

Pro gradu –tutkielma

**VHb-siirtogeenin vaikutukset geenimuunnellun nieriän
(*Salvelinus alpinus*) hapenkulutukseen ja kasvuun**

Jani Pulkkinen



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Akvaattiset tieteet

16.2.2012

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Akvaattiset tieteet

PULKKINEN JANI: VHB-siirtogeenin vaikutukset geenimuunnellun nieriän (*Salvelinus alpinus*) hapenkulutukseen ja kasvuun.

Pro gradu: 24 s.

Työn ohjaajat: FT Juhani Pirhonen, Prof. Juha Karjalainen

Tarkastajat: Prof. Juha Karjalainen, FT Pauli Kallio

Helmikuu 2012

Hakusanat: geenimanipulaatio, metabolia, ravinnon muuntotehokkuus, respirometria, spesifinen kasvunopeus, *Vitreoscilla*-hemoglobiini

TIIVISTELMÄ

Nieriä (*Salvelinus alpinus*) on arvostettu laji sekä urheilukalastuksessa että ruokakalana. Vähentyneiden populaatioiden ja viljelyssä havaittujen ongelmien takia sitä ei kuitenkaan Suomessa voida taloudellisesti hyödyntää parhaalla mahdollisella tavalla. Ilmastonmuutos voi hankaloittaa ennestään nieriän viljelyä, sillä se on kylmän veden laji. Tulevaisuudessa voi siirtogeenisten lajien käyttö ruokakalana olla mahdollista niiden uusien ominaisuuksien ja tehokkaamman viljelyn takia. Tässä tutkimuksessa selvitettiin miten bakteerihemoglobiinia (VHb) koodaava VHB-siirtogeeni vaikuttaa nieriän hapenkulutukseen ja kasvuun. Geenin vaikutuksia tutkittiin mittaamalla kalojen hapenkulutusta kolmessa eri lämpötilassa (8, 12 ja 16 °C). Tämän lisäksi kaloilla tehtiin kasvatuskoe 14 °C:ssa, jossa vertailtiin mm. siirtogeenisten ja kontrollikalojen kasvunopeutta ja ravinnon muuntotehokkuutta. Tutkimuksessa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja siirtogeenisten ja kontrollikalojen välillä minkään tutkitun parametrin osalta. Se voi johtua siitä, että geeni ei ekspressoidu eli bakteerihemoglobiinia ei muodostu käytetyissä olosuhteissa tai sillä ei ole vaikutusta yksilöiden tutkittuihin ominaisuuksiin. Tämän asian vahvistaminen vaatii kuitenkin lisätutkimuksia.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Science

Department of Biological and Environmental Science

Aquatic sciences

PULKKINEN JANI: Effects of VHB-transgene to oxygen consumption and growth of genetically modified Arctic char (*Salvelinus alpinus*)

Master of Science Thesis: 24 p.

Supervisors: PhD Juhani Pirhonen, Prof. Juha Karjalainen

Inspectors: Prof. Juha Karjalainen, PhD Pauli Kallio

February 2012

Key Words: feeding efficiency, genetic manipulation, metabolism, respirometry, specific growth rate, *Vitreoscilla*-hemoglobin

ABSTRACT

Arctic char (*Salvelinus alpinus*) is one of the most respected fish in sport fishing and for food. However it is not fully exploited in Finland, because of the problems in aquaculture and decreased natural populations. Global warming can complicate even more cultivation of Arctic char, because it is cold water species. In future, may be possible to use transgenic fish species in aquaculture, because of new features and improved aquaculture efficiency. Goal of this study was to find out how bacterial hemoglobin coded by VHB-transgene affects oxygen consumption and growth of Arctic char. Effects of the transgene were studied by measuring fish's oxygen consumption in three different temperatures (8, 12 and 16 °C). I also made growth experiment at 14 °C where I compared transgenic and control fishes growth rate and feeding efficiency. In this study, we did not find any significant differences between transgenic and control fishes. Perhaps gene is not expressed ergo bacterial haemoglobin is not produced correctly in used conditions or transgene does not affect studied characteristics of individuals. However this warrants further studies.

Sisältö

1. JOHDANTO	5
2. AINEISTO JA MENETELMÄT	7
2.1. Koekalat.....	7
2.2. Hapenkulutus ja hengitysfrekvenssi.....	7
2.3. Kasvatuskoe.....	9
2.4. Laskukaavat ja tilastollinen analysointi.....	10
3. TULOKSET	12
3.1. Hapenkulutus ja hengitysfrekvenssi.....	12
3.2. Kasvatuskoe.....	15
4. TULOSTEN TARKASTELO	16
4.1. Koejärjestely.....	16
4.2. Hapenkulutus.....	17
4.3. Hengitysfrekvenssi.....	18
4.4. Kasvatuskoe.....	18
4.5. Yhteenveto.....	19
Kiitokset	20
Kirjallisuus	20

1. JOHDANTO

Nieriä (*Salvelinus alpinus*) on yksi arvostetuimmista makean veden kalalajeista sekä ravintona että urheilukalastuksessa. Vaikka nieriä on arvostettu laji, ei sitä kuitenkaan viljellä laajamittaisesti ruokakalaksi Suomessa. Poikaslaitoksilta toimitettiin vuonna 2009 39 000 kalaa jatkoviljelyyn (Anon. 2010). Lajilla on kuitenkin todettu olevan potentiaalia vesiviljelyyn, joten sen viljelyä voitaisiin harjoittaa laajamittaisemmin (Jobling ym. 1993). Yksi eduista viljelyn kannalta on se, että nieriää voidaan viljellä suuremmissa tiheyksissä kuin muita lohikaloja. Hyviä tuloksia on saatu viljelemällä nieriää jopa yli 100 kg m^{-3} (Wallace ym. 1988, Jorgensen ym. 1993), verrattuna kirjolohen 25 kg m^{-3} (*Oncorhynchus mykiss*) tai Atlantin lohen 30 kg m^{-3} (*Salmo salar*) (Pennell & McLean 1996) ruokakalan tuotannossa käytettyihin kasvatustiheyksiin. Suuri kasvatustiheys vähentää nieriöiden aggressiivista käyttäytymistä ja parantaa sitä kautta kasvunopeutta (Wallace ym. 1988, Brown ym. 1992).

Suomessa nieriän viljelyä hankaloittaa nieriän lämpötilarajoitteisuus, sillä kesäkuukausina vedenlämpötila nousee reilusti yli nieriän optimilämpötilan ($14\text{--}17 \text{ }^\circ\text{C}$) (Lyytikäinen ym. 1997a, Larsson & Berglund 2005). Tämä rajoittaa nieriän viljelyn pohjoiseen Suomeen, mikäli laitoksella ei ole saatavilla kylmää vettä ympäri vuoden. Nieriä on myös punasolujen fysiologian puolesta sopeutunut kylmään veteen. Yleensä kaloilla punasolujen tuhoutuminen ja uudismuodostus nopeutuu, kun veden lämpötila nousee. Nieriällä kuitenkin uudismuodostuminen ei käynnisty veden lämpötilan noustessa (Lecklin 2000). Näin ollen kalat voivat kärsiä anemiasta lämpiminä kuukausina ja kuolleisuus voi olla suurta. Ilmaston lämpeneminen voi vaikeuttaa ennestään nieriän viljelyä. Nieriä on lohikaloista vähiten sopeutunut lämpimään veteen (Baroudy & Elliot 1994).

Vesiviljelyn määrä on noussut viimeisen vuosikymmenen aikana ja siitä saadun kalaravinnon kulutus on jo noin puolet kokonaiskalaravinnon kulutuksesta (Anon. 2011). Viljelyn vaikutukset ympäristöön ja viljeltyjen kalojen ravinnon hankkiminen ovat suurimmat haasteet vesiviljelyssä (Naylor ym. 2000). Vesiviljelytuotantoa on tehostettava muun muassa käytetyn ravinnon suhteen, jotta vesiviljelyn ympäristövaikutukset vähenisivät ja viljely olisi kestävä kehityksen periaatteiden mukaista. Tulevaisuudessa voidaan vesiviljelyn tehokkuutta parantaa geeniteknikoiden avulla. Geenimanipulaatioissa (GM) on pääosin kyse siitä, että saadaan jonkin eliön hyödyllinen ominaisuus siirrettyä toiseen eliöön. Jotta siirtogeenisiä tuotteita voidaan käyttää hyväksi vesiviljelyssä, tulee tuotteilla olla tiettyjä edellytyksiä. Siirtogeenisten kalojen osalta kyseisen geenin tulee olla hyödyllinen ja sen tuomaa etua ei voida muulla tavoin saavuttaa. Lisäksi tuotteiden ei tulisi aiheuttaa vaaraa ympäristölle eikä ihmisille. Suurena vaarana GM-eliöiden tuotannossa voi olla niiden mahdollinen hallitsematon luontoon leviäminen. Koska GM-eliöitä on yleensä paranneltu joidenkin ominaisuuksien osalta, voivat ne saada luonnossa yliveraisen edun ja syrjäyttää luontaisen populaation.

Kaloilla on tehty paljon tutkimusta kasvuhormonigeneillä. Näillä geneillä on saatu aikaan nopeaa kasvua muun muassa nieriälle (Pitkänen ym. 1999), hopealohelle (*Oncorhynchus kisutch*) (Devlin ym. 1995), Atlantin lohelle (Cook ym. 2000) ja tilapialle (*Oreochromis niloticus*) (Rahman & Maclean 1999). Kaloilla on havaittu huomattavasti suurempaa kasvua kasvuhormonigeenin vaikutuksesta kuin korkeammilla selkärangkaisilla. Hiirellä painon lisäys on noin kaksinkertainen (Palmiter ym. 1982), kun taas kaloilla painon lisäys voi olla jopa kymmenkertainen verrattuna kontrolliryhmään (Devlin ym. 1994). Kaloille on myös siirretty muita kuin kasvuhormonigenejä. Pilkkupiikkimonna-

(*Ictalurus punctatus*) yöperhosesta (*Hyalophora cecropia*) siirretty kekropiinigeeni teki kalasta vastustuskykyisemmän *Flavobacterium columnare* ja *Edwardsiella ictaluri* – bakteerien aiheuttamia tauteja vastaan (Dunham ym. 2002). Myös bakteeriperäisiä geenejä on saatu tuottamaan proteiinia kaloilla, kun *Escherichia coli* – bakteerin beta-galaktosidaasia koodaava geeni siirrettiin Atlantin loheen (McEvoy ym. 1988). Tämän tavoitteena oli tehostaa hiilihydraattien käyttöä kalan ravintona.

Siirtogeenisten kalojen tutkimuksessa on ongelmana siirtogeenin heikko siirtyminen kalojen geenistöön. Mikäli siirtogeeni on saatu siirtymään emokalaston (P-polvi, p=parental) geenistöön on lisäksi ongelmana siirtogeenin heikko periytyminen jälkeläispolville (F-polvet, f=filial). Geenin huono periytyminen selittyy siirtogeenin mosaikismilla, jossa siirretty geeni ei ole siirtynyt tasaisesti jokaisen solun geenistöön. Tällöin siirretyn geenin periytyminen riippuu siitä, onko geeni siirtynyt sukusoluihin. Moav ym. (1995) havaitsivat kasvuhormonigeenin siirtyneen karpilla (*Cyprinus carpio*) 12,5 %:iin P-polven yksilöistä. Devlin ym. (1995) havaitsivat geenin siirtyneen hopealohella 4 %:iin ja kirjolohella 14 %:iin P-polven yksilöistä. Kinoshita ym. (1996) tutkivat CAT-siirtogeenin (Kloramfenikoli-O-asetyyylitransferaasi) periytyvyyttä medakalla (*Oryzias latipes*) ja havaitsivat geenin periytyneen kaikille jälkeläisille vasta kolmannessa polvessa (F2).

Yhdysvalloissa on jo pitkään yritetty saada lupaa kaupalliseen käyttöön siirtogeeniselle Atlantin lohelle (AquAdvantage®), joka kasvaa teuraskokoon vuotta aiemmin verrattuna ei-siirtogeeniseen loheen (Fletcher ym. 2001). Kyseiseen loheen on siirretty amerikan kivinilkan (*Zoarcis americanus*) kylmänsietoa parantavan proteiinin geeni sekä kuningaslohen (*Oncorhynchus tshawytscha*) kasvuhormonigeeni. Mikäli lupa myönnetään, tulee tuotteesta ensimmäinen GM-eläin, joka on tarkoitettu ihmisen ravinnoksi. Myös ihmisten viihtymiseen on tehty kaupallisia geenimanipuloituja tuotteita, kuten Pohjois-Amerikassa myynnissä oleva akvaariokala (GloFish®), joka on pimeässä hoitava geenimanipuloitu seeprakala (*Danio rerio*) (Anon. 2012).

Tässä tutkimuksessa tutkitaan nieriöitä, joihin on siirretty *Vitreoscilla*-suvun bakteerilta VHB-geeni, joka on hemoglobiinin kaltaista proteiinia koodaava geeni. Bakteeri erittää proteiinia heikoissa happiolosuhteissa ja parantaa sitä kautta selviytymistään (Khosla 1990). VHB-siirtogeenisiä kaloja on vasta alettu tutkia ja Guan ym. (2010) havaitsivat geenin lisäävän seeprakalan mätimunien selviytymistä heikoissa happiolosuhteissa. Geenin ominaisuuksia on tutkittu eniten *Escherichia coli* – bakteerilla. Sen kokonaisproteiinien määrää on saatu lisättyä 30 % VHB-siirtogeenin avulla. Myös kasvunopeutta saatiin lisättyä geenin avulla (Khosla & Bailey 1988). VHB-geenin on todettu myös lisäävän sekundaarisia metaboliatuotteita. Tupakkaan siirretty VHB-geeni lisäsi nikotiinin ja klorofyllin määrää (Holmberg ym. 1997). Geenin on todettu lisäävän alkaloidien määrää kasveilla (Frey ym. 2011) ja antibioottien määrää *Streptomyces*-sädebakteereilla ja *Acremonium crysogenum* -homeella (Frey & Kallio 2003). Alkaloideja käytetään mm. kivun lievityksessä ja nukutuksessa, joten VHB-siirtogeenisiä eliöitä voidaan käyttää hyödyksi monella eri tavalla.

Tässä tutkimuksessa oli tarkoitus selvittää vaikuttaako nieriöihin siirretty VHB-geeni nieriäyksilöiden hapenkulutukseen ja kasvuun. Kokeellisin tutkimuksin selvitettiin eroa siirtogeenisten kalojen hapenkulutus eri lämpötiloissa kontrollikaloiden hapenkulutuservoista ja onko näiden ryhmien välillä eroja kasvunopeudessa. Tässä tutkimuksessa käytettiin siirtogeenisten nieriöiden ensimmäisen jälkeläispolven (F1) yksilöitä. Tutkimuksen hypoteesit olivat, että 1) bakteerihemoglobiinia tuottava siirretty geeni aiheuttaa muutoksen nieriän hapenkulutuksessa 2) siirretyllä geenillä on vaikutuksia

nieriän metaboliaan ja sitä kautta yksilön kasvunopeuteen. Tämä projekti on tehty yhteistyössä Kuopion yliopiston kanssa.

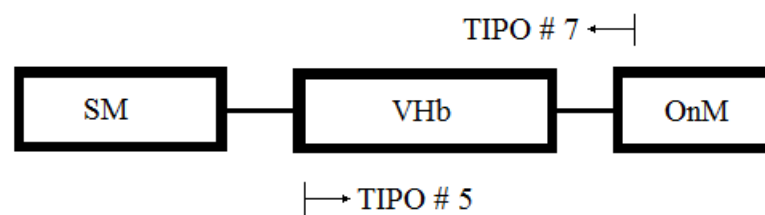
2. AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1. Koekalat

Kokeet tehtiin yhteistyössä Kuopion yliopiston biotieteiden laitoksen kanssa, josta kokeissa käytetyt F1-sukupolven nieriät tuotiin Jyväskylän yliopiston vesikoeyksikköön. Nieriöiden alkioihin oli mikroinjektoitu vuonna 1998 VHb-geeni, joka on *Vitreoscilla*-bakteerin hemoglobiinin kaltaista proteiinia koodaava geeni. Näillä kaloilla havaittiin geenin siirtyneen kolmelle yksilölle 82:sta (3,7 %). Tästä P-polvesta saatiin yhdestä koiraasta VHb-positiivista maitia, jolla hedelmöitettiin VHb-negatiivisen naaraan mätimunua. Kuoriutuneista F1-sukupolven poikasista tutkittiin VHb-geenin esiintymistä evänäytteen avulla ja geeni havaittiin 6,5 %:lla (Koskela A., Itä-Suomen yliopisto, Biotieteiden laitos, julkaisematon aineisto). VHb-positiivisia kaloja tuotiin Jyväskylään 8 kappaletta ja kontrollikaloiksi niiden täyssisaruksia 24 kpl. Kontrollikaloilla ei havaittu VHb-geeniä PCR-mittauksissa. Koe- ja kontrollikaloilla oli siis siirtogeneeniä lukuun ottamatta yhtenäinen geenistö, joten kalat olivat perimältään mahdollisimman samankaltaisia muiden kuin VHb-geenin osalta

Siirretyssä geenikonstruktissa oli VHb-geeniä koodaavan osan lisäksi promoottorina nieriän metallotioniinipromoottori sekä lopetusosana kirjolohen metallotioniinitermiinaattori (Kuva 1). Kalojen siirtogeneenisuus oli testattu ennen kalojen tuomista Jyväskylään. Testaus oli suoritettu pienestä palasta pyrstöä polymeerasiketjureaktion (PCR) avulla. PCR tehtiin käyttämällä TIPO#5 (CTA GGA TCC AAA AAT GTT AGA CCA GCA AAC C) ja TIPO#7 (AGC CGT CGA CTC ATT ATT CAA CCG CTT GAG) alukkeita, jotka kopioivat geenikonstruktiosta 467 emäsparin kokoisen alueen.

Ennen kokeiden aloittamista kalat yksilömerkittiin käyttämällä eväleikkausta. Eväleikkaukseen käytettiin rasvaevää ja/tai vatsaevää. Kalojen säilytykseen ja tutkimukseen Jyväskylässä oli geenitekniikan lautakunnan lupa (Dno 1/E/09).



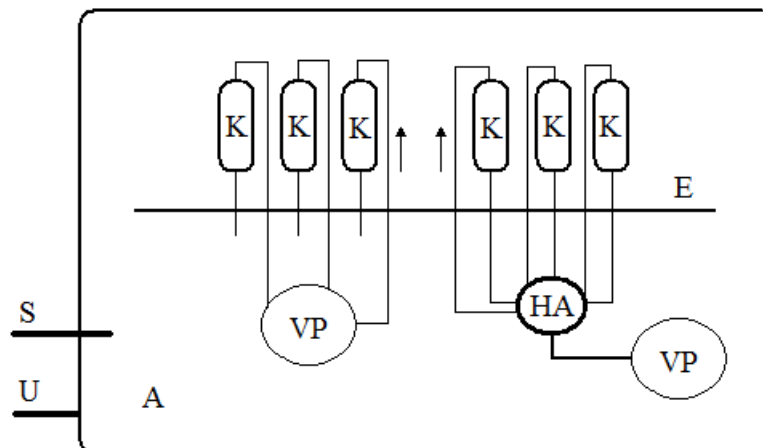
Kuva 1. Nieriään injektoitu geenikonstrukt. SM = Nieriän metallotioniinipromoottori (318 emäsparia, ep), VHb = *Vitreoscilla*-bakteerin hemoglobiinin kaltaista proteiinia tuottava geeni (441 ep), OnM = Kirjolohen metallotioniinitermiinaattori (286 ep), TIPO#5 ja #7 = geenin monistamiseen PCR:llä käytetyt alukkeet (monistaa 467 ep kokoisen alueen).

2.2. Hapenkulutus ja hengitysfrekvenssi

Hapenkulutuksen mittaukset suoritettiin Jyväskylän yliopiston tiloissa Ambioticalla heinä-elokuussa 2009. Mittaukset suoritettiin respirometrillä (intermittent flow respirometer, Forstner ym. 1983) kolmessa eri lämpötilassa, jotka olivat 8, 12 ja 16 °C. Tarkoituksena oli selvittää kalojen perusmetaboliataso ja maksimimetaboliataso. Perusmetaboliatasolla tarkoitetaan pienintä mahdollista metabolianopeutta, jolla kala

pystyy tulemaan toimeen tietyllä ajanhetkellä. Siihen ei lasketa mukaan aktiivisuutta tai ravinnonkulutuksesta johtuvaa energiankulutusta. Maksimimetaboliataso on kalalle suurin mahdollinen metabolianopeus. Hapenkulutuksen mittausta on yleisesti käytetty menetelmä tutkittaessa kalojen metabolian tasoja (Jobling 1994). Perusmetaboliatason (standard metabolic rate, SMR) arvoksi laskettiin keskiarvo kahden alhaisimman hapenkulutuksen mittauksista. Maksimimetaboliatason (maximum metabolic rate, MMR) arvoksi valittiin suurin hapenkulutuksen mittauksista.

Kokeissa käytettiin suljettua respiometriä, jossa vesi kiertää mittauksen ajan kammiossa, jossa kala on. Veden hapen konsentraatiota mitataan samaan aikaan ja konsentraation alenemasta lasketaan kalalle hapenkulutus. Kammiot sijaitsevat vesihauteessa, johon pumpataan jatkuvasti ilmastettua vettä. Allassysteemissä oli mukana kuusi kammiota, joista yhdessä kammiossa voitiin mitata hapenkulutusta kerrallaan. Muita kammioita huuhdottiin kahden pumpun avulla jatkuvasti raikkaalla hapetetulla vedellä (virtausnopeus 200 ml min^{-1}). Happianturin ja pumpun kompleksiin mahtui kerrallaan kolme kammiota, joten mittauksen välillä jouduttiin anturia siirtämään manuaalisesti toisiin kammioihin. Hapenkulutuksen mittauksen aikana vesi kiersi kammiossa erillisen pumpun kautta (virtausnopeus 200 ml min^{-1}). Vesi kiersi kammioissa tarpeeksi hitaasti, jotta kalojen ei tarvinnut uida, mutta kuitenkin riittävällä nopeudella hapensaannin ja veden sekoittumisen kannalta. Kalat olivat kammioissa pää seinää päin, jotta happianturin siirtely häiritsi niitä vähemmän. Lisäksi kammioiden ja pumpujen välille oli asetettu muovinen levy vähentämään häiriöitä (Kuva 2).



Kuva 2. Kaaviokuva hapenkulutuksissa käytetystä laitteistosta. A = allas, S = ilmastetun veden sisääntulo, U = ulosvirtaus, K = respirometrikammio, VP = vesipumppu, HA = happianturi, jossa oma vesipumppu. E = Muovinen levy. Veden virtaussuunta kammioihin esitetty nuolella. Kala sijaitsee kammiossa pää seinää päin. Pumpujen virtausta kammioihin sekä happianturin paikkaa säädeltiin manuaalisesti.

Jokaisen kalan hapenkulutusta seurattiin 23 tuntia mittaamalla hapenkulutus kuusi kertaa. Hapenkulutus mitattiin välittömästi kun kala laitettiin kammioon ja tämän jälkeen 1, 5, 6, 22 ja 23 tunnin kuluttua kokeen alkamisesta. Hapen konsentraation alenemista kammiossa mitattiin 5-20 minuuttia, riippuen kalan kuluttaman hapen määrästä. Kalan hapenkulutuksen ollessa pientä, lisättiin mittausaikaa, jotta mittauksen virhemarginaalia saatiin pienemmäksi ($\pm 0,02 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$). Hapen konsentraatio mitattiin polarografisella mittarilla (YSI 550 ja YSI 560). Jokaisen mittaussektion jälkeen kalat punnittiin 0,1

gramman tarkkuudella ja mitattiin 1 mm:n tarkkuudella (Taulukko 1). Ennen punnitusta kalat nukutettiin neilikkaöljy-etanoli seoksella (1:10), jota tuli 2 ml 5 litraan vettä.

Mittaukset toistettiin samalla tavalla jokaisessa lämpötilassa. Mittausten välissä kaloja pidettiin kolmessa 16 litran altaassa, joihin tuli vesi ilmastetusta jakoaltaasta. Kokeen aikana kalat olivat tasaisen valon alla, jolla ehkäistiin valorytmistä johtuvaa hapenkulutuksen muutosta. Kaloja ruokittiin päivittäin kylläiseksi (*ad libitum*) kaupallisella rehulla (Raekoko 2,5 mm, Royal Response, Rehuraisio Oy, Raisio). Ennen hapenkulutuksen mittauksen aloittamista, kalat olivat paastolla 48 tuntia, millä eliminoitiin ruuansulatuksesta johtuva ravinnonkulutus. Lämpötilan muutoksen jälkeen kaloja akklimoitiin uuteen lämpötilaan yhdeksän vuorokautta ennen uuden hapenkulutuksen mittauksen aloittamista.

Taulukko 1. Nieriöiden keskimääräinen tuoremassa (g) ja keskihajonta (S.D., g) hapenkulutuksen mittausten jälkeen kolmessa eri lämpötilassa.

LT (°C)	Kontrolli (n=12)		VHb+ (n=6)	
	Massa (g)	S.D. (g)	Massa (g)	S.D. (g)
8	12,0	4,2	8,8	3,4
12	10,6	5,1	10,6	4,5
16	13,0	6,5	13,0	6,2

Kammioiden keskitilavuus letkuineen oli 0,30 litraa (vaihteluväli 0,28–0,32 l). Tilavuudet mitattiin täyttämällä kammio ja letkut vedellä ja punnitsemalla vesi. Mittaus toistettiin kolme kertaa ja tilavuutena käytettiin kolmen mittauksen keskiarvoa (tarkkuus \pm 0,005 litraa). Laskuja varten kammion tilavuudesta vähennettiin kalan tilavuuden syrjäyttämän veden määrä. Näin saatiin kammiossa olevan veden määrä selville tarkasti. Jokaisen mittauksen jälkeen mitattiin hapenkulutus tyhjästä kammioista, jolla selvitettiin mahdollisten mikrobien hapenkulutus. Mikrobien hapenkulutus oli niin pientä, että se ei vaikuttanut mittaustarkkuuteen. Kammiot lisäksi desin fioitiin 70 % etanolilla, kun siirryttiin mittaamaan hapenkulutusta uudessa lämpötilassa.

Kalojen hengitysfrekvenssi laskettiin 16 °C:ssa hapenkulutuksen mittauksen aikana. Hengitysfrekvenssi laskettiin kiduskansien liikkeinä. Liikkeet laskettiin hapenkulutuksen mittauksen aikana kahdesti kerrallaan minuutin ajan ja niiden keskiarvoa käytettiin laskuissa (kpl min^{-1}). Laskemisessa käytettiin apuna videokameraa, jolloin ei tarvinnut mennä häiritsemään kaloja. Hengitysfrekvenssin mittauksella haluttiin selvittää onko VHb-positiivisten kalojen ja kontrollikalojen hapenottokyvyssä eroja.

Ennen varsinaisia mittauksia suoritettiin ylimääräisillä kontrollikalajoilla esikoe, jossa tutkittiin laitteiston toimivuutta ja tarvittavan mittaussjaksen pituutta, jolla hapenkulutus tasaantuu. Hapenkulutus mitattiin heti kun kalat asetettiin kammioihin sekä 4, 21, 26 ja 29 tunnin kuluttua kokeen aloittamisen jälkeen. Mittauksissa oli mukana kuusi kalaa (keskipaino 15 g) ja koe suoritettiin 13 °C lämpötilassa.

2.3. Kasvatuskoe

Kasvatuskoe suoritettiin kaloilla lokakuussa 2009. Kokeessa käytettiin viittä VHb-positiivista (keskimassa 31,0 g) ja viittä kontrollikalaa (keskimassa 36,3 g). Kalat laitettiin yksittäin 16 litran altaisiin, joiden sivuille laitettiin tummat muovit estämään kaloja havaitsemasta toisiaan. Altaisiin tuli vesi ilmastetusta jakoaltaasta. Vesi oli suodatettua ja pehmennettyä porakaivovettä (Taulukko 2) ja haluttu lämpötila saatiin sekoittamalla kylmää sekä lämmintä vettä keskenään. Kasvatuskokeen aikana veden keskilämpötila oli 13,6 °C (vaihteluväli 12,8–14,2 °C). Veden virtaama oli keskimäärin 0,3 l min^{-1} . Kalat

sijoitettiin altaisiin vuorotellen, siten että VHB-positiiviset kalat olivat altaissa 1, 3, 5, 7 ja 9 ja kontrollikalat altaissa 2, 4, 6, 8 ja 10. Altaiden yläpuolella oli loisteputkivalaisimia, jotka olivat liitetty kellokytkimeen. Valojakso oli 18 h valoisaa (06:00–24:00) ja 6 tuntia pimeää (0:00–06:00).

Kasvatuskoetta varten kaloja akklimoitiin koealtaisiin kuukauden ajan, jolloin altaiden veden lämpötila oli 16 °C. Kalojen huonon ruokahalun takia veden lämpötilaa jouduttiin laskemaan. Lämpötilan laskemisen jälkeen kaloja akklimoitiin vielä kaksi viikkoa ennen kokeen aloittamista. Akklimoinnin ajan kaloja totutettiin ruokailemaan kerran päivässä. Kokeen alussa kalat punnittiin 0,1 gramman tarkkuudella ja mitattiin 1 mm:n tarkkuudella. Ennen mittauksia kalat nukutettiin neilikkaöljy-etanoli seoksella (1:10), jota tuli 2 ml 5 litraan vettä. Kaloja ruokittiin kylläiseksi (*ad libitum*) kerran päivässä kaupallisella rehulla (Raekoko 2,5 mm, Royal Response, Rehuraisio Oy, Raisio). Ruokittu rehumäärä punnittiin ja ruokinnan jälkeen syömätön rehu poistettiin altaasta. Syömätön rehumäärä (g) arvioitiin laskemalla poistettujen pellettien lukumäärä, jolloin saatiin selville ravinnonoton määrä. Kasvatuskoe kesti 21 päivää, jonka jälkeen kalat punnittiin ja mitattiin samalla tavalla kuin ennen koetta.

Taulukko 2. Nieriöiden kasvatuskokeessa käytetyn veden kemiallisia tietoja. Vesinäyte otettu 3 kuukautta kokeen päätyttyä (8.2.2010).

	Sähkönjohtavuus (mS m ⁻¹)	pH	Kokonaiskovuus (mmol l ⁻¹)	Mangaani (µg l ⁻¹)	Rauta (µg l ⁻¹)
Porakaivo	21,5	6,2	0,74	600	5000
Esisuodatin	21,2	6,3	0,73	550	1100
Pehmennin	21,5	6,3	0,01	8	230
Kalkkikivisuodatin	21,9	6,3	0,08	5	200
Allashuone (kylmä vesi)	21,9	6,4	0,07	24	260
Allashuone (lämmin vesi)	22,8	6,9	0,08	58	400

2.4. Laskukaavat ja tilastollinen analysointi

Kalojen hapenkulutus (MO₂, mg O₂ h⁻¹) laskettiin kaavan 1 avulla. Kalan tilavuus arvioitiin siten, että yhden gramman painoinen kala on yhden millilitran tilavuinen. Hapenkulutuksen ja kalan massan avulla tehtiin yhtälö, jolla laskettiin kalalle odotettu hapenkulutus. Havaitun ja odotetun hapenkulutuksen erotuksella laskettiin kalalle suhteellinen hapenkulutus (rSMR, rMMR) (Metcalf ym. 1995), jossa odotettua pienempi kulutus saa negatiivisia arvoja ja suurempi positiivisia arvoja. Tällä pyrittiin ehkäisemään kalojen erikokoisen massan vaikutusta hapenkulutukseen. Koska suhteelliset hapenkulutuksen tasot kuvasivat mitatun hapenkulutuksen suhdetta odotettuun, voitiin eri lämpötiloista saadut arvot yhdistää VHB-positiivisten kalojen osalta sekä kontrollikalojen osalta ja vertailla arvoja näiden ryhmien välillä. Hengitysfrekvenssin ja hapenkulutuksen suhdetta varten laskettiin hapenkulutus painoyksikköä kohden jakamalla hapenkulutus kalan massalla (kg). Samaa yksikköä (mg O₂ kg⁻¹ h⁻¹) käytettiin myös metabolisen vaihteluvälin tarkasteluun.

$$MO_2 = cO_2 * (V_k - V_f) / T \quad (1)$$

jossa

cO₂ = kuluneen hapen määrä (mg O₂ l⁻¹)

V_k = kammion tilavuus (l)

V_f = kalan tilavuus (l)

T = mittausaika (h)

Kasvatuskokeessa kaloille laskettiin syödyn ravinnon lisäksi Fultonin kuntokerroin (condition factor, CF, kaava 2), spesifinen kasvunopeus (specific growth rate, SGR, kaava 3), ravinnon muuntotehokkuus (feed efficiency, FE, kaava 4), rehukerroin (feed conversion ratio, FCR, kaava 5) sekä kasvu suhteessa alkupainoon ($G\%$, kaava 6).

$$CF = W / L^3 * 100 \quad (2.)$$

jossa

W = kalan massa (g)

L = kalan pituus (cm)

$$SGR = (\ln W_1 - \ln W_0) / T * 100 \quad (3.)$$

jossa

W_1 = kalan massa kokeen päätyttyä

W_0 = kalan massa kokeen alkaessa

T = kokeen kesto päivinä

$$FE = (W_1 - W_0) / FI \quad (4.)$$

jossa

W_1 = kalan massa kokeen päätyttyä

W_0 = kalan massa kokeen alkaessa

FI = syödyn ravinnon määrä

$$FCR = FI / (W_1 - W_0) \quad (5.)$$

jossa

FI = syödyn ravinnon määrä

W_1 = kalan massa kokeen päätyttyä

W_0 = kalan massa kokeen alkaessa

$$G\% = W_0 / W_1 * 100 \% \quad (6.)$$

jossa

W_0 = kalan massa kokeen alkaessa

W_1 = kalan massa kokeen päätyttyä

Kaloille laskettiin päiväkohtainen paino käyttäen avuksi ravinnon muuntotehokkuutta (FE) ja päivittäistä syödyn ravinnon määrää (Kaava 7). Päivittäisen painon avulla laskettiin suhteellisen ravinnonoton määrä joka päivälle (Kaava 8). Päivittäisistä suhteellisen ravinnonoton määristä laskettiin kalalle keskimääräinen päivittäinen ravinnonoton määrä.

$$W_d = FE * FI_d + W_{d-1} \quad (7.)$$

jossa

W_d = kalan massa tietyinä päivänä (g)

FE = Ravinnon muuntotehokkuus

FI_d = Syöty ravinnon määrä (g)

W_{d-1} = kalan massa edellisenä päivänä (g)

$$FI_{d\%} = FI_d / W_{d-1} \quad (8.)$$

jossa

$FI_{d\%}$ = suhteellinen ravinnonotto tietyinä päivänä

FI_d = syöty ravinnon määrä (g)

W_{d-1} = kalan massa edellisenä päivänä (g)

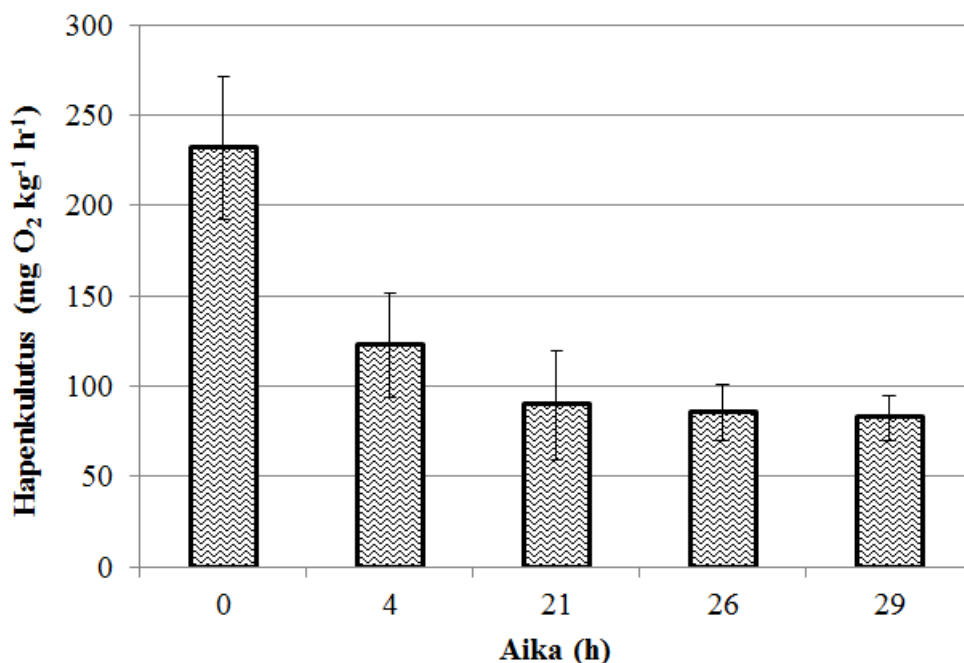
Aineisto käsiteltiin Excel-taulukkolaskentaohjelmalla ja analysoitiin tilastollisesti PASW Statistics 18 – ohjelmalla. Aineiston analysointiin käytettiin parametristä t-testiä, jossa vertailtiin VHB-positiivisten ja kontrollikaloiden keskiarvoja hapenkulutuksessa ja

kasvatuskokeessa. Ainoastaan suhteellisen perusmetabolian osalta 8 °C:ssa jouduttiin käyttämään ei-parametristä Mann-Whitney U-testiä, koska parametristä testiä varten ei normaalisuusoletus toteutunut. Aineiston normaalisuus testattiin Shapiro-Wilkin testillä ja varianssien yhtäsuuruus Levenen testillä. Hengitysfrekvenssin ja hapenkulutuksen välistä yhteyttä kuvaamaan sovitettiin useita yhtälöitä ja korkein selitysaste saavutettiin potenssifunktiolla. Potenssifuntio sovitettiin lineaarisena regressiona logaritmoidusta aineistosta. VHB-positiivisten ja kontrollikalojen hapenkulutuksen ja hengitysfrekvenssin regressiosuoran kulmakertoimien eroavaisuus toisistaan analysoitiin t-testillä.

3. TULOKSET

3.1. Hapenkulutus ja hengitysfrekvenssi

Esikokeessa havaittiin, että hapenkulutus tasaantui perustasolle 21 tunnin mittauksen jälkeen (Kuva 3). Nieriöiden hapenkulutuksen ja massan välillä oli lineaarinen riippuvuus (Taulukko 3). Kontrollikaloiden ja VHB-positiivisten kaloiden suhteellinen perusmetabolia (rSMR) ei eronnut tilastollisesti merkitsevästi missään lämpötilassa (8 °C Mann-Whitney U, $p=0,851$; 12 °C $t=-0,639$, $p=0,532$; 16 °C, $t=-1,296$, $p=0,213$) (Kuva 4). Suhteellinen maksimimetabolia (rMMR) ei myöskään eronnut tilastollisesti merkitsevästi missään lämpötilassa (8 °C, $t=-0,274$, $p=0,787$; 12 °C, $t=-2,079$, $p=0,054$; 16 °C, $t=-0,408$, $p=0,689$) (Kuva 5). Metabolinen vaihteluväli ei eronnut tilastollisesti merkitsevästi missään lämpötilassa (8 °C, $t=-0,013$, $p=0,989$; 12 °C, $t=-1,394$, $p=0,182$; 16 °C, $t=0,253$, $p=0,804$) (Kuva 6). Eri lämpötilojen yhdistetty aineisto suhteellisen perusmetaboliatason osalta ei eronnut tilastollisesti merkitsevästi kontrollikaloiden ja VHB-positiivisten kaloiden välillä ($t=-1,1533$, $p=0,132$). Yhdistetty aineisto maksimimetaboliatason osalta ei eronnut tilastollisesti merkitsevästi ($t=0,089$, $p=0,927$).

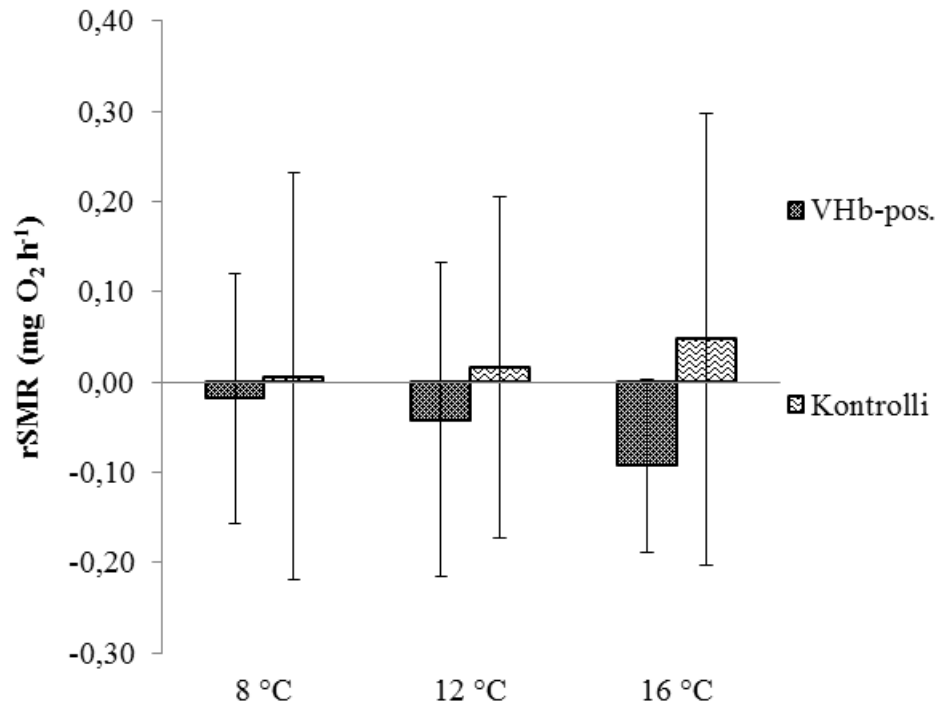


Kuva 3. Kontrollinieriöillä tehdyn esikokeen hapenkulutuksen keskiarvot (\pm SD, $n=6$) eri mittauskerroilla. Aika kuvaa sitä, miten kauan kala on ollut kammiassa mittausajankohtana.

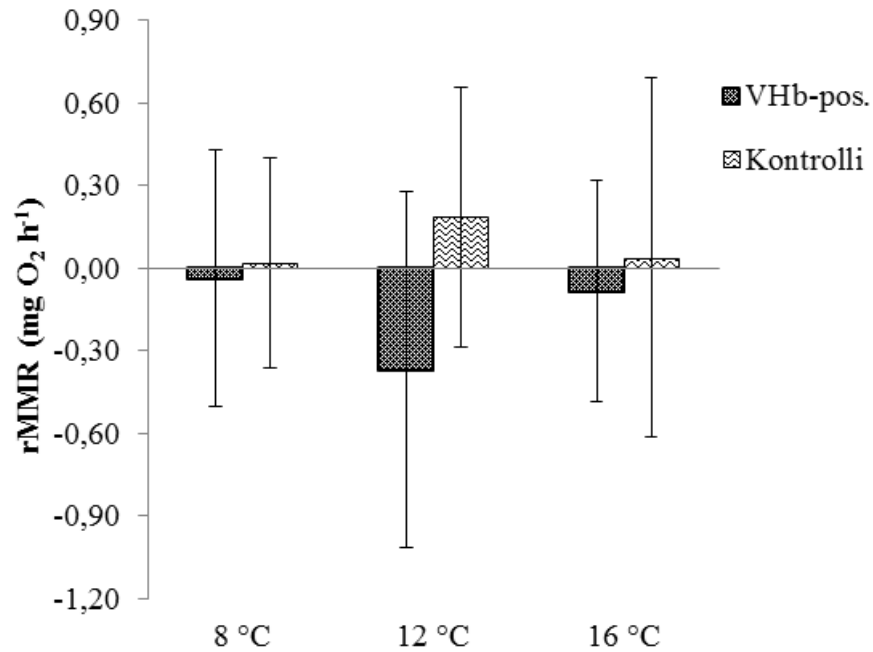
Taulukko 3. Nieriöiden hapenkulutuksen ja massan välinen yhtälö selitysasteineen kolmessa eri lämpötilassa. Yhtälöt sekä perusmetaboliatasosta (SMR) että maksimimetaboliatasosta (MMR).

LT (°C)	Yhtälö (SMR)	Selitysaste (R ²)	Yhtälö (MMR)	Selitysaste (R ²)
8	$y = 84,95x - 0,151$	0,78	$y = 145,08x + 0,090$	0,72
12	$y = 101,35x - 0,063$	0,89	$y = 233,43x - 0,100$	0,81
16	$y = 110,62x + 0,121$	0,92	$y = 231,13x + 0,237$	0,88

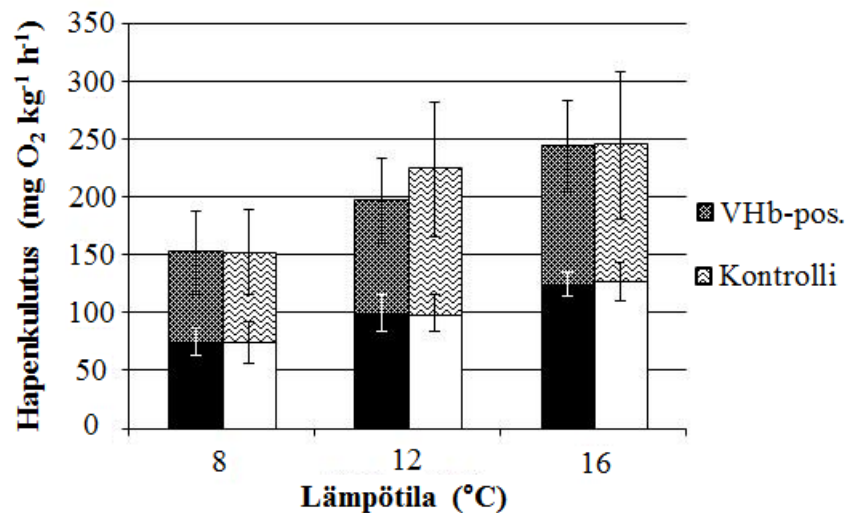
y = hapenkulutus ($\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) x = kalan massa (kg)



Kuva 4. Palkki kuvaa VHb-positiivisten (n=6) ja kontrollinieriöiden (n=12) keskimääräistä suhteellista perusmetaboliatasoa (rSMR) kolmessa eri lämpötilassa (\pm SD). Suhteellinen taso ilmaisee havaitun ja odotetun hapenkulutuksen erotuksen. Suhteellisilla tasoilla ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa ryhmien välillä ($p > 0,05$).

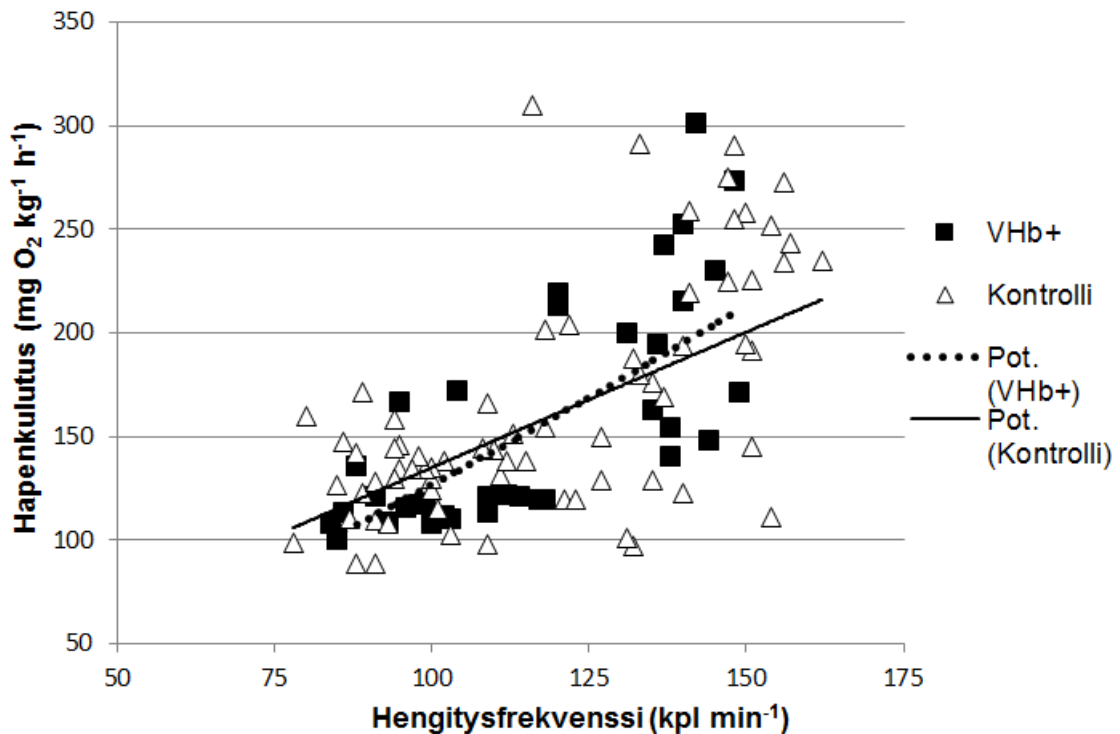


Kuva 5. Palkki kuvaa Vhb-positiivisten (n=6) ja kontrollinieriöiden (n=12) keskimääräistä suhteellista maksimimetaboliatasoa (rMMR) kolmessa eri lämpötilassa (\pm SD). Suhteellinen taso ilmaisee havaitun ja odotetun hapenkulutuksen erotuksen. Suhteellisilla tasoilla ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa ryhmien välillä ($p>0,05$).



Kuva 6. Vhb-positiivisten (n=6) ja kontrollinieriöiden (n=12) hapenkulutus kolmessa eri lämpötilassa. Palkki kuvaa kokonaisuudessaan maksimimetaboliatasoa (\pm SD). Alempi palkki (musta = Vhb, valkea = kontrolli) on perusmetaboliataso (\pm SD). Palkin kuvioitu osa on metabolinen vaihteluväli. Hapenkulutuksella ja metabolisella vaihteluvälillä ei ollut ryhmien välillä tilastollisesti merkitsevää eroa ($p>0,05$).

Hapenkulutuksen ja hengitysfrekvenssin välillä havaittiin tilastollisesti merkitsevä yhteys sekä VHb-positiivisten ($p < 0,001$, $r^2 = 0,56$) että kontrollikalojen osalta (Pearson $0,628$, $p < 0,001$, $r^2 = 0,39$) (Kuva 7). Log-aineiston lineaaristen regressioyhtälöiden kulmakertoimet eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi toisistaan (t-testi, $t = 0,948$, $p = 0,253$).



Kuva 7. Hapenkulutuksen ja hengitysfrekvenssin välinen regressioyhtälö VHb-positiivisilla ja kontrollinieriöillä 16 °C:ssa. Logaritmoidulle aineistolle sovitetut regressioyhtälöt olivat merkitseviä ($p < 0,001$) molemmissa ryhmissä. Regressioyhtälöiden kulmakertoimilla ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa ($p < 0,05$). Huomaa, että kumpikaan akseli ei ala nolasta.

3.2. Kasvatuskoe

Ennen kasvatuskokeen alkua VHb-positiivisten ja kontrollikalojen keskimassat ($t = -0,493$, $p = 0,635$) ja kuntokertoimet ($t = -1,565$, $p = 0,156$) eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi toisistaan. Kasvatuskokeen jälkeen keskimassat ($t = -0,625$, $p = 0,549$) eivätkä kuntokertoimet ($t = -1,524$, $p = 0,166$) eronneet tilastollisesti merkitsevästi toisistaan. Tilastollisesti merkitsevää eroa ei havaittu spesifisen kasvunopeuden (SGR) ($t = -1,104$, $p = 0,302$), syödyn ravinnon määrän ($t = -1,093$, $p = 0,306$), ravinnon muuntotehokkuuden (FE) ($t = -0,137$, $p = 0,894$) eikä päivittäisen suhteellisen ravinnonoton osalta ($t = -0,705$, $p = 0,501$) (Taulukko 4). Lämpötilat altaiden välillä eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi (Kruskal-Wallis, $p = 0,143$).

Taulukko 4. VHb-positiivisten (n=5) ja kontrollinieriöiden (n=5) 21 päivää kestäneen kasvatuskokeen tuloksien ryhmäkohtaiset keskiarvot (KA) ja keskihajonnat (SD). Keskiarvot eivät eroa tilastollisesti merkitsevästi toisistaan minkään parametrin osalta. W_0 = kalan massa kokeen alkaessa, W_1 = kalan massa kokeen päätyttyä, CF_0 = Fultonin kuntosuhteiden kokeen alkaessa, CF_1 = Fultonin kuntosuhteiden kokeen päätyttyä, FI = feed intake, syödyn ravinnon määrä, SGR = specific growth rate, spesifinen kasvunopeus kokeen aikana, FE = feeding efficiency, ravinnon muuntotehokkuus, FCR = feed conversion ratio, rehukerroin, $FI_{d\%}$ = päivittäinen suhteellisen syödyn ravinnon määrä. Taulukossa lisäksi kalan kasvu (g) ja kuinka monta prosenttia kala kasvoi kokeen aikana suhteessa alkupainoon ($G\%$).

	Kontrolli		VHb+	
	KA	SD	KA	SD
Massa (W_0) (g)	36,3	16,6	31,0	16,9
Massa (W_1) (g)	59,1	26,5	48,4	27,7
CF_0	0,97	0,08	0,88	0,11
CF_1	1,08	0,10	0,97	0,13
FI (g)	15,6	5,9	11,6	5,6
Kasvu (g)	22,9	10,1	17,4	11,0
Kasvu ($G\%$) (%)	63	8	56	14
SGR (% d^{-1})	2,35	0,22	2,10	0,44
FE	1,43	0,13	1,42	0,22
FCR	0,70	0,06	0,72	0,11
$FI_{d\%}$ (%)	2,7	0,4	2,5	0,7

4. TULOSTEN TARKASTELU

4.1. Koejärjestely

VHb-positiivisia kaloja tuotiin Kuopiosta kahdeksan kappaletta, joista kaksi kuoli ennen kokeiden aloittamista. Kuopiossa testatuilta F1-sukupolven kaloilta havaittiin siirtogeneeni 6,5 % yksilöistä, jonka takia VHb-positiivisten kalojen määrä jäi niin pieneksi. Siirtogeenin periytymisen F1-sukupolvelle on todettu vaihtelevan paljon. Maclean ym. (1993) havaitsivat geenin periytyneen kirjolohella 14 ja 81 %:lle jälkeläisistä. Moav ym. (1995) puolestaan havaitsivat geenin periytyneen karpilla 0–63 %:lle jälkeläisistä.

Ennen respirometri- ja kasvatuskokeiden aloittamista kalat olivat olleet Jyväskylässä yli kuukauden, joten toipuminen kuljetuksesta ja sopeutumisaika uusiin olosuhteisiin oli riittävä. VHb-positiivista kaloista kuoli yksi hapenkulutuksen ja kasvatuskokeen välissä, joten kasvatuskokeessa käytettiin vain viittä kalaa per ryhmä. Kalat yksilöitiin käyttämällä eväleikkauksia, sillä kalat olivat liian pieniä muihin käyttökelpoisiin merkintämenetelmiin. Kalojen rasvaeväleikkaus ei vaikuta kalan kasvuun tai kuolleisuuteen puronieriällä (*Salvelinus fontinalis*) (Zerrenner ym. 1997), eikä muiden evien leikkaus Atlantin lohella (Dietrich & Cunjak 2006), joten evien leikkaus soveltuu erinomaisesti tutkimuskäyttöön.

Kaloihin siirretty VHb-geeni ohjaa VHb-proteiinin tuottoa. Tämä proteiini poikkeaa suuresti kalojen luontaisista hemoglobiineista. Giles (1991) havaitsi nieriän oman hemoglobiinin eri isoformien vaikuttavan sen hapenkulutukseen ja veren happitasapainoon, joten pienetkin erot proteiinien välillä vaikuttavat yksilön metaboliaan.

Tämän perusteella arvioitiin hapenkulutusmittausten olevan hyvä työkalu selvittämään, miten siirtogenei vaikuttaa nieriöiden metaboliaan. Stevens ym. (1998) huomasivat, että siirtogeenisen lohien metabolianopeus oli suurempaa verrattuna ei-siirtogeenisiin kontrollikaloihin. Kyseisessä tutkimuksessa kaloihin oli siirretty kuningaslohen kasvuhormonigeeni.

4.2. Hapenkulutus

Esikokeen perusteella voitiin päätellä, että vuorokauden mittaus riittää hapenkulutuksen tasaantumiseen perusmetaboliatasolle. Vaikka hapenkulutuksen mittauksissa ei ollut käytössä automatisoitua laitteistoa, olivat perusmetaboliomittausten tulokset vertailukelpoisia muissa tutkimuksissa tehtyjen mittausten kanssa. Beamish (1980) havaitsi 15 °C:ssa nieriän perusmetaboliatason olevan 100 g:n kalalla 80 mg O₂ kg⁻¹ h⁻¹. Koska hapenkulutus mitattiin vain kuudesta vuorokauden aikana, voi se aiheuttaa perusmetaboliatason yliarviointia (Steffensen 1989).

Kokeessa valittiin maksimimetaboliatasoksi ensimmäinen mittaus heti sen jälkeen, kun kala asetettiin kammioon. Kalan käsittelyn ja uuden ahtaan ympäristön takia kalan stressaantuminen nostaa hapenkulutuksen korkealle tasolle, jonka on havaittu olevan hyvin lähellä kalan suurinta uintirespirometrissä rasituksessa aiheutettua hapenkulutuksen tasoa (vrt. Karjalainen ym. 1995). Perus- ja maksimimetabolian välinen suhde on toiminnallinen metabolinen vaihteluväli (factorial metabolic scope, fMS), mikä kuvaa maksimitason suuruutta suhteessa perustasoon. Tässä tutkimuksessa metabolinen vaihteluväli oli 1,1–3,6, mikä vastaa Cutts'in ym. (2002) laskemaa arvoa lohelle (1–3,5). Tässä tutkimuksessa käytetty menetelmä maksimimetaboliatason laskemiselle näyttää olevan vertailukelpoinen muihin tutkimuksiin nähden.

Kaloilla hapenkulutuksen ja massan välinen suhde noudattaa potenssifunktiota (Jobling 1994). Tässä tutkimuksessa käytettiin suhteellisen hapenkulutuksen laskemiseen yhtälöä hapenkulutuksen ja massan välisestä lineaarisesta regressiosta. Kalojen kokovaihtelun ollessa pientä (vaihteluväli 3,1–26,5 g) sopii lineaarinen regressio potenssifunktiota paremmin aineistoon (vrt. Metcalfe ym. 1995).

Kalojen hapenkulutus nousee ruokailun myötä ja voi korkeimmillaan olla jopa kaksinkertainen suhteessa rutiinitasoon (Jobling 1981, Fu ym. 2005). Hapenkulutuksen nousun kesto riippuu suolen tyhjenemisnopeudesta, mikä on puolestaan yhteydessä lämpötilaan. Tässä tutkimuksessa kaloja pidettiin paastolla 48 tuntia ennen hapenkulutuksen mittausta. Kylmässä vedessä suolen evakuointinopeus on hitaampaa ja 48 tunnin paaston jälkeen voi vielä olla ravintoa suolessa jäljellä (Sweka ym. 2004), jolloin perusmetaboliataso voidaan yliarvioida. Myös nälkiintymisen on todettu alentavan perusmetaboliatasoa (Dickson & Kramer 1971), mutta tässä tutkimuksessa hapenkulutuksen mittauksen lopussa kala oli ollut ravinnotta 71 tuntia, mikä tuskin vaikutti perusmetaboliatasoon.

Kahdentoista asteen lämpötilassa kontrollikaloiden ja VHb-positiivisten kalojen aktiivimetaboliatasot erosivat toisistaan eniten ja olivat lähellä tilastollisen merkitsevyyden tasoa (p=0,054). Kalojen maksimimetaboliatason on todettu nousevan käyräviivaisesti suhteessa lämpötilaan. Lähellä kalan kasvun optimilämpötilaa maksimitaso tasaantuu, jonka jälkeen se alenee. Perusmetaboliataso puolestaan nousee tasaisesti suhteessa lämpötilaan eikä samanlaista tasaantumista ole havaittu (Claireaux & Lagardère 1999, Mallekh & Lagardère 2002, Sylvestre ym. 2007, Frisk ym. 2012). Tässä tutkimuksessa havaittiin kontrollikaloiden maksimitason tasaantumista (12 °C ja 16 °C) mutta VHb-kaloilla sitä ei havaittu. Tämä voisi viitata siihen, että VHb-kaloilla kasvun

optimilämpötila voisi olla kontrollikaloja korkeampi mutta tämän toteaminen vaatii lisätutkimusta.

Nukutuksen ja nukutuksesta selviytymisen vaikutusta hapenkulutukseen on tutkittu vähän. Varsinkin toistuvan nukutuksen vaikutusta ei ole tutkittu, mitä tässä tutkimuksessa jouduttiin käyttämään. Kaloja jouduttiin nukuttamaan kahden viikon välein, jotta hapenkulutuksen arvot saatiin laskettua painoyksikköä kohden. Kalan hapenkulutuksen on todettu laskevan nukutuksen aikana ja hieman kohoavan nukutuksen jälkeen, mutta kulutuksen palaaminen rutiinitasolle on nopeaa (Houston ym. 1973, Forgan & Forster 2010). Tässä tutkimuksessa kalojen nukutuksen ja hapenkulutustasojen välillä oli kahden viikon tauko, joten nukutus tuskin vaikutti hapenkulutukseen.

4.3. Hengitysfrekvenssi

Hengitysfrekvenssin ja hapenkulutuksen välisissä suhteissa ei havaittu eroja VHb-positiivisten kalojen ja kontrollikalojen välillä. Mikäli VHb-proteiini olisi vaikuttanut siihen, millä tehokkuudella kala saa happea vedestä, olisi se voinut näkyä hengitysfrekvenssin ja hapenkulutuksen välisessä suhteessa. Tehokkaammalla hapensitomiskyvyllä olisi VHb-positiivinen kala voinut saada vedestä saman määrän happea pienemmällä hengityskustannuksella. Tätä ei ole myöskään havaittu luontaisilla kaloilla, sillä Smith & Jones (1982) havaitsivat veren hapenottokyvyn heikentyessä kirjolohen lisäävän hengitystilavuutta eikä hengitysfrekvenssiä.

Useat tutkimukset ovat todistaneet hapenkulutuksen ja hengitysfrekvenssin riippuvuuden. Tässä tutkimuksessa havaittiin riippuvuuden olevan ei-lineaarista. Saman havaitsivat van Rooij & Videler (1996), kun taas Millidine ym. (2008) ja Grantner & Taborsky (1998) havaitsivat sen olevan lineaarista riippuvuutta.

Hapenkulutuksen ja hengitysfrekvenssin välisen riippuvuuden tarkkuus vaihtelee paljon tutkimusten välillä. Rogers & Weatherley (1983) havaitsivat riippuvuuden olevan tarkempi uimaan pakotetuilla kaloilla, verrattuna spontaanisti liikkuviin kaloihin. Tämä johtuu siitä, että spontaaneissa tilanteissa kala voi käyttää hengitystilavuuden lisäämisen sijasta vaihtoehtoisia tapoja hapensaannin tehostamiseen. Näitä voivat olla hapenoton tehostaminen kiduksissa ja sydämen lyöntitilavuuden nostaminen. Kun kala pakotetaan uimaan, on hapentarve suurempi kuin spontaanissa liikkumisessa ja tällöin hengitysfrekvenssiä nostamalla kala saa parhaiten tarvitsemansa lisähapen. Tämä voi olla myös syynä siihen, miksi tämän tutkimuksen hapenkulutuksen ja hengitysfrekvenssin väliset selitysasteet eivät olleet niin tarkkoja. Kaloja ei pakotettu uimaan vaan ne saivat olla vapaina kammioissa.

Hengitysfrekvenssin laskemiseen käytettiin avuksi videokameraa, mutta alhaisilla ventilaation tasoilla oli frekvenssin laskeminen vaikeaa hämäryyden takia. Viimeisten mittausten osalta frekvenssin laskeminen suoritettiin suoraan havainnoimalla. Hengitysfrekvenssi päätettiin laskea ainoastaan korkeimmassa lämpötilassa, sillä alemmissa lämpötiloissa olisi kiduskansien liikkeen erottaminen ollut liian epätarkkaa, kalojen alemman hapenkulutuksen ja sitä kautta alemman hengitysfrekvenssin takia.

4.4. Kasvatuskoe

Kasvatuskokeeseen pyrittiin valitsemaan lämpötila nieriöiden optimaalisen kasvun alueelta. Tällöin kasvunopeus on suurinta ja mahdolliset erot ryhmien välillä tulevat ilmi nopeasti. Kasvatuskokeeseen aiottua lämpötilaa jouduttiin kuitenkin alentamaan kalojen heikon ravinnonoton takia. Kyseiset kalat olivat ruokailleet normaalisti, kun niitä pidettiin samassa 16 °C:ssa hapenkulutuksen mittauksia varten. Asiaan saattoi vaikuttaa se, että

kaloja pidettiin altaissa yksitellen mutta vastaavia tapauksia ei ole raportoitu muualla. Kalat ruokailivat normaalisti parin asteen lämpötilan muutoksen jälkeen, joten myös mahdollinen vedenlaatuongelma voi olla syynä ruokahaluttomuuteen lämpimämmässä vedessä.

Kasvatuskokeessa saatiin vertailukelpoisia tuloksia kalojen kasvun ja ravinnon muuntotehokkuuden osalta. Spesifinen kasvunopeus oli keskimäärin $2,2 \% d^{-1}$, joka on samankokoisilla nieriöillä samassa lämpötilassa samaa tasoa kuin mitä Tabachek (1988), Jobling (1993) ja Ugedal (1994) ovat havainneet. Ravinnon muuntotehokkuus (keskiarvo 1,43) oli myös samalla tasolla kuin mitä Tabachek (1986) havaitsi.

Tässä tutkimuksessa käytettiin lohelle optimoitua ravintoa, mutta sen on todettu sopivan hyvin myös nieriälle (Tabachek 1986). Pelletin kooksi nieriälle suositellaan hieman pienempää kuin lohelle (Tabachek 1988). Tässä kokeessa pelletin koko oli suositellun koon alarajalla (käytetty 2,5 mm, suositeltu 2,4–4,5mm), mikä saattoi hieman alentaa optimaalisinta ravinnonoton määrää varsinkin suurimmilla kaloilla. Nieriän on todettu syövän hyvin myös hämärässä ja hämäräsyönti voi olla joinakin vuodenaikoina jopa tärkeää (Jørgensen & Jobling 1989). Tässä kokeessa ruoka poistettiin akvaarioista ennen hämäräjaksoa. Mikäli pelletit olisi jätetty altaan pohjalle yön ajaksi, olisivat syömättömät pelletit hajonneet, eikä tarkkaa syödyn ravinnon määrää olisi voitu laskea.

Kasvatuskoe oli tarkoitettu jatkaa siten, että kalat olisivat kasvaneet vähintään 150 % suhteessa alkupainoon. Ensimmäisen välipunnituksen jälkeen koe päätettiin kuitenkin lopettaa, sillä mitään suuria eroja ei kalojen välillä näyttänyt syntyvän. Ravinto jaettiin kaloille altaiden edestä, ja joihinkin kaloihin tämä vaikutti häiritsevästi. Kyseiset kalat kuitenkin hakivat ravintoa, kun ruokkijaa ei näkynyt. Tämä häiriintyminen saattoi kuitenkin vaikuttaa syödyn ravinnon määrään ja varsinkin altaan 1 kala, joka kasvoi suhteellisesti vähiten, oli varsin säikky ruokkijaa kohtaan. Kaloja ruokittiin kylläisyyteen asti ja muutamia pellettejä jätettiin altaan pohjalle noin puoleksi tunniksi. Puolen tunnin jälkeen pelletit eivät vielä olleet hajonneet ja syömättömien pellettien määrä oli helppo laskea.

4.5. Yhteenveto

Tutkimuksessa suoritettujen kokeiden perusteella ei siirtogeenisten ja kontrollikaloiden välillä havaittu eroja hapenkulutuksen eri tasojen tai kasvun välillä. Se, että eroja siirtogeenisten ja kontrollikaloiden välille ei todettu, voi johtua useasta asiasta. Vaikka siirtogeeni havaittiin nieriöiden evänäytteissä, ei siirtogeeni välttämättä ilmene, eli siirtogeeni ei ohjaa VHB-proteiinituotteen muodostamista nieriöissä. Tämä voi johtua siitä, että eliöiden puolustusjärjestelmä voi hiljentää geenejä, jotka ovat monistuneena yksilön genomiin (Garrick ym. 1998). Hiljennetyt geenit metyloidaan ja ne eivät tällöin tuota proteiinia. Koska geeninsiirrossa siirretään useita miljoonia kopioita geeniä (Pitkänen-Arsiola 2001), on mahdollista, että siirtogeeni monistuu genomiin useina kappaleina. Akitake ym. (2011) havaitsivat, että useamman siirtogeenikopion omaavien seprakalojen siirtogeeni hiljentyi useammin, kuin vähemmän siirtogeenikopioita omaavien kalojen siirtogeenit. Voi olla myös, että siirtogeeni ei ilmene nieriöissä tämän tutkimuksen kokeissa käytetyissä olosuhteissa. Siirtogeenien ilmenemisessä on myös havaittu vuodenaikaisvaihtelua (Iyengar A. 1996, Hew ym. 1999). Mahdollista voi olla, että siirtogeeni ohjaa proteiinin tuottoa, mutta proteiini ei vaikuta nieriöiden kasvuun ja hapenkulutukseen testatuissa olosuhteissa tai vaikutukset ovat niin pieniä, että niitä ei havaita yksilövaihteluiden yli. Lisäksi voi olla mahdollista että siirtogeenin tuottama proteiini ei vaikuta hapenkulutukseen tai kasvuun minkäänlaisissa olosuhteissa. Näiden vaihtoehtojen todistamiseen tarvitaan kuitenkin jatkotutkimuksia.

Jatkotutkimuksissa kaloilta voisi mitata VHB-proteiinin esiintymistä eri kudoksissa. Näin saadaan selville aktivoituuko geeni, eli ohjaako geeni VHB-proteiinin tuottoa ja onko tuotolla eroa eri kudosten välillä. VHB-positiivisten kalojen selviytymistä alhaisissa happipitoisuuksissa olisi mielenkiintoista tutkia, sillä Guan ym. (2010) havaitsivat VHB-positiivisen seeprakalan mädin selviytyvän paremmin heikoissa happiolosuhteissa. Ishibashi ym. (2005) totesivat punahammasahvenen (*Pagrus major*) hapenkulutuksella ja selviytymisellä alhaisissa happipitoisuuksissa olevan positiivisen korrelaation. Korkeamman hapenkulutuksen omaavat yksilöt eivät selvinneet niin alhaisessa happipitoisuudessa mitä pienimmän hapenkulutuksen omaavat yksilöt. Mikäli näin on myös nieriällä, olisi kuitenkin voinut olla mahdollista myös hapenkulutusta mittaamalla havaita eroja VHB-positiivisten ja kontrollikalojen selviytymisessä alhaisissa happipitoisuuksissa.

KIITOKSET

Kiitos ohjaajilleni Juhani Pirhoselle sekä Juha Karjalaiselle gradun ohjauksesta ja rakentavasta palautteesta. Suuri kiitos myös Tiina Pitkänen-Arsiolalle VHB-geeniin liittyvästä tiedosta sekä Marja Tiirilalle avusta molekyylibiologian osalta. Kiitos kuuluu myös Konneveden aseman keittiön henkilökunnalle, joiden herkkupatojen ääressä gradun kirjoittaminen oli helppoa Konnevesi-apurahan turvin. Rahallisesta tuesta kiitos Olvisäätiölle, jonka apurahan turvin aineisto voitiin kerätä kesällä.

KIRJALLISUUS

- Akitake C.M., Macurak M., Halpern M.E. & Goll M.G. 2011. Transgenerational analysis of transcriptional silencing in zebrafish. *Dev. Biol.* 352: 191-201.
- Anonyymi 2010. Vesiviljely 2009. Riista- ja kalatalous. Tilastoja nro 5. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos, Helsinki 2010.
- Anonyymi 2011. World aquaculture 2010. FAO fisheries and aquaculture department. Technical paper 500/1, Rome 2011.
- Anonyymi 2012. www.glofish.com. Luettu 16.2.2012
- Baroudy E. & Elliott J.M. 1994. The critical thermal limits for juvenile Arctic charr *Salvelinus alpinus*. *J. Fish Biol.* 45: 1041-1053.
- Beamish F.W.H. 1980. Swimming performance and oxygen consumption of the charrs. Teoksessa: Balon E.K. (toim.), *Charrs, Salmonid fishes of the genus Salvelinus*. Dr W. Junk by publishers, Hague, 739-747.
- Brown G.E., Brown J.A. & Srivastava R.K. 1992. The effect of stocking density on the behaviour of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) *J. Fish Biol.* 41: 955-963.
- Claireaux G. & Lagardère J.-P. 1999. Influence of temperature. Oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. *J. Sea Res.* 42: 157-168.
- Cook J.T., McNiven M.A., Richardson G.F. & Sutterlin A.M. 2000. Growth rate, body composition and feed digestibility / conversion of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 188: 15-32.
- Cutts C.J., Metcalfe N.B. & Taylor A.C. 2002. Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*) with relatively high standard metabolic rates have smaller metabolic scopes. *Funct. Ecol.* 16: 73-78.
- Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Biagi, C.A., Donaldson, E.M., Swanson, P. & Chan, W.-K. 1994. Extraordinary salmon growth. *Nature* 371: 209-210.

- Devlin R.H., Yesaki T.Y., Donaldson E.M., Du S.J. & Hew C.-L. 1995. Production of germline transgenic Pacific salmonids with dramatically increased growth performance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 1376-1384.
- Dickson I.W. & Kramer R.H. 1971. Factors influencing scope for activity and active and standard metabolism of Rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.* 28: 587-596.
- Dietrich J.P. & Cunjak R.A. 2006. Evaluation of the impacts of carlin tags, fin clips and pectoral tattoos on juvenile Atlantic salmon. *N. Am. J. Fish. Manage.* 26: 163-169.
- Dunham R.A., Warr G.W., Nichols A., Duncan P.L., Argue B., Middleton D. & Kucuktas H. 2002. Enhanced bacterial disease resistance of transgenic Channel catfish *Ictalurus punctatus* possessing cecropin genes. *Mar. Biotechnol.* 4: 338-344.
- Fletcher G.L., Goddard S.V., Shears M.A., Sutterlin A. & Hew C.L. 2001. Transgenic salmon: potentials and hurdles. Teoksessa: Toutant J-P. & Balazs E. (toim.), *Molecular Farming, Proceedings of the OECD Workshop*. INRA editions, Paris, France, 57-66.
- Forgan L.G. & Forster M.E. 2010. Oxygen consumption, ventilation frequency and cytochrome c oxidase activity in blue cod (*Paraperca colias*) exposed to hydrogen sulphide or isoeugenol. *Comp. Biochem. Phys. C* 151: 57-65.
- Forstner H., Hinterleitner S., Mähr K. & Weiser W. 1983. Towards a better definition of metamorphosis in coregonus sp.: biochemical, histological and physiological data. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40: 1224-1232.
- Frey A.D. & Kallio P.T. 2003. Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 525-545.
- Frey A.D., Shepherd M., Jokipii-Lukkari S., Häggman H. & Kallio P.T. 2011. The single-domain globin of *Vitreoscilla*: augmentation of aerobic metabolism for biotechnological applications. *Adv. Microb. Physiol.* 58: 81-139.
- Frisk M., Skov P.V. & Steffensen J.F. 2012. Thermal optimum for pikeperch (*Sander lucioperca*) and the use of ventilation frequency as a predictor of metabolic rate. *Aquaculture* 324-325: 151-157.
- Fu S.J., Xie X.J. & Cao Z.D. 2005. Effect of fasting on resting metabolic rate and postprandial metabolic response in *Silurus meridionalis*. *J. Fish Biol.* 67: 279-285.
- Garrick D., Fiering S., Martin D.I. & Whitelaw E. 1998. Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nat. Genet.* 18: 56-59.
- Giles M.A. 1991. Strain differences in hemoglobin polymorphism, oxygen consumption, and blood oxygen equilibria in three hatchery broodstocks of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Fish Physiol. Biochem.* 9: 291-301.
- Grantner A. & Taborsky M. 1998. The metabolic rates associated with resting, and with the performance of agonistic, submissive and digging behaviours in the cichlid fish *Neolamprologus pulcher* (Pisces: Cichlidae). *J. Comp Physiol. B* 168: 427-433.
- Guan B., Ma H., Wang Y., Hu Y., Lin Z., Zhu Z. & Hu W. 2010. *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) overexpression increases hypoxia tolerance in Zebrafish (*Danio rerio*). *Mar. Biotechnol.* DOI 10.1007/s10126-010-9305-z.
- Hew C., Poon R., Xiong F., Gauthier S., Shears M., King M., Davies P. & Fletcher G. 1999. Liver-specific and seasonal expression of transgenic Atlantic salmon harboring the winter flounder antifreeze protein gene. *Transgenic Res.* 8: 405-414.
- Holmberg N., Lilius G., Bailey J.E. & Bülow L. 1997. Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production. *Nat. Biotechnol.* 15: 244-247.

- Houston A.H., Czerwinski C.L. & Woods R.J. 1973. Cardiovascular-respiratory activity during recovery from anesthesia and surgery in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and carp (*Cyprinus carpio*). *J. Fish. Res. Board Can.* 30: 1705-1712.
- Ishibashi Y., Inoue K., Nakatsukasa H., Ishitani Y., Miyashita S. & Murata O. 2005. Ontogeny of tolerance to hypoxia and oxygen consumption of larval and juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 244: 311-340.
- Iyengar A., Muller F. & Maclean N. 1996. Regulation and expression of transgenes in fishes – a review. *Transgenic Res.* 5: 147-166.
- Jobling M. 1981. The influences of feeding on the metabolic rate of fishes : a short review. *J. Fish Biol.* 18: 385-400.
- Jobling M., Jorgensen E.H., Arnesen A.M. & Ringo E. 1993. Feeding, growth and environmental requirements of Arctic charr: a review of aquaculture potential. *Aquacult. Int.* 1: 20-46.
- Jobling M. 1994. *Fish bioenergetics*. Chapman & Hall, London, 309 s
- Jorgensen E.H. & Jobling M. 1989. Patterns of food intake in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, monitored by radiography. *Aquaculture* 81: 155-160.
- Jorgensen E.H., Christiansen J.S. & Jobling M. 1993. Effects of stocking density on food intake, growth performance and oxygen consumption in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture* 110: 191-204.
- Karjalainen J., Huuskonen H. & Medgyesy N. 1995. Differences in metabolic rates during the early life history of vendace (*Coregonus albula* (L.)) and whitefish (*C. lavaretus* L.). *Polskie Archiwum Hydrobiologii* 42: 247-256.
- Khosla C. 1990. *Vitreoscilla hemoglobin: gene structure and regulation functions, and applications to aerobic bioprocesses*. California institute of technology. Pasadena, California USA, 242 s
- Khosla C. & Bailey J.E. 1988. Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*. *Nature* 331: 633-635.
- Kinoshita M., Toyohara H., Sakaguchi M., Inoue K., Yamashita S., Satake M., Wakamatsu Y. & Ozato K. 1996. A stable line of transgenic medaka (*Oryzias latipes*) carrying the CAT gene. *Aquaculture* 143: 267-276.
- Larsson S. & Berglund I. 2005. The effect of temperature on the energetic growth efficiency of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) from four Swedish populations. *J. Therm. Biol.* 30: 29-36.
- Lecklin T. 2000. *The effects of thermal and seasonal acclimation on the function of teleost erythrocyte*. Turun yliopiston julkaisu. Sarja A 2, Biologica. Geographica. Geologica. 82 s
- Lyytikäinen T., Koskela J. & Rissanen I. 1997 a. The influence of temperature on growth and proximate body composition of under yearling Lake Inari arctic char (*Salvelinus alpinus* (L.)). *J. Appl. Ichtyol.* 13: 191-194.
- Mallekh R. & Lagardère J.P. 2002. Effect of temperature and dissolved oxygen concentration on the metabolic rate of the turbot and the relationship between metabolic scope and feeding demand. *J. Fish Biol.* 60: 1105-1115.
- McEvoy T., Stack M., Keane B., Barry J., Sreenan J. & Gannon F. 1988. The expression of a foreign gene in salmon embryos. *Aquaculture* 68: 27-37.
- Mclean N., Iyengar A., Rahman A., Sulaiman Z. & Penman D. 1993. Transgene transmission and expression in Rainbow trout and Tilapia. Teoksessa: Okada T. & Nagahama Y. (toim.), *Biotechnology of aquatic animals*, 95-98.

- Metcalf N.B., Taylor A.C. & Thorpe J.E. 1995. Metabolic rate, social status and life-history strategies in Atlantic salmon. *Anim. Behav.* 49: 431-436.
- Millidine K.J., Metcalfe N.B. & Armstrong J.D. 2008. The use of ventilation frequency as an accurate indicator of metabolic rate in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 65: 2081-2087.
- Moav B., Hinitz Y., Groll Y. & Rothbard S. 1995. Inheritance of recombinant carp β -actin/GH cDNA gene in transgenic carp. *Aquaculture* 137: 179-185.
- Naylor R.L., Goldberg R.J., Primavera J.H., Kautsky N., Beveridge M.C.M., Clay J., Folke C., Lubchenko J., Mooney H. & Troell M. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405: 1017-1024.
- Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E., Trumbauer M.E., Rosenfeld M.G., Brinberg N.C. & Evans R.M. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300: 611-615.
- Pennell W. & McLean W.E. 1996. Early rearing. Teoksessa: Pennell W & Barton B.A. (toim.), *Principles of salmonid culture*. Elsevier, Netherlands, 365-466.
- Pitkänen T.I., Krasnov A., Teerijoki H. & Mölsä H. 1999. Transfer of growth hormone (GH) transgenes into Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) I. Growth response to various GH constructs. *Gen. Anal.* 15: 91-98.
- Pitkänen-Arsiola T.I. 2001. *Expression of exogenous growth hormone in genetically modified salmonid fishes*. Kuopio university publications C, Kuopio, 70 s.
- Rahman M.A. & Maclean N. 1999. Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene. *Aquaculture* 173: 333-346
- Rogers S.C. & Weatherley A.H. 1983. The use of opercular muscle electromyograms as an indicator of the metabolic costs of fish activity in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as determined by radiotelemetry. *J. Fish Biol.* 23: 535-547.
- van Rooij J.M. & Videler J.J. 1996. Estimating oxygen uptake rate from ventilation frequency in the reef fish *Sparisoma viride*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 132: 31-41.
- Smith F.M. & Jones D.R. 1982. The effect of changes in blood oxygen-carrying capacity on ventilation volume in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Exp. Biol.* 97: 325-334.
- Sylvestre E.-L., Lapointe D., Dutil J.-D. & Guderley H. 2007. Thermal sensitivity of metabolic rates and swimming performance in two latitudinally separated populations of cod, *Gadus morhua* L. *J. Comp. Physiol. B* 177: 447-460.
- Steffensen J.F. 1989. Some errors in respirometry of aquatic breathers: how to avoid and correct for them. *Fish Physiol. Biochem.* 6: 49-59.
- Stevens E.D., Sutterlin A. & Cook T. 1998. Respiratory metabolism and swimming performance in growth hormone transgenic Atlantic salmon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55: 2028-2035.
- Sweka J.A., Cox M.K. & Hartman K.J. 2004. Gastric evacuation rates of brook trout. *T. Am. Fish. Soc.* 133: 204-210.
- Tabachek J.L. 1986. Influence of dietary protein and lipid levels on growth, body composition and utilization efficiencies of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L. *J. Fish Biol.* 29: 139-151.
- Tabachek J.L. 1988. The effect of feed particle size on the growth and feed efficiency of Arctic charr [*Salvelinus alpinus* (L.)]. *Aquaculture* 71: 319-330.
- Ugedal O, Heggberget T., G. & Grande G.E. 1994. Growth of wild stunted Arctic charr after transfer to a commercial rearing system. *T. Am. Fish. Soc.* 123: 423.
- Wallace J.C., Kolbeinshavn A.G. & Reinsnes T.G. 1988. The effects of stocking density on early growth in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture* 73: 101-110.

Zerrenner A., Josephson D.C. & Krueger C.C. 1997. Growth, mortality and mark retention of hatchery brook trout marked with visible implant tags, jaw tags and adipose fin clips. *Prog. Fish-Cult.* 59: 241-245.