

KOETTUJEN LÄMPÖTILOJEN JA *PGI*-GENOTYYPIN
VAIKUTUS TÄPLÄVERKKOPERHOSEN (*MELITAEA CINXIA*)
LENTOON

ALMA OKSANEN

Pro gradu -tutkielma
Itä-Suomen yliopisto
Biologian laitos
2014

Dispersaali eli levittäytyminen uusille alueille on yksilöiden elämän keskeinen vaihe ja vaikuttaa populaatioiden sopeutumisessa ympäristöönsä. Perhosten tapauksessa paikasta toiseen liikkuminen tapahtuu lentäen. Dispersaalin lisäksi perhostet tarvitsevat lentoa jokapäiväisiin rutiinitoimintoihin ja elinkierron kriittisiin vaiheisiin kuten lisääntymiseen. Täpläverkkoperhosen (*Melitaea cinxia*) pirstoutuneessa maisemassa elävät populaatiot muodostavat klassisen metapopulaatorakenteen. Lajin populaatioita on seurattu Ahvenanmaalla pitkään ja sen populaatiodynamiikasta tiedetään paljon. Elinympäristön pirstoutuneisuuden vaikutus dispersaaliin on monimutkainen prosessi. Täpläverkkoperhosen liikkuvuuden on todettu vaihtelevan elinympäristölaikkujen koon, kytketyneisyyden sekä paikallispopulaation iän suhteen. Populaatioiden on todettu eroavan energia-aineenvaihduntaan vaikuttavan fosfoglukoosi-isomeraasi-entsyymin (PGI) eri muotojen suhteen. Yksi PGI-entsyymin muoto, jota koodaa *Pgi*-geenin f-alleeli (*Pgi-AC*) on yhteydessä parempaan lentokykyyn. Hyvät lentäjät ovat keskeisiä uusien paikallispopulaatioiden synnyssä jatkuvasti muutoksessa olevassa metapopulaatorakenteessa. Luonnossa perhostet elävät alati muuttuvissa ympäristöoloissa, joissa lämpötilanvaihtelut ovat keskeisessä osassa.

Täpläverkkoperhosilla on tutkittu lämpötilan ja *Pgi*-genotyypin yhteyttä lentoon. Eri *Pgi*-genotyyppien lentosuoritusten on todettu eroavan erilaisissa ympäristön lämpötiloissa. Täpläverkkoperhosen eri *Pgi*-genotyyppien lämpöherkkyyseroja on tutkittu myös aikaisemmin, mutta tässä kokeessa testattiin ensimmäistä kertaa ennen mittausta koetun lämpötilan vaikutusta lentoaineenvaihduntaan. Vastakuoriutuneet perhostet jaettiin kolmeen eri lämpötilakäsittelyyn (15, 24 ja 35°C), jossa ne viettivät kaksi vuorokautta ennen lentomittausta. Kymmenen minuutin pituisessa lentoaineenvaihduntamittauksessa mitattiin perhosen lennon aikana tuottama hiilidioksidimäärä, joka kuvaa hyvin perhosen lentokyvykkyyttä. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää lentävätkö perhostet genotyyppinsä olettamalla tavalla, vai onko lämpötilakäsittely johtanut muutoksiin perhosten lentoaineenvaihdunnassa kokeen aikana. Lisäksi osalla aineistosta tutkittiin uudelleenmittauksen vaikutusta lentosuoritukseen. Koska uudelleenmittaus suoritettiin eri lämpötilassa kun ensimmäinen mittaus, mahdollistui sekä mittauslämpötilan että toistomittauksen vaikutuksen tarkastelu.

Tulokset osoittivat, että ennen lentomittausta koetulla lämpötilakäsittelyllä on huomattava vaikutus täpläverkkoperhosen lentoaineenvaihduntaan ja että lämpötilakäsittelyn vaikutus oli erilainen eri *Pgi*-genotyyppien välillä. *Pgi-AC* yksilöt lensivät *Pgi-AA* yksilöitä paremmin koettuaan matalan lämpötilakäsittelyn, mutta korkean lämpötilakäsittelyn kokeneiden osalta paremmuusjärjestys oli päinvastainen. Kokeen tulokset osoittivat ennen lentoa koetun lämpötilan vaikutuksen olevan samanlainen eri *Pgi*-genotyyppisiin kuin aikaisemmin tutkittu lennonaikaisen lämpötilan vaikutus. Toistomittauksen tulokset osoittivat, että perhostet lensivät paremmin ensimmäisellä mittauskerralla. Naarilla mittauskerran ja -lämpötilan väliltä löytyi interaktio. Toistomittauksen tulos on ristiriidassa aikaisemman tutkimustiedon kanssa. Syy lentosuorituksen heikkenemiseen liittyy siihen, ettei perhosia ruokittu tässä kokeessa kuin vedellä kahden mittauksen välissä. Tämän kokeen tulokset auttavat meitä ymmärtämään paremmin luonnonpopulaatioiden dynamiikkaa muuttuvissa ympäristöolosuhteissa.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND

Department of Biology

OKSANEN, ALMA: Effects of temperature treatment and *Pgi* genotype on the flight metabolic rate of the Glanville fritillary (*Melitaea cinxia*) butterfly.

Msc. Thesis, 39 pp.

April 2014

Dispersal plays key role in an individual's life. It also affects how populations adapt to their environment. In case of butterflies moving from place to place happens by flight. In addition to dispersal, butterflies need flight for their everyday routines and to crucial lifecycle events e.g. reproduction. Populations of the Glanville fritillary (*Melitaea cinxia*) living in fragmented landscapes are a classic example of a metapopulation. In the Åland Islands populations of this species have been surveyed for a long time and the population dynamics of the species are well known. The effect of habitat fragmentation on dispersal is a complicated process. The mobility of *M. cinxia* has been found to vary as a response to habitat patch size, connectivity and population age. Populations have also been found to vary in the frequency of different forms of phosphoglucose isomerase enzyme (PGI). One form of the PGI-enzyme, coded by the f-allele of the *Pgi* gene is connected to better flight ability. These good flyers have an important role in establishing new local populations in the constantly changing metapopulation structure. In nature, butterflies face changing environmental conditions e.g. temperature changes.

Previous studies on the effect of *Pgi* genotype and temperature on flight have established that *Pgi* genotypes differ in flight performance in different temperatures. However, this is the first time that the effect of temperature acclimatisation on flight performance has been tested. Newly eclosed butterflies were divided in 3 different temperature treatments (15, 24 and 35°C) for 2 days. In the 10 min long flight measurement the produced CO₂ was measured. Flight metabolic rate is a good measure of flight ability of a butterfly. The aim of the study was to find out if the individuals would fly like their genotype predicts or has the temperature treatment led to acclimatisation during the experiment. In addition, we measured some of the individuals twice to examine the effect of repeated measurements on flight performance. The second measurement was done in a different temperature than the first measurement, which allowed us to test the effect of temperature on the repeated measurement.

The results show that the temperature treatment experienced before the flight measurement had a significant effect on the metabolic rate of *M. cinxia*. The effect was different in the two *Pgi* genotypes. The *Pgi* AC individuals had better flight performance after the low temperature treatment than the *Pgi* AA individuals. In the high temperature the effect was reversed between the genotypes. These results show that the effect of the temperature on the different *Pgi* genotypes is similar regardless if the temperature is experienced before the flight measurement or during it. The results of the repeated measurement experiment show that the butterflies flew better during the first measurement. An interaction between the order of the measurement and the measurement temperature was found in females. The result from this experiment is contradicting the previous results of flight metabolic rate repeatability. A reason for the decline in flight performance may be connected to the feeding of the adult butterflies. In this experiment the individuals were given only water between the measurements. The results from this experiment will help us to understand better the dynamics of natural population in changing environmental conditions.

SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO	2
1.1	Perhosten dispersaali ja metapopulaatiodynamiikka	2
1.2	Geneettinen vaihtelu energia-aineenvaihdunnassa	5
1.3	Täpläverkkoperhonen: esiintyminen, elinympäristö, lisääntyminen ja elinkierto	6
1.4	Tutkimuksen tarkoitus	7
2	AINEISTO JA MENETELMÄT	8
2.1	Kokeen esittely lyhyesti	8
2.2	Koemateriaali ja toukkien kasvatus	8
2.3	Lämpötiläkäsittelyt	9
2.4	Mittauslaitteisto	10
2.5	Lentoaineenvaihdunnan mittaus	11
2.6	Mittaustulosten käsittely	13
3	TULOKSET	14
3.1	Lentoaineenvaihdunta ja yksilön paino	15
3.2	Lentoa edeltäneen lämpötiläkäsittelyn vaikutus lentometaboliaan eri genotyypeillä	21
3.3	Toistomittauksen, mittauslämpötilan, ja -järjestyksen vaikutus lentometaboliaan	26
4	TULOSTEN TARKASTELO	29
4.1	<i>Pgi</i> -genotyypin ja aiemmin koetun lämpötiläkäsittelyn vaikutus lentometaboliaan	29
4.2	Toistomittauksen vaikutus lentometaboliaan	33
4.3	Virhelähteet	34
	KIITOKSET	36
	LÄHDELUETTELO	37

1 JOHDANTO

1.1 Perhosten dispersaali ja metapopulaatiodynamiikka

Jälkeläisten siirtyminen vanhempien elinpiiriltä uusille alueille eli dispersaali on yksilöiden elämän keskeinen vaihe ja vaikuttaa populaatioiden sopeutumiseen ympäristöönsä (Hanski 1998, Clobert et al. 2004, Bowler & Benton 2005). Evolutiivisia syitä dispersaalille ovat mm. sisäsiittoisuuden ja sisarusten välisen kilpailun vähentäminen (Hanski 1999). Myös resurssien niukkuus ja kilpailu parittelukumppaneista voi johtaa yksilöiden levittäytymiseen uusille alueille. Dispersaali ja siihen liittyvä geenivirta vähentää populaatioiden geneettistä erilaistumista. Yksilöiden emigraatiolla ja immigraatiolla on keskeinen vaikutus populaatiodynamiikkaan, sillä populaation kokoon vaikuttaa näiden kahden tekijän lisäksi vain syntyvyys ja kuolleisuus.

Liikkumista paikasta toiseen, perhosten tapauksessa lentäen, tarvitaan dispersaalin lisäksi jokapäiväisiin toimintoihin kuten ruokailuun, sekä elinkierron kriittisiin vaiheisiin, kuten lisääntymiskumppanin etsintään, lisääntymiseen ja perhosilla munintapaikan valintaan. Hyönteisen lento on kaikista eläinten liikkumatavoista eniten energiaa kuluttava (Suarez 2000). Hyönteisten aineenvaihdunta kykenee tehokkaaseen ATP:n hydrolyysiin ja sen uudelleen syntetisointiin, mikä mahdollistaa sen, että lentoon on käytettävissä paljon voimaa. Yksilöt jotka pystyvät tehokkaaseen energian käyttöön saavuttavat kelpoisuusetuja niissä toiminnoissa, jotka edellyttävät hyvää lentokykyä. Perhosen lento on myös erityisen kiinnostava ilmiö, kun tarkastellaan liikkumisen evoluutiota, tai kun tutkitaan populaatiodynamiikan mekanistisia perusteita. Tämä tutkimus kohdistuu täpläverkkoperhosen (*Melitaea cinxia*) lentoon, jolla on keskeinen rooli lajin selviytymisessä elinympäristössään. Täpläverkkoperhosen pirstoutuneessa elinympäristössä esiintyvät paikallispopulaatiot muodostavat klassisen metapopulaatorakenteen, jossa paikallispopulaatioita katoaa jatkuvasti ja uusia syntyy niiden tilalle (Hanski 1999).

Täpläverkkoperhonen esiintyy Suomessa ainoastaan Ahvenanmaalla (Hanski 1998). Elinympäristönään täpläverkkoperhonen käyttää kuivia ketoja, joilta löytyy vähintään toista toukkien ravintokasveista, heinäratamoa (*Plantago lanceolata*) tai tähkätädykettä (*Veronica spicata*). Sopivia habitaattilaikkuja on laskettu olevan Ahvenanmaalla noin 4000, joista

kerrallaan asuttuja on noin 500 (Hanski 1999). Vuosittain yli 100 populaatiota häviää ja uusia syntyy lähes saman verran tilalle (Nieminen et al. 2004). Uusien populaatioiden syntymisvauhtiin vaikuttaa olennaisesti sopivien elinympäristölaikkujen yhteys toisiinsa. Todennäköisyys tyhjen laikkujen asuttamiselle kasvaa, kun laikkuja on paljon, ne ovat isoja, ja niiden välimatkat olemassa oleviin paikallispopulaatioihin ovat lyhyitä. Ahvenanmaalla eläviä populaatioita on seurattu 1990-luvun alusta lähtien, joten lajin populaatiodynamiikasta tiedetään paljon. Täpläverkkoperhosen populaatioseurannan menetelmistä on kerrottu tarkemmin julkaisussa Ojanen et al. 2013. Täpläverkkoperhosesta onkin tullut yksi populaatioekologian mallilajeista, ja sen tutkiminen on edistynyt viime aikoina myös mm. molekyylibiologian alalla (Vera et al. 2008, Rastas et al. 2013).

Elinympäristön pirstoutuneisuuden vaikutus dispersaaliin on monimutkainen prosessi, jota on tutkittu mm. erilaisten mallien avulla (Heino & Hanski 2001). Pirstoutuneisuuden aste yhdessä muiden tekijöiden kanssa joko lisää tai vähentää dispersaalia. Täpläverkkoperhosen liikkuvuuden on todettu vaihtelevan elinympäristölaikkujen koon ja kytkeytyneisyyden sekä paikallispopulaation iän suhteen (Hanski et al. 2004). Uusissa eristyneissä populaatioissa yksilöt ovat keskimääräistä liikkuvampia kuin vanhemmissa ja paremmin kytkeytyneissä populaatioissa. Vanhoissa populaatioissa liikkuvuus alenee kun eniten liikkuvat yksilöt lähtevät uusille alueille, ja vähemmän liikkuvien jälkeläistuotanto on korkeampi (Hanski et al. 2004, Hanski & Saccheri 2006). Samoin keskenään hyvin kytkeytyneissä populaatioissa liikkumiskyky ei kehity paremmaksi, sillä populaatioiden välillä tapahtuvasta vaihdosta selviävät heikomminkin liikkuvat yksilöt. Liikkuminen periytyy seuraavalle sukupolvelle: hyvin liikkuvat naaraat saavat keskimäärin paremmin liikkuvia naarasjälkeläisiä (Saastamoinen 2008). Täpläverkkoperhosen lentometaboliakyvyn periytyvyyttä jälkeläisille on tutkittu tekemällä lentometaboliomittaukset kahdelle sukupolvelle (Mattila & Hanski, käsikirjoitus). Tulokset osoittivat lentometaboliatason olevan merkitsevästi periytyvä ominaisuus. Maternaaliefekti, eli äidin vaikutus yksilön lentometaboliaan oli sen sijaan kokeen tulosten mukaan mitätön.

Täpläverkkoperhosten uusien ja vanhojen paikallispopulaatioiden yksilöiden välillä esiintyviä eroja mm. dispersaali- ja elinkierto-ominaisuuksissa on selvitetty monessa tutkimuksessa (Wheat et al. 2011, Saastamoinen 2008, Hanski et al. 2004). Dispersaali- ja elinkierto-ominaisuuksien kehittyminen muista ominaisuuksista riippumattomasti, vaan parempaan liikkumiskykyyn saattaa olla kytkeytyneenä muita ominaisuuksia, jotka joko voimistavat tai heikentävät yksilön dispersaali- ja elinkierto-ominaisuuksia (Ronce & Olivieri 2004).

Heterogeeninen elinympäristö ylläpitää vaihtelua lajien elinkierto-ominaisuuksissa (Kvist et al. 2013, Hanski et al. 2004, Hanski 1998). Täpläverkkoperhosen tapauksessa heterogeeninen metapopulaatorakenne on jatkuvassa muutostilassa, jossa asuttujen ja asumattomien habitaattilaikkujen lukumäärä ja sijainti vaihtelevat. Metapopulaation pirstoutunut rakenne aiheuttaa paikallisesti vaihtelevaa luonnonvalintaa, joka voi ylläpitää sekä geneettistä että fenotyypistä vaihtelua. Yksi esimerkki vaihtelusta, jota heterogeeninen elinympäristö ylläpitää, on monilla hyönteislajeilla esiintyvä siipipolymorfia (Zera & Denno 1997). Siipipolymorfiassa siivellisten ja siivettömien muotojen esiintyminen riippuu elinympäristön pysyvyydestä. Vakaassa elinympäristössä siivettömyys voi olla monille lajeille edullinen sopeuma, sillä lentokyvyn ylläpito edellyttää resursseja, jotka ovat pois lisääntymisestä. Jos taas elinympäristö on ajallisesti epävakaa ja epäyhtenäinen, siivellisyys on etu sekä koiraille että naaraille.

Yksilön dispersaaliokyvyn mittaaminen on usein monimutkaisempaa kuin muiden elinkierto-ominaisuuksien analyysi. Luonnossa liikuttuun matkaan vaikuttavat mm. yksilön liikunta- ja navigointikyky, motivaatio liikkua sekä useat ulkoiset tekijät kuten elinympäristön rakenne (Nathan et al. 2008). Tämän lisäksi eliöiden evolutiivinen vaste, joka kohdistuu elinympäristön rakenteen muutoksiin, saattaa kätkeytyä fenotyypiseen plastisuuteen (Merckx & Van Dyck 2006). Myös genotyypin ja ympäristön yhteisvaikutus (Knulle 2003), lisää haastetta selvittää syyt ja seuraukset, kun tarkastellaan populaatioita erilaisissa ympäristöoloissa.

1.2 Geneettinen vaihtelu energia-aineenvaihdunnassa

Täpläverkkoperhosten populaatioiden on todettu eroavan energia-aineenvaihduntaan vaikuttavan fosfoglukooksi-isomeraasi-entsyymin (PGI) eri muotojen suhteen (Haag et al. 2005). Glykolyysin toista vaihetta katalysoivassa PGI-entsyymissä esiintyy perinnöllistä vaihtelua, ja sen vaikutusta yksilön kelpoisuuteen on tutkittu aiemmin esimerkiksi keltaperhosilla (*Colias*) (Watt 1977, Watt et al. 2003). Yksi täpläverkkoperhosen PGI-entsyymin muoto, f-alleeli, on yhteydessä parempaan lentokykyyn (Haag et al. 2005). Yksilön lentokyky on sitä parempi, mitä enemmän se pystyy käyttämään energiaa lennon aikana. Täpläverkkoperhosen PGI:tä koodaavan geenin kartoituksessa saatiin esiin yksittäinen yhden emäsparin ero (single nucleotide polymorfism, SNP), joka korreloi lähes täydellisesti f-alleelin kanssa (Orsini et al. 2009). SNP AA111:n on havaittu selittävän merkitsevästi yksilöiden välillä esiintyvää vaihtelua mm. lentokyvyyssä (Orsini et al. 2009, Niitepõld et al. 2009). Haag et al. (2005) havaitsivat täpläverkkoperhospopulaatioiden PGI-alleelikoostumuksen vaihtelevan populaation iän ja eristyneisyyden suhteen. Hyvään lentokyvyyden yhteydessä oleva f-alleeli on yleisin uusissa ja eristyneissä populaatioissa. Todennäköisin selitys tälle havainnolle on, että uudet eristyneet populaatiot perustaneet naaraat eivät ole satunnainen otos metapopulaatiosta, vaan ne ovat keskimääräistä liikkuvampia yksilöitä, joiden ominaisuudet periytyivät niiden jälkeläisille (Haag et al. 2005). Nämä hyvät lentäjät ovat keskeisiä uusien paikallispopulaatioiden synnyssä jatkuvasti muutoksessa olevassa metapopulaatorakenteessa.

Luonnossa perhoset elävät alati muuttuvissa ympäristöoloissa, joissa lämpötilanvaihtelut ovat keskeisessä osassa. Täpläverkkoperhosilla on tutkittu lämpötilan ja *Pgi*-genotyypin yhteyttä lentoaktiivisuuteen (Saastamoinen & Hanski 2008). Tutkimuksessa perhosten ruumiinlämpö mitattiin välittömästi lennon jälkeen lämpökameralla. Perhosten lämpötilassa havaittiin eroja genotyypistä riippuen, siten että alhaisissa ympäristön lämpötiloissa f-alleelin (*Pgi* AA111 AC) omaavilla perhosilla ruumiinlämpö oli korkeampi kuin yksilöillä joilla ei ole f-alleelia (*Pgi* AA111 AA).

Perhoset, jotka kestävät paremmin ympäristön alhaisia lämpötiloja pystyvät aloittamaan lennon aikaisemmin aamulla ja saavat näin etua pidemmästä aktiivisuusajasta. Tilanne muuttuu kun tarkastellaan korkeampia lämpötiloja, joissa AA-homotsygoottien lentoaineenvaihdunnan taso oli mittauksissa korkeampi kuin AC-heterotsygooteilla (Niitepöld et al. 2009). Siten *Pgi*-genotyyppien menestyminen erilaisissa ympäristön lämpötiloissa on erilaista. *Pgi*-genotyypillä ja lämpötilalla on todettu vuorovaikutuksia myös muissa täpläverkkoperhosen elinkierron vaiheissa. Toukkavaiheessa *Pgi*-genotyyppien edut ilmenivät päinvastaisesti kuin aikuisilla perhosilla, joilla AC heterotsygoottien menestyminen on parempaa. *Pgi*-AA toukat olivat kahdessa suhteessa menestyksekkäämpiä kuin *Pgi*-AC yksilöt (Kallioniemi & Hanski 2011). Niinpä *Pgi*-AA toukat selviytyivät paremmin stressaavista olosuhteista (alhainen lämpötila) ja niiden kotelopainot olivat keskimäärin suuremmat kuin *Pgi*-AC yksilöillä. Näytti siltä, että *Pgi*-AA yksilöt varastoivat ravinnosta saamansa energian eri tavalla kuin *Pgi*-AC toukat. Lämpötilan aiheuttamaa fenotyypistä plastisuutta on tutkittu myös esimerkiksi *Chrysomela aeneicollis* -kuoriaisella. Tutkimuksissa on verrattu eri *Pgi*-genotyyppien välisiä eroja äärevien lämpötilojen vaikutuksessa ja lämpösokkiproteiini Hsp70:n ekspressiossa (Rank et al. 2007). Tämä kuoriaislaji esiintyy vuoristoissa, ja tutkimuksissa on löydetty erilaisia yhteyksiä korkeusasteen ja fysiologian välillä eri *Pgi*-genotyypeillä, mikä viittaa paikallisiin lämpötilasopeumiin (Dahlhoff & Rank 2000). Valinta johtaa parhaiten sopeutuneiden genotyyppien yleistymiseen paikallisesti.

1.3 Täpläverkkoperhonen: esiintyminen, elinympäristö, lisääntyminen ja elinkierto

Ahvenanmaan täpläverkkoperhoset edustavat lajin pohjoisinta kantaa Euroopassa (Murphy et al. 2004). Populaatioita esiintyy sekä Ahvenanmaan 1500 km² kokoisella pääsaarella että joillakin sen ympäröivillä pienemmillä saarilla, joiden pinta-ala on kuitenkin yli 10 km² (Kuussaari et al. 2000). Täpläverkkoperhoselle sopivia elinympäristöjä ovat kuivahkot kedot, niityt ja laidunmaat, joilta löytyy vähintään toista toukkien ravintokasveista, tähkätädykettä tai heinäratamaa. Tähkätädykkeen levinneisyys rajoittuu lähinnä pääsaaren luoteisosaan, heinäratamaa kasvaa laajalti lähes koko Ahvenanmaalla. Paikallispopulaatioiden tasolla on todettu erilaistumista naaraiden isäntäkasvin valinnassa, mikä on yhteydessä kasvien alueelliseen esiintymiseen. Elinympäristölaikut sijaitsevat hajallaan metsien, kivikoiden ja

graniittisten kallioiden värittämässä maisemassa (Murphy et al. 2004). Ahvenanmaa on harvaan asuttu, suhteellisen tiuhaan maanteiden verkostoima saariryhmä, jonka pienimuotoisen maatalouden muokkaamaa kulttuurimaisemaa asukkaat ovat kunnialla säilyttäneet ja ylläpitäneet.

Ahvenanmaalla elävillä täpläverkkoperhosilla on yksivuotinen elinkierto, eli yksi sukupolvi vuodessa (Nieminen et al. 2004). Perhosten lentoaika on kesäkuusta heinäkuun alkuun. Naaraalla on kuoriutuessaan täysi määrä oosyyttejä, ja se parittelee yleensä jo pian kuoriutumisen jälkeen (Saastamoinen 2007a). Naaras munii kerrallaan 50–300 munan munaryhmiä toukkien ravintokasvin lehdille. Naaras voi munia yhden parittelukerran jälkeen useita munaryhmiä, mutta joskus se parittelee uudestaan munaryhmien välillä. Keskimäärin naaras munii elinaikanaan 400–500 munaa, enimmillään jopa kymmenen munaryhmää ja yli 1000 munaa (Saastamoinen 2007a,b). Toukat kuoriutuvat 2–3 viikossa minkä jälkeen ne aloittavat ruokailun ryhmissä (Nieminen et al. 2004). Toukat kehreävät ravintokasvilleen verkkopesän, jossa ne viettävät yöt ja suojautuvat huonolta säältä. Myös nahanluonti seuraavaan toukkavaiheeseen tapahtuu verkkopesässä. Täpläverkkoperhostoukkien valmistautuminen talveen alkaa jo elokuun lopulla, jolloin toukat kehreävät kasville vielä tiivisrakenteisemman pesän, jonka sisällä ne selviävät talven yli diapaussissa. Talvehtivat toukat ovat viidennessä toukkavaiheessa. Toukat heräävät keväällä ilmojen lämmitessä ja ravintokasvien aloittaessa kasvunsa. Ruokailu jatkuu aina viimeiseen eli seitsemänteen toukkavaiheeseen asti, minkä jälkeen toukat koteloituvat 2–3 viikoksi toukokuussa.

1.4 Tutkimuksen tarkoitus

Tämän gradutyön tavoitteena oli selvittää täpläverkkoperhosen fenotyyppejä vasteita vaihteleviin ympäristöoloihin. Erityisen kiinnostuksen kohteena on verrata lämpötilan vaikutusta lentoaineenvaihduntaan eri *Pgi*-genotyyppien välillä. Kokeessa selvitettiin sekä mittauksen aikaisen että aiemmin koetun lämpötilan vaikutusta. Tulokset auttavat ymmärtämään, miten herkkiä täpläverkkoperhoset ovat ympäristön lämpötilalle, ja voiko aikuisen elinaikanaan kokemalla lämpötilalla olla pysyviä vaikutuksia yksilön lentokyvykkyyteen. Tulokset valottavat liikkumisen evoluutiota vaihtelevissa ympäristöolosuhteissa sekä auttavat ymmärtämään populaatiotason prosesseja.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Kokeen esittely lyhyesti

Koe toteutettiin seuraavasti. Perhosia pidettiin kuoriutumisen jälkeen eri lämpötiloissa kaksi päivää, minkä jälkeen niiden lentoaineenvaihduntanopeus mitattiin. Lennon aikaisen energiankulutuksen mittaaminen on hyvä menetelmä määrittää perhosen lentokyky, josta tässä työssä oltiin kiinnostuneita. Koe suoritettiin Lammin biologisella asemalla keväällä 2009. Käytetyt perhoset olivat tutkimusasemalla kasvatetusta koepopulaatiosta.

2.2 Koemateriaali ja toukkien kasvatus

Kokeessa käytettävät perhoset olivat Lammilla kesäkuussa 2008 suoritetussa häkkikokeessa käytettyjen perhosten jälkeläisiä. Häkkikokeen perhoset oli kerätty syksyllä 2007 viidennen toukkavaiheen toukkina ympäri Ahvenanmaata useista eri populaatioista. Suurenulkohäkin (32 * 26 m) koejärjestelyt on esitelty tarkemmin julkaisussa (Saastamoinen 2007a). Häkkikokeen jälkeläiset kasvatettiin laboratoriossa viidenteen toukkavaiheeseen, jolloin ne olivat valmiita menemään diapaussiin. Toukat pakattiin perheryhmittäin talvehtimaan filmipurkkeihin, joita säilytettiin jääkaapissa. Toukkien säilytyslämpötila oli 3°C, mikä vastaa niiden talvehtimisolosuhteita lumen alla.

Kasvatuksiin valittiin toukkia yhteensä 15 eri perheestä. Toukkien herättäminen diapaussista aloitettiin vähitellen tammikuussa 2009. Herätysrytmiksi valittiin kaksi toukkaperhettä päivässä. Kolmen päivän ja kuuden kasvatukseen valitun perheen jälkeen pidettiin välipäivä, jonka jälkeisenä päivänä herätettiin vain yksi perhe, ja loput kuusi perhettä seuraavina kolmena päivänä. Välipäivän tarkoituksena oli hidastaa kuoriutumisvaiheessa syntyvää alkupäivien työruuhkaa.

Kasvatus aloitettiin siirtämällä toukat harsokantisiin rasioihin. Laatikoiden pohjalle laitettiin alustaksi paperia ja muutama lehti toukkien ravintokasvia. Tässä kokeessa kaikki toukat kasvatettiin heinäratamolla. Lopuksi laatikko ja toukat kostutettiin suihkuttamalla vettä sumutepullolla. Ensimmäisen vuorokauden ajan laatikoita pidettiin huoneenlämmössä kasvatushuoneen pöydällä, seuraavana päivänä ne siirrettiin kasvatuskaappiin. Kasvatuskaapin (Sanyo MLR-351) vuorokautinen lämpötilasykli oli 8–28°C (yöllä matalin, päivällä korkein lämpötila). Joka aamu toukkia hoidettiin vaihtamalla tuoret heinäratamon lehdet, poistamalla laatikoista mahdolliset kuolleet yksilöt, ja lisäämällä kosteutta. Ruoan määrää kasvatettiin sitä mukaa kun toukkien ravinnontarve kasvoi.

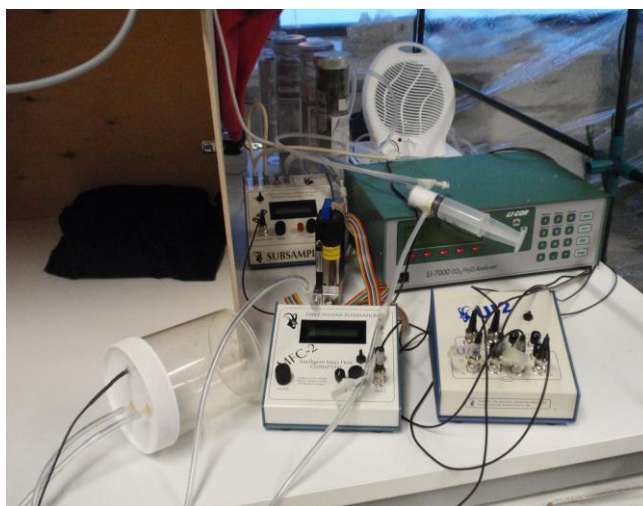
Kotelot poistettiin kasvatuslaatikoista seuraavana päivänä koteloitumisesta, jolloin niiden kovettunut kuori kestää käsittelyä. Kotelot punnittiin (Mettler Toledo SX105 Dual Range) vaa'alla ja laitettiin yksilöllisesti numeroituihin harsokantisiin kuppeihin. Koteloitua sumutettiin kevyesti päivittäin. Kuoriutumispäivänä perhosia pidettiin vielä omissa kupeissaan, jolloin niillä oli mahdollisuus rauhassa avata siipensä. Seuraavana aamuna perhonen merkittiin siipen kirjoitetulla tunnistusnumerolla.

2.3 Lämpötiläkäsittelyt

Perhoset jaettiin kolmeen eri lämpötiläkäsittelyyn (15, 24 ja 35°C), jossa ne viettivät 2 vuorokautta ennen lentomittausta. Kustakin perheestä kuoriutuneet perhoset jaettiin tasaisesti kuhunkin käsittelyyn. Käsittely toteutettiin kasvatuskaapeissa (Sanyo MLR-351), joiden lämpötilaa voidaan säätää. Valaistusolot olivat kaikille perhosille samat. Kussakin kaapissa vallitsi käsittelyn mukainen lämpötila klo 8:00–20:00, yön kaikki perhoset viettivät 8°C:ssa. Käsittelyssä perhoset olivat sylinterihäkeissä (30x15cm), koiraat ja naarat erikseen. Kokeen aikana perhosia ei ruokittu, mutta niille oli tarjolla vettä häkin pohjalle sijoitetussa juomasienessä.

2.4 Mittauslaitteisto

Perhosten lentomittaukset suoritettiin laitteistolla, joka on koottu laboratorioon pystytetyn muovisen läpinäkyvän teltan sisälle. Telttaan sijoitettujen lämmittimien ja tuulettimen avulla mittauslämpötila voidaan säädellä halutulle tasolle. Teltan sisällä olevalle pöydälle on rakennettu etusivustaan avoin (65x65x60cm) vanerilaatikko, jonka kattoon on asennettu UV-valaisin. Mittaaja istuu pöydän ääressä pitäen käsissään olevaa mittauskammiota, jonka sisällä on perhonen, vanerilaatikon sisäpuolella, ja kevyesti ravistelemalla pyrkii pitämään perhosen lennossa 10 minuutin ajan. Vanerilaatikon vieressä pöydällä on varsinainen mittauslaitteisto ja tarvittavat kemikaalit. Käytössä olleiden laitteiden ja kemikaalien tiedot ovat seuraavanlaiset: hiilidioksidianalysaattori (Li-Cor 7000; Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA), pumppu (SS3 Subsampler; Sable Systems, Las Vegas, NV, USA), massavirtaussäädin (Sierra Instruments, Monterey, CA, USA) ja mittauskammioon liitetty NTC-lämpötila-anturi (Sable Systems). Kerätty mittausaineisto tallennettiin reaaliajassa tietokoneelle UI-2 (Sable Systems) liitälaitteella. Tietokoneella aineiston käsittelyyn käytettiin ohjelmistoa ExpeData (Sable Systems). Vesi ja hiilidioksidi poistettiin mittauskammioon pumpattavasta ilmasta kuljettamalla ilma kemikaalisäiliöiden läpi. Veden poistamiseen käytettiin Drierite-kemikaalia (W.A. Hammond, Xenia, OH, USA) ja hiilidioksidin poistamiseen ensin Medisorb-kemikaalia (GE Healthcare, Chalfont St. Gilles, UK) ja lisäksi Ascarite II:a (Thomas, Swedesboro, NJ, USA). Mittauskammiosta tullut ilma kuivattiin toistamiseen ennen analysaattoria magnesiumiperkloraatilla (Alfa Aesar, Karlsruhe, Saksa).



Kuva 1. Mittauslaitteisto. Vasemmalla etualalla mittauskammio, jossa perhosen lentometabolia mitattiin. Kammion vieressä massavirtaussäädin ja UI-2 liitäntälaitte. Takana vasemmalla pumppu ja hiilidioksidianalysointilaitte.

2.5 Lentoaineenvaihdunnan mittaus

Mittauspäivänä perhoset tuotiin varjoisaan paikkaan laboratorioon huoneenlämpöön (24°C) noin puoli tuntia ennen mittausta. Mittauskammioita oli kaksi kappaletta, joten juuri ennen käynnistyvän mittauksen alkua seuraava perhonen oli jo siirretty odottamaan lentovuoroaan toiseen vapaaseen mittauskammioon, joka peitettiin mustalla kankaalla. Peitettyssä kammiossa perhonen sai tottua mittauslämpötilaan ja samalla kammioista poistettiin hiilidioksidi laittamalla laitteistosta tuleva poistoilma virtaamaan kammion läpi. Ennen lentomittauksen alkua mitattiin noin 30 sekunnin ajan lepoaineenvaihduntaa (RMR, Resting Metabolic Rate). Lentoaineenvaihdunnan mittaus aloitettiin poistamalla kangas kammion päältä, minkä jälkeen perhonen aloitti valon ja kevyen ravistusliikkeen avustamana lentonsa.

Lämpötilakäsittelyn jälkeen perhosen lentoaineenvaihdunta mitattiin epäsuoraa kalorimetriaa käyttäen, mittaamalla kaasunvaihtoa. Perhosen tapauksessa mitattiin yksilön kudosten vapauttaman hiilidioksidin määrä, sillä hapen mittaaminen pienistä näytteistä on hankalaa. Kukin perhonen lensi 10 minuutin ajan litran vetoisessa läpinäkyvässä mittauskammiossa, johon pumpattiin vakionopeudella ilmaa, josta oli poistettu hiilidioksidi ja kosteus (katso jakso 2.4). Kammioista poistuva ilma johdettiin hiilidioksidianalysointilaitteeseen,

joka mittaa ilman mukana tulleen perhosen tuottaman hiilidioksidin pitoisuuden. Hiilidioksidimittaukset tehtiin läpivirtausmenetelmällä, eli ilma virtaa koko mittauksen ajan kammion läpi, jolloin hiilidioksidin tuotto nähdään lähes reaaliajassa. Analysaattori määrittää hiilidioksidipitoisuuden näytteen infrapuna-absorbtion perusteella. Kun hiilidioksidipitoisuus ja laitteen läpi virranneen ilman määrä tiedetään, voidaan laskea perhosen lennon aikana tuottaman hiilidioksidin määrä. Lentomittauksia suoritettiin kahdessa eri lämpötilassa (30 ja 35°C). Koska lämpötilan haluttiin olevan mittauksen aikana mahdollisimman tasainen, mittaukset näissä kahdessa eri lämpötilassa suoritettiin vuoropäivinä.

Taulukko 1. Otoksen jakautuminen (N perhosta) eri käsittelyihin ja mittauslämpötiloihin.

		Koiraat		Naaraat	
Lämpötilakäsittely (2vrk)	15°C	18	13	12	3
	24°C	14	20	7	9
	35°C	18	12	2	13
		30°C	35°C	30°C	35°C
Mittauslämpötila					

Tutkimuksen kannalta olisi parasta että kussakin käsittely/mittausryhmässä olisi suunnilleen tasaisesti molempia genotyyppejä: AA homotsygotteja ja AC heterotsygotteja. Koska perhosten genotyypitys tapahtui vasta jälkikäteen, käytettiin koemateriaalin valinnassa perhosten vanhempien tiedossa olevia genotyyppitietoja. Samasta perheestä kuoriutuneet perhoset jaettiin tasaisesti kolmeen eri käsittelyryhmään. Kasvatusolojen aiheuttamaa vaikutusta pienentää se, että koeyksilöiden vanhemmat ovat kasvaneet kontrolloiduissa (common garden) olosuhteissa.

Mittauksen jälkeen perhonen tapettiin säilömällä se eppendorf-putkessa -80°C pakastimeen. Myöhemmin näytteet kuljetettiin Helsinkiin Viikin MES-laboratorioon genotyypitystä varten.

2.6 Mittaustulosten käsittely

Mittausten jälkeen tietokoneelle tallennettu aineisto muunnettiin haluttuun muotoon ExpeData ohjelman avulla. Kukin mittaus avattiin ohjelmalla, ja tallennetusta, jatkuvasta hiilidioksidikäyrästä valittiin manuaalisesti yhteensä 690 sekunnin pituinen pala. Tämä osuus sisälsi 10 minuutin lennon, ja ennen lentoa 30 sekuntia kunkin perhosen perusmetaboliamittausta, mihin lennonaikaista hiilidioksidintuottoa verrattiin. Lisäksi mittauksen lopusta otettiin mukaan vielä minuutin pituinen pala laskevaa hiilidioksidikäyrää. IgorPro 4.02 -analyysiohjelman avulla laskettiin sekä perhosen lennon aikana tuottama kokonaishiilidioksidimäärä että sen saavuttama hiilidioksidintuottohuippu.

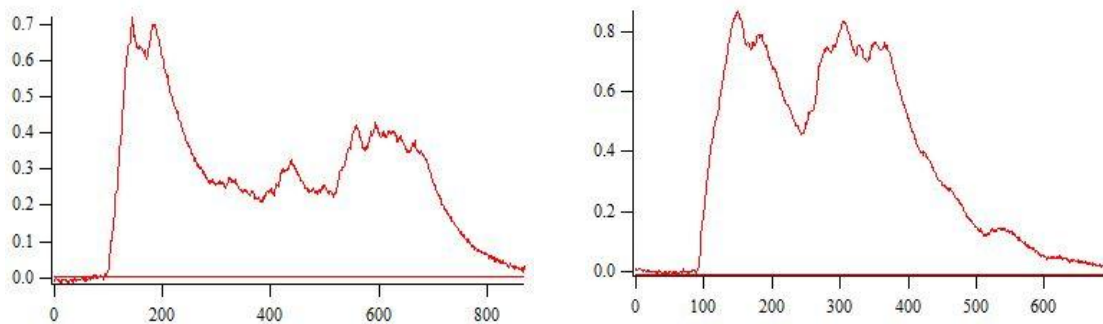
Kokeessa käytetyt yksilöt genotyyпитettiin PGI:tä koodaavalta alueelta muutaman eri SNP:n suhteen, joiden tiedetään korreloivan lähes täydellisesti hyvään lentokykyyn yhteydessä olevan entsyymin f-alleelin kanssa (Orsini et al. 2009., Niitepöld et al. 2009). Genotyyppitysmenetelmä on selostettu artikkelissa Orsini et al. (2009).

Kokeessa kerättyä aineistoa käsiteltiin SPSS Statistics version 20 tilastollisella analyysiohjelmistolla. Analyysin tavoitteena on selvittää kuinka kahden vuorokauden lämpötiläkäsittely ennen mittausta vaikuttaa eri genotyyppien lentoon. Käsittelyn vaikutusta tullaan tarkastelemaan aikaisemmissa tutkimuksissa havaittujen lämpötilaherkkyserojen valossa, kiinnittäen erityisesti huomiota siihen lensivätkö perhoset genotyyppinsä olettamalla tavalla, vai onko lämpötiläkäsittely johtanut muutoksiin perhosten lentoaineenvaihdunnassa kokeen aikana. Tuloksia vertaillaan myös kahdessa eri lämpötilassa tehtyjen lentomittausten osalta.

3 TULOKSET

Lentometaboliamittauksia suoritettiin 155:llä perhosella, joista 100 oli koiraita ja 55 naaraita. Osalla perhosista (36 kpl) toistettiin mittaus seuraavana päivänä, tosin eri mittauslämpötilassa kuin ensimmäinen mittaus. Kokeen aikana mittauksia tehtiin yhteensä 196.

Tuloksista nähdään, että sekä lentometabolian taso että kyky jatkaa lentosuoritusta koko 10 minuutin ajan vaihtelivat suuresti yksilöiden välillä. Kaikissa mittauksissa hiilidioksidihuippu saavutettiin heti mittauksen alussa, minkä jälkeen lentosuoritus heikkeni kokeen loppua kohti (kuva 2). Osa perhosista jaksoi lentää tehokkaasti vain muutaman minuutin ajan, minkä jälkeen ne jaksoivat tehdä vain lyhyitä satunnaisia lentosuorituksia. Jotkut yksilöt jaksoivat lentää koko kymmenen minuutin ajan, useimmiten kuitenkin pienenevällä aineenvaihduntanopeudella kokeen loppua kohti.

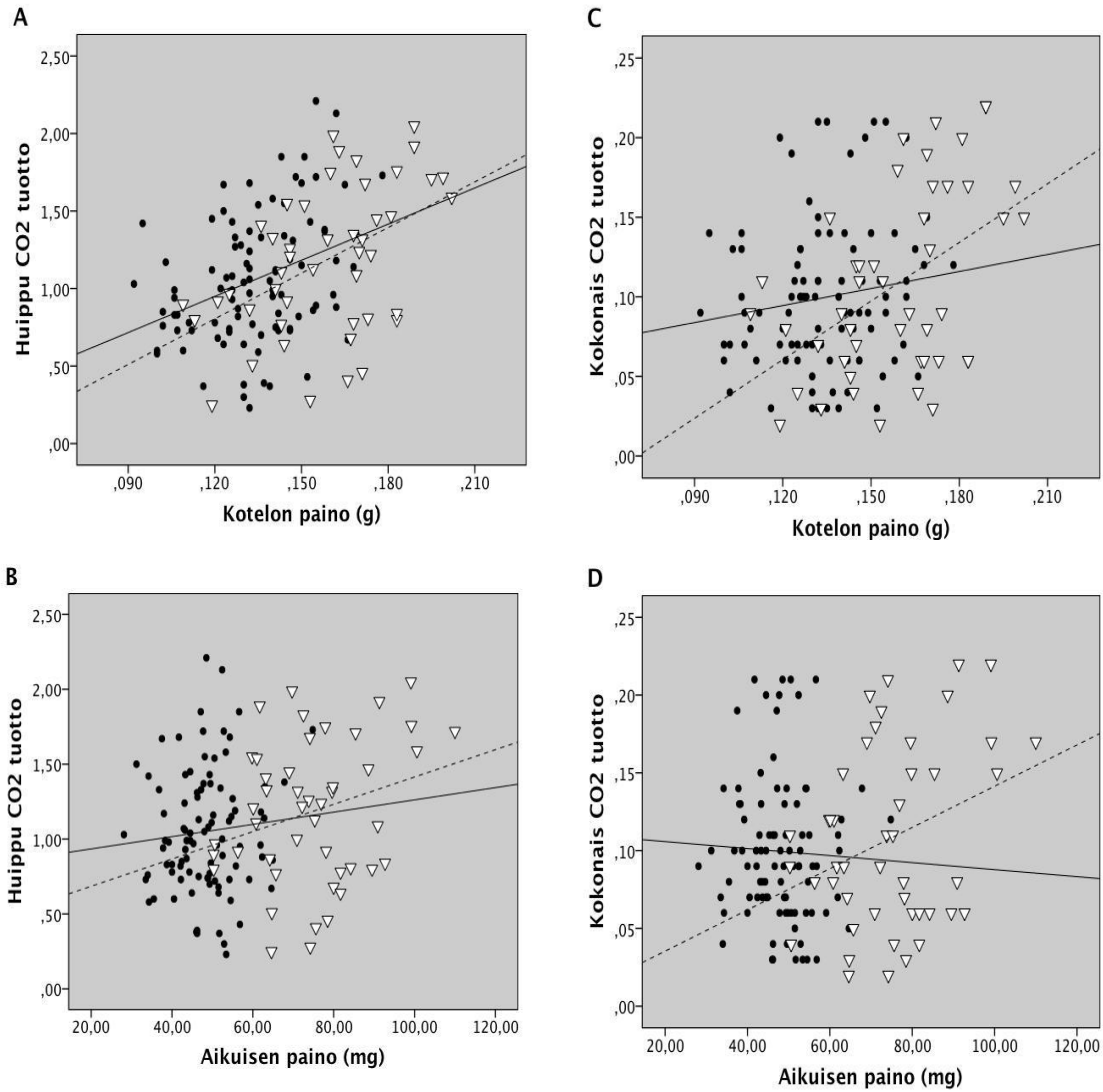


Kuva 2. Esimerkkikuvaajia mitatusta hiilidioksidituotosta. Vasemmanpuoleisen kuvan perhonen on lentänyt alussa vahvasti, mutta sen jälkeen satunnaisia lyhyempiä pyrähdyksiä mittauksen loppua kohti. Oikeanpuoleisen kuvan yksilö aloitti lennon hyvin mutta väsyi kesken lentomittauksen, mikä näkyy hiilidioksidikäyrän notkahduksena mittauksen alkupuolella. Y-akselilla perhosen tuottama hiilidioksidi, X-akselilla aika sekunteina.

3.1 Lentoaineenvaihdunta ja yksilön paino

Perhosen lennon aikana tuottama hiilidioksidimäärä korreloi yksilön painon kanssa (kuva 3). Tämä korrelaatio havaittiin sekä hiilidioksidintuoton huipun että kokonaishiilidioksidimäärän suhteen. Painoina käytettiin kotelo- ja aikuispainoja. Tulokset osoittavat, että lentometabolianopeus riippuu yksilön painosta enemmän naarailta kuin koirailta. Painon vaikutus oli tilastollisesti merkitsevä (taulukko 2).

Molemmilla sukupuolilla hiilidioksidintuoton huippu oli merkitsevästi riippuvainen yksilön kotelopainosta (naaraat $p=0,001$, koiraat $p=0,000$), mutta ei aikuispainosta (naaraat $p=0,074$, koiraat $p=0,421$). Kokonaishiilidioksidin osalta naarailta korrelaatio oli merkitsevä sekä kotelopainoilla ($p=0,001$) että aikuispainoilla ($p=0,033$). Koirailta hiilidioksidin kokonaistuoton suhde kumpaankaan painoon ei ollut merkitsevä ($p=0,168$ ja $p=0,697$).

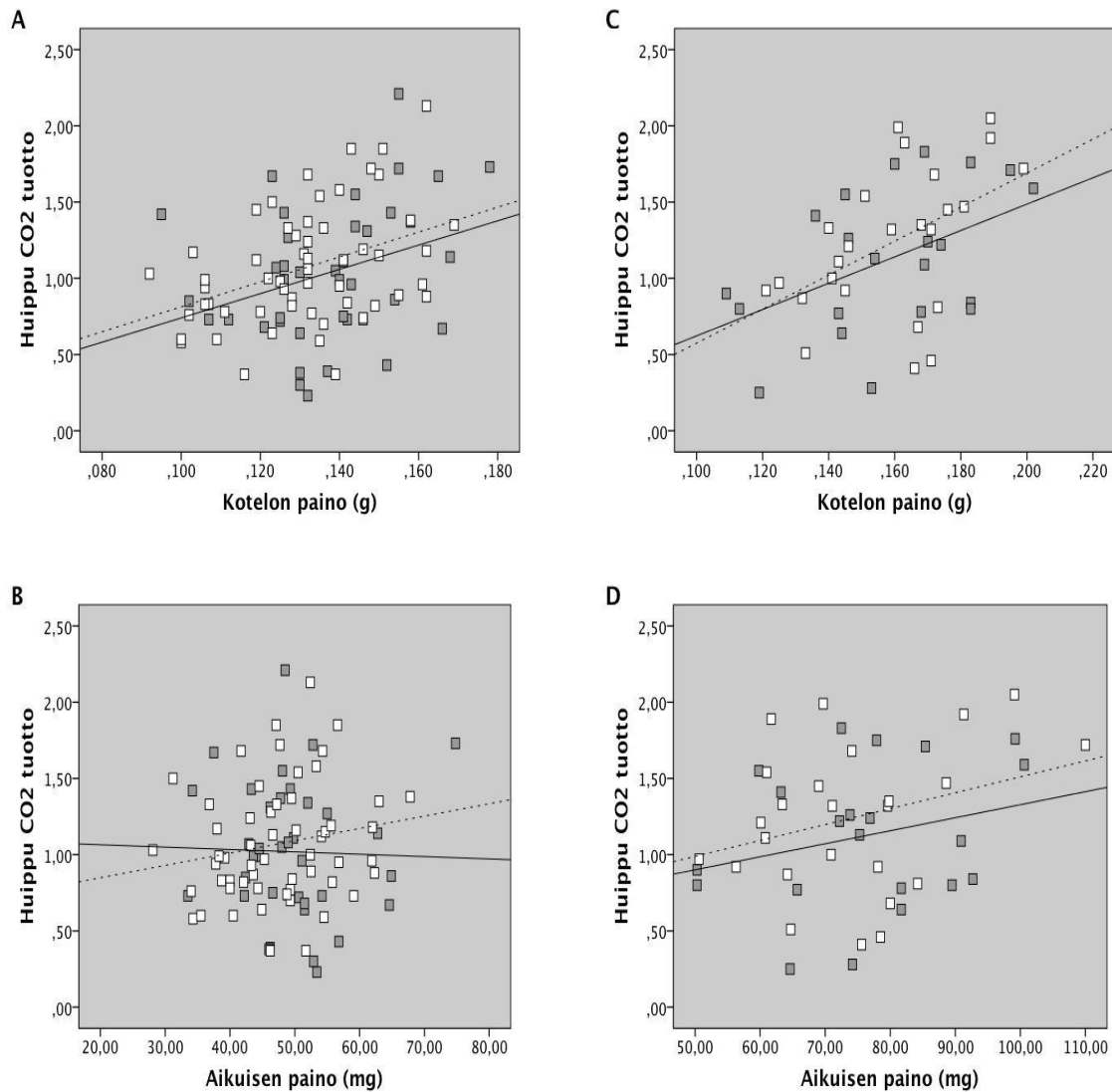


Kuva 3. Lennon aikainen hiilidioksidintuotto suhteessa yksilön painoon. A) Tuotettu hiilidioksidihuippu, suhteessa kotelopainoon, $R^2 = 0,12$ koirilla ja $R^2 = 0,22$ naarailla. B) Tuotettu hiilidioksidihuippu, suhteessa aikuispainoon, $R^2 = 0,01$ koirilla ja $R^2 = 0,07$ naarailla. C) Kokonaishiilidioksidi, suhteessa kotelopainoon, $R^2 = 0,02$ koirilla ja $R^2 = 0,23$ naarailla. D) Kokonaishiilidioksidi, suhteessa aikuispainoon, $R^2 = 0,002$ koirilla ja $R^2 = 0,10$ naarailla. Koiraat: mustat ympyrät ja yhtenäinen viiva, naaraat: valkoiset kolmiot ja katkoviiva.

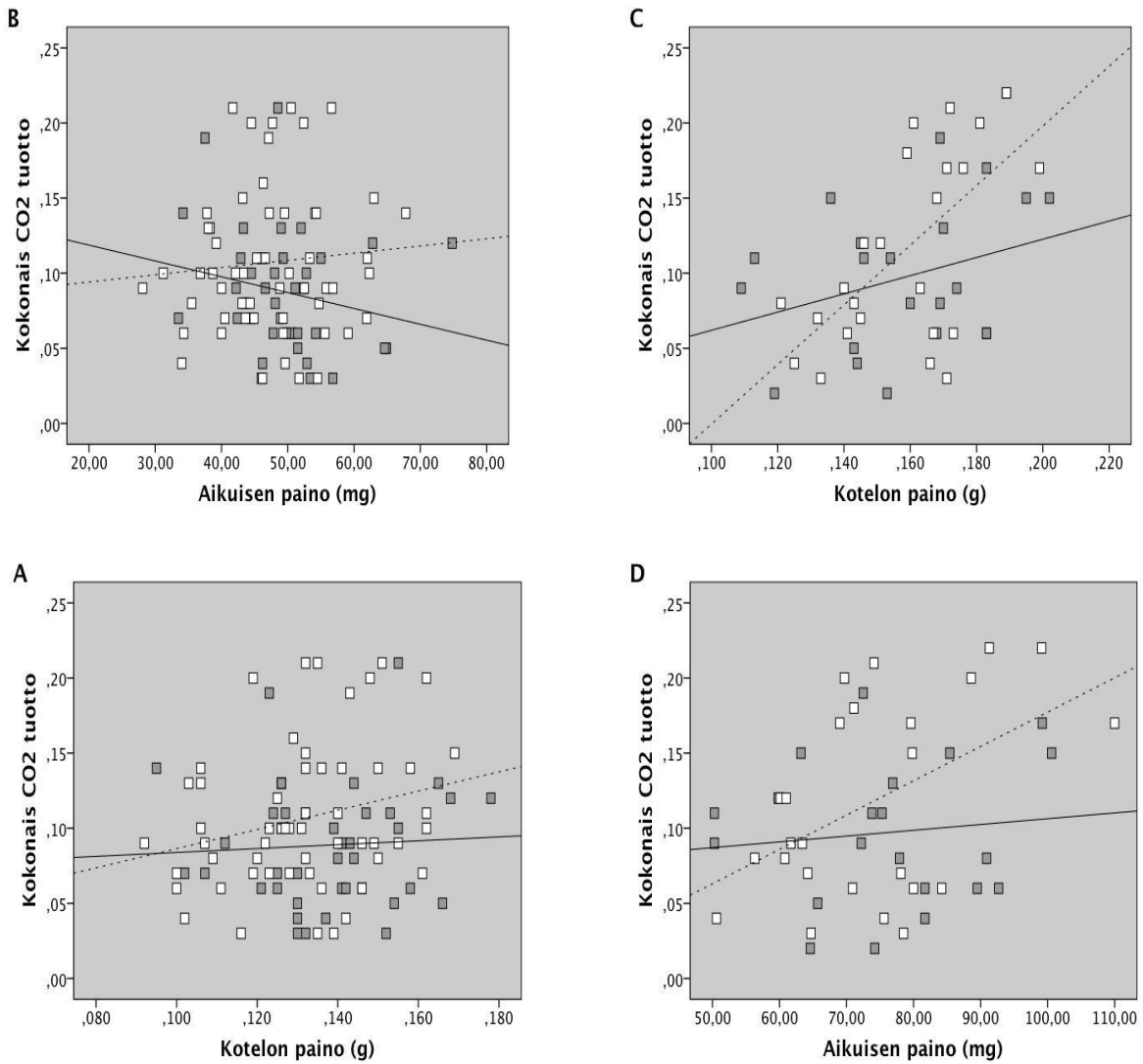
Taulukko 2. Lentometabolian riippuvuus yksilön painosta.

	Riippuva muuttuja	Riippumaton muuttuja	df	t-arvo	P
Koiraat	Huippu CO2 tuotto	Kotelopaino	1	3,610	0,000
	Huippu CO2 tuotto	Aikuispaino	1	0,808	0,421
	Kokonais CO2 tuotto	Kotelopaino	1	1,388	0,168
	Kokonais CO2 tuotto	Aikuispaino	1	-0,390	0,687
Naaraat	Huippu CO2 tuotto	Kotelopaino	1	3,556	0,001
	Huippu CO2 tuotto	Aikuispaino	1	1,832	0,074
	Kokonais CO2 tuotto	Kotelopaino	1	3,635	0,001
	Kokonais CO2 tuotto	Aikuispaino	1	2,198	0,033

Lentometabolian ja yksilön painon suhdetta tarkasteltiin myös genotyypeittäin. Kuvista 4 ja 5 voidaan todeta että kaikissa tarkastelluissa luokissa trendi kahden eri *Pgi*-genotyypin välillä on samankaltainen. *Pgi*-AC yksilöiden regressiosuora sijoittuu kaikissa kuvissa *Pgi*-AA yksilöiden suoran yläpuolelle. Erot ovat silmämääräisesti havaittavissa myös tarkastellessa ryhmien päällekkäisyyttä. Tuloksia testattiin yleistetyllä lineaarisella mallilla, jossa selitettävä tekijä oli hiilidioksidin tuotto, kiinteä selittävä tekijä *Pgi*-genotyyppi, ja kovariaattina yksilön paino. Mallia muokattiin siten että mukaan otettiin painon ja *Pgi*-genotyypin yhdysvaikutus, sekä erikseen molempien tekijöiden päävaikutukset. Käytössä oli tyyppin III neliösumma. Testien tulokset koottiin taulukkoon 3. Koiraiden osalta mikään testatuista yhdysvaikutuksista ei ollut tilastollisesti merkitsevää. Päävaikutuksista vain kotelopaino antoi merkitsevän tuloksen ($p=0,001$) kun tarkasteltiin huippuhiilidioksidintuottoa. Kuvaa 4A silmämääräisesti arvioimalla näyttävät AC-heterotsygootit sijoittuvan AA-homotsygootteja enemmän kuvan yläosaan. *Pgi*-genotyypin ja kotelopainon väliltä ei kuitenkaan löytynyt testin tuloksen mukaan merkitsevää interaktiota ($p>0,005$). Naarailla kokonaishiilidioksidituoton osalta löytyi tilastollisesti merkitsevää *Pgi*-genotyypin ja kotelopainon yhdysvaikutus ($p=0,040$). Sekä kotelopainolla että aikuispainolla oli testin mukaan merkitsevää päävaikutus ($p<0,001$ ja $p=0,029$). Huippuhiilidioksidituoton osalta testatut *Pgi*-genotyypin ja painon yhdysvaikutukset eivät olleet merkitseviä. Kotelopainon päävaikutus antoi merkitsevän tuloksen ($p=0,001$). Sen sijaan aikuispainon tulos ei ollut merkitsevää.



Kuva 4. Lennon aikana tuotettu hiilidioksidihuippu suhteessa yksilön painoon eri *Pgi*-genotyypeillä. A) Hiilidioksidihuippu, suhteessa kotelopainoon koirilla, $R^2 = 0,10$ (AA) ja $R^2 = 0,16$ (AC). B) Hiilidioksidihuippu, suhteessa aikuispainoon koirilla, $R^2 = 7,939E-4$ (AA) ja $R^2 = 0,03$ (AC). C) Hiilidioksidihuippu, suhteessa kotelopainoon naarailla, $R^2 = 0,22$ (AA) ja $R^2 = 0,23$ (AC). D) Hiilidioksidihuippu, suhteessa aikuispainoon naarailla, $R^2 = 0,07$ (AA) ja $R^2 = 0,09$ (AC). *Pgi*-AA genotyyppi on esitetty harmailla neliöillä ja yhtenäisellä viivalla, *Pgi*-AC genotyyppi valkoisilla neliöillä ja katkoviivalla.



Kuva 5. Lennon aikana tuotettu kokonaishiilidioksidimäärä suhteessa yksilön painoon eri *Pgi*-genotyypeillä. A) Kokonaishiilidioksidimäärä, suhteessa kotelopainoon koirilla, $R^2 = 0,003$ (AA) ja $R^2 = 0,06$ (AC). B) Kokonaishiilidioksidimäärä, suhteessa aikuispainoon koirilla, $R^2 = 0,04$ (AA) ja $R^2 = 0,01$ (AC). C) Kokonaishiilidioksidimäärä, suhteessa kotelopainoon naarailla, $R^2 = 0,10$ (AA) ja $R^2 = 0,40$ (AC). D) Kokonaishiilidioksidimäärä, suhteessa aikuispainoon naarailla, $R^2 = 0,01$ (AA) ja $R^2 = 0,23$ (AC). *Pgi*-AA genotyyppi on esitetty harmailta neliöillä ja yhtenäisellä viivalla, *Pgi*-AC genotyyppi valkoisilla neliöillä ja katkoviivalla.

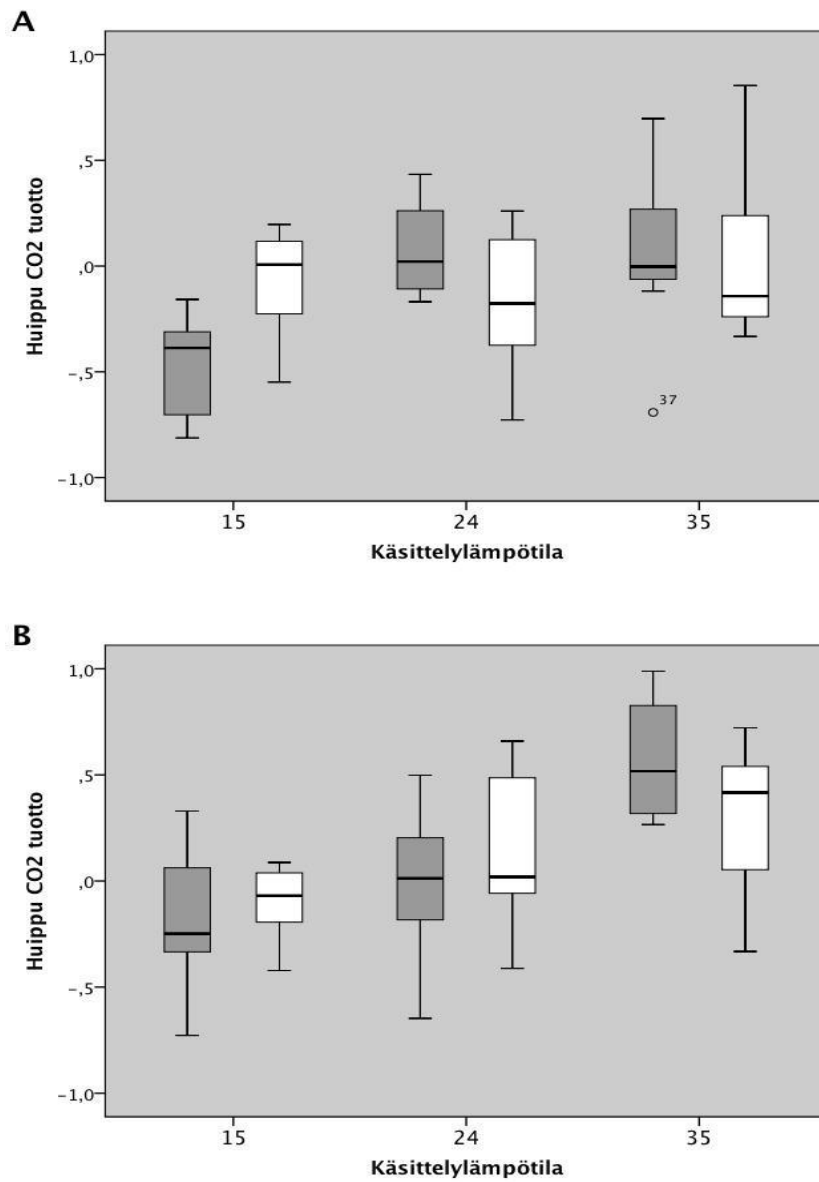
Taulukko 3. *Pgi*-genotyypin ja yksilön painon vaikutus lentometaboliaan.

			Tyypin III neliösummat	df	Neliökeski- arvo	F	P
Koiraat	Huippu CO2 tuotto	Pgi*Kotelopaino	0,000	1	0,000	0,002	0,963
		Pgi	0,001	1	0,001	0,007	0,932
		Kotelopaino	1,963	1	1,963	13,005	0,001
		Pgi*Aikuispaino	0,140	1	0,140	0,826	0,366
		Pgi	0,103	1	0,103	0,608	0,438
		Aikuispaino	0,065	1	0,065	0,380	0,539
	Kokonais CO2 tuotto	Pgi*Kotelopaino	0,002	1	0,002	0,956	0,331
		Pgi	0,001	1	0,001	0,464	0,497
		Kotelopaino	0,004	1	0,004	2,181	0,143
		Pgi*Aikuispaino	0,004	1	0,004	1,687	0,197
		Pgi	0,002	1	0,002	0,894	0,347
		Aikuispaino	0,001	1	0,001	0,238	0,627
Naaraat	Huippu CO2 tuotto	Pgi*Kotelopaino	0,037	1	0,037	0,199	0,658
		Pgi	0,020	1	0,020	0,109	0,742
		Kotelopaino	2,275	1	2,275	12,338	0,001
		Pgi*Aikuispaino	0,008	1	0,008	0,035	0,853
		Pgi	1,65E-005	1	1,65E-005	0,000	0,993
		Aikuispaino	0,770	1	0,770	3,502	0,068
	Kokonais CO2 tuotto	Pgi*Kotelopaino	0,011	1	0,011	4,490	0,040
		Pgi	0,009	1	0,009	3,688	0,062
		Kotelopaino	0,039	1	0,039	15,557	0,000
		Pgi*Aikuispaino	0,008	1	0,008	2,599	0,114
		Pgi	0,005	1	0,005	1,755	0,192
		Aikuispaino	0,015	1	0,015	5,141	0,029

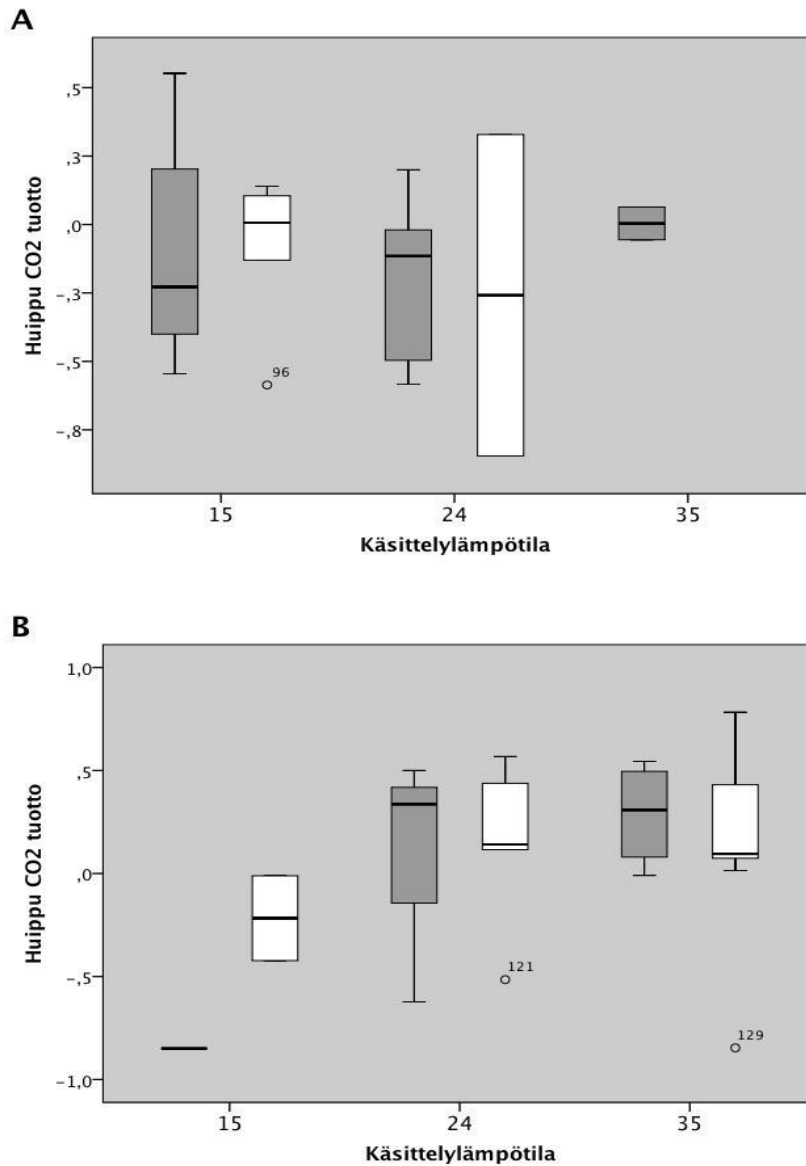
3.2 Lentoa edeltäneen lämpötilakäsittelyn vaikutus lentometaboliaan eri genotyypeillä

Tutkimusaineistolla selvitettiin onko perhosten ennen lentoa kokemalla lämpötilakäsittelyllä vaikutusta lentosuoritukseen. Kukin perhonen vietti tässä lämpötilassa 2 vuorokautta ennen lentometabolian mittausta. Tätä varten kultakin perhoselta otettiin mukaan vain ensimmäinen lentometaboliamittaus. Lisäksi karsittiin pois mittaukset sellaisilta yksilöiltä, joiden genotyypitieto jäi puuttumaan, sekä CC-homotsygootit, joita oli aineistossa vain muutama. Analyysi suoritettiin 141 yksilöllä, joista 95 kpl oli koiraita ja 46 kpl naaraita.

Perhosten tuottamat hiilidioksidimäärät korjattiin ottamalla residuaalit lentometabolian ja yksilön painon suhteen. Tämä tehtiin sekä yksilöiden kotelo- että aikuispainoilla. Residuaalit laskettiin erikseen koiraille ja naaraille.



Kuva 6. Koetta edeltäneen (2 vrk) lämpötiläkäsittelyn vaikutus täpläverkkoperhoskoiraiden huippulentometaboliaan. Y-akselilla on lennonaikainen huippuhiilidioksidintuotto painokorjattuna kotelopainoilla, x-akselilla on eri lämpötiläkäsittelyt – 15, 24 ja 35°C. *Pgi-AA* genotyyppi on esitetty harmaalla, AC valkoisella värillä. Ylemmässä kuvassa mittauslämpötilä oli 30°C, alemmassa kuvassa 35°C.



Kuva 7. Koetta edeltäneen (2 vrk) lämpötiläkäsittelyn vaikutus täpläverkkoperhosnaaraiden huippulentometaboliaan. Y-akselilla on lennonaikainen huippuhiilidioksidintuotto painokorjattuna kotelopainoilla, x-akselilla on eri lämpötiläkäsittelyt – 15, 24 ja 35°C. *Pgi-AA* genotyyppi on esitetty harmaalla, AC valkoisella värillä. Ylemmässä kuvassa mittauslämpötila oli 30°C, alemmassa kuvassa 35°C.

Tulokset osoittavat, että varsinkin koiraiden tapauksessa, mitä lämpimämpi käsittely, sitä parempi lentosuoritus (kuvat 6 ja 7). Genotyypin osalta näyttää siltä, että AC-heterotsygootit ovat lentäneet AA-homotsygootteja paremmin kun ne ovat aiemmin kokeneet matalan käsittelylämpötilan (15°C), kun taas korkeassa käsittelylämpötilassa (35°C) AA-homotsygootit ovat olleet vahvempia lentäjiä. Naaraiden yksilömäärä oli huomattavasti pienempi, mutta kuvista on nähtävissä samansuuntainen tulos kuin koirilla. Kahdessa eri mittauslämpötilassa suoritettujen mittausten tulokset ovat käsittelylämpötilan suhteen samanlaisia, mutta korkeammassa mittauslämpötilassa (35°C) tulokset ovat kautta linjan hieman korkeammat kuin 30°C:ssa saadut tulokset.

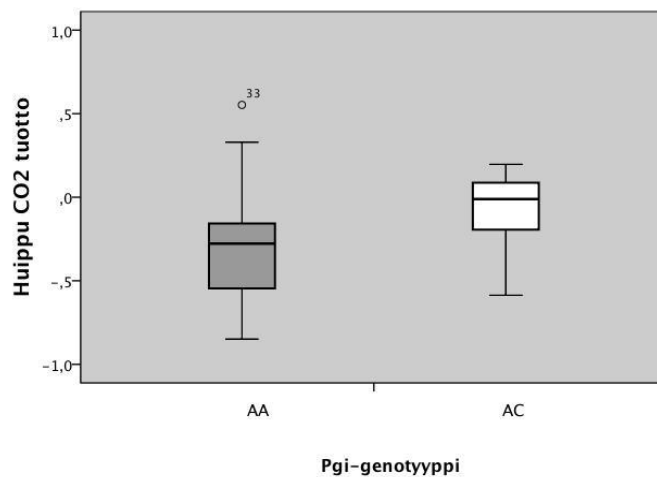
Tuloksia testattiin yleistetyllä lineaarisella mallilla, missä selitettävä tekijä oli hiilidioksidin tuotto, kiinteät selittävät tekijät sukupuoli sekä *Pgi*-genotyyppi, ja kovariaatteina mittaus- ja käsittelylämpötila. Mallia muokattiin siten, että mukaan otettiin käsittelylämpötilan ja *Pgi*-genotyypin yhdysvaikutus. Lisäksi testattiin sukupuolen, mittauslämpötilan ja käsittelylämpötilan päävaikutuksia. Käytössä oli tyypin III neliösumma. Mallissa oli aluksi mukana myös monimutkaisempia yhdysvaikutuksia, mutta ne poistettiin mallista koska ne eivät olleet merkitseviä.

Taulukko 4. *Pgi*-genotyypin ja koetta edeltäneen lämpötilakäsittelyn vaikutus täpläverkkoperhosen huippulentometaboliaan.

		Tyypin III neliösummat	df	Neliökeski- arvo	F	P
Koiraat	Käsittelylämpötila	2,486	1	2,486	22,205	0,000
	Mittauslämpötila	1,148	1	1,148	10,256	0,002
	<i>Pgi</i>	0,651	1	0,651	5,816	0,018
	<i>Pgi</i> *Käsittelylämpötila	0,534	1	0,534	4,774	0,031
Naaraat	Käsittelylämpötila	0,445	1	0,445	2,680	0,109
	Mittauslämpötila	0,064	1	0,064	0,385	0,538
	<i>Pgi</i>	0,055	1	0,055	0,332	0,567
	<i>Pgi</i> *Käsittelylämpötila	0,033	1	0,033	0,199	0,658

Koirilla *Pgi*-genotyypin ja lämpötilakäsittelyn yhdysvaikutus antoi merkitsevän tuloksen (taulukko 4). Interaktion lisäksi testattiin kaikkien muuttujien päävaikutukset erikseen. *Pgi*-genotyyppi, käsittelylämpötila ja mittauslämpötila olivat koiraiden osalta kaikki merkitseviä. Naarilla testin mukaan mikään päävaikutuksista eikä *Pgi*-genotyypin ja lämpötilakäsittelyn interaktio ollut merkitsevää.

Matalan lämpötilakäsittelyn kokeneet yksilöt otettiin vielä lähempään tarkasteluun. Koska sekä koiraiden että naaraiden tulos oli ollut käsittelyssä samansuuntainen, sukupuoli yhdistettiin, samoin kuin kaksi mittauslämpötilaa. *Pgi*-genotyypin, sukupuolen ja mittauslämpötilan vaikutusta testattiin yleistetyllä lineaarisella mallilla.



Kuva 8. Lentometaboliala 15°C lämpötilakäsittelyn yksilöillä. Aineistossa on yhdistetty koiraiden ja naaraiden mittaukset, samoin kuin kaksi eri mittauslämpötilaa. Valkoinen palkki *Pgi*-AC, harmaalla *Pgi*-AA.

Taulukko 5. *Pgi*-genotyypin, sukupuolen ja mittauslämpötilan vaikutus 15°C:n lämpötilakäsittelyn kokeneiden yksilöiden lentometaboliaan.

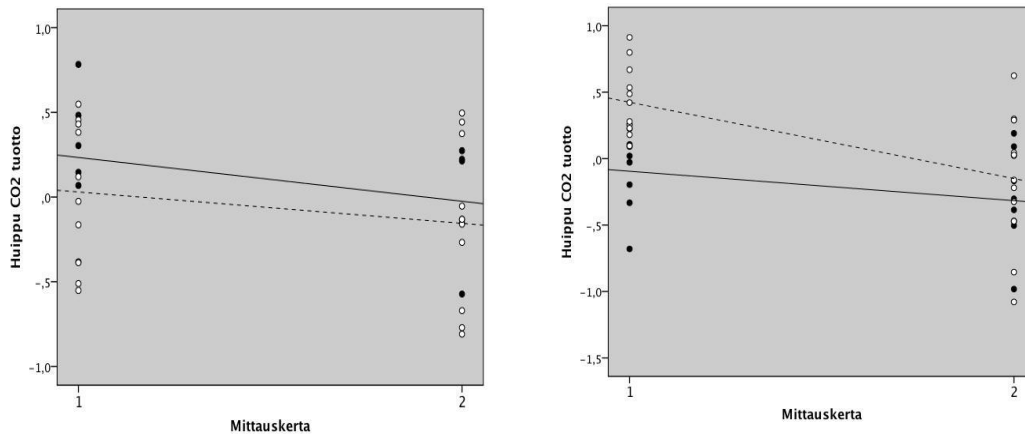
	Tyypin III neliösummat	df	Neliökeski- arvo	F	P
Sukupuoli	0,015	1	0,015	0,155	0,696
<i>Pgi</i>	0,434	1	0,434	0,434	0,043
Mittauslämpötila	0,000	1	0,000	4,347	0,057

Testin mukaan (taulukko 5) *Pgi*-genotyypillä on merkitsevä päävaikutus ($p=0,043$), mutta sen sijaan sukupuolen ja mittauslämpötilan vaikutukset eivät olleet merkitseviä.

Mitatun huippuhiilidioksidituoton lisäksi tarkasteltiin myös lentosuorituksen aikaista kokonaishiilidioksidituottoa. Tässäkin selitettävä muuttuja oli residuaali, josta aikuispainon vaikutus oli poistettu. Tulosten mukaan *Pgi*:llä ja perhosen kokemalla käsittelylämpötilalla ei ollut merkitsevää yhdysvaikutusta. Sen sijaan koirilla sekä käsittely- että mittauslämpötilalla oli merkitsevät päävaikutukset ($p=0,004$, $p=0,033$). Naarilla vain lentoa edeltänyt käsittelylämpötila oli merkitsevä ($p=0,004$). Yksilöiden tuottama kokonaishiilidioksidimäärä kokeen aikana oli suurempi korkeamman lämpötilakäsittelyn kokeneilla kuin matalassa lämpötilassa olleilla perhosilla. Myös kahden eri mittauslämpötilan välillä oli ero. Korkeammassa (35°C) mittauslämpötilassa mitattujen perhosten hiilidioksidin kokonaistuotannon nousu käsittelylämpötilan vaikutuksesta oli selvempi kuin 30°C mitatuilla yksilöillä.

3.3 Toistomittauksen, mittauslämpötilan ja -järjestyksen vaikutus lentometaboliaan

Osalle kokeen perhosista ($n=36$) lentomittaus suoritettiin kahdesti. Ensimmäisen mittauskerran jälkeen perhonen palautettiin alkuperäiseen käsittelylämpötilaan, ja seuraavana päivänä mittaus toistettiin eri mittauslämpötilassa kuin ensimmäisellä kerralla. Tällä haluttiin selvittää, vaikuttaako aiempi mittaus toiseen mittauskertaan, ja onko mittauslämpötilalla ja -järjestyksellä merkitystä perhosen lentosuoritukseen. Tuloksia testattiin käyttämällä lineaarista sekamallia, missä selitettävä tekijä oli hiilidioksidin tuotto, kiinteinä selittävinä tekijöinä mittauskerta ja – lämpötila. Yksilön numero laitettiin satunnaismuuttujaksi, jolloin malli otti huomioon toistomittauksen. Kaikki tekijät muutettiin testiä varten luokkamuuttujiksi. Malliin otettiin mukaan mittauskerran ja -lämpötilan päävaikutukset, sekä näiden yhdysvaikutus. Käytössä oli tyyppi III neliösumma. Tulosten visualisointia varten yksilöt jaettiin kahteen luokkaan sen mukaan, kummassa lämpötilassa ensimmäinen mittaus suoritettiin. Ensimmäisessä luokassa olevat perhoset mitattiin ensin alemmassa mittauslämpötilassa (30°C) ja seuraavana päivänä korkeammassa (35°C), toisessa luokassa päinvastoin. Koiraiden ja naaraiden tulokset käsiteltiin erikseen (kuva 9).



Kuva 9. Toistomittauksen, mittauslämpötilan ja -järjestyksen vaikutus täpläverkkoperhosen lentometaboliaan. Y-akselilla on esitetty hiilidioksidin tuottonopeuden huippu korjattuna yksilöiden kotolopainoilla, x-akselilla mittauksen järjestysnumero. Vasemmanpuoleisessa kuvassa koiraat, oikealla naaraat. Mittausluokka 1: ensimmäinen mittaus 30°C, toinen 35°C, on esitetty mustilla ympyröillä ja yhtenäisellä viivalla. $R^2=0,13$ koirilla ja $R^2=0,11$ naarailla. Mittausluokka 2: ensimmäinen mittaus 35°C, toinen 30°C, on esitetty valkoisilla ympyröillä ja katkoviivalla. $R^2=0,04$ koirilla ja $R^2=0,37$ naarailla.

Taulukko 6. Mittauskerran ja -lämpötilan vaikutus lentometaboliaan. Selitettävänä tekijänä hiilidioksidituoton huippu korjattuna yksilön kotolopainolla. Yksilö oli mallissa mukana satunnaistekijänä.

	Selitettävä	Selittäjät	F	P
Koiraat	CO2 tuotto	Mittauslämpötila	0,056	0,815
		Mittauskerta	2,037	0,165
		Mittauslämpötila*Mittauskerta	1,158	0,291
Naaraat	CO2 tuotto	Mittauslämpötila	2,190	0,148
		Mittauskerta	11,123	0,002
		Mittauslämpötila*Mittauskerta	8,253	0,007

Tulokset osoittavat, että kummankin sukupuolen yksilöt ovat luokasta riippumatta lentäneet paremmin ensimmäisellä mittauskerralla riippumatta siitä, oliko mittauslämpötila korkeampi ensimmäisellä vai toisella mittauskerralla (kuva 9). Naaraista paremmin ovat lentäneet yksilöt, jotka mitattiin ensin korkeammassa lämpötilassa. Kuvan perusteella nähdään myös, että korkeammassa mittauslämpötilassa ensin mitatuilla naarailla lentosuorituksen heikkeneminen toiseen mittaukseen mennessä on kaikkein selkeintä.

Naarailla mittauskerran ja -lämpötilan yhdysvaikutus antoi merkitsevän tuloksen ($p=0,007$) (taulukko 6). Interaktion lisäksi myös mittauskerran vaikutus oli naarailla merkitsevä ($p=0,002$). Mittauslämpötilalla ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta. Koirilla kumpikaan testatuista päävaikutuksista eikä niiden interaktio ollut merkitsevä. Tässä testissä käytettiin hiilidioksidin huipputuottoa korjattuna yksilön kotelopainolla. Tulokset olivat samanlaiset myös kokonaishiilidioksidin osalta. Myös painokorjausten suhteen tulokset olivat samankaltaiset riippumatta käytettiinkö yksilön kotelo- vai aikuispainoa.

4 TULOSTEN TARKASTELO

Täpläverkkoperhosen eri *Pgi*-genotyyppien välillä tiedetään olevan eroja niiden lämpötilaherkkyudessa (Saastamoinen & Hanski 2008, Niitepõld 2010). Aiemmissä kokeissa on mitattu lennonaikaisen lämpötilan vaikutusta perhosen lentosuoritukseen. *Pgi*-genotyypin ja mittauslämpötilan todettiin vaikuttavan merkittävästi lentometaboliaan, niin että AC-heterotsygoottien lentometabolioita oli viileissä lämpötiloissa korkeampi kuin AA-homotsygooteilla (Niitepõld 2010). Tässä gradutyössä selvitettiin lentoa edeltävän ajan olosuhteiden vaikutusta perhosen lentosuoritukseen, mitä ei tutkittu aikaisemmin. Perhosia altistettiin kaksi vuorokautta ennen lentomittauksia erilaisille lämpötiloille. Tarkoituksena oli selvittää, kuinka herkkiä perhoset ovat vaihteleville olosuhteille ja kuinka erilaiset olosuhteet vaikuttavat yksilön lentosuoritukseen.

4.1 *Pgi*-genotyypin ja lämpötiläkäsittelyn vaikutus lentometaboliaan

Tulokset osoittavat, että ennen lentomittausta koetulla lämpötiläkäsittelyllä on huomattava vaikutus täpläverkkoperhosen lentoaineenvaihduntaan. Lämpötiläkäsittelyn vaikutus oli erilainen eri *Pgi*-genotyyppien välillä. Yleisesti ottaen perhoset, jotka viettivät kaksi vuorokautta ennen koetta matalassa lämpötiläkäsittelyssä lensivät huomattavasti huonommin kuin korkeammassa lämpötilassa olleet perhoset. Erilaiset lämpötiläkäsittelyt ennen lentometaboliomittauksia vaikuttivat eri *Pgi*-genotyyppien välillä siten, että *Pgi*-AC yksilöt lensivät *Pgi*-AA yksilöitä paremmin, kun perhoset olivat kokeneet matalan lämpötiläkäsittelyn, kun taas *Pgi*-AA yksilöt suoriutuivat *Pgi*-AC yksilöitä paremmin korkean lämpötiläkäsittelyn jälkeen. Tulokset osoittivat erityisen selkeän eron genotyyppien välillä matalan lämpökäsittelyn (15°C) yksilöillä. Keskimääräisessä lämpötilassa (24 °C) olleiden perhosten lentometaboliatasossa esiintyi paljon vaihtelua, eikä genotyyppien välillä ollut systemaattista eroa. Tulos *Pgi*-genotyyppien lämpötilaherkkyyseroista on samansuuntainen kuin aikaisemmissä kokeissa, joissa mitattiin lentometaboliomittauksen aikaisen lämpötilan vaikutusta perhosen lentometabolian tasoon (Niitepõld 2010). Tulokset olivat *Pgi*-genotyyppien osalta samansuuntaiset kuin tämän tutkimuksen kokeissa. Matalassa

mittauslämpötilassa *Pgi AC* perhoset lensivät paremmin kuin *Pgi AA* yksilöt, mutta korkeammissa lämpötiloissa *Pgi AA* yksilöt suoriutuivat paremmin. Tuloksia tarkastellessa ei voida myöskään poissulkea vaihtoehtoa että tulos liittyisi osaksi yksilönkehitykseen. Lämpötilakäsittelyt tehtiin nuorille, hiljattain kuoriutuneille perhosille. Saattaa olla että lämpimässä käsittelyssä olleet perhoset pystyivät nopeuttamaan lentolihasensa kehitystä, mikä näkyisi parempana lentona. Täpläverkkoperhosen lihasproteiini troponiini t:ssä tiedetään tapahtuvan iän mukana muutoksia, ja isoformi *Tnt A:n* määrä korreloi positiivisesti perhosen aktiivisuuden kanssa (Marden et al. 2008).

Yhteenvedona voidaan todeta, että tämän tutkimuksen keskeinen tulos on kuinka kahden eri *Pgi*-genotyypin erot tulivat esille. Aikaisemmat tutkimukset ovat kohdistuneet vain lentometaboliomittauksen aikaisen lämpötilan vaikutukseen, kun taas tässä kokeessa testattiin ensimmäistä kertaa miten lentoa edeltäneet olosuhteet vaikuttavat lentosuoritukseen. Kokeen tulokset osoittivat, että molemmissa tapauksissa *Pgi*-genotyypit eroavat toisistaan samalla tavalla. Toisin sanoen, perhosten suoritukseen vaikuttavat myös ne olosuhteet mitkä ne ovat kokeneet ennen tietyllä hetkellä tapahtuvaa lentoa, mutta genotyypin ja lämpötilan vuorovaikutus on molemmissa tapauksissa samanlainen.

Kokeissa mitattiin sekä hiilidioksidituoton huippu, joka esiintyy pian lennon alkamisen jälkeen, että perhosen lennon aikana tuottama kokonaishiilidioksidituotto. Kokonaishiilidioksidituotto kertoo huipputuottoa paremmin yksilön kyvystä ylläpitää pitkäkestoisempaa lentoa. Tulokset osoittavat, että myös tällä muuttujalla arvioituna ennen lentomittausta koetulla lämpötilakäsittelyllä oli vaikutusta perhosen lentometaboliaan. Perhoset lensivät sitä paremmin, mitä korkeamman käsittelylämpötilan ne olivat kokeneet. Kuitenkin toisin kuin huippuhiilidioksidituoton tapauksessa, *Pgi*-genotyypillä ei ollut merkitystä yksilöiden tuottamaan kokonaishiilidioksidimäärään.

Ahvenanmaalla vallitsee pohjoinen lauhkea ilmasto, joten kokeessa käytetyt lämpötilat vastaavat hyvin täpläverkkoperhosen luonnossa kokemia olosuhteita. Luonnossa perhoset nostavat ruumiinlämpöään keräämällä ruumiiseensa auringon säteilyä maassa tai kivillä siivet auki istuen. *Pgi-AC* yksilöillä on etua pohjoisissa ilmasto-oloissa kyvystään lentää paremmin matalammissa lämpötiloissa kuin *Pgi-AA* yksilöt (Niitepöld 2010). Täpläverkkoperhosen ruumiinlämpötilaa on mitattu kenttäkokeessa lämpökameran avulla (Saastamoinen ja Hanski 2008). Lennosta pyydystetyillä perhosilla mitattu keskimääräinen ruumiinlämpötila oli 30,1°C

(harvoin yli 33°C), missä lämpötiloissa *Pgi-AC* yksilöillä on etua. Luonnollisissa olosuhteissa Ahvenanmaalla *Pgi-AA* yksilöillä voi olla lentoetu puolellaan todella kuumina päivinä. Tällöinkin *Pgi-AC* yksilöt voivat hyötyä kyvystään aloittaa lentäminen jo aiemmin aamupäivällä, jolloin lämpötilat ovat vielä matalampia.

Täpläverkkoperhosella koiraiden ja naaraiden liikkumiseen kohdistuu erilaiset valintapaineet (Hanski et al. 2006). Siten dispersaalin ja muun liikkumisen edut ja kustannukset eroavat eri sukupuolilla. Täpläverkkoperhosella naaraat parittelevat yleensä vain kerran ja jo pian kuoriutumisen jälkeen (Boggs & Nieminen 2004). Tästä seuraa, että naaraat jotka dispersoivat ja saapuvat tyhjille habitaattilaikuille ovat yleensä jo paritelleet. Koirailta ei näin ollen ole suurta hyötyä lentää tyhjille laikuille, sillä niiltä löytyvät naaraat ovat jo ehtineet paritella (Hanski et al. 2006). Tähystely ja partiointi ovat perhoskoirilla esiintyvää parittelukumppanin etsintään liittyvää käyttäytymistä (Wahlberg et al. 1995). Vähemmän aktiivista liikkumista vaativassa tähystelykäyttäytymisessä koiras on asettunut joko maahan tai kasville tarkkailemaan ohilentäviä naaraita. Koiras lähtee lentoon mahdollisen parittelukumppanin havaittuaan. Partiointikäyttäytymisessä koiras lentelee laajasti habitaattilaikulla etsien parittelukumppania. Huomioiden koiraiden ja naaraiden erilaisen lentokäyttäytymisen, ei ole yllättävää, että hyvä lentokyky (korkea lentometabolia) vaikuttaa eri tavalla koirilla ja naarilla. Eroja sukupuolten välillä on löydetty tutkimuksissa, joissa perhosten lentometaboliatasoa verrattiin yksilöiden liikkumiin matkoihin luonnossa (Haag et al. 2005, Niitepõld et al. 2011). Tulokset viittaavat siihen, että täpläverkkoperhosnaarilla korkea lentometaboliataso liittyy pitkiin lentosuorituksiin luonnossa (Haag et al. 2005, Niitepõld et al. 2009). Niinpä hyvin lentävät naaraat levittäytyvät todennäköisimmin pois syntymäkedoltaan ja perustavat uusia populaatioita. Tätä tukee se, että naarilla jotka ovat peräisin uusista populaatioista on korkeampi lentometaboliataso kuin vanhoista populaatioista peräisin olevilla naarilla. Sen sijaan koirilla lentometabolia ja luonnossa liikuttu matka korreloivat negatiivisesti (Niitepõld et al. 2011). Yksilöt joilla oli korkea lentometaboliataso, lensivät kenttäkokeessa vähemmän ja lyhyempiä matkoja kuin yksilöt joilta mitattiin matala lentometaboliataso. Tämä tulkittiin siten, että ne koiraat joilla on korkea lentometabolia pyrkivät valloittamaan parhaat territoriot, eivätkä ne siitä syystä lennä pitkiä matkoja. Samansuuntainen sukupuolten välinen ero havaittiin kun tutkittiin *Pgi*-genotyypin yhteyttä lentoon. Naaraat joilla on hyvään lentokykyyn liittyvä AC genotyyppi liikkuvat enemmän kuin AC koiraat (Niitepõld et al. 2011).

Täpläverkkoperhosten liikkuvuus vaihtelee populaation iän ja kytkeytyneisyyden mukaan (Hanski et al. 2004). Eri-ikäisistä populaatioista peräisin olevien täpläverkkoperhosten liikkuvuutta on tutkittu kenttäkokeessa harmonisen tutkan avulla (Ovaskainen et al. 2008). Kokeeseen valittiin naaraita sekä uusista että vanhoista (yli 5 vuotta) populaatioista. Uusista populaatioista peräisin olevat naaraat olivat kokeen tulosten mukaan muita liikkuvampia. Yksittäiset liikutut matkat olivat pituudeltaan yhtä pitkiä, mutta uusien populaatioiden yksilöt liikkuiivat useammin. Kahden tunnin aikana liikuttu matka oli uuden populaation naaraalla keskimäärin 1850 metriä, kun vanhasta populaatiosta peräisin olevalla yksilöllä liikuttu matka oli vain 460 metriä. Ahvenanmaan laikkuverkostossa jokaisesta laikusta noin kilometrin säteellä on keskimäärin 23 muuta laikkua (Ovaskainen 2004). Naaras vierailee elinaikanaan korkeintaan parilla muulla laikulla synnyinpaikkansa lisäksi (Hanski 1999).

Lammin biologisella asemalla suoritetuissa häkkikokeissa on tutkittu jo useiden vuosien ajan täpläverkkoperhosten elinkierto-ominaisuuksia, mukaan lukien yksilöiden liikkuvuus. Eräässä tällaisessa kokeessa verrattiin perhosia jotka olivat peräisin erilaisista populaatiotaustoista (Duploux et al. 2013). Kokeen perhoset olivat peräisin joko pirstoutuneesta elinympäristöstä tai yhtenäisistä elinympäristöistä. Yksilöiden liikkuvuus mitattiin häkissä tehtyjen linjahavaintojen perusteella. Lisäksi osalta perhosia mitattiin niiden lentometabolianopeus. Tulokset erosivat yhtenäisten ja pirstoutuneiden elinympäristöjen perhosten osalta selvästi toisistaan. Lentometabolian taso oli alhaisempi yhtenäisen elinympäristön perhosilla, mikä viittaa siihen, että pirstoutuneissa elinympäristöissä elävillä perhosilla on parempi lentokapasiteetti. Häkkikokeessa kaikkien populaatioiden koiraat olivat naaraita liikkuvampia, mutta pirstoutuneen elinympäristön koiraat olivat erityisen liikkuvaisia.

Tässä kokeessa perhoset olivat ilman ruokaa (hunaja-vettä) kaksi vuorokautta ennen lentometaboliamittausta. Häkeissä, joissa perhoset olivat lämpötilakäsittelyn ajan, oli kuitenkin jatkuvasti tarjolla vettä. Sokeripitoisen ravinnon puute on saattanut vaikuttaa perhosten suoriutumiseen lentomittauksissa. Päivittäin saadun ravinnon merkitys voi erota merkittävästi eri *Pgi*-genotyyppien välillä (Ilkka Hanski suul. tied. 19.12.2013). On syytä olettaa, että *Pgi-AC* yksilöt ovat riippuvaisempia jatkuvasta energiansaannista kuin *Pgi-AA* yksilöt. *Pgi-AA* yksilöt ilmeisesti varastoivat ravinnosta saatua energiaa eri tavalla jo toukkavaiheessa, mistä osoituksena eri genotyyppien välillä on ero niiden kotelopainossa (Kallioniemi & Hanski 2011, Saastamoinen et al. 2013). Tämän kokeen lentometaboliamittauksia ajatellen voidaan epäillä, että *Pgi-AA* yksilöt ovat saattaneet saada

etua ruokinnan puuttumisesta. Olisivatko *Pgi-AC* yksilöt lentäneet vielä paremmin, jos perhosia olisi ruokittu, ja näin ollen kahden genotyypin erot lentometaboliassa olisivat tulleet vielä selvemmin esiin? Kysymys on mielenkiintoinen, ja tulevissa tutkimuksissa tullaan varmasti selvittämään ravinnonsaannin merkitystä eri *Pgi*-genotyyppien menestymiselle. Toisaalta ruokinnan puuttuminen ei vaikuttanut eri lämpötilakäsittelyn kokeneiden välillä lentoon kovin dramaattisesti, sillä vaikutuksen olisi odottanut olevan suurempi korkeassa lämpötilassa olleilla perhosilla, joiden energian kulutus on korkeampi kuin viileässä olleilla yksilöillä. Ravinnon riittävyys ei kuitenkaan ollut ongelma, sillä korkeassa lämpötilassa olleet perhoset lensivät silti hyvin.

4.2 Toistomittauksen vaikutus lentometaboliaan

Osalla perhosista lentometaboliomittaus toistettiin seuraavana päivänä ensimmäisestä mittauksesta. Tavoitteena oli selvittää aiemman mittauksen vaikutusta toiseen mittaukseen. Lisäksi testattiin onko mittauslämpötilalla (30°C ja 35°C) ja järjestyksellä vaikutusta lentometaboliaan. Ensimmäisen lentometaboliomittauksen jälkeen perhonen palautettiin alkuperäiseen lämpötilakäsittelyynsä odottamaan seuraavan päivän uudelleenmittausta. Toinen lentometaboliomittaus suoritettiin eri lämpötilassa kuin ensimmäinen mittaus.

Tulokset osoittivat, että yksilöt lensivät kaikissa ryhmissä paremmin ensimmäisellä mittauksella. Naarilla lentosuorituksen heikkeneminen toiseen mittaukseen havaittiin selvemmin kuin koirilla. On mahdollista, että lentosuoritus aiheuttaa perhoselle jonkin verran ylimääräistä stressiä. Vaikka mittauksen kesto (10 min) ei ollut kovin pitkä, saattoi osassa perhosia havaita huomattavaa väsymystä jo muutaman minuutin jälkeen. Perhosen kokemaan huomattavaan rasitukseen viittaa se, että jo 10 minuutin lento johtaa muutoksiin geenien ekspressiossa, jotka näkyvät vielä 20 tunnin kuluttua (J. Kvist ym. käsikirjoitus). Aiemman mittauksen näin selkeä vaikutus toiseen mittaukseen ei ollut kuitenkaan odotettua. Tässä tutkimuksessa saatu tulos on myös ristiriidassa aikaisemman tutkimustiedon kanssa, jonka mukaan täpläverkkoperhosella lentometaboliataso on toistettava ominaisuus (Niitepõld & Hanski 2013). Kahdessa eri kokeessa perhosten lento- ja lepometabolian mitattiin toistuvasti, toisessa kokeessa joka toinen päivä, toisessa kuuden päivän välein. Mittauksia jatkettiin koko perhosen eliniän. Tulosten mukaan mittaus on toistettavissa.

Syy siihen miksi tässä kokeessa toinen mittauskerta tuotti ensimmäistä alhaisemman tuloksen saattaa liittyä perhosten ruokailuun. Tässä kokeessa perhosia ei ruokittu hunajalla kahden mittauksen välissä, vaan niille oli juomasienessä tarjolla ainoastaan vettä. Ruokinnan puuttuminen eroaa Niitepöldin aiemmin toteuttamasta koeasetelmasta, missä suoritettiin toistomittauksia. Sokeripitoisen ravinnon puuttuminen perhosen palautumisvaiheessa kahden mittauksen välissä saattaa olla selitys aiemmista tutkimuksista poikkeaville tuloksille. Ravinnonsaannin merkitystä käsiteltiin myös aikaisemmin jaksossa 4.1.

4.3 Virhelähteet

Tieteellisissä kokeissa on aina omat mahdolliset virhelähteensä, jotka täytyy ottaa huomioon sekä tulosten arvioinnissa että tulevien samantapaisten kokeiden suunnittelussa. Tämän tutkimuksen koeasetelma oli etukäteen huolellisesti suunniteltu, mutta työn edetessä ja jälkikäteen arvioiden tulee esiin seikkoja, jotka olisi voitu tehdä toisella tavalla. Tarkkakaan suunnittelu ei poista epävarmuustekijöitä, joita esiintyy kun tutkitaan ennen tutkimattomia asioita.

Aineiston otoskoko oli riittävä, mutta luonnollisesti vastaavanlaisen kokeen suorittaminen isommalla määrällä yksilöitä lisäisi luotettavuutta. Tässä kokeessa varsinkin mitattujen naaraiden lukumäärä jäi suhteellisen pieneksi, koska yksilöt jakaantuivat moniin eri käsittelyryhmiin. Toistomittausten lukumäärä oli myös suhteellisen pieni yleistävien johtopäätösten vetämiseksi. Toisaalta koska mittaukset suoritti yksi henkilö (tekijä), päivittäinen mittauskapasiteetti tulee nopeasti rajoittavaksi tekijäksi. Tätä ongelmaa voisi vähentää porrastamalla toukkien kasvatuksia, jolloin aikuisten kuoriutuminen ajoittuisi pidemmälle aikavälille. Koemateriaalin kasvatukseen liittyy yllättäviä epävarmuustekijöitä, joita varten koemateriaalia tulisi kasvattaa yli mittauksiin suunnitellun yksilömäärän. Tässä kokeessa osa toukista kuoli kasvatusten loppupuolella tuntemattomaksi jääneestä syystä. Lisämateriaalin kasvattaminen oli tässä vaiheessa koetta myöhäistä. Tästä syystä kokeen yksilömäärä jäi hieman pieneksi kuin suunniteltiin, eikä kokeen yksilöiden sukupuolijakauma ollut tasainen.

Koeasetelma sisälsi kuusi erilaista käsittelyryhmää: kolme erilaista lämpötilaa ennen lentometaboliomittauksia ja kaksi mittauksen aikaista lämpötilaa. Koe suoritettiin sekä koirilla että naarailla, joiden tulokset käsiteltiin erikseen. Vaikka yksilöiden jako eri käsittelyihin suoritettiin tasaisesti, ei jakovaiheessa voitu ottaa huomioon yksilöiden genotyyppejä, jotka määritettiin vasta mittausten jälkeen. Tästä johtuen osa käsittelyryhmistä jäi vain muutaman yksilön suuruiseksi tai kokonaan puuttumaan (varsinkin naaraiden osalta), kun genotyyppi otettiin analyysivaiheessa mukaan tarkasteluun. Kaikkein selvimmät erot lentometaboliassa *Pgi*-genotyyppien välillä saatiin matalan (15°C) lämpötilakäsittelyn kokeneiden yksilöiden välillä. Kokeessa käytetyt mittauslämpötilat olivat täpläverkkoperhosen lennon optimilämpötila (30°C) sekä tästä hieman korkeampi (35°C) mittauslämpötila. Koeasetelman mittauslämpötiloja jälkikäteen pohdittaessa tuli esille ajatus, että näiden kahden mittauslämpötilan lisäksi olisi mielenkiintoista tutkia lentoa ehkä vieläkin alhaisemmissa lämpötiloissa. Tulevaisuudessa vastaavissa kokeissa olisi mielenkiintoista tarkastella myös yksilöiden alueellista alkuperää. Tämän kokeen yksilöt valittiin satunnaisesti useista eri perheistä. Useilta eri vanhemmilta peräisin olevien jälkeläisten valinnalla haluttiin varmistaa, että aineistoon saadaan tasaisesti yksilöitä jotka edustaisivat kahta yleisintä *Pgi*-genotyyppiä. Ehkä kaikkein merkittävin kysymys vastaavien kokeiden osalta tulevaisuudessa liittyy aikuisten perhosten ruokailumahdollisuuteen, joka voi olla yhteydessä eri *Pgi*-genotyyppien menestykseen. Jälkikäteenkin ajatellen on kuitenkin selvä, että kaikkia mahdollisia tekijöitä ei olisi voitu sisällyttää tähän yhteen kokeeseen.

KIITOKSET

Suuret kiitokseni Prof. Ilkka Hanskille kaikesta avusta ja kärsivällisestä ohjauksesta tämän pitkäksi venyneen projektin kanssa. Kristjan Niitepõldille kiitos mielenkiintoisesta aiheesta, kokeen suunnittelusta, mittaustekniikan opetuksesta, tilastotieteen neuvomisesta ja tekstini kommentoinnista. Olet ollut huippuohjaaja sieltä kaukaa Atlantin toiselta puoleltakin. Kiitos myös Prof. Heikki Roiniselle kotiyliopistostani ohjauksesta ja kommenteista.

Suvi Ikoselle suuri kiitos avusta, tsemppaamisesta ja ystävyydestä. Kaiken minkä tiedän toukkien kasvatuksesta, olen oppinut sinulta. Viikin labralle kiitos näytteiden genotyypityksestä. Lammin biologista asemaa kiitän saamastani gradustipendistä, mukavaa henkilökuntaa seurasta ja keittiötä hyvistä ruoista. Haluan kiittää myös kaikkia niitä ihmisiä joiden kanssa olen työskennellyt MRG:n eri projekteissa graduni roikkuessa keskeneräisenä. Olette huipputyyppejä. Perheelleni kiitos kannustuksesta. Ystäville kiitos loputtomista keskusteluista gradunteon sietämättömästä helppoudesta. Olette rakkaat.

Kiitos täpläverkkoperhonen. Lennä!

LÄHDELUETTELO

- Boggs, C. & Nieminen, M. 2004: Checkerspot reproductive biology. – Teoksessa: Ehrlich, P.R. & Hanski, I. (toim.), *On the wings of Checkerspots: a model system of population biology*: 92-112. Oxford University Press. Oxford. 371s.
- Bowler, D. E. & Benton, T.G. 2005: Causes and consequences of animal dispersal strategies: relating individual behavior to spatial dynamics. – *Biological reviews* 80: 205-225.
- Clobert, J., Ims, R.A. & Rousset, F. 2007: Causes, mechanisms and consequences of dispersal. – Teoksessa: Hanski, I. & Gaggiotti, O.E. (toim.), *Ecology, Genetics and Evolution of metapopulations*: 307-335. Elsevier Academic Press. Amsterdam. 696s.
- Dahlhoff, E.P. & Rank, N.E. 2000: Functional and physiological consequences of genetic variation at phosphoglucose isomerase: Heat shock protein expression is related to enzyme genotype in a montane beetle. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* 29: 10056-10061.
- Duploux, A., Ikonen, S. & Hanski, I. 2013: Life history of the Glanville fritillary butterfly in fragmented versus continuous landscapes. – *Ecology and Evolution*. Doi: 10.1002/ece3.885.
- Haag, C.R., Saastamoinen, M., Marden, J.H. & Hanski, I. 2005: A candidate locus for variation in dispersal rate in a butterfly metapopulation. – *Proceedings of the Royal Society B*. 272: 2449-2456.
- Hanski, I. 1998: Metapopulation dynamics. – *Nature* 396: 41-49.
- Hanski, I. 1999: *Metapopulation ecology*. - 313 s. Oxford University Press. New York.
- Hanski, I. & Saccheri, I. 2006: Molecular-level variation affects population growth in a butterfly metapopulation. – *PLOS Biology* 4: 719-726.
- Hanski, I., Erälahti, C., Kankare, M., Ovaskainen, O. & Siren, H. 2004: Variation in migration propensity among individuals maintained by landscape structure. – *Ecology Letters* 7: 958-966.
- Hanski, I., Saastamoinen, M. & Ovaskainen, O. 2006: Dispersal-related life history trade-offs in a butterfly metapopulation. – *Journal of Animal Ecology* 75: 91-100.
- Heino, M. & Hanski, I. 2001: Evolution of migration rate in a spatially realistic metapopulation model. – *The American Naturalist* 157: 495-511.
- Kallioniemi, E. & Hanski, I. 2011: Interactive effects of Pgi genotype and temperature on larval growth and survival in the Glanville fritillary butterfly. – *Functional Ecology* 25: 1032-1039.
- Knulle, W. 2003: Interaction between genetic and inductive factors controlling the expression of dispersal and dormancy morphs in dimorphic astigmatic mites. – *Evolution* 57: 828-838.
- Kuussaari, M., Singer, M. & Hanski, I. 2000: Local specialization and landscape-level influence on host use in an herbivorous insect. – *Ecology* 81: 2177-2187.
- Kvist, J., Wheat, C.W., Kallioniemi, E., Saastamoinen, M., Hanski, I. & Frilander, M.J. 2013: Temperature treatments during larval development reveal extensive heritable and plastic variation in gene expression and life history traits. – *Molecular Ecology* 22: 602-619.
- Marden, J.H., Fescemyer, H.W., Saastamoinen, M., MacFarland, S.P., Vera, J.C., Frilander, M. & Hanski, I. 2008: Weight and nutrition affect pre-mRNA splicing of a muscle gene associated with performance, energetics and life history. – *The Journal of Experimental Biology* 211: 3653-3660.

- Merckx, T. & Van Dyck, H. 2007: Habitat fragmentation affects habitat-finding ability of the speckled wood butterfly, *Pararge aegeria* L. – *Animal Behaviour* 74: 1029-1037.
- Murphy, D.D., Wahlberg, N., Hanski, I. & Ehrlich, P.R. 2004: Introducing Checkerspots, *Taxonomy and Ecology*. – Teoksessa: Ehrlich, P.R. & Hanski, I. (toim.), *On the wings of Checkerspot: a model system of population biology*: 17-33. Oxford University Press. Oxford.
- Nathan, R. Getz, W.M., Revilla, E., Holyoak, M., Kadmon, R., Saltz, D. & Smouse, P.E. 2008: A movement ecology paradigm for unifying organismal movement research. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 19052-19059.
- Nieminen, M., Siljander, M. & Hanski, I. 2004: Structure and dynamics of *Melitaea cinxia* metapopulations. – Teoksessa: Ehrlich, P.R. & Hanski, I. (toim.), *On the wings of Checkerspots: a model system of population biology*: 63-91. Oxford University Press. Oxford. 371s.
- Niitepõld, K. 2009: Flight metabolic rate in the Glanville fritillary butterfly. – Väitöskirja. University of Helsinki. 89 s. Yliopistopaino. Helsinki.
- Niitepõld, K. 2010: Genotype by temperature interactions in the metabolic rate of the Glanville fritillary butterfly. – *The Journal of Experimental Biology* 213: 1042-1048.
- Niitepõld, K., Smith, A.D., Osborne, J.L., Reynolds, D.R., Carreck, N.L., Martin, A.P., Marden, J.H., Ovaskainen, O. & Hanski, I. 2009: Flight metabolic rate and genotype influence butterfly dispersal rate in the field. – *Ecology* 90: 2223-2232.
- Niitepõld, K., Mattila, A.L.K, Harrison, P.J. & Hanski, I. 2011: Flight metabolic rate has contrasting effects on dispersal in the two sexes of the Glanville fritillary butterfly. – *Oecologia* 165: 847-854.
- Niitepõld, K. & Hanski, I. 2013: A long life in the fast lane: positive association between peak metabolic rate and lifespan in a butterfly. – *The Journal of Experimental Biology* 216: 1388-1397.
- Ojanen, S.P., Nieminen, M., Meyke, E., Pöyry, J. & Hanski, I. 2013: Long-term metapopulation study of the Glanville fritillary butterfly (*Melitaea cinxia*): survey methods, data management, and long-term population trends. – *Ecology and Evolution* 3:3713-3737.
- Orsini, L., Wheat, C.W., Haag, C.R., Kvist, J., Frilander, M.J. & Hanski, I. 2009: Fitness differences associated with Pgi SNP genotypes in the Glanville fritillary butterfly (*Melitaea cinxia*). – *Journal of Evolutionary Biology* 22: 367-375.
- Ovaskainen, O., Smith, A.D., Osborne, D.R., Carreck, N.L., Martin, A.P., Niitepõld, K. & Hanski, I. 2008: Tracking butterfly movements with harmonic radar reveals an effect of population area on movement distance. – *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 19090-19095.
- Rank, N.E., Bruce, D.A., McMillan, D.M., Barclay, C., Dahlhoff, E.P. 2007: Phosphoglucose isomerase genotype affects running speed and heat shock protein expression after exposure to extreme temperatures in a montane willow beetle. – *The Journal of Experimental Biology* 210: 750-764.
- Rastas, P., Paulin, L., Hanski, I., Lehtonen, R. & Auvinen, P. 2013: Lep-MAP: fast and accurate linkage map construction for large SNP datasets. – *Bioinformatics* 29: 3128-3134.
- Ronce, O. & Olivieri, I. 2004: Life history evolution in metapopulations. – Teoksessa: Hanski, I. & Gaggiotti, O.E. (toim.), *Ecology, Genetics, and Metapopulation*: 227-257. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Saastamoinen, M. 2007a: Life-history, genotypic, and environmental correlates of clutch size in the Glanville fritillary butterfly. – *Ecological Entomology* 32: 235-242.

- Saastamoinen, M. 2007b: Mobility and lifetime fecundity in new versus old populations of the Glanville fritillary butterfly. – *Oecologia* 153: 569-578.
- Saastamoinen, M. 2008: Heritability and dispersal rate and other life history traits in the Glanville fritillary butterfly. – *Heredity* 100: 39-46.
- Saastamoinen, M. & Hanski, I. 2008: Genotypic and environmental effects on flight activity and oviposition in the Glanville fritillary butterfly. – *The American Naturalist* 171: 701-712.
- Saastamoinen, M., Ikonen, S., Wong, S.C., Lehtonen, R. & Hanski, I. 2013: Plastic larval development in a butterfly has complex environmental and genetic causes and consequences for population dynamics. – *Journal of Animal Ecology* 82: 529-539.
- Suarez, R. K. 2000: Energy metabolism during insect flight: biochemical design and physiological performance. – *Physiological and Biochemical Zoology* 73: 765-771.
- Vera, J.C., Wheat, C.W., Fescemyer, H.W., Frilander, M.J., Crawford, D.L., Hanski, I. & Marden, J.H. 2008: Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing. – *Molecular Ecology* 17: 1636-1647.
- Wahlberg, N. 1995: The reproductive biology of the Glanville fritillary. – *Baptria* 20: 181-187.
- Watt, W.B. 1977: Adaptation at specific loci. I. Natural selection on phosphoglucose isomerase of *Colias* butterflies: biochemical and population aspects. – *Genetics* 87: 177-194.
- Watt, W.B., Wheat, C.W., Meyer, E.H. & Martin, J.-F. 2003: Adaptation at specific loci. VII. Natural selection, dispersal and the diversity of molecular-functional variation patterns among butterfly species complexes (*Colias*: Lepidoptera, Pieridae). – *Molecular Ecology* 12: 1265-1275.
- Wheat, C.W., Fescemyer, H.W., Kvist, J., Tas, E., Vera, J.C., Frilander, M.J., Hanski, I. & Marden, J.H. 2011: Functional genomics of life history variation in a butterfly metapopulation. – *Molecular Ecology* 20: 1813-1828.
- Zera, A.J. & Denno, R.F. 1997: Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects. – *Annual Review of Entomology* 42: 207-230.