

Pro Gradu -tutkielma

***couch potato* -kandidaattigeenissä esiintyvän mutaation
vaikutus *Drosophila montana* -naaraiden
lisääntymislepokauteen**

Hanna Lampinen



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Evoluutiogenetiikka

28.12.2010

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Evoluutiogenetiikka

LAMPINEN, H. : *couch potato* -kandidaattigeenissä esiintyvän mutaation vaikutus *Drosophila montana* -naaraiden lisääntymislepokauteen

Pro Gradu -tutkielma 26 s.
Työn ohjaajat: FT Maaria Kankare, FM Tiina Salminen
Tarkastajat: Prof. Anneli Hoikkala, Prof. Janne Kotiaho
Joulukuu 2010

Hakusanat: *cpo*-geeni, diapaussi, *Drosophila montana*, lisääntymislepokausi, mutaatio

TIIVISTELMÄ

Diapaussi on fysiologinen lepotila, jonka aikana eliön elintoiminnot, kasvu ja kehitys hidastuvat ja ääriolosuhteiden, kuten alhaisten lämpötilojen ja kuivuuden, sietokyky paranee. Lisääntymislepokaudella tarkoitetaan aikuisilla hyönteisillä esiintyvää diapaussin muotoa, jonka aikana lisääntymiseen liittyvät toiminnot hidastuvat tai pysähtyvät kokonaan. *Drosophila melanogaster* -lajin lisääntymislepokauteen on liitetty useita kandidaattigeenejä, joista yksi on *couch potato* (*cpo*), ja tämän geenin yhteydestä lisääntymislepokauteen on saatu viitteitä myös pohjoisella *D. montana* -lajilla. Pro gradu -työssäni tarkasteltiin *cpo*-geenissä esiintyvän 19 emäsparin kokoisen deleetiomutaation yleisyyttä *D. montana* -lajin Oulangan luonnonpopulaatioissa ja esiintymistä vuonna 2003 kerätyn naaraan jälkeläisistä koostuvassa laboratoriolinjassa. Kvantitatiivisen PCR:n (polymerase chain reaction) avulla pyrittiin selvittämään, onko deleetiolla vaikutusta *cpo*-geenin ilmentymistasoon eli RNA:n tuottoon. Lisäksi tutkittiin ko. deleetion vaikutusta *D. montana* -naaraiden lisääntymislepokauteen kasvattamalla deleetio- ja ei-deleetio-naaraita kasvatuskaapeissa valojaksoissa, joissa ne normaalisti siirtyvät lisääntymislepokauteen (L:D 16:8) tai kehittyvät sukukypsiksi (L:D 22:2). Vuonna 2003 luonnosta kerättyjen *D. montana* -yksilöiden joukosta (n=28) löytyi kaksi yksilöä, joilla deleetio esiintyi heterotsygoottisena. Sen sijaan vuonna 2008 kerättyiltä yksilöiltä (n=75) ei löytynyt lainkaan deleetiota. Toisen vuonna 2003 kerätyn deleetion suhteen heterotsygoottisen naaraan jälkeläisistä koostuvassa laboratoriolinjassa deleetio on kuitenkin säilynyt ja on siinä hyvin yleinen. Tässä linjassa *cpo*-geenin ilmentymistaso oli deleetioyksilöillä alhaisempi kuin ei-deleetioyksilöillä sekä lisääntymislepokaudessa olevien että sukukypsien naaraiden keskuudessa. Deleetio ei kuitenkaan vaikuttanut naaraiden lisääntymislepokauteen siirtymiseen, joten alue, jolla se sijaitsee, ei välttämättä ole keskeinen *D. montana* -lajin lisääntymislepokauden määräytymisessä. On myös mahdollista, että ko. deleetioalue vaikuttaa lisääntymislepokauteen mutta deleetiosta huolimatta geenin transkriptiotuotetta syntyy riittävä määrä normaalin geenitoiminnan säilyttämiseksi eikä deleetio siten vaikuta lisääntymislepokauteen siirtymiseen.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science

Department of Biological and Environmental Science
Evolutionary Genetics

LAMPINEN, H.: Effects of the deletion mutation in *couch potato* candidate gene on female *Drosophila montana* reproductive diapause

Master of Science Thesis: 26 p.

Supervisors: PhD Maaria Kankare, MSc Tiina Salminen

Inspectors: Prof. Anneli Hoikkala, Prof. Janne Kotiaho

December 2010

Key words: *cpo*-gene, deletion, diapause, *Drosophila montana*, mutation, reproductive diapause

ABSTRACT

Diapause is a quiescence state where growth and development of an organism have been postponed. During diapause the food intake halts or decreases and the tolerance against harsh environmental conditions like low temperatures and drought improves. Reproductive diapause is a form of diapause which occurs at the adult state of insect life cycle. During reproductive diapause functions related to reproduction either slow down or stop. Several candidate genes have been connected to reproductive diapause in *Drosophila melanogaster*. One of these is *couch potato* (*cpo*) gene which have been recently linked also to reproductive diapause of a northern malt fly species *D. montana*. In this study I examined the appearance of the 19 base pair long deletion mutation in *cpo* gene in *D. montana* flies collected in years 2003 and 2008 from wild population in Oulanka, Finland. The appearance of the deletion was also examined in the laboratory population. The other study aim was to investigate with quantitative PCR (qPCR) if there are differences in the expression levels of *cpo* gene between diapausing and mature females and whether the deletion has any effects on the expression level (RNA production) of the gene. The possible effect of the deletion on female reproductive diapause was studied by maintaining female flies both with and without the deletion in light periods which normally either induce (L:D 16:8) or do not induce (22:2) diapause. Two individuals collected in year 2003 (n=28) had the deletion in the *cpo* gene while none of those collected in year 2008 (n=75) did. However, the frequency of the deletion seems to be increasing in the laboratory culture, which consists of the offspring of the other heterozygote female collected in year 2003. Individuals with deletion showed lower levels of *cpo* gene expression than individuals without deletion, both in diapausing and reproductive females. Nevertheless, deletion did not seem to have an effect on diapause incidence so its location area may not be crucial for the diapause determination in *D. montana* flies. It is also possible that this region in *cpo* gene is involved in diapause regulation but regardless of the deletion sufficient amount of gene product is formed for normal gene function.

SANASTO

Corpora allata	Hyönteisten hermostossa sijaitsevat hormonieritysrauhaset.
Deleetio	Mutaatio; yhden tai useamman nukleotidin puuttuminen DNA-sekvenssistä.
Ekdysteroidit (Ecdysteroids)	Ns. kuorenvaihtohormonit; edistävät ruskuaisproteiinin kerääntymistä munarauhasiin ja ylläpitävät ruskuaisproteiinin synteesiä.
Geenin ilmentyminen	DNA:n transkriptio RNA:ksi.
Homologia	Samansyntyinen samankaltaisuus; samankaltainen rakenne eri lajeilla.
Insertio	Mutaatio; yhden tai useamman emäsparin lisäys DNA-sekvenssiin.
Juveniilihormoni (Juvenile hormone)	Ns. nuoruushormoni; vaikuttaa kuorenvaihtohormonien eritystä lisäävästi ja munarauhasien kypsymisen varhaisvaiheessa.
Kandidaattigeeni	Geeni, joka on yhdistetty tiettyyn ominaisuuteen (esim. sijaintinsa tai koodaamansa proteiinituotteen perusteella).
Kliini	Ominaisuuden vähittäinen muutos eri alueiden välillä; kuvaa lajin sisäistä maantieteellistä erilaistumista.
L:D (light:dark)	Valo-pimeä-sykli. Esim. L:D 16:8 tarkoittaa 16 tuntia valoa ja 8 tuntia pimeää.
Munakammio	Useista solutyypeistä koostuva rakenne, joka sisältää naaraan sukuolun ja sijaitsee munarauhasissa.
Neuroendokriininen	Hermostollinen ja hormonaalinen (säätely), endokriininen= umpieritteinen.

PCR (polymerase chain reaction)

Polymeraasiketjureaktio, jonka avulla haluttu DNA-alue saadaan monistettua.

Rengasrauhanen (Ring gland)

Hyönteisten umpieritteinen elin (muodostuu kolmesta osasta, joista yksi on corpora allata).

Silmukoituminen

RNA:n muokkautuminen ennen proteiinisynteesiä (mm. ei-koodaavien alueiden poistaminen).

Sirkaadinen kello

Vuorokausirytmiiin vaikuttava (sisäinen) kello.

Vitellogeneesi

Munien kypsyminen karpästen munarauhasissa.

Sisältö

1. JOHDANTO.....	7
1.1. Diapaussi.....	7
1.2. Lisääntymislepokausi.....	7
1.3. Lisääntymislepokauden säätely.....	8
1.3.1. Ympäristötekijät.....	8
1.3.2. Lisääntymislepokauden hormonaalinen säätely.....	9
1.3.2. Lisääntymislepokauden geneettinen säätely ja <i>cpo</i> -geeni.....	9
1.4. Tutkimuslaji ja tutkimuksen tarkoitus.....	11
2. AINEISTO JA MENETELMÄT.....	11
2.1. Deletion rakenne.....	11
2.2. Deletion yleisyys.....	12
2.3. Deletion vaikutus <i>cpo</i> -geenin ilmentymistasoon ja naaraiden lisääntymis-	
lepokauteen siirtymiseen.....	13
2.3.1. Homotsygoottisten linjojen muodostaminen.....	13
2.3.2. Homotsygoottisten linjojen käsittely.....	14
2.3.3. Deletion vaikutus <i>cpo</i> -geenin ilmentymistasoon.....	15
2.3.4. Deletion vaikutus naaraiden lisääntymislepokauteen siirtymiseen.....	15
3. TULOKSET.....	15
3.1. Deletion yleisyys.....	15
3.2. Deletion vaikutus <i>cpo</i> -geenin ilmentymistasoon.....	16
3.3. Deletion vaikutus naaraiden lisääntymislepokauteen siirtymiseen.....	17
4. TULOSTEN TARKASTELU.....	18
Kiitokset.....	22
Kirjallisuus.....	23
Liitteet.....	26

1. JOHDANTO

1.1. Diapaussi

Diapaussi eli lepokausi on fysiologinen lepotila, jonka aikana eliön elintoiminnat, kasvu ja kehitys hidastuvat (Denlinger, 2002). Diapaussi-ilmaisua käytetään useissa eri yhteyksissä mutta yleensä sillä tarkoitetaan niveljalkaisten, varsinkin hyönteisten, lepotilaa. Diapaussin aikana eliön ravinnonotto joko pysähtyy tai vähentyy ja eliö sietää paremmin erilaisia ympäristön ääriolosuhteita, kuten alhaisia lämpötiloja ja kuivuutta (Allen, 2007). Vaihtolämpöiset hyönteiset ovat alttiita ympäristön lämpötilan muutoksille, ja monet pohjoisilla leveysasteilla elävät hyönteiset talvehtivat diapaussissa (Allen, 2007). Diapaussia esiintyy myös tropiikissa, missä sen avulla voidaan selviytyä esimerkiksi kuivista kausista. Joillakin lajeilla diapaussiin siirtyminen tapahtuu ravinnon vähentyessä tai populaation yksilötiheyden kasvaessa käytettävissä olevien resurssien kannalta haitallisen suureksi (Kostal, 2006).

Diapaussin ajoittuminen eliön elinkaaressa vaihtelee eri lajien välillä. Sitä tavataan lähes kaikissa hyönteisen kehitysvaiheissa, kuten muna-, toukka-, kotelo- ja aikuisvaiheessa mutta lajikohtaisesti yleensä vain yhdessä tietyssä kehitystasossa (Allen, 2007). Kuitenkin esimerkiksi sudenkorennoilla esiintyy sekä muna- että toukkavaiheen diapaussia (Askew, 1988). Mulperiperhosella (*Bombyx mori*) diapaussi ajoittuu munavaiheeseen (Denlinger, 2002) ja kotelovaiheen diapaussia esiintyy mm. lihakärpäsillä (Denlinger, 1971). Aikuisvaiheen diapaussia tavataan lukuisilla hyönteisillä, mm. useimmilla *Drosophila*-lajeilla (Lumme 1978; Saunders ym. 1989), koloradonkuoriaisella (Hare, 1990) ja tuliluteella (Kalushkov ym. 2001).

Diapaussiin liitettyjä elinkaariominaisuuksien muutoksia ovat mm. eliniän pidentyminen ja diapaussin jälkeiset muutokset lisääntymiskyvyssä (esim. Tatar & Yin, 2001; Schmidt & Paaby, 2009). Myös eliöiden käyttäytyminen (Denlinger, 2002) ja aktiivisuus diapaussin aikana voi vaihdella suuresti eri lajien välillä (Kostal, 2006). Perustoiminnot soluissa säilyvät diapaussin aikana, vaikkakin normaalia alhaisemmalla tasolla. Monet aineenvaihduntaan liittyvät tapahtumat, kuten rakennusaineenvaihdunta (anaboliset reaktiot), jotka johtavat solujen kasvuun ja lisääntymiseen (proliferaatio), ovat vähentyneet diapaussin aikana. Diapaussin alkamisvaiheeseen liittyy rasva-aineiden, proteiinien ja hiilihydraattien kertymistä elimistöön (Denlinger, 2002), jolloin erilaisten stressitekijöiden, kuten vähäisen ravinnonsaannin, sietokyky kasvaa diapaussin aikana (Schmidt ym. 2005).

Diapaussin säätelyyn liittyy erilaisia ympäristötekijöitä, hormonaalisia säätelymekanismeja ja geneettisiä tekijöitä, jotka vaikuttavat diapaussin alkamiseen ja päättymiseen sekä sen aikaisiin toimintoihin (Denlinger, 2002). Fakultatiivinen diapaussi, jota esiintyy esimerkiksi *Drosophila melanogaster* - ja *D. montana* -lajeilla, esiintyy vain tietyissä olosuhteissa ja siihen vaikuttavat erilaiset ympäristötekijät (Lumme ym. 1979; Saunders ym. 1989). Fakultatiivinen diapaussi eroaa ns. obligatorisesta eli pakollisesta diapaussista, joka esiintyy tietyssä elinkierron vaiheessa riippumatta ympäristötekijöistä (Begon ym. 2006).

1.2. Lisääntymislepokausi

Lisääntymislepokaudella tarkoitetaan aikuisilla hyönteisillä esiintyvää diapaussin muotoa, jonka aikana lisääntymiseen liittyvät toiminnot hidastuvat tai pysähtyvät kokonaan (Denlinger, 2002). Lisääntymislepokausi mahdollistaa selviytymisen epäedullisten olosuhteiden vallitessa ja siirtää lisääntymisen ajankohtaan, jolloin jälkeläisten selviytyminen on parhaimmillaan. Lisääntymislepokautta on tutkittu useilla

hyönteislajeilla, kuten monarkkiperhosilla (Herman, 1981), heinäsirkoilla (Greenfield & Pener, 1992), tuliluteella (Kalushkov ym. 2001; Kostal ym. 2008) ja hyttysillä (Robich, 2005). Lisääntymislepokausi on tärkeä talvehtimismuoto useilla pohjoisissa oloissa elävillä *Drosophila*-suvun lajeilla, kuten *D. montana* -lajilla (Lumme & Lakovaara, 1983). *Drosophila*-suvussa on myös lajeja, joilla diapaussi ajoittuu kotelovaiheeseen (*D. alpina* ja *D. subsilvestris*) sekä lajeja, joilla diapaussia ei esiinny lainkaan (*D. guanche* ja *D. sunsobscura*) (Goto ym. 1999).

Lisääntymislepokauteen liittyvät muutokset vaihtelevat eri hyönteislajien välillä. Mahdollisia muutoksia ovat mm. naaraiden munarauhasten kehittymisen ja siihen liittyvän hormonaalisen toiminnan pysähtymisen ja parittelukäyttäytymisen muutokset (Denlinger, 2002; Allen, 2007). Lisääntymisen kustannukset ovat usein suuremmat naaraalle kuin koiraalle, koska esimerkiksi munarauhasten kehittyminen kuluttaa runsaasti energiaa (Freeman & Herron, 2007). Lisääntymislepokaudesta resurssit käytetään lisääntymisen sijasta eliniän pidentämiseen ja hengissä selviytymiseen ts. somaattiseen selviytymiseen (Tatar ym. 2001; Schmidt & Paaby, 2008).

Lisääntymislepokausi voidaan nähdä hyönteisten kelpoisuutta parantavana eli adaptiivisena ominaisuutena mm. pohjoisessa ilmastossa, jossa esiintyy vuodenaikaisvaihtelua (Denlinger, 2002). Koska lisääntymislepokauden ajoittaminen on pohjoisissa olosuhteissa hyvin tärkeää, kohdistuu siihen voimakasta luonnonvalintaa. Ympäristötekijät, kuten kylmyys ja ravinnon puute, synnyttävät valintapaineen, joka karsii yksilöitä, jotka siirtyvät lepokauteen liian myöhään (Lumme, 1978). Toisaalta valinta suosii mahdollisimman runsasta jälkeläistuottoa ja siten myöhäisempää lisääntymislepokauden aloittamista.

D. melanogaster -lajilla lisääntymislepokauden esiintymisessä on havaittu asteittainen maantieteellinen muutos eli kliini (Schmidt ym. 2005). Pohjois-amerikkalaisissa populaatioissa lisääntymislepokauden esiintyvyys kasvaa pohjoista kohti siirryttäessä eteläisestä 35 %:n osuudesta pohjoisen 90 %:iin. Myös monissa lisääntymislepokauteen yhdistetyissä elinkaariominaisuuksissa ja kelpoisuuteen liittyvissä piirteissä, kuten pitkäikäisyydessä ja lisääntymiskyvyssä, on havaittu maantieteellistä muuntelua *D. melanogaster* -lajilla (Schmidt ym. 2005a; Schmidt & Paaby, 2008). Kliinin olemassaolo tukee näkemystä, jonka mukaan lisääntymislepokausi on adaptiivinen ominaisuus (Freeman & Herron, 2007).

1.3. Lisääntymislepokauden säätely

1.3.1. Ympäristötekijät

Ympäristön signaalit ovat tärkeitä fakultatiivisen lisääntymislepokauden alkamisen ja päättymisen säätelyssä loppukesällä ja alkukevällä (Denlinger, 2002). Vuorokauden valoisan ajan lyheneminen ja alhaisemmat lämpötilat toimivat merkinä lisääntymislepokauden aloittamiseksi (Allen, 2007). Kriittisellä päivänpituudella (critical day length, CDL) tarkoitetaan valojaksoa, jossa 50 prosenttia naaraista on lisääntymislepokaudesta (Saunders ym. 2002). Kriittinen päivänpituus erottaa toisistaan pitkät päivänpituudet, jolloin olosuhteet ovat lisääntymiselle suotuisat, ja lyhyet päivänpituudet, jolloin siirrytään lisääntymislepokauteen (Tauber ym. 1986).

D. melanogaster on levittäytynyt Afrikasta Eurooppaan ja Aasiaan 5000 – 16 000 vuotta sitten ja Yhdysvaltoihin ja Australiaan muutaman sadan viime vuoden aikana (David & Capy, 1988; Baudry ym. 2006). Aikaisemmin oletettiin, ettei tropiikista lähtöisin olevalla *D. melanogaster* -lajilla ole lainkaan talvehtimismuotoa, kunnes sillä todettiin alhaisen lämpötilan ja lyhyen päivän aikaansaama lisääntymislepokausi (Saunders ym.

1989). *D. melanogaster* -lajin lisääntymislepokausi on evolutiivisesti ajatellen melko nuorta alkuperää (Saunders & Gilbert 1990; Schmidt ym. 2005b) ja tiedetään myös, että lepokausifenotyyppi on kehittynyt useita kertoja itsenäisesti (Danks, 2006).

Eri leveysasteilla elävien *D. melanogaster* -populaatioiden välillä on havaittu olevan eroja lisääntymislepokauteen johtavan lämpötilan ja valojaksoisuuden välillä ja myös lisääntymislepokauteen siirtyvien yksilöiden osuudessa (Schmidt ym. 2005a). Pohjois-amerikkalaisia *D. melanogaster*-lajin luonnonpopulaatioita tutkittaessa on hiljattain käynyt ilmi, että lämpötilamuutokset selittävät lähes 70 prosenttia lisääntymislepokauteen siirtymisen eroista (Emerson ym. 2009b). Lajin eurooppalaisilla populaatioilla tehdyt tutkimukset ovat sen sijaan osoittaneet, että niiden lisääntymislepokauteen siirtyminen on valojaksoisuuden perustuvaa (Tauber ym. 2007). Ilmeisesti valojaksoisuuden ja lämpötilan merkitys lisääntymislepokauteen siirtymisessä vaihtelee merkittävästi sekä *Drosophila*-lajien että eri alueilla elävien populaatioiden välillä. Lähempänä napa-alueita valojaksoisuudessa on paljon muutoksia vuoden aikana verrattuna lähempänä päiväntasaajaa sijaitseviin alueisiin. Valojaksoisuudessa tapahtuvat muutokset ovatkin pohjoisilla alueilla lämpötilaa luotettavampi signaali vuodenaikojen vaihtumisesta.

1.3.2. Lisääntymislepokauden hormonaalinen säätely

Lisääntymislepokauteen siirtyminen ja sen päättymisen edellyttävät eliöltä mekanismeja, joiden avulla päivän ja yön pituus voidaan arvioida ja lyhyiden ja pitkien päivien määrä laskea (Denlinger, 2002). Nämä mekanismit puolestaan tuottavat signaalin, joka aloittaa elimistössä lepokauteen johtavien hormonaalisten tapahtumien sarjan. Lisääntymislepokauteen liittyvät hormonaaliset tapahtumat välittyvät ns. insuliinisignaaliin viestinnän heikentymisen kautta (Allen, 2007). Muutokset insuliinisignaaliin toiminnassa johtavat fysiologisiin muutoksiin, jotka ovat tarpeen mm. munarauhasen kehityksen pysäyttämiseksi ja talviolosuhteisiin valmistautumisessa (Allen, 2007). Lisääntymiselle suotuisissa olosuhteissa hermoston neurosekreetiosoluista erittyvät insuliininkaltaisia peptidejä (insulin-like peptides, Ilp), jotka aikaansaavat rengasrauhasessa (ring gland) sijaitsevista hormonieritysrauhasista (corpora allata) nuoruushormonin (juveniilihormoni) erittymisen (Emerson, 2009a).

Perhosilla ja heinäsiirkoilla lisääntymislepokausi on saatu kokeellisesti alkamaan poistamalla kirurgisesti corpora allata -rauhaset (Tatar & Yin, 2001; Denlinger, 2002). Toimenpide myös vaikuttaa yksilöiden elinikään kaksinkertaista sen (Pener, 1972; Herman 1985). Nuoruushormonia vastaavan hormonin antamisen lisääntymislepokaudesta oleville *D. melanogaster* -yksilöille on todettu aikaansaavan vitellogeneesin eli munarauhasen kypsymisen alkamisen (Tatar ym. 2001). Nuoruushormoni vaikuttaa munarauhasen kypsymisen varhaisvaiheeseen edistäen ruskuaisproteiinin synteesiä munarauhasissa ja rasvakudoksessa (Emerson, 2009a). Nuoruushormonin vaikutuksesta munarauhaset erittävät ekdysteroideja eli kuorenvaihtohormoneja, mikä edistää ruskuaisproteiinin kerääntymistä munarauhasiin. Kuorenvaihtohormonit myös ylläpitävät ruskuaisproteiinin synteesiä myöhemmässä munarauhasen kypsymisvaiheessa.

1.3.3. Lisääntymislepokauden geneettinen säätely ja *cpo*-geeni

Lisääntymislepokausi on todennäköisesti polygeeninen ominaisuus eli sitä kontrolloidaan useiden eri geenien yhteistoiminnan avulla ja siihen liittyy erilaisia muutoksia geenien toiminnassa (Denlinger, 2002). Useimpien geenien toiminta vähenee lepokauden aikana, mutta joidenkin geenien toiminnan on todettu myös lisääntyvän. Lisäksi geenien toiminnassa on havaittu eroja lisääntymislepokauden aloitus-, ylläpito- ja lopetusvaiheiden välillä (Denlinger, 2002; Kostal, 2006).

D. melanogaster -lajin lisääntymislepokauteen liittyy useita kandidaattigenejä, kuten vuorokausirytmää säätelevään kelloon (sirkaadinen kello) kuuluva *timeless*-geeni (*tim*) (Allen, 2007) ja uudemmissa tutkimuksissa löytyneet *couch potato* (*cpo*) -, *Drosophila p110* (*dp110*) - ja *Insulin-like receptor* (*InR*) -geenit (Williams ym. 2006; Schmidt ym. 2008; Emerson, 2009a). *dp-110*- ja *InR*-geenit osallistuvat *D. melanogaster* -lajilla insuliinisignaaliin toimintaan. *dp110*-geeniä vastaava *age-1*-geeni vaikuttaa *C. elegans*-sukkulamadon toukkavaiheen lepomuodon muodostumiseen eli kyseessä on ilmeisen konservoitunut eli säilynyt tekijä (Tatar & Yin 2001; Williams ym. 2006). *InR* on sen sijaan homologinen geeni *C. elegans* -sukkulamadon *daf-2*-geenin kanssa, joka myös osallistuu lepomuodon syntymiseen (Tatar & Yin, 2001).

cpo-geeni löydettiin alun perin tutkittaessa ääreishermoston kehitystä *D. melanogaster* -lajilla (Bellen ym. 1992a, 1992b) ja se toimii mm. alkioiden, toukkien ja aikuisten yksilöiden keskushermostossa, ääreishermostossa, hermotukisoluissa, sylkirauhasissa sekä rengasrauhassessa (Bellen ym. 1992b; Harvey ym. 1998). Löydetty geeni nimettiin *couch potato* -geeniksi ("sohvaperuna"), koska useat geenin osittaiset toiminnanmenetysmutaatiot aiheuttavat aikuisissa *D. melanogaster* -yksilöissä epänormaalia ja hidastunutta käyttäytymistä, kuten lento- ja liikeaktiivisuuden vähentymistä (Bellen ym. 1992a, 1992b). *cpo*-geenin ortologioita eli samankaltaisia genejä on löydetty myös mm. parasitoidilta (*Nasonia vitripennis*), hernekirvalta (*Acyrtosiphon pisum*), mulperiperhoselta ja hyttyseltä (*Culex quinquefasciatus*) (FlyBase, 2010).

Bellenin ym. (1992a) tutkimuksissa *D. melanogaster* -lajin *cpo*-geenistä on löydetty 14 erilaista insertiomutaatiota, joista osa on letaaleja (aiheuttavat kuoleman). Löydettyistä insertioista yhdeksän oli homotsygoottisena letaaleja ja loput viisi aiheuttivat homotsygoottina muutoksia kärpäsen lentokyvyssä. Lisäksi mutaatioiden todettiin aiheuttavan hidastunutta reagoitua sekä hitaampaa toipumista eetterianestesiasta. Uudemmissa tutkimuksissa (Glasscock & Tanouye, 2005) *cpo*-geenin mutaatioiden on myös havaittu aiheuttavan *D. melanogaster* -lajilla erilaisia neurologisia poikkeavuuksia, kuten iskusta seuraavaa lisääntynyttä halvaantumisalttiutta sekä taipumusta epilepsiatyyppisille kohtauksille ja häiriöille hermosolujen välisessä viestinnässä. Geenillä on ilmeisesti keskeinen rooli hermoston kehittymisessä ja toiminnassa, koska useat sen mutaatioista ovat letaaleja alkiovaiheessa (Bellen ym. 1992a). Mutaatioiden ei sen sijaan ole havaittu aiheuttavan morfologisia eli rakenteellisia ja muodollisia muutoksia. *D. melanogaster* -lajin *cpo*-geenin koodaamia transkriptiotuotteita (lähetti-RNA) tunnetaan seitsemän erilaista (FlyBase, 2010).

Lisääntymislepokauden tiedetään olevan sidoksissa neuroendokriiniseen kontrolliin (Denlinger, 2002). *cpo*-geeni ilmentyy mm. rengasrauhassessa, joka on tärkeä endokriininen elin *Drosophila*-suvun lajeilla (Harvey ym. 1998), ja uusissa tutkimuksissa onkin saatu viitteitä siitä, että *cpo*-geenin vaikutukset lisääntymislepokauteen *D. melanogaster* -lajilla välittyisivät ekdysteroidien eli kuorenvaihtohormonien kautta (Schmidt ym. 2008). Vaikka *cpo*-geeni ei varsinaisesti kuulukaan insuliinisignaaliin, voisi se olla yhdistävä tekijä insuliinisignaaliin ja siihen liittyvien hormoneiden välillä, jotka säätelevät suoraan vitellogeneesia eli munien kypsymistä kärpästen munarauhasissa (Emerson, 2009a).

Schmidtin ym. (2008) mukaan *D. melanogaster* -lajin lisääntymislepokausi on vahvasti sidoksissa *cpo*-geenin viidenteen eksoniin, josta on löytynyt yhteensä 192 muuntelevaa kohtaa, joista kaksi aiheuttaa aminohappomuutoksen. Toisessa näistä ei-synonyymisista mutaatioista aminohappo isoleusiini korvautuu lysiinillä, mikä nostaa *D. melanogaster* -naaraiden alttiutta siirtyä lisääntymislepokauteen (Schmidt ym. 2008). Isoleusiini/lysiini-aminohappopolymorfismissa on havaittavissa samanlainen maantieteellinen kliini kuin naaraiden lisääntymislepokauden esiintyvyydessä, joten

aminohappomuuntelulla voi olla vaikutusta *D. melanogaster* -naaraiden vaihtelevaan lisääntymislepokauden esiintymiseen myös luonnonolosuhteissa (Schmidt ym. 2008).

1.4. Tutkimuslaji ja tutkimuksen tarkoitus

Pro gradu -työni tutkimuslaji *Drosophila montana* on *D. virilis* -ryhmään kuuluva mahlakärpäslaji (Throckmorton, 1982), joka on erkaantunut *D. virilis* -lajista n. 9 miljoonaa vuotta sitten ja *D. melanogaster* -lajista n. 60 miljoonaa vuotta sitten (Spicer, 1991). *D. montana* on todennäköisesti lähtöisin Aasiasta, mistä se on levittäytynyt pohjoiselle pallonpuoliskolle (Throckmorton, 1982) sopeutuen vaihteleviin vuodenaikoihin.

D. montana -lajin lisääntymislepokaudessa valojaksoisuus on tärkeä tekijä (Lumme 1978), ja myös muilla *D. virilis* -lajiryhmän lajeilla esiintyvä lisääntymislepokausi on lähes täysin valojakson aikaansaama (Lumme ym. 1974; Kimura, 1984). Eri leveysasteilla elävien *D. montana* -populaatioiden välillä onkin havaittu olevan eroja lisääntymislepokauteen johtavan valojaksoisuuden suhteen, ja lisäksi lepokauteen siirtyvien yksilöiden osuus vaihtelee (Salminen ym. julkaisematon; Tyukmaeva ym. julkaisematon).

D. montana -lajilla tehdyssä geenien toimintaa tarkastelevassa mikrosirututkimuksessa on havaittu, että lisääntymislepokaudessa olevien naaraiden *cpo*-geenin ilmentymistaso on lisääntymiskykyisiä naaraita korkeampi, mikä viittaa siihen, että *cpo*-geeni liittyy lisääntymislepokauden säätelyyn myös *D. montana* -lajilla (Kankare ym. 2010). Oulungalta Suomesta (66°N, 29°E) kesällä 2003 kerätyn *D. montana* -naaraan jälkeläisistä koostuvasta laboratoriolinjasta O3F66 löydettiin *cpo*-geenissä esiintyvä 19 emäsparin deleetiomutaatio (Haka, 2008), jonka huomattiin sijaitsevan samassa eksonissa (viides eksoni), jossa *D. melanogaster* -lajin lisääntymislepokauteen vaikuttavat mutaatiot esiintyvät (Schmidt ym. 2008).

Tämän pro gradu -työn tarkoituksena oli selvittää, kuinka yleinen kyseinen deleetio on *D. montana* -lajin Oulangan luonnonpopulaatiossa ja laboratoriolinjassa, jossa sen esiintyminen havaittiin (O3F66). Deleetion yleisyyden perusteella pohdittiin sen aiheuttamia mahdollisia valintaetuja tai -haittoja eri olosuhteissa. Lisäksi selvitettiin, onko *cpo*-geenin ilmentymistasossa eroja lisääntymislepokaudessa olevien ja sukukypsien naaraiden deleetio- ja ei-deleetiotyyppien välillä, sekä vaikuttaako deleetio naaraiden lisääntymislepokauteen siirtymiseen. Deleetiota ja sen mahdollisia vaikutuksia tarkasteltiin siis DNA-, RNA- ja fenotyypitasolla, ja tutkimuksen odotettiin myös tuovan uutta tietoa *cpo*-geenin merkityksestä valojaksoisen lisääntymislepokauden säätelyssä erityisesti pohjoisella *D. montana* -lajilla.

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1. Deleetion rakenne

D. montana -lajin *cpo*-geenistä löydetyn deleetion aiheuttamia muutoksia ei tunneta, mutta on todennäköistä, että se aiheuttaa muutoksen geenin lukukehyksessä, jolloin se voi myös aiheuttaa muutoksia lopullisessa proteiinituotteessa (Kankare ym. julkaisematon) (Kuva 1.).

Nukleotidilinjaus:

```

                                     80      90      100     110     120
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Dmontana O3F66 ++      CAACTAAGTCATCAAAAATAATCGATTTATGGTCAAAATGTTGTTCCAGTGATCAAA
Dmontana O3F66 del/del CAACTAAGTCATCAAAAAT~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~::~-GTTGTTCCAGTGATCAAA

```

Kuva 1. Oulungalta vuonna 2003 kerätyn *D. montana* -naaraan jälkeläiseltä löydetty 19 emäsparin deleetio *cpo*-geenissä nukleotidilinjauksena. Deleetio näkyy kuvassa emästen puuttumisena kohdissa 89-107. Deleetion alkamiskohta sijaitsee ilmeisesti STOP-kodonin (TAA) alueella. Kuvan DNA-sekvenssit ovat peräisin eri yksilöiltä (+ + = ei deleetiota, del del = deleetio).

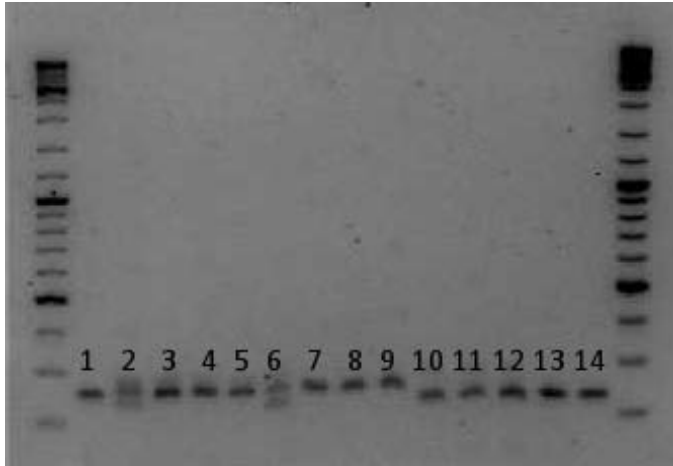
2.2. Deleetion yleisyys

Deleetion yleisyyttä selvitettiin Suomesta Oulungalta (66°N, 29°E) vuosina 2003 ja 2008 kerätyistä *D. montana* -naarasyksilöistä. Vuonna 2008 kerätyistä kärpäksistä (n=75) oli jo aikaisemmin eristetty DNA ja säilytetty se -20 °C:een. Vuonna 2003 kerätyt kärpäset (n=28) oli pakastettu (-20 °C) 70 % alkoholissa ja niistä eristettiin DNA KingFisher-menetelmällä (Qiagen Dneasy Blood & Tissue -eristysarja, KingFisher 96 ThermoScientific).

Deleetion suhteen homo- ja heterotsygoottiset yksilöt tunnistettiin PCR:n ja agarosigeelielektroforeesin (AGE) avulla. Alueelle, jolla deleetio sijaitsee *cpo*-geenissä, oli suunniteltu valmiiksi alukkeet, *cpo*-ma 1F (5'-AGCGACAGCAACAACAACAA-3') ja 1R (5'-CACTCGAACAACATTTGACC-3'), joiden kiinnittymiskohdat geenissä sijaitsevat ennen ja jälkeen deleetion. Syntyvien tuotteiden koot ovat 247 ja 236 emäsparia.

Tutkittavien yksilöiden DNA:ta monistettiin PCR-menetelmällä laboratoriotyöskentelyohjeiden (Kankare, 2009) mukaan. PCR-tulokset tarkistettiin ajamalla tuotteet 2 %:lla agarosigeelillä elektroforeesilaitteessa (Kuva 2.). Geeli tulkittiin siten, että yksilöillä, joilla näkyi geelillä yksi pitemmälle kulkenut juova, oli molemmissa vastinkromosomeissaan deleetio eli ne olivat deleetion suhteen homotsygootteja (del/del). Yksilöillä, joilla juova oli kulkenut lyhyemmän matkan, ei ollut deleetiota (+/+). Yksilöt, joilla näkyi kaksi juovaa, olivat deleetion suhteen heterotsygoottisia (del/+).

Homotsygoottisten linjojen muodostamisen (ks. kohta 2.3.1.) yhteydessä kaikkien kantavanhempien (P-polvi, 104 yksilöä) genotyyppi määritettiin deleetion suhteen, mikä antoi tietoa myös deleetion yleisyydestä laboratoriolinjassa. Deleetion yleisyyttä tarkasteltiin linjassa O3F66 homo- ja heterotsygoottisten yksilöiden suhteellisten osuuksien avulla.



Kuva 2. Yksilöiden genotyypin määrittäminen DNA-näytteestä agarosigeelielektroforeesin (AGE) avulla. Lyhyemmän matkan geelillä kulkeneet juovat (näytteet 1,3,4,5,7,8,9) ovat genotyyppiä $+/+$ (ei deleetiota, homotsygootti). Lähempänä alareunaa olevat juovat ovat deleetion suhteen homotsygoottisia del/del -yksilöitä (näytteet 10-14). Kaksi erillistä juovaa (näytteet 2 ja 6) ovat genotyyppiä $del/+$ (deleetio heterotsygoottisena). Kokostandardit (GeneRuler 100 bp) ovat geelin molemmissa reunoissa.

2.3. Deletion vaikutus *cpo*-geenin ilmentymistasoon ja naaraiden lisääntymislepokauteen siirtymiseen

2.3.1. Homotsygoottisten linjojen muodostaminen

Deletion vaikutusta *cpo*-geenin ilmentymistasoon (RNA-taso) ja naaraiden lisääntymislepokauteen siirtymiseen (fenotyyppitaso) tutkittiin vertailemalla keskenään deleetion suhteen homotsygoottisia yksilöitä (del/del) ja yksilöitä, joilla deleetiota ei ole ($+/+$). Del/del - ja $+/+$ - naaraiden aikaansaamiseksi linjan O3F66 sisällä tehtiin useita risteytyksiä. Kasvatuspulloista kerättiin ja eroteltiin hiilidioksidinukutuksessa vuorokauden ikäisiä naaraita ja koiraita ja ne laitettiin pareittain pieniin muovisiin mallaspuuroa sisältäviin kasvatusputkiin.

Naaras-koiras-parit siirrettiin viikon välein uusiin, puhtaiseen mallasputkiin ja kaikki putket säästettiin jälkeläisten keräämiseksi. Kun putkissa oli munia ja toukkia näkyvissä, kantavanhemmat poistettiin ja niistä eristettiin DNA *cpo*-geenissä esiintyvän deleetion määrittämistä varten. Deleetion määrittäminen tapahtui PCR-tuotteista AGE-ajon perusteella (ks. kohta 2.2.). Jos molemmilla kantavanhemmilla oli deleetio homotsygoottisena, jälkeläiset (del/del) otettiin talteen ilmentymistaso- ja lisääntymislepokausi kokeita varten. Jos kummallakaan kantavanhemmista ei ollut deleetiota, otettiin jälkeläiset ($+/+$) talteen kontrolliksi ilmentymistaso- ja lisääntymislepokausi kokeita varten. Jos deleetion suhteen homotsygoottisia kantavanhempiä ei löytynyt, kerättiin talteen heterotsygoottien vanhempien jälkeläiset, joiden kesken tehtiin uusi sarja risteytyksiä homotsygoottisten jälkeläisten aikaansaamiseksi. Sekä del/del - että $+/+$ -yksilöiden jälkeläisten (F1-polvi) genotyyppi määritettiin ja kokeissa käytettiin näiden jälkeläisiä (F2-polvi). Del/del -naaraita ja -koiraita ja vastaavasti $+/+$ -naaraita ja -koiraita paritettiin homotsygoottisten jälkeläisten saamiseksi, kunnes molempia linjoja oli aikaansaatua riittävästi.

2.3.2. Homotsygoottisten linjojen käsittely

Del/del- ja +/--linjoista kerättiin päivittäin alle vuorokauden ikäisiä naaraita hiilidioksidinuketusta apuna käyttäen. Kokeessa ei käytetty tätä vanhempia karpäsiä, koska ympäristötekijät (kasvatusympäristön jatkuva valo) olisivat voineet vaikuttaa haittaavasti niiden lisääntymislepokauteen siirtymiseen (Salminen, julkaisematon). Naaraat siirrettiin kasvatuskaappeihin (ICP-800, Memmert) sokeri-agarseosta sisältävissä pikkuputkissa (n. 10 yksilöä/putki).

Del/del- ja +/--naaraita kasvatettiin 21 vuorokautta +16 °C lämpötilassa valojaksoissa, joissa ne normaalisti joko kehittyvät sukukypsiksi (L:D 22:2) tai joissa ne siirtyvät lisääntymislepokauteen (L:D 16:8) (Lehtovaara 2008). Kasvatuskaappiin lisättiin karpäsiä vain valoisan jakson aikana, etteivät valaistusolosuhteet olisi muuttuneet kaapin avaamisen vuoksi, ja kutakin neljää käsittelyä (Taulukko 1.) pyrittiin laittamaan kaappiin 110-160 yksilöä.

Taulukko 1. Homotsygoottisten linjojen (del/del=deleetio, +/- =ei deleetiota) saamat käsittelyt lisääntymislepokauteen (L:D 16:8) ja sukukypsyyteen (L:D 22:2) johtavissa valojaksoissa.

Käsittely	Valojakso	Genotyyppi
1.	L:D 16:8	del/del
2.	L:D 16:8	+/+
3.	L:D 22:2	del/del
4.	L:D 22:2	+/+

Kasvatuskaappikäsittelyn jälkeen karpäset tapettiin nopeasti nestetyypen (N₂) avulla. Koska naaraiden munarauhasten kehitysaste haluttiin tarkistaa ennen RNA-eristystä, naaraita siirrettiin nestetypetyksen jälkeen RNA:ta säilövään RNA-later-liuokseen (Qiagen). Jos RNA-eristystä ja karpästen avaamista ei ehditty tekemään heti, karpäset pakastettiin (-80 °C), jotta RNA ei pääsisi hajoamaan säilytyksen aikana. Lisääntymislepokausi selvitettiin aikuisten naaraiden munarauhasten kehitysasteen perusteella (Lumme & Lakovaara 1983; Saunders ym. 1989) (Kuva 3.) mikroskoopin avulla.



Kuva 3A. Lisääntymislepokaudessa olevan naaraan munarauhaset, joiden kehittyminen on pysähtynyt. 3B. Täysin kehittyneet lisääntymiskykyisen naaraan munarauhaset, joissa on runsaasti kypsiä muniä. (Kuvat: Anne Lehtovaara, 2008).

2.3.3. Deletion vaikutus *cpo*-geenin ilmentymistasoon

Lisääntymisvaiheen määrittämisen jälkeen naaraista eristettiin RNA Rneasy Protect MiniKit -eristysmenetelmän avulla (Qiagen) ja näytteiden RNA-pitoisuus ja puhtausarvot mitattiin NanoDrop 3300 -spektrofotometrillä (Thermo Scientific) (Liite 1.). Käytetyssä menetelmässä yksi näyte muodostui yhteensä kuuden karpäsen RNA:sta. Näytteiden RNA-pitoisuus yhdenmukaistettiin laimentamalla näytteet 250 ng:aan/ μ l. RNA:n laatu tarkistettiin Agilent 2100 Bioanalyzer -elektroforeesilaitteen avulla käyttäen laitteen valmistajan reagensseja.

Laimennettu RNA muutettiin käänteistranskription avulla cDNA:ksi (komplementaarinen DNA) käyttäen iScript cDNA-kittiä (Bio-Rad). cDNA-pitoisuus ja cDNA:n puhtausarvot määritettiin NanoDrop-spektrofotometrillä (Liite 1.). Kvantitatiivisessa PCR -ajossa (qPCR) käytettiin seitsemää rinnakkaista näytettä kustakin neljästä käsittelystä ja kaikki näytteet ajettiin samassa ajossa. Lisäksi jokaisesta käsittelystä tehtiin erikseen yksi ajo, jossa kustakin biologisesta replikaatista tehtiin vielä kolme teknistä replikaattia, jotta nähtiin aiheutuuko esim. pipetointitekniikasta vaihtelua, joka johtaisi tulosten vääristymiseen biologisten replikaattien osalta. Koska teknisten replikaattien välillä ei ollut vaihtelua, käytettiin tulosten analysoinnissa vain biologisia replikaatteja.

cpo-geenin ilmentymistaso näytteissä määritettiin qPCR:n eli kvantitatiivisen PCR:n avulla käyttäen Bio-Rad:in CFX96 -laitetta. Tulokset normalisoitiin *E1alpha48D* (*Elongation factor 1 alpha 48D*) ja *eIf4-a* (*Eukaryotic initiation factor4a*) -kontrolligeenien avulla käyttäen CFX Manager™ Software -ohjelmaa (versio 1.1.) (Kankare ym. 2010).

Geenien toiminnan erojen tilastollinen merkitsevyys eri näytteiden välillä määritettiin REST 2009-ohjelmalla (<http://www.gene-quantification.de/rest-2009.html>). REST-ohjelma käyttää tilastollisen merkitsevyuden laskemiseen satunnaistamista ja ns. ”bootstrapping”-tekniikkaa. Ohjelma hyödyntää matemaattista mallia, joka ottaa tulosten normalisoinnissa huomioon sekä tutkittavan geenin että kontrolligeenien PCR-reaktioiden tehokkuudet.

2.3.4. Deletion vaikutus naaraiden lisääntymislepokauteen siirtymiseen

cpo-geenin deletion vaikutusta naaraiden lisääntymislepokauteen siirtymiseen tutkittiin vertaamalla del/del- ja +/-naaraiden munarauhasten kehitysastetta 21 vuorokauden ikäisenä. Munarauhasten kehitysaste määritettiin mikroskoopin avulla. Lisääntymislepokaudessa olevien ja sukukypsien naaraiden osuus laskettiin sekä del/del-että +/-naaraista molemmissa kasvatusolosuhteissa (LD 16:8, lisääntymislepokausiolosuhteet; L:D 22:2, sukukypsyysolosuhteet) (Taulukko 1.). Tavoitteena oli määrittää n. 200 naaraan munarauhasten kehitysaste molemmista genotyypeistä (eli n. 100 naarasta molemmista valojaksoista). Tuloksia tarkasteltiin ristiintaulukoinnilla SPSS-ohjelman (versio 16.0) avulla.

3. TULOKSET

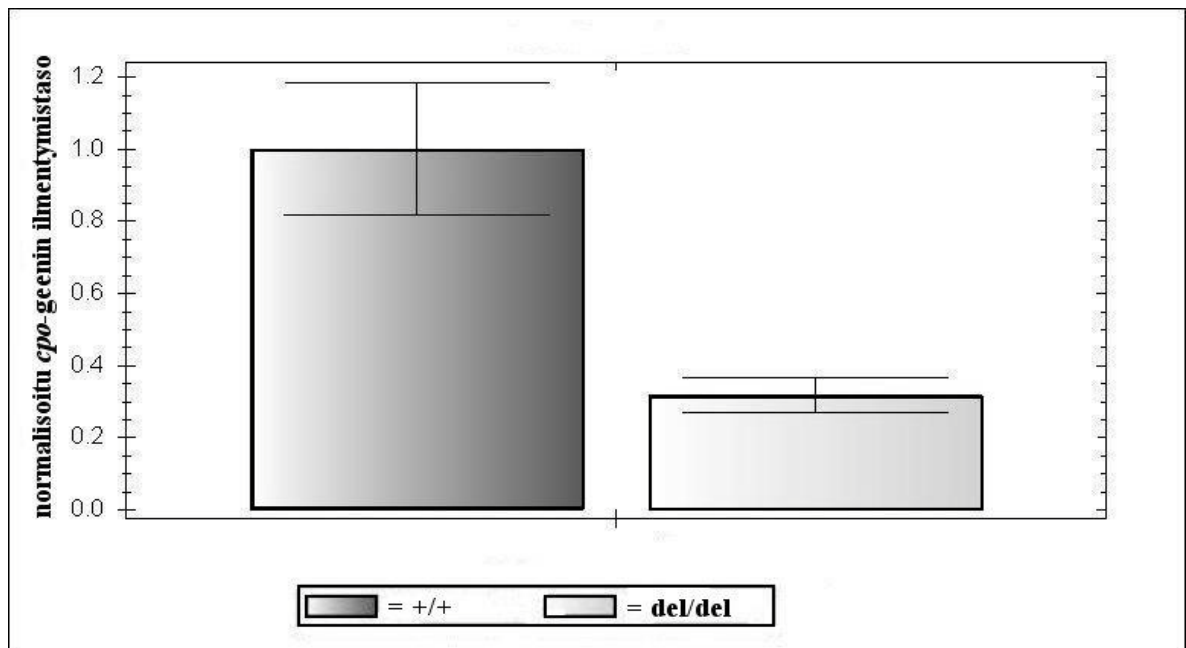
3.1. Deletion yleisyys

Vuonna 2008 kerätyiltä Oulangan populaation *D. montana* -yksilöiltä (n=75) ei löytynyt lainkaan tutkimuksen kohteena ollutta *cpo*-geenin deleetiota hetero- tai homotsygoottisena. Vuonna 2003 kerätyiltä yksilöiltä (n=28) kyseinen deleetio löytyi heterotsygoottisena kahdelta. Toinen ko. yksilöistä oli O3F66-laboratoriolinjan

alkuperäinen kantanaaras mutta toisen naaraan (O386) jälkeläisistä koostuvaa linjaa ei ollut ylläpidetty laboratoriossa. Laboratoriolinjassa O3F66 kaikista tutkituista yksilöistä (n=104, naaraita 50 ja koiraita 54) oli homotsygootteja del/del -yksilöitä 42,3 %, heterotsygootteja (del/+) 46,2 % ja homotsygootteja ei-deleetioyksilöitä (+/+) 11,5 %.

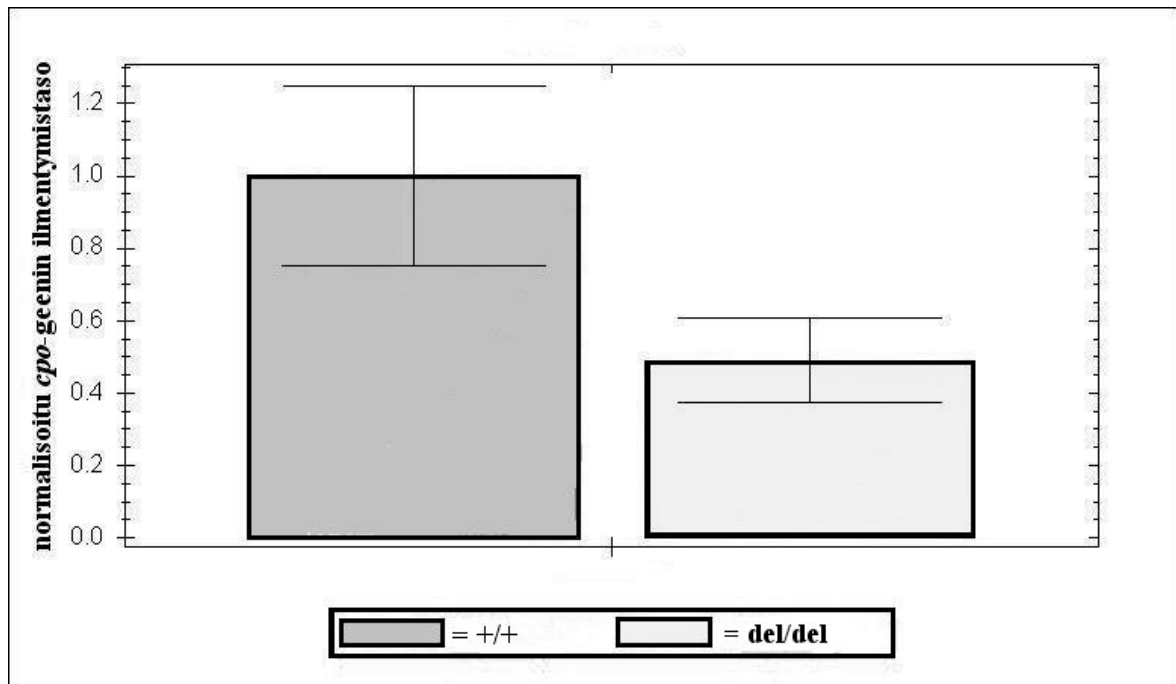
3.2. Deletion vaikutus *cpo*-geenin ilmentymistasoon

cpo-geenin ilmentyminen lisääntymislepokaudessa olevilla *D. montana* -naarailla oli del/del-genotyypillä selvästi ($p = 0.001$) alhaisempaa +/-genotyypin verrattuna. Ilmentymistasojen erot laskettiin genotyyppien ilmentymistasojen suhteena (FC = fold change). +/-yksilöiden *cpo*-geenin ilmentymistaso oli keskimäärin kolminkertainen (FC = 3.12 (keskivirhe = 2.2 – 4.4.)) del/del-yksilöihin verrattuna (Kuva 4.).



Kuva 4. *cpo*-geenin normalisoitu ilmentymistaso lisääntymislepokaudessa (L:D 16:8) olevilla *D. montana* -naarailla. (+/+ = ei deleetiota, del/del = deleetio).

Myös sukukypsillä naarailla *cpo*-geenin ilmentymistason ero oli merkitsevä ($p = 0.025$) del/del- ja +/-yksilöiden välillä. +/-yksilöiden *cpo*-geenin ilmentymistaso oli keskimäärin kaksinkertainen (FC = 2.04 (keskivirhe = 1.2 - 3.4)) verrattuna del/del-yksilöihin (Kuva 5.).



Kuva 5. *cpo*-geenin ilmentymistaso lisääntymiskykyisillä (L:D 22:2) *D. montana* -naarailta (+/+ = ei deleetiota, del/del = deleetio).

cpo-geenin ilmentymistasojen vertailua lisääntymislepokaudessa olevien ja sukukypsien naaraiden välillä ei pystytty suorittamaan, koska referenssigeenien *Eif4A* ja *E1alpha48D* ilmentymistasot eivät pysyneet samoina kaikissa käsittelyissä.

3.3. Deleetion vaikutus naaraiden lisääntymislepokauteen siirtymiseen

Lähes kaikki lisääntymislepokausiokokeessa olleet naaraat siirtyivät lisääntymislepokauteen valojaksossa L:D 16:8, kuten aiemmissakin *D. montana* -lajin Oulangan populaatiolla tehdyissä tutkimuksissa on havaittu tapahtuvan (Salminen, julkaisematon) ja vastaavasti lähes kaikki yksilöt kehittyivät sukukypsiksi valojaksossa L:D 22:2 (Taulukko 2.).

Taulukko 2. Lisääntymislepokaudessa olevien ja sukukypsien deleetio- ja ei-deleetio-kärpästen osuudet eri olosuhteissa (valojaksot L:D 16:8 = lisääntymislepokausiolosuhteet ja L:D 22:2 = lisääntymisolosuhteet) yksilömäärinä (n) ja prosentteina (%) kokonaismäärästä.

	Valojakso L:D 16:8	L:D 22:2
Deleetioyksilöt (del/del)	n (%)	n (%)
lisääntymislepokaudessa	106 (94,6)	2 (1,6)
lisääntymiskykyisiä	6 (5,4)	123 (98,4)
Ei-deleetioyksilöt (+/+)		
lisääntymislepokaudessa	122 (97,6)	13 (10,5)
lisääntymiskykyisiä	3 (2,4)	111 (89,5)

Valojaksossa L:D 16:8 del/del- ja +/+ -genotyyppien välillä ei ollut merkitsevää eroa lisääntymislepokauteen siirtymisessä ($\chi^2 = 1.414$, $df = 1$, $p = 0.234$). Sen sijaan valojaksossa

L:D 22:2 del/del- ja +/- -genotyyppien lisääntymislepokauteen siirtyminen erosi toisistaan tilastollisesti merkittävästi ($\chi^2 = 8.678$, $df = 1$, $p = 0.003$). +/- -genotyyppiä olevista yksilöistä siirtyi lisääntymislepokauteen del/del -genotyyppiä suurempi osuus. On kuitenkin huomioitava, että noin puolet ($n=6$) lisääntymislepokauteen siirtyneistä +/- genotyypin yksilöistä tässä valojaksossa oli samassa kasvatusputkessa. On mahdollista, että ko. putken kohdalla on tapahtunut jokin virhe (ks. tulosten tarkastelu), joka on aiheuttanut putken yksilöiden siirtymisen lisääntymislepokauteen. Jos kyseinen putki poistetaan, tulos ei enää ole tilastollisesti merkitsevä ($\chi^2 = 3.392$, $df = 1$, $p = 0.66$).

4. TULOSTEN TARKASTELU

Tämän työn yhtenä tavoitteena oli saada tietoa *D. montana* -lajin *cpo*-geenissä esiintyvän deleetion yleisyydestä Suomen Oulangan luonnonpopulaatioissa ja laboratoriolinjassa, jossa sen esiintyminen havaittiin. Tutkimuksessa selvisi, että *cpo*-geenin deleetio esiintyi osalla vuonna 2003 Oulangan luonnonpopulaatiosta kerätyillä *D. montana* -naarailta mutta vuonna 2008 kerätyiltä naarailta sitä ei löytynyt lainkaan. Toisen vuonna 2003 kerätyn deleetion suhteen heterotsygoottisen naaraan jälkeläisistä koostuvassa laboratoriolinjassa deleetio on kuitenkin säilynyt ja on siinä hyvin yleinen. Työssä tutkittiin myös, onko *cpo*-geenin ilmentymistasossa eroja lisääntymislepokaudesta olevien ja sukukypsien naaraiden del/del- ja +/- genotyyppien välillä, sekä vaikuttaako deleetio naaraiden lisääntymislepokauteen siirtymiseen. Deleetion havaittiin laskevan *cpo*-geenin ilmentymistasoa sekä lisääntymislepokaudesta olevilla että sukukypsillä naarailta, mutta sen ei havaittu vaikuttavan naaraiden lisääntymislepokauteen siirtymiseen.

Saatujen tulosten perusteella lienee ilmeistä, että deleetiomutaatio on saanut alkunsa luonnonpopulaatioissa ja säilynyt laboratoriolinjassa. Deleetio esiintyi vain kahdella vuonna 2003 kerätyillä *D. montana* -naaraalla, joten se oli käytettävissä olevan aineiston perusteella harvinainen. Vuoden 2003 otos on kuitenkin pieni eikä sen perusteella voi tehdä luotettavia päätelmiä deleetion yleisyydestä luonnonpopulaatioissa. Vuoden 2008 otos on kooltaan suurempi ja sen perusteella voidaan päätellä, että deleetio esiintyi kyseisenä vuonna luonnonpopulaatioissa hyvin harvinaisena. On mahdollista, että deleetio on luonnonolosuhteissa haitallinen ja että sen esiintyvyys populaatioissa on vähentynyt valinnan vaikutuksesta vuosien 2003 ja 2008 välillä. Sen sijaan on mahdotonta päätellä, onko deleetio hävinnyt luonnonpopulaatiosta kokonaan. Harvinainen mutaatio voi hävitä populaatiosta myös sattumalta, vaikka se olisi hyödyllinen tai neutraali (Graur & Li, 2000). Deleetion esiintyminen vain heterotsygoottisena tutkituissa luonnonpopulaation yksilöissä voi olla otoksesta johtuvaa sattumaa. Se voi myös tarkoittaa, että deleetio on luonnonolosuhteissa vähemmän haitallinen esiintyessään heterotsygoottisena, kuin mitä se olisi homotsygoottisena esiintyessään.

Laboratoriolinjassa O3F66 esiintyi huomattavasti enemmän del/del- ja del/+ yksilöitä kuin +/- yksilöitä. Tämä viittaa siihen, että deleetio voi olla laboratorioolosuhteissa edullinen tai neutraali. Jos del/del-yksilöt ovat kelpoisuudeltaan parempia kuin +/- yksilöt, niiden osuus linjassa kasvaa valinnan vaikutuksesta. Jos taas deleetio on laboratorioolosuhteissa vaikutukseltaan neutraali, sen yleisyys sukupolvesta toiseen vaihtelee sattumanvaraisesti (Graur & Li, 2000). Linjaa, josta deleetio löydettiin (O3F66) on säilytetty vuodesta 2003 saakka eli useiden sukupolvien ajan laboratorioolosuhteissa, joten linjassa on saattanut tapahtua sopeutumista näihin olosuhteisiin. Laboratoriossa kärpäset elävät jatkuvassa valossa (L:D 24:0) ja 19 °C lämpötilassa eli ne eivät siirry lisääntymislepokauteen elinkiertoensa aikana. Jos deleetiolla on haitallista vaikutusta lisääntymislepokauteen käyttäytymiseen, se ei tule esiin laboratorioolosuhteissa eikä näin

ollen vaikuta yksilöiden kelpoisuuteen. Laboratorio-olosuhteet (kokovalo ja lämpötila 19 °C) eivät kuitenkaan ole täysin luonnonolosuhteista poikkeavat, koska olosuhteet Oulangalla ovat keskikesällä vastaavat. Valintapaineen muuttuminen (laukeaminen) on voinut aikaansaada deleetion yleistymisen laboratorio-olosuhteissa, vaikka se luonnonolosuhteissa olisikin yksilön kelpoisuutta vähentävä.

Del/del- ja +/--yksilöiden välisiä eroja *cpo*-geenin ilmentymistasossa vertailtiin sekä sukukypsillä että lisääntymislepokaudessa olevilla kärpäksillä, jolloin havaittiin, että deleetio laskee merkittävästi *cpo*-geenin ilmentymistasoa molemmissa ryhmissä (Kuvat 4. ja 5.). Käytettävissä oleva otos oli melko laaja, seitsemän rinnakkaista näytettä kustakin neljästä käsittelystä, joten saatuja tuloksia voidaan pitää luotettavina ja niissä esiintyvää vaihtelua normaalina biologisena vaihteluna.

Koska deleetio vaikutti *cpo*-geenin ilmentymistasoon sekä lisääntymislepokaudessa olevilla että sukukypsillä *D. montana* -naarilla, voidaan päätellä, että *cpo*-geeni toimii molemmissa kehitysvaiheissa. Deleetio- ja ei-deleetiokärpästen *cpo*-geenin ilmentymistasojen välinen ero oli suurempi lisääntymislepokaudessa olevilla naarilla, mutta tämän tuloksen merkityksestä on vaikea tehdä päätelmiä, koska lisääntymislepokaudessa olevien ja sukukypsien naaraiden *cpo*-geenin ilmentymistasoja ei pystytty vertaamaan suoraan keskenään.

Deleetion aiheuttamia muutoksia *cpo*-geenin toiminnan säätelyssä ei tunneta. Geenien toimintaa säädellään kaikissa vaiheissaan alkaen DNA:n transkriptiosta mRNA:ksi aina proteiinien muokkaukseen saakka. *D. melanogaster* -lajin *cpo*-geeni esimerkiksi silmukoituu monin eri tavoin ja se koodaa seitsemää erilaista transkriptiotuotetta (Bellen ym. 1992b; FlyBase 2010). Muutokset esimerkiksi silmukoitumisessa tai muissa geenin toiminnan säätelyyn vaikuttavissa mekanismeissa ja sitä kautta transkriptiotuotteessa (mRNA) voivat johtaa muutoksiin geenin ilmentymisessä. Jos *D. montana* -lajin *cpo*-geenin koodaamien proteiinien rakenne tunnettaisiin, olisi mahdollista tarkastella paremmin deleetion vaikutusta, ja tämä onkin yksi mahdollinen jatkotutkimusaihe.

Koska *cpo*-geeni koodaa RNA:ta sitovaa proteiinia, se osallistuu muiden geenien toiminnan säätelyyn (Bellen ym. 1992b). RNA:ta sitovat proteiinit, joihin *cpo*-geenin koodaamat proteiinit kuuluvat, säätelevät geenien ilmentymistä mm. keskushermostossa (Glasscock & Tanouye, 2005; Lee & Schedl, 2006). Ne sitoutuvat solun tumassa esilähetti-RNA:han (pre-mRNA) ja säätelevät sen muokkaamista lähetti-RNA:ksi (mRNA) sekä avustavat mRNA:n kuljettamisessa sytoplasmaan ja säätelevät mRNA:n stabiilisuutta, paikallistamista ja translaatiota proteiiniksi. RNA:ta sitovat proteiinit ovat myös ilmeisesti välttämättömiä synapsien toiminnalle aikuisten yksilöiden keskushermostossa (Glasscock & Tanouye, 2005). Tiedetään, että lisääntymislepokaudessa ns. insuliinisignaaliireitin viestintä on alentunut verrattuna sukukypsiin yksilöihin (Allen, 2007). *cpo*-geenillä saattaakin olla tärkeä rooli insuliinisignaaliireitin toimintaan osallistuvien geenien toiminnan säätelyssä lisääntymislepokauden aikana.

Lisääntymislepokausi ilmeisesti määräytyy eri mekanismeilla *D. montana* - ja *D. melanogaster* -lajeilla, ja mahdollisesti myös näiden lajien eri alueiden populaatioilla (Schmidt ym. 2005; Salminen ym. julkaisematon; Tyukmaeva ym. julkaisematon). Näin ollen lisääntymislepokauden geneettinen tausta voi olla eri lajeilla populaatioilla ainakin osittain erilainen ja *cpo*-geeni saattaa olla keskeisempi tekijä lämpötilan perusteella määräytyvässä lisääntymislepokaudessa *D. melanogaster* -lajilla. Koska *D. montana* -lajin lisääntymislepokausi määräytyy valojaksoisuuden perusteella (Lumme 1978), voivat myös siihen liittyvät geneettiset mekanismit olla erilaiset. Onkin mahdollista, että *D. montana* -lajin lisääntymislepokauden taustalla on muita, vielä tuntemattomia geneejiä ja tekijöitä. Lisääntymislepokausikokeiden perusteella deleetiolla ei ole vaikutusta naaraiden

lisääntymislepokauteen siirtymiseen. Tulokset ovat yhteneviä myös aikaisempien *D. montana* -lajilla tehtyjen tutkimusten kanssa, joissa on tutkittu naaraiden lisääntymislepokauteen siirtymistä (Lehtovaara, 2008; Salminen, julkaisematon; Tyukmaeva, julkaisematon). Näissä tutkimuksissa on havaittu, että pieni osa yksilöistä käyttäytyy eri tavalla, kuin mitä valojakson perusteella olisi odotettavissa (Lehtovaara, 2008; Salminen, julkaisematon; Tyukmaeva, julkaisematon). Lisääntymislepokauteen siirtyminen on monen tekijän summa ja on ajateltu, että mm. häiriö yksilön kyvyssä mitata valoa vaikuttaa valojaksosta poikkeavaan lepokauteen siirtymiseen tai siihen, ettei lepokauteen siirrytä lainkaan. *Drosophila*-suvun kärpäsillä on valoa mittaavia fotoreseptoreja mm. silmissä ja siivissä (Danks, 2003; Lankinen, suullinen tieto). On havaittu, että esimerkiksi siiven vaurioituminen voi johtaa häiriöön valon mittaamisessa. Näin ollen työssä havaittuja poikkeamia voidaan pitää luonnollisena vaihteluna.

10,5 prosenttia (13 yksilöä) +/-yksilöistä valojaksossa L:D 22:2 oli lisääntymislepokaudesta ja näistä 6 yksilöä oli samassa kasvatusputkessa, mikä aiheutti merkitsevän ja aiemmista lisääntymislepokauskokeista (Lehtovaara, 2008; Salminen, julkaisematon; Tyukmaeva, julkaisematon) poikkeavan tuloksen. On mahdollista, että kyseisen putken käsittelyssä on tapahtunut jotakin tulokseen vaikuttavaa mutta kyseessä voi olla myös normaali biologinen vaihtelu. Yksi mahdollinen selitys on, että putkeen on aluksi laitettu epähuomiossa yksi koiras naaraiden joukkoon. Koiras on voinut paritella joidenkin naaraiden kanssa ja karata putkenvaihdon yhteydessä (putket, joihin kasvoi hometta, vaihdettiin kokeen aikana puhtaisiin). Paritelleet naaraat ovat voineet munia hedelmöittäneet munansa kokeen aikana kasvatusputkeen, jolloin ne on avaamisen yhteydessä luokiteltu lisääntymislepokaudesta oleviksi.

Yksilön elinkaariominaisuuksien kannalta tärkeät geenit ovat yleensä hyvin konservoituneita eli niissä esiintyy hyvin vähän muuntelua. Koska deletiolla ei havaittu käytetyissä olosuhteissa olevan vaikutusta lisääntymislepokauteen siirtymiseen, alue, jossa se sijaitsee *cpo*-geenissä, ei ehkä ole keskeinen lisääntymislepokauden määräytymisessä tai säätelyssä *D. montana* -lajilla. Sen sijaan deletioalue saattaa vaikuttaa muihin vielä tuntemattomiin elintoimintoihin, jotka eivät tässä koejärjestelyssä tulleet esiin.

Koska aikaisemmissa kokeissa (Kankare ym. 2010) oli osoitettu, että *cpo*-geeni ilmentyy voimakkaammin lisääntymislepokaudesta olevilla naarailta sukukypsyin naaraisiin verrattuna, tiedettiin kyseisen geenin jollain tavalla liittyvän lisääntymislepokauteen siirtymiseen tai sen ylläpitoon. Jotta voisi luotettavasti sanoa, että *cpo*-geeni on osallisena lisääntymislepokauden määräytymisessä tai sen ylläpidossa *D. montana* -lajilla, pitäisi *cpo*-geenin toiminta hiljentää (ns. knock down -koe). Toistaiseksi tämä ei kuitenkaan ole mahdollista, koska *ko*-geeniä ei ole sekvensoitu kokonaan *D. montana* -lajilla. On myös mahdollista, että *cpo*-geenin deletioalueella on *D. montana* -lajilla merkitystä lisääntymislepokauden kannalta mutta deletiosta huolimatta geenin transkriptiotuotetta (RNA) syntyy riittävä määrä normaalin geenitoiminnan säilyttämiseksi eikä deletio siten haittaa lisääntymislepokauteen siirtymistä, vaikka toimivaa tuotetta muodostuukin vähemmän deletiotyyppillä kuin villityypillä (+/-genotyyppi).

D. melanogaster -lajilla *cpo*-geenin mutaatioiden on todettu aiheuttavan mm. lento- ja liikeaktiivisuuden vähentymistä (Bellen ym. 1992a) ja *cpo*-geenissä esiintyvät insertiomutaatiot ilmeisesti vaikuttavat proteiinin aktiiviseen kohtaan, koska niiden aiheuttamat muutokset ovat hyvin merkittäviä. On siis mahdollista että *cpo*-geenin toiminta liittyy myös *D. montana* -lajilla jollakin tavoin lento- ja liikeaktiivisuuden säätelyyn. Luonnonolosuhteissa *D. montana* -yksilöt voivat liikkua useiden kilometrien laajuisella alueella, kun taas laboratorio-olosuhteissa liikkuminen on hyvin rajoitettua ja ravinnon jatkuvan saatavillaolon vuoksi lähes tarpeetonta. Jos tutkittu deletio vaikuttaisi liikkumista vähentävästi, voisi se olla yhtenä selittävänä tekijänä, miksi tutkittu deletio on

harvinainen luonnonpopulaatiossa mutta yleinen siinä laboratoriolinjassa, jossa se esiintyy. Tämän asian selvittäminen edellyttäisi liikeaktiivisuuskokeiden suorittamista.

Pro gradu -työssä saatiin selville, että tutkitulla deleetiolla on vaikutusta *cpo*-geenin toimintaan RNA-tasolla mutta yhteyttä lisääntymislepokausifenotyyppiin ei havaittu. Jatkossa olisikin mielenkiintoista tutkia deleetion mahdollisia vaikutuksia muihin fenotyyppiin ominaisuuksiin, kuten edellä mainittuihin lento- ja liikeaktiivisuuteen.

Koska referenssigeenien *Eif4A* ja *E1alpha48D* ilmentymisessä oli eroa lisääntymislepokaudessa olevien ja sukukypsien yksilöiden välillä, ei kaikkia *cpo*-geenin ilmentymistä koskevia qPCR-tuloksia pystytty normalisoimaan niiden avulla. Tämä oli valitettavaa, koska olisi ollut erittäin mielenkiintoista verrata *cpo*-geenin ilmentymistasoja nimenomaan lisääntymislepokaudessa olevien ja lisääntymiskykyisten yksilöiden välillä. Aikaisemmassa tutkimuksessa (Kankare, 2010) kyseiset referenssigeenit ovat toimineet odotetusti, joten niiden oletettiin soveltuvan myös tähän työhön. Kuitenkin joko lisääntymislepokauteen siirtyminen tai valojakso itsessään vaikutti referenssigeenien ilmentymiseen. Aiemmissa tutkimuksissa käytetyt *D. montana* -yksilöt olivat nuorempia (14 vrk ikäisiä) kuin tässä työssä käytetyt (21 vrk) ja onkin mahdollista, että ikä on vaikuttanut referenssigeenien erilaiseen ilmentymistasoon. Yrityksistä huolimatta sopivia referenssigeenejä ei pro gradu -työn aikataulun puitteissa löytynyt. Työssä käytettyjä RNA-näytteitä on vielä jäljellä, joten sopivien referenssigeenien löytyminen mahdollistaisi jatkotutkimukset *cpo*-geenin ilmentymisestä lisääntymislepokaudessa olevien ja sukukypsien yksilöiden välillä. Se, että lisääntymislepokausiolosuhteet vaikuttavat yleisesti nk. taloudenpitogeneeinä tunnettujen *Eif4A*- ja *E1alpha48D*-geenien ilmentymistasoon, on myös itsessään mielenkiintoinen havainto.

Deleetion suhteen heterotsygoottisia kärpäsiä (del/+ -genotyyppi) ei tutkittu, koska pro gradu -työhön käytettävissä oleva aika ja resurssit eivät olisi siihen riittäneet. Heterotsygoottisena esiintyvän deleetion mahdollinen vaikutus lisääntymislepokauteen siirtymiseen ja *cpo*-geenin ilmentymiseen voisi antaa tietoa deleetion dominanssista tai resessiivisyydestä.

Lisääntymislepokauden ja siihen liittyvien geneettisten mekanismien tutkiminen antaa tietoa evoluutiosta ja adaptaatiosta yleisesti sekä esimerkiksi sopeutumisesta pohjoisiin olosuhteisiin (Emerson ym. 2009a). Lisääntymislepokauden esiintyvyyden ja ilmaston lämpenemisen välisestä yhteydestä on saatu viitteitä *D. melanogaster* -lajilla, joten lepokautta on mahdollista käyttää nopeaan ilmastonmuutokseen liittyvien evolutiivisten vasteiden tutkimuksessa (Bradshaw & Holzapfel, 2001). Lisääntymislepokauteen liittyvää tutkimustietoa voidaan soveltaa myös ikääntymistutkimuksessa ja pitkäikäisyyteen vaikuttavien tekijöiden selvittämisessä (Tatar & Yin, 2001; Denlinger, 2002). Lisäksi on esitetty, että lisääntymislepokaudesta saatava geneettinen tietämys olisi sovellettavissa tuhohyönteisten torjuntaan (Denlinger, 2002).

KIITOKSET

Kiitän ohjaajiani FT Maaria Kankareta ja FM Tiina Salmista hyvästä ja kannustavasta ohjauksesta sekä tilaisuudesta päästä tekemään aiheeltaan mielenkiintoista ja menetelmiltään monipuolista pro gradu -työtä. Kiitän myös evoluutiotutkimuksen huippuyksikköä, Kuopion Luonnon Ystävien Yhdistyksen Betty Väänäsen rahastoa ja Suomen Biologian Seura Vanamoaa saamistani apurahoista. Lisäksi kiitän perhettäni – erityisesti aviopuolisoani ja vanhempiani - niin henkisestä kuin taloudellisestakin tuesta tämän työn aikana.

KIRJALLISUUS

- Allen, M.J. 2007. What makes a fly enter diapause? *Fly* 6: 307-310.
- Askew, R.R. 1988. *The Dragonflies of Europe*. Harley Books, Colchester, Essex. 287 p.
- Aspi J., Lumme J, Hoikkala A. & Heikkinen E. 1993. Reproductive ecology of the boreal riparian guilds of *Drosophila*. *Ecography* 16:65-72.
- Baudry, E., Derome, N., Huet, M. & Veuille, M. 2006. Contrasted polymorphism patterns in a large sample of populations from the evolutionary genetics model *Drosophila simulans*. *Genetics* 173: 759-767.
- Begon, M., Townsend, C.R. & Harper, J.L. 2006. *Ecology: from individuals to ecosystems*. Wiley-Blackwell, United Kingdom. 738 p.
- Bellen, H.J., Vaessin, H., Bier, E., Kolodkin, A., D'Evelyn D., Kooyer, S. & Jan Y.N. 1992a. The *Drosophila couch potato* gene: An essential gene required for normal adult behavior. *Genetics* 131: 365-375.
- Bellen, H.J., Kooyer, S., D'Evelyn, D. & Pearlman, J. 1992b. The *Drosophila Couch potato* protein is expressed in nuclei of peripheral neuronal precursors and shows homology to RNA-binding proteins. *Genes & Development* 6: 2125-2136.
- Bradshaw., W.E. & Holzapfel, C.M. 2008. Genetic response to rapid climate change: it's seasonal timing that matters. *Molecular Ecology* 17: 157-166.
- Danks, H.V. 2003. Studying insect photoperiodism and rhythmicity: Components, approaches and lessons. *Eur. J. Entomol.* 100:209-221.
- Danks, H.V. 2006. Key themes in the study of seasonal adaptations in insects II. Life-cycle patterns. *Appl. Entomol. Zool.* 40: 199-211.
- David, J.R. & Capy, P. 1988. Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations. *Trends in Genetics* 4: 106-111.
- Denlinger, D.L. 1971. Embryonic determination of pupal diapause in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of Insect Physiology* 17: 1815-1822.
- Denlinger, D.L. 2002. Regulation of diapause. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 93-122.
- Emerson, K.J., Bradshaw, W.E. & Holzapfel, C.M. 2009a. Complications of complexity: integrating environmental, genetic and hormonal control of insect diapause. *Trends in Genetics* Vol. 5: 217-225.
- Emerson, K.J., Uyemura, A.M., McDaniel, K.L., Schmidt, P.S., Bradshaw, W.E. & Holzapfel, C.M. 2009b. Environmental control of ovarian dormancy in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. A.* 195: 825-829.
- Finnzymes. 2009. *Principles of qPCR*. Edita, Helsinki.
- FlyBase. 2010. A Database of *Drosophila* Genes & Genomes. <http://flybase.org/> Luettu 7.1.2010 – 1.11.2010.
- Freeman, S. & Herron, J.C. 2007. *Evolutionary Analysis*, Fourth Edition. Pearson Education, Inc. United States of America.
- Glasscock, E. & Tanouye, M.A. 2005. *Drosophila couch potato* mutants exhibit complex neurological abnormalities including epilepsy phenotypes. *Genetics* 169: 2137-2149.
- Graur, D. & Li, Wen-Hsiung. 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Second Edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Goto S.G., Yoshida T., Beppu K. & Kimura M.T. 1999. Evolution of overwintering strategies in Eurasian species of the *Drosophila obscura* species group. *Biological Journal of Linneal Society*, 68:429-441. London, UK.
- Greenfield, M.D. & Pener, M.P. 1992. Alternative schedules of male reproductive diapauses in the grasshopper *Anacridium aegyptium* (L.): effects of the corpora allata on sexual behavior (Orthoptera: Acrididae) *J. Insect Behav.* 5: 245-261
- Haka, Jaana. 2008. *Couch potato – geenin sekvensoiminen Drosophila montana –kärpäslajilta*. Opinnäytetyö, Jyväskylän ammattikorkeakoulu. 72 s.
- Hare, J.D. Ecology and management of the colorado potato beetle. 1990. *Annu. Rev. Entomol.* 35:81-100.

- Harvey, P.D., Filippova M. & Bryant, P.J. 1998. Genes expressed in the ring gland, the major endocrine organ of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 149: 217-231.
- Herman, W.S. 1981. Studies on the adult reproductive diapause of the monarch butterfly, *Danaus plexippus*. *Biol. Bull.* 160: 89-106.
- Herman, W.S. 1985. Hormonally mediated events in adult monarch butterflies. In: Rankin, M.A. (Ed.). *Migration: Mechanisms and Adaptive Significance*, Contributions in Marine Science University of Texas Press, Austin, pp. 799-815 (Supplement, 27).
- Kalushkov, P., Hodkova, M., Nedved, O. & Hodek, I. 2001. Effect of thermoperiod on diapause intensity in *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera Pyrrhocoridae). 2001. *Journal of Insect Physiology* 47: 55-61.
- Kankare, M. 2009. Laboratoriotyöskentelyohjeet, Evoluutiogenetiikka 16.3.2009. Jyväskylän yliopisto, Bio- ja ympäristötieteiden laitos.
- Kankare, M., Salminen, T., Laiho, A., Vesala, L. & Hoikkala, A. 2010. Changes in gene expression linked with adult reproductive diapause in a northern malt fly species: a candidate gene microarray study. *BMC Ecology* 10:3.
- Kimura, M.T. 1984. Geographic variation of reproductive diapause in the *Drosophila auraria* complex. *Physiological Entomology* 9:425-431.
- Kostal, V. Eco-physiological phases of insect diapause. 2006. *Journal of Insect Physiology* 52: 113-127.
- Kostal, V., Tollarova, M. & Dolezel, D. 2008. Dynamism in physiology and gene transcription during reproductive diapause in a heteropteran bug, *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of Insect Physiology* 54: 77-88.
- Lee, M.-H. and Schedl, T. 2006. RNA-binding proteins *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.79.1, <http://www.wormbook.org>.
- Lehtovaara, Anne. 2008. *Maantieteellinen muuntelu D. montana –naaraiden lisääntymislepokaudessa ja liikeaktiivisuudessa*. Pro Gradu –tutkielma, Jyväskylän yliopisto, Bio- ja ympäristötieteiden laitos. 39 s.
- Lumme, J., Oikarinen, A., Lakovaara, S. & Alatalo, R. 1974. The environmental regulation of adult diapause in *Drosophila littoralis*. *Journal of Insect Physiology* 20: 2023-2033.
- Lumme J. 1978. Phenology and Photoperiodic diapause in Northern Populations of *Drosophila*. Teoksessa: Dingle H. (toim.), *Evolution of Insect Migration and Diapause* pp. 145-169.
- Lumme J. & Lakovaara S. 1983. Seasonality and diapause in Drosophilids. In Ashburner M., Carson HL, Thompson Jr JN, eds. *The genetics and biology of Drosophila*. Vol. 3d. New York: Academic Press pp. 1-120.
- Pener, M.P. 1972. The corpus allatum in adult acridids: the inter-relation of its functions and possible correlations with the life cycle. In: Hemming C.F., Taylor, T.H.C. (Eds.), *Proceedings of the International Study Conference on the Current and Future Problems of Acridology*. Centre for Overseas Pest Research, London, pp. 135-147.
- Robich, R.M. 2005. *Molecular characterization of adult diapause in the northern house mosquito, Culex pipiens*. PhD –study, The Ohio State University. 194 p.
- Saunders, D.S., Henrich, V.C. & Gilbert, L.I. 1989. Induction of diapause in *Drosophila melanogaster*: Photoperiodic regulation and the impact of arrhythmic clock mutations on time measurement. *PNAS* 86: 3748-3752.
- Saunders, D.S. & Gilbert, L.I. 1990. Regulation of ovarian diapause in *Drosophila melanogaster* by photoperiod and moderately low temperature. *Journal of Insect Physiology* 36: 195-200.
- Saunders D. S., Stell C. G. H., Vafopoulou X. & Lewis R. D. 2002. *Insect Clocks*, Third Edition. Elsevier Science B.V. The Neatherlands
- Schmidt, P.S. & Paaby, A.B. 2008. Reproductive diapause and life-history clines in North American populations of *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 62: 1204-1215.
- Schmidt, P.S. & Paaby, A.B. 2009 Dissecting the genetics of longevity in *Drosophila melanogaster*. *Fly* 3: 1-10.
- Schmidt, P.S., Matzkin, L., Ippolito, M. & Eanes, W.F. 2005a. Geographic variation in diapause incidence, life history traits, and climatic adaptation in *Drosophila melanogaster*. 2005. *Evolution* 59: 1721-1732.

- Schmidt, P.S., Paaby, A.B. & Heschel, M.S. 2005b. Genetic variance for diapause expression and associated life histories in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 59: 2616-2625.
- Schmidt, P.S., Zhu, C-T., Das, J., Batavia, M., Yang, L. & Eanes, W.F. 2008. An amino acid polymorphism in the *couch potato* gene forms the basis for climatic adaptation in *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 105: 16207-16211.
- Spicer, G. 1991. Molecular Evolution and phylogeny of the *Drosophila virilis* species group as inferred by two-dimensional electrophoresis. *Journal of Molecular Evolution* 33: 379-394.
- Tatar, M. & Yin, C-M. 2001. Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. *Experimental Gerontology* 36: 723-738.
- Tatar, M., Chien, S.A., Priest, N.K. 2001. Negligible senescence during reproductive dormancy in *Drosophila melanogaster*. *The American Naturalist* 158: 248-258.
- Tauber, M. J., Tauber, C. A., and Masaki, S. 1986. *Seasonal Adaptations of Insects*. Oxford University Press, Oxford.
- Tauber, E., Zordan, Z., Sandrelli, F., Pegoraro, M., Ostervalder, N., Breda, C., Daga, A., Selmin, A., Monger, K., Benna, C., Rosato, E., Kyriacou, C.P. & Costa, R. 2007. Natural selection favors a newly derived *timeless* allele in *Drosophila melanogaster*. *Science* 316: 1895-1898.
- Throckmorton, L. 1982. The *virilis* species group. *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 3b, ed. Ashburner, M., Carson, H. & Thompson, J. Academic Press, London.
- Williams, K.D., Busto, M., Suster, M.L., So, A.K-C., Ben-Shahar, Y., Leivers, S.J. & Sokolowski, M.B. 2006. Natural variation in *Drosophila melanogaster* diapauses due to the insulin-regulated P13-kinase. *PNAS* 103: 15911-15915.

LIITTEET

Liite 1. Työssä käytetyn RNA:n ja cDNA:n pitoisuudet ja puhtausarvot (NanoDrop 3300 -spektrofotometri). RNA-näytteiden 260/280 -suhteen suositusarvo on n. 2,0 ja cDNA-näytteiden n. 1,8 (Finnzymes, 2009).

Näyte ja olosuhde	RNA-pitoisuus	Puhtausarvot (RNA)	cDNA-pitoisuus	Puhtausarvot (cDNA)
L:D 16:8 del/del	ng/μl	260/280	ng/μl	260/280
1.	314	2,3	1429	1,9
2.	90	2,3	980	1,9
3.	140	2,3	1584	1,9
4.	297	2,4	1459	1,8
5.	245	2,2	1879	1,9
6.	323	2,2	1755	1,9
7.	161	2,1	1064	1,8
L:D 16:8 +/+				
1.	198	2,3	1178	1,9
2.	313	2,3	1346	1,9
3.	131	2,4	1274	1,9
4.	250	2,3	1433	1,9
5.	121	2,3	1433	1,9
6.	114	2,2	1279	1,9
7.	119	2,2	1164	1,8
L:D 22:2 del/del				
1.	780	2,3	1383	1,9
2.	1081	2,3	1388	1,9
3.	366	2,3	1451	1,9
4.	587	2,3	1386	1,9
5.	653	2,3	1424	1,9
6.	319	2,2	940	1,9
7.	1079	2,3	1370	1,9
L:D 22:2 +/+				
1.	259	2,3	1012	1,9
2.	277	2,2	1361	1,9
3.	389	2,2	1064	1,9
4.	452	2,1	1410	1,9
5.	294	2,1	1545	1,9
6.	827	2,3	1410	1,9
7.	472	2,2	1416	1,9