

# **Glyfosaatin vaikutus japaninviiriäisen immuunipuolustukseen**

**Kaisa Lepola ja Pyry Heimonen**



**Jyväskylän yliopisto**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

3.12.2021

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Solu- ja molekyylibiologia

Kaisa Lepola ja Pyry  
Heimonen: Glyfosaatin vaikutus japaninviiriäisen  
immuunipuolustukseen  
Kandidaatin tutkielma: 21 s  
Tutkielman ohjaajat: Apulaisprofessori Suvi Ruuskanen ja Dosentti  
Miia Rainio

11.2021

---

Hakusanat: Glyfosaatti, immuunipuolustus, japaninviiriäinen

Synteettiset torjunta-aineet ovat auttaneet viljelyn tehostamisessa, ja niistä on tullut tärkeä osa maatalouden kasvinsuojelua. Merkittävä osuus käytetyistä torjunta-aineista on rikkakasvien torjunta-aineita, joista maatalouden kehittyminen on tullut riippuvaiseksi. Nykyään maailman käytetyin rikkakasvien torjunta-aine on glyfosaatti. Näiden torjunta-aineiden mahdolliset riskit ympäristölle ja ihmisten terveydelle ovat herättäneet paljon huolta. Niiden runsaalla käytöllä on huomattu olevan vaikutuksia ympäristöön ja sitä kautta myös ihmisiin sekä eliöstöön. Glyfosaatilla on havaittu olevan pääosin negatiivinen vaikutus eri eläinlajien immuunipuolustukseen, mutta sen vaikutusta lintujen immuunipuolustukseen on tutkittu varsin vähän. Tämän vuoksi tässä tutkimuksessa tarkasteltiin glyfosaatin vaikutusta kahteen immunoparametriin, hemolyysiin ja lysotsyymiin aktiivisuuteen. Lysotsyymiin aktiivisuutta määritettiin lisäämällä bakteerisuspensiota eri ikäisistä japaninviiriäisistä otettuihin plasmanäytteisiin ja mittaamalla absorbanssin muutosta reaktion aikana. Hemolyysissä seurattiin, miten eri pitoisuudet plasmanäytteitä reagoivat kanin veren antigeeneihin. Tuloksia analysoitiin Studentin t-testillä Excel -taulukkolaskentaohjelmalla. Kummankaan immunoparametrin kohdalla ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa koe- ja kontrolliryhmän välillä. Saatujen tulosten perusteella voidaan päätellä, että glyfosaatilla ei ole vaikutusta japaninviiriäisten immuunipuolustukseen. Tuloksissa oli pieni otoskoko, suuret keskihajonnat ja huono toistettavuus, minkä vuoksi niiden pohjalta ei voi tehdä suuria yleistyksiä. Aiheeseen liittyen tulee tehdä lisää tutkimuksia erilaisilla koeasetelmilla ja suuremmilla otosko'illa.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science  
Department of Biological and Environmental Science  
Cell and molecular biology

Kaisa Lepola and Pyry  
Heimonen: The effect of glyphosate on the immune defence of  
the Japanese quail

Bachelor of Science Thesis: 21 p.

Supervisors: Assistant Professor Suvi Ruuskanen and Adjunct  
Professor Miia Rainio

11.2021

---

Keywords: Glyphosate, immune defence, Japanese quail

Synthetic pesticides have made farming more effective, and they have become an important part of crop protection in agriculture. Considerable part of all used pesticides are herbicides on which the agriculture has become dependent on. Nowadays the most used herbicide in the world is glyphosate. The possible environmental and health risks of herbicides have caused a lot of concern. Abundant use of herbicides has been noticed to affect the environment and therefore also humans and the biota. Research has shown that glyphosate usually has a negative impact on the immune defence of various species. The amount of research on its effect on the immune defence of birds is limited. Therefore, in this bachelor's thesis the effect of glyphosate is studied on two immune parameters: hemolysis and lysozyme activity. The activity of lysozyme was studied by adding bacteria to plasma samples taken from the Japanese quails on different points of time and measuring the change in absorbance. In the hemolysis assay rabbit blood was added to different concentrations of plasma and the reaction against the rabbit blood's antigens was observed. The statistical analysis was done with Student's t-test in Excel. No statistically significant difference between the test group and the control group were found in either of the studied parameters. With these results we can conclude that glyphosate does not have effect on the immune defence of the Japanese quail. These results might not be reliable as the sample sizes were low, the standard deviations between samples were high and the repeatability was low. More research is needed with bigger sample sizes and different experimental designs.

## SISÄLLYSLUETTELO

<b>1 JOHDANTO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 AINEISTO JA MENETELMÄT .....</b>	<b>6</b>
2.1 Aineisto .....	6
2.2 Menetelmät.....	7
2.2.1 Lysotsyymien aktiivisuuden mittaus .....	7
2.2.2 Hemolyysi.....	8
<b>3 TULOKSET .....</b>	<b>11</b>
3.1 Lysotsyymien aktiivisuuden mittaus .....	11
3.2 Hemolyysi .....	13
<b>4 TULOSTEN TARKASTELU .....</b>	<b>15</b>
4.1 Lysotsyymien aktiivisuuden mittaus .....	15
4.2 Hemolyysi .....	16
<b>Kiitokset.....</b>	<b>18</b>
<b>KIRJALLISUUS.....</b>	<b>19</b>

## **SANASTO JA LYHENTEET**

### **SANASTO**

<b>Agglutinaatio</b>	Solujen tai hiukkasten liimautuminen yhteen tai takertuminen toisiinsa
<b>Lyysis</b>	Solun hajoaminen solukalvon tuhoutuessa

### **LYHENTEET**

<b>EPSPS</b>	5-enolipyruvyyilisikimaatti-3-fosfaattisyntaasi-entsyymi
<b>NAbs</b>	luonnolliset vasta-aineet
<b>PBS</b>	fosfaattipuskuroitu suolaliuos

# 1 JOHDANTO

Synteettisten torjunta-aineiden käyttö aloitettiin 1940-luvulla ja niistä on vuosien aikana tullut tärkeä osa maatalouden kasvinsuojelua. Ne ovat auttaneet viljelyn tehostamisessa ja suurin osa torjunta-aineiden kulutuksesta keskittyykin maatalouteen. Myös torjunta-aineiden käyttö muihin kuin maatalouden tarpeisiin on lisääntynyt 1900- ja 2000-luvun vaihteessa. Merkittävä osuus käytetyistä torjunta-aineista on rikkakasvien torjunta-aineita. Maatalouden kehittyminen on riippuvainen rikkakasvien torjunta-aineista ja niiden runsas käyttö on aiheuttanut vastustuskykyisten rikkakasvilajien kehittymisen. Tämän vuoksi maanviljelyssä täytyy käyttää useampia erilaisia torjunta-aineita ja käytetyt määrät ovat suurempia. On havaittu, että torjunta-aineet kertyvät maaperään ja niiden jäämiä on löydetty maaperästä myös kohdealueen ulkopuolelta (Piotrowski 2011).

Vuonna 1974 Monsanto alkoi myydä Roundup -kauppanimikkeellä torjunta-ainetta, jossa vaikuttavana aineena toimii glyfosaatti. Nykyään glyfosaatti on maailman käytetyin rikkakasvien torjunta-aine. Erityisesti Roundup Ready -kasvien käyttöönoton jälkeen glyfosaatin kulutus on 15-kertaistunut (Benbrook 2016). Glyfosaatti eli N-(fosfonometyyli)glysiini on aminohappo glysiinin ja fosforihapon johdannainen (Singh ym. 2020). Glyfosaatti on aminohappojen synteesiä inhiboiva torjunta-aine. Sen toiminta perustuu glyfosaatin kykyyn estää kasvin normaali toiminta inhiboimalla 5-enolipyruvyyilisikimaatti-3-fosfaattisyntaasi-entsyymiä (EPSPS), joka on osa sikimaattireittiä (Ledoux ym. 2020). EPSPS:a esiintyy kasveissa, sienissä ja useissa bakteereissa, mutta ei eläimissä (Dill ym. 2010). Tämän vuoksi on ajateltu, että glyfosaatin aiheuttamat haitat eläimiin ovat lieviä (Hong ym. 2017). Glyfosaatti on EPSPS:n kilpaileva inhibiittori (Peillex & Pelletier 2020). EPSPS osallistuu sikimaattireitissä elintärkeiden aromaattisten aminohappojen, fenyylialaniinin, tyrosiinin ja tryptofaanin sekä muiden aminohapoista johdettujen aineiden valmistukseen. EPSPS:n inaktivaatio

aiheuttaa näiden aminohappojen puutteen, mikä johtaa lopulta kasvin kuolemaan (Ledoux ym. 2020). Glyfosaatti ja sen hajoamistuote aminometyylifosforihappo (AMPA) kulkeutuvat kasvin sisään lehtien kutikulan läpi. Tämän jälkeen ne kulkeutuvat kasvin nilaa pitkin esimerkiksi sipuleihin, mukuloihin tai juuriin (Singh ym. 2020). Glyfosaatin kyky kulkeutua kasvusolukoihin ja häiritä niiden entsymaattisia toimintoja mahdollistaa juurimukuloiden, maavarsien sekä muiden uusiutuvien osien tuhoamisen (Dill ym. 2010).

Rikkakasvien torjunta-aineiden mahdolliset riskit ympäristölle ja ihmisten terveydelle ovat herättäneet paljon huolta (Piotrowski 2011). Glyfosaatin jäämiä esiintyy vesistöissä ja maaperässä, josta ne joutuvat mukaan ravintoketjuun (Gill ym. 2018). Niiden runsaalla käytöllä on huomattu olevan vaikutuksia ympäristöön ja sitä kautta myös ihmisiin sekä eliöstöön (Piotrowski 2011). Abhilash ja Singh (2009) kertovat, että torjunta-aineille altistumisella on ihmisillä yhteys useaan eri terveysongelmaan, kuten immuunipuolustuksen heikkenemiseen, hormonihäiriöihin, heikentyneeseen älykkyyteen, lisääntymishäiriöihin ja syöpään. Rikkakasvien torjunta-aineilla on huomattu olevan myös vaikutusta maaperän mikrobipopulaatioon (Piotrowski 2011).

Glyfosaatin vaikutuksia eläimiin on tutkittu useilla eri selkärangattomilla, kuten tunkiomadoilla, vesikirpuilla, hämähäkeillä ja tarhamehiläisillä. (Gill ym. 2018). Esimerkiksi Cuhra ym. (2013) havaitsivat, että jo 0,05 mg/l Roundup-konsentraatio aiheutti jälkeläisten pienikasvuisuutta *Daphnia magna* -vesikirppulajilla. Lisäksi 0,45 mg/l Roundup-konsentraation havaittiin vaikuttavan kasvuun, hedelmällisyyteen sekä surkastumisen yleisyyteen. Alberdi ym. (1996) huomasivat toisen glyfosaattia sisältävän kemikaalin (RON-DO) aiheuttavan vesikirpun liikkumattomuutta 250 mg/l konsentraatiossa 24 tunnin altistumisen jälkeen sekä 150 mg/l konsentraatiossa 48 tunnin altistumisen jälkeen. Balbuena ym. 2015 havaitsivat glyfosaatin heikentävän tarhamehiläisten (*Apis mellifera*) älyllistä kyvykkyyttä, mikä vaikeutti niiden takaisin pesään löytämistä (Balbuena ym. 2015).

Gill ym. (2018) raportoivat glyfosaatin vaikuttavan selkärangattomien eläinten lisäksi myös useisiin selkärangattomiin eläinlajeihin. Vaikutuksia on tutkittu muun muassa leveäkuonokaimaaneilla, hopeamonneilla, rotilla, ihmisillä ja useilla eri lintulajeilla (Gill ym. 2018). Glyfosaatin pitkäaikaisia vaikutuksia wistar-rottiin tutkittiin altistamalla rotat 2 kuukauden ajaksi kahdelle eri pitoisuudelle glyfosaattia. Määrät vastasivat 14,4 ja 375 mg/kg rottien ruumiinpainosta. Suuremmalle pitoisuudelle altistetuilla rotilla havaittiin vakavia terveysongelmia, kuten limakalvon sekä maksan solujen hajoamista, hiussuonikerästen rappeutumista sekä pernan ja haiman vahingoittumista (Tizhe ym. 2014).

Ihmiset altistuvat glyfosaatille ruuassa olevien glyfosaattijäämien vuoksi. Glyfosaatin vaikutuksia ihmisten terveyteen on tutkittu useassa eri tutkimuksessa (Gill ym. 2018). Ihmisillä glyfosaatin on todettu aiheuttavan geno- ja sytotoksisia vaikutuksia, poikkeamia tumassa, hormonitoiminnan häiriöitä, kromosomaalisia poikkeamia sekä DNA-vaurioita (Gill ym. 2018). Koller ym. (2012) tutkivat glyfosaatin vaikutuksia ihmisten posken limakalvojen epiteelikudokseen (TR146). Tutkimuksessa koeryhmä oli altistettu usealle eri pitoisuudelle glyfosaattia (10–200 mg/l) hengityksen kautta 20 minuutin ajan. Tutkimus osoitti, että glyfosaatti vahingoitti epiteelikudosta ja vähensi mitokondrioiden toimintaa.

Useilla eri lintulajeilla, kuten punaolkaturpiaalilla (*Agelaius phoeniceus*), keltahupputurpiaalilla (*Xanthocephalus xanthocephalus*) ja suopeukaloisella (*Cistothorus palustris*), tehdyssä tutkimuksissa havaittiin, että glyfosaatin levittäminen maastoon vähensi alueen lintupopulaatiota vielä kahden vuoden kuluttua (Linz ym. 1996). Oliveira ym. (2007) havaitsivat, että glyfosaatti vahingoitti koirassinisorsien (*Anas platyrhynchos*) sukuelimiä, mikä vaikutti niiden lisääntymiseen. Ruuskanen ym. (2020a) tutkivat glyfosaatin vaikutuksia japaninviiriäiseen (*Coturnix japonica*). Japaninviiriäisille syötettiin glyfosaattia sisältävää rehua (160 mg/kg) 10 päivän ikäisestä 12 kuukauden ikäiseksi. Glyfosaatin huomattiin viivästyttävän höyhenpiteen kehittymistä. Lisäksi glyfosaatin jäämiä löytyi munista, lihaksista ja maksasta (Ruuskanen ym. 2020a).



Toisessa tutkimuksessa Ruuskanen ym. (2020b) havaitsivat, että glyfosaatti (160 mg/kg, 10 päivästä 52 viikkoon) vaikutti suolistomikrobiomin koostumukseen. Vaikutuksia huomattiin etenkin nuorilla yksilöillä sekä naarilla. Glyfosaatin havaittiin myös laskevan koiraiden testosteronitasoja, mutta ei vaikuttavan merkitsevästi lisääntymiseen (Ruuskanen ym. 2020b).

Glyfosaatilla on havaittu olevan vaikutusta myös immuunipuolustukseen (Peillex & Pelletier 2020). Immuunipuolustuksen tehtävänä on suojella isäntäeläintä ympäristöstä tulevilta erilaisilta taudinaiheuttajilta (Chaplin 2006). Hyvän immuunipuolustuksen on huomattu parantavan kelpoisuutta luonnonpopulaatioissa (Bowers ym. 2014). Immuunipuolustus voidaan jakaa synnynnäiseen ja hankittuun puolustukseen. Immuunipuolustukseen osallistuu erilaisia lymfosyyttejä, joiden Chaplin (2006) kertoo jakautuvan T-soluihin ja B-soluihin. T-solujen päätehtävänä on tunnistaa ja hajottaa taudinaiheuttajien infektoimia soluja. B-solut puolestaan valmistavat vasta-aineita eli immunoglobuliineja (Ig), jotka sitoutuvat taudinaiheuttajiin (Chaplin 2006). Osa vasta-aineista ei tarvitse muodostuakseen aikaisempaa altistusta tietylle taudinaiheuttajalle. Näitä vasta-aineita kutsutaan luonnollisiksi vasta-aineiksi (NAbs) (Matson ym. 2005). Komplementtijärjestelmä on immuunipuolustukseen osallistuva efektorireitti, joka toimii yhteistyössä varsinkin vasta-aineiden kanssa (Chaplin 2006).

Leveäkuonokaimaaneilla (*Caiman latirostis*) tehdyssä kokeessa niitä altistettiin kahden kuukauden ajan Roundup-kauppavalmisteelle kahdella eri pitoisuudella. Tarkasteluajan jälkeen tutkittavilla yksilöillä havaittiin komplementtijärjestelmän aktiivisuuden aleneminen sekä heterofiilien ja lymfosyyttien määrän väheneminen (Siroski ym. 2016). Kiinanvillasaksiravuilla (*Eriocheir sinensis*) tehdyssä tutkimuksessa glyfosaatin huomattiin vaikuttavan immuunipuolustukseen usealla eri tavalla. Se vaikutti hemosyyttien määrään, fagosytoosiin, immunitettiin vaikuttavien entsyymien aktiivisuuteen ja aiheutti hemosyyttien DNA-vaurioita (Hong ym. 2017). Kreutz ym. (2011) tutkivat glyfosaatin vaikutusta hopeamonnien

(*Rhamdia quelen*) immuunipuolustukseen. Hopeamonnit altistettiin 24 tunnin tai 10 päivän ajaksi glyfosaattipitoisuudelle, joka vastasi 0,730 mg/l pitoisuutta vedestä. Havaittiin, että 24 tunnin altistus vähensi verinäytteisiin lisättyjen bakteerien sakkaantumista. Glyfosaatti aiheutti kalanpoikasissa 10 päivän altistuksen aikana myös lysotsyymien aktiivisuuden vähenemistä. Glyfosaatti ei vaikuttanut komplementin hemolyyttiseen aktiivisuuteen eikä bakteerien kuolleisuuteen (Kreutz ym. 2011).

On havaittu, että glyfosaatin hajoamistuote AMPA lisää ihmisten lymfosyyttien kromosomien epätavallista muuntelua (0,1 ja 0,9 mM) (Mañas ym. 2009). Glyfosaatin vaikutuksesta kromosomeihin ei ole varmaa tietoa, sillä Mañas ym. (2009) eivät havainneet vaikutuksia, kun taas Santovito ym. (2018) havaitsivat glyfosaatin vaikuttavan pitoisuudesta riippuen (pitoisuuksissa 0,05–0,5 µg/ml). Mladinic ym. (2009) huomasivat glyfosaatin suuren pitoisuuden vaikuttavan myös lymfosyytteihin, joilla se on lisännyt apoptoosia ja nekroosia. Mladinic ym. (2009) eivät löytäneet vaikutusta DNA:n hapettumiseen.

Vaikka glyfosaatin vaikutuksia eläimiin ja eläinten immuunipuolustukseen on tutkittu paljon, sen vaikutuksista lintuihin ja erityisesti lintujen immuunipuolustukseen tiedetään varsin vähän (Ruuskanen ym. 2020a). Tutkimuksen tavoitteena on selvittää, vaikuttaako ravinnon mukana elimistöön kulkeutunut glyfosaatti japaninviiriäisten immuunipuolustukseen. Tutkimme myös, onko vaikutus mahdollisesti erilainen eri ikäisillä linnuilla ja eri sukupuolilla. Glyfosaatin vaikutusta japaninviiriäisten immuunipuolustukseen tutkittiin hemolyysillä ja lysotsyymien aktiivisuuden mittauksella. Hypoteesi on, että glyfosaatti vaikuttaa negatiivisesti näihin immunoparametreihin, sillä glyfosaatilla on havaittu negatiivisia vaikutuksia myös muiden eläinten immuunipuolustukseen. Ruuskanen ym. (2020b) havaitsivat tutkimuksessaan, että glyfosaatti vaikutti japaninviiriäisten suolistomikrobiomiin, joka on yhteydessä immuunipuolustukseen. Tämä voi olla yksi tapa, jolla glyfosaatti vaikuttaa immuunipuolustukseen (Ruuskanen ym. 2020b).

## 2 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 2.1 Aineisto

Tutkimuksen kohteena on japaninviiriäinen (*Coturnix japonica*), joka valittiin kohde-eläimeksi, koska glyfosaatin vaikutuksia lintuihin on tutkittu vähän (Ruuskanen ym. 2020a). Japaninviiriäinen on myös yleisesti käytetty mallilaji, jonka genetiikasta ja fysiologiasta tiedetään runsaasti (Cheng ym. 2010). Japaninviiriäistä on helppo kasvattaa vankeudessa ja lintuja oli kasvatuksessa jo valmiiksi Turun yliopiston biologian laitoksella (dosentti M. Rainio, Turun yliopisto, suullinen tiedonanto). Japaninviiriäisellä tehdyistä tutkimuksista ja niiden tuloksista ei voi tehdä suoria yleistyksiä kaikkiin lintulajeihin, mutta japaninviiriäinen on hyvin samankaltainen kanan (*Gallus gallus domesticus*) kanssa, ja siksi hyvä mallilaji siipikarjalle (Cheng ym. 2010). Tutkimukset kanoilla sekä kalkkunoilla ovat kalliita, ja japaninviiriäinen on edullisempi koe-eläin (Wilson ym. 1961). Tuloksia voidaan myös soveltaa jonkin verran glyfosaattia syöviin villeihin lintulajeihin (Ruuskanen ym. 2020b).

Glyfosaatin vaikutusta japaninviiriäisen immuunipuolustukseen tutkitaan niistä vuonna 2018 otettujen verinäytteen avulla. Koeryhmän japaninviiriäisille on syötetty glyfosaattia noin 160 mg/kg rehua ravinnon seassa 10 päivän iästä lähtien. Annostus vastaa noin puolta siitä määrästä, joka on laskettu jyvistä glyfosaatin pellolle levittämisen jälkeen. Kontrolliryhmälle ei ole syötetty glyfosaattia. Yhteensä otoskoko oli 76 lintua ja ne olivat peräisin Turusta (Suomi). Lisätietoa kasvatusolosuhteista löytyy lähdeviitteen artikkelista (Ruuskanen ym. 2020b).

Näytteistä on erotettu veri plasma sentrifugoimalla, jonka jälkeen plasma on pakastettu. Koe suoritettiin aluehallintoviraston koe-eläinlautakunnalta haettujen lupien (ESAVI/7225/04.10.07/2017) mukaisesti (Ruuskanen ym. 2020b). Tutkimukseen valittiin plasmanäytteet, jotka ovat otettu 3, 10, 20, 23 ja 35 viikon ikäisistä japaninviiriäisistä. Tutkimukseen valittiin eri ikäisiä japaninviiriäisiä, jotta saadaan tutkittua glyfosaatin vaikutusta erilaisilla altistusajoilla. Tutkimuksen

kahteen eri mittaukseen käytetyt plasmanäytteet ovat osittain peräisin samoilta linnuilta.

## 2.2 Menetelmät

### 2.2.1 Lysotsyymien aktiivisuuden mittaaminen

Lysotsyymien aktiivisuutta japaninviiriäisen veri-plasmassa mitattiin turbidimetrisellä menetelmällä, jossa tarkkailtiin, kuinka nopeasti plasmassa oleva lysotsyymi-entsyymi hajotti näytteeseen lisätyn *Micrococcus lysodeikticus* -bakteerin soluseinää. Soluseinän hajoaminen havaittiin *Micrococcus*-liuoksen kirkastumisena ja absorbanssin muutoksena 450 nm aallonpituudella (Ruuskanen ym. 2011). Lysotsyymien aktiivisuuden mittaaminen suoritettiin 3, 20 ja 35 viikon ikäisten japaninviiriäisten plasmanäytteille ja jokainen näyte mitattiin duplikaattina eli kahtena rinnakkaiskappaleena. Mittaukseen päätyneitä yksilöitä oli kaiken kaikkiaan 48, joista 22 oli koiraita ja 26 naaraita. Yksilöistä 24 kuului kontrolliryhmään ja 24 glyfosaattiryhmään. Työ suoritettiin jokaiselle yksilölle kaikissa kolmessa aikapisteessä.

Ensin protokollaa testattiin erilaisilla bakteerisuspensiolaimennoksilla, joiden pitoisuudet olivat 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml ja 0,1 mg/ml. Kuvaajista saatujen tuloksien perusteella valittiin bakteerikonsentraatioksi 0,5 mg/ml. Aluksi valmistettiin 1 mg/ml bakteerisolususpensio (*Micrococcus lysodeikticus*, Sigma-Aldrich, Missouri, Yhdysvallat), joka laimennettiin 0,5 mg/ml. Näytteet ja ylimääräiset levykontrollit käytettävät näytteet sulatettiin jäällä. Levykontrollia varten yhdistettiin kuusi näytettä ja samaa kontrollia käytettiin kaikissa absorbanssimittauksissa. Levykontrolleja pipetoitiin kahteen kaivoon 10 µl/kaivo neljälle kirkaalle, tasapohjaiselle 96-kuoppalevyille (Sarstedt, North Carolina, Yhdysvallat). Näytteet lisättiin myös levyille duplikaatteina 10 µl per kaivo. Näytteisiin ja levykontrolleihin lisättiin 100 µl 0,5 mg/ml bakteerisuspensiota. Kuoppalevy siirrettiin välittömästi kuoppalevynlukijaan. Bakteerin lisäämisen

jälkeen kuoppalevyä sekoitettiin ja absorbanssin muutosta mitattiin 30 min ajan 450 nm aallonpituudella VICTOR x4 -kuoppalevynlukijalla (Perkin Elmer, Massachusetts, Yhdysvallat). Absorbanssin arvoja mitattiin 30 min ajan noin 1,5 min välein.

Mittaustuloksista piirrettiin kuvaajat, joissa esitettiin yhden näytteen molempien duplikaattien absorbanssin muutos ajan funktiona. Käyrien lineaarisesta välistä laskettiin absorbanssin muutos minuuttia kohden. Joitain näytteitä oli liian vähän tai plasmassa oli punasoluja, jolloin nämä näytteet hylättiin. Jokaiselle duplikaattiparille laskettiin keskiarvo ja keskihajonta. Näiden avulla laskettiin variaatiokerroin (CV) yhtälöllä

$$CV = \frac{S}{\bar{x}}, \quad (1)$$

jossa  $\bar{x}$  = keskiarvo ja  $S$  = keskihajonta.

Tuloksista hylättiin ne näytteet, joiden duplikaattien variaatiokerroin oli yli 18 %.

### 2.2.2 Hemolyysi

Hemolyysissä tutkittiin, miten japaninviiriäisen immuunipuolustus reagoi toisen lajin veren antigeeneihin. Tätä tutkittiin lisäämällä kanin verilaimennosta japaninviiriäisten laimennettuihin plasmanäytteisiin. Hemolyysi perustuu japaninviiriäisten plasman NAb:sien ja komplementtijärjestelmän toimintaan. Matson ym. (2005) kertovat, että NAb:sit ja komplementit toimivat veressä hajottamalla tai sakkaannuttamalla keholle vieraita soluja. NAb:sien ja komplementtien pitoisuus veressä antaa viitteitä immuunipuolustuksen tehosta. Matson ym. (2005) osoittivat tutkimuksessaan, että laimentamalla verinäytettä tarpeeksi NAb:sien ja komplementtien pitoisuus näytteissä ei riitä hajottamaan tai sakkaannuttamaan verinäytettä.

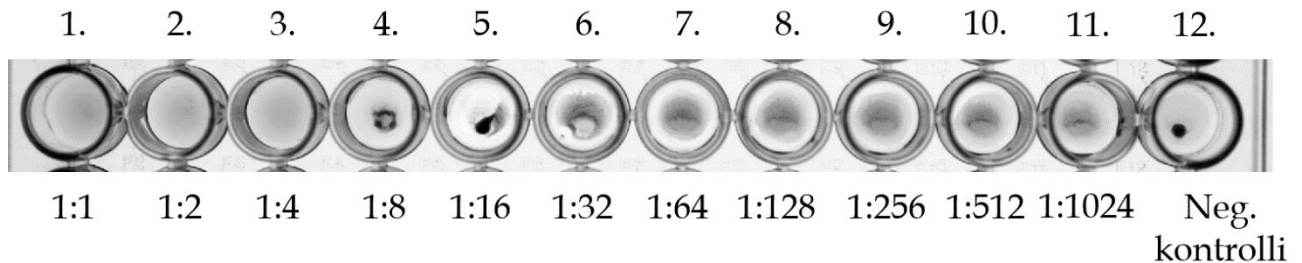
Hemolyysi suoritettiin 10 ja 23 viikkoisten yksilöiden plasmanäytteillä. Lintuja oli yhteensä 44, joista koiraita oli 20 ja naaraita 24. Näistä 18 kuului kontrolliryhmään ja 26 glyfosaattiryhmään.

Ensin valmistettiin 1 % kaninverilaimennos. Pipetoitiin 2 ml kaninverta (50 % verta, 50 % Alsevers, TSC Biosciences, Buckinghamshire, UK) putkeen ja sentrifugoitiin 300xg 5 min RT, (SL 16R Centrifuge, Thermo Scientific, Massachusetts, Yhdysvallat). Supernatantti poistettiin ja pestiin neljä kertaa fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS). Suspensio liuotettiin 2 ml PBS. Mitattiin hematokriitti, joka oli noin 5 %. Se laimennettiin lopputilavuuteen 10 ml, jossa hematokriitti oli 1 %. Valmisteltiin yhteensä 11 levyä, joihin käytettiin u-pohjaisia, kirkkaita 96-kuoppalevyjä (Sarstedt, North Carolina, Yhdysvallat). Tyhjät levyt peitettiin pipetoinnin aikana paperilla kontaminaation vähentämiseksi. Kaivoihin 2-12 pipetoitiin 12,5 µl PBS:ää ja kaivoihin 1-2 pipetoitiin molempiin 12,5 µl samaa plasmanäytettä. Toisesta kaivosta suoritettiin 1:2 laimennossarja kaivoon 11 asti. Kaikkiin kaivoihin pipetoitiin 12,5 µl kaninverilaimennosta. Ennen veren lisäämistä veri sekoitettiin vorteksoimalla (Vortex MIXER, Labnet International, New Jersey, Yhdysvallat) huolellisesti. Kanin veren lisäämisen jälkeen näytteitä sekoitettiin pipetoimalla edestakaisin.

Levyjen päälle asetettiin parafilmi (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Yhdysvallat), vorteksoitiin varovasti ja näytelevyt inkuboitiin 37 °C 90 min lämpökaapissa (Termaks AS, Bergen, Norway). Tämän jälkeen levyt asetettiin 45 ° kulmaan ja inkuboitiin huoneenlämmössä (room temperature, RT) 20 min. Levyt kuvattiin ChemiDoc MP Imaging System tasoskannerilla (Bio-Rad, Kalifornia, Yhdysvallat).

Näytteiden ilmakuplat puhkottiin neulalla. Plasmanäytteitä inkuboitiin RT 70 min, jonka jälkeen ne kuvattiin uudestaan. Tämän jälkeen näytteitä inkuboitiin vielä RT 22 h ja kuvattiin vielä kolmannen kerran. Lopulliset tulokset saatiin kolmannesta kuvauksesta. Skannatuista kuvista näytteille annettiin pisteet sen mukaan, kuinka

laimeassa plasmanäytteessä kanin veressä olevat punasolut hajoavat tai sakkaantuvat. Lyysis-piste annettiin viimeisen kaivon mukaan, jossa näyte on hajonnut. Agglutinaatio-piste annettiin viimeisen kaivon mukaan, jossa näyte on sakkaantunut. Kuvassa 1 on esitetty esimerkki pisteytyksestä.



Kuva 1. Esimerkki hemolyysinäytteen pisteytyksestä. Tälle näytteelle annettiin lyysis-arvo 3 ja agglutinaatioarvo 11. Luvut kuvan alla kuvaavat plasman konsentraatiota ennen kanin veren lisäämistä. Kuvan yläpuolella olevat luvut kertovat kaivon numeron, jonka pohjalta pisteytys tehtiin.

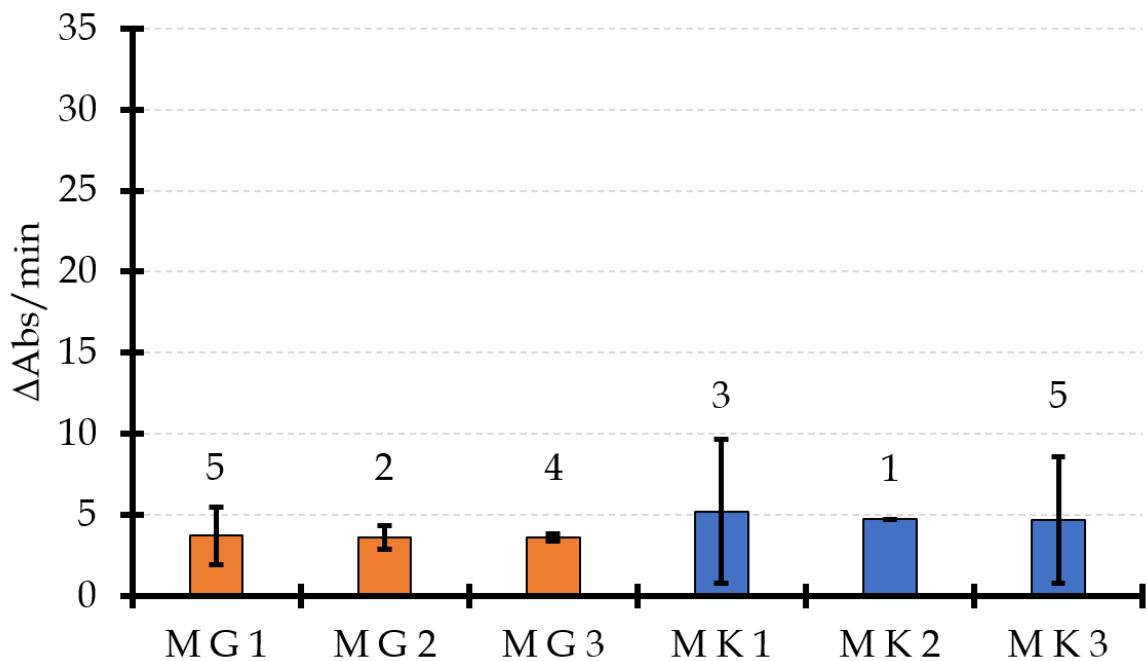
Kuvat rajattiin ja niiden järjestys satunnaistettiin, jotta pisteyttäjä ei voinut tietää, mikä näyte oli kyseessä. Molemmat tutkielman kirjoittajat antoivat näytteille lyysis- ja agglutinaatiopisteet, joista laskettiin keskiarvot.

Tulosten välisten erojen merkitsevyyttä tarkasteltiin Studentin t-testillä Excel -taulukkolaskentaohjelmalla (versio 2110). T-testien tuloksia on esitetty Tulokset- osiossa. Tilastollisen merkitsevyyden rajaksi valittiin P-arvo 0,05.

## 3 TULOKSET

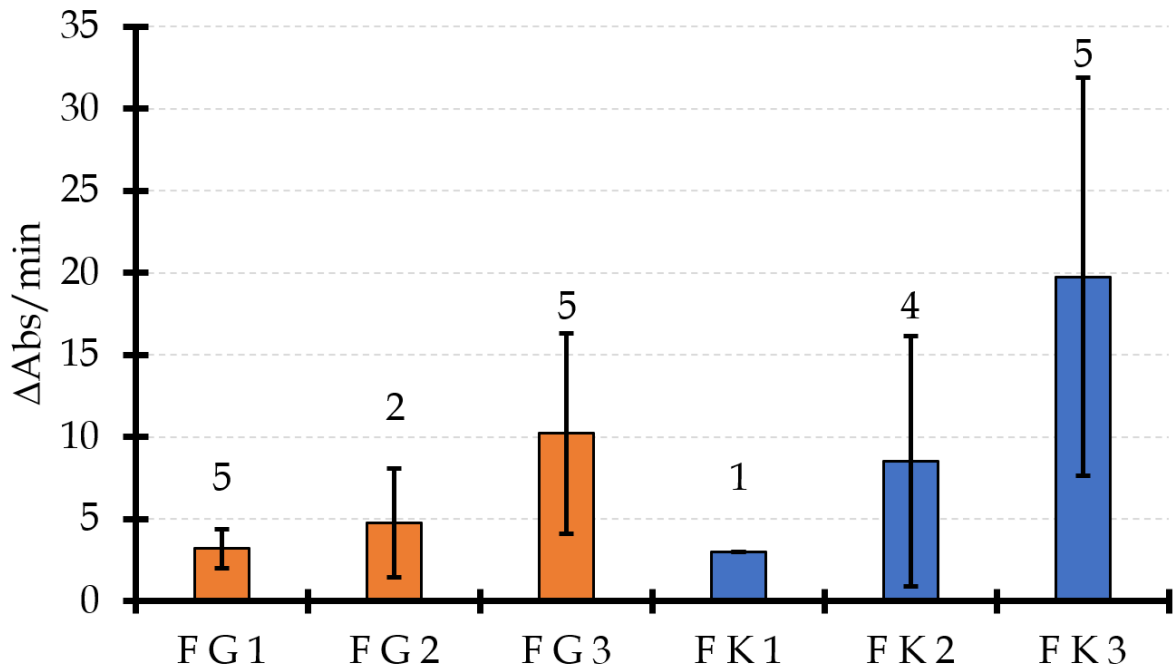
### 3.1 Lysotsyymin aktiivisuuden mittaus

Glyfosaattialtistuksen ei havaittu vaikuttavan merkittävästi lysotsyymin aktiivisuuteen japaninviiriäisuroksilla (Kuva 2) eikä japaninviiriäisnaarailta (Kuva 3). Tilastollisessa analyysissä havaittiin, että glyfosaatti- ja kontrolliryhmän lysotsyymin aktiivisuuserot eivät olleet merkittäviä yhdenkään osajoukon välillä (Taulukko 1).



Kuva 2. Lysotsyymin aktiivisuuden keskiarvoja eri koirasryhmille. M = koiras, G = glyfosaattiryhmä, K = kontrolliryhmä. Numerot 1, 2 ja 3 tarkoittavat aikapisteitä 3 viikkoa, 20 viikkoa ja 35 viikkoa. Virhepalkeissa on esitetty keskihajonta ja luvut palkkien päällä kertovat otoskoon, josta keskiarvo on laskettu.





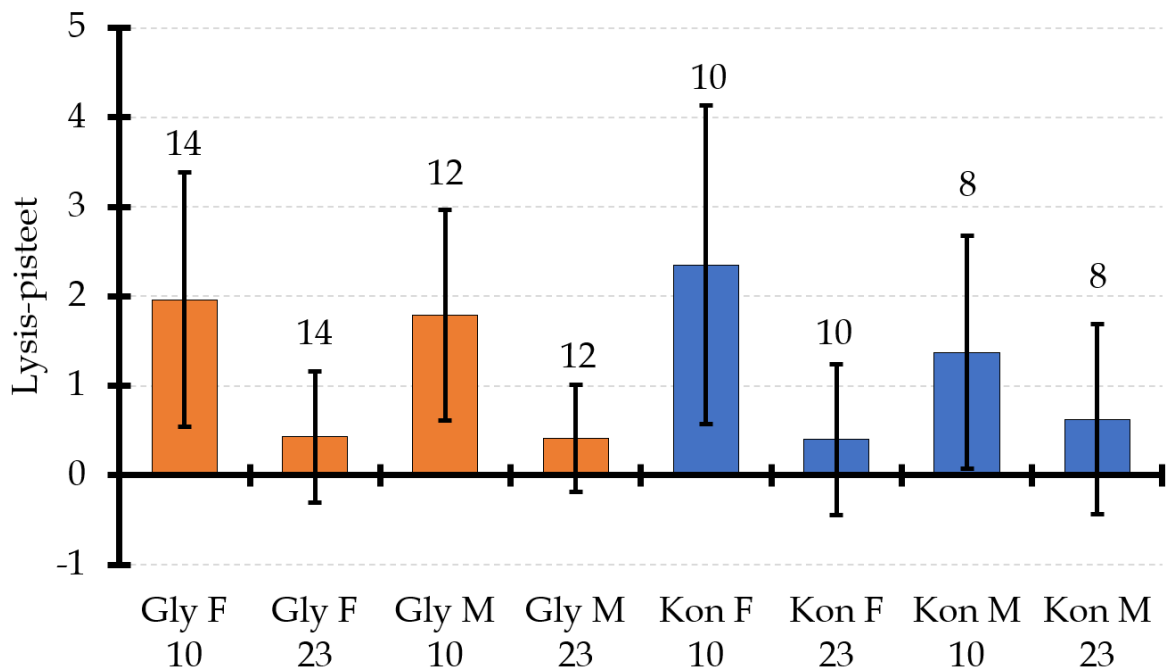
Kuva 3. Lysosyymin aktiivisuuden keskiarvoja eri naarasryhmille. F = naaras, G = glyfosaattiryhmä, K = kontrolliryhmä. Numerot 1, 2 ja 3 tarkoittavat aikapisteitä 3 viikkoa, 20 viikkoa ja 35 viikkoa. Virhepalkeissa on esitetty keskihajonta ja luvut palkkien päällä kertovat otoskoon, josta keskiarvo on laskettu.

Taulukko 1. Eri osajoukkojen välille tehdyistä t-testeistä saatuja tuloksia sekä vertailtujen ryhmien otoskoot ja keskiarvot. Gly = glyfosaattiryhmä, Kon = kontrolliryhmä.

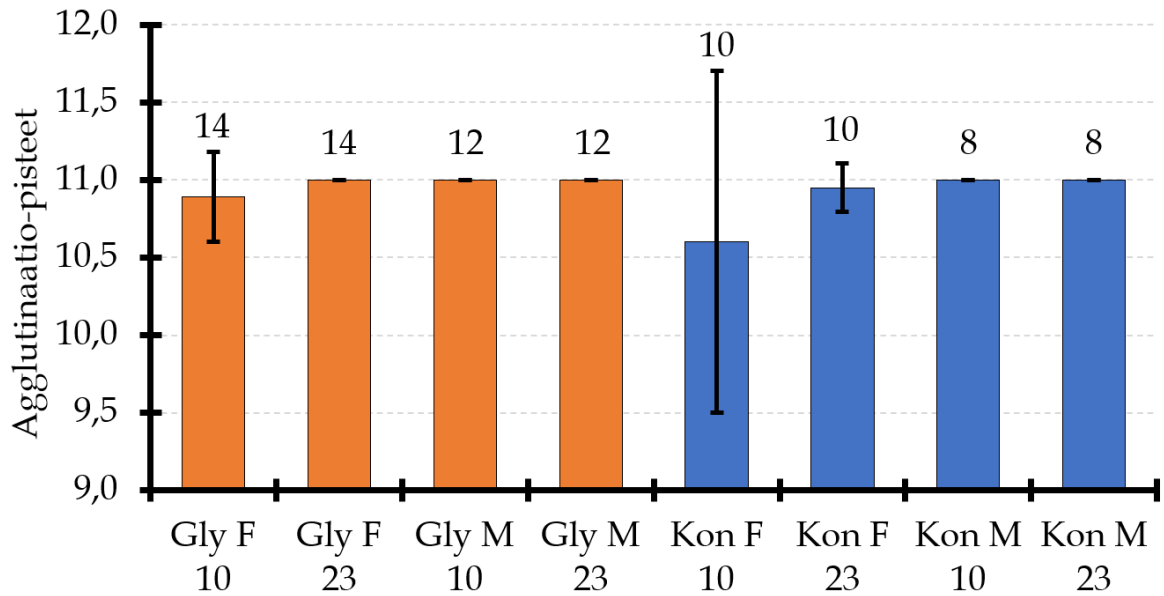
Vertailtavat osajoukot [otoskoko]	Keskiarvot (ΔAbs/min)	T-testin tulos
Gly [23] / Kon [19]	5,073 / 9,455	0,0513
Gly naaras [12] / Kon naaras [10]	6,386 / 13,584	0,0633
Gly koiras [11] / Kon koiras [9]	3,640 / 4,868	0,2938
Gly 3vk [10] / Kon 3vk [4]	3,451 / 4,659	0,3877
Gly 20vk [4] / Kon 20vk [5]	4,172 / 7,752	0,3495
Gly 35vk [9] / Kon 35vk [10]	7,276 / 12,225	0,2616
Naaras [22] / Koiras [20]	9,658 / 4,193	0,0133

### 3.2 Hemolyysi

Havaittiin, että glyfosaattialtistus ei vaikuttanut merkitsevästi komplementin ja luontaisten vasta-aineiden toimintaan (Kuvat 4 ja 5). Tilastollisessa analyysissä havaittiin, että glyfosaatti- ja kontrolliryhmän lyysis ja agglutinaatioerot eivät olleet merkitseviä yhdenkään osajoukon välillä (Taulukko 2).



Kuva 4. Eri ryhmille annetut lyysispisteiden keskiarvot virheineen. Gly = glyfosaattiryhmä, Kon = kontrolliryhmä, M = koiras, F = Naaras ja 10 / 23 = 10 tai 23 viikon ikäinen yksilö. Virhepalkeissa on esitetty keskihajonta ja luvut palkkien päällä kuvaavat otoskokoja, josta keskiarvo on laskettu.



Kuva 5. Eri ryhmille annetut agglutinaatiopisteiden keskiarvot virheineen. Gly = glyfosaattiryhmä, Kon = kontrolliryhmä, M = koiras, F = naaras ja 10 / 23 = 10 tai 23 viikoinen yksilö. Virhepalkeissa on esitetty keskihajonta ja luvut palkkien päällä kuvaavat otoskokoja, josta keskiarvo on laskettu.

Taulukko 2. Eri osajoukkojen välillä tehdyistä t-testeistä saatuja tuloksia sekä vertailtujen ryhmien otoskoot ja keskiarvot. Gly = glyfosaattiryhmä, Kon = kontrolliryhmä.

Vertailtavat osajoukot [otoskoko]	Keskiarvot (lyysis-pisteet)	T-testin tulos
Gly [52] / Kon [36]	1,154 / 1,208	0,8531
Gly naaras [28] / Kon naaras [20]	1,196 / 1,375	0,6863
Gly koiras [24] / Kon koiras [16]	1,104 / 1,000	0,7851
Gly 10vk [26] / Kon 10vk [18]	1,885 / 1,917	0,9422
Gly 23vk [26] / Kon 23vk [18]	0,423 / 0,500	0,7483
10vk [44] / 23vk [44]	1,898 / 0,455	$5,9011 \cdot 10^{-8}$

## 4 TULOSTEN TARKASTELU

### 4.1 Lysotsyymien aktiivisuuden mittaus

Lysotsyymien aktiivisuutta seurattiin lisäämällä näytteisiin bakteerisuspensiota ja mittaamalla niiden absorbanssin muutosta. Koe- ja kontrolliryhmien keskiarvojen välillä oli huomattava ero, mutta ryhmien sisäiset keskihajonnat olivat erittäin suuria. Tämän takia niiden välillä ei havaittu tilastollisesti merkittävää eroa, vaikka t-testillä saatu P-arvo (0,0513) olikin aivan päätetyn tilastollisen merkitsevyyden (0,05) rajalla. Erot voivat johtua osittain myös lopullisten otoskokojen epätasaisuudesta. Levykontrollien väliset erot olivat huomattavia, mikä kertoo vaihtelusta myös levyjen välillä.

Joissakin näytteissä absorbanssi nousi mittauksen aikana, mikä voi olla yksi syy suuriin keskihajontoihin kontrolliryhmällä. Bakteerien hajoaminen lysotsyymien vaikutuksesta laskee absorbanssia. Sama ilmiö huomattiin myös kaivoissa, joissa ei ollut lainkaan plasmaa. Absorbanssin nousu plasmaa sisältävissä näytteissä voi johtua siitä, että reaktio oli tapahtunut ennen mittauksen alkua tai sitä ei tapahtunut lainkaan. Absorbanssin nousu mittauksen aikana tuotti negatiivisia tuloksia, joilla on suuri vaikutus ryhmiensä keskiarvoihin.

Otoskoko lopullisissa tuloksissa oli noin 30 % alkuperäisistä näytteistä, mikä osittain selittää ryhmien sisäisiä suuria keskihajontoja. Lopullisiin tuloksiin otettiin huomioon vain pieni osa kaikista näytteistä, sillä suurimmassa osassa duplikaattien välinen variaatiokerroin oli liian suuri. Tuloksissa otettiin huomioon vain näytteet, joiden duplikaattien välinen CV oli alle 18 %. Tämä variaatiokertoimen raja valittiin, jotta saatiin edes noin 30 % näytteistä mukaan tuloksiin. Näytteiden hylkääminen vaikutti myös eri ryhmien otoskokojen välisiin eroihin ja joillakin ryhmillä lopullinen otoskoko oli vain yksi. Koiraiden ja naaraiden välinen suhde oli epätasainen jo alkuperäisessä otoksessa, sillä koiraita oli 22 ja naaraita 26. Osassa näytteitä toinen duplikaatti jouduttiin hylkäämään esimerkiksi sen takia, että

näytettä oli liian vähän tai plasma oli liian punaista. Näissä tapauksissa lopullinen tulos perustui vain yhteen duplikaattiin.

Absorbanssin mittaus on herkkä virheille, mikä voi osittain selittää duplikaattien välisiä eroja. Virheitä voivat aiheuttaa esimerkiksi erilaiset epäpuhtaudet näytteessä ja kuoppalevyssä. Plasmanäytteet ovat herkkiä eikä niitä sen vuoksi voinut sekoittaa tarpeeksi. Lysotsyymi on saattanut olla epätasaisesti jakautuneena näytteessä, mikä voi osittain selittää eroja duplikaattien välillä. Kahteen kuoppalevyyn ei riittänyt kansia, mikä altisti näytteet mahdollisille kontaminaatioille mittauksien välisenä aikana. Bakterisuspension pipetointi suoritettiin monikanavapipetillä melko nopeasti, sillä mittaus oli aloitettava välittömästi bakterisuspension lisäyksen jälkeen. Tämä on saattanut aiheuttaa suuremman mahdollisuuden pipetointivirheille.

Toisen ja kolmannen aikapisteen naarailla oli huomattavasti korkeampi absorbanssi muihin ryhmiin verrattuna. Tämä voi liittyä siihen, että vanhemmat naaraat ovat sukukypsiä. Muniminen voi selittää eroa vanhempien ja nuorempien naaraiden plasmanäytteiden välillä.

Tulokset eivät ole yhteneväisiä muilla lajeilla tehtyjen aikaisempien tutkimusten kanssa, sillä glyfosaatin ei havaittu vaikuttavan lysotsyymin aktiivisuuteen. Muissa tutkimuksissa glyfosaatille altistuminen heikensi tutkittavan lajin immuunipuolustusta (Gill ym. 2018). Kreutz ym. (2011) havaitsivat, että glyfosaatti laski hopeamonnien lysotsyymin aktiivisuutta 10 viikon ikäisillä yksilöillä. Tämän lisäksi kiinanvillasaksiravuilla tehdyssä tutkimuksessa glyfosaatin huomattiin vähentävän immuniteettiä vaikuttavien entsyymien aktiivisuutta (Hong ym. 2017).

## **4.2 Hemolyysi**

Hemolyysissä tarkasteltiin plasman vasta-aineiden vaikutusta lisätyn vieraan veren antigeeneihin. Kokeessa seurattiin, missä näytepitoisuuksissa lisätty veri sakkaantui tai verisolut hajosivat. Tulosten analysoinnissa keskityttiin

lyyispisteisiin, sillä agglutinaatiopisteet olivat samanlaisia kaikkien ryhmien välillä. Kontrolli- ja koeryhmän tai sukupuolten välillä ei havaittu tilastollisesti merkittävää eroa. Sekä kontrolli- että koeryhmissä havaittiin merkitsevä ero 10 ja 23 viikkoisten yksilöiden välillä.

Tuloksiin tulee suhtautua varovaisesti, sillä pisteytykset perustuvat silmämääräiseen arviointiin. Molemmat tutkielman tekijät pisteyttivät kaikki näytteet, joiden keskiarvoa käytettiin lopullisten tulosten laskemiseen. Pisteytysten välillä oli jonkin verran hajontaa. Lyyispisteiden keskihajontojen keskiarvo oli 0,091 ja agglutinaatiopisteiden 0,051. Keskihajonnat osoittavat, että käytetty metodi ei ole täysin objektiivinen ja pisteytyksen toistettavuus on huono.

Käytössä oli vain yksi kuoppalevykansi, joten tyhjät levyt peitettiin paperilla näytelevyjen valmistelun ajaksi. Tämä on saattanut aiheuttaa näytteiden kontaminaatiota. Tämän lisäksi pipetointivirhettä on voinut lisätä pipetointitilavuuksiin vaikuttaneet ilmakuplat. Viimeiset kuvat levyistä otettiin 22 tuntia levyjen valmistelun jälkeen. On mahdollista, että lyyysis olisi voinut tapahtua pienemmissä pitoisuuksissa, jos inkubaatioaikaa olisi pidennetty. Näytekaivoissa oli paljon ilmakuplia, joten ne puhkottiin ennen skannausta kuvien laadun parantamiseksi. Tähän käytettiin yhtä neulaa levyä kohden, mikä on saattanut aiheuttaa kontaminaatiota ja pieniä pitoisuusmuutoksia.

Hemolyysin tulokset eivät antaneet viitteitä siitä, että glyfosaatti vaikuttaisi komplementtien ja NAbsien toimintaan. Aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu, että glyfosaatti laskee immuunipuolustuksen tehoa (Gill ym. 2018). Tämän tutkimuksen tulokset eivät siis vastaa aikaisempien tutkimusten tuloksia. On mahdollista, että glyfosaatin annostus tai altistusaika ei ollut riittävä suuri aiheuttamaan eroa koe- ja kontrolliryhmän välillä. Glyfosaatin vaikutusta japaninviiriäisiin on kuitenkin tutkittu aikaisemmin samalla populaatiolla, annostuksella sekä altistusajalla, jolloin havaittiin vaikutuksia esimerkiksi koiraiden testosteronitasoihin sekä suolistomikrobiomin koostumukseen (Ruuskanen ym. 2020b).

Lisäksi huomattiin, että 10 viikkoisilla yksilöillä lyysispisteet olivat huomattavasti korkeammat kuin 23 viikkoisilla yksilöillä. Tämä tarkoittaa, että nuoremmilla yksilöillä pienempi plasmapitoisuus riitti aiheuttamaan lyysisen, mikä antaa viitteitä tehokkaammasta immuunipuolustuksesta. Erolla ei kuitenkaan ollut yhteyttä glyfosaattialtistukseen. Matson ym. (2005) raportoivat, että kanoilla oli havaittu kehitys, jossa lyysisarvo oli matalampi nuoremmilla yksilöillä, nousi 12 viikon ikään saakka ja lopulta tasoittui. Tässä tutkimuksessa havaittu tulos on siis päinvastainen. Syy tälle on tuntematon, mutta erilaiset tulokset voivat johtua lajien välisistä eroista.

Aikaisempien tutkimusten tulosten perusteella hypoteesi oli, että glyfosaatti vaikuttaa negatiivisesti japaninviiriäisten immuunipuolustukseen. Glyfosaatin ei kuitenkaan havaittu vaikuttavan kumpaankaan testattuun parametriin, joten hypoteesi hylättiin. Lisäksi glyfosaatin ei havaittu vaikuttavan kumpaankaan parametriin saman sukupuolen tai samojen aikapisteiden välillä. Tuloksien pohjalta ei voi tehdä liian suuria yleistyksiä, sillä virhelähteitä oli paljon, otoskoot olivat pieniä ja toistettavuus oli huono. Glyfosaatin vaikutusta lintujen immuunipuolustukseen täytyy tutkia enemmän erilaisilla koeasetelmilla ja suuremmilla otosko'oilla.

## **KIITOKSET**

Kiitos ohjaajillemme Suvi Ruuskaselle ja Miia Rainiolle tuesta ja neuvoista tämän tutkielman suorittamiseksi sekä kiitos myös Marjo Helanderin tutkimusryhmälle kandidaattitutkielmamme rahoittamisesta. Tämän lisäksi olemme kiitollisia molempien kirjoittajien tasaisesta osallistumisesta LuK-työhön. Katsomme, että me molemmat ansaitsemme saman arvosanan LuK-tutkielmasta.

## KIRJALLISUUS

- Abhilash P.C. & Singh N. 2009. Pesticide use and application: An Indian scenario. *J Hazard Mater* 165: 1-12, doi:[https://doi-org.ezproxy.jyu.fi/10.1016/j.jhazmat.2008.10.061](https://doi.org.ezproxy.jyu.fi/10.1016/j.jhazmat.2008.10.061).
- Alberdi J.L., Sáenz M.E., Di Marzio W.D. & Tortorelli M.C. 1996. Comparative Acute Toxicity of Two Herbicides, Paraquat and Glyphosate, to *Daphnia magna* and *D. spinulata*. *Bull Environ Contam Toxicol* 57: 229-235, doi:10.1007/s001289900180.
- Balbuena M.S., Tison L.é, Hahn M., Greggers U., Menzel R. & Farina W.M. 2015. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *J Exp Biol* 218: 2799-2805, doi:10.1242/jeb.117291.
- Benbrook C. 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur* 28: 1-15, doi:10.1186/s12302-016-0070-0.
- Bowers E.K., Hodges C.J., Forsman A.M., Vogel L.A., Masters B.S., Johnson B.G.P., Johnson L.S., Thompson C.F. & Sakaluk S.K. 2014. Neonatal body condition, immune responsiveness, and hematocrit predict longevity in a wild bird population. *Ecology* 95: 3027-3034, doi:<https://doi.org/10.1890/14-0418.1>.
- Chaplin D.D. 2006. 1. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol* 117: S430-S435, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.09.034>.
- Cheng K.M., Bennett D.C. & Mills A.D. 2010. *The Japanese Quail*. : 655-673. <https://doi.org/10.1002/9781444318777.ch42>.
- Cuhra M., Traavik T. & Bøhn T. 2013. Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 22: 251-262, doi:10.1007/s10646-012-1021-1.
- Dill, G.M, Sammons D.R, Feng, P, Kohn, F, Kretzmer, K, Mehrsheikh, A, Bleeke, M, Honegger, J.L, Farmer, D, Wright, D, and Haupfear, E.A. 2010. *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds : History, Development, and Management*. John Wiley & Sons, Incorporated, Hoboken.
- Gill J., Sethi N., Sethi N., Mohan A., Mohan A., Datta S., Datta S., Girdhar M. & Girdhar M. 2018. Glyphosate toxicity for animals. *Environ Chem Lett* 16: 401-426, doi:10.1007/s10311-017-0689-0.
- Hong Y., Yang X., Yan G., Huang Y., Zuo F., Shen Y., Ding Y. & Cheng Y. 2017. Effects of glyphosate on immune responses and haemocyte DNA damage of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish & shellfish immunology* 71: 19-27, doi:10.1016/j.fsi.2017.09.062.



- Koller V.J., Fürhacker M., Nersesyan A., Mišík M., Eisenbauer M. & Knasmueller S. 2012. Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Arch Toxicol* 86: 805-813, doi:10.1007/s00204-012-0804-8.
- Kreutz L.C., Gil Barcellos L.J., de Faria Valle S., de Oliveira Silva T., Anziliero D., Davi dos Santos E., Pivato M. & Zanatta R. 2011. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. *Fish Shellfish Immunol* 30: 51-57, doi:10.1016/j.fsi.2010.09.012 [doi].
- Ledoux M.L., Hettiarachchy N., Yu X., Howard L. & Lee S. 2020. Penetration of glyphosate into the food supply and the incidental impact on the honey supply and bees. *Food control* 109: 106859, doi:10.1016/j.foodcont.2019.106859.
- Linz G.M., Blixt D.C., Bergman D.L. & Bleier W.J. 1996. Responses of Red-Winged Blackbirds, Yellow-Headed Blackbirds and Marsh Wrens to Glyphosate-Induced Alterations in Cattail Density (Respuesta de *Agelaius phoeniceus*, *Xanthocephalus xanthocephalus* y *Cistothorus palustris* a Alteración en la Densidad de Eneas Tratadas con Yerbicidas. *J Field Ornithol* 67: 167-176.
- Mañas F., Peralta L., Raviolo J., García Ovando H., Weyers A., Ugnia L., Gonzalez Cid M., Larripa I. & Gorla N. 2009. Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 834-837, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.09.019>.
- Matson K.D., Ricklefs R.E. & Klasing K.C. 2005. A hemolysis-hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. *Developmental and comparative immunology* 29: 275-286, doi:10.1016/j.dci.2004.07.006.
- Mladinic M., Berend S., Vrdoljak A.L., Kopjar N., Radic B. & Zeljezic D. 2009. Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes in vitro. *Environ Mol Mutagen* 50: 800-807, doi:<https://doi.org/10.1002/em.20495>.
- Oliveira A.G., Telles L.F., Hess R.A., Mahecha G.A.B. & Oliveira C.A. 2007. Effects of the herbicide Roundup on the epididymal region of drakes *Anas platyrhynchos*. *Reproductive Toxicology* 23: 182-191, doi:<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.11.004>.
- Peillex C. & Pelletier M. 2020. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *null* 17: 163-174, doi:10.1080/1547691X.2020.1804492.
- Piotrowski K.D. 2011. *Herbicides: Properties, Crop Protection, and Environmental Hazards*. Nova Science Publishers, Inc, New York.

- Ruuskanen S., Rainio M.J., Kuosmanen V., Laihonon M., Saikkonen K., Saloniemi I. & Helander M. 2020. Female Preference and Adverse Developmental Effects of Glyphosate-Based Herbicides on Ecologically Relevant Traits in Japanese Quails. *Environmental science & technology* 54: 1128-1135, doi:10.1021/acs.est.9b07331. (a)
- Ruuskanen S., Rainio M.J., Gómez-Gallego C., Selenius O., Salminen S., Collado M.C., Saikkonen K., Saloniemi I. & Helander M. 2020. Glyphosate-based herbicides influence antioxidants, reproductive hormones and gut microbiome but not reproduction: A long-term experiment in an avian model. *Environmental Pollution* 266: 115108, doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115108>. (b)
- Ruuskanen S., Siitari H., Eeva T., Belskii E., Järvinen A., Kerimov A., Krams I., Moreno J., Morosinotto C., Mänd R., Möstl E., Orell M., Qvarnström A., Salminen J.P., Slater F.M., Tilgar V., Visser M.E., Winkel W., Zang H. & Laaksonen T. 2011. Geographical variation in egg mass and egg content in a passerine bird. *PloS one* 6: e25360, doi:10.1371/journal.pone.0025360.
- Santovito A., Ruberto S., Gendusa C. & Cervella P. 2018. In vitro evaluation of genomic damage induced by glyphosate on human lymphocytes. *Environmental Science and Pollution Research* 25: 34693-34700, doi:10.1007/s11356-018-3417-9.
- Singh S., Kumar V., Datta S., Wani A.B., Dhanjal D.S., Romero R. & Singh J. 2020. Glyphosate uptake, translocation, resistance emergence in crops, analytical monitoring, toxicity and degradation: a review. *Environmental chemistry letters* 18: 663-702, doi:10.1007/s10311-020-00969-z.
- Siroski P.A., Poletta G.L., Latorre M.A., Merchant M.E., Ortega H.H. & Mudry M.D. 2016. Immunotoxicity of commercial-mixed glyphosate in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Chem Biol Interact* 244: 64-70, doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.11.031>.
- Tizhe E.V., Ibrahim N.D., Fatihu M.Y., Onyebuchi I.I., George B.D., Jonathan, Ambali S.F. & Shallangwa J.M. 2014. Influence of zinc supplementation on histopathological changes in the stomach, liver, kidney, brain, pancreas and spleen during subchronic exposure of Wistar rats to glyphosate. *Comparative Clinical Pathology* 23: 1535-1543, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s00580-013-1818-1>.
- Wilson W.O., Abbott U.K. & Abplanalp H. 1961. Evaluation of Coturnix (Japanese Quail) as Pilot Animal for Poultry. *Poult Sci* 40: 651-657, doi:<https://doi.org/10.3382/ps.0400651>.