuudelta matalaa ravintoa (Björkman & Larsson 1991). Ravinnon pihka-ainepitoisuudella ei kuitenkaan havaittu olevan vaikutusta loispuolustukseen kokeessa, jossa loisten annettiin munia toukkiin juuri ennen niiden koteloitumista (Björkman & Gref 1993). Pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa ravintoa syöneet toukat eivät selviytyneet loisinnasta pihka-ainepitoisuudeltaan matalaa ravintoa syöneitä toukkia paremmin (Björkman & Gref 1993). Kokeessa ei kuitenkaan selvitetty ravinnon pihka-ainepitoisuuden merkitystä enkapsulaatioreaktioon. Toukista on jonkin verran löydetty enkapsuloituneita loisia (Tostowaryk 1971). Ei kuitenkaan tiedetä vaikuttaako ravinnon koostumus siihen.

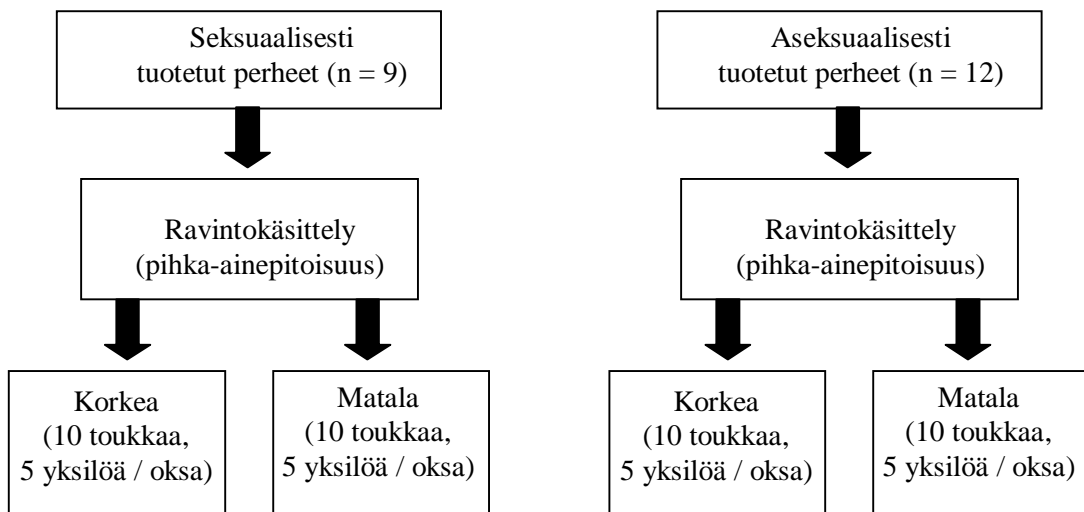
Pro gradu -tutkielmassani tutkin, miten isäntäkasvin laatu vaikuttaa specialisti herbivorin kykyyn puolustautua loisista ja petoja vastaan. Testasin mahdollisia peto- ja loispuolustuksesta aiheutuvia kustannuksia sekä ympäristön ja geneettisen vaihtelun osuutta loispuolustuksessa. Tutkimukseni ensimmäisenä tavoitteena oli selvittää onko männyn (*Pinus sylvestris*) neulasten pihka-ainepitoisuudella (englanniksi resin acids) vaikutusta pilkkumäntypistiäisen (*Diprion pini*) toukan kykyyn puolustautua loisista vastaan. Tätä selvittääkseni testasin vaihteleeko pilkkumäntypistiäisen toukkien enkapsulaatiokyky pihka-ainepitoisuudeltaan korkean ja matalan ravinnon välillä. Enkapsulaatiokykyä mittasin laboratoriokokeessa toukkaan asetettavan keinotekoisien, loista matkivan nailonsiiman palan avulla. Koska ravinnon tiedetään vaikuttavan puolustusnesteen määrään (Björkman & Larsson 1991, Codella & Raffa 1995b), mittasin myös toukkien erittämän puolustusnestepisaran koon imupaperin avulla. Loisinnan vaikutusta toukan petopuolustukseen pystyin epäsuorasti mittaamaan vertaamalla keinotekoisesti loisittujen ja loisimattomien toukkien puolustusnesteen määrää sekä mittaamalla loisituista yksilöistä puolustusnesteen määrän ja enkapsulaatioreaktion. Vaikka ravinnon korkea pihkayhdistepitoisuus voi parantaa puolustuskykyä saalistajia vastaan, siitä voi olla myös

kustannuksia kuten toukkien hidastunut kasvu (Larsson ym. 1986, Björkman & Larsson 1991, Codella & Raffa 1995b). Selvittääkseni toukan puolustukseen ja kasvuun vaikuttavia tekijöitä, siitä mitattiin myös paino, kasvunopeus, kehitysaika ja kotelopaino. Kokeessa käytetyt toukat kasvatettiin perheinä, joista kukin perhe jaettiin kasvatuksen alkuvaiheessa kahteen ravintokäsittelyyn, puolet perheestä pihka-ainepitoisuudeltaan korkealle ja puolet matalalle ravinnolle. Tämän ns. täyssisaruskoeasetelman (englanniksi full-sib design) avulla pystyttiin myös mittaamaan, onko perheiden välillä geneettistä vaihtelua kyvyssä puolustautua loisia vastaan. Koska mäntypistiäiset ovat haplodiploideja (naaraat kehittyvät hedelmöittyneistä diploideista munasoluista ja koiraat hedelmöittymättömistä haploideista munasoluista), ne pystyvät tuottamaan koirasjälkeläisiä myös ilman parittelua eli aseksuaalisesti. Kokeessa lisääntymisstrategian mahdolliset vaikutukset huomioitiin vertaamalla seksuaalisesti ja aseksuaalisesti tuotettuja jälkeläisiä.

Tutkielmassani pyrin löytämään vastaukset seuraaviin kysymyksiin:

- 1) Vaikuttaako ravinnon pihka-ainepitoisuus pilkkumäntypistiäisen toukan kykyyn puolustautua loisia vastaan enkapsulaatiolla?
- 2) Vaikuttaako ravinnon pihka-ainepitoisuus pilkkumäntypistiäistoukan puolustusnesteen määrän tuotantoon eli petopuolustukseen?
- 3) Vaikuttaako loisinta (keinotekoinen loisinta/enkapsulaatioreaktio) pilkkumäntypistiäistoukan puolustusnesteen määrän tuotantoon eli petopuolustukseen?
- 4) Vaikuttaako pilkkumäntypistiäistoukan lois- ja/tai petopuolustus sen elinkierto-ominaisuuksiin?
- 5) Onko perheiden välillä geneettistä vaihtelua kyvyssä puolustautua loisia vastaan?
- 6) Eroavatko mitatut ominaisuudet seksuaalisesti ja aseksuaalisesti tuotettujen toukkien välillä?

Tutkimus tuo tietoa pilkkumäntypistiäisen puolustautumisesta loisia vastaan ja ravinnon laadun eli männyn pihka-ainepitoisuuden vaikutuksesta siihen. Sen lisäksi, että tämä tutkimus tarjoaa tärkeää tietoa pilkkumäntypistiäisen loispuolustuksesta, sillä on myös soveltavaa arvoa, koska tälle metsätalouden kannalta merkittävälle tuholaiselle ei ole onnistuttu kehittämään tehokasta torjuntamenetelmää. Tämän vuoksi pilkkumäntypistiäisen kannanvaihteluiden mahdollisia syitä selvittävät tutkimukset ovat tarpeellisia, jotta voitaisiin paremmin ymmärtää tuhoallan syntyyn ja kehitykseen vaikuttavia tekijöitä. Loisia pidetään yhtenä tärkeänä kannanvaihteluihin vaikuttavana tekijänä, mutta silti niiden vaikutuksia mäntypistiäisiin on tutkittu melko vähän.



Kuva1. Koeasetelma.

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Tutkimuslaji

Pilkkumäntypistiäinen (*D. pini*) on yksi yleisimmistä männyn tuholaisista Suomessa. Toukat käyttävät ravintonaan kaikenikäisiä männyn (*P. sylvestris*) neulasia. Useimpina vuosina pilkkumäntypistiäinen on melko vähälukuinen, mutta ajoittain kannan runsastuessa ne voivat aiheuttaa pahimmillaan tuhansien hehtaarien tuhoa mäntymetsissä. Pilkkumäntypistiäinen talvehtii kotelona ja aikuisten kuoriutuminen alkaa toukokuun puolivälistä ja jatkuu useana aaltona heinäkuun alkuun asti. Ensimmäiset toukat kuoriutuvat neulasissa kesäkuun lopulla 3–4 viikkoa kestäneen munavaiheen jälkeen. Elo-syyskuussa toukat laskeutuvat maahan koteloitumaan (Varama & Viitasaaari 1987).

Tutkimusta varten pilkkumäntypistiäisen koteloiita kerättiin vanhalta tuhoalueelta Itä-Suomesta Ilomantsin Palokankaalta (62° N, 26° E) toukokuun alussa 2005. Kotelot tuotiin Jyväskylän yliopiston laboratoriotiloihin, joissa koteloiista kasvatettiin aikuisia. Aikuiset paritettiin mahdollisimman pian kuoriutumisen jälkeen. Koska koiraita kuoriutui naaraita vähemmän, osa naaraista lisääntyi aseksuaalisesti munimalla munat parittelematta koiraan kanssa. Aseksuaalisesti tuotetut jälkeläiset olivat kaikki haploideja koiraita, kuten myös seksuaalisesti tuotetut koiraat. Parituksessa koiras ja naaras asetettiin harsomaisessa kangaspussissa olevalle noin 25 senttimetriä pitkälle tuoreelle männynoksalle, joka siirrettiin välittömästi vesiastian laboratorion ikkunapöydälle. Aseksuaalisesti lisääntyneet naaraat laitettiin männynoksalle vastaavanlaisesti ilman koirasta. Näin yhdellä oksalla oli vain yhden joko parittelemattoman tai paritelleen naaraan munia. Valon määrää laboratoriossa säädettiin sälekaihtimilla siten, että oksat saivat runsaasti valoa, mutta eivät olleet suorassa auringonpaisteessa. Valorytmi seurasi normaalia vuodenaikaisrytmiä ja lämpötila oli +21 celsiusastetta. Koska neulasten kuivuminen olisi voinut vaikuttaa munien selviytymiseen (Pasquier-Barre ym. 2001), oksia sumutettiin vedellä päivittäin ja varren imupintaa uusittiin leikkaamalla ne vähintään kaksi kertaa viikossa. Naaraan kuoltua neulasissa olevat munat laskettiin ja kangaspussi poistettiin. Koiras ja naaras säilöttiin alkoholiin.

2.2 Tutkimuksen toteutus

2.2.1 Ravintokäsittelyt

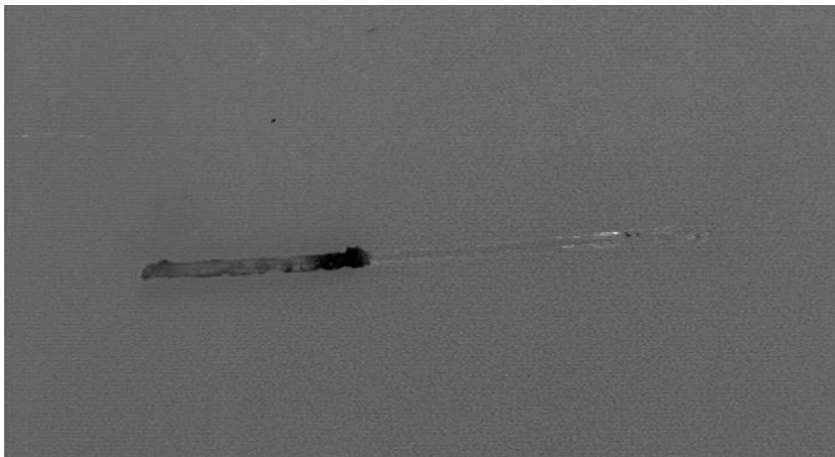
Halusin selvittää täyssisaruskoeasetelman avulla, vaikuttaako ravinnon laatu pilkkumäntypistiäisen puolustautumiskykyyn loisia vastaan vai onko tämä ominaisuus enemmän geneettisesti määräytynyt. Toukkien ollessa yhdeksän päivän ikäisiä kukin perhe jaettiin kahteen ravintokäsittelyyn: puolet pihka-ainepitoisuudeltaan korkealle ja puolet pihka-ainepitoisuudeltaan matalalle oksalle. Kumpaankin käsittelyyn toukkia tuli maksimissaan kymmenen ja korkeintaan viisi toukkaa yhdelle oksalle (kuva 1). Useissa perheissä toukkia kuitenkin kuoriutui vähemmän kuin 20, minkä vuoksi toukkien määrä perheiden välillä vaihteli. Toukkien riittävä tuoreen ravinnon saanti varmistettiin lisäämällä kaksi kertaa viikossa pihka-ainepitoisuudeltaan ravintokäsittelyä vastaava tuore oksa.

Kokeessa toukkien ravintona käytetyt pihka-ainepitoisuudeltaan korkeat ja matalat männynoksat olivat puista, joiden pihka-ainepitoisuus oli määritetty etukäteen. Neulasten pihkatiehyiden määrää voidaan pitää epäsuorana mittarina puun neulasten pihka-aineiden pitoisuuksien määrästä koko puussa (Björkman ym. 1991). Kunkin männyn pihka-ainepitoisuus selvitettiin valitsemalla satunnaisesti eripuolilta puuta otetuista neulasnäytteistä kolme neulasparia, joiden ohuista poikkileikkausviipaleista laskettiin pihkatiehyiden lukumäärä mikroskoopin avulla. Puun pihka-ainepitoisuuden arvo saatiin laskettujen neulasten pihkatiehyiden määrän keskiarvosta. Pihka-ainepitoisuudeltaan matalien puiden keskiarvo oli alle neljä ja pihka-ainepitoisuudeltaan korkeiden yli kymmenen. Puita, joiden keskiarvo oli seitsemän, pidettiin keskitasoisina. Parituksessa käytetyt oksat, joissa toukat olivat yhdeksänpäivänikäisiksi asti, olivat pihka-ainepitoisuudeltaan keskitasoa. Tällä pyrittiin varmistamaan kaikille perheille samanlaiset lähtökohdat ennen ravintokäsittelyä. Tutkimus toteutettiin touko–heinäkuun välisenä aikana 2005 Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksella ekologian osaston laboratoriossa.

2.2.2 Loispuolustustehokkuuden (enkapsulaatioreaktio) mittaaminen

Ravinnon pihka-ainepitoisuuden vaikutusta toukkien kykyyn puolustautua loisiväisiä parasitoideja vastaan tutkittiin mittaamalla enkapsulaatioreaktiota keinotekoisella loisella (Rantala ym. 2000, Ryder & Siva-Jothy 2000, Koskimäki ym. 2004, Ojala ym. 2005). Enkapsulaatio on hyönteisen elimistön yleinen immuunipuolustusreaktio kaikkia sen sisälle tunkeutuvia vieraita kohteita vastaan. Loisten lisäksi myös pienet elottomat toukkaan asetetut partikkelit enkapsuloituvat eli niiden ympärille muodostuu kapselimainen kerros (Lackie 1988), jolla hyönteinen pyrkii tukahduttamaan loisen (Godfray 1994). Enkapsulaatioreaktion mittaamisessa käytetäänkin yleisesti keinotekoisia loisia, kuten nailonimplanttia (esim. Rantala ym. 2000, Ryder and Siva-Jothy 2000, Koskimäki ym. 2004, Ojala ym. 2005). Koska implantti ei estä toukkaa kehittymästä aikuiseksi, myös elinkierto-ominaisuudet voidaan mitata. Implanttina käytettiin neljän millimetrin pituisia ja 0,11 millimetrin vahvuista nailonsiiman palasta. Implantit asetettiin toukkiin niiden ollessa 15 päivän ikäisiä. Ennen implantointia perheestä valittiin satunnaisesti maksimissaan kymmenen toukkaa, viisi kummastakin ravintokäsittelystä. Ennen valintaa toukat punnittiin sekä yksilöitiin. Toukat tainnutettiin yksitellen hiilidioksidilla (esimerkiksi Ojala ym. 2005) tiiviissä noin 0,7 desilitran muovipurkissa. Mikroskoopin alla toukan selkäpuolelle yläosaan tehtiin 0,5 millimetrin vahvuisella neulalla reikä, josta etanoliin kastettu implantti asetettiin toukan sisälle siten että noin 1/3 jäi ulkopuolelle (esimerkiksi Ojala ym. 2005). Esikokeissa selvitettiin kuinka kauan toukan immuunipuolustuksella kesti reagoida implanttiiin enkapsulaatiolla. Esikokeiden perusteella implanttia päädyttiin pitämään toukassa kaksi vuorokautta. Implantin

poistamisen yhteydessä toukka jälleen tainnutettiin hiilidioksidilla. Implantit kuvattiin mikroskoopissa (57 -kertainen suurennos), johon oli liitetty Panasonic wv-CL702 videokamera. Jokaisesta implantista otettiin kolme mustavalkoista kuvaa eri kulmista. Näin varmistettiin, että implantit nähtiin joka puolelta (Rantala ym. 2000). Kuvien analysoinnissa käytettiin ImagePro Plus 4.0- ohjelmaa. Implantin tummuus mitattiin noin 1 millimetrin matkalta implantin päästä, joka oli ollut toukan sisällä. Myös jokaisen kuvan taustan tummuus mitattiin. Kuvauksen aikainen mahdollinen valaistuksen muuttuminen otettiin kuvissa huomioon vähentämällä taustan tummuudesta implantin tummuus. Näin kuvista saatiin keskenään vertailukelpoisia. Toukan enkapsulaatioreaktion voimakkuus saatiin laskemalla taustan ja implantin tummuuden arvojen erotus kolmesta kuvasta ja ottamalla niiden keskiarvo. Mitä tummempi implanti, sitä tehokkaampi enkapsulaatioreaktio on ja sitä paremmin hyönteinen pystyy puolustautumaan loisia vastaan. Implantin avulla siis selvitettiin toukan enkapsulaatioreaktion eli loispuolustuksen tehokkuutta sekä implantoinnin eli loisinnan vaikutusta toukkaan. Käsitteen selkeyttämiseksi tästä eteenpäin, kun tämän tutkimuksen yhteydessä puhutaan loisinnasta, sillä tarkoitetaan implantointia eli kyseistä keinotekoisia loisintäkäsittelyä.



Kuva 2. Enkapsulaatioreaktion mittauksessa käytetty 4 millimetriä pitkä nailonimplantti. Toisessa päässä näkyy muodostunut solukerros, jonka tummuutta mittaamalla saatiin selville toukan enkapsulaation tehokkuus.

2.2.3 Petopuolustuksen (puolustusnesteen määrä) mittaaminen

Aikaisempien tutkimusten perusteella ravinnon pihka-ainepitoisuuden tiedetään parantavan mäntypistiäistoukkien petopuolustusta (Larsson ym. 1986, Björkman & Larsson 1991). Jotta voitiin mitata petopuolustuksen tehokkuutta ja mahdollisia trade-off-tilanteita petopuolustuksen ja loispuolustuksen välillä, mitattiin kokeen aikana toukkien erittämän puolustusnesteen määrä. Koska tainnutuksessa käytetty hiilidioksidi sai toukan erittämään puolustusnestettä, puolustusnestepisara otettiin implantin poistamisen yhteydessä imupaperille. Samalla tavoin myös perheiden loisimattomilta toukilta kerättiin puolustusnestepisarat nukuttamalla ne hiilidioksidilla. Jotta pisaran koko jäi varmasti näkyviin, sen ääriviivat vahvistettiin lyijykynällä. Näytteet kuvattiin Canon EOS D60-digitaalikameralla 50 millimetrin makro-objektiivilla ja mitattiin ImagePro Plus 4-ohjelmalla. Kunkin toukan erittämä puolustusnesteen määrä saatiin mittaamalla pisaran pinta-ala neliömillimetreinä (mm²).

2.2.4 Elinkiertopiirteiden mittaaminen

Mittaamalla toukkien painoa, kehitystä ja kasvua pystyttiin havaitsemaan miten ravinto,

lois- ja petopuolustus vaikuttavat toukkien elinkierto- ja piirteisiin. Toukkien kasvua seurattiin punnitsemalla ne kolme kertaa kasvatuksen aikana. Ensimmäinen punnitus tehtiin yhdeksän päivän ikäisenä ravintokäsittelyyn jaon yhteydessä. Ennen viimeistä punnitusta toukat yksilöitiin ja siirrettiin kukin omalla petrimaljalle. Tuoretta ravintoa lisättiin tarvittaessa, kuitenkin joka toinen päivä. Toukan koteloiduttua kotelo punnittiin. Kehitysaika laskettiin päivinä toukan kuoriutumisen ja koteloitumisen välillä.

2.3 Tilastolliset menetelmät

Naaraspuoliset jälkeläiset jätettiin pois kaikista analyyseistä, koska ne ovat sukupuolidimorfian vuoksi koiraita isompia ja niitä myös kuoriutui huomattavasti vähemmän. Naaraat pystyttiin erottamaan koiraista kotelopainon perusteella (Mopper ym. 1990). Näin ollen tilastollisissa analyyseissä verrattiin pelkästään koiraista mitattuja muuttujia. Samalla pystyttiin vertaamaan seksuaalisesti tuotettuja koiraita aseksuaalisesti tuotettuihin. Muuttujien varianssien homoskedastisuus tarkastettiin Levenen testillä.

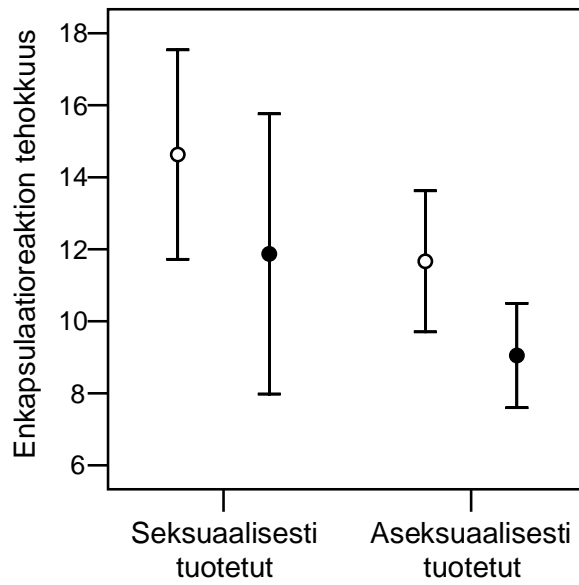
Tilastollisissa analyyseissä käytettiin perheiden keskiarvoja, jotta pystyttiin korjaamaan kuolleisuuden ja erikokoisten perheiden aiheuttamaa heteroskedastista vaihtelua. Enkapsulaatioreaktion, puolustusnesteiden määrän ja elinkierto- ja piirteiden testauksessa käytettiin monisuuntaista varianssianalyysiä (ANOVA; univariate analysis of variance). Testattaessa ravinnon laadun vaikutusta loispuolustustehokkuuteen selitettävänä muuttujana (Dependent variable) oli enkapsulaatioreaktion voimakkuus ja selittävinä muuttujina (Fixed factors) olivat ravintokäsittely ja lisääntymistapa. Toukan painon, kotelopainon, kasvunopeuden, kehitysaikan tai puolustusnesteiden määrän ollessa selitettävänä muuttujana olivat selittävinä muuttujina loisinta (oliko implanttia vai ei), lisääntymistapa ja ravintokäsittely. Kasvunopeus laskettiin kaavalla \ln kotelopaino/toukan kehitysaika päivinä. Muuttujien lineaarista riippuvuutta tarkasteltiin käyttämällä Pearsonin korrelaatiokerrointa ja sen merkitsevyyden testiä.

Perheiden välistä geneettistä vaihtelua enkapsulaatioreaktiossa eli loispuolustuksessa tutkittiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (One-Way ANOVA). Selitettävänä muuttujana (Dependent list) oli enkapsulaatioreaktio ja ryhmittelymuuttujana (Factor) perhe. Analyysit tehtiin aineistosta, jossa oli mukana kaikki perheen koirasyksilöt. Ravintokäsittelyt yhdistettiin, koska ravinnon laatu ei vaikuttanut pääanalyyseissä toukkien enkapsulaatioreaktioon. Seksuaalisesti ja aseksuaalisesti tuotetut perheet testattiin erikseen, koska kirjallisuuden perusteella seksuaalisesti tuotetuilla perheillä voisi olettaa olevan enemmän geneettistä vaihtelua (Stearns & Hoekstra 2002). Kaikki tilastolliset analyysit tehtiin SPSS 13.0 -ohjelmalla.

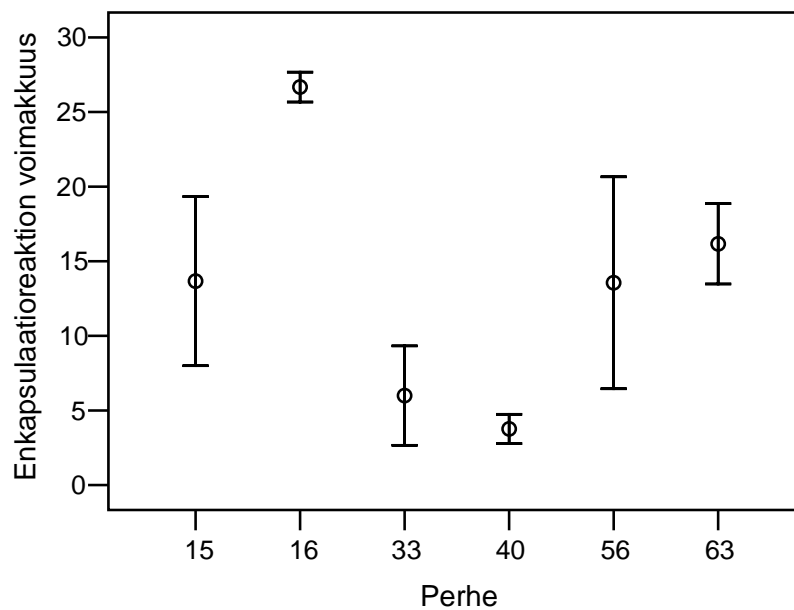
3. TULOKSET

3.1 Ravinnon laadun ja lisääntymistavan vaikutus loispuolustustehokkuuteen

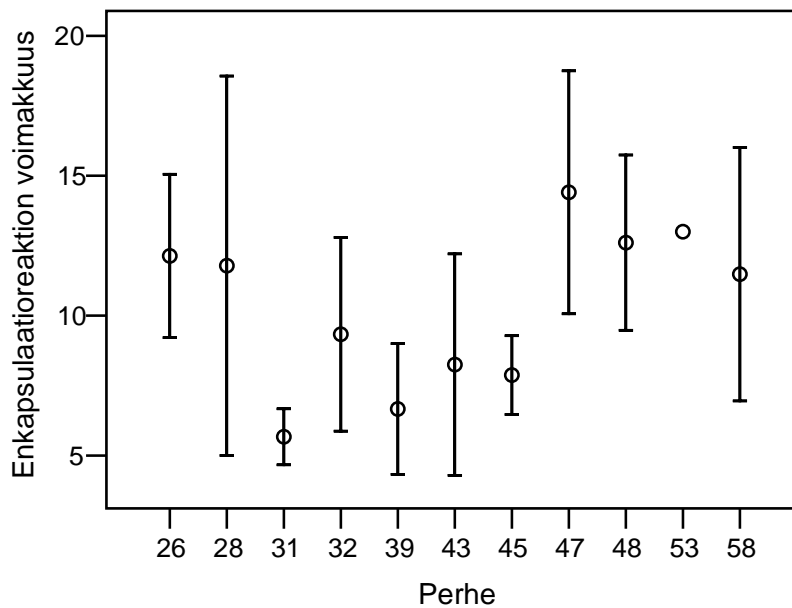
Ravinnolla ei ollut vaikutusta toukkien enkapsulaatiokykyyn. Enkapsulaatioreaktio oli yhtä voimakas pihka-ainepitoisuudeltaan korkea ja matalaa ravintoa syöneillä toukilla ($F_{1,29} = 1.245$, $p = 0.274$). Eroa ei myöskään löytynyt seksuaalisesti ja aseksuaalisesti tuotettujen toukkien enkapsulaatiokykyssä ($F_{1,29} = 1.443$, $p = 0.239$). Näin ollen ravinnon pihka-ainepitoisuus ja lisääntymistapa eivät vaikuta merkittävästi toukkien kykyyn puolustautua loisia vastaan (kuva 3). Seksuaalisesti tuotettujen perheiden välillä oli kuitenkin merkittävä vaihtelua enkapsulaatioreaktion voimakkuudessa ($F = 4.795$, $p = 0.006$) (kuva 4a). Aseksuaalisesti tuotettujen perheiden väliltä ei puolestaan löytynyt vaihtelua enkapsulaatioreaktion tehokkuudessa ($F = 0.363$, 0.965) (kuva 4b).



Kuva 3. Pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa (○) ja matalaa (●) ravintoa syöneiden seksuaalisesti ja aseksuaalisesti tuotettujen toukkien enkapsulaatioreaktion tehokkuus (keskiarvon keskivirhe +/-).



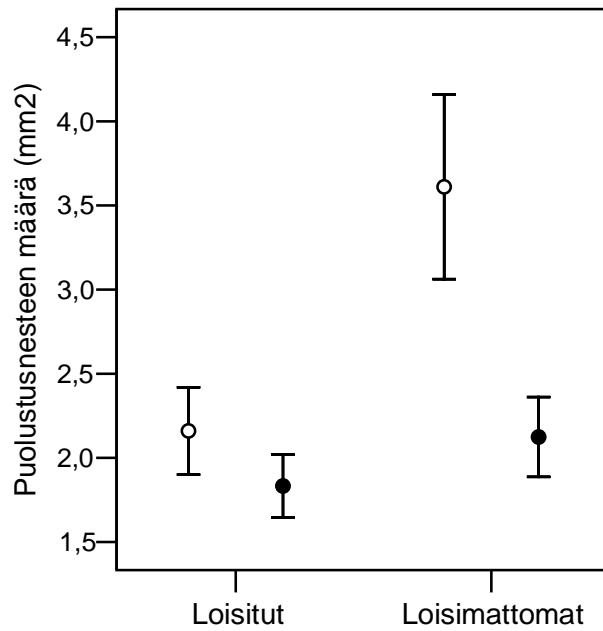
Kuva 4a. Seksuaalisesti tuotettujen perheiden välinen vaihtelu enkapsulaatioreaktion tehokkuudessa (keskiarvon keskivirhe +/-).



Kuva 4b. Aseksuaalisesti tuotettujen perheiden välinen vaihtelu enkapsulaatioreaktion tehokkuudessa (keskiarvon keskivirhe ± 1).

3.2 Ravinnon laadun, loispuolustuksen ja lisääntymistavan vaikutus petopuolustustehokkuuteen

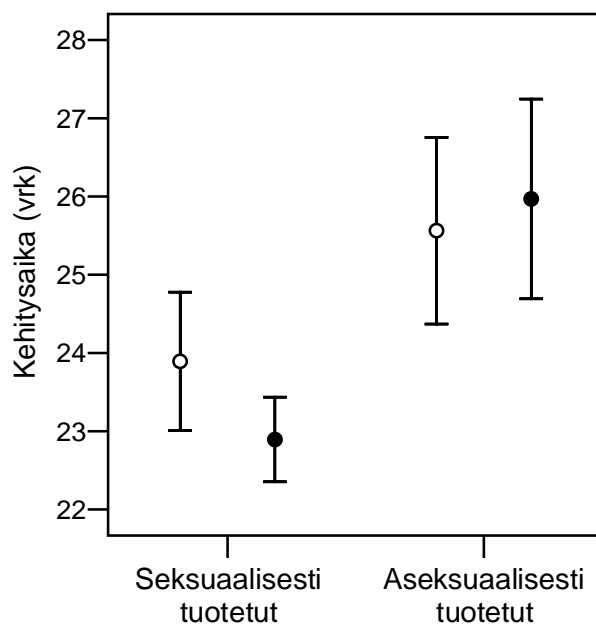
Pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa ravintoa syöneet toukat tuottivat enemmän puolustusnestettä verrattuna pihka-ainepitoisuudeltaan matalaa ravintoa syöneisiin toukkiin ($F_{1,44} = 8.303$, $p = 0.006$). Loisitut (eli implantoidut) toukat tuottivat vähemmän puolustusnestettä kuin loisimattomat (eli implantoimattomat) ($F_{1,44} = 8.720$, $p = 0.005$). Ravinnolla ja loisinnalla oli lisäksi yhdysvaikutus puolustusnesteen määrään ($F_{1,44} = 4.125$, $p = 0.048$) eli loisinta vähensi puolustusnesteen määrää erityisesti pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa ravintoa syöneillä toukilla (kuva 5). Lisääntymistavalla ei ollut vaikutusta puolustusnesteen määrään; seksuaalisesti ja aseksuaalisesti tuotetut toukat tuottivat yhtä paljon puolustusnestettä ($F_{1,44} = 1.315$, $p = 0.258$). Lisääntymistavalla ei myöskään ollut yhdysvaikutusta ravinnon ($F_{1,44} = 1.276$, $p = 0.265$) tai loisinnan ($F_{1,44} = 2.676$, $p = 0.109$) kanssa.



Kuva 5. Pihka-ainepitoisuudeltaan korkea (○) ja matalaa (●) ravintoa syöneiden loisittujen ja loisimattomien toukkien puolustusnesteen määrä neliömillimetreinä (keskiarvon keskivirhe +1).

3.3 Ravinnon laadun, lisääntymistavan ja puolustautumisen aiheuttama vaihtelu elinkierto- ja elinpiirteissä

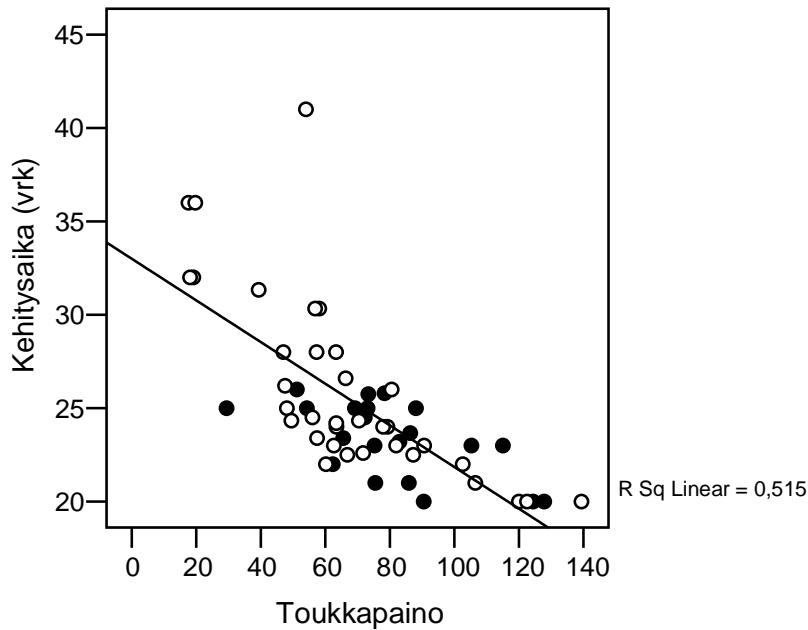
Ravinnon pihka-ainepitoisuus tai loisinta ei vaikuttanut toukkien kehitysaikaan (Taulukko 1). Sen sijaan seksuaalisesti tuotetut toukat kehittyivät ja kasvoivat nopeammin kuin aseksuaalisesti tuotetut (Taulukko 1, kuva 6). Lisääntymistavan, ravinnon laadun ja loisinnan välillä ei ollut yhdysvaikutuksia kehitysajan ja kasvunopeuden suhteen (Taulukko 1).



Kuva 6. Seksuaalisesti ja aseksuaalisesti tuotetuiden toukkien kehitysaika (keskiarvon keskivirhe +1) pihka-ainepitoisuudeltaan korkealla (○) ja matalalla (●) ravinnolla.

Kotelopaino oli korkeampi toukilla, jotka olivat syöneet pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa ravintoa (Taulukko 1, kuva 8a). Lisäksi seksuaalisesti tuotettujen ja loisimattomien toukkien kotelopaino oli korkeampi kuin aseksuaalisesti tuotettujen ja loisittujen toukkien (Taulukko 1, kuva 8b). Lisääntymistavalla ei ollut yhdysvaikutusta ravinnon tai loisinnan kanssa (Taulukko 1). Yhdysvaikutusta ei ollut myöskään ravinnon ja loisinnan, eikä lisääntymistavan, ravinnon ja loisinnan välillä (Taulukko 1).

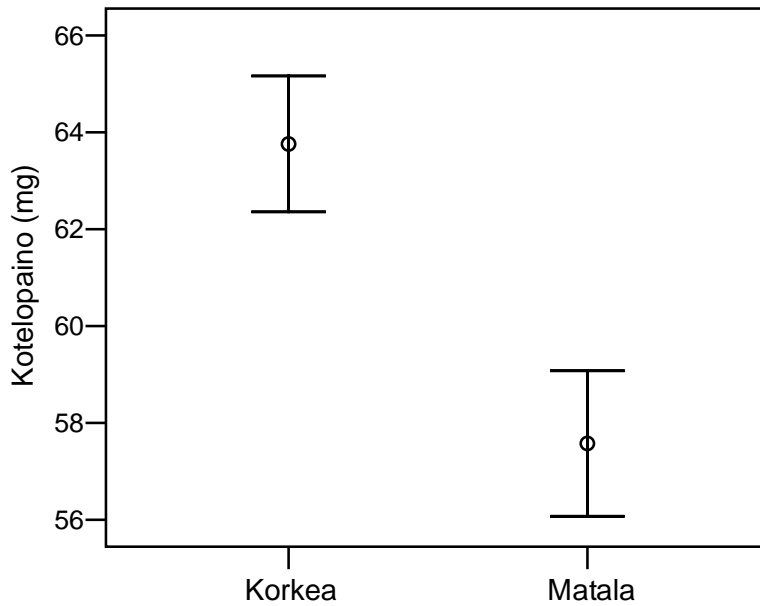
Molemmilla lisääntymistavoilla nopeasti kehittyneistä toukkayksilöistä tuli painavampia ja hitaasti kehittyneet yksilöt jäivät pienemmiksi (seksuaalisesti tuotetut: $R = 0.714$, $p = 0.009$, aseksuaalisesti tuotetut: $R = 0.797$, $p < 0.001$, kuva 7).



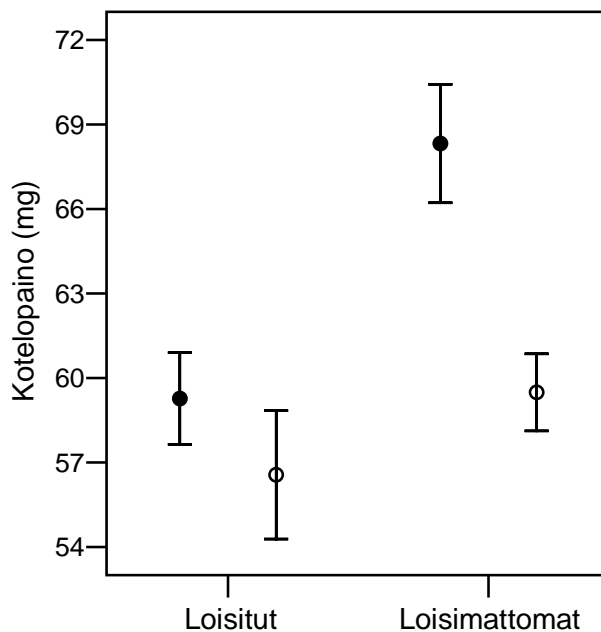
Kuva 7. Seksuaalisesti (●) ja aseksuaalisesti (○) tuotettujen toukkien paino suhteessa kehitysaikaan.

Taulukko 1. Varianssianalyysin tulokset. Lisääntymistavan, ravinnon pihka-ainepitoisuuden ja loisinnan (selittävät muuttujat) vaikutukset kehitysaikaan, kasvunopeuteen ja kotelopainoon (selitettävät muuttujat).

Vaihtelun lähde	d.f.	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
Kehitysaika				
Lisääntymistapa	1	90.911	4.604	0.036
Ravintokäsittely	1	1.163	0.059	0.809
Loisintakäsittely	1	1.344	0.068	0.795
Lisääntymistapa x Ravintokäsittely	1	7.845	0.397	0.531
Lisääntymistapa x Loisintakäsittely	1	9.196	0.466	0.498
Lisääntymistapa x Ravintokäsittely x Loisintakäsittely	1	11.420	0.578	0.450
Error	57			
Kasvunopeus				
Lisääntymistapa	1	0.004	5.967	0.018
Ravintokäsittely	1	0.000	0.168	0.683
Loisintakäsittely	1	0.001	1.517	0.223
Lisääntymistapa x Ravintokäsittely	1	0.000	0.358	0.552
Lisääntymistapa x Loisintakäsittely	1	0.001	1.491	0.227
Ravintokäsittely x Loisintakäsittely	1	4.28E-005	0.058	0.811
Lisääntymistapa x Ravintokäsittely x Loisintakäsittely	1	0.000	0.624	0.433
Error	57			
Kotelopaino				
Lisääntymistapa	1	529.901	9.874	0.003
Ravintokäsittely	1	508.971	9.484	0.003
Loisintakäsittely	1	495.312	9.229	0.004
Lisääntymistapa x Ravintokäsittely	1	6.303	0.117	0.733
Lisääntymistapa x Loisintakäsittely	1	135.385	2.523	0.118
Lisääntymistapa x Ravintokäsittely x Loisintakäsittely	1	29.027	0.541	0.465
Error	57			



Kuva 8a. Kotelopaino (keskiarvon keskivirhe ± 1) pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa ja matalaa ravintoa syöneiden toukkien välillä.



Kuva 8b. Seksuaalisesti (●) ja aseksuaalisesti (○) tuotettujen loisittujen ja loisimattomien toukkien kotelopaino (keskiarvon keskivirhe ± 1).

4. TULOSTEN TARKASTELU

4.1 Ravinnon laadun ja lisääntymistavan vaikutus loispuolustustehokkuuteen

Saamieni tulosten mukaan männyn neulasten pihka-ainepitoisuus ei vaikuta merkittävästi niitä ravintonaan käyttävien pilkkumäntypistiäistoukkien enkapsulaatioreaktion tehokkuuteen, eli toukat eivät pysty vahvistamaan sisäistä immuunipuolustustaan parasitoidien munia ja toukkia vastaan syömällä pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa ravintoa. Kuitenkin kuva 3 antaa viitteitä siihen, että enkapsulaatio voisi olla tehokkaampaa pihka-ainepitoisuudeltaan korkealla ravinnolla. Mahdollinen ero olisi voinut

olla selkeämpi, jos otoskoko olisi ollut suurempi. Vastaavanlainen tulos on kuitenkin löydetty aiemminkin ruskomäntypistiäisellä (*Neodiprion sertifer*), jolla ravinnon pihka-ainepitoisuus ei vaikuttanut koteloituvien toukkien selviytymiseen elävien loisten loisinnasta (Björkman & Gref 1993). Kuitenkin Björkmanin ym. (1997) maastokokeessa loisintaa havaittiin vain toukilla, jotka olivat kasvaneet pihka-ainepitoisuudeltaan matalilla puilla. Maastossa tehdyissä loisintakokeissa kuitenkin myös toukan aktiivinen puolustautuminen, puolustusnesteen erittäminen ja liikkeet voivat vaikuttaa loisintamenestykseen, jolloin ravinnon osuutta sisäiseen loispuolustukseen voi olla vaikea arvioida. Tutkimukseni koe toteutettiin keinotekoisilla loisilla laboratorio-oloissa, joten toukan aktiivisen puolustautumisen vaikutus loispuolustukseen pystyttiin sulkemaan pois. Björkman & Grefin (1993) tulosten perusteella mäntypistiäisen toukan ravinnosta saamat pihka-aineet eivät ole kovin haitallisia sitä loisivien parasitoidien munille ja toukille. Toisaalta ravinnon sisältämien yhdisteiden pitää saavuttaa toukan hemolymfa, jotta niillä olisi haitallinen vaikutus kehittyviin loisiin (Björkman & Gref 1993). Eisnerin 1974 mukaan ravinnon pihka-aineet eivät päädy mäntypistiäistoukan hemolymfaan. Myöhemmin tehdyt tarkemmat tutkimukset ovat osittain päinvastaisia ja osoittavat puolestaan, että yhdisteitä kulkeutuu muuallekin mäntypistiäistoukan elimistöön (Larsson ym. 1986, Björkman & Gref 1993, Björkman ym. 1997).

Päinvastoin kuin omat tulokseni osoittivat, pilkkumäntypistiäisen tavoin massaesiintymiä kehittävällä tunturimittarilla (*Epirrita autumnata*) ravinnon laadun on havaittu vaikuttavan sen koteloiden enkapsulaatiokykyyn (Klemola ym. 2008). Tutkimuksessa käytetyt tunturikoivut (*Betula pubescens spp.czerepanovii*) oli aikaisemmassa tutkimuksessa toukkien menestymisen ja lehtien vesipitoisuuden perusteella luokiteltu laadultaan joko korkea- tai matalalatautuisiksi (Kapari ym. 2006). Korkealatautuisilla tunturikoivuilla kasvaneiden toukkien enkapsulaatioreaktio kotelovaiheessa oli tehokkaampi kuin matalalatautuisilla tunturikoivuilla olleilla toukilla (Klemola ym. 2008). Altistettaessa kotelot parasitoideille, isäntäkasvin laadun vaikutusta loispuolustehokkuuteen ei kuitenkaan pystytty osoittamaan (Klemola ym. 2008). Hyönteisissä on kuitenkin lajeja, jotka pystyvät vastustamaan elimistössään olevia loisen munia ja toukkia vaikuttamalla niihin haitallisesti ravinnosta saamallaan yhdisteillä (Barbosa ym. 1986, van Nouhyus & Hanski 1999, Nieminen ym. 2003). *Manduca secta* -lajin kiitäjillä nikotiinipitoinen ravintokasvi pidentää niitä loisivien parasitoidien kehitysaikaa ja alentaa selviytymistä (Barbosa ym. 1986). Täpläverkkoperhosen (*Melitaea cinxia*) toukka puolestaan varastoi ravintokasveistaan heinäratamosta (*Plantago lanceota*) ja tähkätädykkeestä (*Veronica spicata*) karvaanmakuisia iridoidiglykosidiyhdisteitä (Suomi ym. 2001), jotka suojelevat toukkaa useimmilta saalistajilta (Bowers 1980, Dyer 1995, Suomi 2001). Vaikka *Cotesia melitaeorum* loispistiäinen on erikoistunut munimaan iridoidipitoista ravintoa syöviin täpläverkkoperhosen toukkiin (van Nouhyus & Hanski 2004), on sen havaittu menestyvän huomomin toukilla, jotka ovat syöneet ravintoa, jossa on korkea iridoidipitoisuus (van Nouhyus & Hanski 1999, Nieminen ym. 2003). Esimerkit osoittavat, että ravintokasvi-isäntä-loinen -vuorovaikutussuhteen lopputulos voi vaihdella isäntäkasvin ja sen herbivorien sekä käytetyn mittaustavan mukaan (keinotekoinen loinen vs. oikea loinen).

Perheiden välinen geneettinen vaihtelu pilkkumäntypistiäistoukkien enkapsulaatioreaktiossa katsottiin erikseen seksuaalisesti ja aseksuaalisesti tuotetuista perheistä. Seksuaalisesti lisääntyvät eliöt tuottavat jälkeläisiä, jotka ovat geneettisesti erilaisia. Syntyvissä genotyypeissä on vaihtelua kelpoisuudessa, mikä on tärkeää esimerkiksi loispuolustuksen kehityksen kannalta (Stearns & Hoekstra 2000). Koska mäntypistiäiset ovat haplodiploideja eli naaraat kehittyvät hedelmöittyneistä munasoluista ja koiraat hedelmöittymättömistä munasoluista riippumatta onko naaras paritellut vai ei, voisi luulla, ettei seksuaalisesti ja aseksuaalisesti tuotettujen perheiden välillä siten olisi

eroa geneettisessä vaihtelussa tai muissakaan ominaisuuksissa. Kuitenkin näyttäisi, että ravinnon sijaan geneettisillä tekijöillä voi olla jossain määrin vaikutusta pilkkumäntypistiäistoukkien loispuolustustehokkuuteen, sillä seksuaalisesti tuotettujen perheiden väliltä löytyi vaihtelua enkapsulaatioreaktiossa. On kuitenkin huomioitava, että osa geneettisestä vaihtelusta eli perheiden välisistä eroista voi johtua myös yhteisestä ympäristöstä (oksa), jossa toukat kasvoivat. Tutkimuksen aikana pyrittiin huomioimaan, ettei perheiden välille syntyisi ravintokäsittelyn lisäksi muista tekijöistä, kuten ruuan määrästä tai oksan sijainnista kasvatuspöydällä, johtuvia eroja.

Aseksuaalisesti tuotettuihin toukkiin verrattuna seksuaalisesti tuotetut toukat myös kasvoivat nopeammin ja niillä oli korkeampi kotelopaino. Nämä tulokset viittaavat siihen, että seksuaalisesti tuotetut toukat olisivat yleiskunnoltaan parempia ja voisivat mahdollisesti kompensoida paremmin loispuolustuksesta aiheutuvia kustannuksia, vaikka enkapsulaatioreaktion voimakkuudessa ei lisääntymistapojen välillä ollutkaan eroa. Joillakin hyönteislajeilla koiraat voivat vaikuttaa positiivisesti jälkeläistensä menestykseen muodostamalla spermapaketin, jonka sisältämät proteiinit voivat esimerkiksi kasvattaa naaraan sukusolujen tai kehittyvien munien kokoa ja määrää (Chapman 1998). Saattaa olla, että myös mäntypistiäiskoiraat parittelun yhteydessä luovuttavat naaraalle sperman lisäksi proteiineja, jolloin tämä paternaaliefekti voisi osittain selittää seksuaalisesti tuotettujen toukkien parempaa kasvua.

4.2 Ravinnon laadun, loispuolustuksen ja lisääntymistavan vaikutus petopuolustustehokkuuteen

Tulosteni perusteella ravinnon pihka-ainepitoisuus vaikuttaa toukkien petopuolustukseen. Pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa ravintoa syöneet toukat tuottivat enemmän puolustusnestettä, mikä tukee aikaisempien rusko- sekä pilkkumäntypistiäisellä tehtyjen tutkimusten tuloksia (Björkman & Larsson 1991, Godella & Raffa 1995b). Puolustusnesteeseen tuottoon vaikutti ravinnon lisäksi myös se, oliko toukka loisittu vai ei. Toukat, joilta oli mitattu enkapsulaatioreaktio, tuottivat vähemmän puolustusnestettä kuin ne, joilta ei sitä mitattu. Ravinnolla ja loisinnalla oli lisäksi yhdysvaikutus, mikä tarkoittaa, että loisinta vaikuttaa erilailla puolustusnesteeseen tuottoon riippuen siitä, onko toukka syönyt pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa vai matalaa ravintoa. Pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa ravintoa syöneet loisitut toukat tuottivat puolustusnestettä selvästi vähemmän kuin samaa ravintoa syöneet loisimattomat toukat. Pihka-ainepitoisuudeltaan matalaa ravintoa syöneillä toukilla ero puolustusnesteeseen tuotossa loisittujen ja loisimattomien toukkien välillä oli huomattavasti pienempi.

Tuloksista voi päätellä, että loisinnasta aiheutuu kustannuksia erityisesti pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa ravintoa syöville toukille, koska ne tuottivat puolustusnestettä loisittuna huomattavasti loisimattomia vähemmän. Ravinto, jonka pihka-ainepitoisuus on korkea, tehostaa kemiallista puolustautumista petoja vastaan, mutta loisittuna puolustusnesteeseen tuotanto vähenee ja ravinnon tuoma hyöty petopuolustukseen laskee. Syytä puolustusnesteeseen määrän laskuun on vaikea arvioida. Voi olla, että panostus loispuolustukseen alentaa toukan syömistehokkuutta, jolloin se saa vähemmän puolustusnesteeseen tarvittavia yhdisteitä. Toukka myös saattaa loisittuna panostaa enemmän kasvuun kuin petopuolustukseen, mikä näkyy alentuneena puolustusnesteeseen tuottona. Loispuolustuksen ja petopuolustuksen välinen trade-off-tilanne on löydetty myös, kun on tutkittu isolimakotilon (*Lymnaea stagnalis*) puolustautumista (Rigby & Jokela 2000). Lisääntymistapa ei vaikuttanut merkittävästi pilkkumäntypistiäistoukkien puolustusnesteeseen määrään. Seksuaalisesti ja aseksuaalisesti tuotetut toukat pystyivät siten hyödyntämään yhtä tehokkaasti ravinnosta saamansa pihka-aineet.

4.3 Ravinnon laadun, puolustautumisen ja lisääntymistavan aiheuttama vaihtelu elinkierto-ominaisuuksissa

Aiemmissä tutkimuksissa ravinnon korkean pihka-ainepitoisuuden on todettu hidastavan mäntypistiäistoukkien kasvua tai pidentävän kehitysaikaa (Larsson ym. 1986, Björkman & Larsson 1991, Godella & Raffa 1995b). Näihin tutkimuksiin verrattuna saamani tulokset ovat päinvastaisia. Pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa ravintoa syöneet toukat eivät kärsineet pidentyneestä kehitysaikasta tai hidastuneesta kasvunopeudesta. Edelliset tutkimukset ravinnon pihka-ainepitoisuuden vaikutuksesta toukkien elinkierto-ominaisuuksiin on tehty ruskomäntypistiäisellä (Larsson ym. 1986, Björkman & Larsson 1991). Vaikka ruskomäntypistiäinen on biologialtaan samankaltainen kuin pilkkumäntypistiäinen (Prop 1960), voivat lajit silti sietää pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa ravintoa eri tavalla. Pilkkumäntypistiäisen kohdalta ei ole aikaisempia tutkimuksia ravinnon vaikutuksesta toukkien kasvuun, mutta vaikuttaisi siltä, ettei pihka-ainepitoisuudeltaan korkeasta ravinnosta ole kustannuksia. Tällöin toukat eivät luonnossakaan altistu pedoille ja loisille pihka-ainepitoisuudeltaan matalaa ravintoa syöneitä toukkia pidempää aikaa. Vaikka korkea pihka-ainepitoisuus ravinnossa kasvatti toukkien puolustusnesteen määrää, ei kasvu ja kehitys kuitenkaan hidastunut kuten aikaisemmissä tutkimuksissa ruskomäntypistiäisellä on havaittu tapahtuvan (Larsson ym. 1986, Björkman & Larsson 1991, Codella & Raffa 1995b).

Jostain syystä korkea pihka-ainepitoisuus ravinnossa kasvatti pilkkumäntypistiäistoukkien kotelopainoa, mitä ei ole havaittu ruskomäntypistiäisellä tehdyissä ravintokäsittelytutkimuksissa (Larsson ym. 1986, Björkman & Gref 1993). Tosin eräässä tutkimuksessa ravintokäsittelystä johtuva ero kotelopainossa löytyi vain naarailta. Painavimmat kotelot olivat pihka-ainepitoisuudeltaan matalaa mäntylajia syöneillä toukilla ja kevyimmät pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa mäntylajia syöneillä (Codella & Raffa 1995b). Tämän tuloksen mukaan korkealla pihka-ainepitoisuudella saattaisi olla negatiivinen vaikutus toukan kotelopainoon mikä on siis päinvastainen omiin tuloksiini verrattuna. Pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa ravintoa syöneet toukat eivät olleet isompia, joten se ei selitä painavampia koteloita. Myöskään kotelon kuoren painoon ei toukan syömän ravinnon pihka-ainepitoisuus vaikuta, sillä kuori ei sisällä jäänteitä pihka-aineista (Björkman & Gref 1993). Isäntäkasvin puolustusyhdistepitoisuuden vaikutus sitä syövien toukkien kasvuun ja kehitykseen ei aina ole negatiivinen (Saastamoinen ym. 2007). Täpläverkkoperhosilla toukkien on ensimmäisen toukkavaiheen jälkeen havaittu kasvavan nopeammin ravinnolla, jonka iridoidiglykosidipitoisuus on korkea (Saastamoinen ym. 2007). Tutkimuksen mukaan toukan kasvuun ja menestykseen vaikuttaa kuitenkin myös muut isäntäkasvin ominaisuudet, ei pelkästään korkea iridoidiglykosidipitoisuus (Saastamoinen ym. 2007).

On myös mahdollista, että pihka-ainepitoisuuden vaihtelu puiden sisällä vaikutti tulokseen siten, ettei ravintokäsittelyiden väliltä löytynyt eroa toukkien kasvussa. Useimmissa tutkimuksissa neulasten pihka-ainepitoisuus on mitattu kaasukromatografi -menetelmällä, joka mittaa pitoisuuden tarkasti (Gref & Ericsson 1985, Larsson ym. 1986, Björkman ym. 1997, Codella & Raffa 1995b, Björkman ym. 1991). Myös neulasten pihkatiehyiden määrää voidaan pitää epäsuorana mittarina koko puun neulasten pihka-ainepitoisuuksien määrästä (Björkman ym. 1991). Vaikka pihkatiehyiden laskeminen neulasista on käyttökelpoinen menetelmä puun pihka-ainepitoisuuden määrittämisessä, laskin pihkatiehyiden keskiarvon kolmen neulasen perusteella, mikä ei välttämättä ole riittävä määrä antamaan luotettavaa kokonaiskuvaa koko puun pihka-ainepitoisuudesta. Neulaset olivat eripuolilta puuta otetusta neulasnäytteestä ja pihkatiehyiden lukumäärä on selvästi korkeampi puiden välillä kuin sisällä (Lindstedt ym. 2006). Pihkatiehyiden määrä voi kuitenkin vaihdella eri puolella puuta riippuen valon ja varjon määrästä (Gref & Tenow

1986). Toisaalta toukkien puolustusnesteen tuotannossa löytyi merkittävä ero pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa ja matalaa ravintoa syöneiden toukkien välillä, mikä tukee aiempia tuloksia (Björkman & Larsson 1991, Godella & Raffa 1995b) ja toisaalta todistaa, että käsittelyt erosivat toisistaan. Myös sukupuoli voi mahdollisesti vaikuttaa siihen, ettei pihka-ainepitoisuudeltaan korkealla ravinnolla ollut vaikutusta toukkien kasvuun. Tutkimukseni tuloksissa huomioitiin vain koiraat, ja Godellan & Raffan (1995b) tutkimustuloksien mukaan ruskomäntypistiäiskoiraisten kehitysaikaan ravinnolla ei ollut vaikutusta. Lisäksi on muistettava lajien väliset mahdolliset eroavaisuudet.

Tulosten mukaan enkapsulaatioreaktion mittaaminen toukista ei hidastanut niiden kasvunopeutta tai kehitysaikaa. Näyttäisi, että toukka pystyy panostamaan loispuolustuksen lisäksi myös kasvuun. Loisuilla toukilla oli kuitenkin matalampi kotelopaino verrattuna loisimattomiin toukkiin. Toukat punnittiin enkapsulaatiokokeen jälkeen seuraavan kerran kotelona. On mahdollista, että toukkien paino on laskenut hieman, mikä johtuu enkapsulaatioreaktion muodostamisesta ja tämä näkyy alentuneena kotelopainona. Loisuolustukseen panostamisen negatiivisia vaikutuksia kasvuun ei voi siten sulkea pois. Loisinin lisäksi kotelopainoon vaikutti lisääntymistapa, joka ainoana tekijänä vaikutti myös toukkien kasvunopeuteen ja kehitysaikaan. Aseksuaalisesti tuotetut toukat kasvoivat ja kehittyivät seksuaalisesti tuotettuja hitaammin ja niiden kotelot olivat kevyempiä. Yhteistä seksuaalisesti ja aseksuaalisesti lisääntyneiden toukkien kasvussa oli, että molemmilla lisääntymistavoilla nopeasti kehittyneistä toukista tuli painavampia ja hitaasti kehittyneet jäivät pienemmiksi.

5. JOHTOPÄÄTÖKSIÄ

Kolme trofiatasoa käsittelevän tutkimukseni mukaan männyn neulasten pihka-ainepitoisuus ei vaikuta merkitsevästi pilkkumäntypistiäistoukan loispuolustukseen. Pihka-ainepitoisuudeltaan korkea ravinto sen sijaan tehostaa toukkien petopuolustusta lisäämällä puolustusnesteen tuotantoa. Loisuilla puolustusnesteen tuotanto kuitenkin laskee erityisesti pihka-ainepitoisuudeltaan korkeaa ravintoa syöneillä toukilla, jolloin toukka on myös helpompi saalis pedoille. Yleisesti ottaen pilkkumäntypistiäistoukan sisäinen puolustuskyky loisia vastaan on varsin heikko. Havaittava enkapsulaatioreaktion muodostaminen kesti kaksi vuorokautta, kun joillakin lajeilla reaktio tapahtuu muutamissa tunneissa. Heikon loispuolustuskykynsä takia mäntypistiäistoukan ulkonäkö ei välttämättä ole kovin huomiota herättävä. Ympäristöön sulautuva väritys voi vähentää sen näkyvyyttä joillekin parasitoideille, mutta ei luultavastikaan suojele hyvän isännän löytämiskyvyn omaavilta spesialisti parasitoideilta. Mäntypistiäisiä loisivien parasitoidien tiedetään aiheuttavan suurta kuolleisuutta useimmiten massaesiintymän loppuvaiheissa. Korkea loisinta-aste olikin havaittavissa kokeen alkuvaiheessa, kun vanhalta tuhoalueelta kerätyistä koteloista kuoriutui 44 prosenttia erilaisia parasitoideja verrattuna aikuisiin pilkkumäntypistiäisiin, joita kuoriutui neljä prosenttia. Pilkkumäntypistiäisen heikko loispuolustuskyky voisi mahdollistaa sen biologisen torjunnan parasitoidien avulla, vaikka toukkien loisinta-alttiuteen ei voida vaikuttaa männyn pihka-ainepitoisuuden kautta. Ilmastomuutoksen myötä tuholaislajien, kuten juuri pilkkumäntypistiäisen, kannat saattavat kasvaa huomattavasti. On tärkeää, että tälle yhdelle metsätalouden pahimmista männyn tuholaisista löydettäisiin tehokas torjuntamenetelmä.

KIITOKSET

Valtaiset kiitokset ohjaajilleni Johanna Mappesille ja Carita Lindstedtille, jotka kärsivällisesti jaksoivat auttaa, neuvoa ja kannustaa koko projektin ajan. UPM:ää kiitän luvasta käyttää heidän omistuksessaan olevan metsän mäntyjä tutkimukseni tarpeisiin. Kiitoksen ansaitsevat myös kasvihuoneen kesätyöläiset, jotka tunnollisesti hoitivat toukkiani sekä muita kokeeseen liittyviä tehtäviä poissa ollessani. Jouni Laaksolle erityiskiitos opastuksesta Image Pro -ohjelman käytössä datan käsittelyssä. Suuret kiitokset myös Anna-Kaisalle, joka auttoi pilkkujen viilaamisessa. Vanhempiani sekä muita läheisiäni kiitän lämpimästi saamastani henkisestä tuesta. Erityisesti haluan kuitenkin kiittää Lauria korvaamattomasta jokapäiväisestä tuesta ja kannustuksesta sekä kärsivällisyydestä tämän pitkäkestoisen aherruksen aikana. Tutkimuksen rahoittivat Suomen Biologian Seura Vanamo ry sekä Kuopion Luonnon Ystävien Yhdistys ry.

KIRJALLISUUS

- Barbosa, P., Saunders, J. A., Kemper, J., Trumble, R., Olechno, J. & Martinat, P. 1986: Plant allelochemicals and insect parasitoid: effects of nicotine on *Cotesia congregata* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) and *Hyposoter annulipes* (Cressen) (Hymenoptera: Ichneumonidae). – *J. Chem. Ecol.* 12: 1319–1328.
- Barbosa, P. & Krischik, V. A. 1987: Influence of alkaloids on feeding preference of eastern deciduous forest trees by the gypsy moth *Lymantria dispar*. – *Amer. Natur.* 130: 53–69.
- Björkman, C. & Larsson, S. 1991: Pine sawfly defence and variation in host plant resin acids: a trade-off with growth. – *Ecological entomology* 16: 283–289.
- Björkman, C., Larsson, S. & Gref, R. 1991: Effects of nitrogen fertilization on pine needle chemistry and sawfly performance. – *Oecologia*. 86: 202–209.
- Björkman, C. & Gref, R. 1993: Survival of pine sawflies in cocoon stage in relation to resin acid content of larval food. – *J. Chem. Ecol.* 19 (12): 2881–2890.
- Björkman, C., Larsson, S. & Bommarco, R. 1997: Oviposition preferences in pine sawflies: a trade-off between larval growth and defence against natural enemies. – *Oikos*. 79: 45–52.
- Björkman, C., Kytö, M., Larsson, S. & Niemelä P. 1998: Different responses of two carbon-based defences in Scots pine needles to nitrogen fertilization. – *Ecoscience*. 5(4): 502–507.
- Bowers, M. D. 1980: Unpalatability of as a defense strategy of *Euphydryas phaenton* (Lepidoptera: Nymphalidae). – *Evolution*. 34: 586–600.
- Calvert, W. H., Hedrik, L. E. & Brower, L. P. 1979: Mortality of monarch butterfly (*Danaus plexippus* L.): avian predation experiments at five overwintering sites in Mexico. – *Science*. 204: 847–851.
- Cates, R.G., Redak, R. A. & Henderson, C. B. 1983: Patterns in defensive natural product chemistry: Douglas fir and western spruce budworm interactions. (ed. by P. A. Hedin), pp. 3–19. ACS Symposium Series No. 208, American Chemical Society, Washington.
- Carton, Y. & Nappi, A. J. 1997: Drosophila cellular immunity against parasitoids. – *Parasitology Today*. (Rev.) 13(6): 218–227.
- Chapman, R. F. 1998: *The Insects: Structure and function*. – Cambridge university press, United Kindom, 268–290 s.
- Codella, S. G. & Raffa, K. F. 1995a: Contributions of female oviposition patterns and larval behaviour to group defence in conifer sawflies (hymenptera: diprionidae). – *Oecologia*. 103: 24–33.
- Codella S. G. & Raffa, K. F. 1995b: Host plant influence on chemical defence in conifer sawflies (Hymenoptera: Diprionidae). – *Oecologia*. 104: 1–11.
- Codella, S. G. & Raffa, K. F. 1996: Individual and social components of wood ant response to conifer sawfly defence (Hymenoptera: Formicidae, Diprionidae). – *Anim. Behav.* 52: 801–811.
- Cott, H. B. 1940: *Adaptive coloration in animals*. London: Methuen & Co. Ltd.
- Denno, R. F., Larsson, S. & Olmstead, K. L. 1990: Role of enemy-free space and plant quality in hostplant selection by willow beetles. – *Ecology*. 71: 124–137.
- Dyer, L. A. 1995: Tasty generalists and nasty specialists? Antipredator mechanisms in tropical lepidopteran larvae. – *Ecology*. 76: 1483–1496.
- Eisner, T., Johnessee, J. S. & Carrel, J. 1974: Defensive use by insect of a plant resin. – *Science*. 184: 996–999.
- Eisner, T., Goetz, M. A., Hill, D. E., Smedley, S. R. & Meinwald, J. 1997a: Firefly “femmes fatales” acquire defensive steroids (lucibufagins) from their firefly pray. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 94(18): 9723–9728.
- Eisner, T., Morgan, R. C., Attygalle, A. B., Smedley, R. S., Herath, K. B. & Meinwald, J. 1997b: Defensive production of quinoline by a phasmid insect (*Oreophoetes peruana*). – *J. Exp. Biol.* 200: 2493–2500.
- Endler, J. A. 1988: Frequency-dependent predation, crypsis and aposematic coloration. – *Phil. Trans. Roy. Soc. B* 319: 505–523.
- Endler, J.A. 1991: Interactions between predators and pray. In J. R. Krebs & Davies, N. B. eds. *Behavioral Ecology*, 3 rd Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford. s. 169–196.

- Endler, J. A. & Mappes, J. 2004: Predator mixes and the conspicuousness of aposematic signals. – *Am. Nat.* 163 (4): 532–547.
- Franzl, S. & Naumann, C. M. 1985: Cuticular cavities: storage chambers for cyanoglucoside-containing defensive secretions in larvae of a zygaenid moth. – *Tissue & Cell.* 17: 267–278.
- Frick, C. & Wink, M. 1995: Uptake and sequestration of ouabain and other cardiac glycosides in *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Danaidae): evidence for a carrier-mediated process. – *J. Chem. Ecol.* 21: 557–575.
- Gentry, G. L. & Dyer, L. A. 2002: On the conditional nature of Neotropical caterpillar defences against their natural enemies. – *Ecology.* 83: 3180–3119.
- Godfray, H. C. J. 1994: *Parasitoids: Behavioural and Evolutionary Ecology.* Princeton, NJ: Princeton University Press. 1–364 s.
- Gref, R. & Ericsson, A. 1985: Wound-induced changes of resin acid concentrations in living bark of Scots pine seedlings. – *Can. J. For. Res.* 15: 92–96.
- Gref, R. & Tenow, O. 1986: Resin acid variation in sun and shade needles of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) – *Can. J. For. Res.* 17: 346–249.
- Gros, P. 1993: Insect behavioural and morphological defences against parasitoids. – *Annu. Rev. Entomol.* 38: 251–273.
- Havill, N. P. & Raffa, K. F. 2000: Compound effects of induced plant responses on insect herbivores and parasitoids: implications for tritrophic interactions. – *Ecol. Entomol.* 25: 171–179.
- Herz, A. & Heitland, W. 1999: Larval parasitism of a forest pest, the common pine sawfly *Diprion pini* (L.) (HYM., Diprionidae), during an endemic density phase. – *J. Appl. Ent.* 123: 129–137.
- Hunter, A. F. 2000: Gregariousness and repellent defences in the survival of phytophagous insects. – *Oikos.* 91: 213–224.
- Ikeda, T., Matsumura, F. & Benjamin, D. M. 1977: Chemical basis for feeding adaptations of pine sawflies *Neodiprion rugifrons* and *Neodiprion swanei*. – *Science.* 197: 497–499.
- Kalin, M. & Knerer, G. 1977: Group of mass effects in diprionid sawflies. – *Nature.* 276: 427–429.
- Kapari, L., Haukioja, E., Rantala, M. J. & Ruuhola, T. 2006: Defoliating insect immune defense interacts with induced plant defence during a population outbreak. – *Ecology.* 87: 291–296.
- Karban, L. & English-Loeb G. 1997: Tachinid parasitoids affect host plant choice by caterpillars to increase caterpillar survival. – *Ecology.* 78(2): 603–611.
- Kellner, R. L. L. & Dettner, K. 1995: Allocation of pederin during lifetime of *Paederus* rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae): evidence for polymorphism of hemolymph toxin. – *J. Chem. Ecol.* 21: 1791–1833.
- Klemola, N., Kapari, L. & Klemola, T. 2008: Host plant quality and defence against parasitoids: no relationship between levels of parasitism and a geometrid defoliator immunoassay. – *Oikos.* (Painossa.)
- Koskimäki, J., Rantala, M. J., Taskinen, J., Tynkkynen, K. & Suhonen J. 2004: Immunocompetence and resource holding potential in the damselfly, *Calopteryx virgo* L. – *Behav. Ecol.* 15: 169–173.
- König, C. & Schmid-Hempel, P. 1995: Foraging activity and immunocompetence in workers of the bumble bee, *Bombus terrestris*. *L. Proc. R. Soc. Lond. B.* 260: 225–227.
- Lackie, A. M. 1988: Haemocyte behaviour. – *Adv. Insect Physiol.* 21: 85–178.
- Larsson, S. & Tenow, O. 1984: Areal distribution of *Neodiprion sertifer* (Hym., Diprionidae) outbreak on Scots pine as related to stand condition. – *Holarct. Ecol.* 7: 81–90.
- Larsson, S., Björkman, C. & Gref, R. 1986: Responses of *Neodiprion sertifer* (Hym., Diprionidae) larvae to variation in needle resin acid concentration in Scots pine. – *Oecologia.* 70: 77–84.
- Larsson, S., Ekbom, B. & Björkman, C. 2000: Influence of plant quality on pine sawfly population dynamics. – *Oikos.* 89: 440–450.
- Lill, J. T., Marquis, R. J. & Ricklefs, R. E. 2002: Host plant influence parasitism of forest caterpillars. – *Nature.* 417: 170–173.
- Lindstedt, C., Mappes, J., Päivinen J. & Varama, M. 2006: Effects of group size and pine defence chemicals on Diprionid sawfly survival against ant predator. – *Oecologia.* 150(3): 519–526.
- Mappes, J., Marples, N. & Endler, J. A. 2005: The complex business of survival by aposematism. *Trends. Ecol. Evol.* 20: 598–630.

- Marples, N., Kelly, J. & Thomas R. J. 2005: Perspective: The evolution of warning coloration is not paradoxical. – *Evolution*. 59(5): 933–940.
- Marples, N. M., Brakefield, P. M. & Cowie, R. J. 1989: Differences between the 7-spot and 2-spot ladybird beetles (Coccinellidae) in their toxic effects on a bird predator. – *Ecol. Entomol.* 14: 79–84.
- Merilaita, S., Lyytinen A. & Mappes J. 2001: Selection for cryptic coloration in a visually heterogenous habitat. – *Proc. R. Soc. Lond. Ser. (B)* 268: 1925–1929.
- Mopper, S., Whitham, T. G. & Price, P. W. 1990: Plant phenotype and interspecific competition between insects determine sawfly performance and density. – *Ecology*. 71(6): 2135–2144.
- Nieminen, M., Suomi, J., van Nouhuys, S., Sauri, P. & Riekkola, M.-L. 2003: Effect of iridoid glycoside content on oviposition host plant choice and parasitism in a specialist herbivore. – *J. Chem. Ecol.* 29: 823–844.
- Ojala, K., Julkunen-Tiitto, R., Lindström, L. & Mappes, J. 2005: Diet affects the immune defence and life-history traits of an Arctiid moth *Parasemia plantaginis*. *Evol. Ecol. Res.* 7: 1153–1170.
- Ouchane, S., Picaud, M., Vernotte, C. & Astier, C. 1997: Photooxidative stress stimulates illegitimate recombination and mutability in carotenoid-less mutants of *Rubrivivax gelatinosus*. *EMBO J.* 16: 4777–4787.
- Pasquier-Barre, F., Palasse, C., Goussard, F., Auger-Rozenberg, M-A. & Géri, C. 2001: Relationship of scots pine clone characteristics and water stress to hatching and larval performance of the sawfly *Diprion pini* (Hymenoptera: Diprionidae). – *Environ. Entomol.* 30 (1): 1–6.
- Pasteels, J. M., Gregoire, J. C. & Rowell-Rahier, M. 1983: The chemical ecology of defense in arthropods. – *Annu Rev. Entomol.* 28: 263–289.
- Pearson, D. L. 1985: The function of multiple anti-predator mechanisms in adult tiger beetles. (Coleoptera: Cicindelidae). *Ecol. Ent.* 10: 65–72.
- 1988: Biology of tiger beetles. – *Ann. Rev. Ent.* 33: 123–147.
- 1989: What is the adaptive significance of multicomponent defensive repertoires? – *Oikos*. 54(2): 251–253.
- Prestwich, G. D. 1978: Chemical defence by termite soldiers. – *J. Chem. Ecol.* 5: 459–480.
- Prop, N. 1960: Protection against birds and parasites in some species of tenthredinid larvae. – *Arch. Neerl. Zool.* 13: 380–447.
- Pschorn-Walcher, H. & Eichhorn, O. 1973: Studies on the biology and ecology of the egg parasites (Hym.: Chalcidoidea) of the pine sawfly *Neodiprion sertifer* (Geoff.) (Hym.: Diprionidae) in central Europe. – *Z. ang. Ent.* 74: 286–318.
- Pschorn-Walcher, H. 1987: Interspecific competition between the principal larval parasitoids of the pine sawfly, *Neodiprion sertifer* (Geoff.) (Hym.: Diprionidae). – *Oecologia*. 73: 621–625.
- Rantala, M. J., Koskimäki, J., Taskinen, J., Tynkkynen, K. 2000: Immunocompetence developmental stability and wing spot size in *Calopteryx splendens* L. – *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267: 2453–2457.
- Rigby, M. C. & Jokela, J. 2000: Predator avoidance and immune defence: costs and trade-offs in snails. – *Proc. Soc. Lond. B.* 279: 171–176.
- Riipi, M., Alatalo, R. V., Lindström, L. & Mappes, J. 2001: Multiple benefits of gregariousness cover detectability costs in aposematic aggregations. – *Nature*. 413: 512–514.
- Rosenthal, G. A. & Janzen, D. H. 1979: *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites*. – Academic Press, New York.
- Ruxton, G. D., Sherratt, T. N. & Speed, M. P. 2004: *Avoiding attack: the evolutionary ecology of crypsis, warning signals and mimicry*. Oxford University Press, Oxford. s. 1–249.
- Ryder, J. J. & Siva-Jothy, M. T. 2000: Male calling song provides a reliable signal of immune function in a cricket. – *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267: 1171–1175.
- Saastamoinen, M., van Nouhuys, S., Nieminen, M., O'Hara, B. & Suomi, J. 2007: Development and survival of a specialist herbivore, *Melitaea cinxia*, on host plants producing high and low concentrations of iridoid glycosides. – *Ann. Zool. Fennici.* 44: 70–80.
- Schmid-Hempel, R. & Schmid-Hempel, P. 1998: Colony performance and immunocompetence of a social insect, *Bombus terrestris*, in poor and variable environments. – *Funct. Ecol.* 12: 22–30.

- Scudder, G. G. E., Moore, L. V. & Isman, M. B. 1986: Sequestration of cardenolides in *Oncopeltus fasciatus* : morphological and physiological adaptations . – J. Chem. Ecol. 12: 1171–1187.
- Singer, M. S. & Stireman, J. O. 2003: Does anti-parasitoid defense explain hostplant selection by polyphagous caterpillars? – Oikos. 100: 554–562.
- Smiley, J. T., Horn, J. M. & Rank, N. E. 1985: Ecological effects of salicin at three trophic levels: new problems from old adaptations. – Science. 299: 649–651.
- Soetens, P., Pasteels, J. M., Daloze, D. & Kaisin, M. 1998: Host plant influence on the composition of the defensive secretion of *Chrysomela vigintipunctata* larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). – Biochemical Systematics and Ecology 26: 703–712.
- Stearns, S. C. & Hoekstra, R. F. 2000: Evolution: an introduction. Oxford University Press, Oxford. 135–147 s.
- Suomi, J., Sirén, H., Wiedmer, S. K. & Riekkola, M-L. 2001: Isolation of aucubin and catapol from *Melitaea cinxia* larvae and quantification by micellar electrokinetic capillary chromatography. – Anal. Chim. Acta. 429: 91–99.
- Thorpe, K. W. & Barbosa, P. 1986: Effects of consumption of high and low nicotine tobacco by *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) on survival of gregarious endoparasitoid *Cotesia congregata* (Hymenoptera: Braconidae). – J. Chem. Ecol. 12: 1329–1337.
- Tostowaryk, W. 1971: Relationship between parasitism and predation on Diprionid sawflies. – Ann. Entomol. Soc. Am. 64: 1424–1427.
- van Nouhyus, S. & Hanski, I. 1999: Host diet affects extinctions and colonizations in parasitoid metapopulation. – J. Anim. Ecol. 12: 1329–1337.
- 2004: Natural enemies of checkerspot butterflies, in P. R. Ehrlich and I. Hanski (eds.). On the wings of checkerspot. Oxford University press, New York, in press.
- Viitasaari, M. & Varama, M. 1987: Sahapistiäiset 4. Havupistiäiset (Diprionidae). – University of Helsinki. Department of Agricultural and Forest Zoology. Reports 10: 1–79.
- Zalucki, M. P., Brower, L. P. & Malcolm, S. B. 1990: Oviposition by *Danaus plexippus* in relation to cardenolide content of three *Asclepias* species in southeastern U.S.A. – Ecol. Ent. 15: 231–240.