

ETELÄNKEVÄTESIKON (*PRIMULA ELATIOR*) PIN- JA THRUM-
KUKKATYYPIN KASVIEN SISÄLTÄMÄT FENOLISET
YHDISTEET

KATJA LAURIKAINEN

Pro gradu-tutkielma

Itä-Suomen yliopisto

Biologian laitos

2012

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO

Biologian laitos

LAURIKAINEN, KATJA: Etelänkevätesikon (*Primula elatior*) pin- ja thrumkukkatyyppin kasvien sisältämät fenoliset yhdisteet.

Pro gradu -tutkielma, 40 s., liitteitä 3

Syyskuu 2012

Tämän pro gradu-tutkielman tarkoituksena on selvittää etelänkevätesikon (*Primula elatior*) kukintojen ja lehtien flavonoidikoostumus sekä flavonoidi- ja tanniinipitoisuudet. Etelänkevätesikolla esiintyy kahdenlaisia kukkia (distylia). Hypoteesina tutkimuksessa on, että kahden erilaisen kukkatyyppin välillä olisi eroja fenolisten yhdisteiden määrissä ja biomassoissa. Tämän lisäksi kasvupaikoilta otettuja maaperänäytteitä käytetään selittämään paikan vaikutusta kasvin biomassaan sekä flavonoidi- ja tanniinipitoisuuksiin.

Aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet *Primula*-suvussa esiintyvän runsaasti sekundaarimetabolian tuottamia bioaktiivisia yhdisteitä kuten triterpeenisaponiineja ja erilaisia fenolisia yhdisteitä. Osalla näistä on todettu olevan ihmisen terveyttä edistäviä vaikutuksia. Etelänkevätesikkoa onkin käytetty perinteisesti rohtona kansanlääkinnässä.

Tutkimuksen aineisto koostuu kahden eri kukkatyyppin kasveista, jotka kerättiin kolmelta kasvupaikalta. Kuivatuista kasvinäytteistä punnittiin biomassat. Kukintojen ja lehtien flavonoidikoostumuksen määrittämiseen käytettiin nestekromatografia (HPLC) ja UV-detektointia. Tanniinien määrä analysoitiin väritestillä spektrofotometrisesti (absorbanssit mitattiin aallonpituudella 550 nm). Tulosten tilastolliseen analyysiin käytettiin varianssianalyysiä (ANOVA) ja Fisherin PLSD-testiä. Lisäksi kaikilta kolmelta kasvupaikalta otettiin maaperänäytteet, jotka lähetettiin analysoitavaksi Suomen Ympäristöpalvelu Oy:lle.

Etelänkevätesikon kukinnoista ja lehdistä määritettiin yhteensä 20 erilaista flavonoidiyhdistettä, joista 16 pystyttiin tunnistamaan ja nimeämään. Tutkimus osoitti kukintojen sisältävän hyperiiniä, kversetiini diglykosidia, kversetiini glykosidia, luteoliini 7-glukosidia, kemferoli monoglykosidia, isorhamnetiini glykosidia sekä neljää tuntematonta flavonoidia. Lehdistä löytyi kemferoli diglykosidia, kemferoli monoglykosidia, kversetiini diglykosidia, hyperiinia, kemferoli 3-glukosidia ja kemferoli glykosidia. Tanniinien kokonaispitoisuus kuivatuissa lehdistä oli keskimäärin 49,9 mg/g ja kukinnoissa 24,5 mg/g.

Tutkimus osoitti etelänkevätesikon sisältävän runsaasti erilaisia bioaktiivisia yhdisteitä, joten tutkimustulokset tukevat etelänkevätesikon mahdollista käyttöä lääkekasvina. Kahden erilaisen kukkatyyppin välillä ei ollut merkitsevää eroa sekundaarimetabolian tuottamien yhdisteiden pitoisuuksissa tai biomassoissa. Sen sijaan kasvupaikkojen välillä oli merkitseviä eroja kukintojen ja lehtien flavonoidi- ja tanniinipitoisuuksissa sekä biomassoissa. Tätä selittävät mm. kasvupaikkojen erot maaperän liukoisen typen määrässä.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND

Department of Biology

LAURIKAINEN, KATJA: The phenolic substances in flower types pin and
thrum of *Primula elatior*.

MSc. Thesis, 40 pp., Appendices 3

September 2012

The target of this MSc. thesis was to find out the flavonoid quality and the concentration of flavonoids and tannins in *Primula elatior*. There are two different types of flowers *P. elatior*. The hypothesis in this study was that the two different flower types would have differences in the amounts of phenolic compounds and biomass. In addition the soil samples taken from the habitat are used to explain the effect of location in the biomass and the concentration of flavonoids and tannins.

The earlier studies have shown that large amounts of bioactive compounds such as triterpenesaponins and different phenolic compounds appear in the *Primula* genus. Some of these have been found to have improving influence in the human health. *Primula elatior* has been traditionally used as a folk medicine.

Plants with two different types of flowers collected from three locations were used in the study. The biomass was measured from the dried plant samples. Liquid chromatography and UV detection were used to determine the flavonoid consistency of the inflorescence and leaves. The amount of tannins was analyzed by spectrophotometrical color test (the absorbances were measured in the wavelength of 550 nm). Variance analysis (ANOVA) and the Fisher PLSD test was used for the statistical analyses of the results. In addition soil samples were taken from the three locations and sent to Suomen Ympäristöpalvelu Oy for analysis.

Altogether 20 different flavonoid compounds were defined from the inflorescence and leaves of the *P. elatior* and 16 of them were identified. The study showed that the inflorescence contained hyperine, quercetin diglycoside, quercetin glycoside, luteolin 7-glucoside, kampherol monoglycoside, isorhamnetin glycoside and unknown flavonoids 1-4. Kampherol diglycoside, kampherol monoglycoside, quercetin diglycoside, hyperine, kampherol 3-glucoside and kampherol glycoside were found from the leaves. The total concentration of tannins was 49,9 mg/g in dried leaves and 24,5 mg/g in the inflorescence.

The study showed that the *P. elatior* contains a numerous amount bioactive substances so the study results are supporting the use of *P. elatior* as a medicine plant. The statistical analysis shows that there was no significant difference between the two different flower types in the biomass or in the concentration of substances produced by the secondary metabolism. The locations instead had significant differences and the biomass and in the flavonoid and tannin concentration of the inflorescence and leaves. This is explained among other things by the differences in the amount of soluble nitrogen in the soil.

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO.....	3
2 ETELÄNKEVÄTESIKKO	4
2.1 Lajikuvaus	4
2.2 Levinneisyys	6
2.3 Heterostyilia.....	7
3 KASVIEN SEKUNDAARIMETABOLIAN TUOTTEET	9
3.1 Kasvien sekundaarimetabolia	9
3.2 Fenoliset yhdisteet	9
3.3 Flavonoidit.....	10
3.3.1 Flavonoidien tehtävät kasveissa.....	11
3.3.2 Flavonoidien vaikutus ihmisen terveyteen.....	11
3.4 Tanniinit.....	12
4 AINEISTO JA MENETELMÄT	13
4.1 Kasvinäytteet	13
4.2 Flavonoidien määrittäminen	14
4.2.1 Uuttaminen ja erottelu.....	14
4.2.2 Yleistä korkean erotuskyvyn nestekromatografiasta (HPLC)	14
4.2.3 Flavonoidien erottaminen ja tunnistaminen nestekromatografialla (HPLC)	16
4.2.4 Flavonoidipitoisuuksien laskeminen.....	17
4.3 Tanniinien määrittäminen	18
4.3.1 Tanniinien erottaminen	18
4.3.2 Tanniinipitoisuuden laskeminen	18
4.4 Maaperänäytteet.....	18
4.5 Tilastollinen käsittely	18
5 TULOKSET	19
5.1 Juurten, lehtien, kukinnan ja varren biomassassa	19
5.2 Flavonoidien kokonaispitoisuudet kukinnoissa ja lehdissä.....	21
5.2.1 Kukintojen ja lehtien flavonoidiyhdisteet.....	21
5.2.2 Kukintojen flavonoidikoostumus ja -pitoisuudet.....	21
5.2.3 Lehtien flavonoidikoostumus ja -pitoisuus.....	26
5.3 Tanniinien kokonaispitoisuudet kukinnoissa ja lehdissä.....	30

5.4 Maaperä	32
6 TULOSTEN TARKASTELO	32
6.1 Flavonoidit.....	32
6.2 Tanniinit.....	34
6.3 Kukkatyyppi	34
6.4 Kasvupaikka	35
6.5 Tutkimuksen luotettavuuden arviointi.....	36
6.6 Etelänkevätesikon esiintyminen Suomessa	36
7. JOHTOPÄÄTÖKSET	37
KIITOKSET	37
LÄHDELUETTELO	37
LIITTEET.....	41

1 JOHDANTO

Esikkojen sukuun *Primula* kuuluu 430 lajia ja niiden levinneisyys kattaa kauttaaltaan pohjoisen pallonpuoliskon lauhkean lehtimetsävyöhykkeen (Richards 2003). Etelänkevätesikko (*Primula elatior*) on yksi 34:stä Euroopassa luonnonvaraisesti esiintyvistä *Primula*-suvun lajista. Sen luonnonvarainen levinneisyysalue ulottuu aina Espanjasta Keski-Aasiaan saakka (mm. Jacquemyn et al. 2009). Pohjoisimmillaan etelänkevätesikkoa tavataan Tanskassa ja Etelä-Ruotsissa sekä hajapopulaatioita Baltiassa (Taylor & Woodell 2008). Lajia ei esiinny Suomessa luonnonvaraisesti (Hämet-Ahti et al. 1998), mutta suosittuna puutarhakasvina sitä on siirretty suomalaisiin puutarhoihin. Puutarhakarkulaisena se on levinnyt lähimaastoon ja muodostaa nykyisin jokseenkin pysyviä populaatioita eteläisessä Suomessa.

Aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet *Primula*-suvussa esiintyvän runsaasti erilaisia sekundaarimetaboliitteja eli nk. toissijaisen aineenvaihdunnan tuotteita (Morozowska & Wesolowska 2004). *Primula*-suvulle tyypillisiä sekundaarimetabolian tuottamia bioaktiivisia yhdisteitä ovat triterpeenisaponiinit ja erilaiset fenoliset yhdisteet. Nämä bioaktiiviset yhdisteet toimivat kasveissa väripigmentteinä ja hajua- ja makuyhdisteinä (Taiz & Zeiger 2006). Niillä on tärkeä merkitys kasvien puolustautuessa herbivoreja ja patogeenejä vastaan sekä houkutellessa pölyttäjiä. Osalla kasvien sekundaarimetaboliiteista on todettu olevan ihmisen terveyttä edistäviä vaikutuksia. Etelänkevätesikkoa onkin käytetty perinteisesti rohtona kansanlääkinnässä (Müller et al. 2006). Toisaalta osan yhdisteistä on todettu olevan ihmiselle toksisia (Harborne & William 1992).

Bryant et al. (1983) esitti hiili-typpi allokaatiohypoteesin (CNB, carbon-nutrient balance) selittämään ympäristötekijöiden (kuten hiilidioksidin, ravinteiden ja valon) saatavuuden vaikutusta hiilipohjaisten sekundaarimetaboliittien akkumulaatioon kasveilla. Kasvit käyttävät hiiltä kasvuunsa (esim. primaarimetabolian prosesseihin), jonka lisäksi ne akkumuloivat sitä fotosynteesituotteisiin. Hiili-typpi allokaatiohypoteesin mukaan vähäravinteinen maaperä rajoittaa kasvin kasvua enemmän kuin fotosynteesiä. Kasvin kasvu hidastuu ja fotosynteesituotteet akkumuloituvat, jolloin C/N-suhde kasvissa kasvaa. Ylimääräiset fotosynteesituotteet kasvi varastoi sekundaariyhdisteiksi kuten fenoleiksi, joita kasvi voi käyttää puolustautumiseen. Sen sijaan normaaleissa ravinneoloissa kasvi käyttää suurimman osan hiilestä vegetatiiviseen kasvuunsa, jolloin C/N-suhde laskee ja sekundaariyhdisteiden tuotanto alenee. Herms & Mattson (1992) esittivät kasvu-erilaistumistasapaino -hypoteesin (GDB, growth-differentiation balance), jonka mukaan kasvi joutuu jakamaan rajalliset resurssinsa kasvuun ja

puolustautumiseen. Kasvun ja erilaistumisen välillä on fysiologinen ”trade-off”. Kasvi käyttää ympäristöresursseja primaareihin aineenvaihduntaprosesseihin, jotka tuottavat kasvin kasvun kannalta tärkeitä yhdisteitä ja mahdollistavat kasvin kilpailun. Kasvun lisäksi kasvi käyttää ympäristöresursseja sekundaariyhdisteiden tuottamiseen, joiden avulla se pystyy puolustautumaan herbivoreja ja patogeeneja vastaan.

Etelänkevätesikolla esiintyy kahdenlaisia kukkia (distylia) (Endels et al. 2005). Heterostylia on *Primula*-suvun lajeille tyypillinen piirre (Richards 2003). Thrum-tyypin kukassa emiön vartalo on lyhyt ja heteiden ponnet ovat korkealla kun taas pin-tyypin kukassa emiön vartalo on pitkä ja heteiden ponnet alhaalla. Heterostyliian tarkoituksena on edistää ristipölytystä kahden erilaisen kukkatyypin välillä (Kery et al. 2003).

Etelänkevätesikon sekundaarimetabolian tuottamien yhdisteiden tutkimus on keskittynyt pääasiassa *Primula*-suvussa yleisesti esiintyviin triterpeenisaponiineihin (Calis et al. 1992, Yayli 2001). Varsinkin etelänkevätesikon lehtien sisältämien flavonoidien osalta tutkimus on ollut vähäistä (Budzianowski & Wollenweber 2007). Tanniinien määristä kukinnoissa ja lehdistä ei ole lainkaan aikaisempaa tutkimustietoa. Lisäksi heterostyliian vaikutusta etelänkevätesikon sekundaariyhdisteiden määrään ei ole tutkittu.

Tämän pro gradu-tutkielman tavoitteena on selvittää etelänkevätesikon kukintojen ja lehtien flavonoidiyhdisteiden koostumus ja pitoisuudet. Hypoteesina tutkimuksessa on, että kahden erilaisen kukkatyypin (pin ja thrum) välillä olisi eroja flavonoidipitoisuuksissa. Tutkimuksessa selvitetään myös toisen fenoliyhdisteryhmän, tanniinien kokonaispitoisuus kukinnoista ja lehdistä sekä niiden vaihtelu kukkatyyppien välillä. Lisäksi koepaikoilta otetaan maaperänäytteet, joiden perusteella on tarkoitus selvittää paikan vaikutusta kasvin kuivapainoon sekä flavonoidien ja tanniinien määriin.

2 ETELÄNKEVÄTESIKKO

2.1 Lajikuvaus

Etelänkevätesikko on matala pitkäikäinen kukkakasvi, jonka kurtupintaiset ja lyhytkarvaiset lehdet kasvavat löyhänä ruusukkeena maata vasten (mm. Taylor & Woodell 2008). Lehdet ovat muodoltaan soikeita ja lehden laita on epätasaisen terävänirhainen. Lehden ruoti on lapaa lyhyempi ja siipipalteinen (Hämet-Ahti et al. 1998). Etelänkevätesikko kukkii Suomessa touko-kesäkuussa, jolloin siihen ilmestyy yhdestä muutamaa hienokarvaista, 10 - 30 cm korkeaa, toispuoleista kukkavanaa. Kukan teriö on vaaleankeltainen, suppilomainen, 15 - 25 mm

leveä, yhdyslehtinen ja 5-liuskainen. Kukan verhiö on 10 - 12 mm pitkä, lieriömäinen ja särmikäs.

Pohjois- ja Länsi- Euroopassa etelänkevätesikkoa esiintyy pääasiassa alavilla, kosteilla ja varjoisilla metsämailla (Richards 2003). Lajia tavataan tyypillisesti vanhoissa metsissä, vaikka sen tiedetään kolonialisoineen myös viimeaikoina metsittyneitä alueita (Jacquemyn 2002). Etelänkevätesikon levinneisyysalueen eteläisissä ja itäosissa lajia tavataan hyvin erilaisissa elinympäristöissä aina vuoristoista ruohoaroille asti. Maaperäanalyysien perusteella voidaan todeta etelänkevätesikon viihtyvän happamassa ja vähäravinteisessa maassa (Taylor & Woodell 2008). Lajia tavataankin alueilla, joissa typen ja fosforin määrä maaperässä on alhainen. Etelänkevätesikon siementaimien kasvatuksessa ei ole havaittu liukoisen nitraatin tai fosfaatin lisäyksellä olevan merkittävää vaikutusta taimien kasvuun. Lajin tiedetään sietävän myös hyvin myrkyllisten yhdisteiden kuten rautaionien korkeita pitoisuuksia maaperässä.

Etelänkevätesikko lisääntyy sekä kasvullisesti että suvullisesti. Vaikka kasvin kukintoihin kehittykin runsaasti siemeniä, niin niiden leviäminen on heikkoa (Taylor & Woodell 2008). Lajille ei ole kehittynyt erityistä leviämismekanismia siementen levittämiseen. Tämä osaltaan vaikuttaa siihen, että etelänkevätesikon populaatiot ovat usein pieniä ja eristyneitä. Tutkimukset eivät kuitenkaan ole osoittaneet, että laji kärsisi geneettisen monimuotoisuuden vähenemisestä pienissä ja eristyneissä populaatioissa. Sen sijaan etelänkevätesikolla näyttää olevan suuri geneettinen monimuotoisuus myös pienissä ja pirstaloituneissa populaatioissa.

Etelänkevätesikko voi risteytyä lähilajien kevätesikon (*Primula veris*) ja kääpiöesikon (*Primula vulgaris*) kanssa (Richards 2003). Kahden lajin väliset risteymät eli hybridit ovat osittain hedelmällisiä, mikä osoittaa vahvaa geneettistä suhdetta lajien välillä. Risteymät ovat yleisiä luonnossa alueilla, joissa tavataan useampaa *Primula*-suvun lajia sekapopulaatioissa (Valentine 1975). Brittein saarilla esiintyy luonnonvaraisesti kaikkia kolmea *Primula*-suvun lajia (Taylor & Woodell 2008). Siellä suoritetut tutkimukset ovat osoittaneet etelänkevätesikkoa ja kääpiöesikkoa kasvavan usein samoilla alueilla sekapopulaatioissa. Tämän lisäksi ne kukkivat samanaikaisesti, joten risteymien syntyminen on tavallista. Sen sijaan etelänkevätesikon ja kevätesikon risteymiä pidetään harvinaisina (Gurney et al. 2007). Tähän vaikuttaa se, että Britanniassa lajien esiintymisalueet ja kukkimisajat eroavat merkittävästi toisistaan. Risteymät myös tuottavat huonosti itämiskykyisiä siemeniä. Puutarhoissa esikoita kuitenkin kasvatetaan usein useampaa lajia samalla alueella, jolloin ne pääsevät risteytymään keskenään ja tuottamaan hybridejä jälkeläisiä.

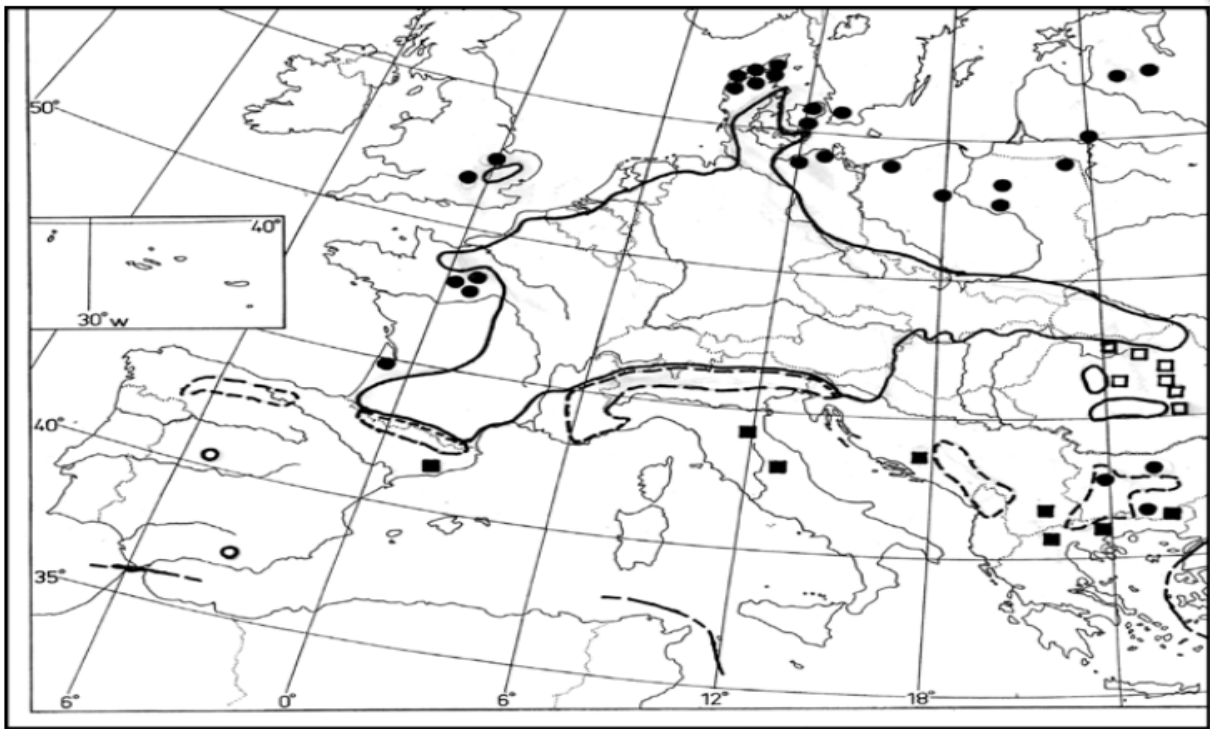
2.2 Levinneisyys

Esikkojen sukuun *Primula* kuuluu 430 lajia ja niiden levinneisyys kattaa kauttaaltaan pohjoisen pallonpuoliskon lauhkean lehtimetsävyöhykkeen (Richards 2003). Suurin osa *Primula*-suvun lajeista esiintyy Himalajalla ja Länsi-Kiinan vuoristoissa. Euroopassa tavataan yhteensä 34 ja Pohjois-Amerikassa 20 *Primula*-sukuun kuuluvaa lajia. Tämän lisäksi risteymiä ja viljelymuotoja on tuhansittain (Berglund 2007). Osa *Primula*-suvun lajeista on suosittuja puutarha- ja koristekasveja (Basbulbul et al. 2008).

Euroopassa etelänkevätesikon luonnonvarainen levinneisyysalue ulottuu aina Espanjasta Keski-Aasiaan asti (mm. Jacquemyn et al. 2009). Pohjoisimmillaan etelänkevätesikkoo tavataan Tanskassa ja Etelä-Ruotsissa sekä hajapopulaatioita Baltiassa (Taylor & Woodell 2008). Lajia ei esiinny Suomessa luonnonvaraisesti (Hämet-Ahti et al. 1998), mutta suosittuna puutarhakasvina sitä on siirretty suomalaisiin puutarhoihin. Lajia tavataan piholla, puistoissa ja pellonlaidoilla, puutarhakarkulaisena. Etelänkevätesikon tiedetään muodostavan nykyisin jokseenkin pysyviä populaatioita eteläisessä Suomessa.

Euroopassa tavataan kahdeksaa allopatrista alalajia (Kuva 1). Ainoastaan alalajin *Primula elatior subsp. elatiorin* levinneisyys on yhtenäinen aina Länsi-Euroopasta Itä-Eurooppaan asti, jossa sitä esiintyy harvemmassa (Taylor & Woodell 2008). Pohjoisimmillaan alalajia tavataan Tanskassa ja Etelä-Ruotsissa. Brittein saarilla esiintyvistä etelänkevätesikkopopulaatioista kaikkien on todettu kuuluvan alalajiin *P. e. subsp. elatior*. Alalajin *P. e. subsp. loft-housei* (Heslop-Harrison) esiintymisalue rajoittuu Espanjaan, jossa sitä tavataan endeemisenä Sierra Nevadassa ja Etelä-Espanjassa (Richards 2003). Alalajia *P. e. subsp. leucophylla* (Pax) esiintyy Itä- Karpaateilla Romaniassa ja Kaukasuksen alueella.

Etelänkevätesikon levinneisyys alueen itäisimmissä osissa, Uralilla, Turkissa, Pohjois-Iranissa sekä Itä-Siperiassa esiintyy alalajia *P. e. subsp. pallasii* (Lehm.), jota Suomessa kutsutaan isokevätesikoksi. Itäisiin alalajeihin kuuluu myös alalajit *P. e. subsp. meyeri* (Rupr.) ja *P. elatior subsp. pseudoelatior* (Kusn.), joita tavataan Pohjois- ja Itä-Turkissa sekä Kaukasusvuorilla ja Armeniassa. *P. e. subsp. meyerin* populaatioiden välillä on hyvin suurta vaihtelua, jonka johdosta ne joskus jaetaan kolmeen alalajiin *P. e. subsp. amoena*, *P. e. subsp. meyeri* ja *P. e. subsp. kusnetsovii*. Alalajin *P. e. subsp. cordifolia* (Rupr.) levinneisyys kattaa edellisten alalajien tapaan Kaukasuksen ja Armenian, mutta sitä yleensä esiintyy alhaisimmilla leveysasteilla.

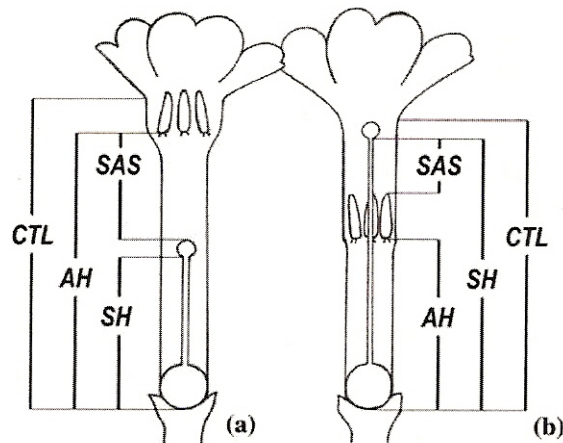


Kuva 1. Etelänkevätesikon alalajien levinneisyys Euroopassa. *Primula elatior* subsp. *elatior* yhtenäinen levinneisyys alue — ja hajapopulaatiot ●. *P. e.* subsp. *intricata* yhtenäinen levinneisyys alue ---- ja hajapopulaatiot ■. *P. e.* subsp. *lofthousei* ○ ja *P. e.* subsp. *intricata* □ (Taylor & Woodell 2008).

Alalajia *Primula elatior* subsp. *intricata* (Gren & Godron) esiintyy yleisesti Etelä-Alpeilla, Pyreneillä, Etelä-Karpaateilla ja Apenniineilla (Taylor & Woodell 2008). Sen luokittelu etelänkevätesikon alalajiksi on perustunut lähinnä sen morfologisiin piirteisiin. Viimeaikaiset geneettiset tutkimukset ovat kuitenkin osoittavat *Primula elatior* subsp. *intricata* olevan selvästi oma lajinsa (Şuteu et al. 2011).

2.3 Heterostylia

Heterostylia on ehkä kaikkein tyypillisin piirre *Primula*-suvun lajeille (Richards 2003). Heterostylisillä kasveilla esiintyy kaksi (distylia) tai kolme (tristylia) erilaista kukkatyyppiä (Tirri et al. 2003). Etelänkevätesikolla esiintyy kahdenlaisia kukkia. Thrum-kukkatyyppillä emiön vartalo on lyhyt ja heteiden ponnet ovat korkealla, kun taas pin-kukkatyyppillä emiön vartalo on pitkä ja heteiden ponnet alhaalla (Endels et al. 2005) (Kuva 2). Pin-muodon kasvit ovat resessiivista homotsygoottista (ss) genotyyppiä ja thrum-muodon kasvit ovat yleensä heterotsygoottista (Ss) genotyyppiä (Richards & Ibrahim 1982).



Kuva 2. Etelänkevätesikon kaksi erilaista kukkatyyppiä: thrum-muoto (a) ja pin-muoto (b) (Kalman et al. 2007).

Kahden erilaisen kukkatyyppin välillä on eroja myös siitepölyn koossa. Thrum-tyypin kukkien heteet tuottavat suurempia siitepölyhiukkasia kuin pin-tyypin kukkien heteet. Heterostylian tarkoituksena on vaikeuttaa sukusiitosta ja edistää ristipölytystä kahden erilaisen kukkatyyppin välillä (Kery et al. 2003). Erilainen kukkien rakenne edistää thrum-kukkatyyppin siitepölyn siirtymistä pölyttäjähönteisen mukana pin-kukkatyyppin kukkien luotille ja päinvastoin. Kukkien väliset erot varmistavat siitepölyn tarttumisen eri osaan hyönteistä, jolloin kukat pölytyvät vain erityyppisestä kukasta tulleella siitepölyllä (Pirainen et al. 1999). Kukkien pölyttämisestä etelänkevätesikolla vastaa pääasiassa Hymenoptera tai Diptera (mm. Van Rossum & Tries 2006).

Siementen tuottamiseen on uskottu vaadittavan kahden eri kukkatyyppin välistä pölytystä. Viimeaikaiset tutkimukset kuitenkin osoittavat kahden saman kukkatyyppin välisen pölytyksen olevan mahdollista (Richards 2003). Etelänkevätesikolla kahden pin-tyypin kukan välisen pölytyksen ei ole todettu tuottavan siemeniä. Sen sijaan kahden thrum-tyypin kukan välisen pölytyksen tuloksena on saatu siemeniä. Etelänkevätesikon kahdella lähilajilla kevätesikolla (*Primula veris*) ja kääpiöesikolla (*Primula vulgaris*) tilanne on täysin päinvastainen.

Kukkien värin ja tuoksun tarkoituksena on houkuttaa pölyttäjiä (Browsher et al. 2008). Kukkien tuoksu muodostuu kemiallisista yhdisteistä, joiden koostumus vaihtelee kasvilajien välillä. Etelänkevätesikon kukat sisältävät useita aromaattisia yhdisteitä (Gasgett et al. 2005). Määrällisesti eniten kukissa esiintyy limoneenia, jonka lisäksi kukista on löydetty pieniä määriä alfa-pineenia, myrseeniä ja sabineenia. Pin- ja thrum-tyypin kukkien välillä ei ole todettu olevan eroa tuoksun muodostavissa kemiallisissa yhdisteissä.

3 KASVIEN SEKUNDAARIMETABOLIAN TUOTTEET

3.1 Kasvien sekundaarimetabolia

Kasvin aineenvaihdunta eli metabolia jaetaan primaari- ja sekundaarimetaboliaan. Primaarimetabolia on kasvin perusaineenvaihduntaa, jonka tarkoituksena on tuottaa kasville sen kasvun ja kehityksen kannalta elintärkeitä yhdisteitä kuten aminohappoja, proteiineja, lipidejä ja nukleiinihappoja (Taiz & Zeiger 2006). Sen sijaan kasvien sekundaarimetabolia tuottaa suuren määrän erilaisia bioaktiivisia yhdisteitä, joilla ei ole ajateltu olevan suoraa tehtävää kasvin kasvussa ja kehityksessä normaaleissa oloissa. Uusimmat tutkimukset kuitenkin osoittavat sekundaariyhdisteiden osallistuvan kasvin tärkeisiin fysiologisiin ja biokemiallisiin toimintoihin (mm. Keskitalo 2001).

Sekundaarimetabolian tuottamia sekundaarimetaboliitteja tuotetaan yleensä pieniä määriä vain tietyssä kehitysvaiheessa tai vasteena stressireaktioihin (Taiz & Zeiger 2006). Siitä huolimatta niillä on tärkeä merkitys kasville, sillä ne toimivat kasvissa väri-, haju- ja makuyhdisteinä, joiden avulla kasvit pystyvät houkuttelemaan pölyttäjiä ja puolustautumaan herbivoreja, sieniä ja mikrobeja vastaan (Browser et al. 2008). Lisäksi ne toimivat signaalimolekyyleinä kasvien välisessä kilpailussa ja kasvien mikrobien välisessä symbioosissa. Kasvien tuottamat sekundaarimetabolian yhdisteet jaetaan kolmeen pääryhmään niiden biosynteesireittien mukaan: fenolit, terpeenit ja tyypeä sisältävät yhdisteet. Kasvien primaari- ja sekundaarimetabolia liittyvät läheisesti toisiinsa, sillä primaarimetabolia tuottaa erilaisia yhdisteitä sekundaarimetabolian lähtöaineiksi.

3.2 Fenoliset yhdisteet

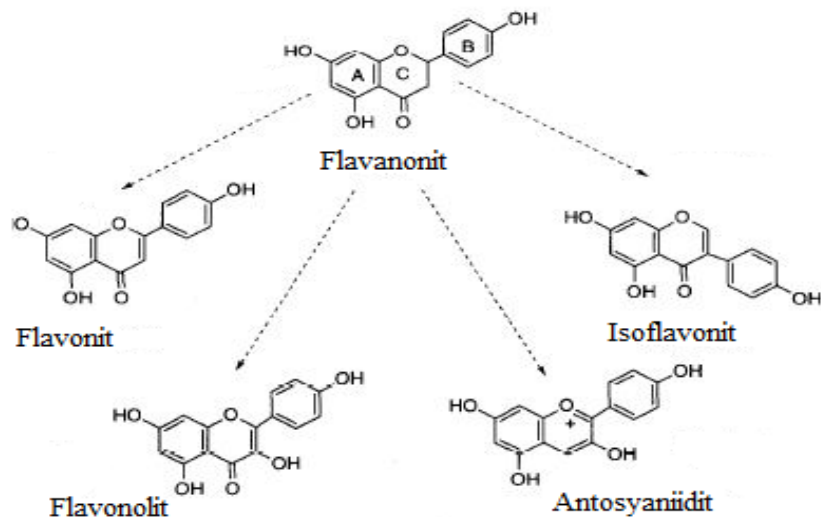
Kasvien fenoliset yhdisteet ovat hyvin laaja orgaanisten yhdisteiden ryhmä, johon kuuluvia erilaisia yhdisteitä on tunnistettu noin 10 000 (Bowsher et al. 2008). Fenolisten yhdisteiden pitoisuus ja koostumus vaihtelee lajeittain tai jopa lajikkeittain (mm. Keskitalo et al. 2001). Kasvien tuottamat fenoliset yhdisteet koostuvat aromaattisesta renkaasta, johon on liittynyt yksi tai useampi hydroksyyli-ryhmä (-OH) (Taiz & Zeiger 2006). Ne esiintyvät kasveissa mono- ja dimeereinä tai monimutkaisina polymerisoituneina molekyyleinä kuten tanniinit ja ligniinit (mm. Taiz & Zeiger 2006, Keskitalo et al. 2001). Kasvien tuottamat fenoliset yhdisteet voivat esiintyä kasvissa vapaina tai sitoutuneina sokereihin (glykosideina), aminohappoihin, terpeeneihin ja proteiineihin. Ne voivat esiintyä myös happojen kanssa esteröityneinä. Fenoli-

set yhdisteet voidaan jakaa monella tapaa. Yksi tapa on jakaa ne neljään pääryhmään, joita ovat yksinkertaiset fenolit, flavonoidit, ligniinit ja tanniinit.

Kasvien tuottamilla fenolisilla yhdisteillä on monia merkittäviä biologisia tehtäviä kasvis-
sa. Ne antavat kasveille värin, tuoksun ja maun, jolla kasvit pystyvät houkuttelemaan pölyttä-
jiä ja karkottamaan herbivoreja, sieniä ja patogeenejä (Bowsher et al. 2008). Osa kasvien tuot-
tamista fenolisista yhdisteistä on nisäkkäille ja hyönteisille myrkyllisiä. Niiden on todettu
myös antavan suojaa UV-säteilyä vastaan ja toimivan signaalimolekyyleinä kasvien välisessä
kilpailussa ja kasvien ja mikrobien välisessä symbioosissa (Harborne & Williams 1992). Li-
säksi fenolisiin yhdisteisiin kuuluvat ligniinit ovat vahvoja sidoksia muodostavia polyfenolei-
ta, jotka muodostavat kasvin tukirangan lujittamalla kasvisolun soluseinää (Taiz & Zeiger
2006).

3.3 Flavonoidit

Flavonoidit kuuluvat kasvien sekundaarimetaboliitteihin, joita tunnetaan yli 4000 erilaista
yhdistettä (Huck et al. 2000). Flavonoidit ovat yhteisnimitys monimuotoiselle yhdisteryhmäl-
le, joka koostuu vesiliukoisista fenolijohdoksista (Tirri et al. 2003). Ne rakentuvat kahdesta
aromaattisesta renkaasta, jotka yhdistyvät kolmesta hiilestä muodostuvalla hiilisillalla (Brow-
ser et al. 2008). Useimmat flavonoidit esiintyvät kasveissa sokereihin sitoutuneina gly-
kosideinä, jolloin yhteen tai useampaan aglykonin hydroksyyliiryhmään on kiinnittynyt jokin
sokeriosa eli glykoni glykosididoksella. Kasvit säilövät flavonoideja inaktiiviseen muotoon
glykosideiksi, josta ne voidaan tarvittaessa ottaa kasvin käyttöön. Jos glykosidin glykoni-osa
on glukoosi, molekyyliä kutsutaan glukosidiksi. Flavonoidit voidaan luokitella niiden kemial-
lisen rakenteen perusteella useaan ryhmään, joita ovat esimerkiksi flavonit, flavonolit, fla-
vanonit, isoflavonoidit ja antosyaniinit (Bowsher et al. 2008) (Kuva 3). Flavoneihin kuuluvis-
ta yhdisteistä tunnetuimpia ovat luteoliini ja apigeniini (Peterson & Dwyer 1998). Flavonolei-
hin taas kuuluu paljon tutkittuja flavonoidiyhdisteitä kuten kversetiini, kemferoli ja isorham-
netiini.



Kuva 3. Flavonoidi ryhmien flavanonit, flavonit, flavonolit, isoflavonit ja antosyaniidit kemiallinen rakenne (Peterson & Dwyer 1998).

3.3.1 Flavonoidien tehtävät kasveissa

Koska flavonoidien synteesi vaatii valoa, niitä esiintyy eniten kasvin maanpäällisissä osissa kuten lehdistä ja kukinnoissa (Hyvärinen 2001). Flavonoidien biologiset ominaisuudet ja tehtävät kasveissa vaihtelevat kasvilajeittain. Flavonoidit kuten antosyaniinit antavat kukille niiden sinisen tai punaisen värin, jolla ne houkuttelevat pölyttäjiä (Taiz & Zeiger 2006). Flavonoideihin kuuluu myös yhdisteitä, joiden antama karvas maku suojaa kasveja herbivoreilta. Niillä on todettu olevan antibioottisia ominaisuuksia, jotka auttavat kasvia selviytymään erilaisten patogeenien ja herbivorien hyökkäyksiä vastaan (Harborne & Williams 1992). Kasvien fysiologiset tutkimukset ovat osoittaneet flavonoidien kuten kversetiinin ja kemferolin suojaavan kasveja auringon haitalliselta UV-B-säteilyltä. Suojaavien flavonoidien on todettu nopeuttavan kasvin päällissolujen kykyä vastata lisääntyneeseen UV-B-säteilyyn (Bowsher et al. 2008). Lisäksi kasvien tuottamat flavonoidit toimivat signaalimolekyyleinä. Kasvit voivat esimerkiksi erittää juuristaan maahan spesifisiä signaalimolekyylejä, jotka osallistuvat kasvin ja bakteerien väliseen symbioottiseen typensidontaan.

3.3.2 Flavonoidien vaikutus ihmisen terveyteen

Flavonoideilla on todettu olevan vaikutusta ihmisen terveyteen (Huck et al. 2000). Flavonoidien päivittäisen saannin on arvioitu olevan länsimaalaisessa ruokavaliossa noin 1g/vrk. Sen sijaan suomalaisessa, maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen (MTT) tekemässä

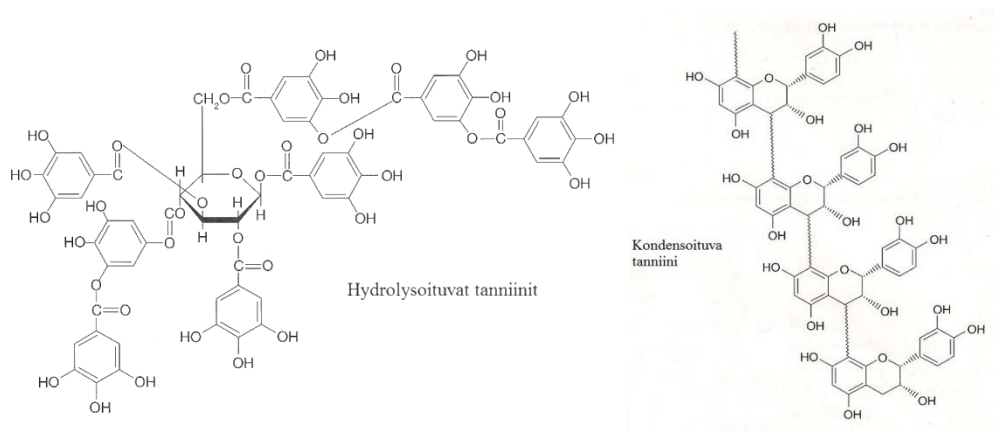
tutkimuksessa flavonoidien kokonaissaanniksi on arvioitu ainoastaan 55 mg/vrk (Mattila & Kumpulainen 2001). Suurimmat flavonoidien pitoisuudet on mitattu kasvien lehdissä, kukissa, marjoissa, hedelmissä, siemenissä, pähkinöissä, vihanneksissa, versoissa, teessä ja viinissä.

Useissa tutkimuksissa eri flavonoidilla kuten kversetiinillä, apigeniinillä, kemferolilla ja luteoliinilla on havaittu olevan antioksidanttista aktiivisuutta (Peterson & Dwyer 1998). Kasvin tuottamien antioksidanttien tiedetään estävän solun aineenvaihdunnassa syntyvien vapaiden happiradikaalien toimintaa (Harborne & Williams 1992). Solujen hapettumisen ja hapen reaktiivisten muotojen eli happiradikaalien syntymisellä on todistettu olevan vaikutusta syövän sekä sydän- ja verisuonitautien kehittymisen (Mattila & Kumpulainen 2001). Erityisesti flavonoidien vaikutusta sydän- ja verisuoni sairauksiin sekä syöpään on tutkittu paljon. Tutkimukset ovat osoittaneet esimerkiksi kversetiinillä ja apigeniinillä olevan syöpäsairauksia estäviä ja hidastavia vaikutuksia. Lisäksi flavonoidit alentavat verenpainetta hillitsemällä tulehdusreaktioita ja verihiutaleiden sakkaantumista.

Antioksidatiivisten vaikutusten lisäksi flavonoideilla on todettu olevan antimikrobiaalisia ominaisuuksia. Ne pystyvät estämään useiden mikrobien ja sienten kasvua sekä lisääntymistä (Mattila & Kumpulainen 2001). Flavonoidien on todettu myös vaikuttavan entsyymien toimintaan (Harborne & Williams 1992). Flavonoideihin kuuluvilla isoflavonoideilla on havaittu olevan estrogeeniaktiivisuutta (Peterson & Dwyer 1998). Runsaan isoflavonien saannin tiedetään aiheuttavan lampailla hedelmättömyyttä (Browser et al. 2008). Liian runsaalla isoflavonien määrällä ruokavaliossa uskotaan olevan vaikutusta myös ihmisten hormonitoimintaan.

3.4 Tanniinit

Tanniinit ovat kasveissa esiintyviä fenolisia yhdisteitä, jotka saostavat proteiineja. Proteiinien saostavuuden takia niitä on perinteisesti käytetty nahan parkitsemiseen (Taiz & Zeiger 2006). Kasvien tuottamat tanniinit jaetaan rakenteensa perusteella kondensoituihin ja hydrolysoituihin tanniineihin (Kuva 4). Kondensoituvat tanniinit eli proantosyanidiinit koostuvat eriasteisesti kondensoituneesta flavonoidiyksiköstä. Hydrolysoituvat tanniinit tuottavat hydrolysoituessaan gallus- tai ellagihappoa ja yksinkertaisia sokereita.



Kuva 4. Hydrolysoituvien ja kondensoituvien tanniinien rakenne (Browser et al. 2008).

Kasvit tuottavat tanniineja puolustautuessaan herbivoreja vastaan. Ne vaikuttavat kasvin makuun, ja nisäkkäiden onkin todettu välttelevän runsaasti tanniineja sisältäviä kasveja. Tanniinit voivat olla myrkyllisiä ja ne heikentävät ravinnon imeytymistä sitoutumalla proteiineihin (Peterson & Dwyer 1998). Pienien määrien esim. punaviinin tanniineja on osoitettu omaavan monia ihmisen terveydelle edullisia ominaisuuksia. Tanniinien tiedetään myös voivan inhiboida sienten kasvua (Browser et al. 2008).

4 AINEISTO JA MENETELMÄT

4.1 Kasvinäytteet

Kasvinäytteiden kerääminen suoritettiin toukokuussa 2011 Siikamäki-Peiposjärvi kylältä, Pieksämäen kunnasta Etelä-Savosta. Kasvinäytteitä kerättiin kolmelta kasvupaikalta, joita olivat Peiposjärven koulu (kasvupaikka koulu), Lassinranta (kasvupaikka ranta) ja Kaipainen (kasvupaikka kaipainen). Kaikilta kolmelta kasvupaikalta otettiin yhteensä kuusi kasvinäytettä juurineen. Multaiset kasvinjuuret huuhdeltiin, jonka jälkeen näytteet kuivattiin huoneenlämmössä.

Kuivatusta näytteistä määritettiin kukkatyyppi ja tarkempaa analysointia varten valittiin 16 kasviyksilöä. Puolet kasvinäytteistä (8 kpl) olivat pin-kukkatyyppiä ja puolet thrum-kukkatyyppiä. Analysoitavista kasvinäytteistä kasvupaikka koululta oli yhteensä neljä näytettä, joista kolme oli pin-kukkatyyppiä ja yksi thrum-kukkatyyppiä. Kasvupaikalta kaipainen kerättiin kuusi kasvinäytettä myöhempää analysointia varten. Kaipaisesta kerätystä kasvinäytteistä kaksi oli pin-kukkatyyppiä ja neljä thrum-kukkatyyppiä. Myös kasvupaikka rannal-

ta otettiin kuusi kasvinäytettä. Rannalta kerätyistä kuudesta kasvinäytteestä kolme oli pin-kukkatyyppiä ja kolme thrum-kukkatyyppiä.

Huonekuivatuista kasvinäytteestä eroteltiin lehdet, kukinto, varsi ja juuret erilleen. Kaikki kasvinosat punnittiin analyysivaa´alla ja tulokset taulukoitiin Microsoft Office Excel 2010-ohjelmalla myöhempää tilastollista testausta varten.

4.2 Flavonoidien määrittäminen

4.2.1 Uuttaminen ja erottelu

Ennen varsinaista kromatografista analyysia flavonoidiyhdisteet eristettiin kuivatusta kasvi-materiaalista uuttamalla. Aluksi kuivatut kukinnot ja lehdet eroteltiin ja jauhettiin Precellys-laitteella. Kukinnosta eroteltiin vähintään viisi kukkaa jokaiseen numeroituun Precellys-pulloon kasvimateriaalin jauhamista varten. Kuivattujen kukkien lisäksi pulloihin laitettiin neljä kuulaa. Kuivatuista lehdistä leikattiin vain toinen puoli jauhatus varten siten, että keskiruoti jätettiin pois. Jokaisesta kasvinäytteestä otettiin viisi lehden puolikasta Precellys-pulloihin, jonka jälkeen pulloihin lisättiin viisi kuulaa.

Etelänkevätesikon kuivasta ja jauhatus kukinto- ja lehtimateriaalista punnittiin 5 mg numeroituihin Precellys-pulloihin (vol 2 ml) uuttamista varten. Precellys-pulloihin pipetoitiin lisäksi 0,6 ml kylmää metanolia ja näyte homogenoitiin Precellys-laitteella 20 sekunnin ajan. Precellys-pullot jätettiin seisomaan jäähauteeseen 15 minuutin ajaksi, jonka jälkeen homogenointi toistettiin. Homogenisoinnin jälkeen näytettä sentrifugoitiin 3 minuutin ajan (13000 rpm, 4 °C). Näytteet otettiin heti pois sentrifugista faasien sekoittumisen estämiseksi. Seuraavaksi supernatatti pipetoitiin pasteur-pipetillä precellys-pulloista 6 ml koeputkiin.

Precellys-pulloihin jääneen sakan uuttaminen toistettiin kolme kertaa muuten samoin, mutta Precellys-pullot jätettiin jäähauteeseen seisomaan vain 5 minuutiksi. Lopuksi koeputkiin kerätty näyte haihdutettiin haihdutus-sentrifugin avulla. Uutettuja näytteitä säilytettiin kylmässä ennen nestekromatografisen analysoinnin aloittamista.

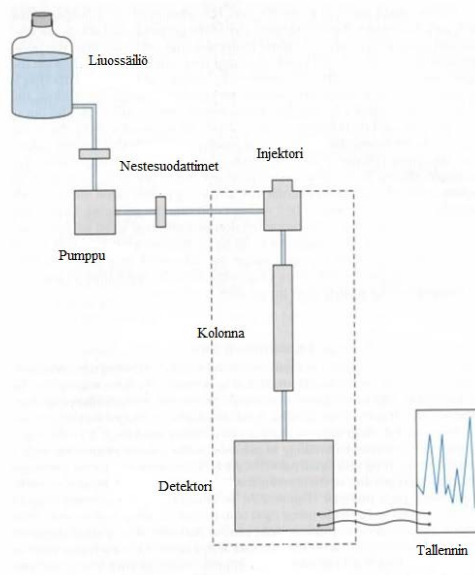
4.2.2 Yleistä korkean erotuskyvyn nestekromatografiasta (HPLC)

Flavonoidien analysointiin käytetään yleensä korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC) (Pihlava 2001). Se soveltuu hyvin flavonoidien määrittämiseen, koska flavonoidit ovat vesiliukoisia ja näin ollen liukenevat helposti liuottimeen. Nestekromatografian avulla

voidaan erottaa, tunnistaa ja analysoida seoksessa olevia yhdisteitä niiden molekyyliarakenteen ja -koon sekä kemiallisten ominaisuuksien avulla (Snyder et al. 2009).

Korkean erotuskyvyn nestekromatografi koostuu liuossäiliöstä (eluenttisäiliöstä), korkean paineen tuottavasta pumpusta, injektorista eli näytteiden syöttäjästä, kolonnista, detektorista ja tallentimesta (Snyder et al. 2009) (Kuva 5). Nestekromatografisessa systeemissä eluenttiin eli liikkuvaan faasiin liuenneet näytteet pakotetaan kulkemaan kolonnin läpi pumpun avulla. Yhdisteiden erottuminen tapahtuu kolonnissa, joka on pakattu täyteen hienojakoista stationaari-faasia eli kiinteää faasia pinnallaan nestefaasi. Näytteessä olevien yhdisteiden erilainen kemiallinen koostumus aiheuttaa sen, että ne reagoivat eri tavalla kolonnin faasin ja eluentin kanssa. Yhdisteiden erilainen vuorovaikutus kolonnin faasin ja eluentin kanssa aiheuttaa sen, että ne kulkevat kolonnin läpi eri nopeuksilla. Kolonnin jälkeen oleva detektori havaitsee kolonnissa erottuneet yhdisteet. UV-detektori on kaikkein yleisin nestekromatografiassa käytetty detektori. Detektori on yleensä liitetty tietokoneeseen, josta tulostuu kromatogrammi, jossa erottuneet yhdisteet näkyvät ”piikkeinä”.

Yhdisteiden tunnistaminen perustuu yhdisteen UV-absorptiospektriin ja retentioaikoihin eli siihen aikaan, joka yhdisteeltä kuluu sen kulkeutuessa kromatografisen systeemin läpi. Jokaisella yhdisteellä on sille ominainen retentioaika. Saatuja UV-spektrejä voidaan verrata tunnetuilla yhdisteillä tehtyyn spektrikirjastoon.



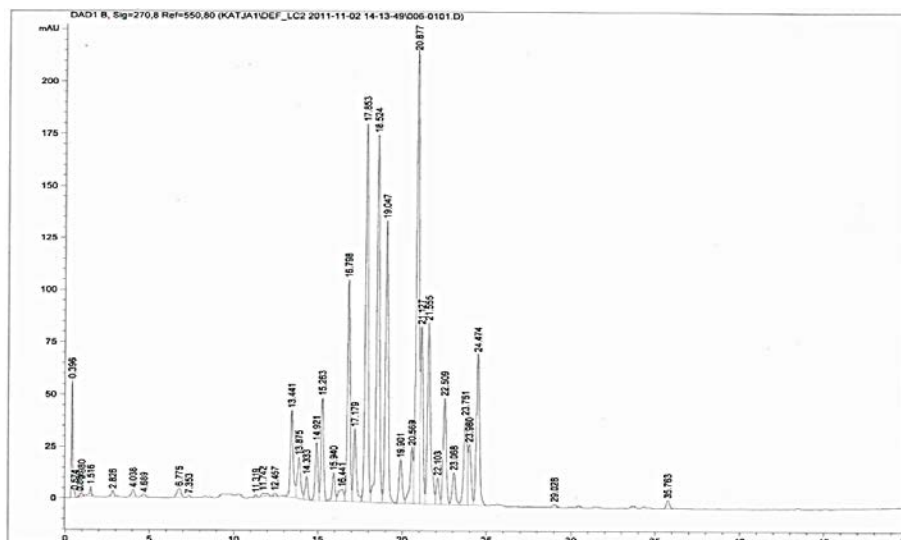
Kuva 5. Nestekromatografisen systeemin osat (Browser et al. 2008).

4.2.3 Flavonoidien erottaminen ja tunnistaminen nestekromatografialla (HPLC)

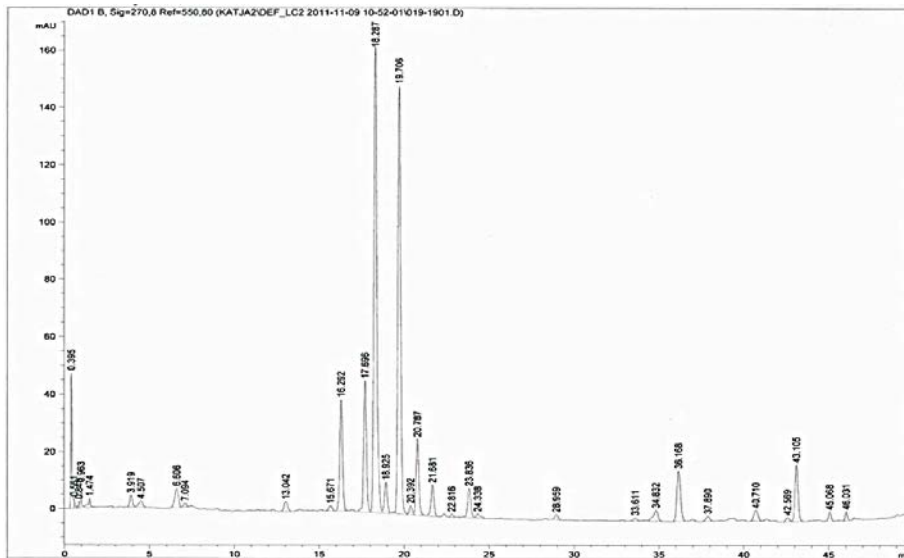
Ennen nestekromatografisen ajon aloittamista haihdutettu näyte liuotettiin 0,3 ml:aan metanolia ja 0,3 ml:aan tislattua vettä. Näytteen liukenemisen edistämiseksi käytettiin ultraäänihaudetta (Bandelin Sonorex super RK106). Näyte kaadettiin numeroituihin eppendorf-putkiin ja sentrifugoitiin 3 minuutin ajan (13000 rpm, 4 °C). Liuos pipetoitiin pasteur-pipetillä HPLC-pulloihin, jonka jälkeen pullot suljettiin nestekromatografista ajoa varten.

Flavonoidikoostumuksen määrittämiseen käytettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC) sekä UV-detektointia. Kukinto- ja lehtinäytteiden yhdisteet ajettiin aallonpituuksilla 220, 270, 320 ja 360 nm. Nestekromatografisessa analyysissä ajoliuoksena eli eluenttina käytettiin kahden liuoksen seosta. A-liuos sisälsi vettä ja vesiliukoista orgaanista liuotinta 1,5 % tetrahydrofuraania sekä 0,25 % *orto*-fosforihappoa, kun taas B-liuos oli 100 % metanolia. Ajot suoritettiin gradientti-ajona, jossa metanolin osuutta nostettiin lineaarisesti 5 minuutista 40 minuuttiin Julkunen-Tiitto ja Sorsa (2001) mukaisesti. Näytettä syötettiin laitteeseen 20 µl.

Erotusprosessin lopputuloksena tulostui kromatogrammi, jossa eri yhdisteet näkyivät signaaleina eli piikkeinä (Kuvat 6 ja 7). Kukinto- ja lehtinäytteistä saatuja retentioaikoja verrattiin jo tunnettuihin standardiarvoihin. Retentioaikojen lisäksi flavonoidiyhdisteiden tunnistamiseen käytettiin UV-detektoria, joka mittasi näytteessä oleville yhdisteille ominaiset spektrit. Kukintojen ja lehtien flavonoidien tunnistaminen tapahtui vertaamalla näytteistä saatuja spektrejä jo tietokoneella valmiina oleviin spektrikirjastoihin.



Kuva 6. Kromatogrammi etelänkevätetikon kukintojen flavonoidiyhdisteistä aallonpituudella 270 nm.



Kuva 7. Kromatogrammi etelänkeväsikön lehtien flavonoidiyhdisteistä aallonpituudella 270 nm.

4.2.4 Flavonoidipitoisuuksien laskeminen

Kukinto- ja lehtinäytteiden flavonoidiyhdisteiden pitoisuudet (mg/g) laskettiin kromatogrammin piikkien pinta-alojen (aallonpituudella 270 nm) perusteella seuraavalla kaavalla

$$\frac{A \times R_f \times 600 \mu\text{l} \times 1000}{20 \mu\text{l} \div 5 \text{mg} \div 1000} = \square \square \square \square \square \square \square \square \square \square$$

Kaavassa A= piikin ala, Rf-arvo = vastetekijä, 600 µl = uutteeseen lisätty neste, 20 µl = ajoin otettu näytemäärä ja 5 mg = kuivasta kasvimateriaalista uuttoa varten punnittu määrä. Rf-arvo saadaan jakamalla erottuneen yhdisteen kulkema matka ajoliuoksen kulkemalla matkalla (Harris 1995). Tunnistettujen ja neljän tuntemattoman flavonoidin pitoisuuden laskemisessa käytetyt Rf-arvot saatiin valmiista taulukosta (Taulukko 1).

Flavonoidi	Rf-arvo
tuntematon 1-4	salisiini 0,0101
luteoliini	luteoliini 0,0009664
kversetiini	hyperiini 0,00107
isorhamnetiini	hyperiini 0,00107
hyperiini	hyperiini 0,00107
Flav. (galangiini)	hyperiini 0,00107
kemferoli	kemferoli 3-ramnosidi 0,001355

Taulukko 1. Flavonoidipitoisuuden laskemiseen käytetyt Rf-arvot.

4.3 Tanniinien määrittäminen

4.3.1 Tanniinien erottaminen

Jauhettua kasvinäytettä punnittiin mikrovaakalla 1,5 mg 20 ml kierreputkiin, jonka jälkeen putkiin pipetoitiin 6 ml butanoli-reagenssia, 1 ml metanolia ja 0,2 ml rautareagenssia. Näytteet sekoitettiin perusteellisesti koeputkisekoitinta (vortex) käyttäen korkit kiinni. Tämän jälkeen kierreputkien korkit löysättiin ja näytteitä keitettiin 50 minuuttia. Keittämisen jälkeen näytteiden annettiin jäähtyä 10 minuuttia. Näyte kaadettiin 10 ml numeroituun koeputkeen, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin 3 minuutin ajan (13000 rpm, 4°C). Näytteistä mitattiin absorbanssi spektrofotometrillä (Spectronic 20 Instruments) aallonpituudella A550 nm. Nollaliuoksena käytettiin butanoli-reagenssia.

4.3.2 Tanniinipitoisuuden laskeminen

Etelänkevätetikon kukintojen ja lehtien tanniinipitoisuus laskettiin spektrofotometrillä mitattujen absorbanssien 550 nm perusteella *Betula nana* tanniinisuoran avulla seuraavasti:

$$x = \frac{y - 0,0317}{0,0066}$$

4.4 Maaperänäytteet

Kaikilta kolmelta koepaikalta otettiin maaperänäytteet, jotka lähetettiin analysoitavaksi Suomen Ympäristöpalvelu Oy:lle. Maaperänäytteiden ottamista varten maanäyterasiaan merkittiin tussilla kasvupaikka. Kaikilta kolmelta kasvupaikalta otettiin 7-8 osanäytteestä koostuva maaperänäyte näytteenottokairalla. Laboratorioon analysoitavaksi lähetettävässä näytteessä ei saanut olla pohjamaan lisäksi roskaa tai kiviä, joten näytteistä poistettiin 2 cm pintamaata. Viljavuustutkimusta varten näyterasiat täytettiin vähintään 3/4 rasian tilavuudesta. Lopuksi rasiat suljettiin huolellisesti. Analyysitilaus tehtiin rasioiden mukana toimitetulla lomakkeella.

4.5 Tilastollinen käsittely

Tilastollisia analyysejä varten kaikki kokeista saatu data taulukoitiin Microsoft Office Excel 2010-ohjelmalla. Kaikkien tulosten tilastolliseen analyysiin käytettiin varianssianalyysia

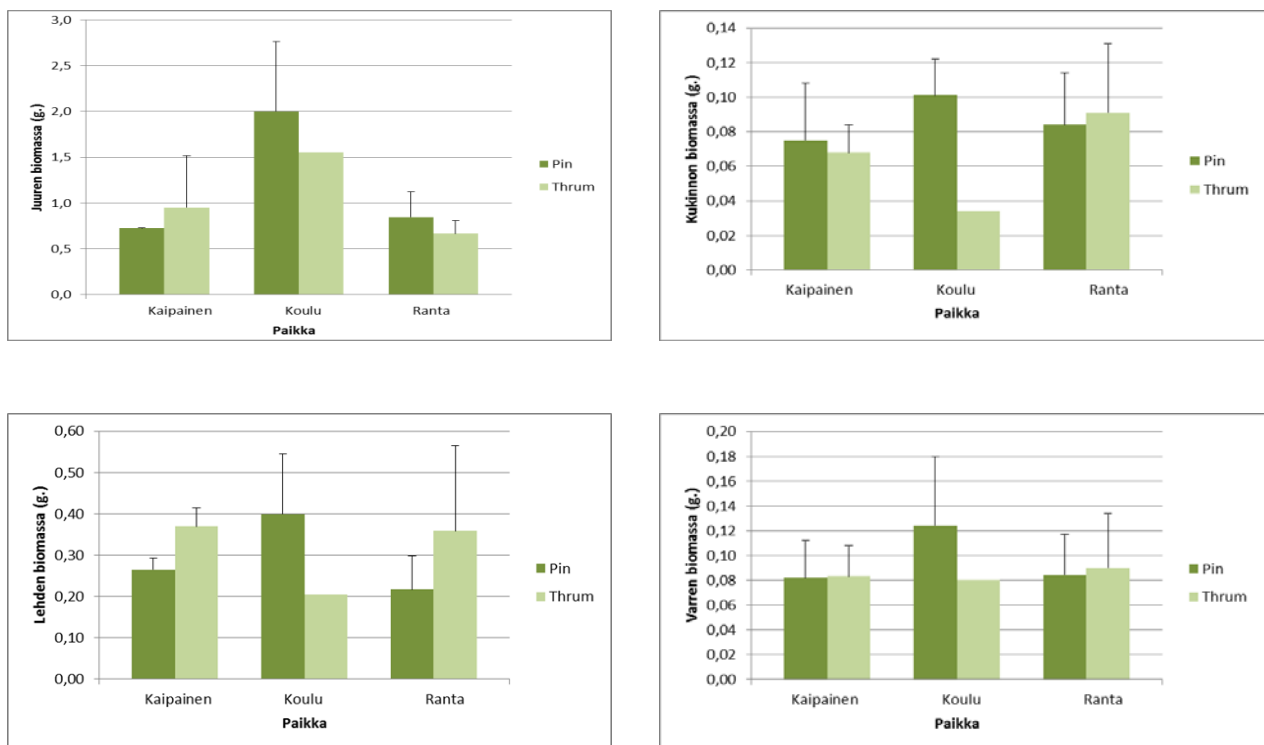
(Statview, ANOVA). Tilastollisen analyysin avulla tutkittiin oliko kukkatyypillä, paikalla tai kasvinosalla tilastollisesti merkitsevää vaikutusta etelänkevätesikon biomassoihin sekä flavonoidi- ja tanniinipitoisuuksiin ja oliko kahden selittävän muuttujan välillä interaktiota eli yhteisvaikutusta. Jatkotestaus suoritettiin Fisherin PLSD-testillä, jonka tarkoituksena oli etsiä merkitsevyyden lähde eli se mistä varianssianalyysin antama tilastollinen merkitsevyys johtuu.

5 TULOKSET

5.1 Juurten, lehtien, kukinnan ja varren biomassassa

Etelänkevätesikon juuren biomassassa oli keskimäärin 1,124 g kaikki näytteet huomioon ottaen. Kasvin maanpäällisistä osista keskimäärin suurin biomassassa 0,302 g oli lehdillä. Varren biomassassa oli keskimäärin 0,091 g ja kukinnan 0,076 g (Kuva 8).

Kasvinosien lisäksi keskimääräisissä biomassoissa oli eroja niin kasvupaikkojen kuin kukkatyyppienkin välillä. Kasvupaikalta koulu kerättyjen juurinäytteiden biomassassa oli korkeampi kuin kahdelta muulta kasvupaikalla kerätyissä näytteissä.



Kuva 8. Kasvinosien biomassassa kukkatyypeittäin ja kasvupaikoittain.

Kukkatyyppin, kasvinosan ja paikan vaikutusta kukinnon, lehtien, varren ja juurten biomassaan testattiin varianssianalyysin (Anova) avulla. Tulokset osoittavat sekä kasvinosalla ($p = < 0,0001$) että kasvupaikalla ($p = 0,0146$) olevan tilastollisesti merkitsevä vaikutus biomassaan (Taulukko 3). Varianssianalyysi ei kuitenkaan osoittanut, että kukkatyyppillä olisi ollut vaikutusta biomassoihin.

Varianssianalyysin avulla tutkittiin lisäksi kahden selittävän muuttujan yhteisvaikutusta biomassaan. Kukkatyyppillä ja kasvupaikalla tai kukkatyyppillä ja kasvinosalla ei ollut tilastollisesti merkitsevää yhteisvaikutusta kasvin biomassaan. Sen sijaan kasvinosalla ja kasvupaikalla oli tilastollisesti merkitsevä yhteisvaikutus ($p = 0,0011$) etelänkevätesikon biomassaan.

Muuttuja (Anova)	Df	F-arvo	P-arvo
kasvinosa	3	51,59	< 0,0001
paikka	2	4,709	0,0146
kukkatyyppi	1	0,306	0,5834
kasvinosa * paikka	6	4,646	0,0011
kasvinosa * kukkatyyppi	3	0,233	0,8729
paikka * kukkatyyppi	2	1,118	0,3369
kasvinosa * paikka * kukkatyyppi	6	0,449	0,8413

Taulukko 2. Kasvinosan, kasvupaikan ja kukkatyyppin vaikutus biomassaan.

Merkitsevyyden lähteen etsintään käytettiin Fisherin PLSD-testiä. Varianssianalyysi osoitti eri kasvinosien biomassojen eroavan tilastollisesti merkitsevästi toisistaan. Jatkoanalyysin mukaan juuren biomassa erosi muista kasvinosista tilastollisesti erittäin merkitsevästi (Taulukko 3). Juuren biomassa oli keskimäärin suurempi kuin muiden kasvinosien. Fisherin PLSD-testi osoitti myös kukinnon ja lehden biomassan eroavan tilastollisesti merkitsevästi toisistaan. Kasvupaikkoja verrattaessa Fisherin PLSD-testillä huomattiin, että kasvupaikka koulu erosi tilastollisesti merkitsevästi kahdesta muusta kasvupaikasta. Koululta kerättyjen kasvinäytteiden kokonaisbiomassa oli kahta muuta kasvupaikkaa suurempi.

Muuttuja (Fisher PLSD)	P-arvo
kasvinosa	
juuri * kukinto	< 0,0001 s
juuri * lehdet	< 0,0001 s
juuri * varsi	< 0,0001 s
kukinto * lehdet	0,0191 s
kukinto * varsi	0,4558
lehdet * varsi	0,0989
paikka	
kaipainen * koulu	0,0007 s
kaipainen * ranta	0,6542
koulu * ranta	0,0002 s
kukkatyyppi	
pin * thrum	0,1247

Taulukko 3. Biomassojen tilastollinen testaus Fisherin PLSD-testillä.

5.2 Flavonoidien kokonaispitoisuudet kukinnoissa ja lehdissä

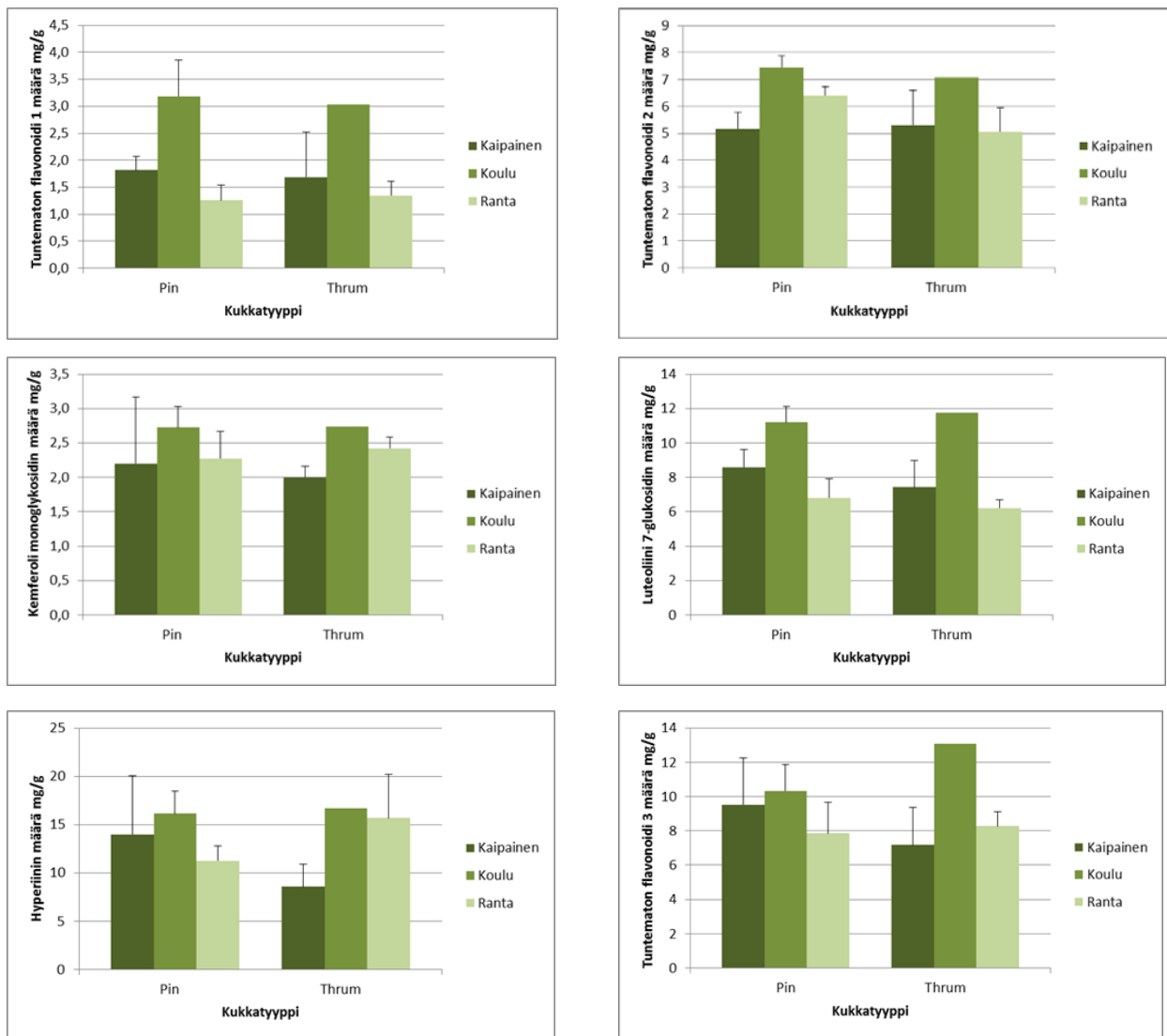
5.2.1 Kukintojen ja lehtien flavonoidiyhdisteet

HPLC-kromatogrammien perusteella etelänkevätesikon kukinnoista ja lehdistä määritettiin yhteensä 20 yksittäisen flavonoidiyhdisteen pitoisuudet, joista 16 pystyttiin tunnistamaan ja nimeämään. Näistä 20 erilaisesta yhdisteestä kukinnoissa esiintyi yhteensä neljätoista ja lehdissä kymmenen erilaista flavonoidiyhdistettä, joista neljää esiintyi sekä kukinnoissa että lehdissä. Kaikki neljä tunnistamatonta flavonoidiyhdistettä löytyivät kukinnoista. Tutkimuksessa ne nimettiin tuntematon flavonoidi 1 - 4.

5.2.2 Kukintojen flavonoidikoostumus ja -pitoisuudet

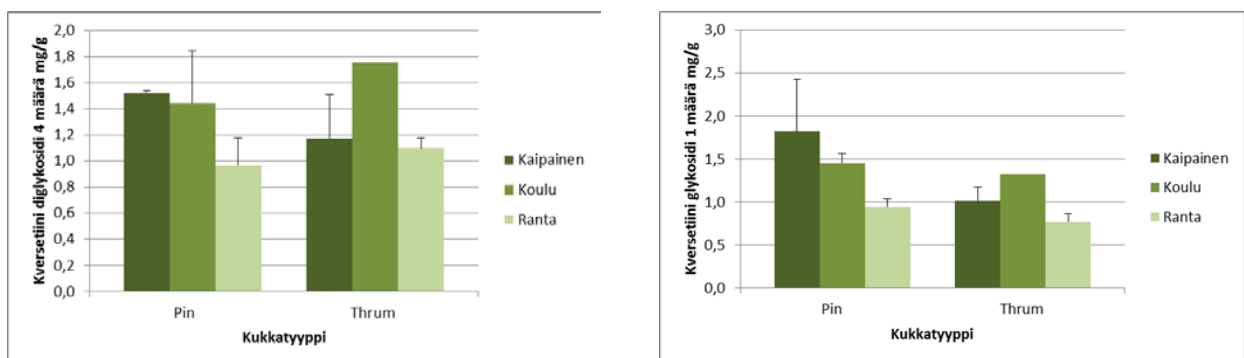
Tutkimus osoitti kukinnoissa olevan eniten hyperiiniä, jonka kokonaispitoisuus kaikki kukintonäytteet huomioon ottaen oli noin 13 mg/g. Hyperiinin jälkeen seuraavaksi yleisempiä flavonoidiyhdisteitä kukinnoissa olivat kversetiini diglykosidi 3, luteoliini 7-glukosidi sekä tuntematon 2, 3 ja 4, joiden pitoisuudet vaihtelivat välillä 5,9 - 9,3 mg/g. Loppujen flavonoidiyhdisteiden pitoisuudet vaihtelivat välillä 0,4 - 4,3 mg/g.

Flavonoidien tuntematon 1, 2 ja 3, luteoliini 7-glukosidin, kemferoli monoglykosidin ja hyperiinin pitoisuudet kukinnoissa olivat kukkatyypistä riippumatta kasvupaikalla koulu keskimäärin suuremmat kuin kahdella muulla kasvupaikalla (Kuva 9). Kasvupaikalla ranta puolestaan oli keskimäärin kaikkein alhaisimmat tuntematon flavonoidi 1 ja luteoliini 7-glukosidi pitoisuudet.



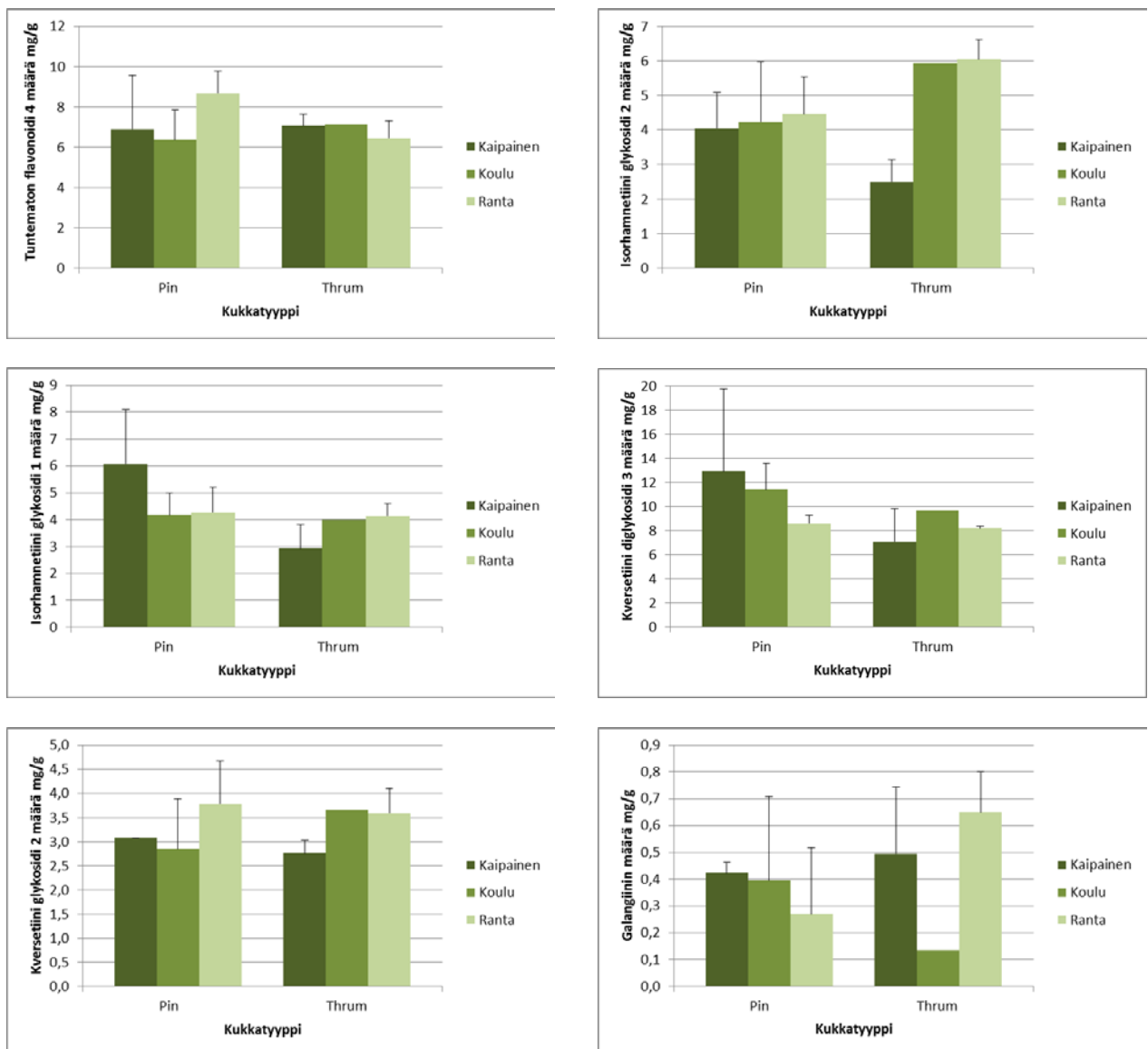
Kuva 9. Kukintojen tuntematon flavonoidi 1 - 3, luteoliini 7-glukosidin, kemferoli monoglykosidin ja hyperiini pitoisuus kukkatyypeittäin ja kasvupaikoittain.

Kasvupaikka rannan keskimääräiset kversetiini diglykosidi 4 ja kversetiini glykosidi 1 pitoisuudet olivat myös muita kasvupaikkoja alhaisemmat riippumatta kukkatyyppistä (Kuva 10).



Kuva 10. Kukinon kversetiini diglykosidi 4 ja kversetiini glykosidi 1 pitoisuus kukkatyypeittäin ja kasvupaikoittain.

Kukintojen isorhamnetiini glykosidi 2 pitoisuus oli keskimäärin alhaisempi kasvupaikka kaipaisesta kerätyissä thrum-kukkatyypin kasveissa kuin koulun ja rannan thrum-kukkatyypin kasveissa (Kuva 11). Toisaalta taas galangiini pitoisuus oli koululta kerätyissä thrum-kukkatyypin kasveissa alhaisempi kuin kahden muun kasvupaikan thrum-kukkatyypin kasveissa. Kversetiini diglykosidi 3, tuntematon flavonoidi 4, isorhamnetiini glykosidi 1 ja kversetiini glykosidi 2 keskimääräisissä pitoisuuksissa ei ollut havaittavissa selkeitä eroja paikkojen tai kukkatyyppien välillä.



Kuva 11. Kukintojen tuntematon flavonoidi 4:n, kversetiini glykosidi 2:n, kversetiini diglykosidi 3:n, isorhamnetiini glykosidi 1:n ja 2:n sekä galangiinin pitoisuus kukkatyypeittäin ja kasvupaikoittain.

Kahden erilaisen kukkatyyppin kukintojen välillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja flavonoidien määrässä muiden kuin kversetiini glykosidi 1 osalta ($p= 0,0140$) (Taulukko 4). Kasvupaikalla oli tilastollisesti erittäin merkitsevä vaikutus ($p= < 0,01$) kukinnon tuntematon 1, luteoliini 7-glukosidi ja kversetiini glykosidi 1 pitoisuuksiin. Kasvupaikalla oli myös merkitsevä vaikutus ($p= < 0,05$) kukinnon tuntematon 2 ja 3, kversetiini diglykosidi 4 ja isorhamnetiini glykosidi 2 pitoisuuksiin. Sen sijaan kasvupaikalla ei ollut vaikutusta kukintojen kversetiini diglykosidi 3, hyperiini, galangiini, kversetiini glykosidi 2, isorhamnetiini glykosidi 1, tuntematon 4 ja kemferoli monoglykosidi pitoisuuksiin.

Varianssianalyysin avulla tutkittiin myös onko kahdella selittävällä muuttujalla, tässä tapauksessa kasvupaikalla ja kukkatyyppillä, tilastollisesti merkitsevää yhteisvaikutusta kukintojen flavonoidien määrään. Tutkimus osoitti, että kasvupaikan ja kukkatyyppin välillä ei ollut merkitsevää yhteisvaikutusta kukintojen flavonoidien määrään.

Yhdiste	F-arvo	P-arvo
Tuntematon flavonoidi 1		
kukkatyyppi	0,04	0,8451
paikka	9,845	0,0043
kukkatyyppi * paikka	0,066	0,937
Tuntematon flavonoidi 2		
kukkatyyppi	1,241	0,2913
paikka	5,432	0,0253
kukkatyyppi * paikka	1,071	0,3789
Luteoliini 7-glukosidi		
kukkatyyppi	0,424	0,5299
paikka	19,128	0,0004
kukkatyyppi * paikka	0,556	0,5901
Tuntematon flavonoidi 3		
kukkatyyppi	0,066	0,8029
paikka	4,245	0,0463
kukkatyyppi * paikka	1,924	0,1964
Kversetiini diglykosidi 3		
kukkatyyppi	2,879	0,1206
paikka	0,739	0,5018
kukkatyyppi * paikka	1,358	0,3008
Kversetiini diglykosidi 4		
kukkatyyppi	0,041	0,8442
paikka	4,512	0,0401
kukkatyyppi * paikka	1,684	0,2342
Kemferoli monoglykosidi		

	kukkatyyppi	0,004	0,9536
	paikka	2,437	0,1373
	kukkatyyppi * paikka	0,279	0,7626
Hyperiini	kukkatyyppi	0,005	0,9451
	paikka	2,332	0,1475
	kukkatyyppi * paikka	3,182	0,0852
Tuntematon flavonoidi 4	kukkatyyppi	0,377	0,5528
	paikka	0,51	0,6155
	kukkatyyppi * paikka	1,857	0,2061
Isorhamnetiini glykosidi 1	kukkatyyppi	4,304	0,0648
	paikka	0,194	0,8269
	kukkatyyppi * paikka	3,671	0,0638
Kversetiini glykosidi 1	kukkatyyppi	8,841	0,014
	paikka	10,622	0,0034
	kukkatyyppi * paikka	3,46	0,0721
Kversetiini glykosidi 2	kukkatyyppi	0,069	0,7981
	paikka	1,839	0,2089
	kukkatyyppi * paikka	0,755	0,495
Isorhamnetiini glykosidi 2	kukkatyyppi	0,963	0,3497
	paikka	5,481	0,0247
	kukkatyyppi * paikka	3,73	0,0616
Flavonoidi (galangiini)	kukkatyyppi	0,243	0,6326
	paikka	0,81	0,472
	kukkatyyppi * paikka	1,919	0,1971

Taulukko 4. Kukinnan flavonoidien tilastollinen testaus varianssianalyysillä.

Fisherin PLSD-testillä määritettiin tarkemmin, mistä merkitsevyys eri koepaikkojen välillä johtuu. Kasvupaikan koulu etelänkevätesikon kukintojen flavonoidien määrä poikkeaa tilastollisesti merkitsevästi kahdesta muusta kasvupaikasta tuntematon flavonoidi 1, 2 ja 3 sekä luteoliini 7-glukosidin osalta (Taulukko 5). Kaikkien näiden neljän flavonoidin pitoisuudet olivat kasvupaikka koululla korkeammat kuin kahdella muulla kasvupaikalla. Kasvupaikat koulu ja ranta erosivat merkitsevästi toisistaan kversetiini diglykosidi 4 osalta. Kasvupaikalla koulu kversetiini diglykosidi 4 pitoisuudet olivat merkitsevästi suuremmat kuin rannalla. Tilastollisesti erittäin merkitsevä ero kukintojen kversetiini glykosidi 1 määrässä johtuu siitä, että koepaikalla ranta yhdisteen pitoisuus oli muita kasvupaikkoja alhaisempi. Kasvupaikka

kaipainen taas erosi kukintojen isorhamnetiini glykosidi 2 osalta kahdesta muusta koepaikasta. Kaipaisesta kerätyistä etelänkevätetikon kukinnoista löytyi korkeammat pitoisuudet isorhamnetiini glykosidi 2:ta.

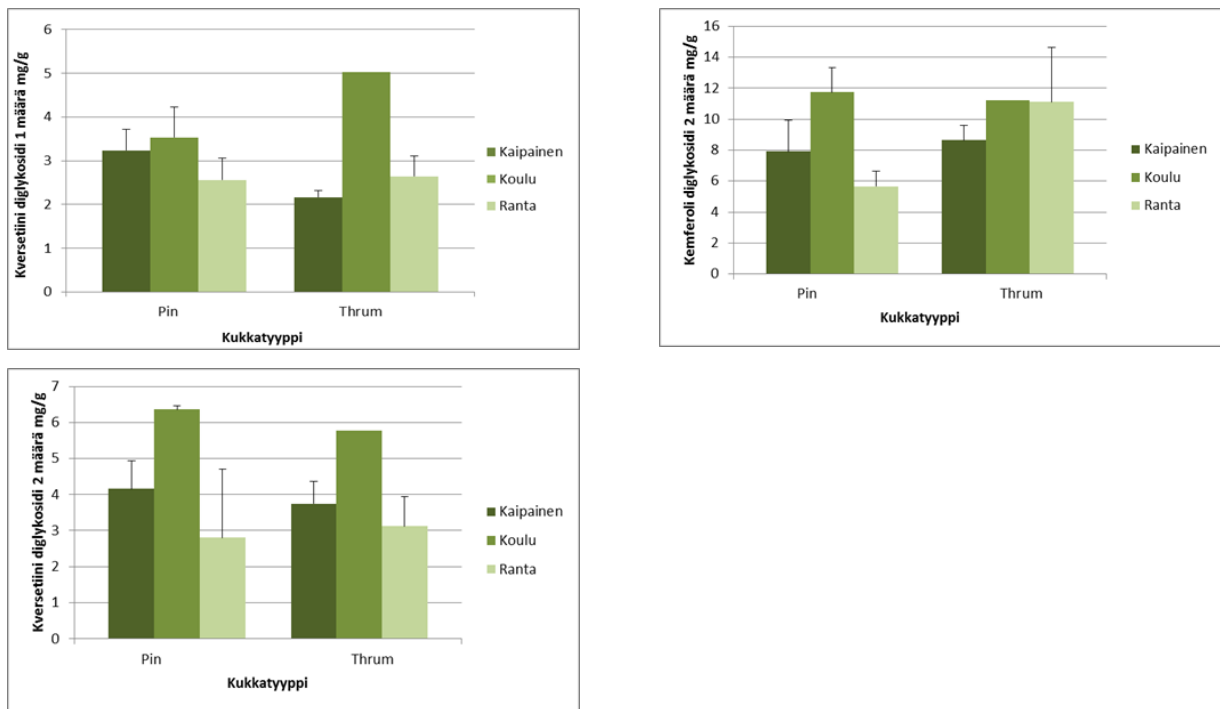
Yhdiste	P-arvo	
Tuntematon flavonoidi 1		
kaipainen * koulu	0,0035	s
kaipainen * ranta	0,2299	
koulu * ranta	0,0006	s
Tuntematon flavonoidi 2		
kaipainen * koulu	0,0037	s
kaipainen * ranta	0,3719	
koulu * ranta	0,0149	s
Luteoliini 7-glukosidi		
kaipainen * koulu	0,0007	s
kaipainen * ranta	0,0756	
koulu * ranta	< 0,0001	s
Tuntematon flavonoidi 3		
kaipainen * koulu	0,0289	s
kaipainen * ranta	0,9226	
koulu * ranta	0,0336	s
Kversetiini diglykosidi 4		
kaipainen * koulu	0,2197	
kaipainen * ranta	0,1425	
koulu * ranta	0,0211	s
Kversetiini glykosidi 1		
kaipainen * koulu	0,3659	
kaipainen * ranta	0,0078	s
koulu * ranta	0,0029	s
Isorhamnetiini glykosidi 2		
kaipainen * koulu	0,0378	s
kaipainen * ranta	0,0045	s
koulu * ranta	0,4092	

Taulukko 5. Kukinnan flavonoidien tilastollinen testaus Fisherin PLSD-testillä.

5.2.3 Lehtien flavonoidikoostumus ja -pitoisuus

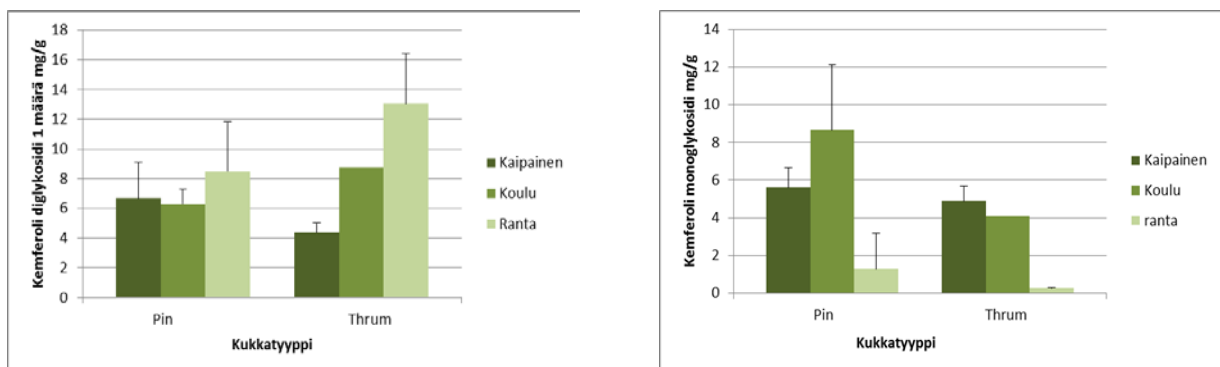
Lehtinäytteiden yleisin flavonoidiyhdiste oli kemferoli diglykosidi 2, jonka pitoisuus oli keskimäärin 9,2 mg/g. Toiseksi yleisin lehtien sisältämä flavonoidiyhdiste oli kemferoli diglykosidi 1, jonka pitoisuus oli 7,7 mg/g. Muiden lehtien sisältämien flavonoidiyhdisteiden pitoisuudet vaihtelivat 0,2-4,1 mg/g välillä.

Lehtien keskimääräiset flavonoidipitoisuudet vaihtelivat kasvupaikkojen välillä. Kasvupaikka koululla oli keskimäärin kaikkein suurimmat kversetiini diglykosidi 1 ja 2 sekä kemferoli diglykosidi 2 pitoisuudet kukkatyyppistä riippumatta (Kuva 12). Rannan keskimääräiset kversetiini diglykosidi 2 pitoisuudet taas olivat muita kasvupaikkoja alhaisemmat kukkatyyppistä riippumatta.



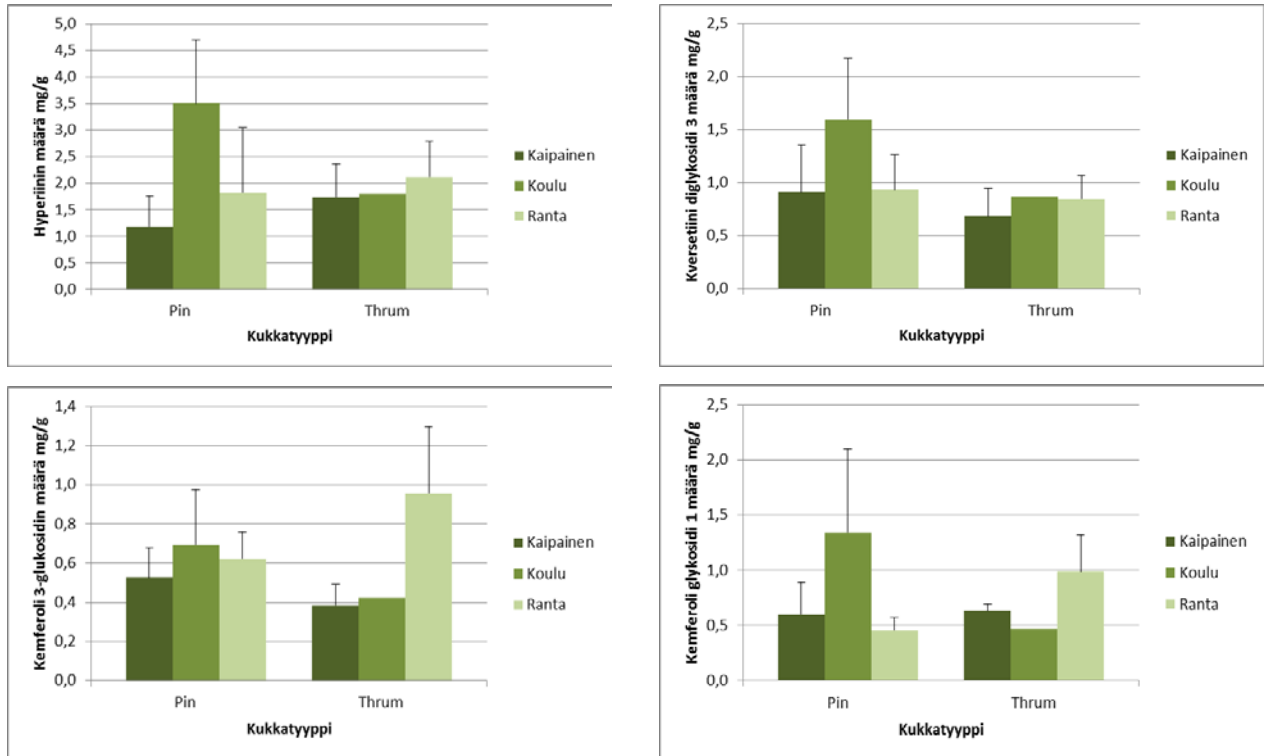
Kuva 12. Lehtien kversetiini diglykosidi 1 ja 2 sekä kemferoli diglykosidi 2 pitoisuudet kukkatyypeittäin ja paikoittain.

Kasvupaikka rannan etelänkevätesikon lehdissä oli keskimäärin muita kasvupaikkoja enemmän kemferoli diglykosidi 1:tä, kun taas kemferoli monoglykosidi pitoisuudet olivat kasvupaikalla ranta muita kasvupaikkoja alhaisemmat (Kuva 13).



Kuva 13. Lehtien kemferoli diglykosidi 1 ja kemferoli monoglykosidi pitoisuudet kukkatyypeittäin ja kasvupaikoittain.

Lehtien hyperiinin, kversetiini diglykosidi 3 ja kemferoli glykosidi 1 pitoisuudet olivat keskimäärin suurimmat koululta kerätyissä pin-kukkatyyppin kasveissa (Kuva 14). Sen sijaan kemferoli 3-glukosidin pitoisuus oli keskimäärin suurinta rannan pin-kukkatyyppin kasveissa.



Kuva 14. Lehtien hyperiinin, kversetiini diglykosidi, kemferoli glykosidi 1 kemferoli ja 3-glukosidi pitoisuudet kukkatyypeittäin ja paikoittain.

Tulokset osoittavat, että kukkatyyppillä ei ole tilastollisesti merkitsevää vaikutusta lehtien flavonoidien määrään (Taulukko 6). Ainoastaan lehtien kemferoli monoglykosidin pitoisuudet kahden kukkatyyppin välillä erosivat tilastollisesti melkein merkitsevästi ($p = 0,0656$) toisistaan. Sen sijaan kasvupaikalla oli erittäin merkitsevä vaikutus lehtien kversetiini diglykosidi 1 ja 2 sekä kemferoli monoglykosidi pitoisuuksiin. Kasvupaikalla oli myös merkitsevä vaikutus ($p < 0,05$) lehtien kemferoli diglykosidi 1 pitoisuuksiin. Melkein merkitsevän p-arvon ($p = 0,05 - 0,1$) saivat lehtien sisältämät flavonoidit kemferoli diglykosidi 2 ja kemferoli 3-glukosidi. Kasvupaikalla ei ollut vaikutusta lehtien kversetiini diglykosidi 3, hyperiini ja kemferoli glykosidi pitoisuuksiin.

Yhdiste	F-arvo	P-arvo
Kversetiini diglykosidi 1		
kukkatyyppi	0,413	0,5348
paikka	14,382	0,0011

kukkatyyppi * paikka	7,286	0,0112
Kversetiini diglykosidi 2		
kukkatyyppi	0,167	0,6918
paikka	9,316	0,0052
kukkatyyppi * paikka	0,274	0,7655
Kemferoli diglykosidi 1		
kukkatyyppi	1,499	0,2488
paikka	7,405	0,0106
kukkatyyppi * paikka	3,137	0,0876
Kversetiini diglykosidi 3		
kukkatyyppi	2,808	0,1247
paikka	1,356	0,3012
kukkatyyppi * paikka	0,738	0,5024
Kemferoli diglykosidi 2		
kukkatyyppi	3,004	0,1137
paikka	3,026	0,0938
kukkatyyppi * paikka	3,101	0,0895
Kemferoli monoglykosidi		
kukkatyyppi	4,275	0,0656
paikka	12,661	0,0018
kukkatyyppi * paikka	1,192	0,3433
Hyperini		
kukkatyyppi	0,311	0,5896
paikka	1,543	0,2416
kukkatyyppi * paikka	1,654	0,2396
Kemferoli 3-glukosidi		
kukkatyyppi	0,048	0,8312
paikka	3,405	0,0745
kukkatyyppi * paikka	2,531	0,1290
Kemferoli glykosidi 1		
kukkatyyppi	0,236	0,6374
paikka	0,537	0,6006
kukkatyyppi * paikka	3,342	0,0774

Taulukko 6. Lehtien flavonoidien tilastollinen testaus varianssianalyysillä.

Jatkotestaus Fisherin PLSD-testillä osoitti kasvupaikka koulun eroavan kversetiini diglykosidi 1 ja 2 osalta kahdesta muusta kasvupaikasta (Taulukko 7). Kasvupaikka koulun kversetiini diglykosidi 1 ja 2 pitoisuudet olivat tilastollisesti merkitsevästi suuremmat kuin kahdella muulla kasvupaikalla. Fisherin PLSD-testi osoitti kasvupaikka rannan eroavan kahdesta muusta kasvupaikasta lehtien kemferoli monoglykosidi ja kemferoli diglykosidi 1 pitoisuuden osalta. Rannassa kemferoli diglykosidi 1 pitoisuudet olivat muita kasvupaikkoja suuremmat. Sen sijaan kemferoli monoglykosidi pitoisuudet olivat rannalla koulua ja kaipaista alhaisemmat.

Yhdiste	P-arvo	
Kversetiini diglykosidi 1		
kaipainen * koulu	0,0010	s
kaipainen * ranta	0,7712	
koulu * ranta	0,0015	s
Kversetiini diglykosidi 2		
kaipainen * koulu	0,0052	s
kaipainen * ranta	0,1500	
koulu * ranta	0,0006	s
Kemferoli diglykosidi 1		
kaipainen * koulu	0,2602	
kaipainen * ranta	0,0018	s
koulu * ranta	0,0275	s
Kemferoli monoglykosidi		
kaipainen * koulu	0,0710	
kaipainen * ranta	0,0021	s
koulu * ranta	0,0002	s

Taulukko 7. Lehtien flavonoidien tilastollinen testaus Fisherin PLSD-testillä.

Tutkittaessa kahden selittävän muuttujan, kasvupaikan ja kukkatyyppin, yhteisvaikutusta lehtien flavonoidien määrään, tulokset osoittavat kasvupaikalla ja kukkatyyppillä olevan tilastollisesti merkitsevä ($p \leq 0,05$) yhteisvaikutus lehtien kversetiini diglykosidi 1 pitoisuuteen. Lehtien kemferoli diglykosidi 1 ja 2 ja kemferoli glykosidi pitoisuudet erosivat kasvupaikan ja kukkatyyppin yhteisvaikutusten osalta melkein merkitsevästi toisistaan ($p = 0,05 - 0,1$). Fisherin PLSD-testi osoitti, että kasvupaikan ja kukkatyyppin välinen interaktio eli yhteisvaikutus johtuu siitä, että kasvupaikka koulu eroaa tilastollisesti merkitsevästi kahdesta muusta kasvupaikasta kversetiini diglykosidi 1 pitoisuuden suhteen.

5.3 Tanniinien kokonaispitoisuudet kukinnoissa ja lehdissä

Tanniinien kokonaispitoisuus kuivatuissa kukinnoissa oli keskimäärin 24,5 mg/g ja lehdissä 49,9 mg/g. Kukintojen ja lehtien tanniinipitoisuudet vaihtelivat paikoittain ja kukkatyypeittäin (Taulukko 8).

Kasvinosa	Kukkatyyppi (mg/g) pin			Kukkatyyppi (mg/g) thrum		
	Koulu	Kaipainen	Ranta	Koulu	Kaipainen	Ranta
Kukinto	32,08±4,14	26,19±0,15	20,04±1,61		23,472	20,79±2,29
Lehti	55,32±3,72	68,85±10,16	40,66±2,96	57,924	48,20±2,42	40,52±2,43

Taulukko 11. Kukintojen ja lehtien tanniinipitoisuus kukkatyypeittäin ja paikoittain.

Kukkatyyppillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta tanniinien määrään (Taulukko 12). Sen sijaan kasvinosalla oli tilastollisesti erittäin merkitsevä vaikutus ($p \leq 0,0001$) tanniinipitoisuuteen. Lehdissä oli enemmän tanniineja kuin kukissa. Myös kasvupaikalla oli tilastollisesti erittäin merkitsevä vaikutus ($p = 0,0005$) tanniinipitoisuuksiin.

Tarkasteltaessa kahden selittävän muuttujan yhteisvaikutusta tanniinien määrään huomattiin, että kasvinosan ja kukkatyyppin sekä kasvinosan ja kasvupaikan välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää yhteisvaikutusta. Kukkatyyppien ja kasvinosien välistä yhteisvaikutusta tutkittaessa f-arvo 0,009 kertoo, että kaikki näytteet olivat erittäin samanlaisia eli lehdissä on aina enemmän tanniineja.

Muuttuja (Anova)	Df	F-arvo	P-arvo
kasvinosa	3	51,590	< 0,0001
paikka	2	4,709	0,0146
kukkatyyppi	1	0,306	0,5834
kasvinosa * paikka	6	4,646	0,0011
kasvinosa * kukkatyyppi	3	0,233	0,8729
paikka * kukkatyyppi	2	1,118	0,3369
kasvinosa * paikka * kukkatyyppi	6	0,449	0,8413

Taulukko 8. Tanniinien tilastollinen testaus varianssianalyysillä.

Fisherin PLSD-testin mukaan kasvupaikat kaipainen ja ranta sekä koulu ja ranta eroavat tilastollisesti erittäin merkitsevästi toisistaan ($p \leq 0,0001$) (Taulukko 13). Kasvupaikka rannan kukintojen ja lehtien tanniinien määrä oli tilastollisesti merkitsevästi erilainen kuin kahdella muulla kasvupaikalla. Tässä tapauksessa rannalta kerätyissä kasvinäytteissä oli vähemmän tanniineja kuin kahdelta muulta kasvupaikalta kerätyissä näytteissä.

Muuttuja (Fisher)	P-arvo	
kasvinosa		
juuri * kukinto	< 0,0001	s
juuri * lehdet	< 0,0001	s
juuri * varsi	< 0,0001	s
kukinto * lehdet	0,0093	s

kukinto * varsi	0,8946	
lehdet * varsi	0,0130	s
paikka		
kaipainen * koulu	0,0018	s
kaipainen * lassinranta	0,6163	
koulu * lassinranta	0,0005	s
kukkatyyppi		
pin * thrum	0,2173	

Taulukko 13. Tanniinien tilastollinen testaaminen Fisherin PLSD-testillä.

5.4 Maaperä

Suomen ympäristöpalvelu Oy:n tekemät viljavuustutkimukset antoivat tietoa kolmen kasvupaikan maalajista ja viljavuudesta. Maalaji oli kaikilla kolmella kasvupaikalla hietamoreeni (Liitteet 1-3). Kaikkien kasvupaikkojen maaperä oli hapan ja vähäravinteinen. Kasvupaikkojen välillä oli eroja maaperän multavuudessa. Kasvupaikka ranta sai viljavuustutkimuksessa arvion m = multainen ja kasvupaikat koulu ja kaipainen sen sijaan rm = runsasmultaiset. Suurimmat erot koepaikkojen välillä oli liukoisen typen määrässä. Koululta otetussa maaperänäytteessä liukoisen typen määrä oli 11,6 kg/ha. Kaipaisesta otetussa maaperänäytteessä oli vähiten liukoista typpeä 6,0 kg/ha. Kasvupaikalla ranta sen sijaan liukoisen typen määrä oli kaikista korkein 27,6 kg/ha.

6 TULOSTEN TARKASTELU

6.1 Flavonoidit

Tutkimus osoitti etelänkevätesikon kukintojen ja lehtien sisältävän runsaasti erilaisia flavonoideja. Kukinnot sisälsivät hyperiiniä, kversetiiniä, luteoliinia, isorhamnetiinia ja kemferolia. Aikaisemmissa tutkimuksissa etelänkevätesikon kukintojen on todettu sisältävän flavonoideja kuten rutiinia, isokversitriiniä, isorhamnetiini 3-rutinosidia, kemferoli 3-rutinosidia ja isorhamnetiini 3-glukosidia (Petitjean-Freytet et al. 1993). Lehtien osalta aikaisempi tutkimus on keskittynyt lehtien sisältämiin flavoneihin. Lehtien yleisimmiksi flavoneiksi tutkimuksissa ovat osoittautuneet 5,6,2',3',6'-pentametoksiflavoneja, 3',5'-dihydroksi 4'-metoksiflavoneja, 2'-metoksiflavoneja, 3'-metoksiflavoneja, 3',4'-dimetoksiflavoneja, 2',5'-metoksiflavoneja, 3'-hydroksi 4',5'-dimetoksiflavoneja, 3', 4', 5'-trimetoksiflavoneja ja 3'-hydroksi 4',5'-metyleenidioksiflavoneja (Budzianowski & Wollenweber 2007). Tämä tutkimus sen sijaan osoitti etelänkevätesikon lehtien sisältävän pääasiassa flavonoleihin kuuluvia

yhdisteitä kuten kemferolia, kversetiiniä ja hyperiiniä. Tunnistettujen ja alustavasti tunnistettujen flavonoidien lisäksi kukinnoissa löytyi neljää tuntematonta flavonoidiyhdistettä, joiden selvittäminen vaatisi jatkotutkimusta.

Flavonoideilla tiedetään olevan ihmisen terveyttä edistäviä vaikutuksia (Harborne & Williams 1992). Flavonoideilla kuten kversetiinillä, kemferolilla ja luteoliinilla on osoitettu olevan antioksidanttista aktiivisuutta (Peterson & Dwyer 1998). Ne pystyvät torjumaan syövän syntymistä ja sydän- ja verisuonitautien kehittymistä (Mattila & Kumpulainen 2001). Flavonoidiyhdisteiden kuten kversetiinin on todettu toimivan myös antimikrobiaalisina yhdisteinä tarjoten suojaa mikro-organismien, hyönteisten ja herbivorien hyökkäyksiä vastaan (Murphy 1999). Sen on todettu jopa inhiboivan HI-virusta.

Etelänkevätesikosta saatua flavonoidipitoista uutetta on perinteisesti käytetty yskänlääkkeenä, kouristuksia estävänä ja virtsan eritystä lisäävänä kansanrohtona (Petitjean-Freytet et al. 1993). Tässä tutkimuksessa saadut tulokset tukevat etelänkevätesikon käyttöä lääkekasvina. Kasvin tiedetään kuitenkin sisältävän flavonoidien lisäksi runsaasti myrkyllisiä triterpeenisisaponiineja (Calis et al. 1992). Saponiinit ovat saippuamaisia aineita, jotka vaikuttavat ihmisen ruuansulatukseen ja aiheuttavat oksentelua ja ripulointia (Bowsher et al. 2008).

Etelänkevätesikkoa enemmän tutkittuja *Primula*-suvun lajeja ovat sen lähilajit kevätesikko ja idänkevätesikko. Kevätesikon maanpäällisistä osista on saatu eristettyä ja tunnistettua suuri määrä erilaisia flavonoideja (Fico et al. 2007). Budzianowski et al. (2005) eristivät viljellyn kevätesikon lehdistä erilaisia rasvaliukoisia flavoneja. Näistä ensimmäistä kertaa tutkimuksessa kuvattiin 3'-hydroksi-4',5'-dimetoksiflavoni ja 3'-metoksi-4',5'-metyleenidioksiflavoni, joita ei ole aikaisemmin löydetty luonnosta. Tutkijat löysivät kevätesikon lehdistä myös kemiallisesta synteesisistä tunnettuja flavoneja kuten 3',4'-dimetoksiflavoni ja 2',5'-dimetoksiflavoni. Sen lisäksi he saivat eristettyä aikaisemmin tunnettuja flavoneja kuten 2'-hydroksiflavoneja, 2'-metoksiflavoneja, 3'-metoksiflavoneja, 3',4',5'-trimetoksiflavoneja ja 5,6,2',6'-tetrametoksiflavoneja (zapotin). Myös kevätesikon versoista on löydetty flavonoidiyhdisteitä (Morozowska & Wesolowska 2004). Sen kukintojen on puolestaan raportoitu sisältävän erilaisia mono-, di-, tri- ja pentametoksiflavoneja (Huck et al. 2000). Kukinnoista on eristetty myös flavonoleihin kuuluvia kversetiiniä ja sen johdannaisia, kemferoli 3-limositriini glukosidia (Morozowska & Wesolowska 2004) sekä rutiinia, isokversitriiniä ja isorhamnetiini 3-rutinosidia (Petitjean-Freytet et al. 1993).

Kevätesikon alalajin, idänkevätesikon (*Primula veris subsp. macrocalyx*) maanpäällisistä osista on eristetty useita samoja flavoneja kuin kevätesikostakin kuten 2',5'-dimetoksiflavoneja, 3'-metoksi-4',5'-metyleenidioksiflavoneja, 3',4'-dimetoksiflavoneja

(Kosenkova et al. 2008). Lisäksi idänkevätesikon maanpäällisistä osista on löydetty 5,6,2',3',6'-pentametoksiflavoneja ja 5,6,2',3',5',6'-heksametoksiflavoneja, joita ei ole aikaisemmin eristetty *Primula*-suvusta.

Myös muiden *Primula*-suvun lajien flavonoidikoostumusta on selvitetty aikaisemmissa tutkimuksissa. Kultaesikon (*Primula auricula*), nystyesikon (*Primula hirsute*) ja *Primula daonensis* lehdistä on saatu eristetty isorhamnetiinia, kversetiinia, kemferolia, tamariksiinia ja 7,2'-dihydroksiflavonia (Fico et al. 2007). *Primula spectabilis* lehdistä on puolestaan eristetty luteoliinia, apigeniinia, kversetiinia ja kemferolia (Vitalini et al. 2011). *Primula*-suvun suuresta lajimäärästä sekä flavonoidiyhdisteiden runsaasta kirjosta johtuen aikaisemmin tunnettujen flavonoidien lisäksi tuntemattomia ja *Primula*-suvulle uusia flavonoideja löydetään jatkuvasti lisää.

6.2 Tanniinit

Tutkimus osoitti etelänkevätesikon sisältävän myös runsaasti tanniineja. Tanniineja esiintyy yleisesti puuvartisilla kasveilla mm. koivulla, pajulla ja tammella. Niitä esiintyy myös ruohovartisilla kasveilla kuten hernekasvien heimoon (*Fabaceae*) kuuluvilla maitteilla (*Lotus*), apiloilla (*Trifolium*) ja punanätkimellä (*Hedysarum coronarium*). Isomaitteen (*Lotus pedunculatus*) on mitattu sisältävän kondensoituvia tanniineja 76 - 90 mg/kg kuivapainosta (Barry 1985). Rehuksi käytetyn punanätkimen lehtien kondensoituvien tanniinien pitoisuudeksi on mitattu 33 - 37,7 g/kg. Myrtin (*Myrtus communis var. italica* L.) lehtien ja kukkien on todettu sisältävän paljon hydrolysoituvia tanniineja (Wannes et al. 2010). Kokonaistanniinipitoisuuden huonekuivatuissa myrtin lehdistä on osoitettu olevan keskimäärin 26,55 mg GAE/g, kukissa 11,95 mg GAE/g ja varressa 3,33 mg GAE/g. Tanniineja esiintyy runsaasti myös monissa ravintokasveissa kuten marjoissa. Riihisen (2005) tutkimuksen mukaan ellagitanniinien määrä mesimarjassa ja lakassa on 3600 - 3900 mg/kg, viljellyssä vadelmassa 1900 mg/kg ja luonnonvadelmassa 2700 mg/kg sekä mansikassa 650 - 850 mg/kg tuorepainosta. Ellagitanniineja on löytynyt myös ruusunmarjoista (Mattila et al. 2005).

6.3 Kukkatyyppi

Tutkimuksen alkuhypoteesina oli, että kahden erilaisen kukkatyyppin välillä olisi eroja biomassoissa ja sekundaarimetabolian tuottamissa fenolisten yhdisteiden pitoisuuksissa. Tilastolliset analyysit kuitenkin osoittivat, että kahden erilaisen kukkatyyppin välillä ei ollut merkittävää eroa kokonaisbiomassoissa tai sekundaarimetabolian tuottamien yhdisteiden pitoisuuksis-

sa. Ainoastaan kukinnon kversetiini glykosidi 1 pitoisuus erosi kahden kukkatyypin välillä merkitsevästi toisistaan ($p = 0,0140$). Tämä tilastollisesti merkitsevä ero voi osaltaan selittyä tutkimuksessa käytetyn aineiston pienellä koolla.

6.4 Kasvupaikka

Kasvupaikkojen välillä oli eroja sekä kokonaisbiomassoissa että flavonoidi- ja tanniinipitoisuuksissa. Tässä tutkimuksessa kasvupaikka koulun etelänkevätesikkojen kokonaisbiomassat olivat keskimäärin suuremmat kuin kahden muun kasvupaikan. Viljavuustutkimuksien perusteella voidaan kuitenkin todeta, ettei koulun maaperä ollut muita paikkoja ravinteikkaampaa. Aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet etelänkevätesikon kasvavan yleensä vähäravinteisessa maassa, jossa typpeä ja fosforia on vähän saatavilla (Taylor & Woodell 2008). Siementaimien kasvatuksessa ei ole havaittu liukoisen nitraatin tai fosfaatin lisäyksellä olevan merkittävää vaikutusta taimien alkuvaiheen kasvuun. Kasvupaikka koulun kasvien keskimääräisesti suurempaa biomassaa voi osaltaan selittää myös se, että paikan populaatio on hyvin vanha ja vakiintunut verrattuna kahteen muuhun kasvupaikkaan.

Kasvupaikalla oli tilastollisesti merkitsevää vaikutusta ($p \leq 0,05$) kukinnon luteoliini 7-glukosidi, kversetiini glykosidi 1, kversetiini diglykosidi 4, isorhamnetiini glykosidi 2, tuntematon 1, 2 ja 3 pitoisuuksiin sekä lehtien kversetiini diglykosidi 1 ja 2, kemferoli monoglykosidi, kemferoli diglykosidi 1 pitoisuuksiin. Kasvupaikka koululta mitattiin muita kasvupaikkoja korkeammat flavonoidipitoisuudet viiden kukinnon ja kahden lehtien flavonoidin osalta. Kasvupaikka ranta taas erosi koulusta ja kaipaisesta kahden kukinnon ja kahden lehden flavonoidin pitoisuuden perusteella. Kolmen flavonoidin osalta rannalla pitoisuudet olivat muita kasvupaikkoja alhaisemmat ja yhden osalta korkeammat. Kasvupaikka kaipainen erosi muista kasvupaikoista tilastollisesti merkitsevästi ainoastaan isorhamnetiini glykosidi 2 osalta, jonka pitoisuus oli kasvupaikka kaipaisessa muita kasvupaikkoja alhaisempi.

Kasvupaikka ranta erosi kaipaisesta ja koulusta myös alhaisempien kukintojen ja lehtien tanniinipitoisuuksien vuoksi. Viljavuustutkimus osoittivat kasvupaikka rannan maaperässä olevan muita kasvupaikkoja enemmän liukoista typpeä (N). Hiili/typpi allokaatiohypoteesin (CNB) mukaan runsasravinteisessa maassa kasvava kasvi käyttää suurimman osan hiilestä kasvuunsa, jolloin sekundaarimetabolian tuottamien yhdisteiden määrää vähenee, mikä voi johtua mm. biosynteesin alenemisesta tai kasvin kasvun lisääntymisen aiheuttamasta sekundaariaineiden laimenemisestä suhteessa tuotettuun kasvubiomassaan (mm. Bryant et al. 1983). Kasvupaikka rannan alhaiset kukinnon kversetiini diglykosidi 4 ja kversetiini glykosidi 1 ja

lehtien kemferoli monoglykosidi sekä tanniinipitoisuudet voivat osittain selittyä kasvupaikan maaperän typen runsaudella.

Vastaavia tuloksia ovat saaneet myös Nguyen ja Niemeyer (2008), jotka ovat tutkineet typpilannoituksen vaikutusta eri basilikalajien fenolipitoisuuksiin. Tutkimuksessa havaittiin lehtien fenolipitoisuuksien olevan korkeimmat alhaisimmalla typpilannoituksen tasolla (0,1 mM). Myös muiden ympäristöresurssien saatavuuden tiedetään vaikuttavan sekundaariyhdisteiden määriin. Puuvartisilla kasveilla korkeampien hiilidioksidipitoisuuksien on todettu lisäävän ellagitanniinien pitoisuutta sokerivaahteralla (*Acer saccharum*) sekä kondensoituvien tanniinien pitoisuutta sokerivaahteralla, amerikanhaavalla (*Populus tremuloides*), punatamalla (*Quercus rubra*) (Lindroth et al. 1993) sekä paperikoivulla (*Betula papyrifera* Marsh.) (Lindroth et al. 1995). Myös rauduskoivulla (*Betula pendula* Roth) korkeampien hiilidioksidipitoisuuksien on osoitettu lisäävän proantosyanidiinien ja flavonoidien määrää lehdistä (Lavonen & Julkunen-Tiitto 1994).

6.5 Tutkimuksen luotettavuuden arviointi

Tässä tutkimuksessa saatuihin tuloksiin vaikuttaa se, että kasvinäytteet kerättiin toukokuun alussa eli kasvukauden alussa, jolloin kasvi käyttää ympäristön tarjoamia resursseja pääasiassa kasvuun. Myöhemmin kasvukauden aikana sekundaariyhdisteiden kuten kondensoituvien tanniinien pitoisuudet lisääntyvät. Myös lehtien biomassa olisi todennäköisesti ollut huomattavasti suurempi syksyllä kerätyissä näytteissä kuin keväällä ja erot kasvupaikkojen välillä olisivat voineet näkyä selvemmin.

Tässä tutkimuksessa saatujen tulosten luotettavuutta arvioideassa on huomioitava myös tutkimuksessa käytetyn aineiston pieni määrä. Tutkimuksen aineistona käytettiin 16 kasviyksilöä, joista puolet kuuluivat pin-kukkatyyppiin ja puolet thrum-kukkatyyppiin. Kasvupaikka koululta tutkimuksessa oli vain yksi thrum-kukkatyyppin näyte.

6.6 Etelänkevätesikon esiintyminen Suomessa

Siikamäki-Peiposjärvi kylällä esiintyvän etelänkevätesikon paikallispopulaation iäksi vanhimmat kyläläiset ovat arvioineet noin 80 - 100 vuotta. Tämän perusteella voidaan sanoa, että vaikka etelänkevätesikkoa ei esiinny Suomessa luonnonvaraisena, niin ihmisen levittämänä se voi muodostaa paikallisesti pysyviä populaatioita myös Suomessa.

7. JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimus osoitti etelänkevätesikon sisältävän runsaasti erilaisia bioaktiivisia yhdisteitä, joten tutkimustulokset tukevat etelänkevätesikon mahdollista käyttöä lääkekasvina. Kahden erilaisen kukkatyypin välillä ei ollut merkitsevää eroa sekundaarimetabolian tuottamien yhdisteiden pitoisuuksissa tai biomassoissa. Sen sijaan kasvupaikkojen välillä oli merkitseviä eroja kukintojen ja lehtien flavonoidi- ja tanniinipitoisuuksissa sekä biomassoissa. Tätä selittävät mm. kasvupaikkojen erot maaperän liukoisen typen määrässä.

KIITOKSET

Haluan kiittää professori Riitta Julkunen-Tiittoa ja yliopistonlehtori Eeva Kuusela Pro gradu -tutkielmani ohjaamisesta. Lisäksi haluan kiittää erikoislaboratoriomestari Sinikka Sorsaa, jolta sain apua laboratoriotyöskentelyyn.

LÄHDELUETTELO

- Basbulbul, G., Ozmen, A., Biyik, H. H. & Özge, S. 2008: Antimitotic and antibacterial effects of the *Primula veris* L. flower extracts. – *Caryologia* 61: 88-91.
- Barry, T. N. 1985: The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. Rates of body and wool growth. – *The British Journal of Nutrition* 54: 211-217.
- Begard, N. C., Wang, Y., Wittenberg, K. M., Krause, D. O., Coulman, B. E., McAllister, T. A. & Ominski K. H. 2011: Condensed tannin concentrations found in vegetative mature forage legumes grown in western Canada. – *Canadian Journal of Plant Science/Revue Canadienne de Phytotechnie* 91: 669-675
- Berglund, K. (toim.) 2007: Unelmien kotipuutarha. – 494 s. Otava. Helsinki.
- Bowsher, C., Steer, M. & Tobin, A. 2008: *Plant biochemistry*. – 466 s. Garland Science. New York.
- Bryant, J. P., Chapin, F. S. & Klein, D. R. 1983: Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. – *Oikos* 40: 357–368.
- Budzianowski, J. & Wollenweber, E. 2 Morozowska, M. & Wesolowska, M. 2005: Lipophilic flavones of *Primula veris* L. from field cultivation and in vitro cultures. – *Phytochemistry* 66: 1033-1039.
- Budzianowski, J. & Wollenweber, E. 2007: Rare flavones from the glandular leaf exudate of the oxlip: *Primula elatior* L. – *Natural Products Communications* 2: 267-270.
- Calis, I., Yürüker, A., Rügger, H., Wright, A. D. & Sticher, O. 1992: Triterpene Saponins from *Primula veris* Subsp. *macrocalyx* and *Primula elatior* Subsp. *meyeri*. – *J. Na. Prod.* 55: 1299-1306.
- Endels, P., Jacquemyn, H., Brys, Rein. & Hermy, M. 2005: Rapid response to habitat restoration by the perennial *Primula veris* as revealed by demographic monitoring. – *Plant Ecology* 176: 143-156.
- Fico, G., Rodondi, G., Flamini, G., Passarella, D. & Tome, F. 2007: Comparative phytochemical and morphological analyses of three Italian *Primula* species. –

- Phytochemistry 68: 1683-1691.
- Gasgett, A., C., Conti, E. & Schiestl, F., P. 2005: Rapid communication floral odor variation in two heterostylous species of *Primula*. – Journal of Chemical Ecology 31: 1223-1228.
- Gurney, M., Preston, C., D., Barrett, J. & Briggs, D. 2007: Hybridisation between Oxlip *Primula elatior* (L.) Hill and Primrose *P. vulgaris* Hudson, and the identification of their variable hybrid *P. × digenea* A. Kerner. – Watsonia 26: 239-251.
- Harborne, J. B. & Williams, C. A. 1992: Advances in flavonoid research since 1992: – Phytochemistry 55: 481-504.
- Hermes, D.A., Mattson, W.J. 1992: The dilemma of plants: to grow or defend. – Quarterly Review of Biology 67: 283-335.
- Huck, C. W., Huber, C. G., Ongania, K. H. & Bonn, G. K. 2000: Isolation and characterization of methoxylated flavones in the flowers of *Primula veris* by liquid chromatography and mass spectrometry. – J. Chrom. A 870: 453-462.
- Hämet-Ahti, L., Suominen, J., Ulvinen, T. & Uotila, P. (toim.) 1998: Retkeilykasvio, 4. uudistettu painos. – 656 s. Luonnontieteellisen keskusmuseon kasvimuseo. Helsinki.
- Hyvärinen, H. 2001: Prosessoinnin vaikutus fenolisiin yhdisteisiin. Teoksessa: Hyvärinen, H. (toim.) Kasvipäiset biomolekyylit – fenoliset yhdisteet ja terpeenit. 59-65. MTT:n julkaisuja sarja A 100 Jokioinen.
- Jacquemyn, H., Vandepitte, K., Roldán-Ruiz, I. & Honnay, O. 2009: Rapid loss of genetic variation in a founding population of *Primula elatior* (Primulaceae) after colonization. – Annals of Botany 103: 777-783.
- Julkunen-Tiitto R, Sorsa S. 2001: Testing the effects of drying methods on willow flavonoids, tannins, and salicylates. Journal of Chemical Ecology 27: 779–789.
- Kalman, K., Medvegy, A., Penzes, Z. & Mihalik, E. 2007: Morph-specific variation of floral traits associated with reciprocal herkogamy in natural populations of *Primula vulgaris* and *Primula veris*. – Pl. Syst. Evol. 268: 15-27.
- Kery, M., Matthies, D. & Schmid, B. 2003: Demographic stochasticity in population fragments of the declining distylous perennial *Primula veris* (Primulaceae). – Basic Appl. Ecol. 4: 197-206.
- Keskitalo, M. 2001: Fenolisten yhdisteiden biokemia ja esiintyminen. Teoksessa: Hyvärinen, H. (toim.) Kasvipäiset biomolekyylit – fenoliset yhdisteet ja terpeenit: 14-39. MTT:n julkaisuja sarja A 100 Jokioinen.
- Keskitalo, M., Hyvärinen, H. & Pihlava, J.-M. 2001: Yleistä fenolisista yhdisteistä. Teoksessa: Hyvärinen, H. (toim.) Kasvipäiset biomolekyylit – fenoliset yhdisteet ja terpeenit. 9-13. MTT:n julkaisuja sarja A 100 Jokioinen.
- Kosenkova, Yu., Polovinka, M., Komarova, N., Korchagina, D., Morozov, S., Vyalkov, A., Kurochkina, N., Cheremushkina, V. & Salakhutdinov, N. 2008: Fatty-acid composition and secondary metabolites from slightly polar extracts of the aerial part of *Primula macrocalyx*. – Chemistry of Natural Compounds 44: 564-568.
- Lavola, A. & Julkunen-Tiitto, R. 1994: The effect of elevated carbon dioxide and fertilization on primary and secondary metabolites in birch, *Betula pendula* (Roth). – Oecologia 99: 315-321.
- Lindroth, R. L., Kinney, K. K. & Platz, C. L. 1993: Responses of deciduous trees to elevated atmospheric CO₂: productivity, phytochemistry, and insect performance. – Ecology 74: 763-777.
- Lindroth, R. L., Arteel, G. E. & Kinney, K. K. 1995: Responses of three saturniid species to Paper Birch grown under enriched CO₂ atmospheres. – Functional Ecology 9: 306-311.
- Mattila, P., Alanko, T., Pihlava J.-M., Hellström, J., Eurola, M., Aro, H., Piironen, V. & Korhonen, H. 2005: Ruusunmarjojen ravintosisältö ja bioaktiiviset yhdisteet. – MTT:n

- Julkaisuja. Jokioinen.
- Mattila, P. & Kumpulainen, J. 2001: Flavonoidien ja fenolisten happojen terveystvaikutukset. Teoksessa: Hyvärinen, H. (toim.) Kasviperäiset biomolekyylit – fenoliset yhdisteet ja terpeenit. 45-51. MTT:n julkaisuja sarja A 100 Jokioinen.
- Morozowska, M. & Wesolowska, M. 2004: In Vitro Clonal Propagation of *Primula veris* L. and Preliminary Phytochemical analysis. – *Acta Biol. Cracov. Bot.* 46: 169-175.
- Müller, A., Ganzera, M. & Stuppner, H. 2006: Analysis of phenolic glycosides and saponins in *Primula elatior* and *Primula veris* (primula root) by liquid chromatography, evaporative light scattering detection and mass spectrometry. – *Journal of Chromatography A* 1112: 218-223.
- Myrphy Covan, M. 1999: Plant products as antimicrobial agents. – *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582.
- Nguyen, P. & Niemeyer, E. 2008: Effects of nitrogen fertilization on the phenolic composition and antioxidant properties of basil (*Ocimum basilicum* L.). – *J. Agric. Food Chem.* 56: 8685-8691.
- Peterson, J. & Dwyer, J. 1998: Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. – *Nutrition Research* 18: 1995-2018.
- Petitjean-Freytet, C., Carnat, A. & Lamaison, J., L. 1993: The flower of Primrose: comparative study of *Primula veris* L. and *Primula elatior* (L.) L. – *Plantes Medicinales et Phytotherapie* 26: 27-35.
- Pihlava, J-M. 2001: Fenolisten yhdisteiden analysointi. Teoksessa: Hyvärinen, H. (toim.) Kasviperäiset biomolekyylit – fenoliset yhdisteet ja terpeenit. 66-73. MTT:n julkaisuja sarja A 100 Jokioinen.
- Piirainen, M., Piirainen, P. & Vainio, H. 1999: Kotimaan luonnonkasvit. – 511 s. WSOY. Porvoo.
- Richards, J. 2003: *Primula*. – 346 s. Timber Press. Portland, OR.
- Richards, J. H. & Ibrahim, H. 1982: The breeding system in *Primula veris* L. Pollen tube growth and seed-set. – *New Phytologist* 90: 305-314.
- Şuteu, D., Puşcaş, M., Băcilă, I., Coste, A., Filipaş, L., Stoica, I-A., Hurdu, B-I., Ursu, T. & Coldea, G. 2011: Does *Primula intricata* Gren. et Godr. Merit Species Rank? A Taxonomic Revision Based on nrDNA, cpDNA and AFLP Data. – *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 39: 24-29.
- Riihinen, K. 2005: Phenolic compounds in berries. – *Kuopion yliopiston julkaisuja c. luonnontieteet ja ympäristötieteet* 187.
- Snyder, L., R., Kirkland, J., J. & Dolan J., W. 2009: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. – 912 s. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2006: *Plant Physiology*. Fourth edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA 315-342 764s.
- Taylor, K. & Woodell, S. 2008: Biological Flora of the British Isles: *Primula elatior* (L.) Hill. – *Journal of Ecology* 96: 1098-1116.
- Tirri, R., Lehtonen, J., Lemmetyinen, R., Pihakaski, S. & Portin, P. 2003: *Biologian sanakirja*. – 888 s. Otava. Keuruu.
- Valentine, D., H. 1975: *Primula* L. Hybridization and the Flora of the British Isles. – Academic Press. London.
- Van Rossum, F. & Triest, L. 2006: Within-population genetic variation in the distylous *Primula veris*: Does floral morph anisoplethy matter in fragmented habitats? – *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 7: 263-273.
- Vitalini, S., Flamini, G., Valaguzza, A., Rodondi, G., Iriti, M. & Fico, G. 2011: *Primula spectabilis* Tratt. aerial parts: Morphology, volatile compounds and flavonoids. – *Phytochemistry* 72: 1371-78.

Wannes, W., Mhamdi, B., Sriti, J., Jemia, M., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., Kchouk, M. & Marzouk, B. 2010: Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. – *Food and Chemical Toxicology* 48: 1362-1370.

Yayli, N. 2001: Triterpenoid saponin from *Primula elatior* subsp. *meyeri*. – *Journal of Asian Natural Products Research* 3: 347-3.



Sammonkatu 8, Oulu p. 08-5145600 f. 08-3113029

VILJAVUUSTUTKIMUS

Pvm 7.11.2011
Työ nro 81788
As.nro 28693

Itä-Suomen Yliopisto
Biologianlaitos/ Kuusela
PL 111
80101 JOENSUU

Tilatunnus	Näyte Maanäyte, 3 kpl	Näytteen ottaja Biologian laitos
Näyte saapui 27.10.2011	Tutk. aloitettu 01.11.2011	Tutkimusperuste Tutkimuspyyntö
Merkki projekti 930025		

Viljavuustietojen yhteenveto													Kalkitustarve eri pH:n tavoiteviljavuusluokilla, t / ha				
Merkkien selitys													Tavoiteviljavuusluokkia määrittävyt viljeltävän kasvin mukaan. Suurin suositeltava karttelevitysmäärä: peruna 6 t / ha, muut kasvit 9 t / ha.				
<input type="radio"/> Huono <input type="radio"/> Huonontainen <input type="radio"/> Välttävä <input type="checkbox"/> Tyydyttävä <input checked="" type="checkbox"/> Hyvä <input checked="" type="checkbox"/> Korkea <input checked="" type="checkbox"/> Arveluttavan korkea																	
Näyte	Lohko	Maalaji Multavuus	Happamuus, pH	Kalsium, Ca	Fosfori, P	Kalium, K	Magnesium, Mg	Rikki, S	Kupari, Cu	Mangaani, Mn	Sinkki, Zn	Boori, B	Natrium, Na	Tavoite: tyydyttävä	Tavoite: hyvä	Tavoite: korkea	Suosittelava kalkitusaine
001	KO	HtMr, rm	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>						5,0	10,0	15,0	MKT
002	LA	HtMr, m	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>						3,0	6,0	9,0	DM tai MK
003	KA	HtMr, rm	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>						10,0	15,0	20,0	KKJ tai TK

VILJAVUUSTUTKIMUS As.nro 28693 Työ nro 81788 Pvm 7.11.2011 Suomen Ympäristöpalvelu Oy

Näyte 001		Koordinaatit x/y /	
Näyte otettu 21.10.2011		Lohko	KO
Maalaji	HtMr	Multavuus	rm
Johtoluku (10*mS/cm) 0,6			
Happamuus (pH)	*	5,5	
Kalsium (Ca)	*	720 mg/l	
Fosfori (P)	*	<1,5 mg/l	
Kalium (K)	*	75 mg/l	
Magnesium (Mg)	*	51 mg/l	
Rikki (S)	*	11 mg/l	
Ca / Mg		14,12	
● ○ □ ▣ ▤ ▥			
Ammonium-N (NH4-N)	2,5 mg/l	->	5,0 kg/ha
Nitraatti-N (NO3-N)	3,3 mg/l	->	6,6 kg/ha
Liukoinen typpi (N)	5,8 mg/l	->	11,6 kg/ha

Näyte 002		Koordinaatit x/y /	
Näyte otettu 21.10.2011		Lohko	LA
Maalaji	HtMr	Multavuus	m
Johtoluku (10*mS/cm) 0,5			
Happamuus (pH)	*	5,6	
Kalsium (Ca)	*	440 mg/l	
Fosfori (P)	*	1,8 mg/l	
Kalium (K)	*	58 mg/l	
Magnesium (Mg)	*	44 mg/l	
Rikki (S)	*	8,2 mg/l	
Ca / Mg		10,00	
● ○ □ ▣ ▤ ▥			
Ammonium-N (NH4-N)	11 mg/l	->	22 kg/ha
Nitraatti-N (NO3-N)	2,8 mg/l	->	5,6 kg/ha
Liukoinen typpi (N)	13,8 mg/l	->	27,6 kg/ha

Näyte 003		Koordinaatit x/y /	
Näyte otettu 21.10.2011		Lohko	KA
Maalaji	HtMr	Multavuus	rm
Johtoluku (10*mS/cm) 0,7			
Happamuus (pH)	*	5,1	
Kalsium (Ca)	*	640 mg/l	
Fosfori (P)	*	2,1 mg/l	
Kalium (K)	*	70 mg/l	
Magnesium (Mg)	*	94 mg/l	
Rikki (S)	*	8,4 mg/l	
Ca / Mg		6,81	
● ○ □ ▣ ▤ ▥			
Ammonium-N (NH4-N)	3,0 mg/l	->	6,0 kg/ha
Nitraatti-N (NO3-N)	<1,5 mg/l	->	<3 kg/ha
Liukoinen typpi (N)	3,0 mg/l	->	6,0 kg/ha

Merkkien selitys

● Huono ○ Huonoinen ○ Välttävä □ Tyydyttävä ▣ Hyvä ▤ Korkea ▥ Arveluttavan korkea

Sivu 2

TUTKIMUSMENETELMÄT

Mittaussuure	Menetelmä	Määrittäysraja	Yksikkö	Mittausepävarmuus, U
Johtoluku *	Mittaus maa-vesisuspensiosta	0.2	10*mS/cm	±25%(0,25-20)
Happamuus (pH) *	Mittaus maa-vesisuspensiosta			±0,1 pH yks
Kalsium (Ca) *	SYP206: HAAc-uutto, ICP-OES	50	mg/l	±20%(<200)±15%(200-1000)±13%(>1000)
Fosfori (P) *	SYP205:HAAc-uutto, FIA	1.5	mg/l	±22% (<3), ±17% (3-10), ±14% (>10)
Kalium (K) *	SYP206: HAAc-uutto, ICP-OES	15	mg/l	±20% (<100), ±15% (>100)
Magnesium (Mg) *	SYP206: HAAc-uutto, ICP-OES	15	mg/l	±18% (<200), ±14% (>200)
Rikki (S) *	SYP206: HAAc-uutto, ICP-OES	3	mg/l	±22% (<10), ±18% (10-100), ±14% (>100)
Ca / Mg				
Ammonium-N (NH ₄ -N)	SYP209: KCl-uutto, FIA	1.5	mg/l	±20% (<5), ±15% (>5)
Nitraatti-N (NO ₃ -N)	SYP209: KCl-uutto, FIA	1.5	mg/l	±20% (<5), ±15% (>5)
Liukoinen typpi (N)		3	mg/l	

Huom ! Mittausepävarm. = Laajennettu mittausepävarmuus (U=2u). Epävarmuusarvioissa pitoisuusalueet ovat sulkeissa määrittäysrajasarakkeessa ilmoitetussa pitoisuusyksikössä. Tarkemmat menetelmäkuvaukset saa pyydettäessä laboratorioilta.

Selite

Suomen Ympäristöpalvelu Oy on FINAS -akkreditoitu testauslaboratorio T231. Akkreditoituun pätevyysalueeseen sisältyvät testit on varustettu * tai ** merkinnöillä. * = akkreditointi kattaa näytteen esikäsittelyn, valmistuksen ja määrittämisen. ** = akkreditointi kattaa määrittämisen, mutta ei näytteen esikäsittelyä ja valmistusta.

Nitraattityppi (NO₃-N) ja liukoinen typpi (NH₄-N ja NO₃-N) ovat typpilannoituksen tarkentamiseen tarkoitetut määrittäykset. Tulokset kg/ha on laskettu olettaen muokkauskerroksen vahvuudeksi 20 cm.

Tulokset pätevät ainoastaan tässä selosteessa mainituille näytteille. Tämän selosteen saa kopioida vain kokonaan. Muussa tapauksessa on pyydettävä lupa Suomen Ympäristöpalvelu Oy:ltä.