

NAARAAN PREFERENSSI NEITSYEN JA PARITELLEEN
KOIRAAN FEROMONEIHIN KENTTÄSIRKOILLA (*GRYLLUS*
INTEGER)

ALEKSI OLLI

Pro gradu- tutkielma
Itä-Suomen yliopisto
Biologian laitos
2012

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO

Biologian laitos

OLLI, ALEKSI: Naaraan preferenssi neitsyen ja paritelleen koiraan feromoneihin kenttäsirkoilla (*Gryllus integer*)

Pro gradu -tutkielma, 33 s., liitteitä 3

Huhtikuu 2012

Kenttäsirkojen ja monien muiden hyönteisten käyttäytymisen tutkimuksessa on keskitytty usein pääasiassa akustiseen tai visuaaliseen signalointiin. Kuitenkin myös erilaisilla kemiallisilla signaaleilla, kuten feromoneilla, on kiistaton vaikutus näiden eläinten parinvalinnassa. Feromoneilla voidaan viestiä esimerkiksi hyvästä kelpoisuudesta tai dominanssista vastakkaiselle sukupuolelle. Feromonit ovatkin eniten käytettyjä sosiaalisia signaaleja eliöiden välisessä kommunikaatiossa.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää naaraan preferenssiä neitsyen ja paritelleen koiraan feromoneihin kenttäsirkoilla (*Gryllus integer*).

Tutkimuksessa kerättiin kahdelta koirasryhmältä feromoninäytteet suodatinpapereille. Naaraan preferenssiä tutkittiin asettamalla naaras areenalle (läpinäkyvään muovilaatikkoon) ja mittaamalla aikaa, jonka naaras aktiivisena kokeessa ollessaan käytti koiraiden feromonien tutkimiseen. Naaraan valittavana oli samanaikaisesti aina sekä neitsytkoiraan että jo paritelleen koiraan feromonipaperi. Kun kaikki koirasparit oli kertaalleen testattu, neitsytkoiraat paritettiin (neitsyestä tehtiin ex-neitsyt). Tämän jälkeen valintakoe toistettiin, käyttäen samoja koiraspareja kuin ensimmäisessä osakokeessa. Koiraspareja oli yhteensä 25. Naaraita oli molemmissa kokeissa 25 yksilöä (yhteensä 50 naarasta), joten eri osakokeissa käytettiin eri naaraita.

Tutkimuksen mukaan naaras vietti keskimäärin yli kaksi kertaa enemmän aikaa neitsytkoiraan feromonipaperin päällä ensimmäisessä kokeessa kuin toisessa kokeessa, jolloin koiraat olivat paritelleet. Feromonien määrää tai laatua ei tutkittu, ainoastaan naaraan preferenssiä feromonipapereihin.

Paritteluhistoria näkyy tämän tutkimuksen mukaan kenttäsirkkakoiraiden feromonien preferenssissä siten, että neitsyitä yksilöitä suositaan enemmän jo paritelleisiin verrattuna. Neitsyillä yksilöillä voi olla monia kelpoisuutta parantavia ominaisuuksia paritelleisiin yksilöihin verrattuna, kuten parempi immunitetti tai vähäisempi sukupuolitautilien määrä. Neitsytkoirailta on myös havaittu olevan enemmän lisääntymiskykyisiä siittiöitä kuin jo paritelleilla koirilla.

Tämä koe kenttäsirkoilla on ensimmäinen, jossa osoitettiin naaraiden suosivan neitsytkoiraiden feromoneja verrattuna jo paritelleiden koiraiden feromoneihin. Lisätutkimusta tarvitaan, sillä kemiallisten signaalien merkitystä eläinten parinvalinnassa ei vielä kukaan ymmärrä riittävästi.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND

Department of Biology

OLLI, ALEKSI: Female preference to pheromone cues left by virgin and mated males in the field cricket (*Gryllus integer*)

MSc. Thesis, 33 pp., 3 Appendices

April 2012

Studies in the field of animal behaviour of insects are often based on acoustic or visual communication between individuals. Although in many cases less studied, chemical communication is regarded as the most widespread form of communication. Females in a wide range of taxa have been shown to base their mate choice on pheromone signals.

There is substantial empirical evidence that mated and unmated females differ in their chemical profile and that males usually prefer virgin females. However, none of the earlier studies have tested whether males would also display different chemical profiles depending on their mating status.

In this study the field cricket (*Gryllus integer*) was used as a model organism to test female preference to pheromone cues left by virgin and mated males.

To collect pheromones from males, each male was placed in a small Petri dish containing a filter paper for 24 hours. The filter paper discs from two males, one virgin and one mated in each pair, were then presented to a female cricket. Pheromones were collected from 25 pairs of males and pheromone preference was tested using 50 different females. Each trial lasted for 10 minutes.

Female preference was measured as the total time a female spent on each filter disc. After the female preference test, all virgin males were mated once (then ex-virgins) and the female preference test was repeated.

Results demonstrated that females spent significantly more time on pheromone-containing filter paper discs from virgin males than these same males when they had been mated (ex-virgin males). The difference in total time females spent on discs was twofold between virgin and ex-virgin males. This is the first study to show that female field crickets prefer pheromone cues left from virgin males when compared to mated males. More studies are needed to confirm these results.

SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO	2
2	SEKSUAALIVALINTA	3
	2.1 Koiraiden välinen kilpailu	4
	2.2 Naaraan parinvalinta ja sen kopiointi	5
	2.3 Loiset, taudit ja immuniteetti	6
	2.4 Allokaatiokustannus.....	7
3	FEROMONIT JA HIILIVEDYT	8
4	KENTTÄSIRKKOJEN BIOLOGIA	9
5	TAVOITTEET JA HYPOTEEESIT	12
6	AINEISTO JA MENETELMÄT	13
	6.1 Tutkimuseläimet	13
	6.2 Kemiallisten signaalien keräys	14
	6.3 Naaraan valintakoe	15
	6.4 Naaraan käyttäytyminen kokeessa.....	17
	6.5 Neitsytkoiraiden paritus.....	18
	6.6 Feromonien uudelleenkeräys ja toinen naaraan valintakoe.....	18
	6.7 Tilastolliset analyysit	19
7	TULOKSET	
	7.1 Naaraan valintakoe	19
	7.2 Ikä- ja kokoerot.....	20
8	TULOSTEN TARKASTELU	21
	8.1 Naaraan valintakoe	21
	8.2 Ikä- ja kokoerot.....	25
	8.3 Kasvatusolosuhteiden ja muiden tekijöiden vaikutus.....	27
9	YHTEENVETO.....	28
	KIITOKSET	29
	LÄHDELUETTELO	30
	LIITTEET	

1 JOHDANTO

Eläinyksilöt erittävät erilaisia hajuaineita, joihin kuuluvat myös feromonit. Feromoni-sana tulee kreikan kielen sanoista *phe'rein* (kantaa) ja *horma'ein* (panna liikkeeseen), jotka kuvaavat hyvin feromonin tehtäviä (Karlson & Lüscher 1959). Seksuualiferomonit voivat välittää informaatiota parittelukumppanin laadusta ja sosiaalisesta asemasta (Rantala et al. 2003b). Feromonit ovat molekyylijä, joita yksilöt vapauttavat ympäristöönsä ja jotka aikaansaavat muutoksen toisen yksilön fysiologiassa tai käyttäytymisessä (Karlson & Lüscher 1959).

Feromonit ovat vanhimpia ja ehkä eniten käytettyjä sosiaalisia signaaleja eliöiden välisessä kommunikaatiossa (Touhara 2008). Kaupp (2010) määrittelee feromonin kemialliseksi yhdisteeksi, jota käytetään lajin yksilöiden väliseen viestintään erotuksena tavallisista tuoksuista. Koska feromonit voivat olla luotettavia signaaleja koiraan laadusta (Rantala et al. 2003b), Zahavin (1975) teorian mukaan dominoivan koiraan erittämän feromonin pitäisi olla naaraan mielestä houkuttelevampi kuin sosiaalisessa hierarkiassa alemmalla tasolla olevan koiraan feromonin.

Feromonit ovat energieettisesti kalliita yhdisteitä ja niiden valmistaminen kuluttaa paljon resursseja, joten ne voivat olla merkinä hyvästä kelpoisuudesta parinvalinnassa (Houck 2009). Seksuaalisina signaaleina feromonien tuottaminen on evolutiivisesti kallista vain, jos siihen käytetty energia ei palaudu takaisin, mikä heikentää yksilön kelpoisuutta (katso Koti-aho 2001). Feromonien tuottaminen voi johtaa suurempaan loistaakkaan, koska osa loisista suunnistaa eläinyksilöiden tuottamien kemiallisten yhdisteiden perusteella. Jos feromonien tuottaminen olisi yksilöille täysin ilmaista, niillä ei ehkä olisi mitään vaikutusta kelpoisuuteen, sillä kaikki yksilöt tuottaisivat feromoneja suurimman mahdollisen määrän koko ajan läpi lisääntymiskykyisen elämänsä.

Joillakin hyönteislajeilla, kuten lehtinunnanaaraila (*Lymantria dispar*), parittelu laukaisee hormonimuutoksen supistaen feromonituotantoa ja näin vähentäen naaraan houkuttelevuutta (Thomas 2011). Sama ilmiö on havaittu myös kahdella kääriäisperhoslajilla.

Koiraiden on havaittu erottavan neitsyet ja paritelleet naaraat toisistaan, ja koiraiden oletetaan suosivan useilla lajeilla neitsyitä naaraita (Thomas 2011). Obinsopuleilla (*Lemmus sibiricus*), mattohämähäkeillä (*Agelenopsis aperta*), jauhopukeilla (*Tenebrio molitor*) sekä maa-mehiläisillä (*Amegilla dawsoni*) koiraat suosivat neitsyiden naaraiden tuottamia feromoneja paritelleisiin verrattuna. Tietyissä tilanteissa myös naaraiden kannattaisi suosia neitsyitä koiraita. Paritelleella yksilöllä voi olla esimerkiksi kelpoisuutta vähentävä sukupuolitauti, ja sen vuoksi paritelleiden ja neitsyiden yksilöiden erottaminen toisistaan on hyödyllistä (Luong et

al. 2000).

Jauhopukeilla (*T. molitor*) tehdyssä kokeessa osoitettiin joidenkin koiraiden tuottamien hajuaineiden olevan suosituimpia kuin toisten (Nielsen & Holman 2012). Eri naarasyksilöiden todettiin suosivan erilaisia hajuja, joten jauhopukkikoiraiden hajuprofiilit ja niiden houkuttelevuus eroavat eri yksilöillä toisistaan. Tämä pätee todennäköisesti myös muihin niveljalkaisiin eläimiin, kuten kenttäsiirkkoihin.

Rohkean käyttäytymisen on todettu lisäävän yksilön kuolleisuusriskiä, mutta toisaalta rohkeuden seurauksena oma lisääntymismenestys tai kelpoisuus voi parantua (Hedrick & Kortet 2012). Kenttäsiirkalla (*Gryllus integer*) on todettu olevan yksilöllisiä persoonallisuuseroja koiraiden välillä esimerkiksi rohkeudessa. Jotta koiraat pääsisivät todennäköisemmin parittelemaan, niiden täytyy asettaa itsensä vaaralle alttiiksi sirittämällä, joka myös houkuttelee saalistajia ja loisia (Zuk et al. 2006). Vaihtoehtoisesti naarasta voi houkuttaa myös muilla tavoin, esimerkiksi hajuaineiden ja muiden kemiallisten signaalien avulla.

Koiraspuoliset kenttäsiirkat tuottavat kauas kuuluvaa pitkän kantaman sirtystä (calling song), lyhyen kantaman sirtystä (courtship song) sekä kemiallisia- ja kosketussignaaleja houkutellessaan naaraita (Wagner & Reiser 2000). Kenttäsiirkojen ja muiden suorasiipisten (*Orthoptera*) hyönteisten tutkimuksessa suurin mielenkiinto on perinteisesti kohdistunut akustiseen eli äänelliseen signaalointiin, koska sen tiedetään olevan tärkeässä osassa naaraan parinvalinnassa (Thomas & Simmons 2009a). Kuitenkin myös erilaisilla kemiallisilla hajuaineilla, kuten feromoneilla, on kiistaton vaikutus siirkojen parinvalintaan (esim. Kortet & Hedrick 2005, Thomas & Simmons 2010).

Kemiallisten signaalien mahdollista vaikutusta seksuaalivalintaan ja naaraan parinvalintaan on tutkittu jo Darwinin ajoista lähtien (Fletcher et al. 2009). Siitä huolimatta kemiallisten signaalien tutkiminen on jäänyt muiden kommunikaatiotapojen tutkimuksen varjoon, eikä kemiallisten signaalien merkitystä vieläkään ymmärretä riittävästi. Thomas ja Simmons (2010) huomauttavatkin, että erilaisten hajuaineiden roolia on useissa tutkimuksissa vähätelty tai jopa kokonaan jätetty huomioimatta keskittyen ihmisaistein helpommin havaittavaan akustiseen signaalointiin.

2 SEKSUAALIVALINTA

Seksuaalivalintaa ohjaa Darwinin mukaan kaksi mekanismia: sukupuolten sisällä tapahtuva kilpailu sekä parinvalinta (Trivers 1972: 137–138). Sukupuolten sisäistä kilpailua syntyy yksilöiden kilpaillessa keskenään paremmasta lisääntymismenestyksestä toisten samaa suku-

puolta olevien yksilöiden kanssa (yleensä koiraiden välistä). Parinvalintaa syntyy silloin, kun mahdolliset kumppanit eroavat toisistaan esimerkiksi materiaalisten tai geneettisten etujen tarjoajina (yleensä naaraat toimivat valitsijana). Parinvalinta johtaa tiettyjen yksilöiden suosimiseen suhteessa muihin yksilöihin. Naaraat voivat täten suosia esimerkiksi vahvinta, komeinta, tai muita yksilöitä dominoivaa koirasta vahvasti hierarkisilla lajeilla, kuten torakoilla tai kenttäsirkoilla.

2.1 Koiraiden välinen kilpailu

Koiraiden tärkeimmät puolustettavat resurssit ovat oma reviiri ja sen alueella olevat naaraat (Hofmann & Schildberger 2001). Esimerkiksi kaksitäpläsirkat (*Gryllus bimaculatus*) ja muut kenttäsirkoihin kuuluvat lajit taistelevat aggressiivisesti valtaamistaan alueista sekä niillä mahdollisesti esiintyvistä naaraista (Alexander 1961). Menestys taistelussa voi johtaa suurempaan parittelumenestykseen, ja eri lajeilla koiraiden taistelu noudattaa usein tiettyä kaavaa.

Taisteluissa menestyvien koiraiden jälkeläisillä voi olla suurempi todennäköisyys menestyä tulevilla taisteluilla, ja kaksitäpläsirkoilla tehdyssä kokeessa osoitettiin taistelumenestyksen olevan osittain perinnöllistä. (Wedell & Tregenza 1999). Koska taistelu kuluttaa energiaa, taisteluiden voittaminen voi olla merkki koiraan hyvästä kelpoisuudesta (Väänänen et al. 2006). Dominoivia koiraita suositaankin useimmiten naaraiden keskuudessa ainakin kenttäsirkoilla ja muilla hyönteisillä (Väänänen et al. 2006, mutta ks. myös Moore et al. 2003 ja Shackleton et al. 2005). Dominoivat koirat voivat tuoda parhaat geenit ja tarjota eniten resursseja naaraille, mutta ne voivat vahvoina myös helpommin vahingoittaa naaraita (esim. Moore et al. 2003, Kortet & Hedrick 2005). Dominanssi on epävakaa ominaisuus ja altis muutoksille populaation sisällä (Thomas & Simmons 2011). Feromonit voivat heijastaa koiraan sosiaalista asemaa kemiallisesti, ja täten peilata muutoksia valtasuhteissa.

Reviiriään aggressiivisesti puolustavilla lajeilla aggressiota säätelee usein tietyn hormonin erityy (Muehlenbein & Watts 2010). Selkärangaisilla hormonina toimii testosteroni, mutta hyönteisillä testosteronin tuotantoa ei ole (Thomas & Simmons 2011). Hyönteisillä nuoruushormonin (juvenile hormone) oletetaan toimivan samoin (Rantala et al. 2003a) Selkärangaisilla enemmän testosteronia tuottavat yksilöt ovat aggressiivisempia ja hierarkisten lajien valta-asemassa usein korkeammalla; hormoni muuttaa eläimen käyttäytymistä tietyissä sosiaalisissa tilanteissa, esimerkiksi taistelussa valta-asemasta, ja käyttäytymisen muutos vaikuttaa hormonitasojen säätelyyn (Muehlenbein & Watts 2010).

2.2 Naaraan parinvalinta ja sen kopiointi

Naaraan parinvalinta useilla eläimillä tapahtuu kaksivaiheisesti: ennen parittelua ja parittelun jälkeen (Mautz & Sakaluk 2008). Ennen parittelua tapahtuvassa (pre-copulatory choice) valinnassa naaras valitsee parittelukumppaninsa esimerkiksi koiraan koon, värityksen tai laulun, tai vaikkapa koiraan tuottamien feromonien perusteella. Parittelun jälkeiseen (post-copulatory choice) valintaan kuuluu esimerkiksi parittelun keskeyttäminen ja tiettyjen koiraiden siittiöiden hylkääminen, poistaminen tai ulostyöntäminen.

Parinvalinnassa esiintyy yleisesti valinnan kopiointia (mate choice copying) (Sakaluk & Ivy 1999). Kopiointia on selitetty kahdella mekanismilla: sen oletetaan joko vähentävän parinvalintaan kuluva aikaa tai mahdollistavan tarkemman tiedon hankkimisen potentiaalisesta parittelukumppanista (Jennions & Petrie 1997). Kerran paritellut yksilö on jo päässyt jatkaamaan sukuaan ja on siten jo siis kertaalleen testattu. Tällöin ei tarvitse käyttää turhaa aikaa kelvollisen kumppanin etsintään. Ei-itsenäinen parinvalinta voi joko lisätä tai vähentää koiraan parittelumenestystä vaikuttaen näin lajin seksuaalivalinnan suuntaan ja voimakkuuteen.

Naaraan valintaan vaikuttavat lähes varmasti sekä sisäsyntyiset (geneettiset) että ulkoiset (kulttuuriset) tekijät (Dugatkin 1998). Naaraan valinnan kopiointia on havaittu esimerkiksi kanalinnuilla, kaloilla ja hirvieläimillä (Jennions & Petrie 1997). Selkärangattomilla eläimillä se on luultavasti vähäisempää, mutta ainakin salviapensassirkalla (*Cyphoderris strepitans*) voi esiintyä naaraan valinnan kopiointia (Sakaluk & Ivy 1999).

Kaloilla tehdyt tutkimukset osoittavat naaraiden suosivan niiden koiraiden ”pesiä”, joissa on myös muiden naaraiden mätiä (Dugatkin 1998). Tämä ei välttämättä tarkoita naaraan valinnan kopiointia. Naaras laskee mätinsä samaan pesään, koska se voi vähentää saaliiksi joutumisen todennäköisyyttä omalle jälkikasvulle. Itse päätetyllä parinvalinnalla ja toisten valintaa kopioimalla voidaan päästä aivan samaan lopputulokseen esimerkiksi jälkeläisten selviytymisen kannalta (Jennions ja Petrie 1997).

Miljoonakalalla (*Poecilia reticulata*) tehty tutkimus osoitti naaraiden muistavan ne valinnat, joita muut naaraat olivat tehneet (Dugatkin 1998). Naaraat osoittivat vahvaa mieltymystä niitä koiraita kohtaan, joita muutkin naaraat olivat suosineet. Jos valinnan kopiointi ei ole mahdollista, naaraat valitsevat koiraita näiden ilmiäsun, kuten koon, pyrstön pituuden tai värityksen mukaan.

Yksilöt voivat säästää kalliita resurssejaan kopioimalla muiden valintaa itse tehtävän arvioinnin sijaan (Jennions & Petrie 1997). Jos elämä on ankaraa, valinnan kopioinnin valitsevat todennäköisesti ne, jotka ovat muita heikommassa asemassa, kuten fyysisesti huonossa kun-

nossa tai suuresta loistaakasta kärsivät yksilöt. Iällä on myös suuri merkitys. Nuoret ja kokemattomat yksilöt kopioivat parinvalintapäätöksensä useammin kuin vanhemmat ja kokeneet. Antilooppinaaraat suosivat parittelussaan sellaisia alueita, joilla on aiemmin vierailut useita naaraita. Naaraat käyttävät virtsaa ja siinä olevia yhdisteitä merkkeinä arvioidessaan aiempaa naaraiden läsnäoloa. Kaikki eivät kuitenkaan pysty kopioimaan toisten valintaa, koska täytyhän jonkun olla myös kopioitavana.

2.3 Loiset, taudit ja immuniteetti

Selkärankaisilla korkeampi testosteronitaso tuottaa koreampia sukupuoliornamenteja (Muehlenbein & Watts 2010). Testosteronin erityksen on osoitettu toimivan kaksiteräisenä miekkana: korkea testosteronitaso on usein merkinä valta-asemasta, mutta sen hintana voi olla myös korkeampi stressihormonitaso ja suurempi alttius loistartunnoille.

Kaikilla populaation yksilöillä ei välttämättä ole loisia, vaan on laskettu, että 20 %:lla populaation yksilöistä voi olla jopa 80 % loistartunnoista (Skorping ja Jensen 2004). Isoilla nisäkkäillä koiraiden on havaittu toimivan paljon useammin tautien välittäjinä kuin naaraiden; riistaeläimistäkin metsästetään usein vain suuria uroksia, joilla on yleensä suuri haaremi. Hierarkian ylimmällä portaalla eläminen on raskasta. On tärkeää osata tunnistaa loistartunnan saaneet yksilöt terveistä yksilöistä mahdollisen tartunnan saamisen estämiseksi.

Sukupuolitauteja ovat taudit, jotka siirtyvät yksilöstä toiseen seksuaalisen kontaktin kautta. Ne voivat tarttua joko suoraan parittelussa tai epäsuorasti hedelmöittyneen munasolun mukana (Luong et al. 2000). Eräässä luonnossa elävässä trooppisen kotisirkan (*Grylloides sigillatus*) populaatiossa yli 70 % sirkkalajin koiraista kantaa ainoastaan parittelun kautta tarttuvaa sukupuolitautia. Esimerkiksi jauhopukeilla naaraiden tiedetään suosivan paremman immuniteetin eli todennäköisemmin tautivapaiden koiraiden hajua (Rantala et al. 2002). On mahdollista, että myös kenttäsirranaaraat haistaisivat infektoituneet koiraat ja suosisivat erityisesti neitsytkoiraita.

Immuunikompetenssihaittahypoteesin (ICHH) mukaan seksuaalivalinnan kannalta tärkeisiin ominaisuuksiin, kuten koreaan ulkokuoreen tai houkuttelevampaan hajuun, panostaminen voi vähentää vastustuskykyä esimerkiksi loisia ja tauteja vastaan (Folstad & Karter 1992). Immuunikompetenssilla tarkoitetaan yksilön kykyä (elimistön vastetta) reagoida ulkoista taudinaiheuttajaa vastaan (Rantala et al. 2002). Hypoteesi on muunnos alkujaan Zahavin (1975) esittämästä haittahypoteesista, jonka mukaan sekundaarisiin sukupuoliominaisuuksiin (lintujen höyhenpeite, leijonan harja) panostaminen voi pienentää yksilön eloonjäämisen mahdolli-

suuksia esimerkiksi lisääntyneen predaation muodossa.

Hyönteisillä korkea nuoruushormonipitoisuus voimistaa seksuaalivalinnassa tärkeitä ominaisuuksia esimerkiksi lisäten hajun houkuttelevuutta ehkäisten samalla immuunipuolustuksen toimintaa (Rantala et al. 2003a). Toisaalta hyväkuntoisten yksilöiden on todettu aivan hyvin pystyvän panostamaan sekä ornamentteihin että vastustuskykyyn (Rantala & Kortet 2003b, Rantala et al. 2003b). Nuoruushormoni on hyönteisten vastine testosteronille ja sen tiedetään vaikuttavan feromonituotantoon ainakin torakoilla ja kovakuoriaisilla (Thomas & Simmons 2011). Nuoruushormonin keinotekoinen lisääminen kasvattaa koiraan hajun puoleensavetävyyttä jauhopukeilla (Rantala et al. 2003a). Nuoruushormoni osallistuu myös lisääntymisen ja morfogeneesin (muodonvaihdoksen) säätelyyn kaikilla hyönteisillä ja säätelee allokaatiokustannuksia (trade-off).

2.4 Allokaatiokustannus

Allokaatiohypoteesi on hypoteesi yksilön rajallisten resurssien jakamisesta (Martin et al. 2011). Sillä tarkoitetaan rajallisten ja kilpailulle alttiiden resurssien jakamista kelpoisuuden kannalta kalliiden fysiologisten toimintojen kesken. Parittelulla on osoitettu olevan negatiivinen vaikutus yksilön immunitettiin monilla hyönteisillä (Leman et al. 2009). Immuunipuolustus voidaan teoriassa ajaa alas ja kelpoisuus maksimoida panostamalla kasvuun tai jälkeläistuotantoon, jos tarttuvista taudeista tai loisista ei ole vaaraa. Tämä ei luonnossa ole mahdollista, koska kaikilla olemassa olevilla (ja sukupuuttoon jo kuolleilla) organismeilla on loisia riippumatta organismien immuunipuolustuksen tehokkuudesta.

Thomasin ja Simmonsin (2008, 2009a, 2009b, 2010 ja 2011) merikenttäsirkoilla (*Teleogryllus oceanicus*) tehdyissä kokeissa osoitettiin selvästi, että sirkat säätelevät kustannuksia sirittämisen (akustinen signaali), hajujen tuottamisen (hajusignaali) sekä lisääntymisen välillä. Kenttäsirkkakoiraat, jotka panostavat vähemmän sirittämiseen, panostavat yleensä vähemmän myös lisääntymiseen pienempien sukupuolirauhasten, siittiöiden laadun ja siten hedelmöityksen onnistumisen muodossa (Thomas et al. 2011). Toisaalta nämä yksilöt voivat tuottaa naaraiden mielestä houkuttelevampia hajuaaineita, eli erilaisia feromoneja ja hiilivetyjä. Kustannuksia voi esiintyä vain, jos edellä mainittujen signaalien tuottaminen tai ylläpito on yksilölle kallista (Kotiaho 2001).

Jos yksilö on lähellä kuolemaa, se voi investoida lisääntymiseensä vielä kerran (terminal investment) (Nielsen & Holman 2012). Jauhopukeilla tehdyssä kokeessa lähellä kuolemaa olevien koiraiden hajun viehättävyys kasvoi naaraiden mielestä. Kun koiraiden immuunitaak-

kaa lisättiin, koiraiden hajun viehättävyys kasvoi. On mahdollista, että koiraat pyrkivät panostamaan naaraan houkuttelemiseen hajuilla vielä kerran ennen kuin on liian myöhäistä.

3 FEROMONIT JA HIILIVEDYT

Volatiiliset, eli haihtuvat ja ilman kautta kulkeutuvat feromonit, ovat kehittyneet eläinten evoluutiossa elämän siirtyessä vedestä maalle kambrikauden räjähdysten aikoihin (Touhara 2008). Feromonit täyttävät erilaisia tarpeita selkärankaisten ja selkärangattomien eläinten sosioseksuaalisessa kommunikaatiossa. Hajun avulla kumppanin tai lauman löytää helpommin varsinkin, jos eläimen muut aistit ovat heikkoja. Eläimet voivat tunnistaa saalistajan hajun esimerkiksi ulosteista ja näin välttää saaliiksi joutumisen (esim. Kortet & Hedrick 2004).

Sammakkoeläinten ja matelijoiden käyttäytymisessä feromonit näyttelevät todistetusti isoa roolia (Houck 2009). Kanadalaisten sukkanauhakäärmeiden (*Thamnopsis sirtalis*) naaraiden iho erittää feromonit, joka houkuttelee koiraita ja johtaa jopa tuhansien koiraskäärmeiden kerääntymiseen naaraan asuttaman pesän ympärille. Kumppanin löytymisen jälkeen feromonien tehtävänä on tuoda lisää tietoa mahdollisesta lajikumppanista esimerkiksi viestittämällä kosijalle paritteluhalukkuudesta. Feromonien avulla voidaan myös viestittää muille omaa valta-asemaa hierarkiassa (esim. Kortet & Hedrick 2005).

Useat jyrksijöillä, sirkoilla ja ihmisillä tehdyt tutkimukset ovat osoittaneet naaraiden suosivan dominoivien koiraiden hajua (Thomas & Simmons 2009). Toisaalta torakkanaaraiden tiedetään suosivan alistuvien koiraiden hajua (Moore et al. 2003). Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että vahvempi koiras kykenee helpommin vahingoittamaan naarasta parittelussa.

Feromonit kehittyvät suhteellisen nopeasti ja siksi niiden evolutiiviset erot voivat olla suuria (Houck 2009). Feromonien avulla voidaan saada tietoa parittelukumppanin kelpoisuudesta (fitness) ja loisresistenssistä, koska loistartunnat voivat vaikuttaa feromonisignaalien informaationvälitykseen (Rantala et al. 2003b). Lisäksi ne voivat antaa tietoa yksilön ravintotilanteesta ja immuunipuolustuksen tilasta sekä valta-asemasta.

Kutikulaariset hiilivedyt (cuticular hydrocarbons, CHC) ovat kemiallisia yhdisteitä, joita esiintyy niveljalkaisten kutikulassa eli kuoren uloimmassa kerroksessa (Thomas & Simmons 2010). Kutikulan ensisijaisena tehtävänä on tarjota fyysistä suojaa sekä suojaa kuivumiselta (Tregenza & Wedell 1997). Useilla eläinlajeilla pitkäketjuiset hiilivedyt muodostavat kutikulan pintaan vahakerroksen. Tämän vahakerroksen sisältämiä hiilivetyjä käytetään lyhytaikaisessa eläinten välisessä kommunikaatiossa (Thomas & Simmons 2011). Hiilivetyjen oletetaan toimivan monilla niveljalkaisilla feromonien tavoin vaikuttaen saman lajin yksilöiden käyt-

täytymiseen tai fysiologiaan (Nielsen & Holman 2012). Kun eläin uusii kuorensa, sen täytyy syntetisoida uusi annos hiilivetyjä ulkokerrokseensa (Howard & Blomqvist 2005). Tässä työssä kutikulaarisista hiilivedyistä ja feromoneista puhuttaessa tarkoitetaan samoja haihtuvia kemiallisia yhdisteitä, joita erittyy yksilöiden aineenvaihdunnan tuloksena ympäristöön. Nämä yhdisteet muodostavat suuren osan jokaisen eläimen yksilöllisestä hajusta.

On esitetty, että kutikulaariset hiilivedyt toimivat sukupuoliannonnassa, ja siten voivat olla niveljalkaisten kemiallinen vastine lintujen ylellisille höyhenpeitteille (Thomas & Simmons 2011). Tuore tutkimus osoitti CHC- yhdisteiden olevan seksuaalisesti dimorfisia eli esimerkiksi kenttäsirkoilla koiraan ja naaraan hiilivedyt voivat olla erilaisia sekä määrällisesti että laadullisesti (Thomas & Simmons 2008 Thomas & Simmons 2010 mukaan).

Hiilivetyjen avulla esimerkiksi jauhopukit erottavat eri sukupuolet toisistaan (Nielsen & Holman 2012). Lisäksi esimerkiksi naaraspuolisilla merikenttäsirkoilla (*T. oceanicus*) eri hiilivetyjen osuus kokonaishajusta vaihtelee sen mukaan, onko yksilö paritellut vai ei (Thomas & Simmons 2011). Hiilivetyjen viehättävyys ei rajoitu naaraan valintaan; koirassirkkojen on havaittu valmistavan spermatofori nopeammin ja olevan halukkaampia luovuttamaan se silloin kun naaras tuottaa tiettyjä hiilivetyjä (Thomas & Simmons 2010).

Kenttäsirkoilta on kaasukromatografisesti löydetty kolmisenkymmentä erilaista kutikulaarista hiilivetyä, joista osaa tavataan vain naarailla (Thomas & Simmons 2009b, 2010). Tregenza ja Wedell (1997) huomauttavat, että ei ole olemassa mitään tiettyä ”seksiferomonia” vaan ennemminkin tiettyjen hiilivetyjen suhteelliset osuudet kokonaishajusta ohjaavat tunnistusta ja parinvalintaa.

4 KENTTÄSIRKKOJEN BIOLOGIA

Kenttäsirkkujen *Gryllus*-suku kuuluu niveljalkaisten pääjaksossa hyönteisten luokkaan ja suorasiipisten lahkossa sirkkojen (*Gryllidae*) heimoon. Niveljalkaiset ovat eläinkunnan ylivoimaisesti runsaslajisin pääjakso, jonka lajeille ovat ominaista mm. ulkoinen kitiinikuori, nivelikäs ruumis ja nivelikkäät raajat sekä avoin verenkiertojärjestelmä. Suorasiipisten lahkoon hyönteisiä käytetään usein yksilöiden välisen viestinnän ja parittelun tutkimiseen (Tregenza & Wedell 1997).

Kenttäsirkkujen ja sen sukulaislajien (esim. *G. bimaculatus*, *T. oceanicus*, jne.) käyttäytymistä on tutkittu laajalti (mm. Hedrick 1986, Hofmann & Schildberger 2001, Kortet & Hedrick 2004, Kortet & Hedrick 2005, Matsumoto & Mizunami 2000, Rantala & Kortet 2003a, Thomas & Simmons 2008, Thomas & Simmons 2010, Thomas & Simmons 2011).

Kenttäsirkoilla naaraat ovat usein suurempia kuin koiraat (Kortet & Hedrick 2005). Naaras kiipeää parittelutilanteessa koiraan päälle, eikä koiras voi pakottaa naarasta parittelemaan. Kenttäsirkojen parinvalinnassa lopullinen valta onkin aina naaraalla. Kenttäsirrat ovat moniavioisia ja päällisin puolin havaittavana erotuksena koiraista, naaraalla on peräpäässään pitkä munanasetin, jonka juureen koiras siirtää sirkojen paritellessa spermatoforin eli siittiötä sisältävän kotelon (Rebar et al. 2011). Naaraan päätettävissä on, käyttääkö se arvokkaan lastin ravinnokseen vai hedelmöitykseen. Naaras voi myös hylätä siittiökotelon. Tämän vuoksi sirrat ovat mielenkiintoisia kohteita esimerkiksi naaraiden parittelunjälkeistä valintaa tutkittaessa (Mautz & Sakaluk 2008).

Kahden aikuisen kenttäsirkkakoiraan kohdatessa syntyy useimmiten taistelu (Alexander 1961). Taistelu alkaa toisen tai molempien osapuolten aggressiivisella käytöksellä, ja päättyy, kun taistelun hävinnyt osapuoli osoittaa alistumiseleitä, ja välttelee voittajan kohtaamista. Kenttäsirkoilla aggressiivisuuden tasot sekä taistelu vaihtelevat kilpakumppanin välttelemisestä tuntosarvimiekkailuun ja leukojen levittelystä painimiseen asti. Taistelun voittajaksi selviytyy esimerkiksi selättämällä vastustajansa. Tämän jälkeen voittaja nytkäyttelee tunnusoimaisesti ruumistaan ja esittää aggressiivisen, terävän sirityksen voittonsa merkiksi. Tappion kokenut sirka ei toisinaan osallistu uusiin taisteluihin moneen tuntiin. Monilla lajeilla, kuten linnuilla, liskoilla ja hämähäkeillä sekä myös joillain sirkoilla, suurempi koko takaa yleensä voiton taisteluissa (Shackleton et al. 2005). Suurempikokoiset koiraat voivat dominoida pienempiä, mutta esimerkiksi kenttäsirkoilla kookkaampi koiras ei automaattisesti ole voittaja (Alexander 1961). Mustilla kenttäsirkoilla (*Teleogryllus commodus*) jopa kolmannes taisteluista päättyy kooltaan pienemmän sirkan voittoon (Hofmann & Schildberger 2001).

Dominoivat koiraat, ja vain koiraat, tuottavat kauas kuultavaa siritystä houkutelukseen naaraita sekä toisen tyyppistä lähikantaman siritystä lisätäkseen naaraan halukkuutta paritteluun (Thomas & Simmons 2011). Koirassirrat myös hyökkäävät toisten koiraiden kimppuun näiden tuottaessa naaraita houkuttelevaa siritystä omalla alueellaan. Vaikka alistuvat kenttäsirkkakoiraat pakotetaan ”hiljaisiksi” hyökkäilemällä, ne näyttävät kompensoivan haittaa tuottamalla enemmän tiettyjä naarasta houkuttelevia hiilivetyjä (Thomas & Simmons 2009a). Jos sosiaaliselta asemaltaan alhainen kenttäsirkkakoiras kohtaa naaraan, se lisää houkuttelevuuttaan hajun avulla tuottamalla viittä ”suosituinta” hiilivetyä käyttäen vaihtoehtoista, hiljaista taktiikkaa naaraiden etsimiseen ja paritteluun. Tälle teorialle saatiin tukea Baileyn (et al. 2008) tutkimuksessa, jossa yli puolet merikenttäsirkojen (*T. oceanicus*) naaraita paritteli koiraiden kanssa siitä huolimatta, ettei yksikään koiras tuottanut naarasta houkuttelevaa siritystä.

Pitkän ja lyhyen kantaman sirityksen tuottamisen on havaittu olevan aineenvaihdunnallisesti kallista kenttäsirkoille (Prestwich & Walker 1981 Thomas et al. 2011 mukaan). Erityisesti lyhyen kantaman sirityksen tuottaminen on raskasta. Myös feromonien tuottaminen voi olla aineenvaihdunnallisesti kallista. Kenttäsirkoilla hiilivetyjen ja feromonien tuottamisen kalleutta ei ole tutkittu suoraan, mutta banaani-kärpäsen (*Drosophila melanogaster*) ja ruskakan (*Blattella germanica*) tutkimuksissa on havaittu kutikulaaristen hiilivetyjen tuottamisen vähentävän munien määrää. Seksikkäästi sirittävien koiraiden ei toisaalta tarvitse tuottaa niin paljon naarasta houkuttelevaa hajua, koska näitä yksilöitä suositaan muutenkin naaraiden keskuudessa (Leonard & Hedrick 2010).

Parinvalinta kenttäsirkoilla ei ole satunnaista vaan naaraat suosivat tiettyjä koiraita: naaraat valitsevat parittelukumppaninsa pitkän ja lyhyen kantaman sirityksen sekä koiraan tuottamien feromonien perusteella (mm. Hedrick 1986, Wagner & Reiser 2000, Rantala & Kortet 2003a, Kortet & Hedrick 2005). Luonnossa *G. integer* -lajin kenttäsirkkakoiraat kutsuvat naaraita sirittämällä maaperän rakojen suojusta, mutta piiloutuvat heti nähdessään mahdollisen saalistajan (Kortet & Hedrick 2007). Lyhyen kantaman sirityksessä on paljon vaihtelua koiraiden keskuudessa ja naaraat näyttävät suosivan enemmän tiheämpää sirityssykliä.

Sirittämistä pidetään yleisesti merkittävimpänä sirkkojen seksuaalivalintaan vaikuttavana tekijänä (Rebar et al. 2011). Seksuaalivalinnan suunta voi tosin nopeasti muuttua. Esimerkiksi Havaijilla sijaitsevan Kawain saaren merikenttäsirkkapopulaatio muuttui 20 sukupolven aikana lähes äänettömäksi, kun saarelle levisi fonotaktisesti eli äänen perusteella suunnistava tappava loiskärpänen (*Ormia ochracea*) (Zuk et al. 2006). Nopeassa evoluutiossa syntyi tynkäsiipisenä (flatwing) sirkkana tunnettu mutaatio, jonka johdosta tynkäsiipiset koiraat eivät enää kyenneet sirittämään mutta ne olivat turvassa loiskärpäseltä (Thomas et al. 2011). Voimakas suuntaava valinta ajoi sirkkapopulaation lähes äänettömäksi ja tynkäsiipiset koiraat ottivat vallan.

Sirittäviä koiraita suositaan yhä naaraiden keskuudessa selvästi enemmän tynkäsiipisiin verrattuna Kawain saaren sirkkapopulaatiossa, mikäli sirittäviä koiraita on paikalla (Bailey et al. 2008). Lyhyen kantaman sirityksen tuottaminen ei kuitenkaan näyttäisi olevan ratkaiseva tekijä parittelukäyttäytymisessä. Koska loiset voivat suunnistaa myös akustisten signaalien perusteella, sirityksen tuottaminen voi olla evolutiivisesti kallista (katso Kotiaho 2001). Kenttäsirkkosten on havaittu vähentävän sirityksen määrää sinä aikana vuorokaudesta, jolloin loiset ovat aktiivisimmillaan (Bailey et al. 2008). Sirkkojen käyttäytyminen voi olla hyvin mukautuvaa ja tilannesidonnaista.

5 TAVOITTEET JA HYPOTEEESIT

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää naaraan preferenssiä neitsyiden ja paritelleiden *G. integer* -lajin kenttäsirkkakoiraiden feromoneihin. Teorian mukaan parittelu laukaisee naarassirkassa hormonimuutoksen, jonka pitäisi näkyä feromonituotannossa vähentäen houkuttelevien hajuaineiden tuotantoa (Thomas 2011). Tämä voi vähentää koiraan kiinnostusta naarasta kohtaan. Tässä tutkimuksessa selvitettiin voisiko sama mekanismi päteä myös koiraspuolisiin sirkkoihin, eli suosiiko naaras neitsyiden vai jo paritelleiden koiraiden feromoneja. Nollahypoteesiksi muodostui ”koiraan parittelu ei vaikuta naaraan preferenssiin” ja vaihtoehdohypoteesiksi ”koiraan parittelu vaikuttaa naaraan preferenssiin”.

Samalla selvitettiin esiintyykö *G. integer* -lajin kenttäsirkkanaarailla parinvalinnan kopiointia. Naaras voi säästää resurssejaan, kuten aikaa ja voimia, valitsemalla sellaisia koiraita jotka on jo testattu (Jennions & Petrie 1997).

Naarassirkkojen tulisi teoriassa suosia neitsytkoiraita useista eri syistä. Toisaalta, jo paritelleiden yksilöiden suosiminen tuo tiettyjä etuja neitsytkoiraisiin verrattuna (taulukko 1). Neitsyyden on todettu olevan ikää luotettavampi valintaperuste ainakin koiraan tekemässä valinnassa (Judge et al. 2010). Periaatteessa naaraan kannattaa suosia neitsytkoiraita, koska esimerkiksi mahdollisia sukupuoliteitse leviäviä tauteja ei voi olla (Luong et al. 2000). Joidenkin lajien neitsytkoirailta voi olla myös enemmän resursseja tarjottavanaan (Sakaluk & Ivy 1999). Paritellut koiras on toisaalta läpäissyt naaraan valintaseulan ainakin kerran eli se on jo testattu ja kelpuutettu jatkamaan sukuaan (Jennions & Petrie 1997).

Taulukko 1. Taulukkoon on kerätty syitä minkä vuoksi eri eläinyksilöiden tulisi suosia neitsyitä tai vastaavasti jo paritelleita yksilöitä parittelussa. Plussat (+) ja miinukset (-).

<u>Neitsytkoiraat</u>	<u>Paritelleet koiraat</u>
+ ei mahdollisia sukupuolitauteja (Luong et al. 2000; Knell & Webberley 2004)	+ vanhemmat koiraat ovat osoittaneet elinkykynsä (Kokko 1998)
+ enemmän lisääntymiskykyisiä siittiöitä (Vahed 1998)	+ selviytyminen vanhaksi voi olla luotettava signaali laadusta (Proulx et al. 2002)
+ siittiökotelon suurempi ravintoarvo naaraalle (Vahed 1998)	+ naaraan valinnan mahdollinen kopiointi (Jennions & Petrie 1997)
+ jos parittelu on kallista, enemmän resursseja jäljellä (Sakaluk & Ivy 1999; Wedell & Ritchie 2004)	+ kokemusta omaavia koiraita suositaan, jos koiras ottaa osaa jälkeläisten hoitoon (Fletcher et al. 2009)
+ parempi immuniteetti (Leman et al. 2009)	- enemmän mahdollisia sukupuolitauteja (Luong et al. 2000; Knell & Webberley 2004)
+ neitsyys ikää luotettavampi valintaperuste (Judge et al. 2010)	- heikompi immuniteetti (Leman et al. 2009)
- koiraan laatu epävarma, ei testattu (Kokko 1998)	- jos parittelu on kallista, vähemmän resursseja jäljellä (Wedell & Ritchie 2004)

6 AINEISTO JA MENETELMÄT

Käyttäytymiskoe eli naaraan valintakoe muistutti asetelmaltaan Kortetin ja Hedrickin (2005) koetta, jossa tutkittiin sirkkakoiraan hajun yhteyttä dominanssiin. Feromonien keräämiseen käytettiin menetelmää, joka muistutti Rantalan et al. kokeita (2002, 2003b). Parittelun vaikutusta tutkittiin parittaisissa testeissä, joissa neitsytkoiraan ja ex-neitsytkoiraan feromonien houkuttelevuutta verrattiin sekä toisiinsa että paritelleisiin koiraisiin. Molemmilta ryhmiltä kerättiin feromonipapereihin oma feromoninäyte, joka annettiin naaraan valittavaksi kokeessa, jossa mitattiin naaraan viettämää aikaa tietyn feromonipaperin päällä. Jotta tuloksesta saataisiin luotettavampi, huomioon otettiin vain aika, jolloin naaras oli aktiivisena kokeessa.

6.1 Tutkimuseläimet

Kokeessa käytetyt sirkat olivat 12.-13. laboratoriosukupolvea Yhdysvaltain länsiosasta Kalifornian Davisista kerätyistä villeistä sirkoista. Sirkkoja säilytettiin Itä-Suomen yliopiston Biologian laitoksen eläintallien sirkkahuoneessa 12/12h valoisa-pimeä – syklissä ja noin 27 asteen lämpötilassa. Koska ruokavalion tiedetään hyönteisillä vaikuttavan yksilön tuottamien feromonien laatuun ja määrään, kaikki yksilöt saivat samanlaista ravintoa *ad libitum* (Rantala et al. 2003b). Eläinten ravintona käytettiin kahdenlaisia pellettejä: Poron Herkkua (Rehurasio) ja Emokala Vital – rehua (Rehurasio). Sirkat erotettiin jo varhaisessa toukkavaiheessa muovisesta syntymälaatikostaan (pituus x leveys x korkeus x: 175 x 175 x 100 mm) toisistaan ja siirrettiin yksilöllisiin muovisiin numeroituihin pakasterasioihin (100 x 85 x 100 mm), joissa niiden saatavilla oli edelleen ruokaa ja vettä *ad libitum*. Siirto tapahtui 24.–26.6.2011 välisenä aikana. Neitsyyden varmistamiseksi ja kokemusten kontrolloimiseksi yksilöt olivat fyysisesti, mutta eivät akustisesti erotettuina toisistaan.

Kokeeseen osallistui vain jo kertaalleen paritelleita naaraita, koska saatavilla ei ollut riittävästi neitsytnaaraita. Toisaalta neitsytnaaraiden on havaittu olevan halukkaampia parittelemaan kuin jo paritelleiden yksilöiden, joten eri paritteluhistorian omaavien naaraiden käyttö olisi voinut vaikuttaa kokeen tulokseen (Ivy et al. 2005). Naarassirkkojen aikuistuminen (viimeinen kuorenvaihto) oli tapahtunut 27.9.2011–18.10.2011 ja koiraiden 7.10.2011–28.11.2011 välisenä aikana (ikä naaras n=50, keskiarvo 67 vrk, ikä koiras n=50, keskiarvo 57 vrk). Ennen varsinaista feromonien keräystä koiraat jaettiin kokonsa ja ikänsä puolesta mahdollisimman samanlaisiin pareihin.

Hajun voimakkuuden, koiraan dominanssin ja yksilökoon on osoitettu olevan toisistaan

riippuvaisia (Kortet & Hedrick 2005). Siksi koirasparit (n=25, yhteensä 50 koirasta) järjestettiin pareihin painonsa perusteella 0,05 gramman tarkkuudella (keskiarvo 0,533 grammaa). Naaraat erosivat koirasta painon suhteen hyvin vähän (keskiarvo 0,530 grammaa).

Neitsytkoiraat olivat keskimäärin nuorempia (53 vrk) kuin paritelleet (59 vrk). Kahdessa tapauksessa koiraiden ikäero neitsyen ja paritelleen välillä oli varsin suuri (39 ja 41 vrk). Sirkkojen ikäero johtui sirkkopopulaation luontaisesta vaihtelusta sekä kasvatuspopulaation korkeasta iästä. Ensimmäiset sirkat olivat kuoriutuneet jo kesällä, joten oli käytettävä niitä sirkkoja, jotka olivat vielä elossa. Yhteensä sirkkoja oli kokeessa 100 yksilöä, 50 naarasta ja 50 koirasta. Koiraiden määrä väheni kokeiden aikana kuolleisuuden vuoksi kahdeksalla yksilöllä. Koiraita oli alkujaan mukana 58 yksilöä, joten kuolleisuusprosentti oli 8,6 %. Naaraita ei kuollut yhtään kokeiden aikana.

6.2 Kemiallisten signaalien keräys

Jokaisessa parissa toinen koirasta oli neitsytkoiras ja toinen jo yhden naaraan kanssa paritelut koiras. Koiraat oli paritettu 15.–17.11.2011 eli noin kuukausi ennen feromonien keräämistä. Feromonien keräämistä varten jokainen sirkkakoira siirrettiin vuorokauden (24h) ajaksi pienen kannellisen petrimaljan (Ø 58 mm) sisään suodatinpaperista leikatun pyöreän paperin päälle (Ø 54 mm) (kuva 1). Suodatinpaperina käytettiin valkoisia suodatinpusseja (Pirkka 1x4) ja leikatut pyöreät paperit suljettiin heti leikkaamisen jälkeen ilmatiiviiseen minigrip-pussiin, jota säilytettiin toisen minigrip-pussin sisällä. Koiraita käsiteltiin muovihanskoilla ja suodatinpapereita siirrettiin pelkästään pinseteillä mahdollisten ulkopuolisten hajujen minimoimiseksi. Keräämisen jälkeen sirkat päästettiin takaisin omiin purkkeihinsa ja petrimaljat papereineen siirrettiin välittömästi viereiseen koehuoneeseen, jossa aloitettiin naaraan valintakoe.



Kuva 1. Feromonien ja hiilivetyjen keräys. Sirkat viettivät suodatinpaperin päällä 24 h. Kuvaaja Aleksi Olli.

6.3 Naaraan valintakoe

Valintakokeeseen valittiin sattumanvaraisesti naaraita, jotka olivat paritelleet kerran aiemmin, ja jotka eivät entuudestaan tunteneet valintakokeen koiraita. Aiempi altistuminen tietyn koiraan hajulle olisi voinut vaikuttaa tuloksiin, koska naarassirkkojen on osoitettu suosivan parittelussaan tuntemattomia yksilöitä ja koiraiden oletetaan toimivan samoin (Bateman & Fleming 2005). Sirkkojen on osoitettu myös muistavan aiemmin kohtaamiaan kemikaaleja ja hajuja, joten kokeen onnistumisen kannalta oli tärkeää valita entuudestaan toisilleen tuntemattomat yksilöt (mm. Matsumoto & Mizunami 2000, Kortet & Hedrick 2004).

Naaraan valintakokeessa naaras siirrettiin filmipurkilla (\varnothing 30 mm, K47 mm) omasta kasvatusastiastaan läpinäkyvään muovilaatikkoon (175 x 175 x 112 mm), joka toimi kokeessa tarkkailtavana areenana. Muovilaatikkoon oli aiemmin siirretty pinsettejä ja muovihanskoja apuna käyttäen kahden koiraan (neitsyt ja paritellut) feromonipaperit. Kontrollipaperia ei käytetty, koska edeltävissä töissä on kattavasti osoitettu sirkkojen viettävän jopa kymmenen kertaa enemmän aikaa koiraan hajuja sisältävän kuin koiraan hajuja sisältämättömien papereiden päällä (katso esim. Kortet & Hedrick 2005). Paperit sijoitettiin yhtä kauas laatikon reunoista sekä toisistaan ja niin, että naaraalla oli mahdollisuus kiertää ne halutessaan. Muovilaatikko eli areena, jossa naarasta tarkkailtiin, pidettiin kokeessa styroksisen pakastelaukun sisällä

ulkopuolisten äänten minimoimiseksi ja jokaisen yksittäisen valintakokeen aikana pakaste-
laukun päälle laitettiin läpinäkyvä muovipleksi, jottei tutkijan uloshengityksen hiilidioksidi
vaikuttaisi kokeen tuloksiin (kuva 2).



Kuva 2. Kokeessa käytetyt välineet [pinsetit, muoviset karamellirasiat (areenat), filmipurkki ja styroksilaatikko] sekä areenan ylle asetettava läpinäkyvä muovipleksi, joka eliminoi häiriöitä. Kuvaaja Aleks Olli.

Useimmat hyönteislajit näkevät valon pitkiä aallonpituuksia eli punaista valoa huonosti tai eivät ollenkaan (Briscoe & Chittka 2001). Koska sirkat ovat aktiivisimmillaan yöllä, huone pyrittiin pitämään mahdollisimman pimeänä. Kokeen seuraamiseen tarvittiin kuitenkin valoa, joten valaistuksessa käytettiin punaista lamppua ulkopuolisten häiriöiden minimoimiseksi. Punaisen lampun tuottama valo mitattiin Spektra1- spektrometrillä (<http://www.forschool.eu/colormixing-and-spectra/spectrometer/>) (liite 1). Valon aallonpituus kokeessa vaihteli kuudensadan ja kahdeksansadan nanometrin välillä.

Jokainen sirkkanaaras sai rauhoittua areenalla filmipurkin alla kahden minuutin ajan ennen varsinaista 10 minuutin koetta. Kokeessa mitattiin kahta eri käyttäytymismuuttujaa; aktiiviteettiä (= kuinka suuren osan koeajasta naaras liikkui aktiivisesti) ja feromonipapereiden tutkimisaikaa (= suodatinpapereiden päällä vietetty aika). Aikaa mitattiin käyttäytymisen analysoimiseen tarkoitetulla AV Bio-Statistics ohjelmalla (versio 4.9) (<http://personal.inet.fi/koti/ansvain/ohjelmat/Biostat.exe>).

Jokaisen valintakokeen jälkeen naaras palautettiin omaan rasiaansa ja koeareenana toiminut muovilaatikko pyyhittiin märällä paperilla hajujen ja mahdollisten muiden eritteiden pois-

tamiseksi. Kokeessa käytettiin kahta muovilaatikkoa vuorotellen.

6.4 Naaraan käyttäytyminen kokeessa

Osa naaraista pysyi täysin paikoillaan pitkänkin ajan kokeen alussa, joten luotettavuuden parantamiseksi vain aktiivinen aika otettiin huomioon käyttäytymisen määrittämisessä (kuva 3). Naaraan katsottiin aktivoituneen, kun ensimmäisen kerran havaittiin naaraan liikuttavan joko ruumistaan tai tuntosarviaan. Aktiviteettiä ei enää pysäytetty tämän jälkeen esimerkiksi naaraan jäädessä paikoilleen. Naaraat olivat hyvin usein aktiivisia läpi kokeen ja vain muutama yksilö pysähtyi pitkäksi ajaksi paikoilleen kokeen kuluessa.



Kuva 3. Naaraan valintakokeet 1 ja 2. Naaras asetettiin areenalle styroksilaa-
tikon sisään läpinäkyvän filmipurkin avulla ja sen annettiin rauhoittua kah-
den minuutin ajan ennen varsinaista koetta. Jokainen koe kesti 10+2 minuut-
tia, ja jokaisessa kokeessa oli yhden koirasparin (n=25, neitsyt ja paritellut tai
ex-neitsyt ja paritellut koiras) feromonipaperit. Kuvaaja Aleks Olli.

Kokeessa mitattiin aikaa, jolloin naaras tutki jompaakumpaa areenalla olevaa koiraan fe-
romonipaperia. Aikaa laskettiin aina naaraan koskettaessa feromonipaperia tuntosarvillaan,
eturajoillaan tai kun vähintään naaraan etupää oli paperin päällä. Jos naaraan takapää oli
paperin päällä ja etupää ulkona, toisin sanoen naaras ei aktiivisesti tutkinut paperia, aikaa ei
laskettu. Kaikkien kunkin paperin päälle teytyjen vierailujen kesto laskettiin yhteen ja näin

saatiin kokonaisuena. Feromonipaperit peittivät areenasta noin 15 % ja naaraan oli mahdollista kiertää areenaa koskematta papereita. Kaikki valintakokeet tehtiin alle 10 tunnin kuluttua feromonikokeen päättymisen jälkeen.

Naarassirkkojen käyttäytyminen kokeessa vaihteli. Osa pysyi paikoillaan liikkumatta useita minuutteja, toiset lähtivät heti liikkeelle. Paikallaan pysyminen on osa sirkkojen käyttäytymistä vaaran, esimerkiksi pedon uhatessa. Liikkuminen aloitettiin useimmiten tuntosarvia heilutteleamalla. Vain yhdessä kokeessa naaras ei käynyt kummankaan feromonipaperin päällä koeajan kuluessa.

6.5 Neitsytkoiraiden paritus

Naaraan valintakokeen jälkeen neitsytkoiraat paritettiin seuraavana päivänä kertaalleen, jotta voitaisiin tutkia naaraan preferenssiä. Täten neitsytkoiraista tuli ex-neitsyitä. Koiraat paritettiin satunnaisesti valitun ei-neitsyen naaraan kanssa ja parituksen aikana pareja tarkkailtiin. Parittelu laskettiin onnistuneeksi, kun koiras sai kiinnitettyä spermatoforinsa naaraan munanjohtimeen. Näin tapahtui 16:a tapauksessa 25:ä, eli 64 % neitsytkoiraista onnistui kiinnittämään spermatoforin tarkkailun aikana. Lopuissa tapauksissa parittelu oli luultavasti tapahtunut, mutta spermatoforia ei löydetty kiinnitettynä. Tämä voi johtua kolmesta syystä. Voi olla, että neitsytkoiras ei jostain syystä ole saanut kiinnitettyä sitä. Täten ei voitu sulkea pois sitä, että parittelu olisi joissain tapauksissa epäonnistunut. Spermatofori on myös voinut irrota parittelun aikana tai naaras on voinut syödä sen.

6.6 Feromonien uudelleenkeräys ja toinen naaraan valintakoe

Feromonit kerättiin samalla tavalla kuin aiemmin. Parituksen ja feromonien uudelleenkeräyksen jälkeen suoritettiin toinen naaraan valintakoe täysin uusilla naarailla niin, että naaraan valittavana oli aina yhden koirasparin (ex-neitsyen ja paritelleen) feromonipaperit (kuva 3). Sirkat eivät olleet edelleenkään entuudestaan toisilleen tuttuja. Areena ja välineet olivat samat. Kaikki valintakokeet tehtiin samassa järjestyksessä kuin edellisessä kokeessa ja alle 10 tunnin kuluessa feromonikeräyksen päättymisestä. Naaraiden käyttäytyminen ei eronnut merkittävästi edellisestä kokeesta.

6.7 Tilastolliset analyysit

Parittelun vaikutusta naaraan preferenssiin mitattiin parittaisella t-testillä (paired-samples T test). Parittaisessa t-testissä lasketaan kullekin havainnolle kahden mittauksen välinen erotus ja testillä tutkitaan poikkeako erotuksen keskiarvo nolasta (Muhli & Kanninen 2000). Riippumattomien otosten testeissä vertailtavien ryhmien oletetaan olevan toisistaan riippumattomia, jolloin otosten välillä ei saisi olla mitään yhteyttä.

Molempien testien oletusten mukaisesti erotusmuuttujan tulee noudattaa normaalijakaumaa. Jos normaalijakaumaoletus ei jonkin muuttujan kohdalla täyttynyt, kyseinen muuttujan jakauma korjattiin logaritimuunnoksella (esim. Kekäläinen et al. 2010).

Ei-parametrisiä testejä käytettiin silloin, kun vaatimukset parametrisille testeille eivät täytyneet. Parametrittomat testit eivät ole muuttujien normaalijakautuneisuutta (Muhli & Kanninen 2000). Esimerkiksi Wilcoxonin testiä voidaan käyttää verrannollisten parien t-testin asemasta, mikäli normaalijakaumaoletus ei ole voimassa.

Kaikki merkitsevyyttä kuvaavat p-arvot ovat kaksisuuntaisten testien tuloksista (2-tailed). Tulokset analysoitiin SPSS Statistics – ohjelmalla (versio 19.0). Kaikki tulosten kuvat piirrettiin GraphPad Prism for Mac OS X – ohjelmalla (versio 5.0).

7 TULOKSET

7.1 Naaraan valintakoe

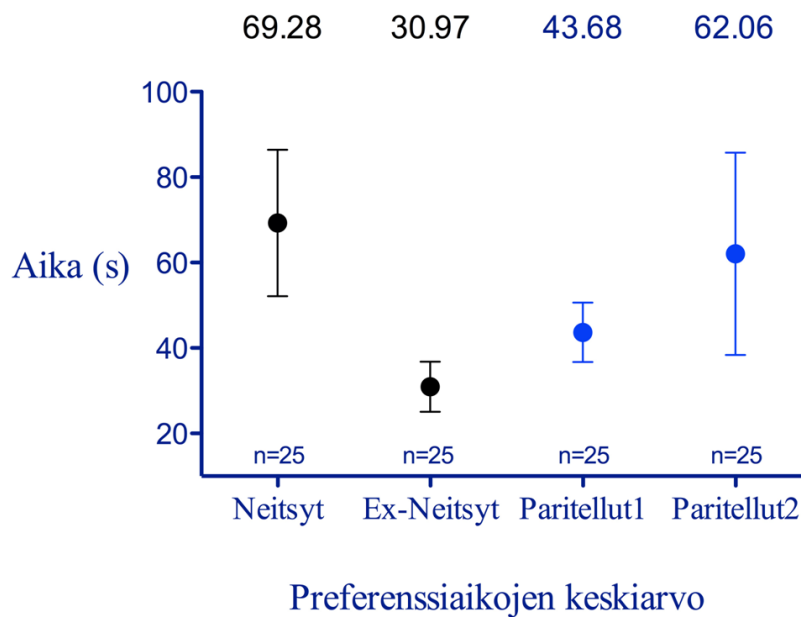
Kokeiden välillä naaras vietti keskimäärin 12.9 % aktiviteettiajastaan (ja 11.5 % koeajasta) feromonipaperin päällä, kun koiras oli neitsyt (koe 1), mutta vain 5.8 % aktiviteettiajastaan (5.2 % koeajasta), kun koiras oli ex-neitsyt (koe 2) (kuva 4, liite 2). Ero oli tilastollisesti merkitsevä (parittainen t-testi, $t_{24}=2.740$, $p=0.011$). Neitsytkoiraat paritettiin kokeiden välillä 16.12.2011.

Naaraan preferenssi aiemmin paritelleen koiraan (15.–17.11.2011) suhteen ei muuttunut kokeiden 1 ja 2 välillä (parittainen t-testi, $t_{24}=0.360$, $p=0.722$). Naaras vietti aktiviteettiajastaan paritelleen koiraan paperin päällä 8.1 % (7.3 % koeajasta) (koe 1) ja 11.7 % (10.3 % koeajasta) (koe 2) (kuva 4, liite 2).

Kokeiden sisällä naaraan preferenssiaikojen erot neitsyen ja paritelleen koiraan (koe 1, Neitsyt ja Paritellut1, kuva 4) sekä ex-neitsyen ja paritelleen koiraan välillä (koe 2, Ex-Neitsyt ja Paritellut2, kuva 4) eivät olleet tilastollisesti merkitseviä (parittainen t-testi, 1. koe:

$t_{24}=1.417$, $p=0.169$, 2. koe: $t_{24}=-0.446$, $p=0.660$).

Yhdessä tapauksessa naaras ei viettänyt aikaa kummarkaan koiraan paperin päällä (2 %, $n=50$) ja neljässä tapauksessa naaras vietti aikaa vain toisen koiraan paperin päällä (8 %, $n=50$). Feromonipaperit täyttivät areenan alasta yhteensä vain 15 %, joten naaras pystyi hyvin liikkumaan areenalla koskettamatta papereita. Yleensä naaras löysi feromonipaperit nopeasti. Useita kertoja naaras tosin vaelsi laatikon pohjalla reunoja pitkin hyvinkin pitkään, mutta jossain vaiheessa naaraan kääntyessä ei-reunanmyötäisesti, se törmäsi paperiin ja alkoi tutkia sitä.



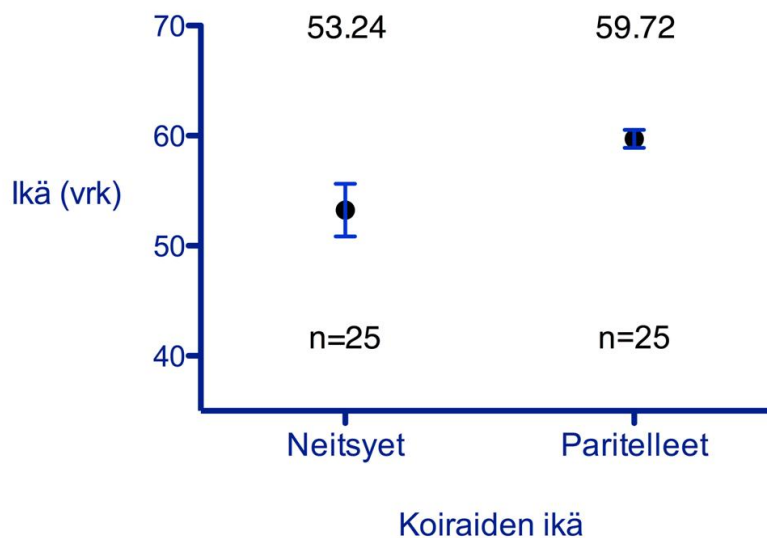
Kuva 4. Aika, jonka naaras vietti feromonipapereiden päällä keskimäärin. Neitsyt (keskiarvon keskivirhe SE 17.16 sekuntia), Ex-Neitsyt (SE 5.86 sekuntia), Paritellut1 (SE 6.94 sekuntia) ja Paritellut2 (SE 23.71 sekuntia). Valitsijana toimi aina eri naaras ($n=50$) yhden koirasparin (25 paria, $n=50$) kohdalla. Jokainen yksittäinen koe kesti 2+10 minuuttia.

7.2 Ikä- ja kokoerot

Neitsytkoiraat olivat keskimäärin nuorempia kuin paritelleet koiraat (Wilcoxonin testi: $n=25$, $Z=-2.886$, $p=0.004$) (kuva 5, liite 3). Neitsytkoiraiden paino sen sijaan ei eronnut tilastollisesti paritelleiden koiraiden painosta (parittainen t-testi, $t_{24}=1.527$, $p=0.140$, neitsyet: keskiarvo 0.537 grammaa, keskihajonta 0.074 grammaa, paritelleet: keskiarvo 0.530 grammaa, keskihajonta 0.076 grammaa) (liite 2).

Naaraiden paino ei eronnut kokeiden välillä (parittainen t-testi, $t_{24}=0.430$, $p=0.671$, 1. koe:

keskiarvo 0.537 grammaa, keskihajonta 0.088 grammaa, 2. koe: keskiarvo 0.525 grammaa, keskihajonta 0.089 grammaa) (liite 2). Naaraan keskimääräinen aktiviteettiäika ei eronnut kokeiden välillä (Wilcoxonin testi: $n=25$, $Z=-0.471$, $p=0.638$, 1. koe: keskiarvo 534.59 sekuntia, keskihajonta 91.36 sekuntia, 2. koe: keskiarvo 530.13 sekuntia, keskihajonta 117.59 sekuntia) (liite 3). Naaraiden ikäkään ei eronnut kokeiden välillä (parittainen t-testi, $t_{24}=1.411$, $p=0.171$, 1. koe: keskiarvo 68.96 vuorokautta, keskihajonta 5.55 vuorokautta, 2. koe: keskiarvo 66 vuorokautta, keskihajonta 8.69 vuorokautta) (liite 3).



Kuva 5. Koiraiden iän keskiarvot (53.24 vuorokautta ja 59.72 vuorokautta, keskiarvojen keskivirheet 2.395 vuorokautta ja 0.818 vuorokautta). Molemmissa ryhmissä koiraita oli 25 yksilöä.

8 TULOSTEN TARKASTELU

8.1 Naaraan valintakoe

Naaraiden on osoitettu suosivan eri koirasyksilöiden hajuja ainakin jauhopukeilla ja kenttäsirkoilla (Kortet & Hedrick, Nielsen & Holman 2012). Toisen koiraan haju on naaraiden mielestä houkuttelevampi kuin toisen koiraan, joten koiraiden profiilit sekä niiden houkuttelevuus eroavat toisistaan.

Naaraat suosivat tutkimukseni mukaan selvästi neitsytkoiraan paperia verrattuna sekä ex-neitsyeen että paritelleeseen koiraaseen. Naaraiden keskimääräinen aktiviteetti pysyi kokeiden välillä lähes samana, ja eri kokeissa käytetyt naaraat olivat keskimäärin samanikäisiä ja –

kokoisia (ks. Kpl 7.2). Siten vaikka eri kokeissa käytettiin eri naaraita, on todennäköistä, että naaraiden vaihtuminen kokeiden välillä ei vääristä kokeessa havaittuja tuloksia.

Yleensä naarat olivat hyvin aktiivisia. Aktiviteetissa naaraiden välillä oli suuri hajonta ja neljässä tapauksessa viidestäkymmenestä naaras pysyi kokeen alkaessa paikoillaan liikkumatta yli puolet koeajasta eli yli viisi minuuttia. Naaras jätti huomiotta toisen koiraan tai molempien koiraiden feromonipaperit keskimäärin joka kymmenennessä parissa. Näissä pareissa koiraiden haju ei ehkä ole ollut tarpeeksi houkutteleva naaraan mielestä. Pidemmällä tarkastelujaksolla, esimerkiksi 15 minuuttia, naaras olisi todennäköisesti ”löytännyt” feromonipaperit. Nyt valittu 10 minuutin seuranta oli sama mitä on käytetty aiemmissa töissä (esim. Kortet & Hedrick 2005).

Paritelleiden koiraiden aikojen välinen ero testien välillä (kuva 4) selittyy pitkälti sillä, että yhden koirasparin tapauksessa (pari numero 20, koe 2) naaras vietti lähes koko aktiviteettiaikansa (yli 545 sekuntia) paritelleen koiraan feromonipaperin päällä liikkumatta. Keskimääräinen naaraan viettämä aika kokeessa paritelleen koiraan paperin päällä oli 62 sekuntia. On mahdollista, että kyseinen naaras valitsi paikkansa toisessa kokeessa täysin sattumalta ja ehkä kuuli tai havaitsi jotain häiriötä ympäristössä, joka aiheutti pitkäaikaisen jähmettymisen paikoilleen (freezing). Tämä on sirkkojen luonnollinen reaktio mahdollisen vaaran uhatessa (Hedrick & Kortet 2012). Jos poistetaan molemmista kokeista yksi suuri äärihavainto molemmilta ryhmiltä (Paritellut1 ja Paritellut2), naaraan preferenssissä aikojen välinen keskimääräinen ero on lähes olematon (keskiarvot: Paritellut1 40.25 ja Paritellut2 41.92 sekuntia). Aikojen eron tilastolliseen merkitsevyyteen äärihavaintojen poisto ei vaikuta (merkitsevyys 0.591). Myös neitsytkoiraiden tapauksessa suurimman havainnon poistaminen molemmilta ryhmiltä pudottaa keskimääräistä aikojen eroa reilut 11 sekuntia (keskiarvot: Neitsyt 55.09 ja Ex-Neitsyt 27.75 sekuntia). Tästä huolimatta neitsytkoiraan ja ex-neitsytkoiraan aikojen ero (alunperin keskimäärin ero yli 38 sekuntia) pysyy suurena ollen keskimäärin noin 27 sekuntia. Myös tilastollinen merkitsevyys säilyy lähes ennallaan (merkitsevyys 0.018). Tämä parantaa mielestäni kokeen luotettavuutta, koska äärihavaintojen poisto aiheuttaa vain aikojen keskiarvojen tasoittumista eikä juuri vaikuta tuloksen merkitsevyyteen.

Seksuaalivalinta näyttölee suurta roolia koiraspuolisten sirkkojen kutikulaaristen hiilivetyjen evoluutiossa (Thomas & Simmons 2009a). Naaraiden valinta on johtanut tiettyjen hiilivetyjen suosimiseen eli toiset hiilivedyt ovat naaraiden mielestä houkuttelevampia kuin toiset. Sosiaaliset kokemukset voivat vaikuttaa naaraan parinvalintaan ja täten muuttaa seksuaalivalinnan suuntaa tai voimakkuutta (Rebar et al. 2011). Aiempi altistuminen tietyn tyyppisille signaaleille (hajut, akustiset) ja yksilön elämänhistoria, kuten parittelujen lukumäärä, voivat

vaikuttaa parinvalintaan. Merikenttäsirkan (*T. oceanicus*) naaraat ovat valikoivampia koiraiden suhteen, jos ne ovat aiemmin tavanneet viehättäviä koiraita ja vastaavasti vähemmän valikoivampia, jos ne ovat aiemmin tavanneet vain epämiellyttäviä yksilöitä. Tässä tutkimuksessa kaikki naaraat oli paritettu jo aiemmin, joten jos naaras oli paritettu naaraan mielestä viehättävän koiraan kanssa, se saattoi vaikuttaa tulokseen naaraan hylkiessä epämiellyttävän koiraan feromonipaperia.

Tämän tutkimuksen valossa *G. integer* -lajin kenttäsirkkanaarailla ei ehkä esiinny parinvalinnan kopiointia. Tämä tukee aiempaa havaintoa toiselta sirkkalajilta, jossa osoitettiin neitsytkoiraiden parittelumenestyksen laskevan ensimmäisen parittelun jälkeen verrattuna yhä neitsyihin koiraisiin (Sakaluk & Ivy 1999). Tuloksia ei voi kuitenkaan suoraan verrata, koska salviapensassirkan (*Cyphoderris strepitans*) naaraat pureskelevat parittelun aikana koiraan takasiipiä ravinnokseen. Tästä johtuen paritelleet koiraat eivät kykene esittämään samanlaista sirtystä kuin neitsytkoiraat, eikä niillä ole myöskään tarjottavanaan samanlaista aineellista resurssia eli ravintoa naaraalle. Parittelu on tämän lajin koiraille erityisen raskasta, koska parittelussa vahingoittuneen koiraan immuunipuolustus joutuu vammojen vuoksi koetukselle (Leman et al. 2009). Lajin neitsytkoirailta on siis suuri etu suhteessa jo paritelleisiin ja takasiipensä vahingoittaneisiin koiraisiin. Myös *G. integer* -lajilla naaraiden tiedetään vahingoittavan koiraita (Kortet & Hedrick 2005). Vaikka *G. integer* -lajin kenttäsirkkokojen parittelukäyttäytyminen eroaa hieman *C. strepitans* -lajista, myös *G. integer* -lajin kenttäsirkkanaaraat näyttäisivät suosivan neitsytkoiraita ainakin niiden tuottamien hajujen perusteella.

Merikenttäsirkan (*T. oceanicus*) koiras tarvitsee vähintään 70 minuutin palautumisjakson toipuakseen pelkästä parittelusta ennen kuin se kykenee ottamaan vastaan ärsykeitä (Simmons 2003). Ennen parittelua koiraan on lisäksi siritettävä ja tuotettava naaraan mielestä houkuttelevia feromoneja. Spermatoforin tuottaminen ja parittelu ovat sirkkakoiraalle raskasta työtä; neitsytkoiras voi menettää jopa kymmenesosan (yleensä 1-10 %) painostaan parittelussa riippuen lajista (Sakaluk & Ivy 1999). Naaraan paritteluhalukkuutta lisäävän sirtysten tuottaminen ja spermatoforin valmistaminen vaativat paljon voimia (Bateman & Fleming 2005). Sirtysten panostamisen on havaittu korreloivan lyhyemmän eliniän kanssa, joten parittelu ja sen aiheuttamat kustannukset ovat todellisia, etenkin kun naaraat voivat myös vahingoittaa koiraita parittelun aikana. Neitsytkoiraat eivät ehkä ole kyenneet palautumaan parittelusta tarpeeksi nopeasti eivätkä pystyneet tuottamaan naaraan mielestä tarpeeksi houkuttelevia feromoneja vielä seuraavan vuorokauden aikana. Mahdollisesti tästä johtuen naaras osoitti hiukan suurempaa mielenkiintoa aiemmin paritelleen koiraan feromonipaperia kohtaan kuin juuri paritelleen koiraan paperia kohtaan (kuva 4, Paritellut2 ja Ex-neitsyt).

Neitsyet ja paritelleet eläinyksilöt eroavat kemialliselta profiililtaan toisistaan ja se välittyy vastakkaiselle sukupuolelle (Thomas 2011). Eläinyksilöiden välisessä parittelussa feromoneja siirtyy toiseen yksilöön fyysisen kontaktin välityksellä sekä esimerkiksi siemennesteen tai siittiökotelon mukana. Moniavioisuuden hyöty yksilölle on periaatteessa sitä suurempi, mitä enemmän hyvälaatuisia parittelukumppaneita sillä on (esim. Simmons 2003, Bleu et al. 2012). Tropiikissa elävän kotisirkan (*G. sigillatus*) naaraat esimerkiksi merkkäavat koiraan omalla hajullaan parittelun aikana (Ivy et al. 2005). Näin ne kykenevät välttämään parittelua samojen koiraiden kanssa myöhemmin. Myös muut naaraat voivat käyttää toisten yksilöiden jättämiä hajujälkiä hyväkseen. Kokeiden välissä paritetun neitsytkoiraan feromonipaperissa (Ex-neitsyt) saattoi olla tuoreen naaraan hajua ja siksi on myös mahdollista, että em. ero aiemmin ja myöhemmin paritelleen koiraan välillä (Ex-neitsyt ja Paritellut2) selittyy naaraan jättämällä hajusignaaleilla. Feromonit ovat haihtuvia yhdisteitä, joten pidempi aika kokeiden välillä olisi voinut vaikuttaa tulokseen.

Thomasin ja Simmonsin (2009a) tutkimuksessa kerran paritelleen ja viisi kertaa paritelleen merikenttäsirkkakoiraan hiilivetyjen esiintymisessä ei ollut eroa. Toisin sanoen parittelujen määrä ei vaikuttanut hiilivetyjen suhteelliseen osuuteen kokonaishajusta. Parittelun onnistumiseksi katsottiin spermatoforin kiinnittäminen naaraaseen. Koiraat, joilla oli enemmän onnistuneita paritteluja takanaan, sirittivät vähemmän lyhyen kantaman sirtystä naaraan houkuttelemiseksi. Tästä huolimatta naaraat pitivät juuri näiden useasti paritelleiden koiraiden spermatoforeja keskimäärin kauemmin kiinni munanjohtimissaan, kuin sellaisten, jotka eivät aiemmin olleet onnistuneet parittelemaan. Sirkat siis muuttivat käyttäytymistään sen mukaan, kuinka usein koiras oli paritellut.

Vaikka kenttäsirkit ovat moniavioisia, naaraat saavat yleensä riittävästi siittiöitä hedelmöitykseen jo ensimmäiseltä koiraalta (Judge et al. 2010). Naarasyksilöiden parittelukäyttäytyminen eroaa todennäköisesti enemmän neitsyiden ja kerran paritelleiden välillä, kuin kerran ja useasti paritelleiden välillä. Sama voi päteä koirasyksilöihin, koska neitsyyden voi menettää vain kerran.

Kenttäsirkkokojen parinvalinta huomioiden on mahdollista, että alistuneemmat koiraat tuottavat enemmän naarasta houkuttelevia hajuja, koska nämä eivät pysty sirtyksellä kilpailemaan dominoivien koiraiden kanssa (Thomas & Simmons 2009b). Naaraat suosivat aina sirtävää koirasta ei-sirtävän sijasta (Thomas et al. 2011). Koska Kortet ja Hedrick (2005) osoittivat naaraiden tunnistavan taisteluissa dominoivien koiraiden hajun ja suosivan tätä, olisi ollut mielenkiintoista testata miten dominanssiasema korreloi feromonien houkuttelevuuden kanssa tässä kokeessa.

8.2 Ikä- ja kokoerot

Naaraiden väliset ikä- ja kokoerot olivat pieniä ja tilastollisesti ei-merkitseviä. Naaraan vaihtuminen kokeiden välillä ei siis oletettavasti vaikuttanut kokeen lopputulokseen; naaraat olivat kiinnostuneempia neitsytkoiraan tuottamista feromoneista ja muista hajuista. Tältä osin vaihtoehtoinen hypoteesini saa tukea, eli parittelu vaikuttaa sirkkakoiraan feromonien houkuttelevuuteen.

Mustilla kenttäsirkoilla (*T. commodus*) tehdyssä kokeessa havaittiin suurempien koiraiden voittavan enemmän koiraiden välisiä taisteluita, mutta naaraiden ei osoitettu suosivan isompia ja painavampia koiraita (Shackleton et al. 2005). Koko tuo etua koiraiden välisissä taisteluissa suurimmalla osalla lajeista. Yksi suora etu suuremman koiraan suosimiseen parinvalinnassa on sen tuoma fyysinen suoja naaraalle ennen ja jälkeen parittelun. Isokokoiset koiraat pystyvät myös todennäköisemmin ylläpitämään suurempaa ja resursseiltaan arvokkaampaa reviiriä, koska suuremmat yksilöt useimmiten päihittävät kilpailijansa. Toisaalta, jos suuremmat koiraat ovat todennäköisemmin myös dominoivia, koko tuo mukanaan kelpoisuutta vähentäviä ominaisuuksia. Näitä ovat esimerkiksi naaraan vahingoittaminen parittelun aikana ja suurempi alttius tautien levittämiseen (dominoivat koiraat parittelevat eniten). Koiraiden koon suhde feromonituotantoon on osoitettu aiemmin (Kortet & Hedrick 2005). Isommat yksilöt myös painavat enemmän. Koiraat erosivat painonsa puolesta alle 0.05 grammaa ja vaikka tilastollisesti ero oli ei-merkitsevä, suosittelen vieläkin pienempää koiraiden painoeroa jatkotutkimuksissa, koska suurempi ulkokuoren pinta-ala antaa mahdollisuuden tuottaa enemmän erilaisia hajuaaineita. Painon mahdollinen vaikutus tuloksiin saadaan tällöin minimoitua.

Koiraiden iän keskiarvojen ero oli pieni, mutta silti tilastollisesti merkitsevä neitsytkoiraiden ollessa keskimäärin hieman nuorempia kuin paritelleet koiraat. Neitsytkoiraiden iässä oli paljon suurempi hajonta kuin paritelleiden koiraiden, koska neitsyissä oli mukana kaksi vasta 16 päivää ennen koetta aikuistunutta sirkkaa. Siten neitsyyden ohella ikä, eli tässä tapauksessa nuoruus, on voinut vaikuttaa neitsytkoiraiden feromonipapereiden suosimiseen naaraiden keskuudessa. Yleisesti kuitenkin arvellaan, että noin 14 päivää aikuistumisesta olisi riittävä aika tasaamaan nuoruudesta johtuvia eroja (Raine Kortet, suull. tied. 19.3.2012).

Kenttäsirkojen sukulaislajilla hepokatilla koiraat osaavat erottaa vanhemmat ja nuoremmat naaraat toisistaan paritellen ensisijaisesti nuorempien yksilöiden kanssa (Thomas 2011). Ikä ja parittelun todennäköisyys korreloivat todennäköisesti suurimmalla osalla lajeista eli vanhemmat yksilöt ovat todennäköisemmin jo paritelleita. Toisaalta, jo paritelleet koiraat eivät välttämättä enää panosta yhtä paljon naaraiden houkutteluun neitsyihin verrattuna, koska

ovat jo paritelleet. Pennsylvanialaisilla kenttäsiirkkanaarailla (*Gryllus pennsylvanicus*) naaraan paritteluhistoria voi olla tärkeämpi parinvalintaan vaikuttava tekijä kuin ikä; paritelleet naaraat olivat paljon valikoivampia kuin neitsytnaaraat iästä riippumatta (Judge et al. 2010). Iän merkitys parinvalinnassa voi täten olla vähäisempi kuin se, millainen paritteluhistoria yksilöllä on. Tässä kokeessa mukana olleet naaraat oli paritettu aiemmin vain yhdelle koiraalle.

Ikä tuo mukanaan monia kelpoisuutta vähentäviä tekijöitä, mutta voi myös toimia yksilön eduksi parinvalinnassa (Proulx et al. 2002). Ikä vaikuttaa todennäköisesti myös koiraiden feromonituotantoon, joten on mahdollista, että nuoremmat sirkat tuottavat enemmän naarasta houkuttelevia feromoneja. Vanhemmat yksilöt ovat toisaalta keskimäärin useammin jo paritelleita sekä kokeneempia. Yksilöiden ikä voi olla muille luotettava signaali kelpoisuudesta, koska pelkästään vanhaksi selviytyminen merkitsee hyvää sopeutuvuutta ympäristöön (Kokko 1998). Vanhemmat yksilöt ovat lisääntymisen kannalta usein heikommassa asemassa kuin nuoremmat, mutta ikä yksinään ei selitä kaikkea. Pensassirkka (*Ephippiger ephippiger*) voi tuottaa vanhempana pienemmän spermatoforin kuin nuorempana, mutta vain jos sirkka on paritellut aiemmin (Wedell & Ritchie 2004). Vanhat neitsyet pensassirkat näyttivät panostavan yhtä paljon spermatoforiin kuin nuoremmat neitsytsirkat.

Kokeessa käytetyt kenttäsiirkat olivat iältään suhteellisen vanhoja. Kun yksilön elinkaari lähenee loppuaan, on järkevää panostaa lisääntymiseen vielä se, mitä jäljellä on. Lähellä kuolemaa olevien yksilöiden on havaittu investoivan enemmän hajun puoleensavetävyyteen erityisesti silloin, jos yksilöiden immuunipuolustusta koetellaan (Nielsen & Holman 2012). Tässä kokeessa ei koeteltu immuunipuolustusta, mutta paritelleet yksilöt olivat keskimäärin vanhempia ja siis todennäköisemmin lähellä kuolemaa, joten periaatteessa tämän teorian mukaan niiden olisi pitänyt tuottaa enemmän naarasta houkuttelevaa hajua. Tässä tutkimuksessa tälle hypoteesille ei kuitenkaan löytynyt tukea.

Isällistä hoivaa arvostavilla eläimillä, kuten luukaloilla ja linnuilla, naaraat suosivat kokeineita yksilöitä kokemattomiin verrattuna (Fletcher et al. 2009). Sukasjalkaisilla tehdyssä kokeessa osoitettiin naaraiden suosivan sellaisia koiraita, jotka olivat kokeneita riippumatta koiraiden dominanssista. Kemialliset signaalit toimivat informaation välittäjinä yksilöiden välillä. Paljon energiaa kuluttavaan taisteluun ei välttämättä ole tarvetta, jos toinen osapuoli voi viestiä kemiallisesti alhaisemmasta asemastaan dominoivalle yksilölle. Samalla naaras voi saada luotettavan signaalin koiraan laadusta. Kemiallinen viestintä, eli esimerkiksi hajuaineilla viestiminen, on laajalle levinnyttä muun muassa sukasjalkaisilla lajeilla. Kenttäsiirkkojen ei tiedetä harjoittavan isällistä hoivaa eikä parittelun tuomalle kokemukselle löydetty tässä tut-

kimuksessa tukea.

8.3 Kasvatusolosuhteiden ja muiden tekijöiden vaikutus tuloksiin

Tässä kokeessa ei tutkittu erikseen akustisia ja kemiallisia signaaleja, mutta kasvatusolosuhteet ja muutamat muut tekijät ovat voineet vaikuttaa tulokseen. Sirkat olivat koehuoneessa fyysisesti, mutta eivät akustisesti erotettuina toisistaan. Kenttäsiirakat vaihtelevat feromonien tuottotasoaan riippuen siitä, minkälaisessa ympäristössä ne kasvavat (Thomas et al. 2011). Lisäksi jos kenttäsiirakanaaras on kasvatusaikana kuullut houkuttelevaa koiraan sirtystä, on mahdollista, että se on paljon vaateliaampi ja haluttomampi vastaamaan seuraavan kuulemansa koiraan sirtykseen. Tämä voi selittää sitä miksi osa neitsytkoiraista ei onnistunut parittelemaan valitun naaraan kanssa.

Monilla sirkkalajeilla spermatoforin kiinnittämiseen käytetty aika on paras koiraan kelpoisuuden mittari naaraan suorittamassa parittelun jälkeisessä valinnassa (Hall et al. 2008). Parittelu katsotaan sirkoilla onnistuneeksi useimmiten vasta, kun koiras on onnistuneesti kiinnittänyt spermatoforinsa naaraan munanjohtimeen (Thomas & Simmons 2009a) (ks. Kpl 6.5). Tällöin siittiöillä on mahdollisuus siirtyä naaraaseen. Mitä kauemmin spermatofori on kiinnittyneenä, sitä enemmän siittiöitä siirtyy. Spermatoforin irrottaminen on osa naaraan parittelun jälkeistä valintaa, joka voi johtaa naarasta kaikkein viehättävimpien koiraiden siittiöiden suosimiseen.

Spermatoforilla on myös suuri ravintoarvo naaraalle, joten naaras saattaa hyvin käyttää koiraan tuotoksen ravinnokseen, koska luonnossa tarjolla on usein yltäkylläinen määrä siittiöitä hedelmöitykseen (Vahed 1998). Aiemmassa kokeessa kenttäsiirakkojen spermatoforin kiinnittäminen on saatu onnistumaan noin 70 % todennäköisyydellä (Bailey et al. 2008). Kenttäsiirakoillakaan kaikki eivät ole kelpoisia jatkamaan sukuaan. Neitsytkoiraiden parituksessa joissain tapauksissa koiras ei saanut houkutelua naarasta paritteluun, jolloin naaras vaihdettiin. Tällä pyrittiin varmistamaan se, että tässä kokeessa koiraista saataisiin mahdollisimman todennäköisesti ex-neitsyitä.

Feromonipapereihin jäi koiraiden jätöksiä sen vuorokauden aikana, jolloin feromonit kerättiin. Näitä ei naaraan valintakokeen aikana poistettu. On mahdollista, että enemmän jätöksiä jättäneen koiraan paperissa oli voimakkaampi haju. Tämä on voinut vaikuttaa tulokseen. Kaikki koiraat saivat toisaalta samaa ravintoa kasvatusastioissaan, joten kyse on luonnollisista yksilöllisistä eroista, aivan kuten yksilöiden feromonituotannoissakin.

Kokeen luotettavuus on mielestäni hyvä, koska feromonipapereita käsiteltiin muovihans-

koin ja niitä siirreltiin pinseteillä kaikissa kokeissa. Feromonien ja muiden mahdollisten koiraan tuottamien hajujen keräyksen aikana, sekä sen jälkeen, suodatinpaperit olivat koko ajan kannellisten petrimaljojen alla. Lisäksi ennen kokeita leikattuja suodatinpapereita säilytettiin ilmatiiviissä muovipussissa. Tästä johtuen papereihin ei todennäköisesti ole voinut tarttua kokeen ulkopuolisia hajujälkiä. Kaikki sirkkojen käsittelyt ja kokeet (esim. kaikki siirrot, feromonien keräykset ja käyttäytymiskokeet, tarkkailut ja analyysit) teki yksi henkilö.

Kokeen tuloksia voidaan vain tietyin varauksin soveltaa *G. integer* -lajin käyttäytymiseen luonnossa. Tämä johtuu pitkälti siitä, että koe-eläiminä käytetyt sirkat olivat syntyneet koehuoneessa ja elivät koko elämänsä koehuoneessa. Lisäksi ne olivat jo 12. ja 13. koe-eläinsukupolvea luonnosta kerätyistä villeistä sirkoista, joten niiden voidaan olettaa olevan pitkälle laitostuneita. Täten niiden käyttäytyminen voi olla erilaista kuin luonnossa elävien kenttäsirkkosten. Tämä ei kuitenkaan vähennä kokeen arvoa, eikä tutkimuksen tuloksia pidä väheksyä, vaan todentaa tai hylätä tulokset jatkotutkimuksilla. Kenttäsirkkosta on tutkittu jo vuosikymmenien ajan, joten teorioiden tueksi on saatavissa paljon tutkimustietoa ja vieläpä useilta eri kenttäsirkkalajeilta.

9 YHTEENVETO

Tässä tutkimuksessa selvitettiin naaraan preferenssiä neitsyen ja paritelleen koiraan feromoneihin kenttäsirkoilla. Tutkimuksessa selvisi, että paritelleet naaraat suosivat neitsytkoiraan feromonipaperia ex-neitsyen ja paritelleen koiraan paperin sijaan. Koiraan paritteluajankohdalla, toisin sanoen sillä onko parittelu tapahtunut vasta äskettäin vai aiemmin, ei ollut merkitystä.

Merikenttäsirkillä (*T. oceanicus*) koirat kykenevät erottamaan neitsyet ja paritelleet naaraat toisistaan kemiallisten jälkien perusteella (Thomas 2011). On mahdollista, että myös naaras erottaa neitsyet ja paritelleet koirat toisistaan esimerkiksi koiraan tuottamien feromonien perusteella. Naaraan preferenssiä neitsyen ja paritelleen koiraan feromoneihin ei ennen tätä työtä ole tutkittu. Aihetta on kuitenkin sivuttu muutamissa tutkimuksissa (Sakaluk & Ivy 1999; Thomas & Simmons 2009a). Näistä jälkimmäisessä kohteena oli eri kenttäsirkkalaji kuin tässä kokeessa eikä kyseisessä tutkimuksessa päätarkoituksena ollut tutkia naaraan preferenssiä neitsyen ja paritelleen koiraan feromoneja kohtaan. Sakalukin ja Ivyn (1999) kokeessa tarkasteltiin neitsytkoiraiden mahdollista etulyöntiasemaa paritelleisiin koiraisiin nähden. Siinä tarkasteltavana oli sirka, joka on kaukaista sukua *G. integer* -lajin kenttäsirkoille, ja jonka parittelukäyttäytyminen eroaa *G. integer* -lajin kenttäsirkkosten vastaavasta. Siksi

suora vertailu lajien välillä ei ole mahdollista.

Tämä tutkimus kenttäsirkoilla on ensimmäinen, jossa osoitettiin *G. integer* -lajin kenttäsirkkanaaraan suosivan neitsytkoiraan feromoneja verrattuna jo paritelleen koiraan feromoneihin. Lisää tutkimuksia aiheesta silti tarvitaan, koska kemiallisten signaalien houkuttelevuus on vain yksi epäsuora indikaattori neitsytkoiraan suosimisesta. Lisäksi feromonipreferenssit eivät välttämättä korreloi suoraan yksilöiden lisääntymismenestyksen kanssa. Kenttäsirkkosten parinvalinta sisältää paljon monimutkaista ja hankalasti ymmärrettävää käyttäytymistä, ja feromonien tuottaminen (sekä niillä houkuttelevuus) on vain osa kenttäsirkkosten parittelukäyttäytymistä.

Yksilöiden tuottamien kemiallisten signaalien tutkimus on kuitenkin aina jäänyt muiden kommunikaatiotapojen, kuten visuaalisten tai auditoristen signaalien, tutkimuksen varjoon. Tässä kokeessa ei ollut mukana useasti paritelleita koirasyksilöitä, joten johtopäätöksiä useasti paritelleiden kenttäsirkkosten mahdollisista preferenssieroista muihin yksilöihin ei voitu tehdä. Siksi suosittelenkin yksinkertaista jatkotutkimusta, jossa voitaisiin tutkia erikseen esimerkiksi neitsydet ja paritelleet kenttäsirkkanaaraat ja verrata näiden yksilöiden preferenssiä neitsyiden, kerran paritelleiden ja vaikka kolme tai viisi kertaa paritelleiden koirassirkkosten feromoneihin. Lisätutkimuksilla voitaisiin myös selvittää esimerkiksi sitä, kumpi vaikuttaa naaraan parinvalintaan enemmän: koiraan paritteluhistoria vai koiraan dominanssi?

KIITOKSET

Suurin kiitos kuuluu ohjaajilleni Raine Kortetille (ISY) ja Jukka Kekäläiselle (ISY) kiitettävästä ohjauksesta ja avunannosta. Kiitos Ville Nivalaiselle, joka lainasi spektrometriä ja opasti sen käytössä.

Kiitos biologian opiskelijoille Pirita Latjalle ja Ilkka Sirkalle, jotka avustivat sirkkosten hoidossa. Kiitos Pipsa Ollille, Risto Eroselle ja Jackie Zieglerille kommentoinnista, oikoluvusta sekä kielen korjaamisesta. Kiitos Tiina Kangasjärvelle tuesta.

LÄHDELUETTELO

- Alexander, R. 1961: Aggressiveness, Territoriality, and Sexual Behavior in Field Crickets (Orthoptera: *Gryllidae*). – Behavior 17: 130-223.
- Bailey, N., McNabb, J. & Zuk, M. 2008: Preexisting behavior facilitated the loss of a sexual signal in the field cricket *Teleogryllus oceanicus*. – Behavioral Ecology 19: 202-207.
- Bateman, P. & Fleming, P. 2005: Males are selective too: mating, but not courtship, with sequential female influences choosiness in male field crickets (*Gryllus bimaculatus*). – Behavioral Ecology and Sociobiology 59: 577-581.
- Bleu, J., Bessa-Gomes, C. & Laloï, D. 2012: Evolution of female choosiness and mating frequency: effects of mating cost, density and sex ratio. – Animal Behaviour 83: 131-136.
- Briscoe, A. & Chittka, L. 2001: The Evolution of Color Vision in Insects. – Annual Review of Entomology 46: 471-510.
- Dugatkin, L. 1992: Sexual Selection and Imitation: Females Copy the Mate Choice of Others. – The American Naturalist 6: 1384-1389.
- Dugatkin, L. 1998: Genes, copying, and female mate choice: shifting thresholds. – Behavioral Ecology 4: 323-327.
- Fletcher, N., Storey, E., Johnson, M., Reish, D. & Hardege, J. 2009: Experience matters: Females Use Smell to Select Experienced Males for Paternal Care. – Public Library of Science 11: 1-8.
- Folstad, I. & Karter, A. 1992: Parasites, bright males and the immunocompetence handicap. – The American Naturalist 3: 603-622.
- Hall, M., Bussière, L., Hunt, J. & Brooks, R. 2008: Experimental evidence that sexual conflict influences the opportunity, form and intensity of sexual selection. – Evolution 62: 2305-2315.
- Hedrick, A. 1986: Female preference for male calling bout duration in a field cricket. – Behavioral Ecology and Sociobiology 19: 73-77.
- Hedrick, A. & Kortet, R. 2012: Sex differences in the repeatability of boldness over metamorphosis. – Behavioral Ecology and Sociobiology 66: 407-412.
- Houck, L. 2009: Pheromone communication in amphibians and reptiles. – Annual Reviews of Physiology 71: 161-176.
- Hofmann, H. & Schildberger, K. 2001: Assessment of strength and willingness to fight during aggressive encounters in crickets. – Animal Behavior 62: 337-348.
- Howard, R. & Blomquist, G. 2005: Ecological, Behavioral, and Biochemical Aspects of Insect Hydrocarbons. – Annual Reviews of Entomology 50: 371-393.
- Ivy, T., Weddle, C. & Sakaluk, S. 2005: Females use self-referent cues to avoid mating with previous mates. – Proceedings of the Royal Society B 272: 2475-2478.
- Jennions, M. & Petrie, M. 1997: Variation in mate choice and mating preferences: a review of causes and consequences. – Biological Reviews 72: 283-327.
- Judge, K., Tran, K. & Gwynne, D. 2010: The relative effects of mating status and age on the mating behaviour of female field crickets. – Canadian Journal of Zoology 88: 219-223.
- Karslon, P. & Lüscher, M. 1959: Pheromones, a new term for a class of biologically active substances. – Nature 183: 55-56.
- Kaupp, B. 2010: Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. – Nature Reviews 11: 188-200.
- Kekäläinen, J., Valkama, H., Huuskonen, H. & Taskinen, J. 2010: Multiple Sexual Ornamentation Signals Male Quality and Predicts Female Preference in Minnows. – Ethology 116: 895-903.
- Knell, R. & Webberley, K. 2004: Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behaviour. – Biological Reviews 79: 557-581.

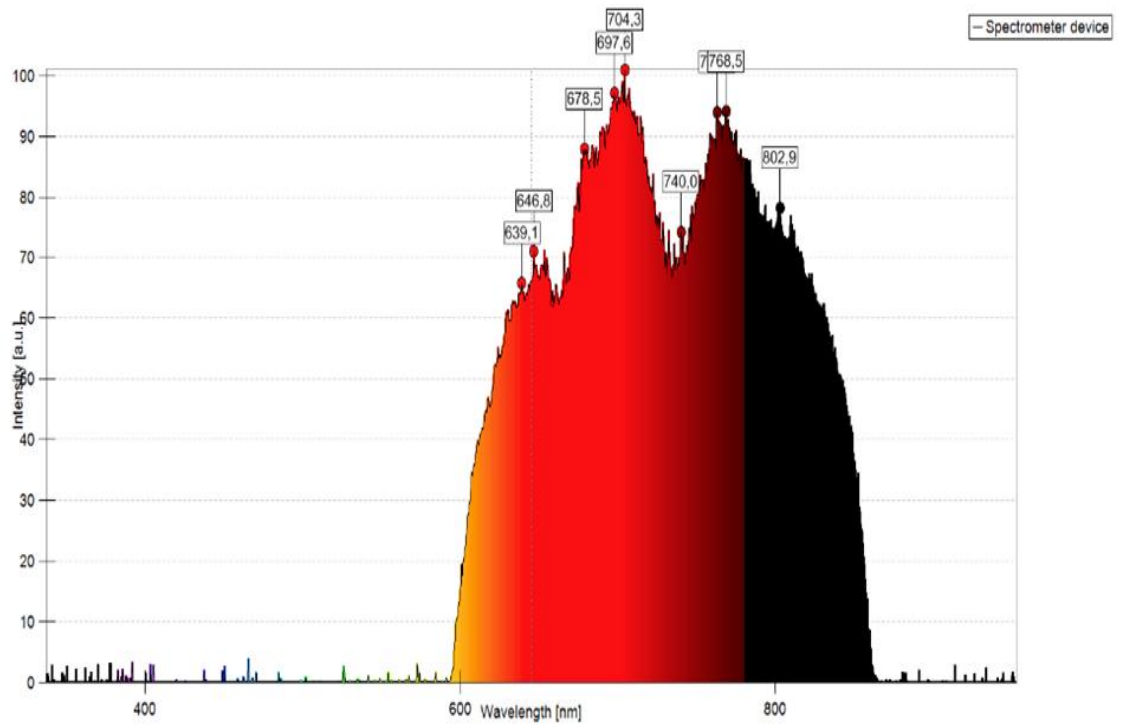
- Kokko, H. 1998: Good genes, old age and life-history trade-offs. – *Evolutionary Ecology* 12: 739-750.
- Kotiaho, J. 2001: Costs of sexual traits: a mismatch between theoretical considerations and empirical evidence. – *Biological Reviews* 76: 365-376.
- Kortet, R. & Hedrick, A. 2004: Detection of the spider predator, *Holoena nedra* by naïve juvenile field crickets (*Gryllus integer*). – *Behaviour* 141: 1189-1196.
- Kortet, R. & Hedrick, A. 2005: The scent of dominance: female field crickets use odour to predict the outcome of male competition. – *Behavioral Ecology and Sociobiology* 59: 77-83.
- Kortet, R. & Hedrick, A. 2007: A behavioural syndrome in the field cricket *Gryllus integer*: intrasexual aggression is correlated with activity in a novel environment. – *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 475-482.
- Leman, J., Weddle, S., Gershman, A., Kerr, M., Ower, G., St John, J., Vogel, L. & Sakaluk, K. 2009: Lovesick: immunological costs of mating to male sagebrush crickets. – *Journal of Evolutionary Biology* 22: 163-171.
- Leonard, A. & Hedrick, A. 2010: Long-distance signals influence assessment of close range mating displays in the field cricket, *Gryllus integer*. – *Biological Journal of the Linnean Society* 100: 856-865.
- Luong, L., Platzer, E., Zuk, M. & Giblin-Davis, R. 2000: Venereal worms: sexually transmitted nematodes in the decorated cricket. – *The Journal of Parasitology* 3: 471-477.
- Martin, L., Hawley, D. & Ardia, D. 2011: An introduction to ecological immunology. – *Functional Ecology* 25: 1-4.
- Matsumoto, Y. & Mizunami, M. 2000: Olfactory learning in the cricket *Gryllus bimaculatus*. – *The Journal of Experimental Biology* 203: 2581-2588.
- Mautz, B. & Sakaluk, S. 2008: Heritable variation in the timing of spermatophore removal, a mechanism of post-copulatory female choice in crickets. – *Journal of Evolutionary Biology* 21: 1366-1370.
- Moore, A., Gowaty, P. & Moore, P. 2003: Females avoid manipulative males and live longer. – *Journal of Evolutionary Biology* 16: 523-530.
- Muehlenbein, M. & Watts, D. 2010: The costs of dominance: testosterone, cortisol and intestinal parasites in wild male chimpanzees. – *BioPsychoSocial Medicine* 21: 1-12.
- Muhli, A. & Kannianen, A. 2000: SPSS 10.0 for Windows Perusteet. – 102 s. ATK-keskus, Oulun yliopisto, Oulu.
- Nielsen, M. & Holman, L. 2012: Terminal investment in multiple sexual signals: immune-challenged males produce more attractive pheromones. – *Functional Ecology* 26: 20-28.
- Prestwich, K. & Walker, T. 1981: Energetics of singing in crickets: effect of temperature in three trilling species (Orthoptera: *Gryllidae*). – *Journal of Comparative Physiology B* 143: 199-212.
- Proulx, S., Day, T. & Rowe, L. 2002: Older males signal more reliably. – *Proceedings of the Royal Society B* 269: 2291-2299.
- Rantala, M., Jokinen, I., Kortet, R., Vainikka, A. & Suhonen, J. 2002: Do pheromones reveal male immunocompetence? – *Proceedings of the Royal Society B* 269: 1681-1685.
- Rantala, M. & Kortet, R. 2003a: Courtship song and immune function in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. – *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 503-510.
- Rantala, M. & Kortet, R. 2003b: Male dominance and immunocompetence in a field cricket. – *Behavioral Ecology* 2: 187-191.
- Rantala, M., Vainikka, A. & Kortet, R. 2003a: The role of juvenile hormone in immune function and pheromone production trade-offs: a test of the immunocompetence handicap principle. – *Proceedings of the Royal Society B* 270: 2257-2261.
- Rantala, M., Jokinen, I., Kortet, R., Vainikka, A. & Suhonen, J. 2003b: Condition dependence

- of pheromones and immune function in the grain beetle *Tenebrio molitor*. – *Functional Ecology* 17: 534-540.
- Rebar, D., Zuk, M. & Bailey, N. 2011: Mating experience in field crickets modifies pre- and postcopulatory female choice in parallel. – *Behavioral Ecology* 22: 303-309.
- Sakaluk, S. & Ivy, T. 1999: Virgin-male mating advantage in sagebrush crickets: differential male competitiveness or non-independent female mate choice? – *Behaviour* 136: 1335-1346.
- Shackleton, M., Jennions, M. & Hunt, J. 2005: Fighting success and attractiveness as predictors of male mating success in the black field cricket, *Teleogryllus commodus*: the effectiveness of no-choice tests. – *Behavioral Ecology and Sociobiology* 58: 1-8.
- Simmons, L. 2003: The evolution of polyandry: patterns of genotypic variation in female mating frequency, male fertilization success and a test of the sexy-sperm hypothesis. – *Journal of Evolutionary Biology* 16: 624-634.
- Skorping, A. & Jensen, K. 2004: Disease dynamics: all caused by males? – *Trends in Ecology and Evolution* 5: 219-220.
- Thomas, M. 2011: Detection of female mating status using chemical signals and cues. – *Biological Reviews* 86: 1-13.
- Thomas, M. & Simmons, L. 2008: Sexual dimorphism in cuticular hydrocarbons of the Australian field cricket *Teleogryllus oceanicus*. – *Journal of Evolutionary Biology* 54: 1081-1089.
- Thomas, M. & Simmons, L. 2009a: Sexual selection on cuticular hydrocarbons in the Australian field cricket, *Teleogryllus oceanicus*. – *BioMed Central Evolutionary Biology* 162: 1-12.
- Thomas, M. & Simmons, L. 2009b: Male dominance influences pheromone expression, ejaculate quality, and fertilization success in the Australian field cricket, *Teleogryllus oceanicus*. – *Behavioral Ecology* 20: 1118-1124.
- Thomas, M. & Simmons, L. 2010: Cuticular hydrocarbons influence female attractiveness to males in the Australian field cricket, *Teleogryllus oceanicus*. – *Journal of Evolutionary Biology* 23: 707-714.
- Thomas, M. & Simmons, L. 2011: Short-term phenotypic plasticity in long-chain cuticular hydrocarbons. – *Proceedings of the Royal Society B*: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/278/1721/3123.full.pdf+html?sid=1967860a-2a32-4a9a-b48b-1f67067ec00a>. 16.01.2012.
- Thomas, M., Gray, B. & Simmons, L. 2011: Male crickets alter the relative expression of cuticular hydrocarbons when exposed to different acoustic environments. – *Animal Behaviour* 82: 49-53.
- Touhara, K. 2008: Sexual communication via peptide and protein pheromones. – *Current Opinion in Pharmacology* 8: 759-764.
- Tregenza, T. & Wedell, N. 1997: Definitive evidence for cuticular pheromones in a cricket. – *Animal Behaviour* 54: 979-984.
- Trivers, R. 1972: Parental Investment and Sexual Selection. – Teoksessa: Campbell, B. (toim.), *Sexual Selection And The Descent Of Man*: 136-179. Aldine Publishing Company. Chicago.
- Vahed, K. 1998: The function of nuptial feeding in insects: a review of empirical studies. – *Biological Reviews* 73: 43-78.
- Väänänen, S., Kortet, R. & Rantala, M. 2006: Dominance and immune function in the F1 generation of wild caught field crickets. – *Behaviour* 6: 701-212.
- Wagner, J. & Reiser, M. 2000: The importance of calling song and courtship song in female mate choice in the variable field cricket. – *Animal Behaviour* 59: 1219-1226.
- Wedell, N. & Tregenza, T. 1999: Successful fathers sire successful sons. – *Evolution* 53: 620-625.

- Wedell, N. & Ritchie, M. 2004: Male age, mating status and nuptial gift quality in a bush cricket. – *Animal Behaviour* 67: 1059-1065.
- Zahavi, A. 1975: Mate Selection - A Selection for a Handicap. – *Journal of Theoretical Biology* 53: 205-214.
- Zuk, M., Rotenberry, J. & Tinghitella, R. 2006: Silent night: adaptive disappearance of a sexual signal in a parasitized population of field crickets. – *Biology Letters* 2: 521-524.

LIITTEET

Liite 1. Spektra 1- spektrometrillä mitattu valon aallonpituuden kuvaaja naaraan valintako-
keessa.



Liite 2. Parittaisten t-testien tuloksia. Suluissa kokeen numero: 1= ensimmäinen koe, 2= toinen koe.

Aika filtteri-paperin luona (erot kokeiden välillä)	Keskiarvo	Keskiarvon keskivirhe	Vapausasteet	t	P-arvo (merkitsevyys)
Neitsyt (1) Ex-neitsyt (2)	3.704 2.929	0.240 0.248	24	2.740	0.011*
Paritellut (1) Paritellut (2)	3.258 3.098	0.276 0.307	24	0.360	0.722
Aika filtteri-paperin luona (erot kokeiden sisällä)	Keskiarvo	Keskiarvon keskivirhe	Vapausasteet	t	P-arvo (merkitsevyys)
Neitsyt (1) Paritellut (1)	3.704 3.258	0.240 0.276	24	1.417	0.169
Ex-neitsyt (2) Paritellut (2)	2.929 3.098	0.248 0.307	24	- 0.446	0.660
Naaraan ikä ja paino (g)	Keskiarvo	Keskiarvon keskivirhe	Vapausasteet	t	P-arvo (merkitsevyys)
Ikä (1) Ikä (2)	4.230 4.181	0.016 0.027	24	1.411	0.171
Paino (1) Paino (2)	0.537 0.525	0.018 0.018	24	0.430	0.671
Koiraan paino (g)	Keskiarvo	Keskiarvon keskivirhe	Vapausasteet	t	P-arvo (merkitsevyys)
Neitsyt Paritellut	0.537 0.530	0.015 0.015	24	1.527	0.140

Liite 3. Wilcoxonin merkitsevyydestien tuloksia.

Aktiviteetti (naaras)	n	Aika (keskiarvo, sekuntia)	Z	P-arvo (merkitsevyys)
Koe1	25	534.59	- 0.471	0.638
Koe2	25	530.13		
Ikä (koiraat)	n	Ikä (keskiarvo, vuorokautta)	Z	P-arvo (merkitsevyys)
Neitsyt	25	53.24	- 2.886	0.004*
Paritellut	25	59.68		