

Pro Gradu -tutkielma

**Kylmän aiheuttamat muutokset *Dca*- ja *Frost*-geenien
toiminnassa *Drosophila montana* -mahlakärpäsellä**

Taru Kuparinen



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Evoluutiogenetiikka

8.6.2010

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Evoluutiogenetiikka

KUPARINEN, T.:

Kylmän aiheuttamat muutokset *Dca*- ja *Frost*-geenien toiminnassa *Drosophila montana*-mahlakärpäsellä

Pro Gradu -tutkielma:

31 s.

Työn ohjaajat:

FT Maaria Kankare & FM Laura Vesala

Tarkastajat:

Prof. Mikko Mönkkönen & Prof. Janne Kotiaho

Kesäkuu 2010

Hakusanat: akklimaatio, kylmäkäsittely, kylmänkestävyys, lisääntymisdiapaussi, qPCR

TIIVISTELMÄ

Lämpötila on tärkeä eliöiden levinneisyyttä ja runsautta rajoittava tekijä. Pohjoisilla leveysasteilla lämpötilavaihtelut ja kylmyys asettavat haasteita kaikille organismeille. Esimerkiksi hyönteisille on kehittynyt lukuisia menetelmiä, joiden avulla ne selviävät kylmistä olosuhteista. Hyönteisillä ympäristön ärsykkeet laukaisevat diapaussin eli lepokauden ja se on yleinen keino sopeutua ympäristön kausittaisiin muutoksiin. Yksi aikuisvaiheen diapaussin muoto on niin kutsuttu lisääntymisdiapaussi, jonka on havaittu muun muassa parantavan kylmänkestävyyttä. Hyönteisten kylmänkestävyydessä akklimaatiolla tarkoitetaan hidasta karaistumista kylmiin olosuhteisiin, ja se on ominaista hyönteisille, joista tulee syksyllä lämpötilan hitaasti laskeutessa kylmänkestävämpiä. Kylmyys aiheuttaa hyönteisissä monenlaisia vasteita ja esimerkiksi geenien toiminta muuttuu kylmäaltistuksen seurauksena. Useita niin kutsuttuja kylmänkestävyyden kandidaattigeenejä on voitu liittää hyönteisten kylmänkestävyyteen. Esimerkiksi *Drosophila melanogaster* -kärpäslajilla *Dca*- ja *Frost*-geenien toiminta muuttuu kylmän vaikutuksesta. Geenien toiminnan tutkimiseen hyönteisten kylmänkestävyydessä soveltuva menetelmä on esimerkiksi kvantitatiivinen, reaaliaikainen PCR-menetelmä (qPCR). Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää qPCR:n avulla saavatko luonnonoloja mukailevat kylmäkäsittelyt (kylmäshokki, kylmäshokista palautuminen ja akklimaatio) aikaan *Dca*- tai *Frost*-geenin toiminnan muuttumisen kontrollitasoon verrattuna *Drosophila montana* -naarailta ja eroaako geenien toiminta sukukypsien ja lisääntymisdiapaussissa olevien naaraiden välillä. Tutkimuksen tulosten perusteella kylmäkäsittelyt eivät muuttaneet tutkimusgeenien toimintaa sukukypsillä yksilöillä. Sen sijaan tutkimusgeenien toiminta oli diapaussaavilla naarailta voimakkaampaa kuin sukukypsillä naarailta. Geenien toiminnan muuttumattomuus sukukypsillä yksilöillä saattaa olla seurausta esimerkiksi sukukypsien yksilöiden resurssien jakamisesta ja naaraiden kasvatusolosuhteiden (kesä) aikaansaamista tekijöistä. Sen sijaan geenien toiminnan muuttuminen lisääntymisdiapaussissa olevilla naarailta tukee aiempia tutkimustuloksia, joiden mukaan diapaussi lisää valmiutta vastata elinympäristön stressiin, jollaisina myös kylmäkäsittelyjä voidaan pitää. Kaiken kaikkiaan tutkimuksen tulokset antavat viitteitä siitä, että kahden tutkitun kylmänkestävyysgeenin, *Dca*:n ja *Frost*:n, sekä lisääntymisdiapaussin ja kylmänsiedon välillä vallitsee yhteys. Tutkimuksen tulokset auttavat ymmärtämään paremmin kylmänsiedon geneettisen taustan laajuutta, avaten samalla runsaasti uusia tutkimuskysymyksiä.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Science

Department of Ecological and Environmental Science

Evolutionary genetics

KUPARINEN, T.:

Cold-induced changes in *Dca* and *Frost* gene expression levels in a malt fly, *Drosophila montana*

Master of Science Thesis:

31 p.

Supervisors:

PhD Maaria Kankare & MSc Laura Vesala

Inspectors:

Prof. Mikko Mönkkönen & Prof. Janne Kotiaho

June 2010

Key Words: acclimation, cold tolerance, cold treatment, qPCR, reproductive diapause

ABSTRACT

Temperature is one of the most important factors determining the distribution and abundance of organisms. In insects the ability to tolerate cold varies greatly and many insect species have evolved numerous adaptations to survive in cold conditions. Diapause, which is triggered by environmental factors, is a common way for insects to survive seasonal environmental changes. One form of diapause in adult insects is reproductive diapause, which among other things, improves cold tolerance. Cold acclimation is a slow cold hardening that occurs in cold conditions and is common in many insect species, enabling them to become more cold tolerant when temperatures become extremely low. Cold temperatures can cause several responses in insects including changes in gene expression levels. Several candidate genes have been connected to insect cold tolerance. In *Drosophila melanogaster*, expression levels of *Dca* and *Frost* genes have been shown to change in response to cold conditions. In this study, I used the qPCR method to investigate whether temperature manipulations that simulate natural conditions (cold shock, recovery from cold shock and acclimation) evoke changes in the expression levels of the *Dca* and *Frost* genes when compared to control levels in *Drosophila montana* females. I also tested for differences in gene expression levels between reproducing and diapausing females. My results indicate that cold treatments did not change gene expression levels in reproducing females when compared to control levels. However, expression levels of both genes were higher in diapausing females than in reproducing females in all treatments. Constant gene expression levels in reproducing females may follow from resource allocation or from the summer conditions experienced by the females. In addition, the increased gene expression levels in diapausing females found in this study is supported by previous research, which indicates that diapause increases the capacity to respond to habitat stresses like low temperatures. Overall the results of this study supports the idea that there is a link between the two genes, reproductive diapause and cold tolerance. These results improve our understanding of the genetic background of cold tolerance and diapause and open the door to many interesting research questions.

Sisältö

1. JOHDANTO	5
1.1. Hyönteisten kylmänsieto.....	5
1.2. Kylmän aiheuttamat vauriot.....	5
1.3. Kylmänsietoon vaikuttavia tekijöitä.....	6
1.3.1. Kylmäkaraistuminen ja kylmänkestävyys.....	6
1.3.2. Diapaussi ja kylmänkestävyys.....	8
1.4. Geenien toiminnan tutkiminen.....	9
1.4.1. Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR (qPCR).....	9
1.4.2. Muita geenien toiminnan tutkimisen menetelmiä.....	10
1.5. <i>Drosophila</i> -lajien kylmänkestävyyteen liitettyjä geenejä.....	11
1.5.1. Lämpöshokkiproteiinit ja niitä koodaavat geenit.....	11
1.5.2. Kylmänkestävyyden kandidaattigeenit.....	11
1.6. Pro Gradu -työn tavoitteet.....	12
2. AINEISTO JA MENETELMÄT	13
2.1. Työssä käytetyt <i>Drosophila</i> -lajit.....	13
2.2. Lisääntymisdiapaussin ja akklimaation vaikutus kylmänsietoon tutkimuspopulaation naarailla.....	13
2.3. <i>Dca</i> - ja <i>Frost</i> -geenien toiminta tutkimuspopulaation naarailla.....	14
2.3.1. Kylmäkäsittelyt.....	14
2.3.2. RNA-eristykset.....	15
2.3.3. cDNA-synteesi (RT-PCR).....	16
2.3.4. RNA- ja cDNA-eristysten puhtaus.....	16
2.3.5. Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR (qPCR).....	16
3. TULOKSET.....	17
3.1. Lisääntymisdiapaussin ja akklimaation vaikutus kylmänsietoon tutkimuspopulaation naarailla.....	17
3.2. Tutkimusgeenien toiminnan määrittäminen, suhteellinen normalisointi.....	18
3.2.1. Tutkimusgeenien toiminta sukukypsillä naarailla.....	19
3.2.2. Tutkimusgeenien toiminta sukukypsien ja lisääntymisdiapaussissa olevien naaraiden välillä.....	22
4. TULOSTEN TARKASTELU	24
4.1. Tutkimuspopulaation naaraiden kylmänsieto.....	24
4.2. Geenien toiminta sukukypsillä naarailla.....	24
4.3. Geenien toiminta lisääntymisdiapaussissa olevilla naarailla.....	25
4.4. Suhteellisen normalisoinnin ongelmakohdat qPCR-menetelmässä.....	26
4.5. Tulevaisuus.....	26
Kiitokset.....	27
Kirjallisuus.....	27

1. JOHDANTO

1.1. Hyönteisten kylmänsieto

Kylmä lämpötila asettaa haasteita kaikille organismeille, ja myös hyönteiset kestävät kylmiä olosuhteita vaihtelevasti (Clark & Worland 2008). Hyönteisten kylmänsietokyky on useiden tekijöiden summa ja tutkimuskohteena varsin mielenkiintoinen ja runsaasti tutkittu. Perinteisesti hyönteisten kylmänkestävyys on jaettu kahteen strategiaan, kylmää sietäviin ja kylmää sietämättömiin lajeihin. Kylmää sietämättömät lajit selviävät alle 0 °C:een lämpötilasta estämällä kehon jäätymistä nostamalla ylijäähtymispistettään (piste, jossa ruumiinnesteet jäätyvät) ja välttämällä näin jääkiteiden muodostumisesta aiheutuvia haittoja, kun taas kylmää sietävät lajit kestävät elimistön jäätymistä (Lee 1991, Storey & Storey 1988). Suurin osa hyönteisistä ei kestä jäätymistä vaan ne kuolevat silloin, kun hemolymfa eli verta vastaava hyönteisen ruumiinneste jäätyy (Denlinger & Lee 1998).

Kylmänkestävyyden jakoa kahteen strategiaan pidetään nykyisin yksiselitteisyytensä vuoksi riittämättömänä ja esimerkiksi Bale (1993) ja Sinclair (1999) ovat luoneet tarkemman hyönteisten kylmänkestävyyden luokittelun. Balen (1993) mukaan hyönteisten kylmänkestävyys jaetaan niin, että jäätymistä kestävä laji on oma luokkansa ja kylmää kestävä laji jaetaan edelleen viiteen eri luokkaan: jäätymistä välttäviin, hyvin kylmyyttä kestäviin, kohtuullisesti kylmää kestäviin, kylmyysherkkiin ja opportunistisiin lajeihin. Sinclairin (1999) lisäksi Balen (1993) luokitteluun on jäätymistä kestävien hyönteisten jako edelleen neljään alaluokkaan.

Hyönteisen kylmänkestävyyttä voidaan mitata määrittelemällä hyönteisen ylijäähtymispiste (supercooling point, SCP) sekä LTT (lower lethal temperature) eli alin lämpötila, josta yksikään hyönteinen ei selviä hengissä (Czajka & Lee 1990). Vaikka SCP:llä tarkoitetaan lämpötilaa, jossa ruumiinnesteet jäätyvät, voivat jo paljon korkeammat lämpötilat aiheuttaa kuoleman. Esimerkiksi *Drosophila melanogaster* -kärpäslajilla toukkien, koteloiden ja aikuisten yksilöiden SCP sijoittui lämpötilavälille -17 °C - -20 °C, mutta silti jo kahden tunnin altistuksen jälkeen -5 °C:ssa puolet aikuisista kärpäksistä kuolee (Czajka & Lee 1990). SCP ei siis välttämättä kerro paljoakaan hyönteisen todellisesta kylmänkestävyydestä, vaan tutkimuksessa tulee aina ottaa huomioon lämpötilan lisäksi myös altistusaika.

Hyönteisten kylmänkestävyydetutkimuksen alkuvaiheessa, 1900-luvun alkupuolella, tutkimus kohdistui hyönteisten fysiologiseen kylmänsietoon, eikä kylmänsietoa lisäävistä tai siihen vaikuttavista mekanismeista tiedetty kovinkaan paljon (Clark & Worland 2008). Tänä päivänä jatkuvasti kehittyvät tutkimusmenetelmät ovat mahdollistaneet lukuisten täysin uudenlaisten tutkimusten suorittamisen myös hyönteisten kylmänkestävyyteen liittyen. *D. melanogaster* -kärpäsen koko genomitiedon julkaiseminen vuonna 2000 (Adams ym. 2000) vauhditti tunnetun malliorganismien ja muiden hyönteisten kylmänkestävyyden tutkimista sekä stressitutkimusta geneettisellä tasolla. Perinteisten sekvenssitason vertailututkimusten lisäksi uudet menetelmät, kuten mikrosirutekniikka ja kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR ovat edesauttaneet geenien toiminnan tuntemusta ja tuoneet esille runsaasti täysin uudenlaisia tutkimuskysymyksiä.

1.2. Kylmän aiheuttamat vauriot

Vaikka hyönteisillä on lukuisia kylmältä suojaavia mekanismeja, voi kylmyys silti aiheuttaa niiden elimistössä monenlaisia vaurioita. Kylmän aiheuttamat vauriot riippuvat lämpötilasta, sen vaikutuksesta kehon sisältämän veden jäätymiseen ja itse hyönteisen jäätymiseen (Michaud & Denlinger 2005) sekä kylmälähtöajasta (Denlinger & Lee 1998). Pienikokoisten vaihtolämpöisten hyönteisten ruumiista 70 % on vettä, joten suurin kylmyyden mukanaan tuoma haitta on ruumiinnesteiden jäätyminen (Denlinger & Lee

1998). Suoranaisen jäätyminen lisäksi kylmän lämpötilan tiedetään aiheuttavan solussa esimerkiksi proteiinien rakennemuutoksia (denaturaatio) (Morris & Clarke 1987) ja entsyymitoiminnan häiriintymistä sekä muutoksia solunsisäisessä pH:ssa (Denlinger & Lee 1998).

Hyönteisillä lisääntymisjärjestelmän tiedetään olevan erityisen herkkä kylmän vaikutuksille. Esimerkiksi kylmäkäsittelyn saaneet lihakärpäsen (*Sarcophaga crassipalpis*) esiikuiset (pharate adults) onnistuivat poistumaan kotelostaan, syömään ja parittelemaan, mutta jälkeläistuotto väheni (Denlinger & Lee 1998). Coulson ja Bale (1991) tutkivat kylmäkäsittelyn saaneita huonekärpäs-naaraita (*Musca domestica*) ja havaitsivat niiden tuottavan vähemmän munia elinaikanaan, kuin ei-käsiteltyjen kontrollinaaraiden. Naaraiden heikentyneen jälkeläistuoton pääteltiin olevan seurausta sekä lyhyemmästä eliniästä että vähentyneestä munamäärästä. Lisäksi tutkimuksessa havaittiin, että kylmäkäsittelyn saaneiden naaraiden munien elinkykyisyys oli huonompi kuin käsittelemättömien kontrollinaaraiden.

Lisääntymisjärjestelmän lisäksi hyönteisten hermo-lihasliitosjärjestelmän toiminnan tiedetään olevan herkkä kylmyyden vaikutuksille. Lämpötilan laskiessa hyönteiset menettävät asteittain kykynsä liikkua. Pistettä, jossa hyönteinen menettää lopullisesti liikuntakykynsä, hermojen ja lihasten menettäessä toimintansa vastaanottaa sähköisiä impulsseja, kutsutaan kylmäkoomapisteeksi (Denlinger & Lee 1998). Esimerkiksi *D. melanogaster* -lajin kylmäkoomapiste on 0 °C (Gibert ym. 2001). Kylmäkooman seuraukset hyönteisen fysiologiassa voivat altistusajasta riippuen olla joko pysyviä tai palautuvia, eli altistusajan ollessa tarpeeksi lyhyt, palaaminen lämpimään saa aikaan palautumisen myös koomasta (Gibert ym. 2001). Vaikka lyhyistä kylmäkoomakäsittelyistä aiheutuvien vaurioiden tiedetäänkin olevan palautuvia, niin useasti toistettuina ne voivat kuitenkin vaurioittaa hermosolujen toimintakykyä pysyvästi. Esimerkiksi Yocum ym. (1994) tutkivat useiden kylmäkoomakäsittelyjen vaikutuksia lihakärpäsen (*S. crassipalpis*) toimintakykyyn. Tutkimuksessa selvisi, että kylmäkoomakäsittelyn esiikuisvaiheessa saaneet lihakärpäset jatkoivat normaalia kehitystään, mutta kun käsittelyjä lisättiin, eivät aikuiset kärpäset pystyneet poistumaan kotelostaan.

1.3. Kylmänsietoon vaikuttavia tekijöitä

Hyönteiset puolustautuvat kylmiä olosuhteita vastaan monin tavoin. Ensimmäinen puolustuskeino on käyttäytymisen muuttuminen, jolloin talvehtiva hyönteinen voi hakeutua lämpimään mikroilmastoon (Denlinger & Lee 1998). Kaikki hyönteiset eivät kuitenkaan hakeudu lämpimään ja hyönteisten kylmänkestävyysstrategiaan kuuluukin lukuisia molekyyli-tason sopeutumia mukaan lukien kryoprotektanttien eli jäänestoaineiden ja INA-yhdisteiden (Ice Nucleating Agents) synteesi (Zachariassen & Hammel 1976), metaboliatason lasku (lepokauden eli diapaussin aikana) ja sen mukanaan tuomat muutokset sekä muutokset geenien toiminnassa (Storey 1997, Pfister & Storey 2006). Hyönteinen voi myös kylmäkaraistua eli kasvattaa asteittaisesti kylmänsietoaan.

Myös biologiset tekijät kuten hyönteisen sukupuoli, kehitysaste ja ikä vaikuttavat kylmänsietoon. Esimerkiksi 3-5 päivän ikäiset *D. melanogaster* -yksilöt selvisivät parhaiten kylmäaltistuksesta, kun vanhempien yksilöiden selviytyminen oli huomattavasti heikompaa (Czajka & Lee 1990).

1.3.1. Kylmäkaraistuminen ja kylmänkestävyys

Kylmiä olosuhteita talvella kestävä hyönteiset eivät välttämättä siedä kylmää lämpiminä vuodenaikoina, vaan kylmänkestävyys saavutetaan syksyllä vähitellen, tottumalla kylmenevään lämpötilaan (Clark & Worland 2008). Kylmäkaraistuminen voi tapahtua

nopeasti, lämpötilan ollessa alhainen vain muutamia minutteja, tai siihen saattaa kulua tunteja tai jopa viikkoja (Hoffman ym. 2003).

Nopeassa karaistumisessa (rapid cold hardening, RCH) sopeutuminen kylmään tapahtuu minuuttien tai tuntien aikana (Cossins & Bowler 1987), jolloin myös fysiologiset muutokset ovat pääsääntöisesti palautuvia (Khazaeli ym. 1997). Nopeaa karaistumista pidetään erityisen tärkeänä sellaisilla alueilla esiintyville lajeille, joilla saattaa keväisin ja syksyisin esiintyä nopeita ja suuria lämpötilanvaihteluita (Czajka & Lee 1990). Esimerkkinä nopean kylmäkaraistumisen hyödyistä on Coulsonin ja Balen (1991) tutkimus, jossa huonekärpäsen (*M. domestica*) kotelovaiheen kaikki yksilöt kuolivat, kun ne siirrettiin suoraan -7 °C:een kahdeksi tunniksi. Selviytyvyys kasvoi 80 % silloin, kun kärpästen annettiin olla 90 minuuttia 0 °C:ssa ennen siirtämistä nollan alapuoliseen lämpötilaan. Leen ym. (1987) tutkimuksessa +25 °C:ssa kasvatetut *S. crassipalpis* -lihakärpäslajin esiaikuiset eivät selvinneet kahden tunnin altistuksesta -10 °C:ssa, mutta jos yksilöitä pidettiin ennen altistusta vähintään 10 minuuttia 0 °C:ssa, teki se selviytymisestä todennäköisempää.

Kylmään akklimoitumisella tarkoitetaan pitkäkestoista, päivien tai viikkojen aikana tapahtuvaa kylmänkestävyyden lisääntymistä eli hidasta karaistumista (Hoffman ym. 2003). Akklimaatiota tapahtuu varsinkin hyönteisillä, jotka valmistautuvat syksyllä karaistumalla hitaasti talven kylmiin olosuhteisiin (Denlinger & Lee 1998). Esimerkiksi Chenin & Walkerin (1994) tutkimuksen mukaan aikuisten *D. melanogaster* -yksilöiden muutaman päivän akklimaatio kylmässä edesauttoi selviämistä kylmähokista ja suojaasi jäätymiseltä. Akklimaation tehokkuuteen vaikuttavat useat tekijät. Joissain tutkimuksissa on tullut ilmi, että akklimaatio voi joillakin lajeilla toimia erittäin hitaasti. Esimerkiksi Horin & Kimuran (1998) tutkimuksessa selvisi, että joillakin lajeilla maksimaalinen akklimaatiohyöty saavutettiin vasta 16 päivän akklimaation jälkeen. Myös karaistumislämpötilalla ja päivänpituudella on merkitystä akklimaatiossa. Kimura ym. (1994) tutkivat akklimaation ja päivänpituuden (32 päivää 11 °C tai 15 °C, päivänpituus lyhyt tai pitkä) vaikutusta selviytymiseen 2 °C:ssa useilla *Drosophila*-lajeilla (*D. lutescens*, *D. trilineata*, *D. prostipennis* ja *D. takashii*). Selviytyvyuden havaittiin olevan selvästi parempaa lajeilla, joiden akklimaatiolämpötila oli 11 °C ja päivänpituus lyhyt, mitä voidaan pitää sopeutumisena syksyllä kylmeneviin ja pimeneviin olosuhteisiin. Kelty & Lee (1999) puolestaan tutkivat asteittaisen lämpötilan laskun vaikutusta kylmänsietoon, mukailemalla tutkimuksessaan luonnossa tapahtuvaa asteittaista kylmenemistä ja huomasivat, että jos lämpötila laski 0,05 °C:ta tai 0,1 °C:ta minuutissa, parani *D. melanogaster* -lajin yksilöiden selviäminen kylmähokista.

Kylmäkaraistumisen mekanismeista ei ole vielä kovinkaan paljoa tietoa, mutta useat eri tekijät liittyvät karaistumisen ja paremman kylmänsiedon toisiinsa. Kylmäkaraistumisen tiedetään edesauttavan esimerkiksi jäätymiseltä suojaavien aineiden (kryokprotektanttien) synteesiä. Kryokprotektantteihin kuuluvat kolligatiiviset kryokprotektantit ja ei-kolligatiiviset kryokprotektantit. Kolligatiiviset kryokprotektantit esiintyvät ruumiinnesteissä suurina pitoisuuksina estäen ruumiinnesteiden jäätymistä. Tavallisia kolligatiivisia kryokprotektantteja ovat polyolit ja sokerit, joiden pitoisuuden on todettu nousevan myös karaistumisessa (Chen ym. 1987, Denlinger & Lee 1998). Esimerkiksi *S. crassipalpis* -kärpäsen kotelon hemolymfan glyserolipitoisuus nousi 300 % nopean kylmäkaraistumisen aikana (Chen ym. 1987). Ei-kolligatiiviset kryokprotektantit suojaavat myös solujen kalvoja estäen esimerkiksi proteiinien haitallisia rakennemuutoksia ja solujen kuivumista. Tunnetuimpia hyönteisten ei-kolligatiivisia proteiineja ovat proliini ja trehaloosi. Esimerkiksi Fieldsin ym. (1998) jyväkärpäskäällä (*Sitophilus granarius*) ja lesehärällä (*Cryptolestes ferrugineus*) tekemässä tutkimuksessa selvisi, että elimistön trehaloosimäärä kaksinkertaistui akklimaatiokäsittelyn aikana. INA-yhdisteet (Ice

Nucleating Agents) aloittavat jäätymisprosessin ja myös niillä on todettu olevan yhteys karaistumiseen ja kylmän aiheuttamien vaurioiden torjuntaan. Hyönteisillä INA-yhdisteet ovat proteiineja ja lipoproteiineja (Willmer ym. 2000). INA:t saavat aikaan jäätymistä normaalia korkeammassa lämpötiloissa ja tätä kautta niitä sisältävän suolen tyhjentyminen edesauttaa karaistumista (Cannon & Block 1988). Kausittaiset vaihtelut hyönteisten kylmänkestävyydessä ovat yhteydessä myös muutoksiin solukalvojen fosfolipidien rasvahappokoostumuksessa (Phospholipid Fatty Acid, PLFA) (Bennett ym. 1997, Kostal & Simek 1998, Ohtsu ym. 1998) niin, että tyydyttämättömien rasvahappojen määrä kasvaa kylmenevissä olosuhteissa. Määrän kasvu lisää kalvojen juoksevuutta, parantaen kylmänsietoa. Esimerkiksi Bennettin ym. (1997) äkämäpistiäisellä (*Eurosta solidaginis*) tekemässä tutkimuksessa selvisi, että tyydyttämättömien rasvahappojen suhdeluku kasvoi 3,0:sta 4,2:een viilenevien syyskuukausien aikana. Lisäksi tutkimuksissa on saatu viitteitä siitä, että solukalvojen rasvahappokoostumuksen muutokset liittyisivät varsinaisen karaistumisen lisäksi myös päivittäisiin lämpötilavaihteluihin (Overgaard ym. 2006) ja valojaksoon (Ohtsu ym. 1998, Hodková ym. 2002). Edellä mainittujen tekijöiden lisäksi kylmäkaraistumisen tiedetään edesauttavan muun muassa stressiproteiinien tuotannon lisääntymistä (ks. Johdanto 1.5.1.).

1.3.2. Diapaussi ja kylmänkestävyys

Lepokausi eli diapaussi edesauttaa eliöitä selviämään haitallisista ympäristöolosuhteista (Williams & Sololowski 1993). Esimerkiksi useat lauhkean vyöhykkeen hyönteiset talvehtivat diapaussissa ja altistuvat näin ollen kaikista kylmimmille ja ankarammille olosuhteille viettäessään lepokautta (Denlinger & Lee 1998). Diapaussia ei kuitenkaan voida liittää ainoastaan lauhkeiden tai kylmien vyöhykkeiden lajeihin, ja tätä kautta kylmänkestävyyteen, koska lepokautta viettävät myös muiden lämpötilavyöhykkeiden lajit. Diapaussin laukaisevat muutokset ympäristöolosuhteissa kuten lämpötilassa ja päivän pituudessa. Mahdollisia diapaussin aikaansaamia muutoksia yksilössä ovat esimerkiksi aineenvaihdunnan hidastuminen ja suolen tyhjentyminen. Onkin arveltu, että esimerkiksi nämä piirteet saattaisivat vaikuttaa hyönteisten kylmänkestävyyteen vaikka itse diapaussi ei siihen vaikuttaisikaan (Denlinger & Lee 1998).

Diapaussin ja kylmänkestävyyden yhteys voi olla suora tai sattumanvarainen (Denlinger & Lee 1998). Esimerkiksi maissikoisalla (*Ostrinia nubilalis*) on kyse satunnaisesta yhteydestä eli laji voi olla diapaussissa olematta kylmänkestävä: toukka menee diapaussiin päivänpituuden lyhentyessä, mutta tulee kylmänkestäväksi vasta altistuttuaan kylmälle (Hanec & Beck 1960). Kahdella paljon tutkitulla lihakärpäslajilla (*S. bullata* ja *S. crassipalpis*) diapaussi ja kylmänkestävyys ovat tiiviisti yhteydessä (Lee & Denlinger 1985). Kyseisillä lihakärpäslajeilla kylmänkestävyys on osa diapaussia eikä erillistä kylmänkestävyyden laukaisevaa ympäristötekijää tarvita. *S. crassipalpis* -lajilla kotelovaiheen diapaussissa olevat yksilöt selviävät jopa useita päiviä lämpötiloista, jotka ovat lähellä niiden SCP:tä (-23 °C), kun taas saman ylijäähtymispisteen omaavat, ei-diapaussissa olevat kotelot kuolevat -10 °C:ssa alle tunnissa (Lee & Denlinger 1985).

Se missä kehitysvaiheessa diapaussiin mennään, vaihtelee lajien välillä, mutta esimerkiksi useilla *Drosophila*-lajeilla diapaussi sijoittuu aikuisvaiheeseen (Clark & Worland 2008). Yksi aikuisvaiheen diapaussin muoto on niin kutsuttu lisääntymisdiapaussi. Lisääntymisdiapaussi parantaa yksilön mahdollisuuksia selvitä esimerkiksi pitkästä ja kylmästä talvesta ja se siirtää hedelmöitymisen vuodenaikaan, jolloin munien ja jälkeläisten selviytyminen on todennäköisempää (Pener 1992). Valojakso ja lämpötila indusoivat muiden diapaussin muotojen tavoin myös lisääntymisdiapaussia. Esimerkiksi Saunders ym. (1989) saivat selville, että *D. melanogaster* -lajilla lisääntymisdiapaussin laukaiseva lämpötila on 12 °C, fotoperiodin eli valojakson ollessa 10

tuntia valoa ja 14 tuntia pimeää vuorokaudessa. Lisääntymisdiapaussissa lisääntymispiirteiden kehitys pysähtyy päivänpituuden muuttuessa, naarailta ovarioiden eli munarauhasten kehitys pysähtyy ja pariutumiskäyttäytyminen muuttuu molemmilla sukupuolilla (Tatar & Yin 2001). Lisääntymisdiapaussissa olevat aikuiset voivat kuitenkin syödä ja pysyä aktiivisina. Myös lisääntymisdiapaussilla ja paremmalla kylmänsiedolla tiedetään olevan joissakin tapauksissa yhteys. Esimerkiksi lisääntymisdiapaussissa olevalla tuliluteella (*Pyrrhocoris apterus*) INA-yhdisteiden tuotto laskee, polyolejen lisääntyy ja solukalvojen rasvahappokoostumus eroaa verrattaessa sukukypsiin naaraisiin (Šlachta ym. 2002). INA-yhdisteiden tuoton vähentyminen ja lisääntynyt polyolejen tuotto on samalla tutkimuslajilla voitu liittää myös kylmäkaraistumiseen (Hodková & Hodek 1997, Košťál ym. 2001).

Diapaussi hidastaa hyönteisen aineenvaihduntaa ja esimerkiksi Tatar ja Yin (2001) huomasivat *D. melanogaster* -lajilla tekemässään diapaussitutkimuksessa, että myös vanheneminen hidastui lisääntymisdiapaussin aikana. Diapaussissa olleet aikuiset pysyivät elossa paljon pidempään kuin ei-diapaussissa olevat, joten hitaaseen ikääntymiseen voikin liittyä kohonnutta stressinsietokykyä, kuten myös resurssien uudelleenjakoa yksilön fysiologisen tilan säilyttämiseksi.

1.4. Geenien toiminnan tutkiminen

1.4.1. Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR (qPCR)

PCR:llä eli polymeerasiketjureaktiolla tarkoitetaan molekyylibiologista menetelmää, jossa kolmivaiheisessa reaktiossa käytetään hyväksi DNA-polymeerasientsyymiä ja kahta oligonukleotidialuketta kohteena olevan DNA-alueen eksponentiaaliseen monistukseen. PCR koostuu sykleistä (yleensä 20–40 sykliä), joissa on kolme perusvaihetta: (1) kaksijuosteisen DNA:n denaturaatio, (2) oligonukleotidialukkeiden pariutuminen kohde-DNA:n kanssa ja (3) nukleiinihapposäikeen synteesi.

Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR (qPCR) antaa absoluuttista tietoa ajoon valittujen geenien toiminnan tasoista. qPCR:ssä monistetaan lähetti-RNA:sta käännettyä cDNA:ta eli komplementaarista DNA:ta. Suurin ero tavalliseen PCR:ään verrattuna on se, että qPCR:ssä PCR-tuotteen määrän muutoksia pystytään seuraamaan reaaliaikaisesti, jokaisen PCR-syklin jälkeen. qPCR:ssä jokainen positiivinen reaktio havaitaan fluoresenssisignaalin kerääntymisenä. Ct-arvolla (cycle treshold) tarkoitetaan sitä syklien määrää, joka tarvitaan siihen, että näytteen fluoresenssisignaali ylittää tietyn kynnsarvon. Ct-arvo on kääntäen verrannollinen nukleiinihapon määrälle kohdenäytteessä eli mitä alhaisempi Ct-arvo on, sitä enemmän näytteessä on nukleiinihappoa. Ct-arvo edesauttaa siten kunkin näytteen kvantitointia. PCR-reaktion aikana tapahtuvassa detektiossa hyödynnetään joko kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvia fluoresoivia merkkiaineita, kuten SYBR green -väriainetta (Lekanne-Deprez ym. 2002), tai fluoresoivia koettimia (Glegg 1992, Selvin 2005).

Fluoresoiva merkkiaine SYBR green sitoutuu qPCR:n synteesivaiheen jälkeen syntyvään kaksijuosteiseen PCR-tuotteeseen, minkä seurauksena fluoresenssi vahvistuu yli 100-kertaiseksi (Lekanne-Deprez ym. 2002). qPCR-laite mittaa automaattisesti SYBR green -väriaineen lähettämän fluoresenssin jokaisen PCR-syklin jälkeen. PCR:än denaturaatiovaiheessa merkkiaine taas irtoaa DNA-juosteesta ja PCR-reaktio jatkuu normaalisti. SYBR green -väriaineen hyvinä puolina pidetään sen yksinkertaisuutta ja sitä, ettei se vaadi erillisten koettimien suunnittelua. Huonona puolena on sen epätarkkuus, SYBR green nimittäin kiinnittyy kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han, myös PCR-reaktiossa mahdollisesti syntyviin epäspesifisiin tuotteisiin (Lekanne-Deprez ym. 2002). Epäspesifisten tuotteiden löytämiseksi qPCR:ssä tehdään niin sanottu

sulamiskäyräanalyysi, jossa ko. tuotteet näkyvät poikkeavina sulamispiikkeinä (Kubista ym. 2006).

Jotta PCR:n lähettämät fluoresenssit voidaan qPCR:ssä muuttaa luotettavasti lähetti-RNA:n määräksi, tarvitsee jokainen qPCR-ajo normalisoida. Normalisoinnissa käytetään kahta eri menetelmää, joko absoluuttista tai suhteellista normalisointia. Absoluuttisessa normalisoinnissa geenien toiminnan määrittämiseen käytetään konsentraatioiltaan tunnettua laimennossarjaa (Wong & Medrano 2005), kun taas suhteellinen normalisointi tehdään käyttäen referenssigeenejä (kontrolligeenejä) sisäisinä kontrolleina. Kontrolligeeneinä käytetään esimerkiksi niin kutsuttuja taloudenpitogeenejä (housekeeping genes) (Pfaffl 2004), kuten GAPDH:ia ja β -aktiinia, tai ribosomaalista RNA:ta (rRNA) (Pfaffl 2001, Wong & Medrano 2005). Näiden geenien toiminnan oletetaan pysyvän vakaana eri käsittelyjen välillä, ja ne on valittava huolella erikseen jokaiseen qPCR-ajoon.

1.4.2. Muita geenien toiminnan tutkimisen menetelmiä

DNA-sirutekniikka (ns. mikrosirutekniikka) perustuu niin ikään yksijuosteisten DNA molekyylien kykyyn paritua emäsparisäännön mukaan. Mikrosirutekniikan yksi tärkeimmistä sovelluksista on geenien toiminnan mittaaminen eli lähetti-RNA:n määrän monitorointi (Lockhart & Winzeler 2000). Mikrosirutekniikan avulla voidaan tutkia satoja tai jopa satojatuhansia geenejä samanaikaisesti (Beebee & Rowe 2004).

Menetelmänä mikrosiruanalyysi on geenien toimintaa tutkittaessa melko yksinkertainen ja etenee Monnin ym. 2002 mukaan esimerkiksi seuraavalla tavalla: ensimmäisessä vaiheessa suoritetaan RNA:n eristys, minkä jälkeen eristetty RNA käännetään cDNA:ksi. Kääntämisen jälkeen näyte hybridisoidaan ja leimataan samanaikaisesti kahdella fluoresoivalla merkkiaineella (on olemassa myös yksiväridataa tuottavia siruja). Leimaamisessa käytettyjä värejä ovat esimerkiksi Cy3 eli punainen ja Cy5 eli vihreä. Hybridisaation onnistuttua siru luetaan laserpohjaisella mikroskoopilla ja tulokseksi saadaan kuvat sirun fluoresenssista kahdella eri aallonpituudella, jotka kuvaavat testi- ja verrokinäytteiden cDNA:n hybridisoitumista kussakin sirun pisteessä. Geenisirujen kuvat esitetään värillisinä, jolloin varsinainen näyte näkyy punaisena ja vertailunäyte vihreänä. Mikäli geenin toiminta on näytteessä lisääntynyt, näkyy tämä punaisena pisteenä. Vihreä piste tarkoittaa heikentyntä toimintaa ja keltainen puolestaan yhtä aktiivista geenin toimintaa kummassakin näytteessä.

Kuvankeräyksen jälkeen sirujen fluoresenssi mitataan kussakin sirun pisteessä, vähennetään taustafluoresenssi ja muutetaan kuvasta saatu informaatio luvuiksi. Tietokonepohjaiset analyysiohjelmat kertovat testi- ja kontrollinäytteiden väliset erot, ja tätä kautta muuttavat geenien toiminnan suhdeluvuiksi, joista voi bioinformatiikan työkaluilla määrittellä geenien toiminnan tason (Monni ym. 2000).

Northern Blot -analyysin tarkoituksena on geenien toiminnan määrittäminen samanaikaisesti useammasta näytteestä. Trayhurn (1996) esittää northern blot -analyysin kulun seuraavalla tavalla: ensimmäisessä vaiheessa totaali-RNA eristetään halutusta näytteestä käyttäen apuna esimerkiksi formaldehydiä, joka saa solut rikkoutumaan, proteiinit denaturoitumaan ja RNA:n muuttumaan liukoiseksi. Seuraavassa vaiheessa on mahdollista erottaa lähetti-RNA totaali-RNA:sta niin sanottua poly-A+valintaa apuna käyttäen, minkä jälkeen RNA-juosteet erotellaan toisistaan perinteisellä agarosieeielektroforeesilla. Elektroforeesin jälkeen seuraa niin sanottu blottaus eli imeyttäminen esimerkiksi nylonkalvolle, jossa voidaan käyttää apuna joko vakuumia tai kapillaaria. Onnistuneen blottauksen jälkeen näytteet kiinnitetään kalvolle joko lämpökäsittelyllä tai UV-valoa apuna käyttäen. Seuraavassa vaiheessa valmistellaan käytettävä koetin, minkä jälkeen se hybridisoidaan kalvolle. Koettimen hybridisoinnin jälkeen kalvolta pestään pois kaikki turha, ei-kiinnittynyt RNA ja samalla pesun avulla

varmistetaan, että koetin on kiinnittynyt oikeaan kohde-RNA:han. Pesun jälkeen suoritetaan hybridisaatiosignaalien ajo, ajon kuvaus ja tulosten määrittäminen.

1.5. *Drosophila*-lajien kylmänkestävyyteen liitettyjä geenejä

1.5.1. Lämpöshokkiproteiinit ja niitä koodaavat geenit

Poikkeavat ympäristöolosuhteet muuttavat geenien toimintaa ja saavat aikaan niin kutsuttujen stressiproteiinien tuotantoa (Willmer ym. 2000). Hyönteisillä lämpöshokki (Hsp) -proteiinit liitetään usein nimensä mukaisesti lämpöshokkiin mutta niiden tiedetään olevan osallisina myös muissa elimistön stressitiloissa (Hoffmann & Parsons 1991), kuten kylmäaltistuksessa. Hsp-proteiinit toimivat solussa kaperoneina eli auttajina ja niiden varsinaisena tehtävänä on proteiinien laskostumisen edesauttaminen (Burton ym. 1988) ja tätä kautta niillä on oletettavasti myös kyky korjata stressin seurauksena vaurioituneita proteiineja (Qin ym. 2005).

Hsp-ryhmistä merkittävimpänä kylmänkestävyyden kannalta pidetään Hsp70-proteiiniperhettä (Denlinger & Lee 1998), vaikka tutkimustulokset Hsp70-proteiiniperheen osallisuudesta kylmänkestävyydessä ovatkin erittäin ristiriitaisia. Esimerkiksi Overgaardin ym. (2005) sekä Keltyn & Leen (2001) tutkimuksissa Hsp70:tä ei voitu liittää nopeaan kylmäkaraistumiseen eikä myöskään kylmäshokkiin, kun taas useissa muissa *D. melanogaster* -lajilla tehdyissä tutkimuksissa Hsp70 voitiin liittää kylmäaltistukseen. Esimerkiksi Colinet ym. (2009) saivat qPCR:n avulla tekemässään tutkimuksessa selville, että *Hsp70Aa*-geenin toiminta lisääntyi *D. melanogaster* -lajilla erityisesti kylmäaltistuksesta palaututtaessa. Hsp70-proteiineja esiintyy eukaryoottisolussa endoplasmakalvostossa, tumassa, sytoplasmassa ja mitokondrioissa (Heino & Vuento 2002).

Hsp-proteiineista myös muiden kuin Hsp70:n tiedetään liittyvän kylmänkestävyyteen. Esimerkiksi Hsp23-, Hsp26- ja Hsp83 -proteiineja koodaavien geenien toiminta lisääntyi nopean kylmäkaraistumisen aikana (Qin ym. 2005). Näiden kolmen proteiinin tiedetään toimivan *D. melanogaster* -lajilla munasarjojen suojasoluissa ja onkin arveltu, että näiden geenien toiminta liittyisi osaltaan lisääntymisen pysähtymiseen lämpöstressin seurauksena ja myöhemmin edesauttavana tekijänä tilasta palaututtaessa (Zimmerman ym. 1983). Kuitenkin kyseisten proteiinien merkitys kylmäkaraistumisessa jää epäselväksi. Tiedetään myös, että *D. auraria* -lajilla Hsp83-proteiinia koodaavan geenin toiminta lisääntyi huomattavasti karpästen joutuessa pitkäksi aikaa 0 °C:n lämpötilaan (Yiangou ym. 1997) ja on myös raportoitu, että kaikki tunnetut Hsp:t ilmentyisivät kyseisessä lämpötilassa *D. melanogaster* -yksilöillä (Burton ym. 1988).

Hsp-proteiineja koodaavien geenien (esim. *Hsp70*, *Hsp23*) toiminnan on tutkimuksissa todettu lisääntyvän myös kotelovaiheen diapaussissa olevilla *S. crassipalpis* -lihakarpäsillä (Yocum ym. 1998, Rinehart ym. 2000) ja toiminnan kasvun on todettu olevan riippumaton lämpötilastressistä (Rinehart ym. 2007).

1.5.2. Kylmänkestävyyden kandidaattigeenit

Hsp-proteiineja koodaavien geenien lisäksi myös muiden geenien toiminnan on havaittu muuttuvan kylmäaltistuksen seurauksena hyönteisillä. Kylmänkestävyyteen vaikuttavia geenejä on etsitty paljon *D. melanogaster* -lajilta ja eräässä mikrosirututkimuksessa 37 geenin toiminta muuttui karpästen kylmäkaraistumisen aikana (Qin ym. 2005). Yli kolmasosa näiden geenien koodaamista proteiineista oli kalvoproteiineja, mikä olikin odotettavissa, koska kalvojen rasvahappokoostumuksen tiedetään muuttuvan lämpötilamuutosten seurauksena (Haque & Russel 2004).

Frost-geeni (*Fst*) on yksi solussa kylmäältistuksen aikana esiintyvistä niin kutsutuista kylmänkestävyyden kandidaattigeeneistä. *Frost*-geenin koodaaman proteiinin perimmäistä toimintaperiaatetta solussa ei tiedetä, mutta sekvenssin perusteella sen on arveltu olevan mysiinin kaltainen proteiini, jota eritetään hemolymfaan (Goto 2001). Esimerkiksi Goto 2001 havaitsi *D. melanogaster* -lajilla Northern Blot -tekniikan avulla tekemässään tutkimuksessa, että *Frost*:n toiminta lisääntyi varsinkin pitkstä kylmäältistuksesta palauduttaessa (8 tuntia, 0 °C). Qin ym. (2005) tutkivat *Frost*:n transkriptiotasoa nopean kylmäkaraistumisen aikana ja saivat selville, että sen toiminta lisääntyi myös kylmäkaraistumisen seurauksena, mutta nousu ei ole yhtä huomattavaa kuin Goton (2001) tutkimuksessa. Goton (2001) sekä omien tutkimustulostensa perusteella Qin ym. (2005) kuitenkin spekuloiivat *Frost*-geenillä olevan tärkeän roolin kylmäkaraistumisessa ja kylmäältistusvaurioissa.

Toinen *Drosophila*-lajien kylmänkestävyyteen liitetty geeni on *Drosophila cold acclimation gene* eli *Dca* (nisäkkäillä homologinen geeni on *smg-30*), jonka koodaamalla proteiinilla on tehtävä solunsisäisen Ca^{2+} -homeostasian säätelyssä. Nisäkkäillä *smg-30* liitetään ikääntymiseen ja sen toiminnan tiedetään vähenevän yksilön vanhetessa (Fujita & Maryuama 1998, Fujita ym. 1998), kun taas *D. melanogaster* -kärpäksillä *Dca*-geenin toiminnan on havaittu lisääntyvän ikääntymisen myötä (Goto 2000). Kylmänkestävyydetutkimuksissa *Dca*-geeni liitetään erityisesti akklimaatioon, esimerkiksi Goton (2001) tutkimuksessa *Dca*-geenin transkriptiotasot nousivat kun *D. melanogaster* -yksilöitä pidettiin 1-2 vuorokautta 15 °C:ssa. Sen sijaan Qin ym. (2005) ja Sinclair ym. (2007) huomasivat tutkimuksessaan, että useista muista kandidaattigeeneistä poiketen *Dca*-geenin toiminta laskee kylmäältistuksen jälkeen, mikä Sinclairin ym. (2007) arvioiden mukaan saattaa kertoa vain erilaisesta Ca^{2+} -säätelystä näiden kahden tapahtuman välillä.

Desaturase2-geenin (*desat2*) toiminta solussa liitetään rasvahappojen biosynteesiin, ja tätä kautta myös tämän geenin on arveltu liittyvän kylmänkestävyyden säätelyyn (Overgaard ym. 2005). Esimerkiksi Greenberg ym. (2003) tutkivat *desat2*-geenin eri alleeleja *D. melanogaster* -populaatioilla ja päättelivät, että eri alleelit saattavat olla vastuussa kylmänkestävyyden variaatiosta saman lajin eri populaatioissa. Toisaalta esimerkiksi Sinclair ym. (2007) eivät havainneet *desat2*-geenin toiminnan muuttuvan kylmäältistuksessa tai sen jälkeen, mikä ei ollut oletettavaa, koska solukalvojen koostumuksen voisi kuvitella palaavan takaisin normaaliksi kylmäältistuksesta palauduttaessa (Clark & Worland 2008). Myös *desaturase1*- eli *desat1*-geenin koodaaman proteiinin tiedetään vaikuttavan solukalvojen fosfolipidien koostumukseen ja tätä kautta myös se on liitetty kylmänkestävyyteen (Montooth ym. 2006). Toisaalta *desat1*-geenin tiedetään toimivan myös feromonien biosynteesissä (Labeur ym. 2002).

Muista kandidaattigeeneistä *Sialic acid phosphate synthase* eli *Sas*-geenillä tiedetään olevan tekemistä jään sitoutumisen ja jäätymisvasteen kanssa (Kim ym. 2002). *Trehalase*- eli *Treh*-geeni liitetään soluissa trehaloosin synteesiin ja metaboliaan, ja trehaloosi saa hyönteisissä aikaan parempaa stressinsietoa sekä toimii myös energianlähteenä hemolymfassa (Chung 2008). Trehaloosin tuotanto lisääntyy hyönteisillä kylmissä olosuhteissa ja sen tiedetään myös toimivan jäänestoaineena (Lee 1989). Vaikka hyönteisten kylmänkestävyyden kandidaattigeenien tutkimus on viimeaikoina vauhdittunut ja tietomäärä tutkimuksen mukana lisääntynyt, lukuisat tutkimuskysymykset ovat edelleen avoimia ja lisätutkimusta tarvitaan.

1.6. Pro Gradu -työn tavoitteet

Aiempien tutkimusten pohjalta tiedetään, että lisääntymisdiapaussi parantaa kylmänkestävyyttä *D. montana* -mahlakärpäksellä (L. Vesala, julkaisematon). Tutkimukseni tarkoituksena oli selvittää kylmänkestävyyden geneettistä taustaa seuraamalla qPCR:n

avulla kahden kylmänkestävyyteen liitetyn kandidaattigeenin, *Dca:n* ja *Frost:n* toimintaa kylmähokin aikana, siitä palauduttaessa sekä akklimaatioissa. Tarkoituksena oli selvittää tapahtuuko näiden kahden geenin toiminnassa muutoksia kylmän vaikutuksesta *D. montanalla*. Tutkimuksessa käytettiin lisääntymisdiapaussissa olevia ja sukukypsiä naaraita, koska diapaussin tiedetään lisäävän joissakin tapauksissa kylmänkestävyyttä (Denlinger & Lee 1998). Työssä mitattiin aluksi lisääntymisdiapaussissa olevien ja kylmään akklimoituneiden naaraiden kylmänkestävyys. Tällä haluttiin varmentaa, että nämä ilmiöt vaikuttavat kylmänkestävyyteen käyttämässäni tutkimuspopulaatioissa. Tutkielmani pääkysymykset olivat 1) muuttuuko tutkimusgeenien toiminta kylmäkäsittelyjen seurauksena *D. montana* -naarilla verrattaessa kontrollinaaraisiin ja 2) eroaako geenien toiminta sukukypsien ja lisääntymisdiapaussissa olevien naaraiden välillä. Hypoteeseina olivat 1) geenien toiminta muuttuu kylmäkäsittelyjen seurauksena *D. montana* -naarilla verrattuna kontrollitasoon ja 2) lisääntymisdiapaussissa olevat naaraat sietävät kylmää paremmin kuin sukukypsät naaraat ja täten myös tutkittavat kylmänkestävyyden kandidaattigeenit toimivat niillä sukukypsiä naaraita enemmän.

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1. Työssä käytetyt *Drosophila*-lajit

Drosophila-mahlakärpäset soveltuvat hyvin alhaisen lämpötilan vaikutuksen tutkimiselle, sillä lajeja löytyy maailmanlaajuisesti erilaisista elinympäristöistä ja ympäristögradieniteista (Shorrocks 1977, Ayrinhac ym. 2004). Tutkimuslajina tässä työssä käytettiin *D. montana* -lajia, joka kuuluu alkuperältään Manner-Aasialaiseen *D. virilis* -lajiryhmään (Throckmorton 1982). *D. montana* -lajin levinneisyys ulottuu pohjoisessa aina 30°N:sta 70°N:een saakka. *D. montanalla* on myös tutkimuksen vaatima lisääntymisdiapaussi. Erityisen mielenkiintoisen tutkimuskohteen *D. montana* -kärpäksistä tässä tutkimuksessa tekee se, ettei lajin kylmänkestävyyteen liittyvien kandidaattigeenien toiminnasta ole aikaisempaa tietoa. Kaikki tutkimuksessa käytetyt yksilöt ovat peräisin linjasta, joka perustettiin vuonna 2008 Oulungalta (Suomi, 66°N) kerättyjen 20 naaraan jälkeläisistä. Tutkimuksessa käytettiin sukukypsiä ja lisääntymisdiapaussissa olevia naaraita, koska haluttiin tutkia myös naaraan fysiologisen tilan vaikutuksia kylmänsietoon geenien toiminnan tasolla. Kandidaattigeenit on etsitty *D. melanogaster* -lajin genomitiedon perusteella FlyBase-tietokannasta ja niiden avulla on suunniteltu alukkeet *D. montana* -lajille käyttäen hyväksi *D. montanan* lähilajin, *D. viriloksen* genomidataa (Kankare ym. 2010).

2.2. Lisääntymisdiapaussin ja akklimaation vaikutus kylmänsietoon tutkimuspopulaation naarilla

Ensimmäiseksi Pro gradu -työssäni testattiin käytettävän tutkimuspopulaation naaraiden kylmänsietoa, sekä lisääntymisdiapaussin ja akklimaation vaikutusta siihen. Lisäksi halusin varmuuden siihen, että tutkimuspopulaation naaraat selviävät hengissä tutkimuksessa käytetyistä kylmäkäsittelyistä (Taulukko 1). Kyseinen koe suoritettiin hyönteisten kylmänsietokokeissa yleisesti käytetyllä menetelmällä (esim. Gilbert ym. 2001, David ym. 2003), jossa tarkoituksena oli mitata hyönteisen toimintakyvyn palautumisnopeutta rajun kylmäältistuksen jälkeen (hermosolujen toiminnan palautumisnopeutta pidetään kylmänsietokyvyn mittana hyönteisillä tehdyissä tutkimuksissa).

Ennen varsinaisia kylmäkokeita kaikki Pro gradu -tutkielmassani käytetyt naaraskärpäset kerättiin kasvatuspulloista vuorokauden ikäisinä. Välittömästi keräyksen jälkeen naaraat siirrettiin kasvamaan +17 °C:een (+/- 0,5 °C) 14 vuorokaudeksi

ravintoseosta sisältäviin kasvatusputkiin, kahteen eri lämpökaappiin. Toisessa lämpökaapissa valaistusolosuhteet olivat 22 tuntia valoa ja 2 tuntia pimeää (22:2, pitkä päivä, sukukypsyys) ja toisessa *D. montana* -lajin Oulangan populaation lisääntymisdiapaussin edellyttämät 16 tuntia valoa ja 8 tuntia pimeää (16:8, diapaussi). Kokeessa käytettiin samanikäisiä karpäsiä, sillä iän tiedetään vaikuttavan kylmänkestävyyteen (Czajka & Lee 1990).

Kylmänsietokokeessa 20 lisääntymisdiapaussissa olevaa ja 20 sukukypsää kontrollinaarasta, sekä 20 lisääntymisdiapaussissa olevaa ja 20 sukukypsää akklimaatio-käsittelyn saanutta naarasta laitettiin 16 tunniksi -6 °C:een (tässä ajassa naaraat menevät kylmäkoomaan). Akklimaatio-käsittelyssä karpästen annettiin akklimoitua kylmään 24 tuntia +10 °C:ssa (akklimaatio1, Taulukossa 1, Kappale 2.3.3.). Kylmäkäsittelyn jälkeen naaraat asetettiin nopeasti koe-alustoille, jossa jokaiselle naaraalle oli oma 4X4 cm:n osasto (osastoja yhdessä levyssä yhteensä 12 kpl.). Koe-alustalle asetelun jälkeen kunkin naaraan kylmäkoomasta heräämisaika kirjattiin ylös ja katsottiin vaikuttaako lisääntymisdiapaussi tai akklimaatio merkitsevästi heräämisaikaan. Kokeen jälkeen naaraat säilöttiin 70 % etanoliin, avattiin ja määritettiin ovarioiden tilan mukaan joko diapaussaavaksi tai sukukypsäksi. Sukukypsällä naaraalla ovariot ovat suuret, valkoiset ja helposti havaittavissa, kun taas diapaussaavalla hyvin pienet ja läpikuultavat. Kylmänsietotutkimus toistettiin identtisenä yhden kerran. Aineiston tilastolliset analyysit suoritettiin SPSS 15.0-ohjelmalla.

2.3. *Dca*- ja *Frost*-geenien toiminta tutkimuspopulaation naarailla

2.3.1. Kylmäkäsittelyt

Ennen kylmäkäsittelyä naarakarpäsiä oli kasvatettu kuten edellä. Ensimmäisessä käsittelyssä noin 60 yksilöä (30 diapaussaavaa ja 30 sukukypsää) laitettiin tunniksi 0 °C:seen (shokki1). Toisessa käsittelyssä yksilömäärät olivat samat, mutta lämpötilaa laskettiin -6 °C:een ja altistusaikaa vähennettiin 30 minuuttiin (shokki2). Ensimmäisen ja toisen käsittelyn jälkeen yksilöt upotettiin välittömästi muoviputkissa (noin 10 karpästä/putki) nestetyypeen ja siirrettiin säilöön syväpakastimeen (-80 °C). Nestetyypeen upotetut karpäset kuolivat heti, jolloin saatiin tallennettua käsittelyn aikaiset RNA-tasot. Kolmannessa kylmäkäsittelyssä yksilömäärät, altistusaika- ja lämpötila olivat samat kuin ensimmäisessä käsittelyssä, mutta karpästen annettiin palautua kylmähokista huoneenlämmössä (20 °C) 30 minuutin ajan (palautuminen), minkä jälkeen yksilöt upotettiin nestetyypeen ja siirrettiin pakastimeen (Taulukko 1).

Akklimaatiota testattiin taulukossa 1 esitettyjen tietojen pohjalta niin, että ensimmäisessä käsittelyssä noin 30 diapaussaavaa ja 30 sukukypsää naarasta siirrettiin 24 tunniksi olosuhdekaappiin +10 °C:een (akklimaatio1). Toisessa käsittelyssä yksilömäärät ja altistusaika olivat samat mutta lämpötila oli +5 °C (akklimaatio2). Käsittelyjen jälkeen suoritettiin nestetypitys ja pakastaminen kuten edellä.

Varsinaisten kylmäkäsittelyjen lisäksi suoritettiin kontrollikäsittely. Kontrollikäsittelyssä noin 30 diapaussaavalle ja 30 sukukypsälle, 14 vuorokauden ikäiselle naaraskarpäselle ei annettu mitään kylmäkäsittelyä vaan ne toimivat qPCR:ssä verrokkeina käsitellyille karpäseille. Kontrolleina toimineet karpäset kasvatettiin samoissa valojaksoissa kuin koeyksilöt, minkä jälkeen ne laitettiin suoraan nestetyypeen ja edelleen säilöön syväpakastimeen.

Taulukko 1. Koeasetelman mukaiset kylmäkäsittelyt.

Käsittely	Käsittelyn kesto tunteina	Lämpötila (°C)	Palautuminen tunteina	Diapaussi	Kärpästen määrä
Shokki1	1	0	0	Kyllä	30
	1	0	0	Ei	30
Shokki2	0,5	-6	0	Kyllä	30
	0,5	-6	0	Ei	30
Palautuminen	0,5	-6	0,5	Kyllä	30
	0,5	-6	0,5	Ei	30
Akklimaatio1	24	10		Kyllä	30
	24	10		Ei	30
Akklimaatio2	24	5		Kyllä	30
	24	5		Ei	30

2.3.2. RNA-eristykset

Ennen varsinaisia RNA-eristyskäsittelyjä jokainen eristykseen päätyvä kärpänen avattiin nopeasti (niin, ettei kärpänen ehtinyt sulaa) pinsettien avulla mikroskoopin alla, ja määriteltiin ovarioiden tilan mukaan joko diapaussaavaksi tai sukukypsäksi (kuten edellä). RNA-eristykseen käytettiin Qiagenin eristyskittiä (RNeasy Protect Mini Kit, Qiagen). Jokainen RNA-eristys (6 yksilöä/eristys) aloitettiin sekoittamalla Eppendorf-putkessa 600µl RLT-puskuria ja 6µl 2-merkaptotetanolia. Seos lisättiin putkeen, joka sisälsi 6 diapaussitilaltaan tarkistettua kärpäsyksilöä. Näyte homogenisoitiin nopeasti steriilillä homogenointisauvalla jäissä, minkä jälkeen suoritettiin sentrifugointi (3 minuuttia, 13000 kierrosta minuutissa).

Sentrifugoinnin jälkeen päällimmäinen, läpikuultava faasi siirrettiin uuteen Eppendorf-putkeen ja lisättiin yksi tilavuus (600µl) 70 % etanolia. Seuraavaksi näyte pipetoitiin RNeasy pylvääseen, jonka alla oli 2ml:n putki ja sentrifugoitiin 15 sekuntia, 10 000 kierrosta minuutissa. Läpi tullut liuos heitettiin jäteastiaan ja suoritettiin DNAasi käsittely. DNAasi-käsittelyn ensimmäisessä vaiheessa pipetoitiin 350µl RW1-puskuria RNeasy-pylvääseen ja sentrifugoitiin 15 sekuntia, 10 000 kierrosta minuutissa. Läpi tullut liuos poistettiin mutta samaa putkea käytettiin edelleen seuraavassa vaiheessa. Erillisessä putkessa sekoitettiin varovaisesti 10µl DNAasia ja 70µl RDD-puskuria, minkä jälkeen seos lisättiin RNeasy-pylvääseen ja odotettiin 15 minuuttia ennen seuraavaa vaihetta. 15 minuutin jälkeen pylvääseen lisättiin 350µl RW1-puskuria ja sentrifugoitiin 15 sekuntia 10 000 kierrosta minuutissa. Läpi tullut liuos kaadettiin jäte-astiaan ja alaputki vaihdettiin.

Seuraavassa vaiheessa pylvääseen lisättiin 500µl RPE-puskuria ja sentrifugoitiin 15 sekuntia, 10 000 kierrosta minuutissa. Läpi tullut liuos poistettiin, lisättiin edelleen 500µl RPE-puskuria ja sentrifugoitiin aluksi 2 minuuttia, 10 000 kierrosta minuutissa ja edelleen 1 minuutti, 13 000 kierrosta minuutissa. Tämän jälkeen alaputki heitettiin jäteastiaan ja RNeasy-pylväs siirrettiin uuteen Eppendorf-putkeen, johon pipetoitiin 30µl RNAasi-vapaata vettä. Pylvästä sentrifugoitiin aluksi minuutti, 10 000 kierrosta minuutissa, minkä jälkeen läpi tullut neste pipetoitiin uudelleen pylvääseen ja sentrifugoitiin edelleen 1 minuutti, 10 000 kierrosta minuutissa. Lopuksi RNA-pitoisuus ja näytteen puhtausaste määritettiin NanoDrop ND-1000 spektrofotometrillä (NanoDrop, Wilmington, USA). Eristettyä RNA:ta säilytettiin pakastimessa, -20 °C:ssa. Ennen RT-PCR:ää jokainen näyte laimennettiin niin, että totaali-RNA:ta tuli jokaiseen cDNA-synteesiin sama määrä.

2.3.3. cDNA-synteesi (RT-PCR)

Eristetty totaali-RNA käännettiin vastaavaksi cDNA:ksi kaupallisella kitillä (iScript cDNA Synthese Kit, Bio-Rad, CA, Hercules). Kuhunkin 20 µl:n RT-PCR-reaktioon tuli 12-14µl nukleiinihappo-vapaata vettä, 4µl 5x iScript Reaction Mix:iä, 1µl iScript Reverse Transcriptase -entsyymiä ja 1-3µl RNA-templaattia. Kuhunkin reaktioon tuli 500 µl RNA:ta, jolloin veden ja RNA-templaatin µl-määrät vaihtelivat reaktiossa riippuen saadusta RNA-pitoisuudesta. RT-PCR ajettiin C1000 Thermal Cycler PCR-laitteilla (Bio-Rad) seuraavalla ohjelmalla: 5 minuuttia 25 °C, 30 minuuttia 42 °C, 5 minuuttia 85 °C ja lopuksi pysyvä tila 4 °C. Saadun cDNA:n laatu ja pitoisuus tarkastettiin jälleen NanoDrop ND-1000 spektrofotometrillä ja näytteet säilöttiin pakastimessa -20 °C:ssa. Ennen qPCR -ajoa näytteet laimennettiin 200 ng/µl konsentraatioon.

2.3.4. RNA- ja cDNA-eristysten puhtaus

RNA- ja cDNA-pitoisuudet mitattiin NanoDrop ND-1000 spektrofotometrillä. RNA-näyte on puhdas, kun sen absorbanssi-arvo 260/280 on lähellä 2,0 ja 260/230-arvo yli 1,8, ja DNA-näyte, kun 260/280-arvo on lähellä 1,8 ja 260/280-arvo lähellä 2,0.

2.3.5. Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR (qPCR)

Geenien toiminnan määrittämiseen käytettiin qPCR-menetelmää. Kyseinen menetelmä valittiin tutkimukseen sen tulosten luotettavuuden ja reaktioiden hyvän toistettavuuden takia.

Jokainen qPCR-ajo suunniteltiin huolellisesti Bio-Radin 96-kuoppalevyille ennen varsinaista näytteiden ajoa. Kuhunkin 20µl PCR-reaktioon käytettiin 12,5 µl iQ™ SYBR® Green Supermix:iä (Bio-Rad), 1µl molempia geneille valmiiksi suunniteltuja spesifisiä F- ja R-alukkeita, 5 µl laimennettua templaatti-cDNA:ta ja 0,5 µl steriiliä vettä. Kussakin qPCR -ajossa ajettiin molemmat tutkimusgeenit ja kaksi kontrolligeeniä (Taulukko 2) sekä negatiivinen kontrollinäyte, joka sisälsi samat reagenssit kuin muut näytteet lukuunottamatta templaattia.

Tutkimuksessa käyttämäni kontrolligeenit *Ef1a48D*:n (*Elongation factor 1 alpha 48D*) ja *eIf-4a*:n (*Eukaryotic initiation factor4a*) valittiin Kankareen ym. (2010) tutkimuksen perusteella. Kontrolligeenit oli tutkimuksessa todettu toimiviksi lisääntymisdiapaussissa olevien ja sukukypsien yksilöiden välisissä vertailuissa.

Taulukko 2. Tutkimuksessa käytetyt alukkeet ja niiden emäsjärjetykset. Geeneistä kaksi ensimmäistä on varsinaisia tutkimusgeenejä ja loput kaksi qPCR-ajoissa käytettyjä kontrolligeenejä.

Geenin nimi	F-aluke(5'-3')	R-aluke(5'-3')
<i>Dca (smp-30)</i>	CAGAACAAGACGTACAGGAC	TCATCGCCAATGTAGCGCAT
<i>Frost (Fst)</i>	ATTTGGATCATGGACGCTGG	AGCCTGAGTAGACTCCGATT
<i>Ef1a48D</i>	TCTACAAGTGCGGTGGTATC	GAGGTACCAGTGATCATGTTC
<i>eIf-4a</i>	AAGGGTGTTCGATCAACTT	CGGCAATATTAGCAGGCATT

qPCR-ajot ajettiin CFX96™ Real-Time PCR -laitteella, ja analysoitiin CFX Manager™ Software -ohjelmalla (versio 1.1.). qPCR-ajoissa käytetty PCR-ohjelma on esitetty taulukossa 3. Tulosten luotettavuuden lisäämiseksi poikkeavan reaktiokäyrän omaavat näytteet poistettiin analyysistä, jolloin rinnakkaisten näytteiden määrä saattoi vähentyä ajoa analysoitaessa.

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

Taulukko 3. Tutkimuksessa käytetty qPCR-ohjelma.

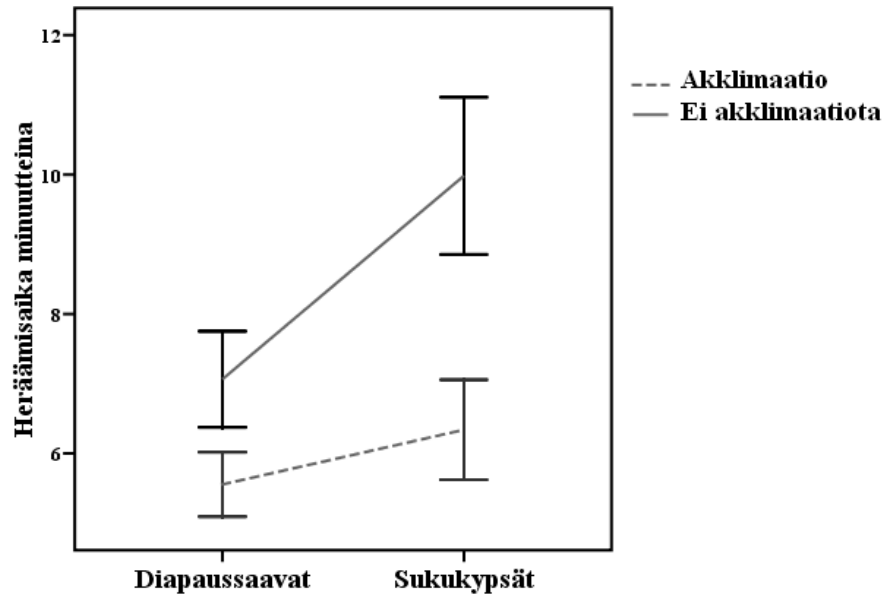
Ohjelman vaihe	Kesto min:s	Lämpötila (°C)	Kierrokset
1. Alkudenaturaatio	3:00	95,0	1
2. Denaturaatio	0:10	95,0	
3. Alukkeiden kiinnittyminen	0:10	54,0	40
4. Synteesi	0:30	72,0	
5. Sulamiskäyräanalyysi	0:10	95,0	
	0:05	65,0	1
		95,0	

3. TULOKSET

3.1. Lisääntymisdiapaussin ja akklimaation vaikutus kylmänsietoon tutkimuspopulaation naarailla

Heräämisaikojen tilastollisen merkitsevyyden määrittämiseen tutkimuksessa käytettiin kaksisuuntaista varianssianalyysiä (ANOVA). Varianssianalyysin oletuksiin kuuluu normaalijakautuneisuus sekä varianssien yhtäsuuruus. Normaalijakautuneisuus oli analyysissä voimassa. Levenen testillä mitattu varianssien yhtäsuuruusoletus ei tutkimuksessa täytynyt, minkä vuoksi testin luotettavuutta nostettiin laskemalla p-arvoa, $p < 0,001$. Tutkimuksessa suoritettavat toistot eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi toisistaan ($t(150)=0,050$, $p=0,954$), joten ne analysoitiin yhdessä.

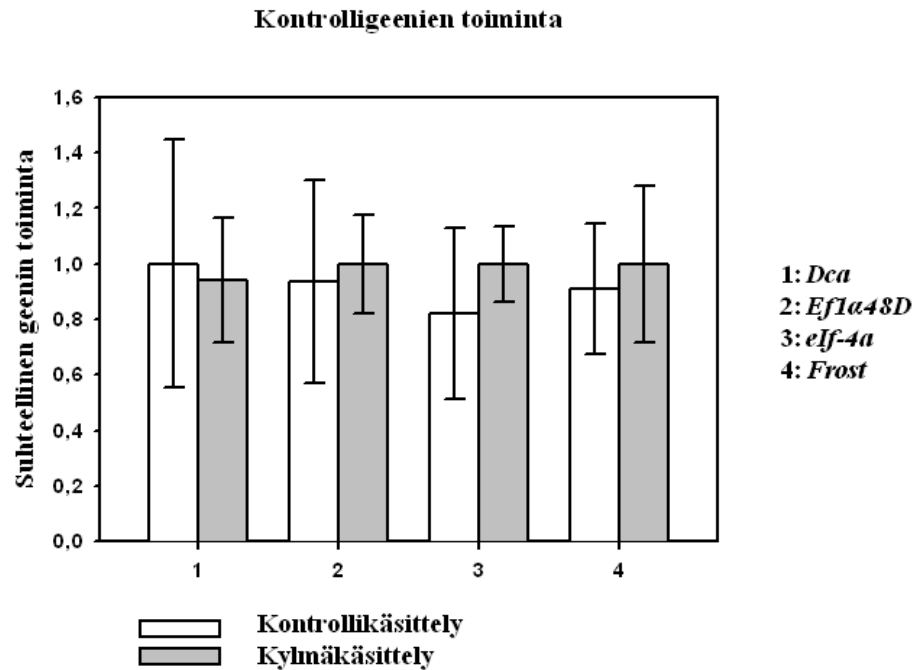
Tutkimuksessa selvisi, että lisääntymisdiapaussilla ja akklimaatiolla oli yhdysvaikutus ($F(1)=18,568$, $p < 0,001$) (Kuva 1). Tuloksen tarkempaan tutkimiseen käytettiin t-testiä, jossa tarkasteltiin aineistoa erillisissä osissa. t-testissä varianssien ei oleteta olevan yhtäsuuret, joten tilastollisen merkitsevyyden rajana käytettiin p-arvoa 0,01. t-testin mukaan diapaussissa olleet naaraat selvisivät kylmäkäsitteilyistä nopeammin, jos ne olivat saaneet akklimaatiokäsittelyn verrattuna yksilöihin, jotka eivät tätä käsitteilyä saaneet ($t(68,113)=-4,541$, $p < 0,001$). Samoin sukukypsillä naarailla akklimaatiokäsittely paransi kylmänkestävyyttä ($t(68)=-7,943$, $p < 0,001$). Tarkasteltaessa diapaussin vaikutusta heräämisaikoihin erikseen akklimaatiokäsittelyn saaneilla ja ei-akklimoituneilla yksilöillä, havaittiin, että diapaussi nopeuttaa kylmäkoomasta heräämistä ei-akklimoituneilla verrattuna sukukypsiin ($t(72)=-6,585$, $p < 0,001$), mutta akklimaatiokäsittelyn saaneilla diapaussin merkitys ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($t(61,587)=-2,136$, $p=0,036$), merkitsevyyden riippuessa p-arvolle asetetusta raja-arvosta.



Kuva 1. Lisäntymisdiapaussin ja akklimaation vaikutus tutkimuspopulaation naaraiden heräämisaikoihin. Kuvassa näkyy kylmäkoomasta heräämisaika minuutteina kussakin käsittelyssä sekä heräämisajan keskiarvo.

3.2. Tutkimusgeenien toiminnan määrittäminen, suhteellinen normalisointi

Tutkimuksen tulosten analysointiin qPCR:ssä käytettiin kahden kontrolligeenin avulla suoritettavaa normalisointia (ks. Johdanto 1.4.1.). Normalisoinnissa käytettiin kontrolligeenejä, joiden tiedettiin toimivan samalla tavalla sekä sukukypsillä että lisäntymisdiapaussissa olevilla naarilla normaaleissa olosuhteissa (Kankare ym. 2010), sen sijaan niiden toiminnasta eri kylmäkäsittelyissä ei ollut aikaisempaa tietoa. Kontrolligeenit toimivat sukukypsillä naarilla kaikissa kylmäkäsittelyissä sekä kontrollikäsittelyssä (Kuva 2) ja lisäntymisdiapaussissa olevilla naarilla shokki1-, palautumis- sekä akklimaatio1-käsittelyissä. Kontrolligeenit eivät sen sijaan toimineet halutulla tavalla lisäntymisdiapaussissa olevilla naarilla kontrolli-, shokki2- ja akklimaatio2-käsittelyissä, joten näitä vertailuja ei voitu luotettavasti analysoida kyseisellä menetelmällä, eikä tähän gradutyöhön ollut mahdollista sisällyttää aikaa vievää, sopivien uusien kontrolligeenien etsintää ja testaamista.



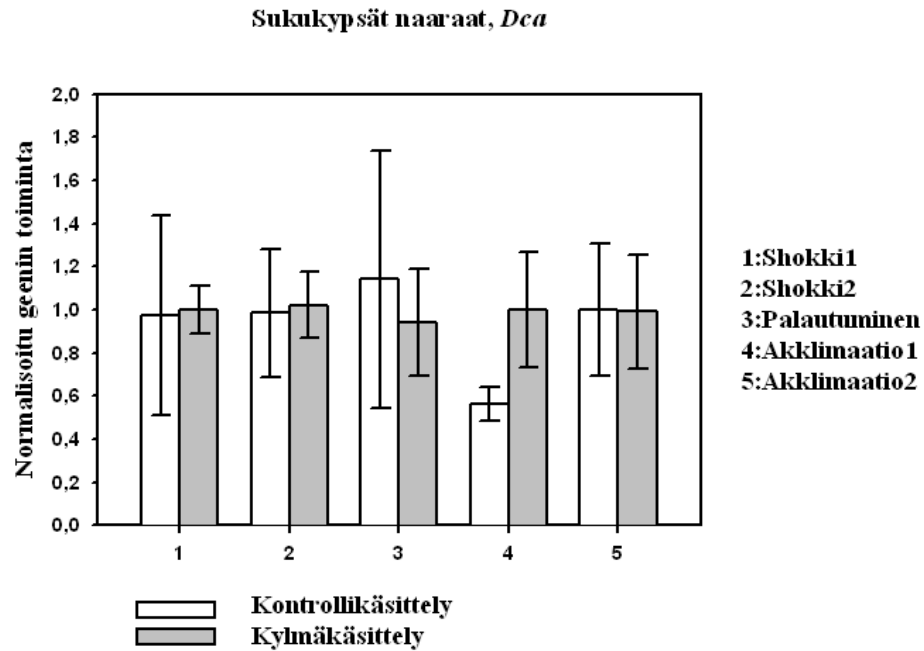
Kuva 2. Tutkimus- ja kontrolligeenien (1-4) suhteelliset toimintatasot kontrolli- ja palautumiskäsittelyssä sukukypsillä naarailla. Molemmat kontrolligeenit toimivat kummassakin käsittelyssä samankaltaisesti, varmistaen onnistuneen normalisoinnin.

3.2.1. Tutkimusgeenien toiminta sukukypsillä naarailla

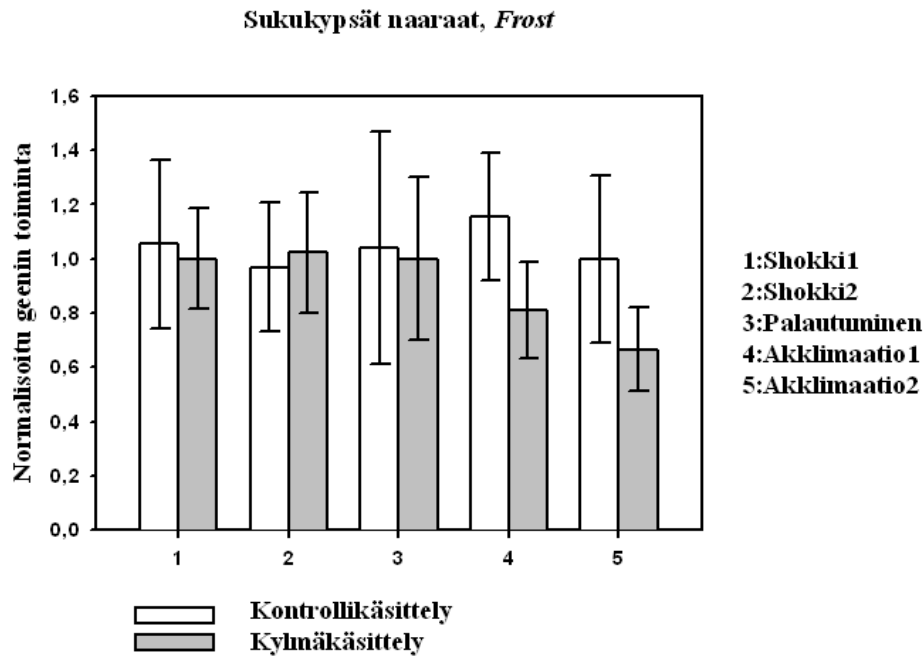
Dca-geenin toiminta ei eronnut sukukypsillä yksilöillä shokki1-käsittelyssä tilastollisesti merkitsevästi verrattaessa kontrollitasoon (s.e.=0,549-2,425, p=0,726) (Kuva 3). Myöskään *Frost*-geenin toiminnassa ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa shokki1- ja kontrollikäsittelyn välillä (s.e.=0,442-1,862, p=0,951) (Kuva 4). Kummankaan tutkimusgeenin toiminta ei eronnut tilastollisesti merkitsevästi sukukypsillä naarailla myöskään shokki2-käsittelyn ja kontrollikäsittelyn välillä (*Dca*: s.e.=0,842-1,496, p=0,662 ja *Frost*: s.e.=0,676-1,674, p=0,791) (Kuvat 3 ja 4). Lisäksi *Dca*- tai *Frost*-geenien toiminnassa ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa palautumiskäsittelyssä (*Dca*: s.e.=0,414-1,604, p=0,436 ja *Frost*: s.e.=0,444-2,169, p=0,752) (Kuvat 3 ja 4), akklimaatio1-käsittelyssä (*Dca*: s.e.=0,354-1,223, p=0,128, *Frost*: s.e.=0,782-4,415, p=0,182) (Kuvat 3 ja 4) tai akklimaatio2-käsittelyssä (*Dca*: S.E.=0,787-1,273, p=0,971 ja *Frost*: s.e.=0,902-2,488, p=0,105) (Kuvat 3 ja 4). Molempien geenien toimintatasot ja niiden erot on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Tutkimusgeenien toiminta eri kylmäkäsittelyissä sukukypsillä yksilöillä kontrollitasoon verrattuna. Taulukossa on esitetty lopullinen näyttereplikaattien eli rinnakkaisten näytteiden määrä, normalisointiin käytetty Ct-arvo ja sen keskivirhe, geenien toiminta ja geenitoiminnan erot kylmäkäsittely- ja kontrollinäytteen välillä sekä tilastollinen merkitsevyys (p-arvo).

Kylmäkäsittely	Geeni	Käsittely	Repli- kaatit	C(t)-arvo	C(t)-arvon keskivirhe	Geenin toiminta	Geeni-		
							toiminnan ero	p-arvo	
Shokki1	<i>Dca</i>	Kontrolli	7	21,98	0,601	0,97	0,97	0,726	
		Shokki1	7	21,36	0,080	1,00	1,03		
	<i>Frost</i>	Kontrolli	6	25,83	0,223	1,05	1,05		0,951
		Shokki1	6	25,32	0,226	1,00	0,95		
Shokki2	<i>Dca</i>	Kontrolli	5	21,71	0,312	0,98	0,96	0,662	
		Shokki2	6	21,47	0,156	1,02	1,04		
	<i>Frost</i>	Kontrolli	5	25,54	0,178	0,97	0,95		0,791
		Shokki2	6	25,27	0,280	1,02	1,06		
Palautuminen	<i>Dca</i>	Kontrolli	7	22,85	0,645	0,59	2,43	0,436	
		Palautuminen	7	22,94	0,345	0,25	0,41		
	<i>Frost</i>	Kontrolli	7	25,93	0,449	1,04	1,04		0,752
		Palautuminen	7	25,80	0,405	1,00	0,96		
Akklimaatio1	<i>Dca</i>	Kontrolli	6	22,10	0,306	1,00	1,78	0,128	
		Akklimaatio1	7	23,14	0,158	0,56	0,56		
	<i>Frost</i>	Kontrolli	6	25,44	0,204	0,81	0,70		0,182
		Akklimaatio1	6	25,14	0,261	1,16	1,42		
Akklimaatio2	<i>Dca</i>	Kontrolli	6	22,17	0,288	0,99	0,99	0,971	
		Akklimaatio2	7	21,94	0,379	1,00	1,01		
	<i>Frost</i>	Kontrolli	6	25,39	0,211	0,67	0,67		0,105
		Akklimaatio2	7	24,57	0,378	1,00	1,50		



Kuva 3. *Dca*-geenin toiminta eri kylmäkäsittelyissä (1-5) sukukypsillä naarailla verrattuna kontrollitasoon. Kuvassa on esitetty normalisoitu geenin toiminta sekä sen keskiarvo.



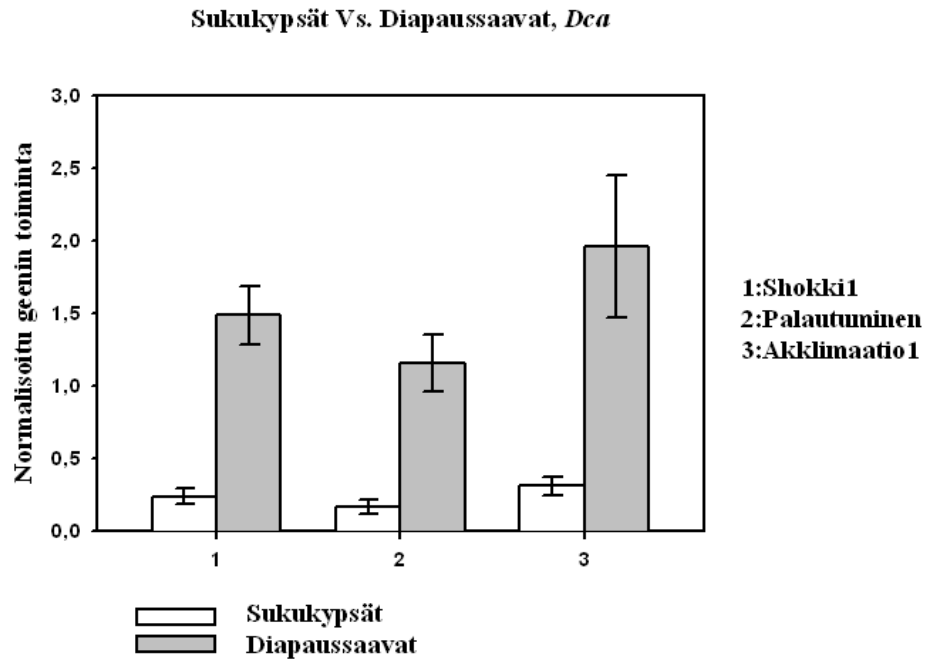
Kuva 4. *Frost*-geenin toiminta eri kylmäkäsittelyissä (1-5) sukukypsillä naarailla verrattuna kontrollitasoon. Kuvassa on esitetty normalisoitu geenin toiminta sekä sen keskiarvo.

3.2.2. Tutkimusgeenien toiminta sukukypsien ja lisääntymisdiapaussissa olevien naaraiden välillä

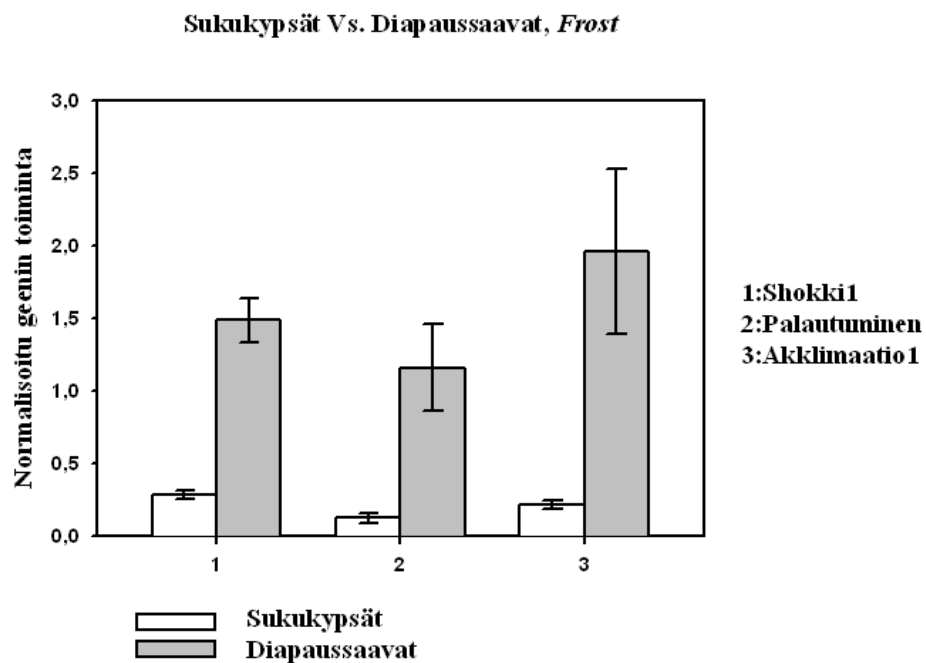
Dca-geenin toiminta erosi shokki1-käsittelyssä sukukypsien ja lisääntymisdiapaussissa olevien naaraiden välillä tilastollisesti merkitsevästi niin, että diapaussaavilla yksilöillä geenituotetta syntyi enemmän (s.e.=4,003-5,227, p=0,020) (Kuva 5). Myös *Frost*-geenin toiminta erosi samansuuntaisesti, ja ero oli tilastollisesti merkitsevä (s.e.=4,132-7,573, p=0,022) (Kuva 6). Geenien toiminta erosi sukukypsien ja diapaussaavien yksilöiden välillä palautumiskäsittelyssä. Geenituotetta syntyi tilastollisesti merkitsevästi enemmän diapaussaavilla yksilöillä sekä *Dca*- että *Frost*-geenillä (*Dca*: s.e.=5,289-28,739, p=0,003, *Frost*: s.e.=3,559-13,703, p=0,005) (Kuvat 5 ja 6). Tulokset olivat samansuuntaisia myös kolmannessa luotettavasti analysoidussa kylmäkäsittelyssä, eli *Dca*-geenin toiminta erosi akkliomaatio1-käsittelyssä tilastollisesti merkitsevästi sukukypsien ja diapaussaavien yksilöiden välillä niin, että geenituotetta syntyi enemmän diapaussaavilla yksilöillä (s.e.=5,588-12,606, p=0,007, Kuva 5). Samanlainen tilastollinen merkitsevyys oli nähtävissä myös *Frost*-geenillä (s.e.=3,311-8,576, p=0,002, Kuva 6). Molempien geenien toimintatasot ja niiden ero eri käsittelyissä on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. Tutkimusgeenien toiminta eri kylmäkäsittelyissä sukukypsillä yksilöillä lisääntymisdiapaussissa oleviin yksilöihin verrattuna. Taulukossa on esitetty lopullinen näyttereplikaattien eli rinnakkaisten näytteiden määrä, normalisointiin käytetty Ct-arvo ja sen keskivirhe, geenien toiminta ja geenitoiminnan erot kylmäkäsittely- ja kontrollinäytteen välillä sekä tilastollinen merkitsevyys (p-arvo).

Kylmäkäsittely	Geeni	Sukukypsä/ Diapaussaava	Repli- kaatit	C(t)-arvo	C(t)-arvon keskivirhe	Geeni-		p-arvo
						Geenin toiminta	toiminnan ero	
Shokki1	<i>Dca</i>	Sukukypsä	7	21,35	0,080	0,29	0,19	0,020
		Diapaussaava	2	19,04	0,083	1,48	5,15	
	<i>Frost</i>	Sukukypsä	7	25,55	0,305	0,24	0,16	0,022
		Diapaussaava	2	22,98	0,147	1,15	6,18	
Palautuminen	<i>Dca</i>	Sukukypsä	7	23,01	0,342	0,13	0,11	0,003
		Diapaussaava	4	19,96	0,336	1,16	8,93	
	<i>Frost</i>	Sukukypsä	7	25,87	0,407	0,17	0,15	0,005
		Diapaussaava	4	23,25	0,189	1,16	6,80	
Akkliomaatio1	<i>Dca</i>	Sukukypsä	7	23,20	0,157	0,22	0,11	0,007
		Diapaussaava	3	21,02	0,334	1,96	8,91	
	<i>Frost</i>	Sukukypsä	7	25,34	0,260	0,32	0,16	0,002
		Diapaussaava	3	23,67	0,261	1,96	6,21	



Kuva 5. *Dca*-geenin toiminta eri kylmäkäsittelyissä (1-3) sukukypsillä ja lisääntymisdiapausissa olevilla naarailla. Kuvassa on esitetty normalisoitu geenin toiminta keskivirheineen.



Kuva 6. *Frost*-geenin toiminta eri kylmäkäsittelyissä (1-3) sukukypsillä ja lisääntymisdiapausissa olevilla naarailla. Kuvassa on esitetty normalisoitu geenin toiminta keskivirheineen.

4. TULOSTEN TARKASTELU

4.1. Tutkimuspopulaation naaraiden kylmänsieto

Tutkittaessa *D. montana* -mahlakärpäslajin Oulangan populaation naaraiden kylmänsietoa selvisi, että lisääntymisdiapaussilla ja akklimaatiolla oli yhdysvaikutus. Jatkotutkimuksessa ilmeni, että akklimaatio parantaa naaraiden kylmänkestävyyttä, mutta lisääntymisdiapaussilla näyttäisi olevan vaikutusta vain ei-akklimoituneilla yksilöillä. Akklimoituneilla naarailta lisääntymisdiapaussissa olevat yksilöt heräsivät kylmäkoomasta keskimäärin hieman nopeammin kuin sukukypsät, mutta vaikutus ei ollut merkitsevä. Diapaussin on havaittu parantavan kylmänsietoa myös aiemmissa eri hyönteislajeilla tehdyissä tutkimuksissa (esim. Kimura ym. 1994, Ślachta ym. 2002) ja myös muilla tutkimuslaji *D. montanan* populaatioilla (L. Vesala, julkaisematon). Vaikka diapaussi sinällään lisäsi kylmänkestävyyttä saatiin tutkimuksessa viitteitä myös siitä, että akklimaatio saattaa tasoittaa sen kylmänsietoa parantavia vaikutuksia. Yksi selitys diapaussin merkityksen mahdolliseen vähenemiseen akklimoituneilla naarailta on akklimaation mukanaan tuomat kylmänsietoa lisäävät fysiologiset muutokset, jotka koskettavat myös sukukypsiä naaraita. Vaikka diapaussin tiedetään joissain tapauksissa lisäävän kylmänkestävyyttä, diapaussin ja kylmänsiedon välinen yhteys on tutkijoille monilta osin edelleen epäselvä varsinkin geenien toiminnan tasolla. Tässä tutkimuksessa oli tarkoitus varmistaa diapaussin aiheuttama parempi kylmänkestävyys tutkimuspopulaatiolla ja tutkia geneettisiä tekijöitä diapaussin ja paremman kylmänsiedon taustalla kahden hyönteisten kylmänsietoon liitetyn kandidaattigeenin avulla.

Kylmänsietokokeessa selvisi, että myös akklimaatio parantaa kylmänkestävyyttä tutkimuspopulaation naarailta. Akklimaatiota ja parempaa kylmänsietoa on tutkittu hyönteisillä useissa eri tutkimuksissa ja sillä näyttäisi olevan kiistaton osuus talveen valmistuvien hyönteisten kylmänsiedossa. Akklimaation tiedetään muun muassa edesauttavan kylmänkestävyyttä parantavia fysiologisia muutoksia, kuten jäänestoaineiden synteesiä (Fields ym. 1998) ja muutoksia solukalvojen fosfolipidien rasvahappokoostumuksissa (Bennett ym. 1997, Kostal & Simek 1998, Ohtsu ym. 1998). Lisätutkimusta kuitenkin vaativat esimerkiksi akklimaation ja paremman kylmänsiedon sekä akklimaation ja diapaussin taustat, sekä niiden mahdolliset yhteydet geenien toiminnan tasolla.

4.2. Geenien toiminta sukukypsillä naarailta

Kylmäaltistuksen tiedetään vaikuttavan *Dca* - ja *Frost*-geenien toimintaan *D. melanogaster* -lajilla (Goto 2001, Qin ym. 2005, Sinclair ym. 2007). *Dca*-geenin osalta tulokset ovat kaksisuuntaisia: toiminnan on todettu kasvavan akklimaatioissa (Goto 2001) ja laskevan kylmähokista palaututtaessa (Qin ym. 2005, Sinclair ym. 2007). *Frost*-geenillä toiminnan vähentymistä ei ole havaittu ja toiminnan lisääntyminen on voitu liittää kylmäaltistuksista palautumiseen (Goto ym. 2001) sekä kylmäkaraistumiseen (Qin ym. 2005). Oman tutkimukseni tulokset tekee mielenkiintoiseksi se, että käytin sekä sukukypsiä että lisääntymisdiapaussissa olevia, kylmänkestävän *D. montana* -lajin naaraita, joilla näiden kahden kylmänkestävyyden kandidaattigeenin toimintaa ei ole aikaisemmin tutkittu.

Sukukypsillä *D. montana* -naarailta yksikään viidestä kylmäkäsitelystä ei aiheuttanut *Dca*- eikä *Frost*-geenin toiminnan lisääntymistä kontrollitasoon verrattuna. Tulos on hyvin mielenkiintoinen, sillä voisi olettaa, että lisääntymistilassa olevat naarat reagoisivat elinympäristön aiheuttamaan stressiin jopa muita lajikumppaneitaan herkemmin, jolloin myös tutkittavien kylmänkestävyyden kandidaattigeenien toiminta muuttuisi. Mahdollisia selityksiä geenien toiminnan muuttumattomuuteen sukukypsillä naarailta on kuitenkin useita. Lyhyt päivänpituus valmistaa yksilöitä diapaussiin

(Denlinger & Lee 1998), joka tuo *D. montana* -kärpäsillemme valmiuden selvitä myös kylmistä olosuhteista (Throckmorton 1982). Sukukypsiä yksilöitä kasvatettiin kesäolosuhteissa, joten on mahdollista, etteivät yksilöt yksinkertaisesti ”ehtineet” reagoimaan näin äkilliseen lämpötilan laskuun. Lisääntymistilassa olevien naaraiden stressinsietokyvyn on myös todettu joissakin tapauksissa olevan alentunut, mutta esimerkiksi kylmyyden ja lisääntymiseen liittyvien kustannusten välinen yhteys on edelleen epäselvä (Harshman & Zera 2006). Voi myös olla, että lisääntymiseen liittyvä resurssien uudelleenjakoa vähentää naaraiden valmiutta vastata elinympäristön ärsykkeisiin. Lisäksi tulee muistaa, että kyseisten kandidaattigeenien toiminnan kasvu kylmänsietokokeissa on pystytty tähän mennessä liittämään ainoastaan lämpimien elinalueiden *D. melanogaster* -kärpäslajiin (Goto 2001, Qin ym. 2005, Sinclair ym. 2007), jonka kylmänsietokyky eroaa huomattavasti *D. montana* -lajin kyvystä sietää kylmää.

4.3. Geenien toiminta lisääntymisdiapaussissa olevilla naarilla

Molempien kandidaattigeenien toiminta oli suurempaa lisääntymisdiapaussissa olevilla naarilla sukukypsiin naaraisiin verrattuna kaikissa luotettavasti analysoiduissa kolmessa kylmäkäsittelyssä. Lisääntymisdiapaussin ja hyönteisten kylmänkestävyyden tiedetään kulkevan käsi kädessä (esim. Pener 1992, Šlachta ym. 2002). *D. montanan* lisääntymisdiapaussi valmistaa yksilöitä lämpötilan alenemiseen ja talveen (Throckmorton 1982) ja sen seurauksena hyönteisen elimistössä tapahtuu monimutkaisia kemiallisia ja fysiologisia muutoksia. Lisäksi lisääntymisdiapaussin on todettu liittyvän muun muassa käytössä olevien resurssien uudelleenjakoon: kesällä lepokauteen menevät yksilöt eivät lisääntyneet kuluvana kautena mutta ne sietävät esimerkiksi stressiä paremmin kuin ei-lepokaudessa olevat yksilöt (Tauber ym. 1986).

Tutkimuksessa jäi epäselväksi se, mikä on lisääntymisdiapaussin ja mikä kylmäkäsittelyjen aikaansaama geenien toiminnan muuttumista. Kankare ym. 2010 tutkivat *Dca*-geenin toimintaa lisääntymisdiapaussissa olevilla *D. montana* -naarilla ja saivat selville, että geenin toiminta kasvoi lisääntymisdiapaussin seurauksena jo ilman kylmäkäsittelyjä. Mikäli kylmäkäsittelyt kuitenkin lisäsivät entisestään geenien toimintaa, tutkimuksessa käytetyistä kylmäkäsittelyistä kylmäshokkikasittelyä ja tätä kautta äkillistä kylmäaltistusta ei ole aikaisemmissa tutkimuksissa pystytty suoraan liittämään kummankaan tutkimusgeenin toiminnan muuttumiseen *D. melanogaster* -kärpäsellä. Tämä tutkimus kuitenkin poikkeaa aiemmista tutkimuksista tutkimuslajin ja lisääntymisdiapaussin osalta. On esimerkiksi mahdollista, että lisääntymisdiapaussi lisää elimistön valmiutta reagoida äkilliseen kylmäshokkiin ja nopea reagointi puolestaan näkyy myös nopeana geenien toiminnan muuttumisena. Tätä olettamusta tukee myös tutkimuksen alussa tehty kylmäkoe, jossa selvisi, että tutkimuslinjan lisääntymisdiapaussissa olevat naarat heräävät kylmäshokin aiheuttamasta kylmäkoomasta sukukypsiä naaraita nopeammin.

Kylmäshokista palautumisen mekanismien tiedetään olevan monimutkaisia ja useat tutkimukset ovat antaneet viitteitä siitä, että geenit/proteiinit ovat jopa aktiivisempia palautumisen aikana kuin itse kylmäshokissa (Clark & Worland 2008). Myös tässä tutkimuksessa molempien tutkimusgeenien toiminta oli palautumiskäsittelyssä lisääntymisdiapaussissa olevilla naarilla moninkertainen suurempaa kuin sukukypsillä naarilla. Geenien toiminta myös lisääntyi kolmesta kylmäkäsittelystä eniten juuri palautumiskäsittelyssä. Tutkimustuloksen merkittävyyttä ja luotettavuutta vähentää kuitenkin se, että molemmat tutkimusgeenit toimivat diapaussaavilla naarilla sukukypsiä naaraita huomattavasti enemmän kaikissa käsittelyissä. Lisäksi *Dca*-geenin toiminta kasvoi tutkimuslajin lisääntymisdiapaussissa olevilla naarilla myös ilman kylmäkäsittelyjä (Kankare ym. 2010).

Kylmäkaraistuminen ja akklimaatio kätkevät taakseen monimutkaisia mekanismeja ja fysiologisia muutoksia. Goto (2001) osoitti, että *Dca*-geenin toiminta voidaan liittää erityisesti mataliin stressireaktioihin ja hän myös arveli *Dca*-geenin toiminnan kasvun liittyvän solun kylmäaltistuksen aikaisen Ca^{2+} -pitoisuuden ylläpitoon. Ca^{2+} -pitoisuuden puolestaan on mm. ajateltu toimivan solulimassa eräänlaisena muistina aiemmista stressireaktioista (Knight ym. 1998) ja tätä kautta sillä saattaa olla jonkinlainen yhteys myös akklimaatioprosessiin (Rako & Hoffman 2006). Aiempien tutkimustulosten lisäksi (Qin ym. 2005) myös oma tutkimukseni antaa viitteitä siitä, että *Dca*-geenin lisäksi myös *Frost*-geenillä saattaa olla jonkinlainen yhteys kylmäkaraistumiseen ja akklimaatioon.

4.4. Suhteellisen normalisoinnin ongelmakohdat qPCR-menetelmässä

Usealla kontrolligeenillä suoritettu normalisointi lisää geenien toiminnan määrittämistarkkuutta qPCR-menetelmässä (Bustin ym. 2009). Useamman kuin yhden sopivan kontrolligeenin löytäminen voi kuitenkin osoittautua yllättävän hankalaksi. Tässä tutkimuksessa käytin kontrolligeeneinä kahta diapaussitutkimuksessa aiemmin käytettyä geeniiä (*Ef1a48D*, *eIf-4a*), joiden oletettiin soveltuvan kontrolligeeneiksi myös tähän tutkimukseen. Näin ei kuitenkaan valitettavasti ollut, vaan kontrolligeenien huonosta toimivuudesta seurasi ongelmia ja osaa datasta ei pystytty normalisoimaan.

Kontrolligeenien hyvä toimivuus on qPCR:ssä kiistatta välttämätöntä. Huonosti toimivat kontrolligeenit vääristävät tutkimustuloksia ja aiheuttavat muutoinkin ongelmia geenien toimintatasojen määrittämisessä. Kontrolligeeneinä käytetään yleisesti ns. taloudenpitogeneitä, joiden toiminnan oletetaan olevan tasaista eri olosuhteissa ja kehitysvaiheissa. Oman tutkimukseni ongelmien perusteella taloudenpitogeenien tasainen toiminta ei kuitenkaan ole itsestäänselvyys. Tutkimukseni onkin hyvä esimerkki myös siitä, että usein qPCR-tutkimuksen onnistuminen vaatii työlästä, aikaa ja rahaa vievää tutkimukseen sopivien kontrolligeenien kartoittamista.

4.5. Tulevaisuus

Hyönteisten kylmänkestävyys on jo pitkään ollut tutkijoiden mielenkiinnon kohde, mutta tutkimus on paikoittain rajoittunut mallilajeihin kuten *D. melanogaster* -kärpäseen, joka ei eteläisen alkuperänsä vuoksi ole paras mahdollinen laji ainakaan kylmään sopeutumisen geneettisen taustan tutkimiseen. Jotta saataisiin todellinen kuva kylmänkestävyyden taustoista, tulisi tutkimusta keskittää luonnostaan pohjoisen alkuperän omaaviin lajeihin, kuten tässä tutkimuksessa käytettyyn *D. montana* -mahlakärpäseen.

Tämä tutkimus toi esille lukuisia uusia kysymyksiä *D. montana* -kärpäsen kylmänsiedosta. Tutkimukseni ei esimerkiksi selvittänyt lisääntymisdiapaussin ja kylmänkestävyyden kandidaattigeenien välistä yhteyttä. Diapaussin tiedetään aiheuttavan kylmänkestävyyteen liitettyjen geenien toiminnan muutoksia jo ilman kylmästressiäkin (Kankare ym. 2010, Rinehart ym. 2007). Tulevaisuudessa olisikin tärkeää saada selvyys siihen, lisäsivätkö kylmäkäsittelyt tutkimusgeenien toimintaa lisääntymisdiapaussissa olevilla naarailla vai oliko geenien toiminnan kasvu vain seuraus lisääntymisdiapaussista jo ilman kylmäkäsittelyjä. Yksi tärkeä huomio tuloksissa oli se, että *Dca*- ja *Frost*-geenit toimivat keskenään hyvin samankaltaisesti eri kylmäkäsittelyissä. Olisikin kiintoisaa selvittää onko näiden kandidaattigeenien toiminnan välillä tarkempi yhteys vai onko samankaltainen toiminta sattumaa tai seurausta esimerkiksi fysiologisesta tilasta. Tulevaisuudessa muita tutkimusaiheita *D. montana* -mahlakärpäsellä voisivat olla esimerkiksi geenien sekvenssimuuntelun kartoittaminen eri olosuhteisiin sopeutuneilla yksilöillä ja laajempi geenien toiminnan kartoittaminen. Olisi mielenkiintoista nähdä eroavatko näiden kahden kylmänkestävyyden kandidaattigeenin sekvenssit eri

populaatioissa esimerkiksi pohjois-etelä akselilla, ja voisiko tämä selittää myös mahdollisia geenitoiminnan eroja eri populaatioissa.

Tämä tutkimus osoitti, että hyönteisten kylmänkestävyys kätkee taakseen monimutkaisia muutoksia myös geenien toiminnan tasolla. Tutkimukseni jo kahden kylmänkestävyyden kandidaattigeenin avulla antoi viitteitä ainakin siitä, että hyönteisen fysiologinen tila voi olla ratkaiseva tekijä kylmänsiedon taustalla ja, että se saattaa vaikuttaa myös kylmänkestävyyteen liitettuihin geneettisiin tekijöihin. On hyvä muistaa, että hyönteisten kylmänkestävyyteen liittyy tutkimusgeenieni lisäksi lukuisia muita genejä, joiden toiminnasta tai merkityksestä ei ole varmuutta. Yksi tulevaisuuden haasteista hyönteisten kylmänsietotutkimuksessa onkin rakentaa lukuisista paremman kylmänsiedon aikaansaavista tekijöistä suurempi kokonaisuus ja ymmärtää paremmin myös geneettiset tekijät kylmänsiedon taustalla.

Kiitokset

Suuret kiitokset tutkielmani ohjaajille FT Maaria Kankareelle ja FM Laura Vesalalle korvaamattomasta avusta, tuesta ja hyvistä neuvoista työn eri vaiheissa. Kiitos Tiina Salmiselle ja Mikko Merisalolle avusta tutkielman kokeellisen osuuden toteuttamisessa. Kiitos Jackson Jenningsille abstraktin oikeinkirjoituksen tarkastamisesta. Kiitos koeläimtilojen henkilökunnalle ja kaikille muille yliopistolaisille, jotka avuliaisuudellaan edesauttoivat minua tutkielmani toteutuksessa. Kiitos taloudellisesta tuesta Jyväskylän yliopiston Evoluutiotutkimuksen huippuyksikölle sekä Kuopion Luonnon Ystävien Yhdistykselle. Erityiskiitokset tukena ja turvana toimineelle Joonakselle sekä muille perheenjäsenille ja ystäville ympäri Suomea.

Kirjallisuus

- Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E., Li P.W., Hoskins R.A., Galle R.F. etc. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287: 2185-2195.
- Ayrinhac A., Depat V., Gibert B., 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.
- Bale J.S. 1993. Classes of insect cold hardiness. *Funct. Ecol.* 7: 751-753.
- Beebee T.J.C. & Rowe G. 2004. *An introduction to molecular ecology*. Oxford University Press, New York, 239 s.
- 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.
- Bustin S.A. Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Hugget J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J. & Witter C.T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55: 611-622.
- Cannon R.J.C. & Bock W. 1988. Cold tolerance of microarthropods. *Biol. Rev.* 63: 23-77.
- Chen C.P., Denlinger D. L. & Lee R. E. 1987. Cold injury and rapid cold-hardening in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Physiol. Zool.* 60: 297-304.
- Chen C.P. & Walker V.K. 1994. Cold-shock and chilling tolerance in *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* 40: 661-669.
- Chung J.S. 2008. A trehalose 6-phosphate synthase gene of the hemocytes of the blue crab, *Callinectes sapidus*: cloning, the expression, its enzyme activity and relationship to hemolymph trehalose levels. *Saline Systems.* 4: 18.
- Clark M.S. & Worland M.R. 2008. How insects survive the cold: molecular mechanisms-a review. *J. Comp. Physiol. B.* 178: 917-933.

- Colinet H., Lee S.F. & Hoffmann A. 2010. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *FEBS Journal*. 277: 174-185.
- Cossins A.R. & Bowler K. 1987. *Temperature Biology of Animals*. Chapman Hall, New York.
- 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.
- Denlinger D. L. & Lee R. E. 1998. Physiology of cold sensitivity. Teoksessa: *Lethal Temperatures in Integrated Pest Management*. Hallmann G.J. & Denlinger D.L., Westview Press, Boulder, 55-95.
- Fields P.G., Fleurat-Lessard F., Lavenseau L., Febvay G., Peypelut L. & Bonnot G. 1998. The effect of cold acclimation and deacclimation on cold tolerance, trehalose and free amino acids levels in *Sitophilus granaries* and *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera). *J. Insects Physiol.* 44: 955-965.
- Fujita T., Inoue H., Kitamura T., Sato N., Shimosawa T. & Maruyama N. 1998. Senescence marker protein-30 (SMP30) rescues cell death by enhancing plasma membrane Ca²⁺-pumping activity in Hep G2 cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 250: 374-380.
- Fujita T. & Maruyama N. 1998. Expression and structure of senescence marker protein-30 (SMP30) and its physiological function. *Nippon. Ronen. Igakkai. Zasshi.* 35: 654-657.
- 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.
- Glegg R.M. 1992. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Method. Enzymol.* 211: 353-388.
- Goto S.G. 2000. Expression of *Drosophila* homologue of senescence marker protein-30 during cold acclimation. *J. Insect. Physiol.* 46: 1111-1120.
- Goto S.G. 2001. A novel gene that is up-regulated during recovery from cold shock in *Drosophila melanogaster*. *Gene.* 270: 259-264.
- Greenberg A.J., Moran J.R., Coyne J.A. & Wu C.I. 2003. Ecological adaptation during incipient speciation revealed by precise gene replacement. *Science.* 302: 1754-1757.
- Haque M.A. & Russell N.J. 2004. Strains of *Bacillus cereus* vary in the phenotypic adaptation of their membrane lipid composition in response to low water activity, reduced temperature and growth in rice starch. *Microbiology.* 150: 1397-1404.
- Hanec W. & Beck S. D. 1960. Cold hardiness in the European corn borer, *Pyrausta nubilalis* (Hubn.). *J. Insect Physiol.* 5: 169-180.
- Harshman L.G. & Zera A.J. 2006. The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends Ecol. Evol.* 22: 2.
- Heino J. & Vuento M. 2002. *Solubiologia*. WSOY, 306 s.
- Hodková 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 andocrine gland, corpus allatum. *J. Insect Physiol.* 48: 1009-1019.
- Hodková M. & Hodek I. 1997. Temperature regulation of supercooling and gut nucleation in relation to diapause of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). *Cryobiology.* 34: 70-79.
- Hoffmann A.A. & Parsons P.A. 1991. *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*. Oxford University Press, New York.
- Hoffman A.A., Sorensen J.G. & Loeschche V. 2003. Adaptation to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *J. Therm. Biol.* 28: 175-216.
- Hori Y. & Kimura M.T. 1998. Relationship between cold stupor and cold tolerance in *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). *Environ. Entomol.* 27: 1297-1302.
- Kankare M., Salminen T., Laiho A., Vesala L. and Hoikkala A. 2010. Changes in gene expression linked with adult reproductive diapause in a northern malt fly species: a candidate gene microarray study. *BMC Ecol.* 10: 13.

- 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. Biology.* 204: 1659-1666.
- Khazaali A.A., Tatar M., Pletcher S.D. & Curtsinger J.W. 1997. Heat-induced longevity extension in *Drosophila*. I. Heat treatment, Mortality, and Thermotolerance. *J. Gerontol. Biol. Sci. B:* 489-452.
- Kim K., Lawrence S.M., Park J., Pitts L., Vann W.F., Betenbaugh M.J. etc. 2002. Expression of a functional *Drosophila melanogaster* N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) phosphate synthase gene: evidence for endogenous sialic acid biosynthetic ability in insects. *Glycobiology.* 12: 73-83.
- Kimura M.T., Ohtsu T., Yoshida T., Awasaki T. & Lin F.J. 1994. Climatic adaptations and distributions in the *Drosophila takahashii* species subgroup (Diptera: Drosophilidae). *J. Nat. Hist.* 28: 401-409.
- Knight H., Brandt S. & Knight M.R. 1998. A history of stress alters drought calcium signalling pathways in *Arabidopsis*. *Plant J.* 16: 681-687.
- Košťál V. & Šimek P. 1998. Changes in fatty acid composition of phospholipids and triglycerols after cold-acclimation of an aestivating insect prepupa. *J. Comp. Phys. B.* 168: 453-460.
- Košťál V., Šlachta M. & Šimek P. 2001. Cryoprotective role of polyols independent of the increase in supercooling capacity in diapausing adults of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Insecta). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 130: 365-374.
- Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strombom L., Stålberg A. & Zoric N. 2006. The real time PCR reaction. *Mol. Aspects Med.* 27: 95-125.
- Labeur C., Dallerac R. & Wicker-Thomas C. 2002. Involvement of *desat1* gene in the control of *Drosophila melanogaster* pheromone biosynthesis. *Genetica.* 114: 269-274.
- Lee R.E. 1989. Insects cold hardiness: To Freeze or Not to Freeze. *BioScience.* 39: 308-313.
- Lee R.E. 1991. Principles of insect low temperature tolerance. Teoksessa: *Insects at Low Temperature*. Lee R.E. & Denlinger D.L., jne. Chapman & Hall, New York, 17-46. Bale J.S. 1993. Classes of insect cold hardiness. *Funct. Ecol.* 7: 751-753.
- Lee R.E., Chen C-P. & Denlinger D.L. 1987. A rapid cold-hardening process in insects. *Science.* 238: 1415-1417.
- 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.
- Lekanne-Deprez R.H., Fijnvandraat A.C., Ruijter J.M. & Moorman A.F.M. 2002. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal. Biochem.* 302: 63-69.
- Lockhart D.J. & Winzeler E.A. 2000. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature.* 405: 827-836.
- Michaud M.R. & Denlinger D.L. 2005. Molecular modalities of insect cold survival: current understanding and future trends. Teoksessa: *Animals and Environments*. Morris S., Voslo A., jne., Elsevier, Amsterdam, 32-46.
- Monni O., Hautaniemi S. & Kallioniemi O. 2002. *Geenisiruteknikka ja siihen liittyvä bioinformatiikka.* 118: 1157-1168.
- Montooth K.L., Siebenthal K.T. & Clark A.G. 2006. Membrane lipid physiology and toxin catabolism underlie ethanol and acetic acid tolerance in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biology.* 209: 3837-3850.
- Morris G.J. & Clarke A. 1987. Cells at low temperature. Teoksessa: *Effects of low temperatures on biological systems*. Arnold E., Baltimore, 72-119.
- Ohtsu T., Kimura M.T. & Katagiri C. 1998. How *Drosophila* species acquire cold tolerance qualitative changes of phospholipids. *Eur. J. Biochem.* 252: 608-611.
- Overgaard J., Sorensen J.G., Petersen S., Loeschke V. & Holmstrup M. 2006. Reorganization of membrane lipids during fast and slow cold hardening in *Drosophila melanogaster*. *Physiol. Entomol.* 31: 328-335.

- 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. *Chroobiol. Int.* 9: 102-113.
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: 9.
- Pfaffl M.W. 2004. Quantitation strategies in real-time PCR. *A-Z of quantitative PCR.* 3: 87-112 .
- Pfister T.D. & Storey K.B. 2006. Insect freeze tolerance: roles of protein phosphatases and protein kinase A. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 18-24.
- Qin W., Neal R.M., Westwood J.T. & Walker V.K. 2005. Cold hardening and transcriptional change in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.* 14: 607-613.
- Rako L. & Hoffmann A.A. 2006. Complexity of cold acclimation response in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 52: 94-104.
- Rinehart J.P., LI A., Yocum G.D., Robich R., Hayward S.A.L. & Denlinger D.L. 2007. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insects diapause. *PNAS.* 27: 11130-11137.
- 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*. *Insects Biochem. Mol. Biol.* 30: 515-521.
- Saunders D.S., Heinrich V.C. & Gilbert L. 1989. Induction of diapause in *Drosophila melanogaster*: Photoperiodic regulation and the impact of arrhythmic clock mutations on time measurement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 3748-3752.
- Selvin R. 2005. Fluorescence resonance energy transfer. *Method. Enzymol.* 246: 300-334.
- Shorrocks B. 1977. An ecological classification of European *Drosophila* species. *Oecologia.* 26: 335-345.
- Sinclair B.J. 1999. Insect cold tolerance: how many kinds of frozen? *Eur. J. Entomol.* 96: 157-164.
- Sinclair B.J., Gibbs A.G. & Roberts S.P. 2007. Gene transcription during exposure to, and recovery from, cold and desiccation stress in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.* 16: 435-443.
- Šlachta M., Berkova P., Vampera J. & Košťál V. 2002. Physiology of cold acclimation in non-diapausing adults of *Pyrhocoros apterus* (Heteroptera). *Eur. J. Entomol.* 99: 181-187.
- Storey K.B. 1997. Organic solutes in freeze tolerance. *Comp. Biochem. Physiol.* 117: 319-326.
- Storey K. B. & Storey J. M. 1988. Freeze tolerance in animals. *Physiol. Rev.* 68: 27-84.
- Tatar M. & Yin C.M. 2001. Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. *Exp. Gerontol.* 36: 723-738.
- Tauber M.J., Tauber C.A. & Masaki S. 1986. *Seasonal Adaptations of Insects*. Oxford University Press, New York.
- Trayhurn P. 1996. Northern blotting. *Proc. Nut. Soc.* 55: 583-589.
- Throckmorton L.H. 1982. The *virilis* species group. Teoksessa: *The genetics and biology of drosophila*. Ashburner M., Carson H.L. & Thompson J.N. jr. Academic Press, London, Vol. 3b.
- Williams K.D & Sokolowski M.B. 1993. Diapause in *Drosophila melanogaster* females; a genetic analyses. *Heredity.* 71: 312-317.
- Willmer P., Stone G. & Johnston I. 2000. *Environmental Physiology of Animals*. Blackwell Science, 644 s.
- Wong M.R. & Medrano J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques.* Vol. 39.
- Yiangou M., Tsapogas P., Nikolaidis N. & Scouras Z.G. 1997. Heat shock gene expression during recovery after transient cold shock in *Drosophila auraria* (Diptera: Drosophilidae). *Cytobios.* 92: 91-98.
- 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.
- Yocum G.D., Joplin K.H. & Denlinger D.L. Upregulation of a 23 kDa small heat shock protein transcript during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insects Biochem. Mol. Biol.* 28: 677-682.

- Zachariassen K.E. & Hammel H.T. 1976. Nucleating agents in the haemolymph of insects tolerant to freezing. *Nature*. 262: 285-287.
- Zimmerman J.L., Petri W. & Meselson M. 1983. Accumulation of a specific subset of *D. melanogaster* heat shock mRNAs in normal development without heat shock. *Cell*. 32: 1161-1170.