

*Tischeria ekebladella* -perhosen  
metapopulaatiorakenne

Karita Jessica Haapasalo  
Helsingin yliopisto/  
Bio- ja ympäristötieteet  
Biotieteellinen tiedekunta  
Ekologia ja evoluutiobiologia  
Syventävien opintojen tutkielma  
syyskuu 2006

# HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos – Institution – Department	
Biotieteellinen tiedekunta/ Ekologia ja evoluutiobiologia		Bio- ja ympäristötieteiden laitos	
Tekijä – Författare – Author			
Karita Jessica Haapasalo			
Työn nimi – Arbetets titel – Title			
<i>Tischeria ekebladella</i> -perhosen metapopulaatorakenne			
Oppiaine – Läroämne – Subject			
Ekologia ja evoluutiobiologia			
Työn laji – Arbetets art – Level	Aika – Datum – Month and year	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages	
Syventävien opintojen tutkielma	Syyskuu 2006	30 (+1)	
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Monet lajit esiintyvät useana toisistaan osittain eristäytyneenä paikallispopulaationa, joiden välillä tapahtuu yksilöiden välistä muuttoliikettä. Tämä muuttoliike yhdistää saman lajin paikallispopulaatiot geneettisesti ja/tai toiminnallisesti toisiinsa siinä määrin, että ne voidaan luokitella kuuluvaksi yhteen yhtenäiseen metapopulaatioon. Metapopulaation säilymiseen vaikuttavat useat tekijät, joista muuttoliikkeen aiheuttama geenivirta eli alleelien siirtyminen populaatiosta toiseen on keskeisessä osassa. Valinta suosii usein tietynlaisia yksilöitä ja pyrkii vähentämään geneettisen muuntelun määrää, kun taas migraatio tuo populaatioihin uusia alleleja lisäten geneettisen muuntelun määrää. Alleelifrekvenssien avulla voidaan siis päätellä kuinka kytkeytyneitä populaatiot ovat toisiinsa, kuinka paljon niiden välillä tapahtuu migraatiota ja kuinka paljon valinnalla on vaikutusta populaation geneettiseen koostumukseen. Näiden tekijöiden selvittäminen voi antaa tietoa koko metapopulaation rakenteesta ja siitä, kuinka elinkykyinen populaatio on nyt, ja kuinka ympäristöolosuhteiden muutokset voivat vaikuttaa populaation elinkykyyn tulevaisuudessa.</p> <p>Tämän työn tarkoituksena oli selvittää tammipuihin (<i>Quercus robur</i>) erikostuneen <i>Tischeria ekebladella</i> -perhosen metapopulaatorakennetta Wattkastin saarella. Työssä keskityttiin tutkimaan sitä, ovatko perhosen paikallispopulaatiot migraation kautta kytkeytyneet toisiinsa, ja vaikuttaako valinta saaren populaatioiden geneettiseen koostumukseen ja yksilöiden kvantitatiivisiin ominaisuuksiin. Tutkimusongelman selvittämiseen käytettiin allotsyymimarkkereita fosfoglukomutaasi (<i>Pgm</i>) ja fosfogluukoosi-isomeraasi (<i>Pgi</i>). Näistä neutraaliksi oletetun markerilokuksen (<i>Pgm</i>) alleelifrekvenssien perusteella selvitettiin, millaisia yksilövirtoja eri paikalliskantojen ja puiden välillä esiintyy, sekä kuinka paikallispopulaatioiden etäisyys vaikuttaa geenivirran voimakkuuteen. Ei-neutraalin markerigeenin (<i>Pgi</i>) alleelifrekvenssien ja genotyyppifrekvenssien perusteella selvitettiin, kuinka erittäin eristäytyneiden vanhojen populaatioiden sekä vähemmän eristäytyneiden nuorten ja vanhojen populaatioiden yksilöt poikkeavat geneettisesti toisistaan. <i>Pgi</i>-lokukseen lisäksi valinnan mittana käytettiin erilaisten populaatioiden naarasyksilöiden suhteellista takaruumiin painoa. Tämän tarkoituksena oli selvittää, kohdistuuko tähän ominaisuuteen valintaa ja suosiiko valinta tiettyä <i>Pgi</i>-genotyyppiä.</p> <p>Tutkimustulokset osoittivat, että Wattkastin saaren <i>Tischeria ekebladella</i> -populaatio on suuri yhtenäinen metapopulaatio ja sen paikallispopulaatioita yhdistää jatkuva geenivirta. Tässä metapopulaatiossa isäntäpuut sijaitsevat perhoslajin leviämiskykyyn nähden varsin tiiviisti, mikä mahdollistaa yksilöiden dispersaalin paikallispopulaatiosta toiseen. Tiheimmissä tammikoissa perhospopulaatio muistuttaa yhtenäistä metapopulaatiota, jossa kaikki paikallispopulaatiot ovat kytkeytyneet tiiviisti toisiinsa. Laajemmassa mittakaavassa metapopulaatiossa voidaan havaita eristäytyneempiä paikallispopulaatioita, joiden koko vaihtelee ajallisesti ja paikallisesti. Tämän tutkimuksen tulosten perusteella <i>Pgi</i>-lokukseen kohdistuva valinta vaikuttaa voimakkaimmin näihin eristäytyneisiin yksittäisiin populaatioihin, joissa migraatio on vähäisempää kuin Wattkastin saaren metapopulaatiossa.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
<i>Tischeria ekebladella</i> , <i>Quercus robur</i> , metapopulaatio, allotsyymi			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

## SISÄLTÖ

1. Johdanto.....	3
1.1. Metapopulaatiot .....	3
1.2. Muuntelun mittaaminen metapopulaatioissa.....	6
1.2.1. Alleelifrekvenssit geenivirran ja luonnonvalinnan kuvaajana.....	6
1.2.3. Tilastolliset menetelmät populaatiotutkimuksessa.....	7
1.2.4. Allotsyymien käyttäminen populaatiotutkimuksissa .....	8
1.3. Tutkimuksen tavoitteet.....	9
2. Aineisto ja menetelmät .....	10
2.1. Tutkimuksen kohdelajit .....	10
2.2. Tutkimusalue ja perhosaineisto.....	11
2.3. Geneettiset menetelmät.....	12
2.4. Morfologiset mittaukset.....	13
2.5. Tilastolliset menetelmät .....	13
3. Tulokset.....	15
3.1. Perhosten kuoriutumismenestys.....	15
3.2. Populaatioiden geneettisen muuntelun jakauma .....	16
3.3. Populaatioiden morfologisen muuntelun jakauma .....	19
4. Tulosten tarkastelu .....	22
4.1 <i>Tischeria ekebladella</i> -perhosen metapopulaatorakenne.....	22
4.2. Luonnonvalinta <i>Tischeria ekebladella</i> -perhosen paikallispopulaatioissa .....	23
4.3. Virhelähteet ja kehitysmahdollisuudet.....	24
4.4. Johtopäätökset.....	25
5. Kiitokset.....	26
6. Kirjallisuusviitteet.....	27

## 1. Johdanto

Metapopulaatiolla tarkoitetaan tietyn lajin paikallispopulaatioiden joukkoa, jota yhdistää eri paikalliskantojen välillä tapahtuva migraatio eli yksilö- ja geenivirta (Hanski 1998a). Luonnossa yhä harvemmat lajit esiintyvät suurina yhtenäisinä kantoina pääosin siitä syystä, että ihmisen toiminta pirstoo aikaisemmin yhtenäisiä elinympäristöjä ympäri maailmaa (Hanski 2005). Pirstoutuneessa ympäristössä alun perin yhtenäiset populaatiot ovat jakautuneet useisiin paikallispopulaatioihin, jolloin lajin elossa säilyminen riippuu olennaisesti näiden paikallispopulaatioiden välisestä muuttoliikkeestä. Migraation kautta tyhjiksi jääneet habitaattilaikut voivat tulla asutetuiksi, mikä kompensoi paikallisia sukupuuttoja. Migraation kautta saadaan myös paikallispopulaatioihin uutta perimäainesta, mikä vähentää sisäsiittoisuutta ja tuo uutta materiaalia luonnonvalinnan raaka-aineeksi. Tämä puolestaan mahdollistaa populaation yksilöiden sopeutumista vallitseviin olosuhteisiin ja parantaa niiden vastustuskykyä esim. taudeille. Populaation rakenteella on siten huomattava vaikutus populaation dynamiikkaan ja pitkällä aikavälillä myös populaation evoluutioon. Tästä syystä metapopulaatiotutkimuksella on huomattava merkitys luonnonsuojelussa.

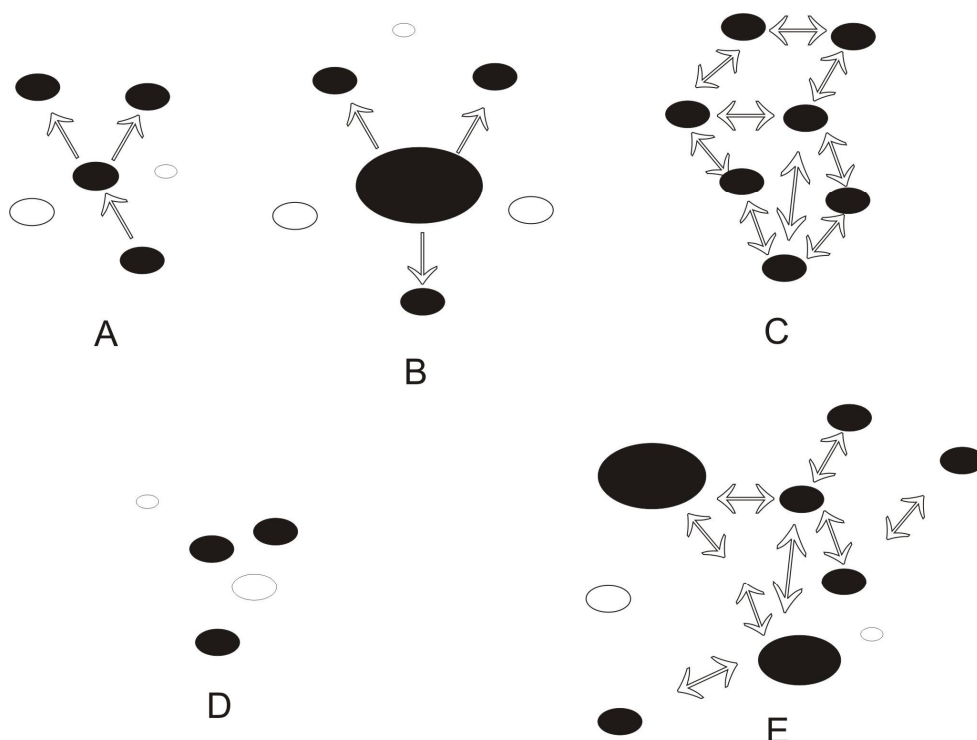
### 1.1. Metapopulaatiot

Luonnossa esiintyy hyvin paljon erilaisia metapopulaatioita, joiden vaste ympäristöolosuhteiden muutoksiin vaihtelee. Eri metapopulaatioiden dynamiikka riippuu mm. tarkasteltavasta lajista, ympäristön hetero-/homogeenisyydestä, paikalliskantojen koosta, lukumäärästä ja keskinäisestä sijainnista sekä ympäristöolojen vakaudesta. Metapopulaatioiden dynamiikan ymmärtämiseksi on kehitelty erilaisia malleja, joista kukin pyrkii kuvaamaan tietynlaista metapopulaatiota tietynlaisissa olosuhteissa (Harrison & Taylor 1997). Luonnossa kaikkia metapopulaatioita yhdistävät kuitenkin samat perusprosessit, mistä syystä näitä malleja on viime aikoina pyritty yhdistämään yhtenäiseen teoreettiseen viitekehykseen (Thomas & Kunin 1999, Ovaskainen & Hanski 2003).

Levinsin klassinen malli (KUVA 1A) on kehitetty kuvaamaan yhden lajin metapopulaatiodynamiikkaa. Sen mukaan metapopulaatio nähdään epävakaiden osapopulaatioiden joukkona, jonka säilyminen riippuu yksilöiden kyvystä asuttaa uusia

habitaattilaikkuja. Oletuksena on se, että kunkin paikalliskannan todennäköisyys hävitä sukupuuttoon on samansuuruinen. Samoin kunkin ennestään asumattoman habitaattilaikun todennäköisyys tulla asutetuksi oletetaan samansuuruiseksi. Manner-saari-malli (KUVA 1B) kuvaa metapopulaatiota, jonka säilyminen on riippuvainen isosta mannerpopulaatiosta. Mantereelta tapahtuva migraatio synnyttää uusia vähemmän vakaita paikalliskantoja pienimpiin ”saariin”, joista pienimmät todennäköisimmin häviävät, eikä niillä ole merkittävää vaikutusta metapopulaation säilymiselle (Harrison 1991). Tietyissä metapopulaatioissa (KUVA 1C) populaatiot ovat kuitenkin migraation kautta niin kytkeytyneitä toisiinsa, ettei todellisia osapopulaatioiden häviämisiä tapahdu. (Harrison & Taylor 1997).

Edellisissä malleissa oletuksena on, että habitaattilaikkujen uudelleenkolonisaatio estää metapopulaation häviämisen. Epävakaissa jäännemetapopulaatioissa (KUVA 1D) paikalliskannat ovat kuitenkin toisistaan niin eristyneet, ettei migraatiota juuri tapahdu. Nämä metapopulaatiot ovat siksi alttiita häviämään ympäristön pirstoutumisen seurauksena (Harrison & Taylor 1997).



KUVA 1. Erilaisia metapopulaatiomalleja: klassinen malli (A), manner-saari-malli (B), yhtenäinen metapopulaatio (C), epävakaaja jäännemetapopulaatio (D) ja realistinen metapopulaatio (E), jossa kaikki edelliset metapopulaatiomallit yhdistyvät. Modifioitu teoksesta Harrison & Taylor 1997.

Luonnossa esiintyvistä metapopulaatioista suurin osa lienee yhdistelmä näitä kaikkia malleja (KUVA 1E), joissa sekoittuvat sekä hyvin eristäytyneet että erittäin tiiviisti sijaitsevat habitaattilaikut. Useimmin metapopulaatiot ovat siten paikallisessa habitaattiverkostossa toimivia dynaamisia kokonaisuuksia, joissa habitaattilaikkujen laatu, koko ja eriytyneisyys vaihtelevat. Tällaisissa metapopulaatioissa paikalliset populaatiot kasvavat ja pienenevät, uusia populaatioita syntyy ja kuolee mikä johtaa siihen, että metapopulaation rakenne vaihtelee koko ajan (Thomas & Harrison 1992, Harrison & Taylor 1997).

Metapopulaation rakenteella on erittäin suuri merkitys lajin populaatiodynamiikkaan, ja siihen kuinka paljon populaatioiden välillä esiintyy geenivirtaa. Jos metapopulaatio on hyvin kytkeytynyt, se tarjoaa populaatiolle geenivirran kautta vaihtelua ja vaikuttaa ratkaisevasti populaation geneettisen muuntelun säilymiseen (Hanski 1999, Hanski ym. 2004). Geneettisellä stokastisuudella eli sattumalla on erityisen suuri vaikutus metapopulaation pieniin paikallispopulaatioihin, joista erityisesti sisäsiittoisuuden on osoitettu vaikuttavan populaation häviämistodennäköisyyteen (Saccheri ym. 1998, Nieminen ym. 2001). Vastavuoroisesti taas mutaatio ja migraatio voivat lisätä paikallisen muuntelun määrää (Frankham ym. 2002). Useiden eliölajien olemassaolo onkin erittäin riippuvainen metapopulaation kytkeytyneisyydestä, ja tästä syystä habitaattilaikkujen häviämisen ja elinympäristöjen pirstoutumisen on osoitettu vaikuttavan metapopulaatioiden säilymiseen (Hanski 1998b, Hanski & Saccheri 2006a). Joidenkin tutkimusten mukaan oletetaan, että useat lajit ajautuvat sukupuuttoon ennen geneettisten tekijöiden vaikutusta. Todisteita kuitenkin löytyy siitä, että keskimääräisen heterotsygotia-asteen perusteella voidaan arvioida populaatioiden alentunutta evoluutiopotentiaalia jo ennen niiden häviämistä (Spielman ym. 2004).

Evolutiivisesti ajatellen paikallispopulaatioiden välinen migraatio eli geenivirta määrittää sen, kuinka geneettisesti samankaltaisia paikallispopulaatiot ovat. Tätä paikallispopulaatioiden välistä geenivirtaa voidaan mitata suorasti seuraamalla lajin yksilöiden dispersaalia tai epäsuorasti mittaamalla populaation yksilöiden geneettisen vaihtelun määrää (Slatkin 1995).

## **1.2. Muuntelun mittaaminen metapopulaatioissa**

Kuten edellä on esitetty, yksilöiden muuttoliikkeet ja populaatioiden välinen geenivirta on metapopulaatioissa avainasemassa. Muuttoliikkeen mittaamiseksi perinteiset havainnoimismenetelmät ovat kuitenkin yleensä työläitä ja hitaita toteuttaa. Tästä syystä populaatiotutkimusta varten on kehitetty tehokkaampia tilastollisia menetelmiä, joiden tarkoituksena on arvioida populaatioiden välistä geenivirtaa ja geneettisen muuntelun määrää.

### **1.2.1. Alleelifrekvenssit geenivirran ja luonnonvalinnan kuvaajana**

Geenivirta yhdistää saman lajin populaatiojoukot toisiinsa ja estää niiden erilaistumista. Yksittäisille populaatioille migraatiolla voi olla erilaisia vaikutuksia, riippuen vastaanottavan populaation koosta ja tulokkaiden lähtöpopulaation laadusta. Geneettiseltä koostumukseltaan erilaisesta isosta populaatiosta tulevat yksilöt voivat muuttaa ratkaisevasti yksittäisen pienen populaation alleelifrekvenssejä ja tätä kautta vaikuttaa populaation evoluutioon. Toisaalta taas pienestä populaatiosta tulevien yksilöiden geeniviralla ei ole suurta vaikutusta isojen populaatioiden alleelifrekvensseihin (Freeman & Herron 2004, King 1993). Migraatio myös vähentää sattuman (geneettisen ajautumisen eli driftin) vaikutuksia pienissä populaatioissa, tuomalla yhteen alleelifrekvenssejä jotka ovat sattuman kautta ajautuneet erilleen (Freeman & Herron 2004).

Luonnonvalinnan merkitys perinnölliseen muunteluun voi olla päinvastainen geenivirtaan nähden, jos ympäristöolot eri paikallispopulaatioissa poikkeavat toisistaan. Se erottaa geneettisesti saman lajin populaatiot toisistaan lähinnä siksi, että se vähentää haitallisten alleelien määrää samalla kun se lisää selviytymisen kannalta hyödyllisten alleelien määrää populaatiossa. Valinta voi tässä mielessä muuttaa populaatioiden alleelifrekvenssejä ja johtaa tiettyjen alleelien fiksaatioon, häviämiseen tai joissakin tapauksissa säilyttää populaation geneettistä diversiteettiä (Freeman & Herron 2004).

Geneettisen ajautumisen, migraation ja valinnan tasapainolla voi olla merkittävä vaikutus populaatioiden väliseen erilaistumiseen ja geneettisen muuntelun määrään

(Phillips 1996). Erihaustumiseen vaikuttaa ratkaisevasti se kuinka voimakkaasta valintapaineesta on kysymys, kuinka suuri on geenivirran määrä ja mitkä ovat tulokkaiden alleelifrekvenssit. Tulokkaiden suuri yksilömäärä ja heikko valintapaine estävät tyypillisesti paikallisten sopeutumien muodostumista pitäen populaation alleelifrekvenssit monimuotoisempina. Päinvastaisessa tilanteessa paikallisia sopeutumia syntyy taas todennäköisimmin, mikä puolestaan vähentää alleelifrekvenssien monimuotoisuutta (Frankham ym. 2002).

### 1.2.3. Tilastolliset menetelmät populaatiotutkimuksessa

Hardyn-Weinbergin tasapainolaki luo tärkeän peruslähtökohdan populaatio-geneettiselle tutkimukselle. Laki määrittelee genotyyppien suhteellisen osuuden populaatioissa olettaen, ettei populaatiossa tapahdu valintaa, migraatiota tai mutaatioita. Populaation yksilöiden tulee lisäksi pariuua satunnaisesti. Siksi havaitut poikkeamat Hardyn-Weinbergin odotuksista paljastavat evolutiivisia voimia populaatiossa (Freeman & Herron 2004).

Hardyn-Weinbergin lain mukaan populaation heterotsygotia-aste (H) pysyy vakaana sukupolvesta toiseen. Erityisesti pirstoutuneessa populaatiossa havaittu heterotsygotia-asteen aleneminen ja suuret alleelifrekvenssien erot alapopulaatioiden välillä viittaavat siis geneettiseen ajautumiseen tai sisäsiittoisuuteen. Heterotsygotia voi osoittautua Hardyn-Weinbergin odotusta alhaisemmaksi tilanteessa, jossa sinänsä Hardyn-Weinbergin tasapainossa olevat paikallispopulaatiot ovat toisistaan osittain tai kokonaan eristäytyneet. Tätä kutsutaan Wahlundin vaikutukseksi (Saccheri ym. 1998, Frankham ym. 2002).

Wahlundin vaikutusta ja populaation pirstoutumista voidaan kuvata Wrightin (1921, 1965)  $F$ -arvoilla. Niiden avulla koko metapopulaation tasolla havaittu poikkeama Hardyn-Weinbergin tasapainosta (heterotsygotiavaje), voidaan jakaa koko populaation ( $F_{IT}$ ), paikallispopulaatioiden väliseen ( $F_{ST}$ ) ja paikallispopulaatioiden sisäiseen ( $F_{IS}$ ) osaan. Vertailemalla paikallispopulaatioiden välisen erilaistumisen astetta populaatioiden sisäiseen muunteluun saadaan tietoa siitä, kuinka paljon paikallispopulaatioiden välillä on geenivirtaa.  $F$ -arvot antavat myös tarkemmin tietoa



siitä, mikä on syynä populaation alentuneeseen heterotsygotia-asteeseen (Frankham ym. 2002).

Muuntelu populaation kvantitatiivisten ominaisuuksien osalta voidaan jakaa  $F$ -arvoja vastaaviin osiin.  $F_{ST}$ -arvoa vastaa siten  $Q_{ST}$ . Vertailemalla populaation geneettistä erilaistumisen astetta ( $F_{ST}$ ) ja kvantitatiivisten ominaisuuksien muuntelua keskenään, voidaan tehdä päätelmiä siitä, minkälaiset evolutiiviset voimat vaikuttavat populaation erilaistumiseen. Mikäli  $F_{ST} > Q_{ST}$ , voidaan olettaa populaatiossa tapahtuvan suuntaavaa valintaa tutkitun kvantitatiivisen ominaisuuden suhteen. Vastaavasti jos  $F_{ST} = Q_{ST}$  valinta on stabiloivaa, ja jos  $F_{ST} < Q_{ST}$  populaatiossa esiintyvä geneettinen eriytyminen johtuu geneettisestä ajautumisesta (Frankham ym. 2002, Merilä 1996, Merilä & Sheldon 1999).

#### 1.2.4. Allotsyymien käyttäminen populaatiotutkimuksissa

Useissa entsyymeissä esiintyy runsaasti polymorfiaa ja tätä kautta useita saman proteiinin muotoja (allotsyymejä eli isotsyymejä). Näitä saman proteiinin muotoja voidaan usein erottaa elektroforeesilla. Ensyymit koostuvat aminohapoista, jotka omaavat tietyn sähköisen nettovarauksen. Aminohappoa koodavassa DNA:ssa tapahtunut mutaatio muuttaa siten entsyymin nettovarausta, jolloin sen kulkeutumisenopeus sähkökentässä muuttuu. Tämän johdosta eri entsyymivariantit voidaan havaita käyttämällä geelielektroforeesia ja spesifistä entsyymivärjäystä (Hartl & Clark 1997, Kephart 1990).

Mitä enemmän entsyymeissä esiintyy polymorfiaa, sitä suurempi on populaation potentiaalinen heterotsygotia-aste tämän lokuksen suhteen. Entsyymeissä esiintyvän polymorfian avulla voidaan siten päätellä kuinka paljon populaatiossa esiintyy muuntelua, kuinka erilaistuneita paikallispopulaatiot ovat, tapahtuuko populaatiossa valintaa vai ei ja minkälainen on metapopulaation rakenne (Hartl & Clark 1997, Kephart 1990).

Migraation voimakkuutta voidaan mitata luonnonvalinnan kannalta neutraaleiksi oletettujen markkerigeenien avulla, joista tässä työssä käytetty fosfoglukomutaasi (*Pgm*) on esimerkki. Luonnonvalinnan esiintyminen tai sen puuttuminen taas on mahdollista

osoittaa fosfogluukoosi-isomeraasi entsyymimarkkerin (*Pgi*) avulla. Keltaperhosella (suku *Colias*; Watt 1992) ja täpläverkkoperhosella (*Melitaea cinxia*; Haag ym. 2005, Hanski & Saccheri 2006b) tämän lokuksen on havaittu vaikuttavan ratkaisevasti perhosen lentokykyyn, hedelmällisyyteen sekä muihin kelpoisuuteen vaikuttaviin tekijöihin.

*Pgi*-entsyymimarkkerin avulla on voitu mm. osoittaa, että täpläverkkoperhosella uusia paikallispopulaatioita perustavat yleensä vain kaikkein lentokykyisimmät yksilöt, jotka kantavat tiettyä *Pgi*-geenin alleelia (Hanski ym. 2004, Haag ym. 2005). Tämän lisäksi eri *Pgi*-genotyyppien on osoitettu vaikuttavan keltaperhosten hedelmällisyyteen (Watt 1992). *Pgi*-geenin vaihtelulla on siis suora vaikutus populaation yksilöiden hedelmällisyyteen, lentokykyyn, koko populaation käyttäytymiseen ja tätä kautta koko lajin metapopulaatiodynamiikkaan. Tämän perusteella voidaan olettaa, että monissa lajeissa *Pgi*-geeniin kohdistuu voimakasta valintaa. Sellaisissa lajeissa joissa vastaavaa valintaa ei esiinny, muuntelun voi olettaa kuvastavan tasapainoa geneettisen ajautumisen ja yksilövirtojen välillä.

### 1.3. Tutkimuksen tavoitteet

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää ensin, onko lajilla *Tischeria ekebladella* havaittavissa *Pgi*-lokukseen kohdistuvaa luonnonvalintaa ja jos on, kohdistuvatko *Pgi*-lokukseen erilaiset valintapaineet vanhoissa ja nuorissa populaatioissa. Tämä tehtiin tutkimalla geneettisiä ja morfologisia eroja vanhempien ja vastikään perustettujen paikalliskantojen välillä. Tutkimuksen toisena tavoitteena oli selvittää neutraalin *Pgm*-lokuksen avulla, mikä on eri paikalliskantojen välinen geenivirran voimakkuus. Molempia markkerilokuksia käytettiin selvittämään sitä, vaikuttaako populaatioiden maantieteellinen etäisyys geenivirran määrään. Tuloksia yhdistämällä pyrittiin hyvään kuvaan lajin *Tischeria ekebladella* alueellisesta populaatorakenteesta.

## 2. Aineisto ja menetelmät

### 2.1. Tutkimuksen kohdelajit

Euroopassa tammi (*Quercus robur*) on tärkeä isäntälaji yli 200 perhoslajille (lahko Lepidoptera). Näistä suuri osa kuuluu kovertajaperhosiin, jotka usein ovat varsin isäntäspesifisiä (Feeny 1970).

*Tischeria ekebladella* (Lepidoptera, Tischeriidae) on kovertajaperhonen, joka on Suomessa erikoistunut elämään tammen lehdillä. Naaraan muninta-aika ajoittuu kesä-heinäkuulle, jolloin naaras laskee munansa tammen lehtien yläpinnalle. Toukat kuoriutuvat noin kolmen viikon kuluttua muninnan jälkeen ja kovertavat tammen lehdelle epäsäännöllisen mallisia valkoisia läiskiä (KUVA 2). Toukka putoaa syksyn tullessa lehden mukana maahan jossa se talvehtii. Myöhään keväällä toukka koteloituu ja aikuinen kuoriutuu noin viiden viikon kuluessa (Jordan 1995, Roslin ym. 2006).



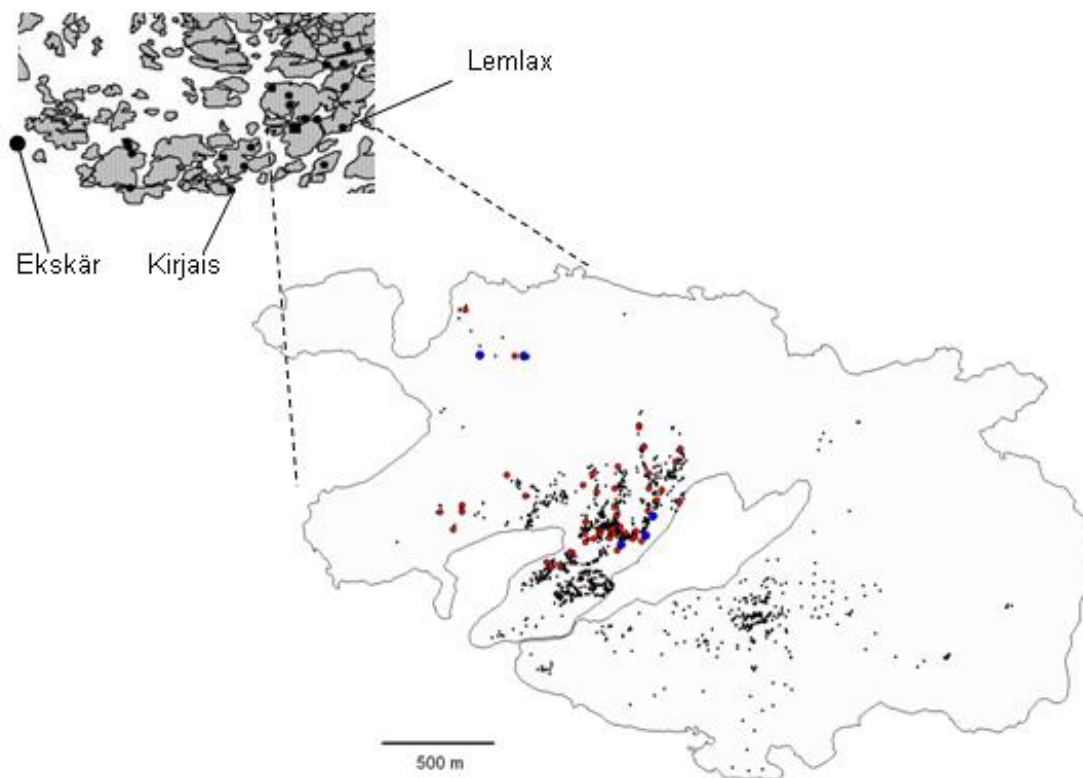
[cgi.ukmoths.force9.co.uk](http://cgi.ukmoths.force9.co.uk)   [www.bladmineerders.nl](http://www.bladmineerders.nl)

KUVA 2. Vasemmallalla *Tischeria ekebladella* -perhonen ja oikealla toukan kovertama tammen lehti.

*Tischeria ekebladella* -perhosen metapopulaatorakenne muistuttaa suurta saaristoa, jossa kunkin isäntäpuun latva toimii yksittäisenä saarena. Tammen jakautuminen maisemassa ja perhosen lentokyky vaikuttavat ratkaisevasti siihen, kuinka eri paikallispopulaatioiden yksilöt pystyvät leviämään uusiin habitaattilaikkuihin. *Tischeria ekebladella* -naaraat pystyvät lentämään keskimäärin vain 50 m (Gripenberg & Roslin 2005), mikä voi johtaa eristyneempien paikalliskantojen geneettiseen eriytymiseen toisistaan.

## 2.2. Tutkimusalue ja perhosaineisto

Tutkin *Tischeria ekebladella* -perhosen populaatorakennetta Wattkastin saarella. Saari sijaitsee Lounais-Suomessa Korppoon alueella ja on toiminut mm. *Tischeria ekebladella* -perhoseen liittyvien projektien tutkimusalueena (esim. Gripenberg & Roslin 2005, Roslin ym. 2006) (KUVA 3).



KUVA 3. Korppoo, Wattkast. Alueen kaikki (noin 200) yli 50 cm:n korkuiset tammipuut on merkitty kartalle (mustat pisteet). Näistä punaiset pisteet ovat nuoria tammipuita ja siniset pisteet vanhoja tammipuita, joista on otettu toukkanäytteet. Karttaan on myös merkitty Wattkastin saaresta eristäytyneet *Tischeria ekebladella* -populaatiot (Ekskär, Kirjais, Lemlax).

Tutkiakseni geneettisiä ilmiöitä erilaisten populaatioiden välillä valitsin tutkimusaineistoon perhosnäytteitä, jotka oli kerätty erityyppisistä puista. Uusia Wattkastin saaren populaatioita edustivat sellaisten puiden perhoset, joista oli vuonna 2004 kerätty pois kaikki toukkien kovertaita sisältävät lehdet (aineiston "uudet puut"). Kaikki vuoden 2005 yksilöt olivat siis puuhun lentäneiden naaraiden ensimmäisen polven jälkeläisiä. Wattkastin saarella kasvavien vanhempien tammipuiden perhoset edustivat saaren suuria pysyviä populaatioita (aineiston "isot puut"), kun taas pienten luonnonvaraisten puiden perhoset edustivat saaren epävakaita, pieniä populaatioita (aineiston "pienet puut"). Wattkastin lisäksi toukkia

oli kerätty Wattkastin ulkopuolella olevista erityisen eristyneistä vanhoista tammista (Ekskär, Kirjais ja Lemlax). Näistä vanhoista tammista Ekskär oli kaikkein eristynein yksittäinen tammipuu, joka sijaitsee Houtskarın kunnan pienellä saarella Kihdin selän vieressä. Ekskärin ympärillä on vain vettä ja saaria ilman tammia. Kirjais on iso saari Nauvon eteläpuolella ja tälläkin alueella tammet ovat vähissä. Lemlax taas on iso saari Paraisten kunnassa.

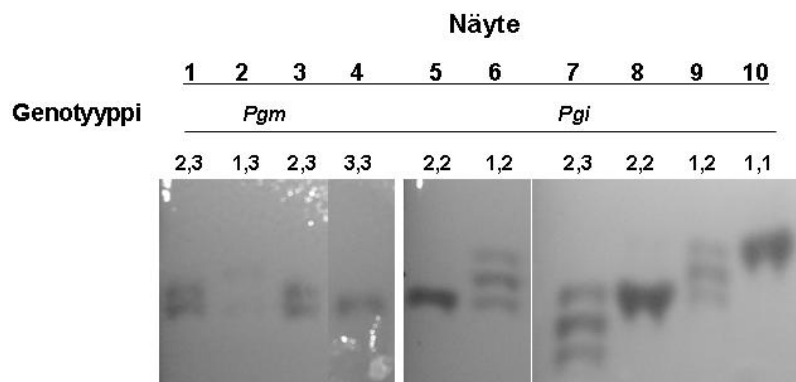
Toukkien koverteita sisältävät lehtinäytteet hain 13.02.06 Wattkastin saarelta ja säilytin niitä kuoriutumishäkeissä huoneenlämmössä. Lehtien kuivumisen estämiseksi kostutin näytteitä viikottain. Näytteistä kuoriutuvat yksilöt pyydystin näyteputkiin ja säilöin -80°C lämpötilaan entsyymianalyysejä ja morfologisia mittauksia varten. Aineistoon käytettiin myös vuonna 2005 kuoriutuneita perhosia, jotka oli kerätty ja kasvatettu vastaavin menetelmin.

### **2.3. Geneettiset menetelmät**

Tutkimuksessa käytin kahta allotsyymimarkkeria (*Pgi* ja *Pgm*). Entsyymianalyysiä varten homogenisoin perhosten päät ja keskiruumiit jäillä 30 µl:aan ionivapaata vettä, minkä jälkeen analysoin näytteet välittömästi selluloosa-asetaatielektroforeesilla tai siirsin -80°C lämpötilaan entsyymien hajoamisen estämiseksi. Ennen näytteiden pipetoimista liuotin selluloosa-asetaatilevyjä (Helena Laboratories Inc.) Tris-glysiini -puskurissa (pH 8,5) 20 minuutin ajan ja kuivatin hetken aikaa paperin päällä. *Pgi*-analyysiä varten ajoin näytteet 30 min ajan 200 V jännitessä ja *Pgm*-analyysiä varten vastaavasti 20 min ajan 160 V jännitteessä. Ajon jälkeen värjäsin näytteet entsyymiväreillä (Richardson ym. 1986, Hebert & Beaton 1989) ja kuvasin geelit hetken värjäytymisen jälkeen (LIITE).

Piloottikokeessa havaitsin *Pgm*-lokuksessa esiintyvän ainakin kolme eri alleelia, joten se soveltui hyvin populaatioiden välisten geenivirtojen havainnointiin. Testiajoissa myös *Pgi*-lokuksessa esiintyi ainakin kolme eri alleelia samassa isossa *Tischeria ekebladella* -paikallispopulaatiossa (KUVA 4). Kunkin näytteen yksilön genotyypit selvitin laskemalla proteiinijuovien lukumäärän ja mittaamalla juovien kulkemat matkat. Dimeerisen *Pgi*-entsyymin ajossa homotsygootilla havaitsin yhden juovan ja heterotsygootilla kaksi juovaa, kun taas monomeerisen *Pgm*-entsyymin

homotsygootilla havaitsi yhden ja heterotsygootilla kaksi juovaa (vrt. Richardson ym. 1986).



KUVA 4. Selluloosa-asetaatielektroforeesi *Pgm*- ja *Pgi*-lokuksella. Vasemmalta oikealle ensimmäiset kolme näytettä ovat *Pgm*-lokuksen suhteen heterotsygootteja perhosyksilöitä. Neljäs näyte on *Pgm3*-alleelin suhteen homotsygootti. Näytteet 5-10 ovat *Pgi*-näytteitä, joista 5. ja 8. ovat homotsygootteja *Pgi2*-alleelin suhteen ja 10. näyte homotsygootti *Pgi1*-alleelin suhteen. Näytteet 6, 7 ja 9 ovat heterotsygootteja.

## 2.4. Morfologiset mittaukset

Selvittääkseni poikkeavatko yksilöiden morfologiset mitat eri populaatioiden välillä, ja onko *Pgi*-genotyypillä vaikutusta takaruumiin painoon, punnitsin perhosnaaraiden takaruumiit jääkylminä mikrovaa'alla. Ensin mittasin koko perhosyksilön painon. Tämän jälkeen leikkasin irti perhosen takaruumin ja punnitsin sen painon. Saaduista painoista laskin, mikä on perhosen takaruumiin painosuhte yksilön kokonaispainoon. Suhteellisen kevyen takaruumiin oletettiin kuvaavan hyvää leviämiskykyä ja heikkoa lisääntymiskykyä. Painavan takaruumiin oletettiin vastaavasti kuvaavan huonoa leviämiskykyä ja hyvää lisääntymiskykyä. Näiden morfologisten mittausten ja saamieni alleelifrekvenssien perusteella pystyin päättämään, miten voimakkaat yksilövirrat sitovat populaatioita toisiinsa.

## 2.5. Tilastolliset menetelmät

Entsyyvärjäysten jälkeen selvitin jokaisen perhosyksilön genotyypin ja laskin kunkin populaation alleelifrekvenssit. Eri allotsyymien heterotsygotia-asteet ( $H_T$ ), geneettiset erot alapopulaatioiden välillä ( $F_{ST}$ ) ja Hardyn-Weinbergin testit (Fisherin

menetelmä) laskin Genepop 3.2 -ohjelman avulla (Raymond & Rousset 1995). Morfologisten ominaisuuksien (takaruumiin paino ja sen suhde yksilön kokonaispainoon) osalta laskin varianssikomponentteja SAS:n v.8.0 PROC MIXED ohjelman avulla.

Tästä sain laskettua  $Q_{ST}$  -arvot seuraavasti:

$$Q_{ST} = \frac{S_{GB}^2}{S_{GB}^2 + 2S_{GW}^2}$$

Tässä yhtälössä  $s^2_{GB}$  = alapopulaatioiden sisäinen varianssi ja  $2s^2_{GW}$  = alapopulaatioiden välinen varianssi, joka olettaa populaation kvantitatiivisten ominaisuuksien heritabiliteettin olevan lähellä lukua 0,5 (Merilä & Gustafsson 1993, Merilä 1996).

Selvittääkseni onko havaitut lokukset Hardy-Weinbergin tasapainossa, vertasin perhosen alapopulaatioiden välisiä sekä alapopulaatioiden sisäisiä *Pgi*- ja *Pgm*-genotyypifrekvenssejä Hardy-Weinbergin odotuksiin. Kaikkien populaatioiden genotyypifrekvenssit testattiin erikseen *Pgi*- ja *Pgm*-alleeleille ja yhteisesti molemmille lokuksille. Lisäksi testi suoritettiin erikseen kullekin populaatiolle ja lokukselle.

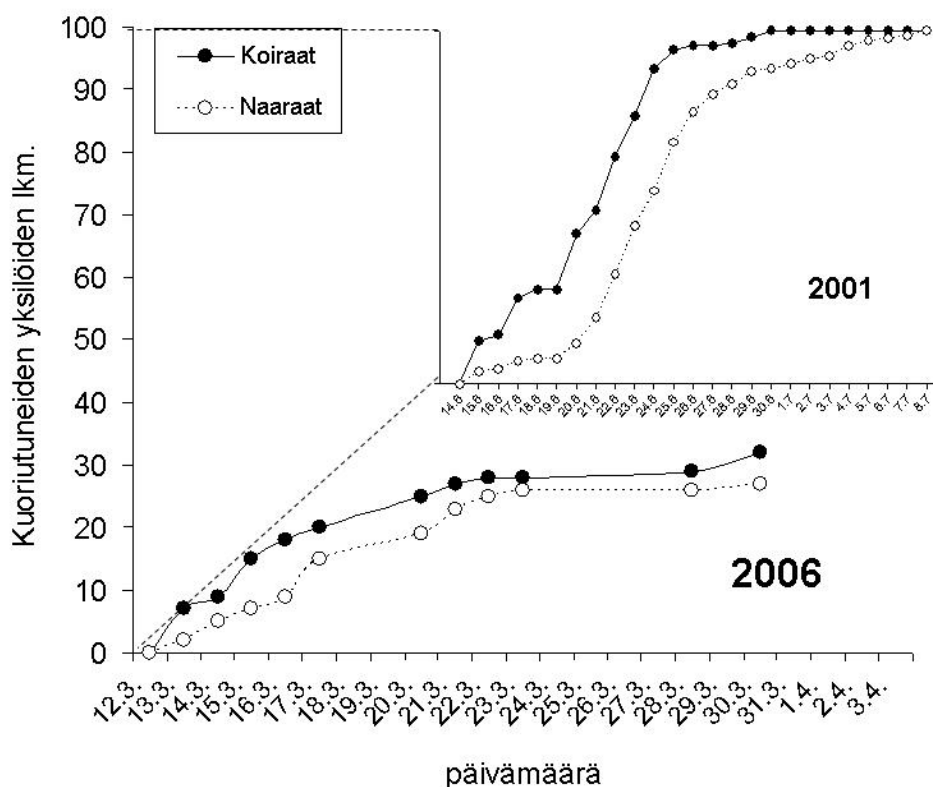
Populaatioiden välisiä eroja morfologisten ominaisuuksien suhteen vertasin SPSS-ohjelman yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA) ja Mannin-Whitneyn testillä. Watkastin perhosyksilöiden *Pgi*-genotyyppien ja takaruumiiden suhteellisten painojen väliseen vertailuun käytin SPSS-ohjelman mediaanitestiä.

Lopuksi halusin selvittää kuinka geenivirran voimakkuus muuttuu etäisyyden kasvaessa. Siksi vertasin kullekin populaatioparille kuinka populaatioiden välinen etäisyys vaikuttaa *Pgi*- ja *Pgm*-lokusten suhteen laskettuihin  $F_{ST}$ -arvoihin. Aineistoon valitsin ne populaatiot, joista oli suurimmat näytemäärät, eli Watkastin saarelta Västerbyn perhospopulaation, kaksi uutta, kaksi pientä ja yhden ison populaation sekä kaikki eristäytyneet populaatiot (Ekskär, Lemlax, Kirjais). Roussetia (2000) seuraten analyysi keskittyi suureeseen  $F_{ST} / (1 + F_{ST})$ . Assosiaation voimakkuutta testasin Genepop 3.2 ohjelmalla Mantelin testillä (Mantel 1967).

### 3. Tulokset

#### 3.1. Perhosten kuoriutumismenestys

Perhosia kuoriutui 19 vuorokauden aikana yhteensä 66 yksilöä, joista 32 oli naaraita ja 34 koiraita. Perhosten kuoriutumismenestys erosi huomattavasti vuodesta 2001, jolloin pienemmästä määrästä lehtikoverteita saatiin lähes 200 aikuista yksilöä (KUVA 5, Gripenberg 2001). Koiraiden ja naaraiden välinen suhde kaikista kuoriutuneista perhosyksilöistä oli molempina vuosina lähes 1:1. Kasvattaakseni aineiston kokoa käytin analyysiin 81 yksilöä, jotka olivat kuoriutuneet kesällä 2005 ja säilötty -80°C lämpötilaan tutkimuksia varten (Gripenberg 2001).

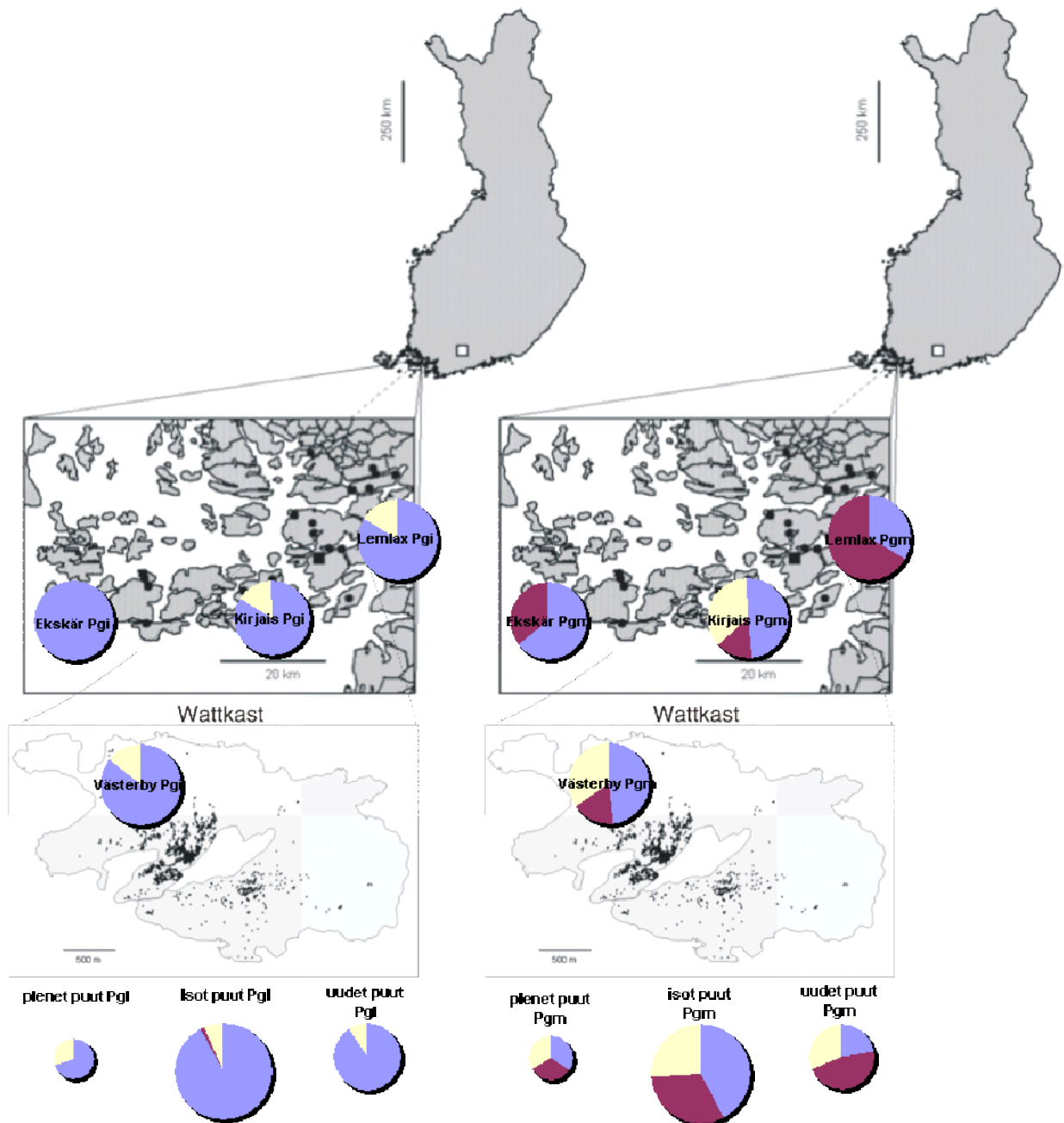


KUVA 5. Perhosten kuoriutumismenestys vuosina 2001 ja 2006. X-akselilla kuoriutuneiden yksilöiden lukumäärä ja y-akselilla kuoriutumispäivämäärä. Kuvaajasta sisempi kuvaa vuoden 2001 kuoriutuneiden yksilöiden määrää, joka on noin nelinkertainen vuoteen 2006 verrattuna (ulompi kuvaaja).



### 3.2. Populaatioiden geneettisen muuntelun jakauma

Määritin *Pgi*- ja *Pgm*-lokusten alleelifrekvenssit seitsemästä eri perhospopulaatiosta. Alleelien kokonaismäärä oli molempien lokusten osalta kolme (KUVA 6).



KUVA 6. *Pgi*- ja *Pgm*-alleelien jakautuminen *Tischeria ekebladella* -populaatioissa. Vasemmassa kartassa *Pgi*-alleelien jakautuminen ja oikeassa *Pgm*-alleelien jakautuminen. Piirakkadiagrammien keltainen väri kuvaa *Pgi/Pgm*-alleelia 1, sininen alleelia 2 ja punainen alleelia 3. Wattkastin saarta (alimmat ruudut) lähimpänä oleva populaatio on Kirjais. Lemlax ja Ekskär ovat saareilta etäimpinä. Wattkastin saaren erikokoisten puiden alleelifrekvenssit (pienet, isot ja uudet puut) on kuvattu saaren alapuolelle

Populaatioiden sisällä genotyypijakauma noudatti Hardy-Weinbergin tasapainoa. (TAULUKKO 1). Västerbyn *Pgm*-lokukseen suhteen havaittu poikkeama ei ollut merkitsevä Bonferronin korjauksen jälkeen. Sen sijaan kun populaatiot yhdistettiin, löydettiin merkitsevä poikkeama (TAULUKKO 2). Tämä lienee osoitus Wahlud-vaikutuksesta.

#### TAULUKKO 1

*Tischeria ekebladella* -populaatioissa havaitut heterotsygotiapoikkeamat Hardy-Weinbergin tasapainosta sekä havaitut ( $H_O$ ) ja odotetut ( $H_E$ ) heterotsygotia-asteet. Taulukon N tarkoittaa populaation alleelien määrää ja P-arvo ilmoittaa havaitun heterotsygotia-asteen todennäköisyyden. W&C näyttää testin F-arvon ja R&H sisäsiitoskertoimen (Robertson & Hill 1984, Weir & Cockerham 1984)

Hardy-Weinbergin testi:						Fis:	
populaatio	lokus	N	$H_E$	$H_O$	P	W&C	R&H
Ekskär	<i>Pgi</i>			Vain yksi alleeli !			
	<i>Pgm</i>	22	0,48	0,55	1,00	-0,13	-0,14
Lemlax	<i>Pgi</i>	12	0,30	0,00	0,09	1,00	1,20
	<i>Pgm</i>	12	0,48	0,33	1,00	0,33	0,38
Kirjais	<i>Pgi</i>	48	0,28	0,25	0,50	0,12	0,12
	<i>Pgm</i>	48	0,62	0,75	0,14	-0,21	-0,10
Västerby	<i>Pgi</i>	90	0,25	0,29	0,57	-0,16	-0,16
	<i>Pgm</i>	86	0,63	0,76	0,01	-0,23	-0,15
Uudet pop. (Wattkast)	<i>Pgi</i>	22	0,16	0,17	1,00	-0,05	-0,06
	<i>Pgm</i>	22	0,67	0,64	0,42	0,05	0,04
Isot pop. (Wattkast)	<i>Pgi</i>	76	0,15	0,16	1,00	-0,06	-0,03
	<i>Pgm</i>	76	0,66	0,71	0,08	-0,07	-0,09
Pienet pop. (Wattkast)	<i>Pgi</i>	16	0,46	0,63	0,49	-0,40	-0,42
	<i>Pgm</i>	16	0,71	0,38	0,09	0,49	0,54

#### TAULUKKO 2

*Tischeria ekebladella* -perhosen kaikkien populaatioiden välillä havaittujen genotyypifrekvenssien poikkeamat Hardy-Weinbergin tasapainosta

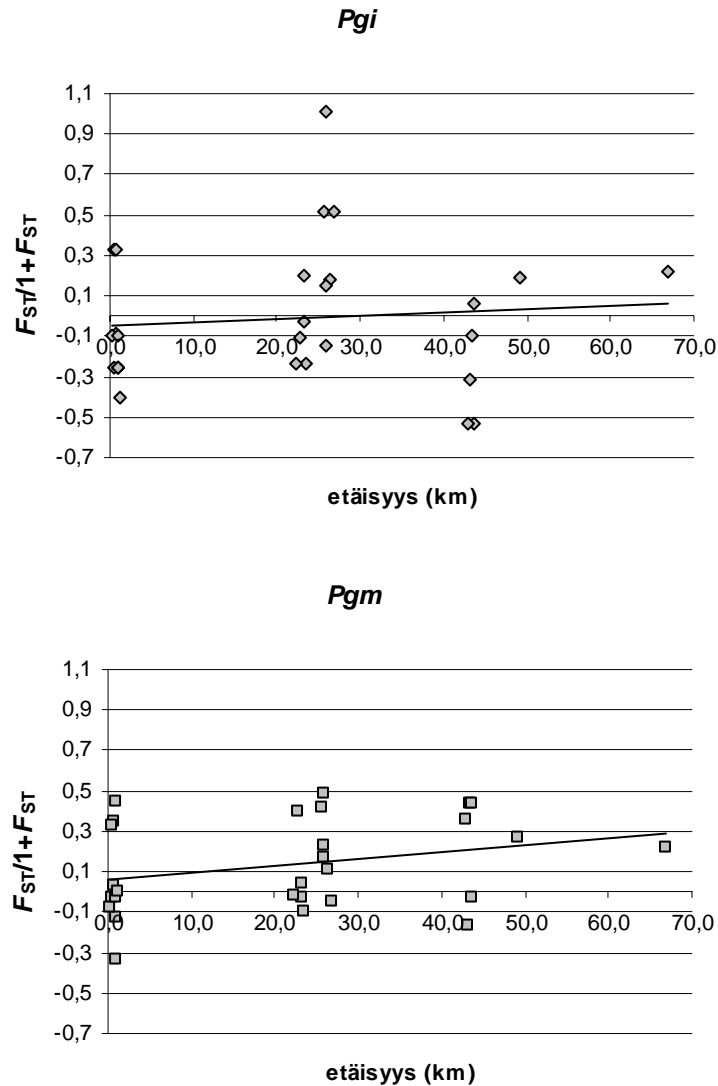
lokus	$\chi^2$	df	P
<i>Pgi</i>	23,85	14	0,05
<i>Pgm</i>	23,85	14	0,05

*Pg2*-alleelia oli kaikissa tutkittavissa populaatioissa eniten (100%-68,8%), kun taas *Pg3*-alleelia löytyi vain yhdestä populaatiosta frekvenssillä 1,3%. *Pg1*-alleelin osuus vaihteli populaatioissa 0% ja 31,2% välillä, puuttuen eristyneeltä Ekskärin saarelta kokonaan. *Pgm*-alleelien osuus vaihteli populaatioiden välillä *Pgi*-alleelien frekvenssejä enemmän. Alleeleja *Pgm2* tai *Pgm3* oli runsaimmin kaikissa populaatioissa

lukuun ottamatta Watkastin saaren pienten puiden populaatioita, jossa *Pgm1*-alleelia oli suhteellisesti eniten (37,5%). Tämä alleeli puuttui kokonaan kahdesta populaatiosta (Ekskär ja Lemlax), jotka olivat maantieteellisesti kauimpana Watkastin saaresta. *Pgm1*-alleelin osuus Watkastin saarella ja Watkastia lähempänä olevassa populaatiossa (Kirjais) vaihteli 26,3% ja 37,5% välillä.

$F_{ST}$ -arvojen perusteella 5 % *Pgi*-lokuksen alleelifrekvenssien kokonaisvarianssista esiintyi populaatioiden välillä, kun taas vastaava arvo *Pgm*-lokukselle oli 3 %. Kahden kvantitatiivisten ominaisuuden (perhosen kokonaispaino ja painosuhte) kokonais-varianssista kaikki (100 %) esiintyi populaatioiden sisällä. Populaatioiden välillä ei siis esiintynyt yhtään eriytymistä tämän ominaisuuden suhteen. Myös takaruumiin painon suhteen vain 0,54 % varianssista esiintyi populaatioiden välillä.

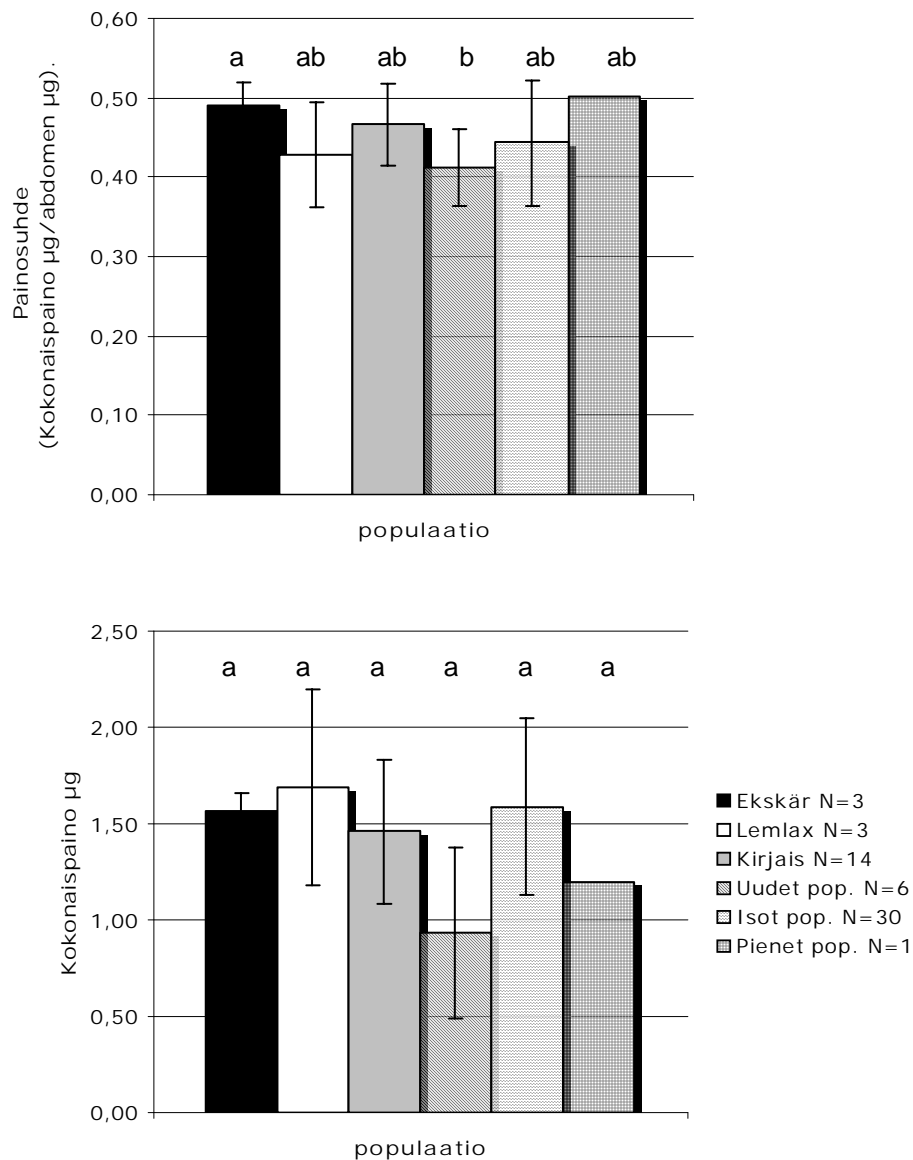
*Tischeria ekebladella* -perhosen paikallispopulaatioiden (n = 8) maantieteellinen etäisyys ei vaikuttanut merkittävästi niiden geneettiseen eriytymiseen (KUVA 7; Mantelin testi lokuksille *Pgi* P = 0,22, *Pgm* P = 0,12). Lokuksen *Pgm* suhteen oli kuitenkin havaittavissa lievä kasvava trendi (KUVA 7, alhaalla) kun taas lokuksen *Pgi* kohdalla parittaiset  $F_{ST}$ -arvot heittelehtivät täysin satunnaisesti etäisyydestä riippumatta.



KUVA 7. Maantieteellisen etäisyyden vaikutus *Tischeria ekebladella* -perhosen paikallispopulaatioiden välisiin geneettisiin eroihin. X-akselilla populaatioiden väliset maantieteelliset etäisyydet ja y-akselilla vastaavasti populaatioiden välinen geneettinen varianssi.

### 3.3. Populaatioiden morfologisen muuntelun jakauma

Naaraiden kokonaispainoissa (KUVA 8) ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja (ANOVA,  $F_{6,50} = 1,1$   $P = 0,4$ ). Jokaisessa populaatiossa yksilöiden kokonaispainoissa oli runsaasti vaihtelua. Yksilöiden kokonaispainon ja takaruumin painon suhteet jakautuivat populaatioiden sisällä tasaisemmin, ja näissä havaittiin eroja eri populaatioiden välillä. Erot olivat tilastollisesti merkitseviä Ekskärin ja Wattkastin uusien populaatioiden välillä (Mann-Whitney,  $Z = -2,32$ ,  $P = 0,02$ ).



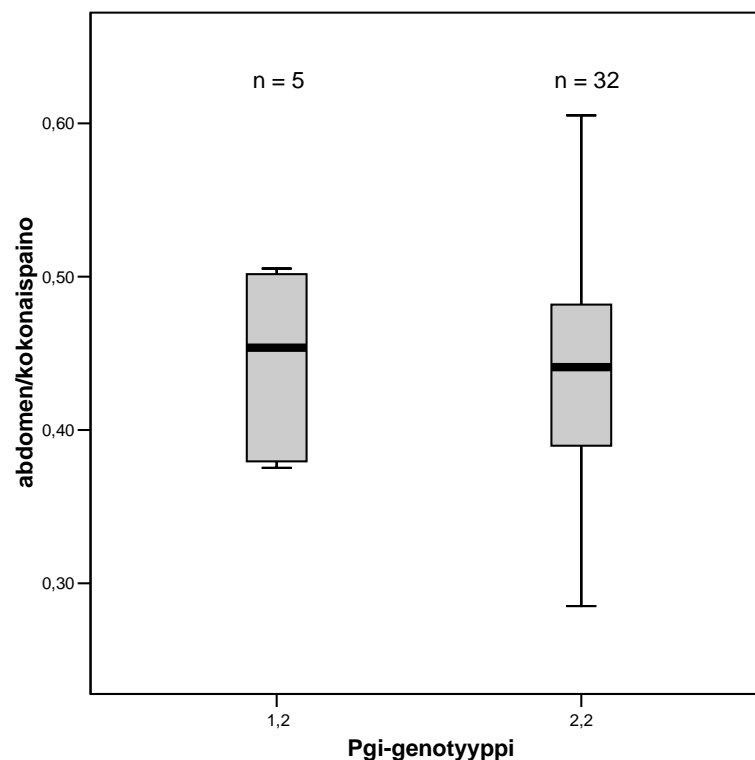
KUVA 8. Kuuden *Tischeria ekebladella* -populaation naarasyksilöiden kokonaispainot (alempi pylväsdiagrammi) sekä kokonaispainon ja takaruumiin painosuhteet (ylempi pylväsdiagrammi). Tilastollisesti merkitsevät erot on osoitettu kirjainkoodeilla pylväiden yläpuolella.

Vertailin lisäksi vaikuttaako yksilön *Pgi*-genotyyppi takaruumiin suhteelliseen painoon. Genotyypit 2,2 ja 1,2 olivat yleisiä kaikissa populaatioissa, kun taas genotyypit 1,1 ja 2,3 olivat hyvin harvinaisia (TAULUKKO 4). Siksi keskityin vertaamaan kahta yleisintä genotyyppiä. Valitsi analyysiin vain Wattkastin saaren populaatioita, jotta alueelliset erot perhosten koossa eivät sotkeutuisi genotyyppien välisiin eroihin. Perhosnaaraiden painosuhteet Wattkastin saaren populaatioissa olivat kaikkein vaihtelevimpia *Pgi*-genotyypillä 2,2; mutta eri genotyyppien painosuhteet

teiden välillä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja (Mediaanitesti:  $n = 37$ , yhteinen mediaani = 0,442  $\mu\text{g}$ ;  $df = 1$ ,  $P = 0,56$ ; KUVA 9).

#### TAULUKKO 4

Populaatio	Ekskär	Lemlax	Kirjais	Västerby	Wattkast		
					uudet populaatiot	suuret populaatiot	pienet populaatiot
Genotyyppi							
2, 2	11	5	17	32	9	32	3
1, 2	0	0	6	13	2	5	5
1, 1	0	1	1	0	0	0	0
2, 3	0	0	0	0	0	1	0
1, 3	0	0	0	0	0	0	0
3, 3	0	0	0	0	0	0	0
N	11	6	24	45	11	38	8



KUVA 9. Naaraiden takaruumiin paino suhteessa yksilön kokonaispainoon. Vertailussa mukana ovat vain Wattkastin saaren naaraat.

## 4. Tulosten tarkastelu

Tässä tutkimuksessa *Tischeria ekebladella* -perhosen geneettisen ja kvantitatiivisen muuntelun jakauma antoi viitteitä sekä lajin metapopulaatorakenteesta eri mittakaavoissa, että luonnonvalinnan vaikutuksesta.

### 4.1 *Tischeria ekebladella* -perhosen metapopulaatorakenne

Wattkastin saaren *Pgm*-alleelifrekvenssit jakoutuivat tasaisesti eri paikallispopulaatioiden välillä. Tämä havainto vahvisti epäilyjä siitä, että Wattkastin saaren *Tischeria ekebladella* -perhosen populaatio on rakenteeltaan suuri yhtenäinen metapopulaatio, jossa tapahtuu jatkuvaa geenivirtaa. Perhoset näyttävät levittäytyvän Wattkastin saarella tehokkaasti uusiin habitaattilaikkuihin, ja kykenevän pitämään yllä myös pienempiä paikallispopulaatioita. Habitaattilaikkujen tehokas uudelleenkolonisaatio voinee myös vähentää pienten vastaperustettujen populaatioiden häviämistodennäköisyyttä (Brown & Kodrick-Brown 1977).

Maantieteellisesti eristäytyneiden Ekskärin ja Lemlaxin populaatioiden *Pgm*-alleelifrekvenssit erosivat selvästi Wattkastissa ja Kirjaisissa havatuista frekvensseistä. Tämä antaa viitteitä siitä, että näiden saarten eristyneisyys on tarpeeksi suuri vähentääkseen yksilö- ja geenivirtaa.

Populaatiokohtaiset *Pgi*-genotyypifrekvenssit noudattivat Hardy-Weinbergin tasapainolakia, mutta kaikkien populaatioiden tasolla sekä *Pgi*- että *Pgm*-frekvenssit poikkesivat Hardy-Weinbergin laista. Etäisyyden ja populaatioiden parittaisten eriytymisarvojen välillä ei havaittu yhteyttä. Populaatioiden välillä oli kuitenkin nähtävissä selkeitä eroja alleelifrekvensseissä ( $F_{ST} > 0$  ja  $H_O < H_E$ ), mikä johtui populaatioiden välisestä eriytymisestä ja Wahlund-vaikutuksesta. Tuloksista havaittiin, että populaatioiden välinen geenivirta on siis rajallista, mutta maantieteellinen etäisyys ei yksinään rajoita geenivirran voimakkuutta.

## 4.2. Luonnonvalinta *Tischeria ekebladella* -perhosen paikallispopulaatioissa

*Tischeria ekebladella* -populaatioiden alleelifrekvenssit antoivat alustavia viitteitä luonnonvalinnan kohdistumisesta *Pgi*-lokukseen. Eri populaatioiden huomattavan homogeeniset *Pgi*-alleelifrekvenssit osoittivat, että tämän alleelin suhteen esiintyy valintaa (ks. KUVA 6). Populaatioiden *Pgi*-alleelifrekvenssit olivat selkeästi *Pgm*-alleelin frekvenssejä homogeenisemmat myös populaatioissa, jotka olivat maantieteellisesti hyvin kaukana toisistaan. Tästä lokusten välisestä erosta voidaan olettaa, että samojen alleelien rikastuminen toisistaan etäällä olevissa populaatioissa on nimenomaan valinnan aikaansaannosta, eikä migraation aiheuttamaa samankaltaistumista (Karl & Avise 1992).

Naaraiden takaruumiiden suhteellisessa painossa havaittiin fenotyypistä vaihtelua eri populaatioiden välillä, joista kiinnostusta herättävät Watkastin saaren uusien populaatioiden ja eristäytyneen Ekskärin populaation painoerot. Näistä uusien populaatioiden yksilöillä oli suhteellisesti kevyempi takaruumis kuin vanhan Ekskärin populaation yksilöillä. Tästä voitiin päätellä, että uusia populaatioita perustaviin yksilöihin kohdistuu toisenlaisia valintapaineita kuin vanhempien populaatioiden yksilöihin (Hanski ym. 2004). Watkastin uudet populaatiot ovat kaikki ensimmäisen sukupolven jälkeläisiä puuta asuttaneille yksilöille, mutta Ekskärin populaatio edustaa paikalla pitkään elänyttä kantaa. Saari sijaitsee kaukana kaikista muista tammista, joten menetstyksellinen migraatio saareen tai saaresta pois lienee erittäin epätodennäköistä. Siten voidaan olettaa valinnan suosivan huonon leviämiskyvyn, mutta hyvän lisääntymiskyvyn omaavia yksilöitä.

$F_{ST}$ - ja  $Q_{ST}$ -arvojen vertailuissa havaittiin populaatioiden välisten alleelifrekvenssien varianssien olevan suurempi kuin vastaava kvantitatiivisten ominaisuuksien varianssi (TAULUKKO 5). Varianssien perusteella saatiin viitteitä *Pgi*-alleeliin kohdistuvasta suuntaavasta valinnasta ( $F_{ST} < Q_{ST}$ ) eri paikallispopulaatioissa (Merilä 1996). Sekä  $F_{ST}$ - että  $Q_{ST}$ -arvot olivat kuitenkin niin pienet, että saadut tulokset tulisi varmistaa suuremmalla aineistolla.



## TAULUKKO 5

$F_{ST}$  ja  $Q_{ST}$ -arvot *Tischeria ekebladella* -populaatioista

		$Q_{ST}$		
		Perhosen kok.paino	takaruumiin paino	paino- suhde
		< 0,001	0,005	< 0,001
$F_{ST}$	$P_{gi}^1$ 0,03	$F_{ST} > Q_{ST}$	$F_{ST} > Q_{ST}$	$F_{ST} > Q_{ST}$
	$P_{gm}^2$ 0,05	$F_{ST} > Q_{ST}$	$F_{ST} > Q_{ST}$	$F_{ST} > Q_{ST}$

### 4.3. Virhelähteet ja kehitysmahdollisuudet

Perhosten kasvatus ei onnistunut odotusten mukaisesti. Yksilöitä kuoriutui aineistoon niin vähän, että työhön oli käytettävissä moninkertaisesti vähemmän tutkimusmateriaalia kun alun perin suunniteltiin. Perhosten huonoon kuoriutumismenestyksen syynä oli todennäköisesti kokemuksen puute ja tammenlehtien liian vähäinen kastelu, mutta syynä saattoi olla myös talven 2005-2006 ankarat talvehtimisolosuhteet. Pienet otoskoot Watkastin uusien ja pienten populaatioiden naarasyksilöissä teki *Pgi*-alleeliin kohdistuvan valinnan analysoimisen vaikeaksi. Populaation alleelifrekvenssien kartoittaminen ja perhosten ruumiinpainojen määrittäminen antoi kokonaisuudessaan kuitenkin selkeitä viitteitä *Tischeria ekebladella* -perhosen metapopulaatorakenteesta.

Tutkimuksen suunnitteluvaiheessa tavoitteena oli selvittää geneettistä taustaa populaation leviämiskykyyn. Tämä olisi toteutettu vertailemalla naaraiden takaruumiin painon lisäksi koiraiden suhteellista siipien kokoa eri populaatioissa. Tämän kokeen lisääminen tutkimukseen olisi voinut osoittaa populaation iän ja sijainnin vaikuttavan perhosen lentotaitoon, ja tätä kautta tukenut muista perhoslajeista saatuja tuloksia (vrt. Hanski ym. 2004).

#### 4.4. Johtopäätökset

Tämä tutkimus osoittaa Watkastin saaren tammien sijaitsevat niin tiheässä, että *Tischeria ekebladella* -metapopulaatiossa yksilöt kulkeutuvat tehokkaasti habitaattilaikusta toiseen. Tammipuiden tilajakauman ansiosta perhosten populaatiotiheydet, asuttujen habitaattilaikkujen määrät ja populaation geneettinen vaihtelevuus pysyvät riittävän korkeina ylläpitääkseen saaren metapopulaation tiiviisti kytkeytyneenä. Watkastin saaren tiheimmissä tammikoissa perhospopulaatiot muodostavat yhtenäisen metapopulaation, mutta mitä suurempaa mittakaavaa tarkastellaan, sitä enemmän populaatioiden välinen kytkeytyneisyys vaihtelee. Laajemmassa mittakaavassa tarkasteltuna Watkastin saaren *Tischeria ekebladella* -perhonen todennäköisesti edustaa luonnossa yleisintä metapopulaatorakennetta, joka sisältää niin kooltaan kuin laadultaan erilaisia yksittäisiä paikallispopulaatioita.

## 5. Kiitokset

Ensimmäiseksi, lämpimät kiitokset ohjaajalleni Tomas Roslinille siitä, että hän osasi ohjata lopputyötäni suunnitelmallisesti eteenpäin. Olen iloinen, että sain osallistua tähän mielenkiintoiseen tutkimukseen ja että sain kaiken tarvittavan tuen projektin alusta loppuun asti. Lämpimät kiitokset Sofia Gripenbergille ja Varpu Mitikalle kaikesta avusta allotsyymiajoissa ja hyödyllisistä asiantuntijaneuvoista. Kiitokset Tvärminnen eläintieteellisen aseman henkilökunnalle käytännön ohjeista ja loistavasta ylläpidosta. Kiitokset Suomen Biologian Seura Vanamo ry:lle apurahasta, minkä avulla sain olla mukana edistämässä Suomen luonnon tutkimusta. Lopuksi haluan vielä erityisesti kiittää avomiestäni Aki Tuomaista kaikesta tuesta ja kärsivällisyydestä.

## 6. Kirjallisuusviitteet

Brown, J.H. & Kodrick-Brown, A. 1977. Turnover rates in insular biogeography: effect of immigration on extinction. *Ecology* 58: 445-449.

Feeny, P. 1970. Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology* 51: 565-581.

Frankham, R. Ballou, J.D. & Briscoe, D.A. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge university press.

Freeman, S. & Herron, J.C. 2004. Evolutionary analysis. 3. painos. Prentice Hall.

Gripenberg, S. 2001. Spatial population structure and local adaption in *Tischeria ekebladella*. Pro gradu -tutkielma. Ekologian ja systematiikan laitos. Helsingin yliopisto.

Gripenberg, S. & Roslin, T. 2005. Host plants as islands: Resource quality and spatial setting as determinants of insect distribution. *Annales Zoologici Fennici* 42: 335-345.

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 of London B* 272: 2449-2456.

Hanski, I. 1998a. Metapopulation dynamics. *Nature* 396:41-49.

Hanski, I. 1998b. Connecting the parameters of local extinction and metapopulation dynamics. *Oikos* 83: 390-396.

Hanski, I. 1999. Habitat connectivity, habitat continuity, and metapopulations in dynamic landscapes. *Oikos* 87: 209-219.

Hanski, I. 2005. The shrinking world: ecological consequences of habitat loss. International Ecology Institute, Oldendorf. 307 s.

Hanski, I. Erälahti, C. Kankare, M. Ovaskainen, O. & Sirén, H. 2004. Variation in migration propensity among individuals maintained by landscape structure. *Ecology Letters* 7: 958-966.

- Hanski, I, & Saccheri, I. 2006a. Natural selection and population dynamics. Trends in Ecology and Evolution. In press.
- Hanski, I. & Saccheri, I. 2006b. Molecular-level variation affects population growth in a butterfly metapopulation. Plos Biology. 4: 0719-0726.
- Harrison, S. 1991. Local extinction in a metapopulation context: An empirical evaluation. Biological Journal of the Linnean Society 42: 73-88.
- Hartl, D.L. & Clark, A.G. 1997. Principles of population genetics 3. painos. Sinauer.
- Harrison, S & Taylor, A.D. 1997. Empirical evidence for metapopulation dynamics. Teoksessa: Hanski, I & Gilpin, M.E. Metapopulation biology. Academic Press, San Diego, California.
- Hebert, P.D.N. & Beaton, M.J. 1989. Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis. A practical handbook. Helena Laboratories.
- Jordan, T. 1995. Biologie und parasitoidenkomplex der eichenminiermotte *Tischeria ekebladella* (Bjerkander, 1795) (Lep.,Tischeriidae) in Norddeutschland. Journal of Applied Entomology 119: 447-454.
- Karl, S.A. & Avise, J.C. 1992. Balancing selection at allozyme loci in oysters: implications from nuclear RFLPs. Science 256: 100 -102.
- Kephart, S.R.. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. American Journal of Botany 77: 693-712.
- King, R.B. 1993. Color-Pattern variation in lake erie water snakes; Prediction and measurement of natural selection. Evolution 47: 1819-1833.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research 27: 209-220.
- Merilä, J. 1996. Quantitative trait and allozyme divergence in the Greenfinch (*Carduelis chloris*, Aves: Fringillidae). Biological Journal of the Linnean Society 61: 243-266.

- Merilä, J. & Gustafsson, L. 1993. Inheritance of size and shape in a natural population of collared flycatchers, *Ficedula albicollis*. *Journal of Evolutionary Biology* 6: 375-395.
- Merilä, J. & Sheldon, B.C. 1999. Genetic architecture of fitness and nonfitness traits: empirical patterns and development of ideas. *Heredity* 83: 103-109.
- Nieminen, M. Singer, M.C. Fortelius, W. Schöps, K. & Hanski, I. 2001. Experimental confirmation that inbreeding depression increases extinction risk in butterfly populations. *American Naturalist* 157: 237-244.
- Ovaskainen, O. & Hanski, I. 2003. How much does an individual habitat fragment contribute to metapopulation dynamics and persistence. *Theoretical Population Biology* 64: 481-495.
- Phillips, P.C. 1996. Maintenance of polygenic variation via a migration-selection balance under uniform selection. *Evolution* 50: 1334-1339.
- Raymond, M. & Rousset F, 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Richardson, B.J. Baverstock, P.R. & Adams, M. 1986. Allozyme electrophoresis: a handbook for animal systematics and population studies. Academic Press.
- Robertson, A. & Hill, W.G. 1984. Deviations from Hardy-Weinberg proportions: sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics* 107: 713-718.
- Roslin, T. 2001. Spatial population structure in a patchily distributed beetle. *Molecular Ecology* 10: 823-837.
- Roslin, T. Gripenberg, S. Salminen, J.-P. Karonen, M. O'Hara, R. B. Pihlaja, K. & Pulkkinen, P. 2006. Seeing the trees for the leaves - oaks as mosaics for a host-specific moth. *Oikos* 113: 106-120.
- Rousset, F. 2000. Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology* 13: 58-62.
- Saccheri, I.J. Kuussaari, M. Kankare, M. Vikman, P. Fortelius, W. & Hanski, I. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392: 491-494.

Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 393-430.

Spielman, D. Brook, B.W. & Frankham, R. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Population Biology* 101: 15261-15264.

Thomas, C.D. & Harrison, S. 1992. Spatial dynamics of a patchily distributed butterfly species. *The Journal of Animal Ecology* 61: 437-446.

Thomas, C.D. & Kunin, W.E. 1999: The spatial structure of populations. *The Journal of Animal Ecology* 68: 647-657.

Watt, W. B. 1992. Eggs, enzymes and evolution: Natural genetic variants change insect fecundity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89: 10608-10612.

Weir, B.S. & Cockerham, C.C. 1984. Estimating  $F$ -statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370

Wright, S. 1922. The theory of path coefficients a reply to Niles's criticism. *Genetics* 8: 239-255.

Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by  $F$ -statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 3: 395-420.

## PUSKURIT

10 x TG-puskuri

30 g Trizma base

144 g Glysiini

Laimenna litraan vettä. Käyttöä varten laimenna 1:10 ionivapaaseen veteen.

Pgi värjäys

1 ml NAD (2 mg/ml)

1 tippaa Fruktuosi-6- fosfaatti

2 tippaa MTT (7 mg/ml)

2 tippaa PMS (2 mg/ml)

7 µl Glukoosi-6-fosfaatti dehydrogenaasi

2 ml Agar +60°C (3,6g/ 250 ml Agua)

Pgm värjäys

1 ml NAD (2 mg/ml)

3 tippaa MgCl<sub>2</sub>

7 tippaa Glukoosi-1- fosfaatti

5 tippaa MTT (7 mg/ml)

4 tippaa PMS (2 mg/ml)

10 µl Glukoosi-6-fosfaatti dehydrogenaasi

2 ml Agar +60°C (3,6g/ 250 ml Agua)