

Pro Gradu -tutkielma

**Karaistumisen ja lisääntymisdiapaussin vaikutukset
Drosophila montana -mahlakärpästen
kylmänkestävyyteen**

Marjaana Myllylä



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Evoluutiogenetiikka

25.5.2011

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Ekologia ja evoluutiobiologia

MYLLYLÄ, M. : Karaistumisen ja lisääntymisdiapaussin vaikutukset *Drosophila montana* -mahlakärpäslajin kylmänkestävyyteen

Pro Gradu –tutkielma: 26 s.
Työn ohjaajat: Prof. Anneli Hoikkala, FM Laura Vesala
Tarkastajat: Prof. Janne Kotiaho, Prof. Leena Lindström
Toukokuu 2011

Hakusanat: *Drosophila*, chill coma recovery time, kylmäkooma, lepokausi

TIIVISTELMÄ

Kylmyys on yksi tärkeimmistä lajien levinneisyyteen ja runsauteen vaikuttavista stressitekijöistä. Karaistuminen ja lisääntymisdiapaussi ovat esimerkkejä hyönteisten fysiologisesta ja biokemiallisesta sopeutumista mataliin lämpötiloihin. Karaistumisella tarkoitetaan lyhyen ajan sisällä tapahtuvaa kylmänkestävyyden kasvamista, ja sillä voi olla huomattava vaikutus kylmistä olosuhteista selviytymiseen. Lisääntymisdiapaussin laukaisee ympäristöstä tulevat ärsykkeet, kuten muutokset päivän pituudessa ja lämpötilassa. Se parantaa naaraiden mahdollisuuksia selvitä epäedullisista vuodenaajoista ja siirtää jälkeläisten tuoton ajankohtaan jolloin munien ja jälkeläisten selviytyminen on parhaimmillaan. Tämän työn tavoitteena oli etsiä sopivat lämpötilat ja käsittelyajat *Drosophila montana* -mahlakärpästen kylmänkestävyyden mittaamiseen ja selvittää vaikuttavatko lyhytaikainen karaistuminen ja lisääntymisdiapaussi naaraiden ja koiraiden kylmänkestävyyteen. Tutkimuslajina käytettiin *D. montana* -lajia, joka on sopeutunut talvehtimaan pohjoisissa luonnonoloissa. Kärpästen kylmänkestävyyttä tutkittiin mittaamalla niiden kylmäkoomasta selviytymiseen kuluva aika. Tutkittavia yksilöitä pidettiin aluksi kaksi viikkoa kasvatuskaapeissa (+16 °C), joista toisessa oli jatkuva valaistus ja toisessa lisääntymisdiapaussin laukaiseva valojakso 16:8 (16 tuntia valoa ja 8 tuntia pimeää). Ennen kylmänkestävyyskoetta puolet yksilöistä sai karaistumiskäsittelyn (1 tunti 0 °C:ssa). Varsinaiset kylmänkestävyyskokeet kestivät 16 tuntia ja ne tehtiin kolmessa eri lämpötilassa (-6 °C, -7 °C ja -8 °C). Tämän tutkimuksen perusteella voitiin päätellä, että *Drosophila montanan* kylmäkoomasta selviämiseen kuluva aika voidaan parhaiten mitata -6 °C:ssa altistusajan ollessa 16 tuntia. Tämä lämpötila oli riittävä käsittelyjen välisten erojen selvittämiseksi, mutta ei liian rankka kärpästen selviytymisen kannalta. Tutkimuksen perusteella lisääntymisdiapaussi parantaa naaraiden ja samoissa olosuhteissa kasvatettujen koiraiden kylmänkestävyyttä, karaistumisen vaikutuksen ollessa selkein naarailta, jotka eivät ole diapaussissa. Diapaussin ja karaistumisen aikaansaamat muutokset kärpäsen fysiologiassa voivat olla samankaltaisia, ja näin karaistumisen antama lisähyöty on lähes olematonta tai sattumanvaraista lisääntymisdiapaussissa oleville yksilöille.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science

Ecology and Evolutionary Biology

MYLLYLÄ, M.: Effects of cold hardening and reproductive diapause on cold tolerance in *Drosophila montana*

Master of Science Thesis: 26 p.

Supervisors: Prof. Anneli Hoikkala, MSc Laura Vesala

Inspectors: Prof. Janne Kotiaho, Prof. Leena Lindström

May 2011

Key Words: *Drosophila*, chill coma recovery time, chill-coma

ABSTRACT

Coldness is one of the most important stress factors influencing the distribution and abundance of the species. Cold hardening and reproductive diapause are examples of insects' physiological and biochemical adaptations to low temperatures. Cold hardening, i.e. a rapid increase in cold tolerance in cool temperature, can significantly improve insects' chances to survive in cold conditions. The adult reproductive diapause is induced by changes in environmental conditions such as fluctuations in the daily rhythms of light and temperature. It increases the chances of the females to survive over the unfavourable seasons and transfers their progeny production to a season, when the survival of the eggs and the emerging offspring is at its best. The aim of this work was to search for suitable temperatures and treatment times for measuring the cold hardiness of *D. montana* flies and to find out whether a short-term cold hardening and the maintenance of flies in the diapause inducing conditions affect the cold tolerance of females and males. As a study species we used *Drosophila montana*, which has adapted to overwinter in northern environmental conditions. The cold hardiness of the flies of this species was studied by measuring their chill coma recovery time. The flies were first kept for two weeks at 16 °C in two climate chambers, one of which had a photoperiod of 16 hours light and 8 hours dark (16:8) and the second one a continuous lighting. Before the cold treatment, half of the flies were cold hardened by keeping them on ice at 0 °C for one hour. The cold treatments were performed in -6 °C, -7 °C, -8 °C and they lasted for 16 hours. According to this study the best test temperature for measuring the cold tolerance of *Drosophila montana* flies was -6 °C, with an exposure time of 16 hours. This treatment was sufficient for detecting differences between the treatment groups, but not too hard for the flies themselves. Culturing the flies in conditions, which induce reproductive diapause in females, was found to improve the cold tolerance of both sexes, while the effects of cold hardening were most clear in females that were not in diapause. Changes in the physiology of the flies caused by diapause and cold hardening might be similar to each other so that the cold hardening does not produce extra benefits for the diapausing flies.

Sisältö

1. JOHDANTO	5
1.1. Kylmänkestävyyden fysiologiaa	5
1.2. Karaistuminen ja karaistumisen mekanismit	6
1.2.1. Jäätymiseltä suojaavat aineet (Kryoprotektantit)	6
1.2.2. Stressiproteiinit	7
1.2.3. Muutokset solukalvojen rasvahappokoostumuksessa	7
1.3. Diapaussi ja kylmänkestävyys	8
1.3.1. Diapaussin ja kylmänkestävyyden välinen yhteys	8
1.3.2. Koiraiden lisääntymisdiapaussi	9
1.3.3. <i>Drosophila</i> -lajien diapaussi	9
1.4. Hyönteisten kylmänkestävyyden tutkimiseen käytetyt menetelmät	10
1.5. Työn tarkoitus	10
2. AINEISTO JA MENETELMÄT	10
2.1. Tutkimuslaji	10
2.2. Esikoe	11
2.3. Kylmänkestävyyskoe	11
2.4. Aineiston analysointi	12
3. TULOKSET	13
3.1. Kärpästen kuolleisuus kylmänkestävyyskokeiden aikana	13
3.2. Kylmäkoomasta selviytymiseen kuluva aika (chill coma recovery time)	15
4. TULOSTEN TARKASTELU	18
4.1. Kylmänkestävyyden mittaaminen	18
4.2. Karaistumisen vaikutus kärpästen kylmänkestävyyteen	18
4.3. Diapaussin vaikutus kylmänkestävyyteen	19
4.4. Yhteenveto ja käytännön huomioita	20
4.5. Tulevaisuus	21
Kirjallisuus	22
Liite 1	26
Liite 2	26

1. JOHDANTO

1.1. Kylmänkestävyyden fysiologiaa

Lämpötila on yksi tärkeimmistä lajien levinneisyyteen ja runsauteen vaikuttavista tekijöistä (Cossins & Bowler 1987), joten sopeutuminen lämpötilan muutokseen on tärkeää kaikkien elävien organismien selviytymisen kannalta. Useimmille eliöille, jotka ovat sopeutuneet elämään kylmillä alueilla, on kehittynyt keinoja selvitä pitkistä ja ankarista talvista. Kylmyys aiheuttaa muun muassa entsyymitoiminnan hidastumista, muutoksia proteiinien tertiärrakenteessa sekä polypeptidi-alayksikköjen hajoamista (Denlinger & Lee 1991), mistä johtuva proteiinien denaturaatio voi olla peruuttamatonta (Morris & Clarke 1987). Jossain vaiheessa kylmyys voi saada aikaan solukalvon muuttumisen nestemäisestä geelimäiseksi, mikä aiheuttaa suuria muutoksia solukalvon rakenteessa ja läpäisevyydessä sekä solukalvoon liittyvien entsyymien aktiivisuudessa (Quinn 1985, Hazel 1995).

Matalat lämpötilat aiheuttavat erityisiä haasteita vaihtolämpöisille hyönteisille. Alhainen lämpötila vaikuttaa hyönteisten kehittymiseen ja selviytymiseen useissa kehitysvaiheissa: se voi vaikuttaa aikuisten kokoon, toukkavaiheiden määrään, kudosten erilaistumiseen sekä sukupuolijakaumaan (Denlinger & Lee 1991). Kaikkein herkin alue kylmyydelle on hyönteisten lisääntymisjärjestelmä. Vaikka matalan lämpötilan aiheuttamat vauriot ovat korkeiden lämpötilojen aiheuttamiin vaurioihin verrattuna pienempiä, voi sekä koiraiden että naaraiden hedelmällisyys olla heikentynyt kylmäkäsittelyn jälkeen (Denlinger & Lee 1991). Esimerkiksi huonekärpäsnaaraat (*Musca domestica*), jotka ovat saaneet kylmäkäsittelyn, tuottavat vähemmän munia elinaikanaan kuin naaraat, jotka eivät ole saaneet tätä käsittelyä (Coulson & Bale 1991). Naaraiden heikentyneen jälkeläistuoton havaittiin edellä mainitussa tutkimuksessa olevan seurausta sekä lyhyemmästä eliniästä että vähentyneestä munamäärästä. Lisäksi kylmäkäsittelyn saaneiden naaraiden munien elinkykyisyys oli matalampi kuin ilman käsittelyä olleiden naaraiden.

Hyönteisille suurin alhaisen lämpötilan aiheuttama haitta on jäätyminen, sillä pienten vaihtolämpöisten hyönteisten ruumista noin 70 % on vettä. Hyönteisillä on useita keinoja puolustautua tällaisia haittoja vastaan. Usein ensimmäinen puolustuskeino matalia lämpötiloja vastaan on käyttäytymisvaste, joka ohjaa talvehtivan hyönteisen lämpimämpään mikroilmastoon suojaan tai muuttomatalle etelään. Lämpimän suojapaikan lisäksi hyönteisillä on useita fysiologisia mekanismeja suojautua alhaisten lämpötilojen aiheuttamilta vaurioilta. Sukupuolen merkitys kylmänsietoon vaihtelee eri tutkimusten välillä. Useimmissa tutkimuksissa sukupuolella ei ole vaikutusta kylmänkestävyyteen (Czajka & Lee 1990, Gibert ym. 2001), mutta muutamissa *D. melanogaster* -lajilla tehdyissä kokeissa koiraiden kylmänkestävyys oli hiukan huonompi kuin naaraiden (David ym. 1998, Gibert & Huey 2001). Kylmänkestävyys voi myös vaihdella iän mukaan, vaikka lajien välillä on tässä muuntelua (Fukatami, 1984). Hyönteisen kylmänkestävyyteen vaikuttavat myös yksilön kehitysaste, karaistuminen ja erilaiset lepovaiheet kuten lisääntymisdiapaussi. Lisäksi kylmästä selviytyminen riippuu sekä lämpötilasta että ajasta, joka joudutaan viettämään epäsuotuisan matalassa lämpötilassa (Denlinger & Lee 1991).

Hyönteisillä hermo-lihasliitosjärjestelmän toiminta on erittäin herkkä kylmyyden vaikutuksille. Lämpötilaa, jossa hyönteiset menettävät kykynsä kävellä ja seistä lihasten ja hermojen menettäessä kykynsä vastaanottaa sähköisiä impulsseja, kutsutaan kylmäkoomapisteeksi (Denlinger & Lee 1991). Lyhyistä kylmäkoomakäsittelyistä aiheutuvat vauriot ovat palautuvia, mutta toistuvat altistukset voivat vaurioittaa neuronien

toimintakykyä pysyvästi. Kylmäkäsittelyn saaneet lihakärpäsen (*Sarcophaga crassipalpis*) nuoruusvaiheen aikuiset (pharate adults) onnistuvat poistumaan koteloistaan, syömään ja parittelemaan, mutta eivät lisääntymään normaalisti (Denlinger & Lee 1991). Useita kylmäkoomakäsittelyjä saaneet lihakärpäset (*Sarcophaga crassipalpis*) eivät sen sijaan onnistu lainkaan poistumaan koteloistaan (Yocum ym. 1994).

1.2. Karaistuminen ja karaistumisen mekanismit

Pohjoiseen levinneet, alhaisia lämpötiloja hyvin kestävät hyönteiset eivät välttämättä ole kylmänkestäviä kesäisin, jolloin ne ovat aktiivisimmillaan. Kylmään karaistuminen voi tapahtua hyvin nopeasti lämpötilan ollessa alhainen muutamia minuutteja tai tunteja, mutta sen kehittymiseen voi myös kulua useita viikkoja (Clark & Worland 2008). Nopea karaistuminen mukauttaa nopeasti hyönteisen fysiologian lämpötilan muutoksiin, ja sen aikana tapahtuvat muutokset ovat yleensä palautuvia. Sen onkin ajateltu olevan erityisen tärkeää lajeille, jotka esiintyvät alueilla, joissa saattaa keväisin ja syksyisin esiintyä nopeita ja suuria lämpötilanvaihteluita (Czajka & Lee 1990). Esimerkiksi +25 °C:ssa kasvatetut *S. crassipalpis* -nuoruusvaiheen aikuiset eivät selviä kahden tunnin altistuksesta -10 °C:ssa, mutta yksilöiden pitäminen ennen altistusta vähintään 10 minuuttia 0 °C:ssa parantaa huomattavasti niiden selviytymistä (Lee ym. 1987). Vastaavanlaisesti surviaissääskiin kuuluva *Belgica Antarctica* -lajin toukka ei selviä 24 tunnin altistuksesta -20 °C:ssa, mutta tunnin karaistuminen -5 °C:ssa ennen altistusta parantaa toukkien selviytymistä yli 75 %:a (Lee ym. 2006). Hitaalla karaistumisella eli akklimaatiolla tarkoitetaan tilannetta, jossa hyönteisten talvehtivista muodoista tulee syksyllä lämpötilan laskiessa kylmänkestävämpiä (Denlinger & Lee 1991), ja se aiheuttaa sekä palautuvia että palautumattomia fysiologisia muutoksia (Hoffmann ym. 2003). Kylmäkaraistumisen fysiologinen tausta on vielä epäselvä, mutta ainakin kryoprotektanttien (jäätymiseltä suojaavien yhdisteiden), stressiproteiinien ja solun kalvojen rakenteessa tapahtuvien nopeiden muutosten arvellaan olevan siinä keskeisessä asemassa (Overgaard ym. 2005).

1.2.1. Jäätymiseltä suojaavat aineet (Kryoprotektantit)

Talvehtivat hyönteiset tuottavat poikkeuksellisen suuria pitoisuuksia molekyylimassaltaan pieniä yhdisteitä, kryoprotektantteja (Denlinger & Lee 1991). Näitä solun sisäisiä, jäätymiseltä suojaavia aineita on kahdenlaisia; kolligatiivisia ja ei-kolligatiivisia. Kolligatiiviset kryoprotektantit esiintyvät suurina pitoisuuksina ja nostavat ruumiinnesteiden osmoottista konsentraatiota estäen veden poistumisen solusta kohti ulkopuolen pienempää vesipitoisuutta (Willmer ym. 2000). Samalla ne laskevat yksilön ylijäähtymispistettä (SCP, supercooling point) eli lämpötilaa, jossa hyönteisen ruumiinnesteet kiteytyvät (jäätävät) spontaanisti (Lee ym. 1987). Tavallisimpia kolligatiivisia suoja-aineita ovat polyolit ja sokerit, jotka ovat suurissakin pitoisuuksissa eliöille vaarattomia ja metabolisesti reagoimattomia. Glyseroli on yleisin tällainen aine, mutta myös sorbitolia ja ribitolia esiintyy. Chenin ym. (1987) tutkimuksen mukaan glyserolipitoisuus kasvaa erittäin nopeasti karaistumisen aikana, ja tämä saattaa selittää suurimman osan ainakin lihakärpästen kryoprotektantisesta vasteesta. Esimerkiksi *S. crassipalpis* -lihakärpäsen altistaminen kahdeksi tunniksi 0 °C:een nostaa kärpäsen glyserolitason lähes kolminkertaiseksi. Glyserolin merkitys on kuitenkin epäselvä nopeassa karaistumisessa, sillä Keltyn ja Leen (1999) tekemässä kokeessa glyserolin määrä ei lainkaan noussut karaistumiskäsittelyn (2 h; +1 °C) saaneilla *D. melanogaster* -yksilöillä.

Ei-kolligatiiviset jäätymiseltä suojaavat aineet (non-colligative cryoprotectants) esiintyvät tavallisesti pieninä pitoisuuksina. Ne korvaavat veden vähentyessä rakenteellisen veden, ja siten estävät kalvojen fuusioitumista, proteiinien denaturoitumista ja solun

kuivumista. Hyönteisillä yleisimpiä tällaisia suoja-aineita ovat trehaloosi ja proliini (Willmer ym. 2000).

1.2.2. Stressiproteiinit

Yksilöt altistuvat säännöllisesti fysikaalisille ja kemiallisille stressitekijöille kuten kuumalle ja kylmälle lämpötilalle, hapenpuutteelle, säteilylle, erilaisille kemikaaleille ja mekaaniselle kuormitukselle. Poikkeavien ympäristöolosuhteiden seurauksena useiden geenien toiminta vähenee, kun taas lämpöshokki- (heat-shock, Hsp) eli stressiproteiinien tuotanto lisääntyy ja merkitys korostuu (Niemi ym. 1994, Willmer ym. 2000). Hsp-proteiineja kutsutaan myös kaperoneiksi (molecular chaperones). Ne toimivat eräänlaisina avustajina muuttaessaan muiden proteiinien rakennetta ja niillä on kyky korjata stressin seurauksena vaurioituneita proteiineja sekä parantaa solun elinkykyä. Stressitilanteiden ohella lämpöshokkiproteiineilla on tärkeä tehtävä solun normaalitoiminnoissa muun muassa proteiinien laskostuksessa ja kuljetuksessa ja lisäksi ne estävät proteiinien yhteenkertymistä eli aggregoitumista (Niemi ym. 1994, Willmer ym. 2000, Heino & Vuento 2002). Kaikkein merkittävin Hsp-ryhmä sekä kuuma- että kylmähokkin kannalta on Hsp70-proteiiniperhe (Denlinger & Lee 1991). Eukaryoottisolussa Hsp70-proteiineja on paitsi endoplasmakalvostossa, myös tumassa, sytoplasmassa ja mitokondrioissa (Heino & Vuento 2002).

Hyönteisen altistuminen kylmälle vaikuttaa stressiproteiinien tuottamiseen eri tavalla kuin altistus kuumalle. Kylmälle altistuttaessa stressiproteiineja tuotetaan vasta kylmähokista palautumisen aikana ja niiden tuotanto voi jatkua useita päiviä (Denlinger & Lee 1991). Hsp70-proteiinien tuotannosta kylmälle altistuksen jälkeen on kuitenkin ristiriitaisia tutkimustuloksia. Keltyn ja Leen (2001) ja Overgaardin ym. (2005) *D. melanogaster* -lajilla tekemissä tutkimuksissa nopean karaistumisen tai kylmähokkin jälkeen ei ollut havaittavissa lisääntynyttä Hsp70-proteiinien tuotantoa. Muissa *D. melanogaster* -lajille tehdyissä tutkimuksissa on havaittu, että vähintään 8 tunnin kylmäaltistus 0 °C:ssa lisää Hsp70-proteiinituotantoa, mutta huomattavasti vähemmän kuin kuuma-altistus (Burton ym. 1988, Goto & Kimura 1998, Sejerkilde ym. 2003). Voidaankin olettaa että proteiinien denaturaatio tai aggregaatio, ja täten Hsp70-proteiinien tuotanto ei todennäköisesti ole suora vaste suhteellisen lievään (1h -6 °C:ssa) kylmäaltistukseen. Sen sijaan Hsp70-proteiinien lisääntynyt tuotanto voi johtua lämpenemisestä kun yksilö palautuu normaaliin lämpötilaan (Hayward ym. 2004).

1.2.3. Muutokset solukalvojen rasvahappokoostumuksessa

Solukalvojen fosfolipidien rasvahappokoostumuksessa (phospholipid fatty acid, PLFA) tapahtuu usein kylmän vaikutuksesta muutoksia. Kalvot ovat normaalisti nestekidefaasimuodossa ja muuntuvat geelifaasimuotoon lämpötilan laskiessa (Thrieringer 1998). Tällöin ne voivat osittain menettää valikoivat läpäisyominaisuutensa (Cossins & Raynard 1987, Hazel 1995), mikä voi johtaa muun muassa solunsisäisten rasvojen, proteiinien ja ionien häviämiseen solusta ja haitallisten natrium- ja kalsiumionien kulkeutumiseen solun sisään (Watson & Morris 1987). Useat organismit kykenevät kompensoimaan nestekidefaasin muuttumista geelifaasiksi muuttamalla kalvon fosfolipidien hiilivetyketjujen (rasvahappojen) tyydyttyneisyysastetta (Thrieringer 1998). Lämpötilan laskiessa solukalvojen juoksevuus ensin vähenee, mutta elion alkaessa tuottaa tyydyttymättömiä rasvahappoja juoksevuus jälleen paranee, koska tyydyttymättömillä rasvahapoilla on alhaisempi sulamispiste ja parempi juoksevuus kuin tyydyttyneitä rasvahappoja sisältävillä fosfolipideillä (Thrieringer 1998). Tällaista ilmiötä, jonka toiminta perustuu rasvahappoihin ja steroleihin vaikuttavien entsyymien (saturaasit ja desaturaasit) synteesin muutoksiin, kutsutaan homeoviskoosiseksi adaptaatioksi.

Homeoviskoosinen adaptaatio pyrkii siis pitämään solukalvojen juoksevuuden samanlaisena lämpötilan vaihdellessa (Willmer ym. 2000).

Useat eri tutkimukset ovat osoittaneet, että kausittaiset vaihtelut hyönteisten kylmänkestävyydessä ovat yhteydessä fosfolipidien rasvahappokoostumuksessa tapahtuviin muutoksiin (Bennett ym. 1997, Kostal & Simek 1998, Ohtsu ym. 1998), niin että kylmän vaikutuksesta tyydyttymättömien rasvahappojen määrä kasvaa PLFA:ssa. Hyönteisillä tämä muutos näyttää olevan pienempi kuin muilla vaihtolämpöisillä eläimillä (Hazel & Landrey 1988, Suutari ym. 1997) ja PLFA:n koostumuksessa tapahtuvissa muutoksissa voi myös olla vaihtelua eri kudosten välillä (Baldus & Mutchmore 1988, Kostal & Simek 1998). Myös valojaksolla on todettu olevan vahva vaikutus PLFA:n koostumukseen (Ohtsu ym. 1998, Hodkova ym. 2002). Overgaardin ym. (2005) *D. melanogaster* -lajilla tehdyn tutkimuksen mukaan nopean karaistumisen (5h ja 10 min.) aiheuttamat muutokset kasvattivat tyydyttymättömien rasvahappojen määrää solukalvolla. Vaikka muutokset PLFA:n koostumuksessa olivat pieniä, niin olivat ne sopusoinnussa nopean karaistumisen aikaansaaman parantuneen kylmänkestävyyden kanssa.

1.3. Diapaussi ja kylmänkestävyys

1.3.1. Diapaussin ja kylmänkestävyyden välinen yhteys

Useimmat lauhkean vyöhykkeen hyönteiset altistuvat kaikkein kylmimmille lämpötiloille talvehtiessään diapaussissa (lepokausi) (Denlinger & Lee 1991), jonka laukaisevat ympäristöstä tulevat ärsykkeet kuten muutokset päivän pituudessa ja lämpötilassa. Yleensä hyönteiset siirtyvät lepovaiheeseen eli diapaussiin vain yhdessä kehitysvaiheessa, mutta jotkin lajit voivat olla diapaussissa myös useissa eri kehitysvaiheissaan (muna, toukka, kotelo tai aikuinen).

Diapaussin tyypillisimpiä ominaisuuksia ovat aineenvaihdunnan hidastuminen ja suolen tyhjentyminen, ja nämä piirteet voivat myös vaikuttaa kylmänkestävyyteen (Denlinger 1991). Diapaussi itsessään ei kuitenkaan välttämättä nosta hyönteisten kylmänkestävyyttä; hyönteisten diapaussi ei ole nimittäin rajoittunut ainoastaan lauhkeille tai kylmille vyöhykkeille, eikä se ole aina kytköksissä talveen. Diapaussin ja kylmänkestävyyden välillä voi olla sattumanvarainen yhteys, tai kylmänkestävyys voi olla osa diapaussia. Yhteyttä pidetään sattumanvaraisena, jos eri ympäristöstä tulevat ärsykkeet säätelevät niitä. Esimerkiksi maissikoisan toukka (*Ostrinia nubilalis*) menee diapaussiin päivän lyhentyessä, mutta muuttuu kylmänkestäväksi vasta lämpötilan laskiessa. Erilliset ympäristökijät ohjaavat siis näitä kahta tapahtumaa, vaikka ne ilmenevätkin samanaikaisesti (Denlinger & Lee 1991). *S. bullata* ja *S. crassipalpis* lihakarpäset ovat hyviä esimerkkejä lajeista, joilla lisääntynyt kylmänkestävyys on osa diapaussia eikä erillistä kylmänkestävyyden laukaisevaa ympäristökijää tarvita. Esim. *S. crassipalpis* -lajilla vain kotelovaiheen diapaussissa olevat selviävät lämpötiloista, jotka ovat lähellä sen SCP:tä (-23 °C) jopa useita päiviä, kun taas samaisen ylijäähtymispisteen omaavat ei-diapaussissa olevat kotelot kuolevat -10 °C:ssa alle tunnissa (Lee & Denlinger 1985).

Monet hyönteislajit, mm. useimmat *Drosophila*-lajit, ovat diapaussissa vain aikuisvaiheessa. Aikuisvaiheen diapaussin eräs muoto on lisääntymisdiapaussi, joka siirtää hedelmöitymisen vuodenaikaan, jolloin munien ja jälkeläisten selviytyminen on parhaimmillaan, ja/tai auttaa selviytymistä epäedullisista vuodenaajoista (Pener 1992). Lisääntymisdiapaussissa lisääntymispiirteiden kehitys pysähtyy vasteena muutoksiin päivän pituudessa. Naarailta ovarioiden eli munarauhasten kehitys viivästyy ja molemmilla sukupuolilla pariutumiskäyttäytyminen muuttuu lisääntymisdiapaussin ajaksi (Tatar & Yin 2001). Lisääntymisdiapaussissa olevat aikuiset voivat kuitenkin syödä ja pysyä melko aktiivisina. Tatarin ja Yinin (2001) *D. melanogaster* -lajilla tekemän

tutkimuksen mukaan lisääntymisdiapaussi hidastaa karpästen vanhenemista. Hitaaseen ikääntymiseen voikin liittyä kohonnutta stressin sietokykyä kuten myös resurssien uudelleen jakoa yksilön somaattisen eli fyysisen tilan säilyttämiseksi (Tatar & Yin 2001).

1.3.2. Koiraiden lisääntymisdiapaussi

Naaraiden lisääntymisdiapaussi on kuvattu ja fysiologisesti määritelty useilta hyönteislajeilta, mutta koiraiden kohdalla sen määrittäminen on usein vaikeaa. Muutamien lajien koiraille on kuitenkin pystytty määrittelemään selkeitä lisääntymisdiapaussin tuntomerkkejä: *Hypera postica* -kärpäskäiden lisääntymisdiapaussissa olevien koiraiden testikset eivät ole täysin kehittyneet (Ascerno ym. 1978), *Sepedon fuscipennis* -kärpästen spermatogeneesi eli siittiöiden kehittyminen testiksissä on pysähtynyt (Barnes 1976) ja *Danaus plexippus* -monarkkiperhosen apurauhasten kehitys on viivästynyt (Herman 1981). Toisilla lajeilla, kuten harsokorennolla (*Chrysopa carnea*), diapaussivaiheessa olevien koiraiden testikset ovat puolestaan täynnä siittiöitä (Macleod 1967).

Useiden hyönteislajien naaraat ovat valmiita lisääntymään vasta lisääntymisdiapaussin päätyttyä. Näillä lajeilla koiraatkin menevät usein joko heikkoon tai vahvaan lisääntymisdiapaussiin. Esimerkki koiraiden heikosta lisääntymisdiapaussista on *Oulema melanopus* -kovakuoriaisen diapaussi, jossa naaraan lisääntymisvaihe ohjaa koiraan seksuaalista aktiivisuutta (Conn ja Hoopingarner 1971). Useiden hyönteislajien koiraiden lisääntymisdiapaussia ohjaavat samat ympäristötekijät (valojakso ja lämpötila) ja sisäiset mekanismit kuin naaraiden diapaussia. Tällaisia lajeja ovat muun muassa heinäsiirkkoihin kuuluva *Oedipoda miniata*, joka viettää lisääntymisdiapaussissa kuivan ja kuumun kesän sekä kovakuoriaisiin kuuluva kosteikkosysikiitäjäinen (*Pterostichus nigrita*), joka puolestaan talvehtii lisääntymisdiapaussissa.

Pener (1992) on ehdottanut yleiseksi koiraiden lisääntymisdiapaussin määritelmäksi väliaikaisen ja palautuvan kykenemättömyyden hedelmöittää lisääntymiskykyisiä naaraita. Jos koira onnistuu parittelemaan vain harvoin tai kykenee siihen vain heikosti, se voi olla jonkinlaisessa lisääntymisdiapaussin ja täyden lisääntymisaktiivisuuden välitilassa. Tällaista välitilaa on kutsuttu osittaiseksi diapaussiksi, mutta paremmin kuvaava olisi alilisääntymistila (subreproductive state) (Pener 1992). Lisääntymisdiapaussiin liittyvät fysiologiset muutokset saattavat parantaa myös koiraiden mahdollisuuksia selvitä epäedullisista vuodenaajoista.

1.3.3. *Drosophila*-lajien diapaussi

Drosophila-lajeilla lisääntymisdiapaussi määritellään usein tauoksi naaraiden lisääntymispiirteiden kehittymisessä, koska *Drosophila*-koiraiden lisääntymisdiapaussista tai lisääntymisaktiivisuudesta tiedetään vasta vähän. Esim. *D. auraria* -lajiryhmään kuuluvan *D. triauraria* -lajin koiraiden paritteluaktiivisuus vähenee lyhyessä päivänpituudessa samalla kun naaraiden ovarioiden kehitys lakkaa (Kimura 1988), lyhyt päivänpituus nostaa myös koiraiden kylmänkestävyyttä (Higuchi ja Kimura 1985).

Koiraiden mahdolliseen diapaussiin viittaa myös Takashin (1992) tutkimus *Drosophila melanogaster* -lajiryhmän energian varastoinnista. Sen mukaan lisääntymisdiapaussissa olevat karpäset käyttävät talvehtiessään pääasiallisesti eri energiavarastoja kuin ei-diapaussissa olevat. Ne lauhkean vyöhykkeen lajit, jotka talvehtivat lisääntymisdiapaussissa (esim. *D. subauraria*, *D. biauraria*, *D. auraria*, *D. triauraria*) käyttävät paljon enemmän triasyyliglyserolia kuin glykogeenia energianlähteenä, päinvastoin kuin lämpimän-lauhkean vyöhykkeen lajit (*D. rufa*, *D. lutescens*).

1.4. Hyönteisten kylmänkestävyyden tutkimiseen käytetyt menetelmät

Hyönteisten kylmänkestävyyttä on tutkittu sekä karaistumisen kanssa että ilman karaistumista. Karaistumislämpötilat ovat yleensä 0 °C ja +11 °C välillä, ja altistusajat ovat vaihdelleet muutamasta tunnista useisiin viikkoihin (Hoffman ym. 2003). Hyönteisten kylmänkestävyyttä on tutkittu esimerkiksi määrittämällä lämpötila, jossa puolet (LT₅₀) tai tietty prosenttiosuus kärpäsisistä kuolee (Gibert ym. 2001, David ym. 2003, Kimura 2004) tai määrittelemällä ylijäähtymispiste (SCP, supercooling point) eli lämpötila, jossa hyönteisen ruumiinnesteet kiteytyvät spontaanisti (Lee & Denlinger 1985, Czajka & Lee 1990). Hyönteisten kylmänkestävyyttä voidaan myös tutkia mittaamalla kylmäkoomapiste eli lämpötila, jossa yksilö vaipuu kylmäkoomaan (Huey ym. 1992) ja/tai aika, joka hyönteiseltä kuluu kylmäkoomasta selviämiseen (Gibert ym. 2001).

Hyönteisten kylmäkooma johtuu siitä, että matalissa lämpötiloissa asteittaiset muutokset lihasten ja hermojen lepopotentiaaleissa haittaavat ionikanavien ja -pumppujen oikeanlaista toimintaa ja sähkövirran kulkua aktiopotentiaalin aikana. Kun ionien kuljetus solukalvon läpi hidastuu, solunsisäinen jännite ja ionigradietti laskevat, mikä laskee lihasten ja hermojen toimintakykyä ja johtaa lopulta kylmäkoomaan. Hoslerin ym. (2000) tutkimuksen mukaan hyönteisten alhaisin toiminnallinen lämpötila (kylmäkoomapiste) määräytyy sen kyvystä yllä pitää lepopotentiaalia. Tehokkuus lepopotentiaalin ylläpitämisessä ja siitä johtuen kyky torjua kylmäkoomaa vaihtelee lajien välillä. Kylmäkooma on ohimenevä tila ja hyönteisen toiminnot palautuvat ennalleen lämpötilan ollessa muutaman asteen kylmäkoomapistettä korkeampi (Hosler ym. 2000), mikäli kylmäkäsittely ei ole liian pitkä (Gibert ym. 2001, Gibert & Huey 2001). Kylmäkoomasta liikkumiskyvyn palautumiseen kuluva aika (chill coma recovery time) voidaankin pitää myös hyvänä kylmänkestävyyden mittarina (Gibert ym. 2001). Menetelmässä yksilöt altistetaan ensin lyhyiksi ajoiksi kylmälle (0 °C tai alhaisempi lämpötila), jonka jälkeen selviytymiseen kuluva aika mitataan huoneenlämmössä. Tämä selviytymisaika korreloi hyvin tutkittavien lajien levinneisyyden kanssa (David ym. 1998, 2003, Gibert ym. 2001, Kimura 2004).

1.5. Työn tarkoitus

Tämän työn tavoitteena oli etsiä sopivat lämpötilat ja käsittelyajat *Drosophila montana* -mahlakärpästen kylmänkestävyyden mittaamiseen kylmäkoomasta selviytymistä mittaavan kokeen ('chill coma recovery time') avulla. Lisäksi haluttiin selvittää vaikuttaako nopea karaistuminen ja lisääntymisdiapaussi ja/tai näiden yhdysvaikutus *Drosophila montana* -mahlakärpäslajin naaraiden tai koiraiden kylmänkestävyyteen. Tutkimuksen hypoteesina on, että nopea karaistuminen parantaa sekä naaraiden että koiraiden kylmänkestävyyttä, ja lisääntymisdiapaussi ainakin naaraiden kylmänkestävyyttä.

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1. Tutkimuslaji

Työssä käytettiin tutkimuslajina Drosophilidae-heimoon kuuluvaa *Drosophila montana* -lajia, joka on sopeutunut talvehtimaan pohjoisissa luonnonoloissa ja soveltuu hyvin kylmänkestävyyden tutkimiseen. Erityisesti *D. montana* naaraiden talvehtiminen lisääntymisdiapausissa tekee siitä mielenkiintoisen tutkimuskohteen. Työssä käytettiin laboratorio-oloissa kasvatettuja yksilöitä, joita oli pidetty jatkuvassa valossa mallaspuuroa sisältävissä muovisissa kasvatuspulloissa. Kasvatushuoneen lämpötila oli 19±1 °C ja

ilmankosteus 60 ± 10 %. Työssä käytetyt yksilöt olivat peräisin yhden Oulangalta (Suomi, 66°N) kesällä 2003 kerätyn naaraan jälkeläisistä koostuvasta linjasta (O3F77).

2.2. Esikoe

Ennen varsinaista kylmänkestävyyskoea tehtiin tutkittavan linjan (O3F77) naarailta esikoe, jonka tarkoituksena oli varmistaa, että valitut olosuhteet todella saavat naarat menemään lisääntymisdiapaussiin. Esikoea varten naarat eroteltiin koiraista mikroskoopin avulla, yksilöiden ollessa nukutettuna hiilidioksidikaasulla (CO_2). Erottelu pyrittiin tekemään mahdollisimman nopeasti, ettei hiilidioksidinukutuksella olisi vaikutusta karpästen elinkykyyn. Naarat eroteltiin koiraista heti kuoriutumisen jälkeen ja laitettiin Rosatan ja Kyriacoun mallaspuuroa (liite 1.) sisältäviin kasvatusputkiin, noin 13 naarasta putkea kohden. Kasvatusputkia pidettiin kaksi viikkoa kasvatuskaapeissa $+16^\circ\text{C}$:n lämpötilassa. Toisessa kasvatuskaapeista oli jatkuva valaistus ja toiseen oli ohjelmoitu valojakso 16:8 (16 tuntia valoa ja 8 tuntia pimeää). Aiemmissä tutkimuksissa on todettu, että suurin osa Oulangan populaatiosta peräisin olevista yksilöistä menee lisääntymisdiapaussiin kahdessa viikossa, kun valojakso on 16:8 ja lämpötila $+16^\circ\text{C}$ (Lehtovaara, Pro Gradu -työ, 2008), kun taas jatkuvassa valossa suurimmalle osalle naaraita kehittyy kypsät, lisääntymisvalmiit ovariot. Kahden viikon kuluttua molemmissa kaapeissa olleiden naaraiden (yhteensä 212 yksilöä) ovariot tutkittiin. Jatkuvassa valossa kasvatetuista naaraita noin 80 %:lla oli kypsät ovariot, mutta valojaksossa 16:8 kasvatettujen naaraiden ovarioiden kehitys oli pysähtynyt lähes kaikilla. Esikokeen tulosten perusteella varsinaisessa kokeessa kasvatusputkiin päätettiin lisätä vielä kuivahiivaa mallaspuuron päälle, jotta ravinnon puute ei hidastaisi naaraiden ovarioiden kehitystä.

2.3. Kylmänkestävyyskoe

Kylmänkestävyyskokeissa käytettiin kolmea eri lämpötilaa (-6°C , -7°C , -8°C). Lämpötila valittiin muilla *Drosophila*-lajeilla tehtyjen tutkimusten perusteella (Gilbert ym. 2001, David ym. 2003) ottaen huomioon, että *D. montana* -karpäset ovat erittäin kylmänkestäviä (Vesala, Gradu -työ 2007, suullinen tieto). Kussakin kylmänkestävyyskokeessa käytettiin 112-201 yksilöä (noin puolet naaraita ja puolet koiraita) ja kaikki lämpötilakäsittelyt toistettiin neljä kertaa. Lämpötilasta riippuen yksilömäärä oli siis yhteensä 628-694 yksilöä (noin puolet naaraita ja puolet koiraita) ja kaiken kaikkiaan 1951 yksilöä (taulukko 1.).

Karpäset eroteltiin mallaspuuroa (7-8 ml) sisältäviin kasvatusputkiin 1-2 vrk kuoriutumisen jälkeen, koirat ja naarat omiin putkiinsa. Kuhunkin putkeen pyrittiin laittamaan vähintään 10 karpästä. Karpäset kasvatettiin kahdessa lämpökaapissa samoin kuin esikoea varten. Valojaksossa 16:8 kasvatetuista naaraita 93,7 % oli diapaussissa (kehittymättömät ovariot) kun taas jatkuvassa valossa kasvatetuista naaraita 95,8 %:lla oli kypsät ovariot. Koirailta mahdollista diapaussia ei pystytty määrittämään, joten ne luokiteltiin samoissa olosuhteissa kasvatettujen naaraiden diapaussin mukaan. Valojaksossa 16:8 kasvatettuihin karpäsiin viitataan tästä eteenpäin diapaussissa olevina, ja jatkuvassa valossa kasvatettuihin ei-diapaussissa olevina.

Kahden viikon kuluttua molemmissa kaapeissa olleista naaraita ja koiraita puolet sai tunnin mittaisen karaistumiskäsittelyn. Käsitelystä karpäset laitettiin jäämurskalla täytettyyn laatikkoon, jonka lämpötila oli noin 0°C :ta. Ennen karaistumiskäsittelyä karpäset siirrettiin ilman nukutusta uusiin putkiin, jotka sisälsivät 3-4 ml 2 %:sta agarseosta (liite 1.). Seoksen tarkoitus oli antaa putkiin hiukan kosteutta, jotta mahdollinen kuivuminen ei aiheuttaisi kuolemista kylmäkäsitelystä aikana. Seoksen päälle laitettiin vielä

imupaperit, etteivät karpäset tartu seokseen kiinni. Varsinaisessa kylmänkestävyyskokeessa kaikki karpäset vaihdettiin uusiin agarputkiin ja laitettiin joko $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ tai $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ kylmäkaappiin (taulukko 1.). 16 tunnin kuluttua karpästen kylmänkestävyys mitattiin kylmäkoomasta selviytymiseen kuluvana aikana (David ym. 1998, Gibert ym. 2001). Käytännössä kylmänkestävyyden mittaaminen tehtiin huoneenlämmössä ($23\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) kannellisilla petrimaljoilla, joilla karpästen heräämistä oli helppo havainnoida. Karpästen katsottiin selvinneen kylmäkoomasta, kun ne joko kävelivät tai seisoivat. Heräämisajat merkittiin muistiin kahden desimaalin tarkkuudella. Kaikkien kokeiden maksimikesto oli 20 minuuttia: karpänen merkittiin kuolleeksi, jos se ei tässä ajassa osoittanut elonmerkkejä. Kuolleiden karpästen määrä eri käsittelyissä ja lämpötiloissa merkittiin muistiin jatkoanalyysija varten. Jokainen lämpötiläkäsittely toistettiin neljä kertaa. Kokeiden jälkeen kaikkien naaraiden ovarioiden kehitysaste tarkastettiin.

Taulukko 1. Kokeessa käytetyt käsittelyt ja yksilömäärät. Yksilömäärissä ovat mukana kaikki toistot.

Valojakso	Käsittely	Suku­puoli	Lämpötila		
			$-6\text{ }^{\circ}\text{C}$	$-7\text{ }^{\circ}\text{C}$	$-8\text{ }^{\circ}\text{C}$
Diapaussi 16 h valoa/ 8 h pimeää 16 $^{\circ}\text{C}$	Karaistuneet	koiraat (putki 1&2)	71 (n)	81 (n)	88 (n)
		naaraat (putki 1&2)	82	76	82
Ei karaistumista	Ei karaistumista	koiraat (putki 1&2)	71	71	86
		naaraat (putki 1&2)	78	80	91
Ei diapaussia, Jatkuva valo 16 $^{\circ}\text{C}$	Karaistuneet	koiraat (putki 1&2)	73	73	82
		naaraat (putki 1&2)	81	92	93
Ei karaistumista	Ei karaistumista	koiraat (putki 1&2)	88	86	84
		naaraat (putki 1&2)	84	70	88
Yhteensä			628	629	694

2.4. Aineiston analysointi

Kaikki tilastolliset analyysit tehtiin SPSS 14.0 -ohjelmalla. Kuolleisuusaineiston analysoinnissa käytettiin log-lineaarista logit-mallia ja ristiintaulukointia. Kylmänkestävyyskoeaineiston analysoinnissa käytettiin parametrista hierarkkista varianssianalyysiä (nested ANOVA) muuttujien mahdollisten yhdysvaikutusten havaitsemiseksi.

Kuolleisuusaineiston analysointi aloitettiin logit-mallilla, jolla voidaan tehdä riippuvuustarkasteluja yhden selitettävän muuttujan ja useiden selittävien muuttujien välillä. Tässä tutkimuksessa selitettävä muuttuja oli selviytyminen (elossa/kuollut) ja selittävinä tekijöinä olivat tarkasteltavat muuttujat (päävaikutukset); valojakso (diapaussi/ei-diapaussi), karaistuminen (karaistunut/ei-karaistunut), sukupuoli (naaras/koiras) ja niiden yhdysvaikutukset. Sopivan mallin etsintä aloitettiin ottamalla mukaan kaikki mahdolliset pää- ja yhdysvaikutukset ja katsottiin mallin sopivuus ($p>0,05$). Tämän jälkeen ei-merkitseviä pää- ja yhdysvaikutuksia poistettiin yksitellen mallista p-arvon mukaisessa järjestyksessä suurimmasta alkaen. Poistaminen aloitettiin monimutkaisimmista eli tässä analyysissa kaksisuuntaisista yhdysvaikutuksista. Jokaisen vaikutuksen poistamisen jälkeen mallin sopivuus tarkastettiin. Yhdysvaikutuksen ollessa merkitsevä ($p<0,05$) poistettiin suurin päävaikutus ($p>0,05$) mikäli se ei ollut mukana yhdysvaikutuksessa. Lopulliseen malliin saattoi siis myös jäädä yhdysvaikutuksessa mukana olevia ei-merkitseviä päävaikutuksia. Lopuksi mallissa oli enää mukana ne

muuttujat, jotka vaikuttivat selitettävään muuttujaan eli tässä tapauksessa selviytymiseen. Logit-mallilla on mahdollista selvittää myös tarkempi riippuvuuden suunta (millaista riippuvuus on), mutta tässä työssä se tutkittiin ristiintaulukoinnin avulla selkeyden ja ajansäästämisen vuoksi. Kylmänkestävyyskoeaineisto täytti vain osittain parametristen testien oletukset; normaalisuuskäyriä tarkastelemalla sen voitiin todeta olevan lähes normaalisti jakautunut, mutta varianssien yhtäsuuruus ei ollut voimassa yhdessäkään lämpötilassa johtuen toistojen välisestä muuntelusta. Koska varianssien yhtäsuuruusoletus ei toteutunut, aineistolle tehtiin jäännöstarkastelu sellaisen varianssin havaitsemiseksi, jota ei pystytä selittämään tutkittavien muuttujien avulla. Eri lämpötilojen jäännöksissä eli residuaaleissa ei ollut merkitseviä eroja käsittelyiden välillä, joten analysointi voitiin tehdä parametrisella testillä (nested ANOVA) käyttäen kriittisempää tarkastelua ($p < 0,01$) (FT Kari Nissinen, Jyväskylän yliopisto, suull. tiedonanto). Hierarkkisessa varianssianalyyssissä (nested ANOVA) riippuvana muuttujana (dependent variable) oli selviytymisaika (min), riippumattomina muuttujina (fixed factors) diapaussi, karaistuminen ja sukupuoli sekä satunnaismuuttujana (random factor) putki. Myös toistot olivat mukana havaintomatriisissa (design-ikkuna) satunnaismuuttujan alla hierarkkisessa yhdysvaikutuksessa muiden riippumattomien muuttujien kanssa (liite 2.).

3. TULOKSET

3.1. Kärpästen kuolleisuus kylmänkestävyyskokeiden aikana

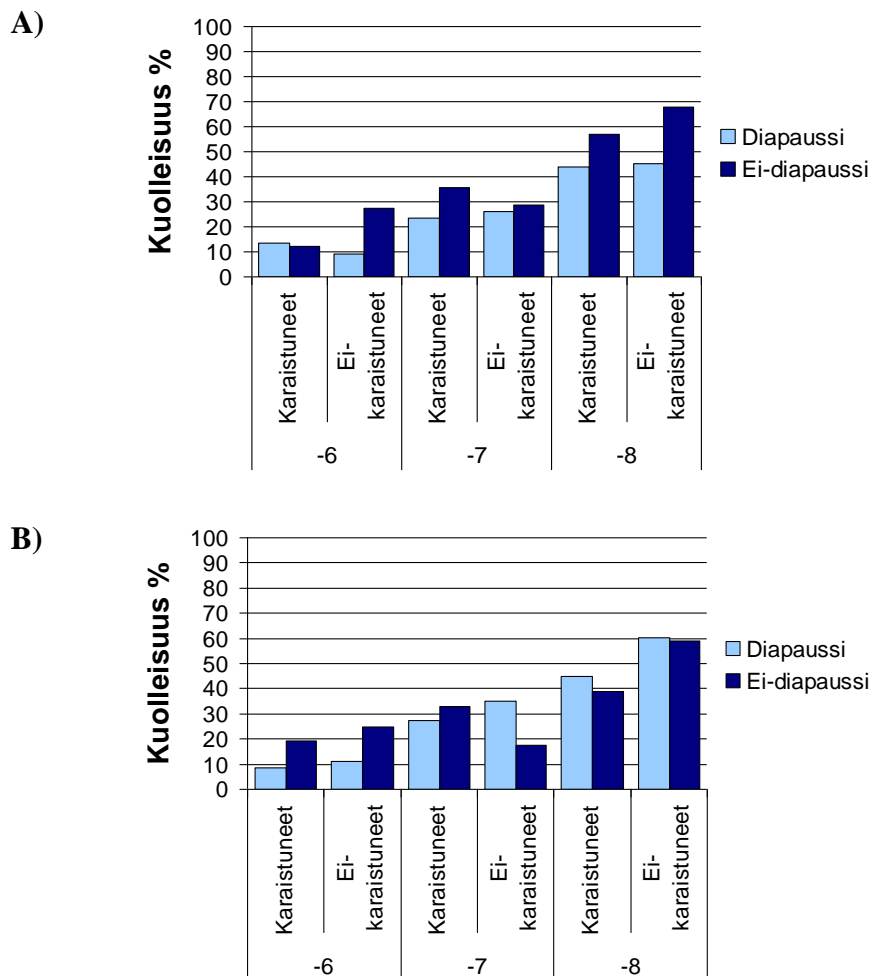
Kylmänkestävyyskokeissa kärpästen kuolleisuus kasvoi koelämpötilan mukaan seuraavasti: -6 °C :ssa kuolleisuus oli 16,1 %, -7 °C :ssa 28,3 % ja -8 °C :ssa 52,1 %. Kuolleisuus oli samaa luokkaa molemmilla sukupuolilla (taulukko 2.). Kärpästen selviytymiseen kylmänkestävyyskokeissa vaikutti logit-mallin mukaan eri lämpötiloissa eri tekijät.

-6 °C :n koelämpötilassa kärpästen selviytymiseen vaikutti lähinnä se, oliko ne kasvatettu diapaussin laukaisevissa olosuhteissa vai ei ($N=626$, $D=8,210$ $df=6$, $p=0,223$). Jatkoselvitys ristiintaulukoinnin avulla paljasti, että ei-karaistuneilla yksilöillä diapaussi vähensi kuolleisuutta merkitsevästi molemmilla sukupuolilla ($N=320$, $\chi^2=13,414$, $df=1$, $p < 0,001$). Karaistuminen ei tuonut lisähyötyä diapaussissa oleville yksilöille ($N=300$, $\chi^2=0,087$, $df=1$, $p=0,769$), mutta se paransi merkittävästi ei-diapaussissa olevien kärpästen kylmänkestävyyttä ($N=326$, $\chi^2=5,449$, $df=1$, $p=0,02$) (taulukko 2., kuva 1.). -7 °C :n koelämpötilassa kärpästen selviytymiseen vaikutti diapaussin ja karaistumisen yhdysvaikutus ($N=630$, $D=4,460$, $df=4$, $p=0,347$). Ristiintaulukoinnista saatujen tulosten perusteella voidaan sanoa, että diapaussissa olevien yksilöiden kuolleisuus oli hiukan pienempi karaistumiskäsittelyn saatuaan kuin ilman sitä ($N=324$, $\chi^2=3,141$, $df=1$, $p=0,076$). Ei-diapaussissa olevat yksilöt selviytyivät parhaiten ilman karaistumista ($N=321$, $\chi^2=5,419$, $df=1$, $p=0,020$). -8 °C :een koelämpötilassa kärpästen selviytymiseen vaikutti sekä karaistuminen että diapaussin ja sukupuolen yhdysvaikutus ($N=683$, $D=3,325$, $df=3$, $p=0,344$). Karaistuminen vähensi kuolleisuutta molemmilla sukupuolilla silloin, kun yksilöt eivät olleet diapaussissa ($N=340$, $\chi^2=7,527$, $df=1$, $p=0,006$). Karaistuminen ei vaikuttanut enää merkitsevästi diapaussissa olevien yksilöiden kuolleisuuteen ($N=343$, $\chi^2=2,153$, $df=1$, $p=0,142$). Diapaussin ja sukupuolen yhdysvaikutus oli nähtävissä ei-karaistuneilla naarailla, joiden kuolleisuus oli merkitsevästi pienempi diapaussissa kuin ei-diapaussissa olevilla naarailla ($N=175$, $\chi^2=9,217$, $df=1$, $p=0,002$). Myös karaistumiskäsittelyn saaneilla naarailla kuolleisuus oli hiukan pienempi diapaussissa kuin ei-diapaussissa ($N=173$, $\chi^2=3,026$, $df=1$, $p=0,082$). Diapaussilla ei ollut merkitystä

karaistuneiden (N=167, $\chi^2=0,632$, df=1, p=0,427) eikä ei-karaistuneiden (N=168, $\chi^2=0,035$, df=1, p=0,852) koiraiden kuolemiseen (taulukko 2., kuva 1).

Taulukko 2. Kylmänkestävyysskoekiden naaraiden ja koiraiden kuolleisuusprosentit (%) ja yksilömäärät (N) jokaisessa koelämpötilassa. Molemmilla sukupuolilla kuolleisuus oli pienintä $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$:een ja suurinta $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$:een koelämpötiloissa.

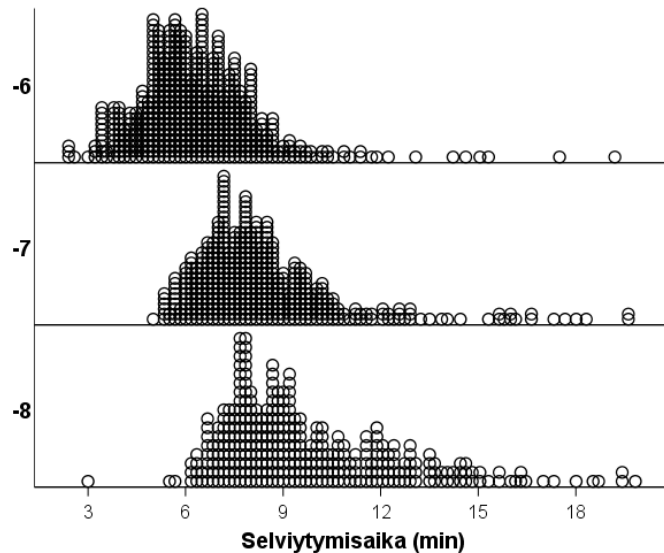
		Lämpötila						
		$-6\text{ }^{\circ}\text{C}$	N	$-7\text{ }^{\circ}\text{C}$	N	$-8\text{ }^{\circ}\text{C}$	N	
Naaraat	Diapaussi	Karaistuneet	13,4 %	11	23,4 %	18	43,9 %	36
		Ei karaistumista	9,1	7	26,3	21	45,1	41
	Ei diapaussi	Karaistuneet	12,3	10	35,5	33	57,1	52
		Ei karaistumista	27,4	23	28,6	20	67,9	57
		k.a. (%) yht. (N)	15,7%	51	28,8%	92	53,4%	186
Koiraat	Diapaussi	Karaistuneet	8,6	6	27,2	22	44,8	39
		Ei karaistumista	11,3	8	35,2	25	60,2	50
	Ei diapaussi	Karaistuneet	19,2	14	32,9	24	38,8	31
		Ei karaistumista	25	22	17,6	15	58,8	50
		k.a. (%) yht. (N)	16,6%	50	27,7%	86	50,7%	170



Kuva 1. Kylmänkestävyysskoekiden naaraiden (A) ja koiraiden (B) kuolleisuusprosentit kolmessa koelämpötilassa.

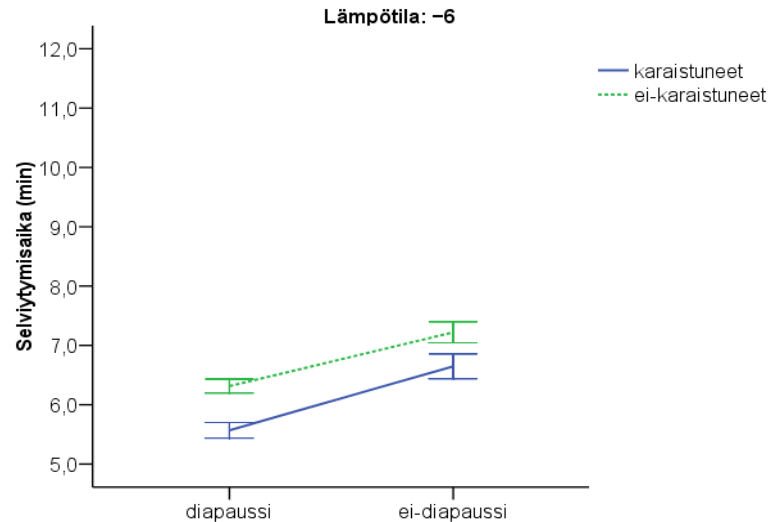
3.2. Kylmäkoomasta selviytymiseen kuluva aika (chill coma recovery time)

Eri kylmänkestävyyskoelämpötilojen ($-6\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$) välillä havaittiin selvä ero karpästen kylmäkoomasta selviämiseen kuluviassa ajoissa: odotetusti $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$:n koelämpötilasta karpäset heräsivät aikaisemmin kuin $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$:n koelämpötilasta ($F=263,130$, $df=2$, $p<0,001$). $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa karpäsillä kylmäkoomasta selviytymisessä kului keskimäärin 6,5 minuuttia, $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa 8,5 minuuttia ja $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa keskimäärin 10 minuuttia (Kuva 2.).



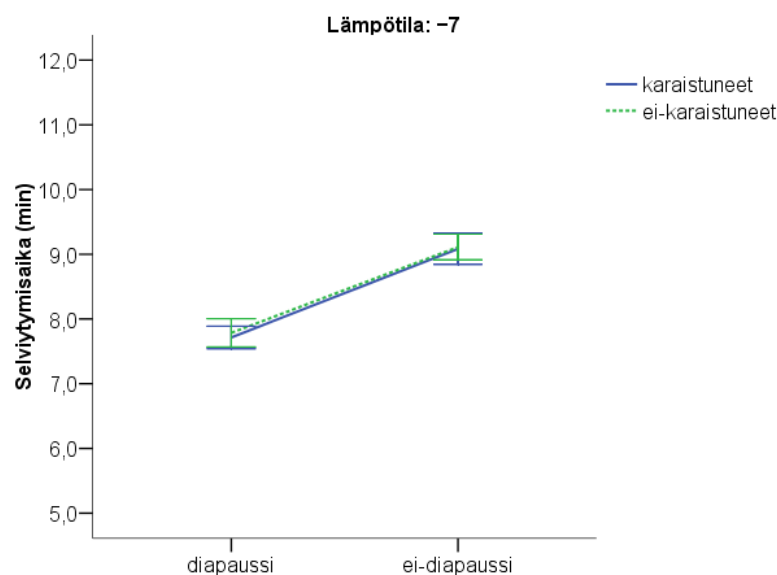
Kuva 2. Karpästen kylmäkoomasta selviämiseen kuluvat ajat eri koelämpötiloissa. $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa suurin osa karpäsistä heräsi 5-7 minuutin kuluttua käsittelystä, $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa 7-8 minuutin kuluttua käsittelystä ja $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa 8-9 minuutin kuluttua käsittelystä.

$-6\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa sukupuoli ei ollut merkitystä selviytymisnopeuteen ($F=0,144$, $df=1$, $p=0,705$), joten sukupuolet analysoitiin yhdessä. Diapaussissa olevat selviytyivät merkittävästi muita nopeammin kylmäkoomasta ($F=7,468$, $df=1$, $p=0,008$) (kuva 3). Myös karaistumisella näyttäisi olevan vaikutusta selviytymisnopeuteen, mutta vaikutus ei ollut merkitsevä ($F=4,221$, $df=1$, $p=0,044$; kriittisempi tarkastelu). Merkitseviä yhdysvaikutuksia eri muuttujien välillä ei havaittu (taulukko 4.).



Kuva 3. $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$:een koelämpötilassa karaistuneet ja diapaussissa olevat kärpäset heräsivät aikaisemmin kuin ei-karaistuneet ja ei-diapaussissa olevat. Kuvassa heräämisaikojen keskiarvot ja niiden keskivirheet ($\pm 1\text{ SE}$).

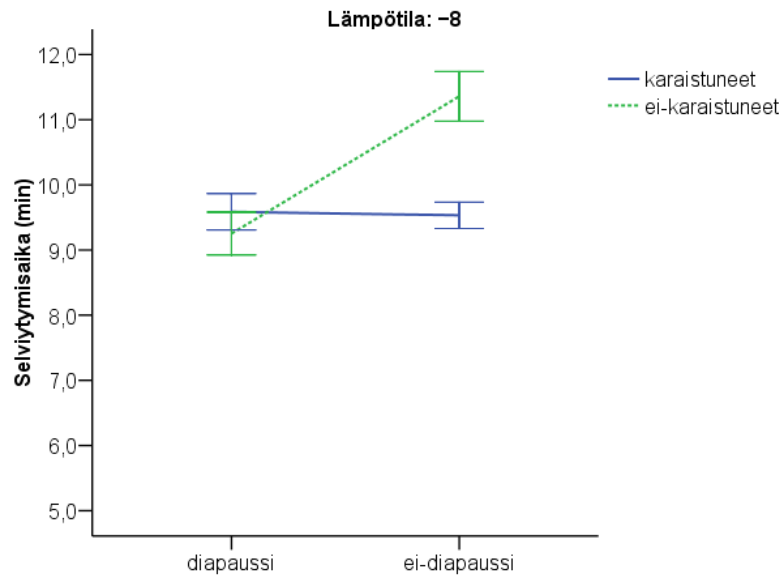
Myös $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$:een koelämpötilassa lisääntymisdiapaussissa olevat kärpäset selviytyivät merkittävästi muita nopeammin kylmäkoomasta ($F=23,977$, $df=1$, $p<0,001$) (kuva 4). Karaistumisella ($F=0,053$, $df=1$, $p=0,818$) ja sukupuolella ($F=2,371$, $df=1$, $p=0,129$) ei ollut vaikutusta selviytymisnopeuteen.



Kuva 4. $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$:n koelämpötilassa diapaussissa olevat kärpäset heräsivät aikaisemmin kuin ei-diapaussissa olevat. Karaistumisella ei ollut vaikutusta selviytymisnopeuteen. Kuvassa heräämisaikojen keskiarvot ja niiden keskivirheet ($\pm 1\text{ SE}$).

$-8\text{ }^{\circ}\text{C}$:een koelämpötilassa kärpästen selviytymisnopeudessa havaittiin valojakson (diapausi/ei-diapausi) ja karaistumisen yhdysvaikutus ($F=9,879$, $df=1$, $p=0,002$). Sukupuolella ei ollut vaikutusta selviytymisnopeuteen ($F=1,194$, $df=1$, $p=0,278$). Lisääntymisdiapaussissa olevat yksilöt selviytyivät ei-diapaussaavia nopeammin, jos

karaistumiskäsittelyä ei ollut ($F=10,300$, $df=1$, $p=0,002$). Sen sijaan diapaussaavat ja ei-diapaussaavat selvisivät yhtä nopeasti, jos ne olivat saaneet karaistumiskäsittelyn ($F=9,879$, $df=1$, $p=0,002$) (kuva 5.).



Kuva 5. -8 °C:een koelämpötilassa ilman karaistumiskäsittelyä ja diapaussissa olevat kärpäset heräsivät merkitsevästi aikaisemmin kuin ei-diapaussissa olevat. Karaistuneiden yksilöiden selviytymisnopeuteen valojaksolla (diapaussi/ei-diapaussi) ei ollut vaikutusta vaan ne selviytyivät yhtä hyvin. Kuvassa heräämisaikojen keskiarvot ja niiden keskivirheet (± 1 SE).

Taulukko 4. Nested ANOVA:n tulokset kaikissa koelämpötiloissa koottuna varianssitauluun. Sarakkeiden selitteet: df = vapausasteet, F = testisuure, p = tilastollinen todennäköisyys. Tähdellä merkityt tulokset ovat tilastollisesti merkitseviä tasolla $p<0,01$.

Muuttuja	Lämpötila								
	-6 °C			-7 °C			-8 °C		
	df	F	p	df	F	p	df	F	p
diapaussi	1	7,468	0,008*	1	23,977	0,000*	1	10,300	0,002*
karaistuminen	1	4,221	0,044	1	0,053	0,818	1	5,147	0,026
sukupuoli	1	0,144	0,705	1	2,371	0,129	1	1,194	0,278
diapaus.*karaist.	1	0,062	0,805	1	0,123	0,727	1	9,879	0,002*
diapaus.*sukup.	1	0,182	0,671	1	0,145	0,704	1	0,147	0,703
karaist.*sukup.	1	0,207	0,651	1	0,573	0,452	1	0,163	0,687
diapaus.*karaist.*sukup.	1	0,418	0,520	1	2,814	0,099	1	0,889	0,349

4. TULOSTEN TARKASTELU

4.1. Kylmänkestävyyden mittaaminen

Kärpästen kylmäkoomasta selviytymiseen kuluva aika (chill coma recovery time) pidetään hyvänä kylmänkestävyyden mittarina, ja menetelmä onkin paljon käytetty tutkittaessa hyönteisten kylmänkestävyyttä (esim. David ym. 1998, Gibert ym. 2001, David ym. 2003, Ayrinhac ym. 2004, Anderson ym. 2005, McCabe ym. 2008). Myös tässä työssä menetelmä havaittiin toimivaksi kylmänkestävyyden mittaamisessa. Tämän työn perusteella kylmänkestävälle *Drosophila montana* -lajille koelämpötiloista sopivin oli -6°C :tta altistusajan ollessa 16 tuntia. Nämä muuttujat olivat yhdessä riittäviä käsittelyjen välisten erojen selvittämiseksi, mutta eivät liian rankkoja kärpäsillem (kuolleisuus 16,1 %). Lisäksi suurin osa yksilöistä selvisi kylmäkoomasta alle 10 minuutissa, tätä nopeampi herääminen olisi saattanut estää käsittelyjen välisten erojen selviämisen. Kylmemmissä lämpötiloissa 16 tunnin altistusaika lisäsi huomattavasti kuolleisuutta; -7°C :ssa kuolleisuus oli 28,3 % ja -8°C :ssa 52,1 %. Korkea kuolleisuus -7°C :ssa ja -8°C :ssa voi viitata siihen, että lämpötila oli liian matala tai altistusaika liian pitkä, jolloin käsittelyiden väliset erot ja mahdolliset vaikutukset jäävät liian kylmän lämpötilan tai pitkän altistusajan taakse piiloon. Koska *D. montana* -lajin oletetaan kestävän erittäin matalia lämpötiloja, kylmempiä koelämpötiloja käytettäessä voisi altistusaikoja lyhentää. David ym. (2003) käyttivät kylmänkestävälle *Drosophila subobscura* -lajille tekemissään vastaavissa kylmänkestävyysoikeissa lyhyempiä altistusaikoja kylmissä lämpötiloissa seuraavanlaisesti: 3 tuntia -8°C :ssa; 2 tuntia -9°C :ssä ja -10°C :ssä ja 1 tunti -11°C :ssä. Heidän tutkimuksessaan Moskovasta ($55^{\circ}8' \text{N}$) peräisin olevat *D. subobscura* -kärpäset selvisivät -6°C :sta noin 11,5 minuutissa ja -7°C :sta 16,5 minuutissa 16 tunnin altistuksen jälkeen. Tässä tutkimuksessa *D. montana* -lajin havaittiin olevan kylmänkestävyydeltään vielä *D. subobscura* -lajiakin parempi: ilman karaistumista ja diapaussiakin *D. montana* -kärpäset selvisivät -6°C :sta noin 7 minuutissa ja -7°C :sta 9 minuutissa 16 tunnin altistuksen jälkeen. Kylmänkestävyydetutkimuksissa yleisesti käytetyn *Drosophila melanogaster* -lajin kylmänkestävyydestä kertoo Czajkan & Leen (1990) tutkimus, jossa kaikki *D. melanogaster* -kärpäset kuolivat oltuaan vain 2 tuntia -5°C :ssa.

4.2. Karaistumisen vaikutus kärpästen kylmänkestävyyteen

Aikaisemmissa tutkimuksissa on viitattu kylmäkooman monimutkaiseen taustaan (David ym. 2003, Macdonald ym. 2004). Tämä tuli esiin myös Rako & Hoffmannin (2006) tutkimuksessa, missä nopea karaistuminen näyttäisi laukaisevan mekanismin, joka laskee kärpästen kuolleisuutta, mutta pidentää kylmäkoomasta selviytymiseen kuluvia aikoja. Lisäksi Chen & Walker (1994) ovat havainneet, että äkillisestä kylmään joutumisesta selviytymisen (kylmäkoomasta selviytyminen) ja pitempiäaikaisista viileistä olosuhteista selviämisen (hidas karaistuminen) taustalla saattaa myös olla kaksi eri geneettistä mekanismia. Hitaaseen karaistumiseen (akklimaatio) liittyy energiavarojen säästeliäämpi käyttö, kun taas kryoprotektantit ovat tärkeitä kylmäkoomasta selviämisen kannalta. Karaistumisen ja kylmäkooman fysiologinen (ja myös geneettinen) tausta on monimutkainen. Jatkossa olisi tärkeää ymmärtää paremmin niiden luonnetta, jotta löydettäisiin niihin parhaiten sopivat koemenetelmät muuttujineen (Rako & Hoffmann 2006).

Useiden tutkimusten mukaan lyhytkestoinen jäädyttäminen tai karaistuminen parantaa kylmänkestävyyttä, kun mittarina on käytetty kuolleisuutta (esim. Czajka & Lee 1990, Chen & Walker 1994, Kely & Lee 1999, Rako & Hoffmann 2006). Myös tässä tutkimuksessa karaistuminen pienensi kärpästen kuolleisuutta $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$:n koelämpötilassa, kun taas $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$:n koelämpötilassa kärpästen kuolleisuus oli lähes yhtä suurta karaistuneiden ja ei-karaistuneiden kesken. $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ koelämpötilat ovat käyttökelpoisia tutkittaessa kuolleisuutta eikä kylmäkoomasta heräämiseen kuluvaan aikaan. Kuolleisuutta oli yllättävän paljon, joten karaistumiskoe kannattaisi suorittaa eri muuttujia (altistusajaksi ja -lämpötila, karaistumisaika ja -lämpötila) käyttäen tai kokonaan eri menetelmällä. Esim. LT_{50} -menetelmällä saataisiin *D. montana* -lajille useita muihin lajeihin verrattavissa olevia tutkimustuloksia. *Drosophila melanogaster* -lajin LT_{50} on $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$:tta altistusajan ollessa 1,5 tuntia (Chen & Walker 1994).

Tutkittaessa karaistumisen vaikutuksia kylmänkestävyyteen voidaan mittarina käyttää kuolleisuuden ohella myös kylmäkoomasta selviytymiseen kuluvaan aikaan. Rako & Hoffmann (2006) tutkivat nopean karaistumisen vaikutuksia *D. melanogaster* -lajin kylmänkestävyyteen useilla eri menetelmillä, erityisesti mittaamalla kärpästen kylmäkoomasta selviytymiseen kuluvaan aikaan. Heidän tutkimuksessaan lyhytkestoinen karaistuminen (2h $0\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa) pidensi selkeästi kärpästen kylmäkoomasta (6 tuntia $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa) selviytymiseen kuluvaan aikaan. Tässä tutkimuksessa karaistumisen vaikutuksista saatiin *D. montana* -lajilla osittain ristiriitaisia tuloksia koelämpötilasta riippuen. $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$:n koelämpötilassa karaistumisen vaikutus oli selvintä vaikkakin heikohkoa ja se paransi selviytymisaikoja sekä diapaussissa olevilla että ei-diapaussissa olevilla kärpäksillä. $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa karaistumisen vaikutus selviytymisaikoihin oli kaikissa käsittelyissä lähes olematonta ja $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$:n koelämpötilassa karaistuminen paransi vain ei-diapaussissa olevien kärpästen heräämistä kylmäkoomasta. $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$:een tulokset voivat olla vääristyneitä kärpästen suuren kuolleisuuden vuoksi. Heikkoon tai puuttuvaan karaistumiseen saattoi vaikuttaa liian pitkä altistusajaksi. Aikaisemmassa *D. montana* -lajilla tehdyssä tutkimuksessa tunnin mittainen karaistumisaika $0\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa lyhensi kärpästen kylmäkoomasta heräämiseen kuluvaan aikaan, kun kärpäsiä pidettiin karaistumiskäsittelyn jälkeen neljän tunnin ajan $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa (Ojala, LuK-tutkielma, 2007). Käytettäessä matalia kylmäkoomalämpötiloja altistusajaksi voisikin lyhentää (esim. 6-8 tuntia $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa, 4-6 tuntia $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa ja $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssä ja 1-3 tuntia $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssä ja $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa), koska karaistumisen vaikutukset voivat jäädä liian pitkän altistusajan taakse piiloon. Karaistumisen varmistamiseksi myös karaistumisaikaa voisi pidentää tai/ja karaistumislämpötilaa laskea 1-2 astetta. Heikkoon karaistumiseen saattoi vaikuttaa myös kärpästen ikä, sillä Czajkan & Leen (1990) tutkimuksessa 10-30 päivää vanhojen *D. melanogaster* -kärpästen todettiin karaistuvan huonosti ja tässä tutkimuksessa käytetyt *D. montana* -kärpäset olivat 14-15 vrk:n ikäisiä. Ristiriitaisiin tuloksiin saattoi myös vaikuttaa se, että jäihin laitettavat kärpäset asettuivat eri paikkoihin putkessa. Osa kärpäksistä jäi putken yläpäähän lähelle pumpulia tai pumpuliin, mikä saattoi hidastaa niiden karaistumista. On myös muistettava, että tässä tutkimuksessa käytettiin vain yhden naaraan jälkeläisistä koostuvaa linjaa, joten tämän tutkimuksen perusteella ei voi tehdä kovin pitkälle meneviä johtopäätöksiä.

4.3. Diapaussin vaikutus kylmänkestävyyteen

Schmidtin & Conden (2006) tutkimuksessa diapaussissa olevien *D. melanogaster* -kärpästen kuolleisuus oli pienempi ja kylmän ja nälän sietokyky parempi kuin niillä yksilöillä, jotka eivät olleet diapaussissa. Tässä Pro gradu -tutkimuksessa diapaussissa olemisen havaittiin pienentävän *D. montana* -lajin naaraiden kuolleisuutta kaikissa koelämpötiloissa ja koiraiden kuolleisuutta $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$:een koelämpötilassa. Sukupuolten väliset erot kuolleisuudessa voivat viitata koiraiden heikompaan /erilaiseen diapaussiin. Kimuran

(1988) tutkimuksessa *D. triauraria* -lajin koirailta havaittiin heikompi lisääntymisdiapaussi kuin naarailla vaikkakaan sitä ei havainnollistettu kuolleisuudella vaan aikaisemmin ja nopeammin päättyvällä lisääntymisdiapaussilla.

D. montana -lajin kärpästen nopeampaan kylmäkoomasta heräämiseen vaikutti kaikissa koelämpötiloissa lisääntymisdiapaussissa oleminen. Tulos oli odotettu, koska lisääntymisdiapaussiin on yleisesti liitetty fysiologisia muutoksia, jotka parantavat selviytymistä epäedullisista oloista: ikääntymisen ja aineenvaihdunnan hidastumista sekä kohonnutta stressin sietokykyä (Schmidt ym. 2005, Schmidt & Conde 2006). Esim. *D. melanogaster* ja *Drosophila obscura* -ryhmän lajeilla lisääntymisdiapaussin on havaittu parantavan huomattavasti vastustuskykyä useita ympäristön stressitekijöitä vastaan (Tatar ym. 2001, Goto ym. 1999). Lisäksi Schmidt & Conde (2006) havaitsivat *D. melanogaster* -lajille tekemässään tutkimuksessa, että sellaiset genotyypit, jotka mahdollistivat diapaussiin menon, lisääntyivät laboratorio-oloissa ajan mittaan kun kärpäset altistettiin ympäristön stressitekijöille (kylmyys ja nälkä). Toisaalta sellaiset genotyypit, jotka eivät mene diapaussiin, lisääntyivät silloin kun kärpäsiä oli kasvatettu suotuisissa kontrolloidoissa. Näiden tulosten pohjalta voidaan päätellä, että diapaussiin menevien yksilöiden kelpoisuus on parempi stressaavissa ympäristöoloissa, kun taas jatkuvasti lisääntymistilassa olevat naaraat pärjäävät paremmin vähemmän stressaavissa ympäristöissä. Diapaussista on siis kärpäsillemme kustannuksia mikäli olot eivät ole stressaavat, vaikkakin diapaussigenotyypit ovat olennaisesti pitkäikäisempiä ja elinkelpoisempia kuin ei-diapaussissa olevat. Toisaalta kärpäset, jotka eivät mene diapaussiin, kehittyvät munasta aikuiseksi nopeammin ja saavat myös aiemmin jälkeläisiä (Schmidt ym. 2005).

4.4. Yhteenveto ja käytännön huomioita

Tässä tutkimuksessa selkeimmät tulokset saatiin $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$:een koelämpötilassa, jossa lisääntymisdiapaussin havaittiin parantavan kylmänkestävyyttä molemmilla sukupuolilla ja karaistumisen vaikuttavan samaan suuntaan etenkin niillä yksilöillä, jotka eivät olleet diapaussissa. Karaistumisella ja diapaussilla ei ollut kärpästen kylmänkestävyyteen vaikuttavia yhdysvaikutuksia, mutta lisätutkimuksia olisi kuitenkin hyvä tehdä myös eri koemenetelmillä. Lisääntymisdiapaussin aikaansaamat muutokset kärpäsen fysiologiassa voivat olla samankaltaisia tai päällekkäisiä kuin karaistumisen vaikutukset ja näin karaistumisen antama lisähyöty on lähes olematonta tai sattumanvaraista lisääntymisdiapaussissa oleville yksilöille. Kärpänen ei kuitenkaan voi säädellä omaa karaistumistaan tai diapaussissa oloaan, koska ulkoiset tekijät määräävät nämä tapahtumat. Karaistumisesta saattaa olla hyötyä esimerkiksi aikaisin syksyllä (ennen lisääntymisdiapaussin alkamista), tai myöhään keväällä (lisääntymisdiapaussin purkautuessa) tapahtuvien lämpötilanmuutosten kestämisessä. Tässä työssä ei ollut alun perin tarkoitus analysoida kärpästen kuolleisuutta, mutta se tehtiin $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$:een koelämpötilojen odottamattoman suuren kuolleisuuden vuoksi.

Kasvatuskaappeihin eroteltiin yhteensä 2876 yksilöä, joista 1951 (67,8 %) selviytyi kylmänkestävyyškokeisiin. Kahden viikon aikainen yllättävän suuri kuolleisuus kasvatuskaapeissa (925 yksilöä, 32,2 %) saattoi vaikuttaa myös varsinaisten kokeiden suureen kuolleisuuteen. Kuolleisuus kasvatuskaapeissa vaihteli (9,5-56,3 %) keräyspäivien mukaan. Syy tähän vaihteluun saattoi olla kasvatuskaappien ja elatusseoksen kosteusvaihtelut. Kasvatuskaappien kosteuden ollessa 60-72 %:a kärpäsiä kuoli keskivertoa enemmän sekä kasvatuskaapeissa että kylmänkestävyyškokeissa. Kosteus oli suurinta silloin, kuin elatusseos oli märkää eli märkä seos saattoi lisätä kaappien kosteutta tai kosteat kaapit ylläpitivät seoksen kosteutta. Elatusseoksen ollessa kostea kärpäset jäivät helpommin kiinni puuroon ja sulaneeseen kuivahiivaan, ja lopulta kuolivat puuron päälle. Tämä saattoi vaikeuttaa muiden kärpästen ravinnon saantia tai/ja lisätä kärpästen

stressaantuneisuutta sekä homeen kasvua putkissa vaikuttaen näin kärpästen heikompaan elinkykyyn. Tämän työn mallaspuuroa (liite 1.) käytettäessä kannattaa valmistus ajoittaa niin, että valmiin puuron ja kärpästen keräämisen väliin jää riittävän pitkä aika puuron kuivuuden varmistamiseksi. Vaihtoehtoinen ravintoalusta työssä käytetylle mallaspuurolle voisi olla kasvatuspulloissa käytettävä puuro, joka on todettu erittäin toimivaksi banaanikärpäsillä. Lisäksi kasvatuskaappien kosteudet kannattaa tarkistaa mahdollisimman useasti ja pyrkiä pitämään ne lähellä 50 %:a.

Kylmäkoomasta heräämiseen kuluva aika riippuu vahvasti lämpötilasta, jossa toipuminen tapahtuu. Tässä työssä kylmänkestävyyden mittaaminen tehtiin pienessä huoneessa ja koska tarkkailijoita oli paljon, lämpötila vaihteli 22,6-23,7 °C:een välillä. Tulevaisuudessa mittaaminen kannattaisi tehdä huoneessa, missä ilman laatu ja lämpötila pysyisivät mahdollisimman tasaisena ja samanlaisena kokeiden kesken.

Useimmissa kokeissa heräämisaikojen mittaavilla henkilöillä oli kaksi putkea, jolloin seurattavia kärpäsiä saattoi olla jopa 30 yksilöä. Tarkkailua saattoi vaikeuttaa käytetty petrialja, koska heränneitä kärpäsiä ei pystytty paikallistamaan petrialjalle ja useita kärpäsiä saattoi herätä samaan aikaan huomaamatta. Jos kärpäsiä oli seurattavana paljon (20-30) saattoi heräämisajoissa ja niiden merkitsemisessä mennä sekaisin. Jatkossa olisikin hyvä saada sellainen alusta, missä kärpäset olisi lokeroitu erikseen ja alustaan voisi merkata heräämisen tai heräämisajan. Näin saataisiin lisää luotettavuutta heräämisaikoihin.

Vaikka yllämainitut asiat heikentävät tämän työn tulosten luotettavuutta, työ antoi arvokasta tietoa *D. montana* -lajilla tehtävien uusien kylmäkkeiden suunnitteluun.

4.5. Tulevaisuus

Verrattaessa tämän tutkimuksen tuloksia muiden lajien tai populaatioiden kylmänkestävyyteen on otettava huomioon käytetty koemenetelmä. Aikaisemmissa kylmänkestävyyttä mittaavissa tutkimuksissa on todettu, että eri koemenetelmät mittaavat erilaista kylmänkestävyyttä ja vaikuttavat eri mekanismein kylminä jaksoina (Rako & Hoffmann 2006). Eroja vertailtaessa optimaalisinta olisi käyttää täysin samoja koemenetelmiä, ja vielä sellaisia jotka muistuttaisivat mahdollisimman paljon yksilöiden luonnossa kokemia stressiolosuhteita (Hoffmann ym. 2003). Tällaisia menetelmiä ovat kylmäkoomalämpötilan ja LT₅₀ -lämpötilan määrittäminen sekä kylmäkoomasta selviytymiseen kuluvan ajan mittaaminen. Kylmänkestävyytystutkimusten olisi lisäksi hyvä käsittää useampia sukupolvia (Rako & Hoffmann, 2006).

Drosophila montana -lajin kylmänkestävyyttä voisi tutkia myös selvittämällä lajin ylijäähtymispiste (SCP) eli lämpötila, jossa hyönteisen ruumiinnesteet kiteytyvät spontaanisti ja alin lämpötila, missä yksikään hyönteinen ei selviä hengissä (LLT, lower lethal temperature) (Czajka & Lee 1990). SCP- ja LLT- lämpötilojen perusteella hyönteiset on perinteisesti jaoteltu jäätymistä kestävämmiin ja kestäviin lajeihin. Esimerkiksi *Drosophila melanogaster* -lajin SCP on -20 °C:tta ja LLT -5 °C:tta (Czajka & Lee 1990), minkä perusteella *D. melanogaster* -laji on jäätymistä kestävä ja herkkä kylmälle. Koska kylmänkestävyytystutkimuksissa on ennen lähes aina selvitetty lajin SCP- ja LLT-arvot, löytyy näiden arvojen perusteella paljon kylmänkestävyytystutkimuksia useista eri hyönteislajeista, joiden kylmänkestävyyttä ja ekologiaa voidaan sitten verrata *D. montana* -lajiin. Tämän tutkimuksen perusteella *D. montana* -laji voisi olla jäätymistä kestävä (suuri kuolleisuus), mutta kuitenkin joko hyvin kylmää kestävä tai jäätymistä välttävä laji, koska kylmäkoomasta selviytymiseen kuluvan ajan perusteella laji oli kuitenkin erittäin kylmänkestävä.

Tärkeä tulevaisuuden haaste olisi löytää kärpästen kylmänkestävyyteen vaikuttavia geneejiä, geeniverkostoja ja metaboliaketjuja. Olisi myös hyödyllistä tutkia kylmäkaraistumisen ja lisääntymisdiapaussin vaikutuksia muihin adaptiivisesti tärkeisiin

kelpoisuuspiirteisiin kuten kärpästen ikääntymiseen, parittelukäyttäytymiseen ja hedelmällisyyteen (Rinehart ym. 2000).

KIITOKSET

Suurin kiitos tämän työn valmistumisesta kuuluu joustaville ja ymmärtäväisille ohjaajilleni Lauralle ja Annelille. Lauran apu oli korvaamatonta sekä käytännön kokeissa että kirjallisen työn useissa läpiluvuissa kommentteineen. Parempia ohjaajia en olisi voinut saada. Kiitos kuuluu myös avopuolisolleni Alille, joka koko tämän pitkän projektin on jaksanut kannustaa ja tukea minua.

KIRJALLISUUS

- Anderson, A.R., Hoffmann, A.A. & McKechnie, S.W. 2005. Response to selection for rapid chill-coma recovery in *Drosophila melanogaster*: physiology and life-history traits. *Genet. Res.* 85: 15-22.
- Ascerno, M.E., Hower, A.A. Jr. & Smilovitz, Z. 1978. Gonadal development of laboratory-reared male alfalfa weewils, *Hypera postica*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 71: 239-242.
- Ayrinhac, A., Debat, V., Gibert, P., Kister, A.-G., Legout, H., Moreteau, B., Vergilino, R. & David, J.R. 2004. Cold adaptation in geographical populations of *Drosophila melanogaster*: phenotypic plasticity is more important than genetic variability. *Funct. Ecol.* 18: 700-706.
- Baldus, T.J. & Mutchmore, J.A. 1988. The effects of temperature acclimation on the fatty acid composition of nerve cord and fatbody of the American cockroach, *Periplaneta Americana*. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 89: 141-147.
- Bale, J.S. 1993. Classes of insect cold hardiness. *Funct. Ecol.* 7: 751-753.
- Bale, J.S. 2002. Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 37: 849-862.
- Barnes, J.K. 1976. Effect of temperature on development, survival, oviposition, and diapause in laboratory populations of *Sepedon fuscipennis* (Diptera: Sciomyzidae). *Environ. Entomol.* 5: 1089-1098.
- Barrett, J. 2001. Thermal hysteresis proteins. *Int. J. Biochem. Cell B.* 33: 105-117.
- Bennett, V. A., Pruitt, N.L. & Lee, R.E. 1997. Seasonal changes in fatty acid composition associated with cold-hardening in third instar larvae of *Eurosta solidaginis*. *J. Comp. Physiol. B.* 167: 249-255.
- Burton, V., Mitchell, H.K., Young, P. & Petersen, N.S. 1988. Heat shock protection against cold stress of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 3550-3552.
- Cannon, R.J.C. & Bock, W. 1988. Cold tolerance of microarthropods. *Biol. Rev.* 63: 23-77.
- Chen, C-P. & Walker, V.K. 1994. Cold-shock and chilling tolerance in *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* 40: 661-669.
- Chen, C-P., Denlinger, D.L. & Lee JR, R.E. 1987. Cold-shock injury and rapid cold hardening in the flesh fly *sarcophaga crassipalpis*. *Physiol.Zool.* 60: 297.
- Chown, S.L. & Nicolson, S.W. 2004. *Insect Physiological Ecology mechanisms and patterns*. Oxford University Press, New York, 243 s.
- Clark, M.S. & Worland, M.R. 2008. How insects survive the cold: molecular mechanisms-a review. *J. Comp. Physiol. B.* 178: 917-933.
- Connin, R.V. & Hoopingarner, R.A. 1971. Sexual behavior and diapause in the cereal leaf beetle *Oulema melanopus*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 64: 655-660.
- Cossins, A.R. & Bowler, K. 1987. *Temperature Biology of Animals*. Chapman Hall, New York, 339 s.

- Cossins, A.R. & Raynard, R.S. 1987. Adaptive responses of animal cell membranes to temperature. Teoksessa: Bowler, K. & Fuller, B.J. (toim.), *Temperature and Animal Cells*, Cambridge, 91-112.
- Costanzo, J.P. & Lee, R.E. 1995. Supercooling and ice nucleation in vertebrate ectotherms. Teoksessa: Lee, R.E., Warren, G.J. & Gusta, L.V. (toim.), *Biological Ice Nucleation and Its Applications*, St. Paul, Minnesota, 221-237.
- Costanzo, J.P. & Lee, R.E. 1996. Mini-review: Ice nucleation in freeze-tolerant vertebrates. *Cryo-Letters*. 17: 111-118.
- Coulson, S.J. & Bale, J.S. 1991. Anoxia induces rapid cold hardening in housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *J. Insect Physiol.* 37: 497-501.
- Czajka, C. & Lee, R.L. Jr. 1990. A rapid cold-hardening response protecting against cold injury in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 148: 245-254.
- David, J.R., Gibert, P., Pla, E., Petavy, G., Karan, D. & Moreteau, B. 1998. Cold stress tolerance in *Drosophila* -analysis of chill coma recovery in *D. melanogaster*. *J. Therm. Biol.* 23: 291-299.
- David, J.R., Gibert, P., Moreteau, B., Gilchrist, G.W. & Huey, R.B. 2003. The fly that came from cold: geographic variation of recovery time from low-temperature exposure in *Drosophila subobscura*. *Funct. Ecol.* 17: 425-430.
- Denlinger, D.L. 1991. Relationship between cold hardiness and diapause. Teoksessa: Lee, R.E. & Denlinger, D.L., (toim.), *Insect at Low Temperature*, Chapman and Hall, New York, 174-198.
- Denlinger, D.L. & Lee, R.E. 1991. Physiology of cold sensitivity. Teoksessa: Hallman, G.J. & Denlinger, D.L. (toim.), *Lethal temperatures in integrated pest management*, Westview press, Boulder CO, 55-95.
- DeVries, A.L. 1971. Glycoproteins as biological antifreeze agents in Antarctic fishes. *Science*. 172: 1152-1155.
- Fukatami, A. 1984. Cold temperature resistance in *Drosophila lutescens* and *D. Takahashii*. *Jpn. J. Genet.* 59: 61-70.
- Gibert, P., Moreteau, B., Petavy, G., Karan, D. & David, J.R. 2001. Chill-coma tolerance, a major climatic adaptation among *Drosophila* species. *Evolution*. 55: 1063-1068.
- Gibert, P. & Huey, R.B. 2001. Chill-coma temperature in *Drosophila*: effects of developmental temperature, latitude and phylogeny. *Physiol. Biochem. Zool.* 74: 429-434.
- Goto, S.G. & Kimura, M.T. 1998. Heat- and cold-shock responses and temperature adaptations in subtropical and temperate species of *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* 44: 1233-1239.
- Goto, S.G., Yoshida, T., Beppu, K. & Kimura, M.T. 1999. Evolution of overwintering strategies in Eurasian species of the *Drosophila obscura* species group. *Biol. J. Linn. Soc.* 68: 429-441.
- Hayward, S.A.L., Rinehart, J.P. & Denlinger, D.L. 2004. Desiccation and rehydration elicit distinct heat shock protein transcript responses in flesh fly pupae. *J. Exp. Biol.* 207: 963-971.
- Hazel, J.R. 1995. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. physiol.* 55: 19-42.
- Hazel, J.R. & Landrey, S.R. 1988. Time course of thermal adaptation in plasma membranes of trout kidney. II. Molecular species composition. *Am. J. Physiol.* 255: R628-R634.
- Heino, J. & Vuento, M. 2002. *Solubiologia*, WSOY, Porvoo, 306 s.
- Herman, W.S. 1981. Studies on the adult reproductive diapause of the monarch butterflies, *Danaus plexippus*. *Biol. Bull.* 160: 89-106.
- Higuchi, C. & Kimura, M.T. 1985. Influence of photoperiod on low temperature acclimation for cold-hardiness in *Drosophila auraria*. *Physiol. Entomol.* 10: 303-308.
- Hodkova, M., Berkova, P. & Zahradnickova, H. 2002. Photoperiodic regulation of the phospholipid molecular species composition in thoracic muscles and fat body of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera) via an endocrine gland, corpus allatum. *J. Insect Physiol.* 48: 1009-1019.
- Hoffman, A.A. & Sorensen, J.G. 2003. Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *J. Therm. Biol.* 28: 175-216.
- Hosler, J.S., Burns, J.E. & Esch, H.E. 2000. Flight muscle resting potential and species-specific differences in chill-coma. *J. Insect Physiol.* 46: 621-627.
- Huey, R.B., Crill, W.D., Kingsolver, J.G. & Weber, K.E. 1992. A method for rapid measurement of heat or cold resistance of small insects. *Funct. Ecol.* 6: 489-494.

- Kelty, J.D. & Lee, R.E. 1999. Induction of rapid cold hardening by cooling at ecologically relevant rates in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 45: 719-726.
- Kelty, J.D. & Lee, R.E. 2001. Rapid cold hardening of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) during ecologically based thermoperiodic cycles. *J. Exp. Biol.* 204: 1659-1666.
- Kimura, M.T. 1988. Male mating activity and genetic aspects in imaginal diapause of *Drosophila triauraria*. *Entomol. exp. appl.* 47: 81-88.
- Kimura, M.T. 2004. Cold and heat tolerance of drosophilid flies with reference to their latitudinal distributions. *Oecologia* 140: 442-449.
- Klok, C.J. & Chown, S.L. 1997. Critical thermal limits, temperature tolerance and water balance of a sub-Antarctic caterpillar, *Pringleophaga marioni* (Lepidoptera: Tineidae). *J. Insect Physiol.* 43: 687-694.
- Kostal, V. & Simek, P. 1998. Changes in fatty acid composition of phospholipids and triacylglycerols after cold-acclimation of an aestivating insect prepupa. *J. Comp. Physiol. B.* 168: 453-460.
- Lee, R.E. 1991. Principles of insect low temperature tolerance. Teoksessa: Lee, R.E. & Denlinger, D.L. (toim.), *Insects at Low Temperature*, Chapman and Hall, New York, 17-46.
- Lee, R.E. & Denlinger, D.L. 1985. Cold tolerance in diapausing and non-diapausing stages of the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Physiol. Entomol.* 10: 309-315.
- Lee, R.E., Chen, C-P. & Denlinger, D.L. 1987. A rapid cold-hardening process in insects. *Science*. 238: 1415-1417.
- Lee, R.E. Jr., Elnitsky, M.A., Rinehart, J.P., Hayward, S.A.L., Sandro, L.H. & Denlinger, D.L. 2006. Rapid cold-hardening increases the freezing tolerance of the Antarctic midge *Belgica antarctica*. *J. Exp. Biol.* 209: 399-406.
- Lehtovaara, A. 2008. *Maantieteellinen muuntelu Drosophila montana –naaraiden lisääntymislepokaudessa ja liikeaktiivisuudessa*. Ekologian ja Ympäristönhoidon Pro gradu –tutkielma. Jyväskylän Yliopisto, 39 s.
- Macdonald, S.S., Rako, L., Batterham, P. & Hoffmann, A.A. 2004. Dissecting chill coma recovery as a measure of cold resistance: evidence for a biphasic response in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 50: 695-700.
- Macleod, E.G. 1967. Experimental induction and elimination of adult diapause and autumnal coloration in *Chrysopa carnea* (Neuroptera). *J. Insect Physiol.* 13: 1343-1349.
- McCabe, C.K., Wilton, A. & Ballard, J.W. 2008. Seasonal trade-off between starvation resistance and cold resistance in temperate wild-caught *Drosophila simulans*. *Aust. J. Entomol.* 47: 20-23.
- Morris, G.J. & Clarke, A. 1987. Cells at low temperature. Teoksessa: Grout, B.W.W. & Morris, G.J. (toim.), *Effects of low temperatures on biological systems*, Edward Arnold, Baltimore, 72-119.
- Niemi, M., Virtanen, I. & Vuorio, E. 1994. *Solu- ja molekyylibiologia*. Weilin + Göös, Porvoo, 330 s.
- Ohtsu, T., Kimura, M.T. & Katagiri, C. 1998. How *Drosophila* species acquire cold tolerance qualitative changes of phospholipids. *Eur. J. Biochem.* 252: 608-611.
- Ojala, V. 2007. *Maantieteellisen alkuperän ja karaistumisreaktioiden vaikutuksesta Drosophila montana –mahlakärpäsen kylmänkestävyyteen*. Ekologian ja Ympäristönhoidon LuK –tutkielma. Jyväskylän Yliopisto, 16 s.
- Overgaard, J., Sorensen, J.G., Soren, O.P., Volker, L. & Holmstrup, M. 2005. Changes in membrane lipid composition following rapid cold hardening in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 51: 1173-1182.
- Pener, P. 1992. Environmental Cues, Endocrine Factors, and Reproductive Diapause in Male Insects. *Chronobiol. Int.* 9: 102-113.
- Quinn, P.J. 1985. A lipid-phase separation model of low-temperature damage of biological membranes. *Cryobiology*. 22: 128-146.
- Rako, L. & Hoffmann, A.A. 2006. Complexity of the cold acclimation response in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 52: 94-104.

- Rinehart, J.P., Yocum, G.D. & Denlinger, D.L. 2000. Developmental upregulation of inducible *hsp70* transcripts, but not the cognate form, during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 515-521.
- Saunders, D.D. 2002. *Insect clocks*. Elsevier science B. V., The Netherlands, 560 s.
- Schmidt, P.S., Paaby, A.B. & Heschel, M.S. 2005. Genetic variance for diapause expression and associated life histories in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 59: 2616-2625.
- Schmidt, P.S. & Conde, D.R. 2006. Environmental heterogeneity and the maintenance of genetic variation for reproductive diapause in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 60: 1602-1611.
- Sejerkilde, M., Sorensen, J.G. & Loeschcke, V. 2003. Effects of cold- and heat hardening on thermal resistance in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 49: 719-726.
- Sinclair, B.J. 1999. Insect cold tolerance: how many kinds of frozen? *Eur. J. Entomol.* 96: 157-164.
- Stanley, S.M., Parssons, P.A., Spence, G.E. & Weber, L. 1980. Resistance of species of the *Drosophila melanogaster* subgroup to environmental extremes. *Aust. J. Zool.* 28: 413-421.
- Stratman, R. & Markow, T.A. 1988. Resistance to thermal stress in desert *Drosophila*. *Funct. Ecol.* 12: 969-970.
- Suutari, M., Rintamäki, A. & Laakso, S. 1997. Membrane phospholipids in temperature adaptation of *Candida utilis*: alterations in fatty acid chain length and unsaturation. *J. Lipid Res.* 38: 790-794.
- Takashi, O., Kimura, M.T. & Hori, S.H. 1992. Energy storage during reproductive diapause in the *Drosophila melanogaster* species group. *J. Comp. Physiol. B.* 162: 203-208.
- Tatar, M. & Yin, C.-M. 2001. Sow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. *Exp. Gerontol.* 36: 723-738.
- Thrieringer, H.A., Jones, P.G. & Inouye, M. 1998. Cold shock and adaptation. *Bioessays* 20: 49-57.
- Throckmorton, L.H. 1982. The *virilis* species group. Teoksessa: Ashburner, M., Carson, H.L. & Thompson, J.N. (toim.), *The Genetics and Biology of Drosophila*, Academic Press, London, 227-296.
- Vesala, L. 2007. *Kylmänkestävyyden mittaaminen ja sekvenssimuuntelu kahdessa kylmänkestävyyteen liittyvässä geenissä (Dca ja Sas) Drosophila montanalla ja D. viriliksellä*. Ekologian ja Ympäristönhoidon Pro gradu –tutkielma. Jyväskylän Yliopisto, 47 s.
- Watson, P.F. & Morris, G.J. 1987. Cold shock injury in animals. Teoksessa: Bowler, K. & Fuller, B.J. (toim.), *Temperature and Animal Cells*, The Company of Biologist Limited, Cambridge, 311-340.
- Willmer, P., Stone, G. & Johnston I. 2000. *Environmental Physiology of Animals*. Blackwell Science, New York, 644 s.
- Yocum, G.D. & Denlinger, D.L. 1994. Anoxia blocks thermotolerance and the induction of rapid cold hardening in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Physiol. Entomol.* 19: 152-158.

Liite 1.

Rosatan ja Kyriacoun mallaspuuro:

250 ml vettä
 11,5 g sukroosia
 11,5 g kuivahiivaa
 2,5 g agar
 2,5 ml nipagin

Sekoita veden joukkoon sukroosi, kuivahiiva ja agar. Kiehauta seosta noin 40 minuuttia. Jäähdytä puuro noin 55 °C:ksi ja lisää nipagin puuroon.

2% agarseos:

50 ml vettä
 1 g agar

Sekoita ainekset keskenään ja kiehauta mikrossa kunnes seos läpikuultavaa.

Liite 2.

Nested ANOVA design:

```
UNIANOVA
  selviyt.aika BY diapaussi karaistum sukupuoli putki toistot
  /RANDOM = putki
  /METHOD = SSTYPE(3)
  /INTERCEPT = INCLUDE
  /SAVE = RESID
  /PLOT = PROFILE( diapaussi*karaistum )
  /PRINT = HOMOGENEITY
  /CRITERIA = ALPHA(.05)
  /DESIGN = diapaussi karaistum sukupuoli diapaussi*karaistum diapaussi
  *sukupuoli karaistum*sukupuoli diapaussi*karaistum*sukupuoli
  putki(diapaussi*karaistum*sukupuoli*toistot)
```