

LuK-tutkielma

**Juveniilihormonin vaikutus munantuotantoon ja
seksuaaliseen antagonismiin koloradonkuoriaisilla**

Valtteri Jokinen



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ekologia ja evoluutiobiologia

30.11.2012

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Ekologia ja evoluutiobiologia

Jokinen, V.: Juveniilihormonin vaikutus munantuotantoon ja seksuaaliseen antagonismiin koloradonkuoriaisilla

LuK-tutkielma: 14 s.
Työn ohjaajat: FT Saija Piironen, FM Philipp Lehmann
Tarkastajat:
Joulukuu 2012

Hakusanat: hyönteiset, Insecta, *Leptinotarsa decemlineata*, lisääntyminen, manipulointi, munantuotanto

TIIVISTELMÄ

Hormonitoiminta on yksi eliöiden säätelyjärjestelmistä. Hyönteisillä keskeisessä osassa hormonisäätelyä ovat juveniilihormonit (JH). Niiden määrä yksilöiden elimistössä säätelee monia asioita yksilöiden kehityksestä lisääntymistoimintoihin. Juuri tehokas lisääntyminen onkin eliöiden tärkeimpiä tehtäviä. Hormonitoiminta pitää yllä evoluution myötä eri lajeille ja lajiryhmille kehittyneitä erilaisia lisääntymisstrategioita: jotkin lisääntyvät harvakseltaan mutta huolehtivat poikasistaan, toiset tuottavat paljon jälkeläisiä, jotka ne jättävät selviämään yksin. Sukupuolten välillä on kuitenkin eroja optimaalisessa lisääntymisstrategiassa. Naaraat joutuvat kuluttamaan jälkeläisten tuottamiseen koiraita enemmän energiaa, minkä vuoksi koiraat voivat tuottaa hyvinkin paljon jälkeläisiä, kun taas naarailta tulee resurssiraja vastaan. Strategiaero aiheuttaa konfliktin sukupuolten välillä, mikä voi johtaa seksuaaliseen antagonismiin: tyypillisesti koiraat aiheuttavat parittelun yhteydessä haittaa naaraille oman edun tavoittelun vuoksi. JH on yksi aineista, joilla koiraat voivat säädellä naaraiden munintaa siirtämällä sitä parittelun yhteydessä naaraaseen. Selvitin tutkimuksessani JH:n roolia kovakuoriaisnaaraiden munantuotantoon: kuinka koiraiden ja naaraiden sama ylimääräinen JH-annos vaikuttaa yhtäältä naaraiden tuottamien munien määrään ja toisaalta niiden laatuun, ja pystyvätkö koiraat manipuloimaan naaraita tuottamaan enemmän munia. Käytin tutkimuslajina koloradonkuoriaisia (*Leptinotarsa decemlineata*), jotka ovat Suomessakin jo hieman jalansijaa saaneita tuhohyönteisiä. Aktiivinen tutkimus voi auttaa kehittämään keinoja lajin leviämisen estämiseksi. Kokeessa paritin JH- ja kontrollikäsiteltyjä koiraita ja naaraita laboratoriossa keskenään niin, että sain neljä ryhmää eri käsittely-yhdistelmin. Hypotetisoin, että ylimääräinen JH yhtäältä nostaisi naaraiden tuottamien munien määrää ja toisaalta laskisi niiden laatua. Seurasin sekä naaraiden tuottamien munien että niistä kuoriutuneiden toukkien määriä päivittäin. Tuloksista kävi ilmi, että hormonikäsitteily ei vaikuta naaraiden munimien määrään. Naaraiden sama ylimääräinen JH laski kuitenkin munien laatua selvästi kontrolliryhmään verrattuna. Sen sijaan hypoteesille koloradonkuoriaiskoiraiden seksuaalisesta antagonismista tutkimus ei antanut tukea. Koska tutkimuksen otoskoko oli suhteellisen pieni (N = 12), ilmiötä kannattaa tutkia vielä tarkemmin.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science

Department of Biological and Environmental Science

Ecology and Evolutionary Biology

Jokinen, V.: Effects of juvenile hormone on egg production and sexual antagonism in Colorado potato beetle

BSc thesis: 14 p.

Supervisors: PhD Saija Piironen, MSc Philipp Lehmann

Inspectors:

December 2012

Keywords: egg production, insect, *Leptinotarsa decemlineata*, manipulation, reproduction

ABSTRACT

Hormonal activity is one of the control mechanisms of organisms. Juvenile hormones (JH) have a central role in the hormonal regulation of insects. Their amount in insects controls many things, ranging from development to reproduction activities. It is the efficient reproduction that is one of the most important objectives of any living organism. Hormonal activity maintains reproduction strategies that different taxa have developed over the course of evolution: some give birth to few descendants yet take care of them, others produce a large number of offspring and leave them to survive on their own. However, sexes have differences in their optimal reproduction strategies. In producing offspring, females must spend more energy than males, which is why males can produce a very large number of offspring but females are bounded by resources. This difference in strategies causes a conflict between sexes and may lead to sexual antagonism: typically, males harm their partner during copulation in order to get some benefit. JH is also one of the substances, with which males can control females' oviposition by transferring it into females during copulation. In my research, I studied the role of JH on egg production of beetles: how an extra dose of JH affects, on one hand, the number of eggs females produce and, on the other hand, the quality of eggs, and if males are able to manipulate females to exceed their optimal egg-producing capacity. As a study species, I used Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*), an invasive species that is slowly expanding its range to Finland. Active research may help to find means to restrict the species' expansion. In my study, I mated JH- and control-treated males and females with each other under laboratory conditions so that I had four groups with different treatment combinations. I hypothesized that the extra JH would, on one hand, raise the number of eggs females produced and, on the other hand, lower their quality. I recorded on a daily basis the number of the eggs the females produced and the number of the larvae that hatched from the eggs. The results showed that the JH treatment had no effect on the number of eggs the females laid. However, the extra JH the females received, significantly decreased the quality of eggs compared with the control group. The hypothesis about sexual antagonism was, however, not supported. Due to the rather small sample size ($N = 12$), the phenomenon warrants further studies.

Sisältö

1. JOHDANTO	5
2. AINEISTO JA MENETELMÄT	6
2.1. Kuoriaisten valmistelu	6
2.2. Hormonikäsittely	7
2.3. Munien ja toukkien laskeminen	8
2.4. Aineiston tilastollinen tarkastelu	9
3. TULOKSET	9
4. TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINNAT	11
KIITOKSET	13
KIRJALLISUUS	13

1. JOHDANTO

Hormonitoiminta on kaikkien monisoluisien eliöiden tärkeimpiä biologisten toimintojen säätelyjärjestelmiä. Imunesteessä, veressä tai muussa ruumiinnesteessä kulkevat hormonit ohjaavat lähes kaikkea kasvamisesta ja kehityksestä aineenvaihduntaan ja lisääntymiseen toimimalla solujen välisten viestien välittäjinä (Nijhout 1994). Eri eliöryhmillä tavataan hormoneja, joita muilla ei ole. Hyönteisillä on myös omat erityiset hyönteishormoninsa.

Eräitä tärkeimmistä hyönteishormoneista ovat juveniilihormonit (JH). Näitä corpora allata -elimen tuottamia hormoneja on useampia erilaisia, joista kullakin hyönteislahkolla tavataan vain yhtä, poikkeuksena perhoset (Gäde ym. 1997). Seitsemästä tunnetusta JH:n muodosta kovakuoriaisilla tavataan JH III:a, joka on eläinkunnassa yleisimmin tavattu JH. Sen keskeisimpiä tehtäviä ovat kasvun ja kehityksen ohjaaminen toukkavaiheessa sekä lisääntymistoimintojen säätely aikuisvaiheessa (Riddiford 2007). Se vaikuttaa vahvasti myös talvehtimisdiapaussiin.

JH:ta muodostuu hyönteisissä läpi niiden elämän, mutta sen määrä vaihtelee paitsi kehitysvaiheen myös ympäristön mukaan (Gilbert ym. 2000). JH osallistuu monenlaisiin toimintoihin hyönteisten elämän eri vaiheissa – JH:lla onkin kaikista tunnetuista hormoneista kaikkein vaihtelevimmat tehtävät, jotka käsittävät monia prosesseja toukkien nahanluonnista aikuisten hyönteisten pariutumiskäyttäytymiseen (Gäde ym. 1997).

Monilla hyönteislahkoilla ja -heimoilla on lisäksi omat erityiset fysikaaliset tai sosiaaliset mekanisminsa, joissa JH on merkittävässä osassa. Sosiaalisilla hyönteisillä JH-taso on sidoksissa yksilöiden kastiin: kontukimalaisilla JH:n tuotanto ja pitoisuus on korkeampi yhteisöissä, joissa ei ole kuningatar (Bloch ym. 1999). Samoin naaraiden munasarjat kehittyvät nopeammin. Tarhamehiläisyhteisöissä puolestaan JH-pitoisuutta kasvattamalla voi nopeuttaa yksilöiden siirtymistä ylemmän kastin töihin (Jassim ym. 1999). JH voi liittyä myös jälkikasvusta huolehtimiseen. Esimerkiksi *Nicrophorus orbicollis* -turkkilolla naaraiden JH-pitoisuudet ovat vahvasti koholla jälkeläisten ollessa pesässä mutta laskevat nopeasti naaraan jätettyä pesän (Trumbo 1997).

Vaikka JH:n säätelymekanismeja ja vaikutuksia on tutkittu paljon, moni asia on silti vielä enemmän tai vähemmän tutkimatta. Tiedetään, että päivän pituus vaikuttaa JH:n määrään koloradonkuoriaisilla (*Leptinotarsa decemlineata*): erot talvehtimaan ja lisääntymään valmistautuvien naaraiden JH-pitoisuuksissa ovat huomattavia (de Kort & Granger 1990). Naarailta JH myös käynnistää munasarjojen kypsymisen, koordinoi kudoksia niin, että sukusoluja syntyy, ja huolehtii, että pariutuminen ja muninta tapahtuvat oikeaan aikaan (Wyatt & Davey 1996). Tutkimustietoa JH:n suorista vaikutuksista munantuotantoon koloradonkuoriaisilla ei kuitenkaan ole. Tämä johtuu hyvin pitkälti siitä, että JH-reseptoria ei kunnolla tunneta (Klowden 2007).

Munien tuottaminen nostaa naaraiden lisääntymiskuluja koiraisiin verrattuna. Tämän seurauksena sukupuolilla on erilaiset lisääntymisstrategiset pyrkimykset, mikä johtaa sukupuolten väliseen konfliktiin (Arnqvist & Nilsson 2000). Monien lajien naarat pariutuvat useiden koiraiden kanssa. Koiraille on liki poikkeuksetta epäedullista, jos naaras pariutuu jälkeensä toisen koiraan kanssa (Johnstone & Keller 2000). Tämän estämiseksi koiraille on kehittynyt erilaisia keinoja estää muita koiraita hedelmöittämästä naarasta, jonka kanssa on juuri paritellut. Hyönteiskoirat saattavat muun muassa siirtää siemennesteen mukana naaraisiin aineita, jotka tekevät naaraista haluttomia tai kyvyttömiä uuteen paritteluun tai edesauttavat munimisen alkamista ja näin nostavat todennäköisyyttä, että munasolut hedelmöittyvät kyseisen koiraan siittiöillä (Cordero 1995, Gillot 2003). Yksi tällaisista aineista on JH, jonka rooli munien kypsymisessä on havaittu aiemmissa perhosilla tehdyissä tutkimuksissa (Bali ym. 1996, Gillot 2003, Pszczolkowski ym. 2006). Kovakuoriaisilla vastaavaa tutkimusta on tehty vähemmän, mutta muun muassa

sarvijäärillä koiraiden on osoitettu siirtävän naaraisiin parittelun yhteydessä JH:ta (Tian ym. 2010).

Kovakuoriaisista koloradonkuoriainen soveltuu erinomaisesti hormonisäätelyn tutkimuskohteeksi, sillä tuholaishyönteisenä siitä tarvitaan runsaasti lisää tietoa. Tämä tulokaslaji on kasvattanut esiintymisaluettaan jatkuvasti pohjoisemmaksi (EPPO 2006 sit. Piironen ym. 2011). Suomessa lajia tavataan nykyään useampana kesänä vuosikymmenessä, ja yksilöitä havaitaan yhä laajemmalla alueella. Lajin toukat aiheuttavat mittavia tuhoja perunasadoille syömällä kasvien lehdet. Hormoneihin suuntautuvan perustutkimuksen avulla voi olla mahdollista löytää uusia sovelluksia lajin leviämisen ja lisääntymisen rajoittamiseksi. Esimerkiksi yleisesti käytetyt hyönteismyrkyt pyriproksifeeni ja metopreeni ovat molemmat JH-analogeja (Koopmanschap ym. 1989).

Tekemäni tutkimuksen tavoitteena oli löytää yhteys JH-tason ja munantuotannon välillä sekä määrän että laadun osalta. Samalla tutkin, pystyvätkö kuoriaiskoiraat manipuloimaan JH:n avulla naaraita tuottamaan enemmän munia kuin olisi naaraiden kannalta optimaalista. Koeasetelmassa paritettiin koiraita naaraiden kanssa. Puolelle kummankin sukupuolen yksilöistä annettiin JH-, puolelle kontrollikäsitteily (K). Näin saatavien neljän ryhmän (JH–JH, JH–K, K–JH, K–K) munantuotantoa ja kuoriutuneiden toukkien määriä verrattiin keskenään. Hypoteesini olivat, että naaraiden saama hormonikäsitteily nostaa tuotettujen munien määrää mutta laskee laatua ja että koiraiden saama ja naaraisiin siirtämä ylimääräinen hormoni niin ikään nostaa naaraiden munantuotantoa laadun kustannuksella. Hypoteesin taustalla on ajatus seksuaalisen antagonismin vaikutuksista lisääntymiseen.

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1. Kuoriaisten valmistelu

Tutkimuksessa halusin selvittää sekä koiraille että naaraille annetun juveniilihormonin vaikutusta naaraiden munantuotantoon sekä määrällisesti että laadullisesti. Jälkimmäisen mittarina oli munista kuoriutuneiden toukkien määrän suhde tuotettujen munien määrään. Tarvittavien tietojen pohjalta laadin tutkimuskaavakeen. Mittasin lisäksi kunkin kuoriaisyksilön koon, jonka mittana käytin massaa. Isompikokoiset naaraat voivat kyetä tuottamaan runsaammin munia.

Koejärjestelyiden toteuttaminen alkoi perunan, koloradonkuoriaisen isäntäkasvin, kasvattamisella kuoriaisten ravinnoksi. Hyvin kasvavaksi lajikkeeksi oli aiempien kokemusten perusteella valittu Van Gogh. Siemenperunaa istutettiin kasvihuoneessa ruukkuihin ja kasteltiin päivittäin, kunnes verso oli kasvanut riittävän suureksi ja tuotti runsaasti lehtiä.

Tutkimuksessa käytetyt kuoriaiset olivat kuudennen sukupolven laboratoriossa tutkimustarkoituksiin kasvatettuja yksilöitä. Alkuperäinen laboratoripopulaatio (917 yksilöä) oli kerätty venäläiseltä pelloilta (61° 49' N, 34° 10' E) läheltä Petroskoita vuonna 2006. Yksilöiden valinta tapahtui satunnaistamalla kontrolloidusti siten, että samoista sukulinjoista eli perheistä ei otettu tutkimukseen kovin monta yksilöä. Naaraita oli yhteensä 48 yksilöä, koiraita 24, joista kukin paritettiin kahden eri naaraan kanssa. Lisäksi kasvatukseen otettiin ylimääräisiä yksilöitä kumpaakin sukupuolta, koska oli todennäköistä, että tutkimuksen aikana kuoriaisista kuolee pieni osa heikon yleiskunnon tai itse koekäsittelyn vuoksi.

Ensimmäisenä laboratoriopäivänä huhtikuun lopulla valittiin kuoriaiset, kukin yksilö sijoitettiin suljetulle petrimaljalle kostutetun imupaperin päälle ja niille annettiin pala perunanlehteä ravinnoksi. Kaikki maljat etiketoitiin yksilöllisesti, jotta tunnistaminen olisi

mahdollista, ja sijoitettiin muutaman maljan korkuisiin pinoihin kopiopaperilaatikoihin ja laatikot valaistuun saksalaisen Weiß Technicin valmistamaan B1300-mallin kasvatuskaappiin, jonka lämpötila pystyttiin tarkasti pitämään halutussa 296 kelvinissä. Kaapissa kuoriaiset saivat vuorokaudessa 18 tuntia valoa ja 6 tuntia pimeää. Alkuvaiheessa kuoriaisia käytiin tarkkailemassa joka toinen päivä, jolloin niille annettiin lisää perunaa ja poistettiin vanhat lehdet sekä tarpeen mukaan vaihdettiin imupaperi. Samalla seurattiin, olivatko naaraat munineet hedelmöittämättömiä munia. Nämä kerättiin pois ja tuhottiin.

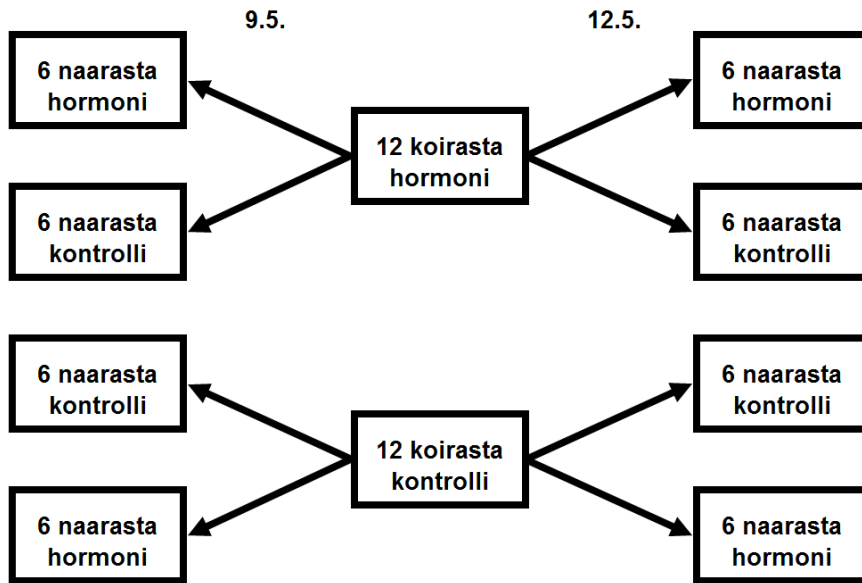
2.2. Hormonikäsittely

Varsinaisen kokeen tekeminen käynnistyi kaksi viikkoa valmistelujen alkamisesta, jolloin kuoriaiset olivat talvehtimisen jälkeen valmiita parituksiin. Koeasetelmassa (Kuva 1) koiraat jaettiin sattumanvaraisesti kahteen ryhmään, joista toiselle annettiin JH- ja toiselle kontrollikäsittely. Vastaavasti naaraat jaettiin kahteen ryhmään tulevan käsittelyn (JH- / kontrollikäsittely) mukaan. Koska koiraita oli vain puolet naaraiden määrästä, kukin koiras paritettiin kahden eri naaraan kanssa. Naaraista puolet – kaksitoista kummastakin käsittelyryhmästä – paritettiin 9.5. Koiraille vaihdettiin uudet naaraat kolme päivää myöhemmin aiemmin parittamattomista naaraista. Tämän jälkeen kutakin koirasta vaihdeltiin kolmen päivän välein niiden kahden naaraan välillä, joiden kanssa se oli paritettu. Samalla myös kuoriaisten käsittely toistettiin.

Koiraille arvottiin parit käsittelyyn kuoriaisnaaraista satunnaismenetelmällä. Tässä oli tarpeen tarkistaa, etteivät paritettavat yksilöt olleet sukua toisilleen. Mikäli ne olivat, arvottiin koiraan tilalle toinen koiras. Tätä jatkettiin, kunnes kaikilla yksilöillä oli pari. Toukokuun 9. päivänä käsiteltävät yksilöt samalla myös punnittiin Mettler AM 100 - tarkkuusvaa'alla. Kuoriaiskoiraille tehtiin punaisella, vedenpitävällä tussilla selkakilpeen täplä, jonka avulla ne voitiin helpommin erottaa naaraista niiden ollessa samalla maljalla naaraan kanssa.

Naaraat, joita ei käsitelty vielä 9. päivänä, saivat ensimmäisen käsittelynsä 12.5., jolloin nekin punnittiin. Koiraat paritettiin myös uusien naaraiden kanssa satunnaistetusti. Kaikki tutkimuksessa mukana olleet yksilöt saivat käsittelyannoksensa, samoin 12. päivästä eteenpäin aina kolmen päivän välein toukokuun loppuun asti – yhteensä seitsemän kertaa.

Käsittelyjä varten valmistettiin annokset sekä JH- että kontrolliliuosta. JH oli liuotettu asetonitriiliin (CH_3CN). Liuoksen hormonipitoisuus oli $500 \mu\text{g/ml}$. Koska JH ruiskutettiin kuoriaisen vatsakilvelle ruiskeen antamisen asemesta, imeytymistä kilven läpi helpotettiin sekoittamalla JH-liuos yhtä suureen tilavuuteen asetonia ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$): $500 \mu\text{l}$ (JH-liuos) + $500 \mu\text{l}$ (asetoni) = 1 ml (käsittelyliuos). Kuoriaisille annettavan liuoksen JH-pitoisuudeksi muodostui näin $250 \mu\text{g} / \text{ml}$. Kontrolliliuos valmistettiin samoin mutta asetonitriiliin liuotettu JH korvattiin $500 \mu\text{l}$:lla pelkkää asetonitriiliä. Molemmat käsittelyliuokset sekoitettiin omaan eppendorf-putkeensa. Kaikkia kemikaaleja säilytettiin tiiviissä lasipulloissa, JH:ta puolestaan pienemmässä, niin ikään tiiviissä lasiputkilossa. Kaikkien säilytyspaikkana oli 278-kelvininen kylmäkaappi. Jääkaapissa säilytettyä JH-liuosta annettiin kolmella peräkkäisellä käsittelykerralla, koska se säilyy toimivana ainakin viikon ajan (Zera 2007). Kolmatta kertaa seuraavalla käsittelykerralla oli valmistettava uudet käsittelyliuokset.



Kuva 1. Koeasetelmakaavio, josta selviää, miten koiraat paritettiin naaraiden kanssa ja milloin eri ryhmien käsittelyt alkoivat. Jokainen 24 koirasta paritettiin 9.5. yhden naaraan kanssa, 12.5. koiraat paritettiin uudestaan aiemmin parittamattomien naaraiden kanssa. Koiraita vaihdeltiin kunkin kanssa paritettujen kahden naaraan välillä kolmen päivän välein.

Hormoniannos, jonka tilavuus oli 5 µl liuosta / kuoriainen / käsittelykerta, annettiin kääntämällä kuoriainen pöydällä selälleen ja ruiskuttamalla pipetillä liuos vatsakilvelle. Kuoriaisen tuli olla selällään kymmenkunta sekuntia, jotta liuos ehtisi imeytyä erityisesti raajojen nivelien kautta elimistöön (Koopmanshap ym. 1989). Toisinaan oli tarpeen rajoittaa kuoriaisten pyrkimyksiä kääntyä liian nopeasti jaloilleen. Kaikille hormonia saaville annettiin annokset ensin, minkä jälkeen pipetin kärki vaihdettiin ja annettiin kaikille kontrolliliuosta saaville kuoriaisille annoksensa. Kun jokaisen kuoriaisparin kummallekin osapuolelle oli annettu käsittely, sekä koiras että naaras sijoitettiin naaraan petrimaljalle ja niille annettiin perunanlehteä. JH:n hajoamisen estämiseksi liuoksia pidettiin käsittelyn aikana jäämurskassa styroksilaatikossa.

2.3. Munien ja toukkien laskeminen

Ensimmäisen käsittelypäivän jälkeen naaraiden tuottamat munat laskettiin joka päivä 20 päivän ajan. Seurantakäynnit ajoitettiin aina alkuiltapäivään järjestelmällisyyden tähden. Kuoriaiset siirrettiin tyhjälle petrimaljalle laskemisen ajaksi. Kun munien lukumäärä oli selvillä, ne siirrettiin uudelle petrimaljalle, joka etiketöitiin ja jonne laitettiin kostutettu imupaperi sekä pieni pala perunanlehteä. Munarykelmien käsittelyssä piti noudattaa suurta varovaisuutta, jotta yksikään muna ei vahingoittuisi, sillä se mahdollisesti vääristäisi munien laadullisen seurannan tuloksia.

Toinen osa seuranta oli laskea toukat, jotka kuoriutuivat tyypillisesti 3–5 päivää kunkin munarykelmän munimisen jälkeen. Munia tarkkailtiin kuitenkin kaiken varalta 20 päivää ennen niiden hävittämistä. Kuoriutuneet toukat laskettiin kahteen kertaan: ensin päivänä, jona ne olivat kuoriutuneet, ja toistamiseen seuraavana päivänä. Näiden kahden päivän jälkeen todennäköisyys, että munista kuoriutuisi vielä toukkia, oli hyvin pieni. Toisen päivän laskennan jälkeen toukat hävitettiin pakastamalla.

Kokeen aikana kuoli yksi koiras ja kolme naarasta. Oli odotettavissa, että kuoriaista osa kuolisi, ja etukäteisarviot kuolleiden määrästä liikkuvat kymmenen prosentin tuntumassa. Koesuunnitelman mukaisesti kuolleet yksilöt korvattiin uusilla satunnaisesti valituilla yksilöillä seuraavan käsittelyn yhteydessä. Luonnollisesti korvaaville yksilöille ei kertynyt yhtä monta seurantapäivää.

2.4. Aineiston tilastollinen tarkastelu

Muna- ja toukkamäärien analysoinnissa jouduttiin poistamaan kahden yksilön havainnot niiden kohdalla tapahtuneiden käsittelyvirheiden vuoksi: kummassakin tapauksessa naaras oli saanut yhtenä päivänä sekä JH- että kontrollikäsitteilyn, minkä huomiotta jättäminen vääristäisi tuloksia. Lisäksi kokeen aikana kuolleiden naaraiden osalta ei ollut dataa koko seurantajakson ajalta.

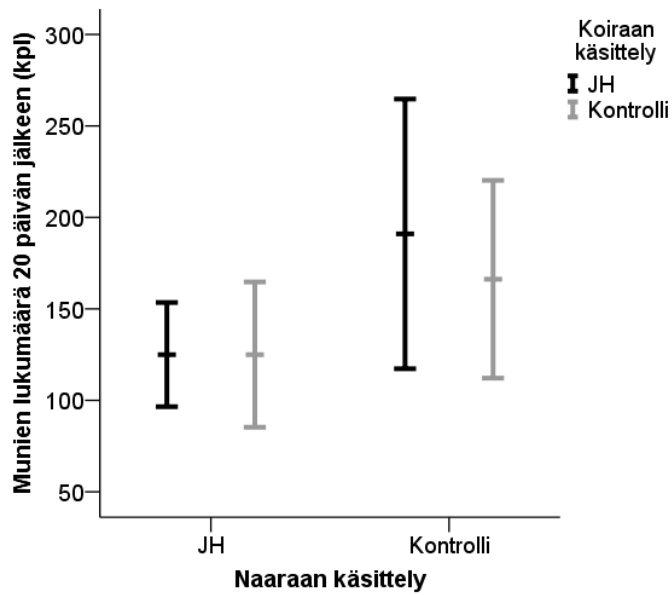
Kokeen alkuperäisen suunnittelun ja lopullisen toteutuksen välillä tapahtui jossakin vaiheessa informaatiokatko, joka johti sekaannukseen kuoriaiskoiraiden paritusten kanssa. Tämän seurauksena alkujaan suunniteltua tilastollista testausmenetelmää ei voitu käyttää muuttujien välisten riippuvuussuhdeoletusten muututtua. Tilanne korjattiin jättämällä puolet havaintomateriaalista analysoimatta niin, että vain koiraiden ensimmäiset paritukset huomioitiin.

Neljän vertailuryhmän jäljelle jääneet havainnot analysoitiin koko seuranta-ajalta IBM SPSS Statistics -ohjelman versiolla 20. Ryhmien eroja munia munineiden naaraiden lukumäärän osalta tutkittiin ristiintaulukoimalla ja χ^2 -testillä. Koiraiden ja naaraiden saamien käsittelyjen vaikutuksia munittujen munien määrään ja toukkien kuoriutumisprosenttiin puolestaan tutkittiin kovarianssianalyysin (ANCOVA) keinoin. Riippumattomiksi muuttujiksi valittiin koiraiden ja naaraiden käsittelyt. Kovariaatiksi otettiin kuoriaisen massa. Nollahypoteesina oli, että naaraan tai koiraan hormonikäsitteilyllä ei ole tilastollisesti merkitsevää vaikutusta munantuotantoon tai kuoriutumisprosenttiin, vaihtoehdoisen hypoteesin mukaan taas ylimääräinen JH nostaa munittujen munien määrää laadun kustannuksella.

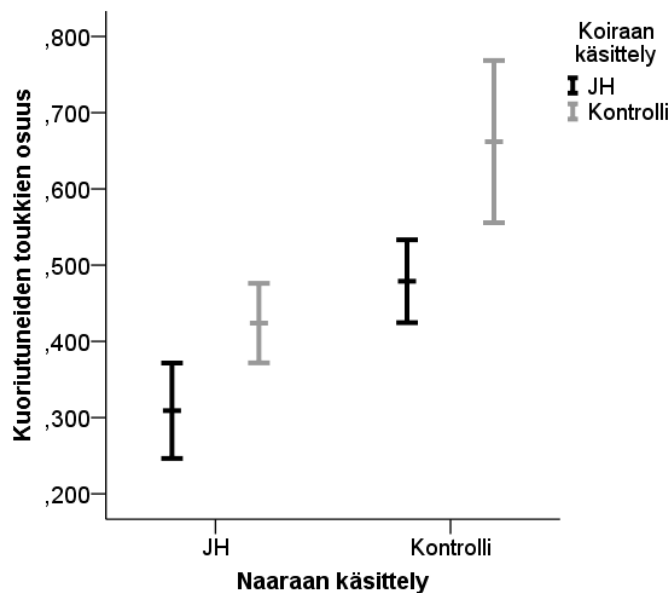
3. TULOKSET

Tutkin ristiintaulukoimalla, onko eri käsittelyryhmien välillä eroja munia tuottaneiden naaraiden lukumäärissä. Testin mukaan JH-käsittely ei aiheuttanut eroa ($\chi^2 = 2,237$, $df = 3$, $p = 0,525$).

Kovarianssianalyysi puolestaan osoitti, että munamäärissä ryhmien välillä ei ollut eroja koiraiden ($F = 0,281$, $df = 1$, $p = 0,603$) eikä naaraidenkaan ($F = 1,453$, $df = 1$, $p = 0,245$) osalta, Kuva 2. Yhdysvaikutustakaan ei ilmennyt käsittelyjen välillä ($F = 0,083$, $df = 1$, $p = 0,776$). Tein myös toisen kovarianssianalyysin, jossa vastemuuttujana oli nyt toukkien kuoriutumisprosentti. Tämänkään kohdalla ei koiraiden käsittelyllä ollut vaikutusta ($F = 2,318$, $df = 1$, $p = 0,149$), mutta naaraiden käsittely vaikutti tilastollisesti merkitsevästi ($F = 8,227$, $df = 1$, $p = 0,012$, Kuva 3). Yhdysvaikutusta ei ollut tässäkään tapauksessa ($F = 0,129$, $df = 1$, $p = 0,725$). Kovariaattina olleen massan vaikutus ei ollut merkitsevä kummassakaan testissä.



Kuva 2. Kunkin neljän käsittelyryhmän naaraiden munimien munien lukumäärät naaraiden funktiona, ryhmiteltyinä koiraiden käsittelyn mukaan (keskiarvo \pm s.e.). Mukana ovat myös munimattomat naaraat.



Kuva 3. Käsittelyryhmissä kuoriutuneiden toukkien suhteelliset osuudet munittujen munien määristä naaraiden käsittelyn funktiona, ryhmiteltyinä koiraiden käsittelyn mukaan (keskiarvo \pm s.e.).

4. TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINNAT

Ajatus evoluution myötä kehittyneestä optimoidusta munantuotantokapasiteetista on kiinnostava eikä kuulosta kaukaahaetulta. Vähintään yhtä mielenkiintoinen konsepti on koiraiden mahdollisuus vaikuttaa tähän omien etujensa mukaisesti naaraiden tuottamien munien määrää muuttamalla. Tutkimuksessa etsittiin viitteitä tästä koiraiden potentiaalisesti harjoittamasta antagonismista samalla, kun tutkittiin, kuinka JH-määrä ylipäänsä vaikuttaa naaraiden tuottamien munien määrään.

Hieman yllättäen eri ryhmien välillä ei vaikuttanut olevan eroja munamäärissä (Kuva 2). Hypoteesinahan oli, että eroja ilmenee, vieläpä niin päin, että JH-käsittely nostaisi munamääriä, sillä useat muilla hyönteisillä tehdyt tutkimukset tukevat tätä käsitystä. Esimerkiksi *Heliothis virescens* -yökkösellä tehdyissä tutkimuksissa naaraiden JH I- ja JH II -määrät olivat selvästi koholla parittelun jälkeen ja liittyivät vahvasti korkeaan munantuotantoon (Shu ym. 1998). Omat tulokseni eivät tätä näytä kuitenkaan tukevan. Tutkimus ei myöskään antanut viitettä, että toisen tai molempien sukupuolten käsitteleminen JH:lla saisi naaraita tuottamaan enempää tai vähempää munia kontrolliryhmään verrattuna. Munittujen munien määrään vaikuttanevat tosin muutkin hormonit, mahdollisesti ekdysteroidit (Hoffmann ym. 1996).

On aiheellista pohtia, minkä vuoksi eroja käsittelyiden välillä ei syntynyt odotuksista huolimatta. Väistämättä olosuhteet kuoriaisille optimoiduissa laboratorio-oloissa ovat hyvin erilaiset kuin perunapellolla ympäröivän luonnon armoilla eletessä. Kuoriaiset saavat runsaasti ravintoa laboratoriohoidossa, eikä niiden tarvitse kilpailla keskenään. Näin ne pystyvät laittamaan kaikki käytössä olevat resurssit jälkeläistuotantoon. Kun naarailta ei ole ulkopuolelta tulevia rajoittavia tekijöitä, munantuotantoa rajoittavat fysiologiset ominaisuudet, esimerkiksi yksilön massa. Yksikään naaras ei kykene tuottamaan rajatonta määrää munia, vaan ennen pitkää tulee kynnyks vastaan. Yksilötasolla tämä yläraja epäilemättä vaihtelee, ehkä runsaastikin, mutta kun laboratorio-oloissa kuoriaiset pääsevät käyttämään resurssinsa lähes yksinomaan lisääntymiseen, vaihtelun voi olettaa syntyvän yksilöiden välisistä fysiologisista eroista, ei niiden ulkopuolelta tulevista häiriöistä kuten ylimääräisenä annettusta JH:sta.

Vaikka munamääriin JH ei vaikuttanutkaan kummankaan sukupuolen kohdalla, eri käsittelyn saaneiden naaraiden välillä oli kuitenkin selvä ero kuoriutumisprosentissa, jota pidettiin munien laadun mittarina (Kuva 3). Aivan kuten otaksuttiinkin, ylimääräinen JH johti kuoriutumisprosentin laskuun, mutta naaraista saatujen tulosten valossa on ehkä hieman yllättävää, että koiraille annettulla JH:lla ei näyttänyt olevan minkäänlaista vaikutusta munien laatuun. Tämä tulos oli jotain muuta kuin se, jota Arnqvist & Rowe (2005) antoi ennakkoon olettaa. JH:n suorasta vaikutuksesta munien laatuun ei kuitenkaan ole aiemmin tehty tutkimuksia, joten vertailukohtaa ei kirjallisuudesta ole löytynyt sen enempää koiraille kuin naaraillekaan annettun hormonilisän osalta. Joka tapauksessa on helppoa huomata, että liian suuri määrä JH:ta vaikuttaa negatiivisesti kuoriaisnaaraiden lisääntymispotentiaaliin, mikä viittaa niille evoluution myötä kehittyneeseen optimaaliseen munantuotantokapasiteettiin.

JH:n määrä naaraan elimistössä munien kypsymisen aikana vaikuttaa tuotettujen munien laatuun: paitsi aikuisvaiheen säätelyhormonina JH toimii myös kehityshormonina ennen aikuisvaihetta ja laukaisee monet peruuttamattomat muutokset pitkin hyönteisen kehityskaarta niin alkio- kuin toukkavaiheessakin hormoniherkillä jaksoilla (Nijhout 1994). Tietyissä vaiheissa tarvittavan hormonin puuttuminen voi jättää kehityksen kesken. Samalla tavalla liiallinen määrä hormonia saattaa estää yksilön normaalin kehityksen, mikä koskee myös JH:ta: naaraiden elimistöstä JH siirtyy muniin ja niissä kehittyviin alkioihin.

Tämä voi selittää ainakin osittain, miksi munien laatu laskee kuoriaisnaaraiden saatua ylimääräistä JH:ta.

Koiraille annettu JH itsessään ei kulkeudu siemennesteeseen, vaan koiraskuoriaiset siirtävät naarasiin proteiineja, joiden määrää elimistössä oleva JH säätelee, erityisesti vitellogeniiniä (Arnqvist & Rowe 2005). Nämä proteiinit puolestaan stimuloivat naaraiden munankehitystä. Osa JH:sta haihtui kuoriaisten kutikulalta asetoin mukana, mutta elimistöön asti imeytynyt JH luultavasti stimuloi muodostumaan runsaasti vitellogeniiniä. Eri asia on, kuinka paljon siitä kulkeutui lopulta naarasiin siemennesteen mukana. Tämä epävarmuus saattaa selittää osaltaan, miksi koiraiden saamalla JH:lla ei vaikuttanut olevan suurta vaikutusta sen enempää munamääriin kuin munien laatuunkaan. Lisäksi on huomattava, että JH on hyvin hauras hormoni. Sen tilalla olisi voinut kokeilla metopreeniä tai pyriproksifeenia, sen analogeja (Koopmanschap ym. 1989). Näiden muista vaikutuksista ei tosin ole riittävästi tietoa, jotta niitä voisi käyttää ottamatta asiaa suunnittelussa huomioon. Haihtumisongelmaan puolestaan olisi voinut tulla kysymykseen ruiskeena annettava JH, mutta käytännön toimenpiteenä se olisi ollut liian vaativa.

Kuoriaisnaaraiden munimien munien määrissä oli valtavia yksilöiden välisiä eroja: monet naaraat eivät muneet ainuttakaan munaa, tehokkain munija taas tuotti yli 500 munaa. Seurauksena varianssit muodostuivat suuriksi, mikä aiheutti tilastollista epävarmuutta. Suurempi otoskoko olisi ainakin jossakin määrin pienentänyt ongelmaa, mutta resurssien puolesta sitä ei ollut mahdollista toteuttaa. Suunnitteluvaiheessa oli alkujaan tarkoitus viedä tutkimus läpi niin, että käytössä olisi ollut vain 20 koirasta ja 40 naarasta – 10 naarasta / ryhmä. Päätös kasvattaa ryhmien kokoja kahdella yksilöllä oli oikea, mutta jälkeenpäin ajateltuna muutos ei ehkä ollut riittävän suuri, vaikka kuoriutumisprosentista löytyikin selvä yhteys JH-lisään.

Huolimatta pyrkimyksistä mahdollisimman suureen tarkkuuteen ja täsmällisyyteen munia ja toukkia laskettaessa pieniltä virheiltilta ei todennäköisesti voinut välttyä. Munien laskeminen silmämääräisesti munarykelmistä oli haastavaa käytössä olleesta suurennuslasista huolimatta. Vilkkaasti liikkuvat, vastakuoriutuneet toukat olivat vielä vaikeampia laskettavia, kun niitä oli petrimaljalla kymmenittäin samanaikaisesti. Erityisesti tässä saattoi syntyä pienehköjä (\pm kaksi toukkaa) virheitä, joiden merkitys kuitenkin on tulosten kannalta käytännössä olematon.

Tutkimuksessani etsittyä tukea teorialle kuoriaiskoiraisten naaraita kohtaan mahdollisesti harjoittamasta seksuaalisesta antagonismista ei löytynyt, tai ainakaan sitä ei voitu havaita munamäärissä tai munien laadussa. Hyönteismaailmassa siemennesteen sisältämien aineiden välittämä seksuaalinen antagonismi ei kuitenkaan ole tuntematon ilmiö. Muun muassa banaanikärpäskoiraat (*Drosophila melanogaster*) siirtävät naarasiin useita eri proteiineja, jotka laskevat naaraiden kuntoisuutta ja vastaavasti nostavat koiraan kuntoisuutta (Chapman 2001).

Tässä tutkimuksessa saatu tulos ei tietenkään tarkoita, että koloradonkuoriaisilla ei esiintyisi antagonismia. On mahdollista, että se ilmenee eri tavalla kuin naaraiden tuottamien munien määrässä tai laadussa. On olemassa niin ikään mahdollisuus, että koirat kykenevät kuin kykenevätkin manipuloimaan naaraiden lisääntymistä JH:n avulla, mutta tutkimuksessani käytetyt menetelmät olivat riittämättömiä tai koe suunniteltu niin, että ilmiön havaitseminen ei ollut mahdollista. Ei ole myöskään poissuljettu ajatus, että koirilla ei olisi muita keinoja manipuloida naaraita, kuten aiemmissa, eri lajeilla tehdyissä tutkimuksissa on havaittu. Menetelmiä kannattaa kehittää edelleen ja toistaa koe suuremmalla määrällä kuoriaisyksilöitä, jotta ilmiön olemassaolosta saadaan enemmän näyttöä suuntaan tai toiseen.

KIITOKSET

Haluan kiittää ohjaajiani FT Saija Piirousta ja FM Philipp Lehmannia asiantuntevasta ja kärsivällisestä avusta tutkielmanprojektin aikana, Joel Rahkosta ja Kati Kivisaarta kuoriaisten ja toukkien hoitamisesta ja toukkalaskennoissa auttamisesta sekä elämänkumppaniani Jasmin Nevalaa henkisestä tuesta ja muusta avusta pitkässä ja toisinaan tuskaisessakin luomisprosessissa.

KIRJALLISUUS

- Arnqvist G. & Nilsson T. 2000. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Anim Behav* 60: 145–164.
- Arnqvist G. & Rowe L. 2005. *Sexual Conflict*. Princeton University Press, Princeton
- Bali G., Raina A.K., Kingan T.G. & Lopez J.D. Jr. 1996. Ovipositional behavior of newly colonized corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) females and evidence for an oviposition stimulating factor of male origin. *Ann Entomol Soc Am* 89: 475–480.
- Bloch G., Borst D.W., Huang Z-Y., Robinson G.E., Cnaani J. & Hefetz A. 1999. Juvenile hormone titers, juvenile hormone biosynthesis, ovarian development and social environment in *Bombus terrestris*. *J Insect Physiol* 46: 47–57.
- Chapman T. 2001. Seminal fluid-mediated fitness traits in *Drosophila*. *Heredity* 87: 511–521
- Cordero C. 1995. Ejaculate Substances that Affect Female Insect Reproductive Physiology and Behavior: Honest or Arbitrary Traits? *J Theor Biol* 174: 453–461.
- Gilbert L.I., Granger N.A. & Roe R.M. 2000. The Juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem Mol Biol* 30: 614–644.
- Gillot C. 2003. Male accessory gland secretions - modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annu Rev Entomol* 48: 163–184.
- Gäde G., Hoffmann K-H. & Spring J.H. 1997. Hormonal Regulation in Insects: Facts, Gaps, and Future Direction. *Physiol Rev* 77: 963–1032.
- Hoffmann K.H., Sorge D. & Schwarzenberger D. 1996. Effects of juvenile hormone analogues and ecdysteroid biosynthesis effectors on egg production in crickets, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae). *Invertebr Reprod Dev* 29: 103–110.
- Jassim O., Huang Z.Y. & Robinson G.E. 1999. Juvenile hormone profiles of worker honey bees, *Apis mellifera*, during normal and accelerated behavioural development. *J Insect Physiol* 46: 243–249.
- Johnstone R.A. & Keller L. 2000. How Males Can Gain by Harming Their Mates: Sexual Conflict, Seminal Toxins, and the Cost of Mating. *Amer Nat* 156: 368–377.
- Klowden M.J. 2007. *Physiological systems in insects*. Academic press, Waltham.
- Koopmanschap A.B., Oouchi H. & de Kort C.A.D. 1989. Effects of a juvenile hormone analogue on the eggs, post-embryonic development, metamorphosis and diapause induction of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Entomol Exp Appl* 50: 255–263.
- de Kort C.A.D. & Granger N.A. 1990. Regulation of the juvenile hormone titer. *Annu Rev Entomol* 26: 1–28.
- Nijhout H.F. 1994. *Insect Hormones*. Princeton University Press, Princeton.
- Piirouinen S., Ketola T., Lyytinen A. & Lindström L. 2011. Energy use, diapause behaviour and northern range expansion potential in the invasive Colorado potato beetle. *Funct Ecol* 25: 527–536.
- Pszczolkowski M.A., Tucker A., Srinivasan A. & Ramaswamy S.B. 2006. On the functional significance of juvenile hormone in the accessory sex glands of male *Heliothis virescens*. *J Insect Physiol* 52: 786–794.
- Riddiford L.M. 2007. Juvenile hormone action: a 2007 perspective. *J Insect Physiol* 54: 895–901.
- Shu S.Q., Park Y.I., Ramaswamy S.B. & Srinivasan A. 1998. Temporal profiles of juvenile hormone titers and egg production in virgin and mated females of *Heliothis virescens* (Noctuidae). *J Insect Physiol* 44: 1111–1117.

- Tian L., Ji B-Z., Liu S-W., Jin F., Gao J. & Li S. 2010. Juvenile hormone III produced in male accessory glands of the longhorned beetle, *Apriona germari*, is transferred to female ovaries during copulation. *Arch Insect Biochem Physiol* 75: 57–67.
- Trumbo S.T. 1997. Juvenile Hormone–Mediated Reproduction in Burying Beetles: From Behavior to Physiology. *Arch Insect Biochem Physiol* 35: 479–490.
- Wyatt G.R. & Davey K.G. 1996. Cellular and Molecular Actions of Juvenile Hormone. II. Roles of Juvenile Hormone in Adult Insects. Teoksessa: Evans P. (toim.), *Advances in Insect Physiology Vol. 26*, Academic Press, Cornwall, s. 1–156.
- Zera A.J. 2007. Endocrine analysis in evolutionary-developmental studies of insect polymorphism: hormone manipulation versus direct measurement of hormonal regulators. *Evol Dev* 9: 499–513