

**LuK-tutkielma**

**Ravinnonsaannin vaikutukset kasvuun ja  
aineenvaihduntaan perinnöllisesti eriytyneillä  
seeprakalapopulaatioilla**

**Sanni Parviainen & Aurora Ruotsalainen**



**Jyväskylän yliopisto**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Luonnonvarat ja ympäristö

03.12.2021

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Luonnonvarat ja ympäristö

Parviainen S. & Ruotsalainen A.

Ravinnonsaannin vaikutukset kasvuun ja aineenvaihduntaan perinnöllisesti eriytyneillä seeprakalapopulaatioilla

Kandidaatin tutkielma:

32 s.

Tutkielman ohjaajat:

akatemiaturkija Silva Uusi-Heikkilä ja projektitutkija Tiina Sävilammi

Joulukuu 2021

---

Hakusanat: Aineenvaihdunnan joustavuus, aineenvaihduntanopeus, elinkierto-ominaisuus, kasvukerroin, kelpoisuus, kuntokerroin

Aineenvaihduntanopeus, elinkierto-ominaisuudet ja niiden väliset vuorovaikutukset kertovat paljon yksilön kelpoisuudesta, toisin sanoen kyvystä selvitä hengissä ja tuottaa lisääntymiskykyisiä jälkeläisiä tietyssä ympäristössä. Ne vaikuttavat myös yksilön kykyyn sopeutua ympäristön muutoksiin. Tässä tutkimuksessa keskityimme siihen, miten ravinnonsaannin määrän vaikutuksiin kasvuun ja aineenvaihduntanopeuteen perinnöllisesti eriytyneillä seeprakalapopulaatioilla (*Danio rerio*). Käytimme tutkimuksessamme kolmea geneettisesti eriytynyttä valintalinjaa ja altistimme niitä noin kahden kuukauden ajan kolmelle erilaiselle ruokintäkäsittelylle. Osa kaloista oli koko tutkimuksen ajan *ad libitum* -dieetillä, osa nälkiintymisdieetillä ja osa vaihtoi tutkimuksen puolella välissä *ad libitum* -dieetiltä nälkiintymisdieetille. Mittasimme kalojen kokoa ja kasvua viikoittain ja aineenvaihduntaa kolme kertaa respirometrin avulla. Tutkimuksessa havaitsimme jokaisen valintalinjan pystyvän säätelemään aineenvaihduntaa ravinnonsaannin määrän muuttuessa. Mikään valintalinjoista ei ollut toistaan parempi tai heikompi aineenvaihdunnan säätelemisessä. Kaikilla valintalinjoilla nälkiintymisdieetillä olleet kalat kasvoivat hitaimmin ja nälkiintymisdieetiltä *ad libitum* -dieetille vaihtaneilla kaloilla kasvu oli nopeinta. Eroja valintalinjojen välisessä kasvussa huomasimme ruokintäkäsittelyssä, jossa kalat vaihtoivat nälkiintymisdieetiltä *ad libitum* -dieetille. Pienikokoisten valintalinjassa ei ollut yhtä suurta kompensoivaa kasvua kuin kontrollilinjassa tai suurikokoisten linjassa.

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

Parviainen S. & Ruotsalainen A.      The effect of food intake on growth and metabolic rate in genetically differentiated zebrafish populations  
Bachelor of Science Thesis:            32 p.  
Supervisors:                                Academy Research Fellow Silva Uusi-Heikkilä and Project researcher Tiina Sävilammi

December 2021

---

Keywords: Condition factor, fitness, food availability, growth, growth factor, life history trait, plasticity

Metabolic rate, life history traits and the connection between the two can tell us a lot about individual's fitness, which implies individual's ability to stay alive and produce fertile offspring. Metabolic rate and life history traits can also affect the ability of an organism to adapt to a changing environment. In our study, we examined the effect of food availability on growth and metabolic rate in genetically different zebrafish (*Danio rerio*) populations. We used three genetically different selection lines and exposed them to three different diets for approximately two months. One group of the fish were on an *ad libitum* diet for the whole study, the second part on a starvation diet and the third one changed diets from *ad libitum* to starvation half way through the study. We measured the growth of the fish weekly and the metabolic rate of the fish three times during the study. We observed that all selection lines were capable of regulating their metabolic rate in an environment where food availability was alternating. In addition, there was no difference in any of the selection lines' metabolic rate regulation. The growth was weakest on the starvation diet and strongest on the diet where the fish changed from starvation to *ad libitum*. Differences between selection lines were found on the diet where the fish switched from starvation to *ad libitum*. The small selection line fish did not have such a big compensating growth as the large selection line fish or the control line.

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>1 JOHDANTO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 AINEISTO JA MENETELMÄT .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 KÄYTETYT VALINTALINJAT .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 RUOKINTAJÄRJESTELYT .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 KASVUN SEURANTA .....</b>	<b>7</b>
<b>2.4 RESPIROMETRIKOE .....</b>	<b>8</b>
<b>2.5 AINEISTON ANALYSOINTI .....</b>	<b>10</b>
2.5.1 <i>Pituuden ja painon kasvukertoimet .....</i>	<i>11</i>
2.5.2 <i>Kuntokertoimet .....</i>	<i>12</i>
2.5.3 <i>Aineenvaihduntanopeus .....</i>	<i>12</i>
2.5.4 <i>Aineiston tilastollinen tarkastelu .....</i>	<i>12</i>
<b>3 TULOKSET .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 PITUUDEN JA PAINON KASVUKERTOIMET .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 KUNTOKERTOIMET .....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 AINEENVAIHDUNTA NOPEUS .....</b>	<b>22</b>
<b>4 TULOSTEN TARKASTELU .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1 RUOKINTAKÄSITTELYN VAIKUTUS KASVUUN PERINNÖLLISESTI     ERILAISTUNEILLA SEEPRAKALAPOPULAATIOILLA .....</b>	<b>25</b>
<b>4.2 EROT AINEENVAIHDUNNASSA JA SEN PLASTISUUDESSA .....</b>	<b>27</b>
<b>4.3 YHTEENVETO .....</b>	<b>28</b>
<b>KIITOKSET .....</b>	<b>30</b>
<b>KIRJALLISUUS .....</b>	<b>31</b>

# 1 JOHDANTO

Aineenvaihdunta käsitteenä tarkoittaa biologisia prosesseja, joiden seurauksena eliö tai solu saa energiaa ja rakennusaineita käyttöönsä. Siksi aineenvaihduntaa voidaan myös kuvata elämän perustaksi. Aineenvaihduntanopeus eli nopeus, jolla nämä prosessit tapahtuvat, määrittää lähes kaikkien biologisten aktiviteettien nopeuden. Tätä kautta aineenvaihduntanopeus vaikuttaa myös elämän tahtiin (*eng. pace-of-life*) elinkierto-ominaisuuksien, kuten esimerkiksi sukukypsyyden saavuttamisen, eliniän pituuden ja kasvun, kautta (Brown ym. 2004). Elinkierto-ominaisuudet kuvaavat puolestaan yksilölle ominaisia tapoja käyttää energiaansa esimerkiksi erilaisiin kasvuun tai lisääntymiseen vaikuttaviin tekijöihin. Jokaisella yksilöllä on käytettävissä äärellinen määrä energiaa, eli yksilön täytyy jakaa energiaansa eri elinkierto-ominaisuuksien kesken (Burton ym. 2011). Esimerkiksi, jos yksilö suuntaa energiankäyttönsä sukukypsyyden saavuttamiseen, saattaa sen kasvu hidastua. Tätä kutsutaan vaihtokaupaksi (*eng. trade-offs*). Elinkierto-ominaisuuksien ilmenemiseen vaikuttaa yksilön perimä, ja siksi ne ovat lajitasolla samankaltaisia saman lajin yksilöiden kesken. Niiden ilmentyminen myös vaihtelee lajin sisällä yksilöiden välillä, mahdollistaen luonnonvalinnan, joka johtaa populaatioiden adaptaatioon muuttuvissa olosuhteissa. Elinkierto-ominaisuuksia voidaan määrittää ja niiden avulla ennustaa populaatioiden reagoititapoja muuttuviin olosuhteisiin (King ym. 2003). Kalojen aineenvaihduntaan vaikuttavat lukuisat tekijät, joista ravinto on lämpötilan kanssa selvästi yksi tärkeimmistä (Burton ym. 2011, Auer ym. 2015a).

Aineenvaihdunnan nopeus kertoo usein paljon yksilön elinkierto-ominaisuuksista. Auer ym. (2018) tutkivat miljoonakaloilla yhteyttä aineenvaihduntanopeuden ja elinkierron tahdin välillä. He havaitsivat merkkejä positiivisesta rinnakkaisesta evoluutiosta aineenvaihduntanopeuden ja elinkierron tahdin välillä. He myös osoittivat, että nopeatempoisen elinkierron (yksilöt, jotka saavuttavat sukukypsyyden aikaisemmin ja pienemmän kokoisina, lisääntyvät nopeasti, mutta

kuolevat nuorena) miljoonakalapopulaatioiden aineenvaihduntanopeudet ovat korkeammat kuin niillä populaatioilla, joiden elinkierto etenee hitaammin. Erot elinkiertojen tahdissa kehittyivät korkean ja matalan saalistuspaineen ympäristöjen vaikutuksesta vain 20 sukupolven kuluessa. Scholer ym. (2019) esittivät puolestaan todisteita selviytymisen negatiivisesta kytköksestä aineenvaihduntaan linnuilla, ja tuloksia tukee Pettersenin ym. (2016) tutkimus sammaleläimillä. Molemmissa tutkimuksissa korkea aineenvaihduntanopeus ennusti pienempää mahdollisuutta eloonjäämiseen, toisin sanoen lyhyempää elinikää, ja hitaampi aineenvaihdunta vastaavasti merkitsi pidempää ikää, kuten myös elinkierto-ominaisuuksien ilmenemisen myöhäisempää kehitystä. Nopeamman tai hitaamman aineenvaihdunnan omaaviin yksilöihin ei kuitenkaan Pettersenin ym. (2016) tutkimuksessa kohdistunut suuntaavaa valintaa, minkä johdosta he totesivat, ettei aineenvaihdunnan tasaisella nopeudella, oli se sitten miten nopea tai hidas tahansa, ole välttämättä vaikutusta yksilön kelpoisuuteen. Kelpoisuuden kannalta tärkeämpää on yksilön aineenvaihdunnan jatkuva plastisuus, eli joustavuus, elinkierron eri vaiheissa. Plastisuus on tärkeä ominaisuus, sillä korkea plastisuus kuvastaa yksilön mahdollisuuksia selviytyä ja lisääntyä muuttuneessa ympäristössä.

Yksi merkittävimmistä ympäristötekijöistä kelpoisuutta mitattaessa etenkin vaihtolämpöisillä eliöillä kuten kaloilla on ravinnonsaanti (Kim ym. 2020), joka vaikuttaa myös eliön kasvuun oleellisesti. Auer ym. (2015a) huomasivat taimenilla tehdyssä tutkimuksessaan, että saatavilla olevasta ravinnon määrästä riippuen perusaineenvaihdunta (eng. *standard metabolic rate*) ja aineenvaihdunnan maksimi- ja minimitason erotus (eng. *aerobic scope*) voivat yhdessä vaikuttaa yksilön kasvuun. Burton ym. (2011) puolestaan totesivat lepoaineenvaihdunnan (eng. *resting metabolic rate*) vaikuttavan yksilön kelpoisuuteen niin selviytymisen kuin kasvunkin kannalta, joskin myös sen vaikutus kasvuun voi olla riippuvainen ravinnon määrästä, kuten Auerin ym. (2015a) tutkimuksessa. Vaikka nämä kaksi tutkimusta käsittelevät aineenvaihdunnan erilaisia mittareita, molemmissa todetaan yhtä lailla ravinnon määrän vaikuttavan aineenvaihdunnan kautta yksilön kasvuun ja kelpoisuuteen.

Vaikka ravinnon määrä on tärkeää kasvulle, ei se ole ainoa kasvuun vaikuttava tekijä, vaan on otettava huomioon myös yksilön perinnöllinen kyky muokata syötyä ravintoa uudeksi kudokseksi (Burton ym. 2011). Tämän takia emme voi todeta pelkästään ravinnon määrän säätelyn automaattisesti tai suoraan vaikuttavan yksilön kasvuun, vaan myös geneettinen tausta on huomioitava. Burton ym. (2011) totesivat, ettei yksilölle tai koko populaatiolle ole välttämättä, eikä todennäköisesti, olemassa yhtä täydellistä lepoaineenvaihdunnanopeutta, vaan tärkein elementti on nimenomaan lepoaineenvaihdunnan plastisuus. Kalojen on pystyttävä säätelemään aineenvaihduntaansa jonkin verran, sillä luonnossa saatavilla olevan ravinnon määrä on vaihtelevaa. Mikäli ravintoa on vähän saatavilla, kelpoisempia ovat yksilöt, joiden lepoaineenvaihdunta on matala. Ravintoa ollessa runsaasti kelpoisempia ovat korkean lepoaineenvaihdunnan omaavat yksilöt. Ravinnon määrän ollessa runsasta voi yksilöiden aineenvaihdunta olla nopeaa esimerkiksi nopean kasvun tai lisääntymistehokkuuden maksimoimiseksi. Puolestaan ravinnon määrän ollessa niukkaa, takaa hitaampi aineenvaihdunta selviämisen. Aineenvaihduntanopeuden säätely eri tilanteissa on yksilölle siis jopa elintärkeää. Siten ne, jotka pystyvät sopeuttamaan aineenvaihduntaansa ravinnon määrän muutoksiin, menestyvät (Burton ym. 2011).

Vaikka aineenvaihduntanopeuden plastisuudesta esimerkiksi ravinnon laadun ja saatavuuden mukaan löytyy jonkin verran aikaisempaa tutkimustietoa, ei eroja ravinnonsaannin vaikutuksesta aineenvaihduntanopeuteen geneettisesti erilaisten populaatioiden välillä ole juurikaan tutkittu. Tutkimuksessamme selvitimme, miten ravinnonsaanti vaikuttaa geneettisesti eriytyneiden seeprakalapopulaatioiden (*Danio rerio*) kasvuun ja aineenvaihduntaan. Käytössämme on kolme geneettisesti eriytyneiden seeprakalojen valintalinjaa, isokokoisten kalojen valintalinja, pienikokoisten valintalinja ja kontrollilinja. Tutkimuksemme voi kertoa muun muassa siitä, onko olemassa yhtä optimaalisinta ravinnonsaannin määrää kaikille yksilöille, geneettisestä erilaisuudesta huolimatta. Tutkimuksemme keskittyy pelkästään ravinnon määrän tarkasteluun, eikä esimerkiksi ravinnon laatuun tai makroravintoaineiden suhteisiin. On myös mielenkiintoista selvittää, onko perimällä vaikutusta yksilön aineenvaihdunnan

nopeuteen ja plastisuuteen. Koska aineenvaihdunnan plastisuus voi olla merkinä kalan kelpoisuudesta, se miten tehokkaasti seeprakalat säätelevät aineenvaihdunnanopeuttaan tutkimuksessa, voi tuottaa tietoa geneettisesti erilaisten populaatioiden kelpoisuudesta. Seuraamme siis eri geno- ja fenotyyppien reagointia vaihtelevaan ravinnonsaantiin kasvun ja aineenvaihdunnan osalta.

Oletuksemme on, että kalojen perusaineenvaihdunta ja kasvu on hidasta, kun ravinnonmäärä on vähäistä ja vastaavasti korkeampaa, kun ravintoa on tarjolla runsaasti. Oletamme myös, että kun ravinnonsaanti muuttuu, kalojen aineenvaihdunnan ja kasvun nopeudet muuttuvat sen myötä. Koska pienikokoisilla kaloilla on ollut alhaisempi kelpoisuus kuin isokokoisilla kaloilla ja kontrollikaloilla (Uusi-Heikkilä ym. 2015, 2017), oletamme, että niillä on myös heikompi aineenvaihdunnan säätely. Käytännössä tämä merkitsisi, että pienikokoisimmat kalat pystyvät mukautumaan erilaisiin ravintomääriin heikommin - eli aineenvaihdunnanopeus ei juurikaan muutu kalojen ravinnonsaannin muuttuessa.

## **2 AINEISTO JA MENETELMÄT**

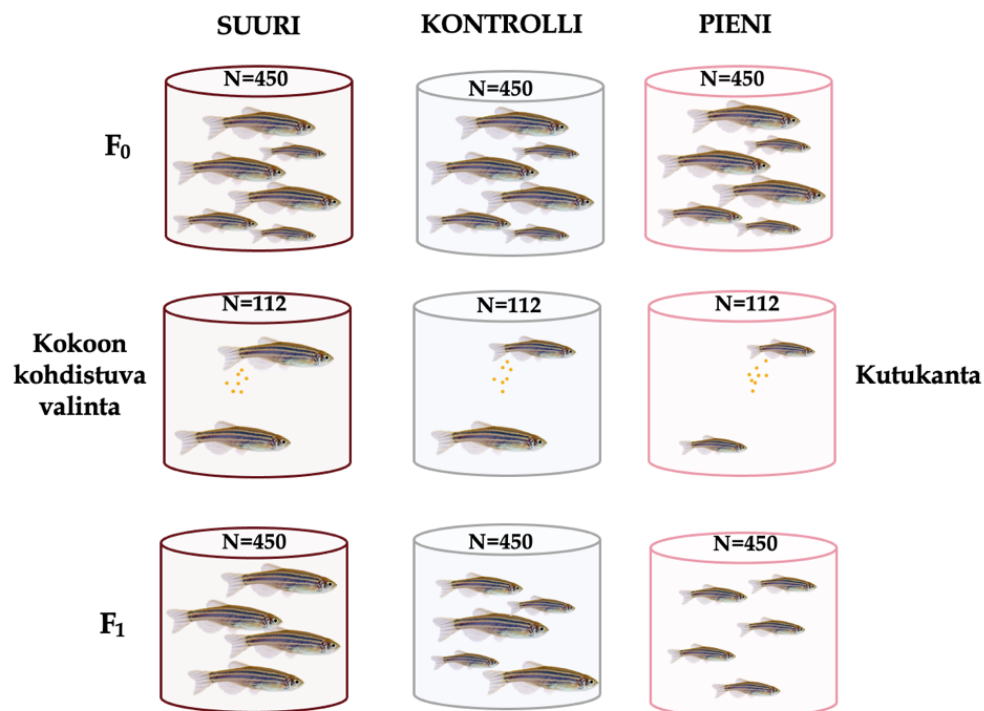
### **2.1 Käytetyt valintalinjat**

Käytimme tutkimuslajinamme seeprakalaa, joka on otollinen malliorganismi biologisessa tutkimuksessa muun muassa sen korkean hedelmällisyysasteen ja nopean kehityksen vuoksi (Khan & Alhewairini 2018). Tutkimuksemme seeprakalat on jalostettu alun perin noin 1500 villistä yksilöstä kolmen eri käsittelyn avulla eri valintalinjoiksi. Jokainen valintalinja koostuu kahdesta toistosta, jolloin saamme kokonaisuudessaan kuusi hyödynnettävää populaatiota. Koon suhteen jalostamattomat kontrollilinjat perustettiin valikoimalla satunnaisesti koon suhteen 25 % sukupolven edustajaa aloittamaan uutta sukupolvea. Suurikokoisten seeprakalojen valintalinjat saatiin valikoimalla aina 25 % kooltaan suurimmista seeprakaloista jatkamaan linjaa, ja pienikokoisten seeprakalojen valintalinjat saatiin



vastaavasti valikoimalla 25 % kooltaan pienimmistä yksilöistä kutemaan. Koon mukaan valikoivaa kalastusta (Kuva 1) jatkettiin viiden sukupolven ajan, jonka jälkeen kalat saivat toipua kalastuksesta kymmenen sukupolven ajan valikoimalla linjoista satunnaiset 112 yksilöä kutemaan, sillä haluttiin nähdä, että toipuvatko seeprakalat koon suhteen jalostuksesta. Kymmenen sukupolven jälkeen kalojen ilmiäsuojen erot ovat pienentyneet linjojen välillä (akatemiattutkija S. Uusi-Heikkilä, Jyväskylän yliopisto, julkaisematon), mutta vielä muutama sukupolvi sitten perinnöllisiä eroja oli selvästi (Uusi-Heikkilä ym. 2017).

Kymmenen sukupolven jälkeen kalastusvalinnan loppumisesta valintalinjojen välillä on eroa seeprakalojen käyttöksessä ja elinkierto-ominaisuuksissa. Esimerkiksi isot kalat käyttäytyvät aktiivisemmin ja ottavat enemmän riskejä, ja valintalinjojen välillä on eroja elinkierto-ominaisuuksissa esimerkiksi kalan kasvussa, koossa kalan saavuttaessa sukukypsyyden, sekä jälkeläisten määrässä (Uusi-Heikkilä ym. 2015). Uusi-Heikkilä ym. (2015) ei kuitenkaan havainnut eroja aineenvaihdunnassa valintalinjojen välillä.



Kuva 1. Seeprakalasukupolven jalostaminen koon mukaan kolmeksi perimältään erilaiseksi valintalinjaksi. Esimerkki yhden sukupolven jalostamisesta, valintaa jatkettiin yhteensä viiden sukupolven ajan.

Tutkimuksessa hyödynsimme 108 seeprakalayksilöä, kuusi kalaa yhtä valintalinjan replikaattia ja yhtä dieettiä kohden. Jokainen kala yksilöitiin koodein. Koodin ensimmäinen numero 1-6 ilmaisi, mikä kala kuudesta on kyseessä. Seuraavaksi ilmoitettiin kalan valintalinja kirjaimella R (*random selected*; kontrolli), L (*large selected*; suuri) tai S (*small selected*; pieni), jota seurasi joko numero 1 tai 2, mikä ilmaisi kumpi replikaatti oli kyseessä. Viimeisenä ilmeni kalan dieetti kokeen alku- ja loppupuoliskolla. Kirjain S ilmaisi nälkiintymisdieettiä ja kirjain A yltäkylläistä eli *ad libitum* -dieettiä, jolloin yhdistelmä SA viittasi kalan olleen vaihtuvalla dieetillä (ensin nälkiintymisdieetillä ja sen jälkeen yltäkylläisellä dieetillä), yhdistelmä AA kertoi kalan saaneen koko ajan paljon ruokaa ja yhdistelmä SS kertoi kalan olleen koko ajan nälkiintymisdieetillä. Lisäsimme seeprakaloille arpomalla myös numerotunnisteet 1-110 selventääksemme datan kirjaamista.

Tutkimuksen aikana seeprakaloista menehtyi viisi yksilöä: *ad libitum* -dieetiltä kaksi kalaa pienikokoisten valintalinjalta ja yksi suurikokoisten linjalta, nälkiintymisdieetiltä yksi suurikokoisten linjan yksilö ja vaihtuvalta dieetiltä yksi kontrollilinjan yksilö. Kalat menehtyivät joko respirometrikokeen aikana tai kaloja käsitellessä. Näistä viidestä kolme pystyttiin korvaamaan vastaavilla varayksilöillä: yksi pienikokoisten valintalinjan *ad libitum* -yksilö, kontrollilinjan vaihtuvalla dieetillä ollut yksilö ja suurikokoisten linjan nälkiintymisdieetillä ollut yksilö.

## 2.2 Ruokintajärjestelyt

Ennen varsinaisten ruokintajärjestelyjen alkua ruokimme kaloja *ad libitum* -ruokinnalla (ruoan määrää tarkasti mittaamatta) kasvun takaamiseksi. Kun aineenvaihduntanopeus oli mitattu respiometrillä ensimmäisen kerran, aloitimme tarkemmat ruokintajärjestelyt, joihin kalat siirtyivät vaiheittain. Aloitimme tutkimuksen liukuvasti, jotta pystyimme mittaamaan jokaisen kalan aineenvaihduntanopeuden ennen ruokintajärjestelyjen aloittamista. Päivittäin kahdeksan kalaa siirtyi niille määrätulle ja mitatulle ruokavaliolle, jossa ruoka punnittiin. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että liukuma-aika tarkasti mitatun ruokavalion aloituspäivässä ensimmäisen ja viimeisen kalan välillä oli kaksi

viikkoa. Kokeessamme kunkin kalan ruokintajärjestely kuitenkin kesti 55–57 päivää riippuen teknisistä ongelmista, jolloin siis myös ensimmäisen kalan mitattu ruokavalio loppui kaksi viikkoa aikaisemmin kuin viimeisen kalan. Ruokimme kalat päivittäin aamulla kahden tunnin aikaikkunalla (10.00–12.00) poislukien respirometriin seuraavan 24:n tunnin sisällä asetettavat kalat. Punnitsimme ruoan analyysivaa’alla Eppendorf-putkiin. Nälkiintymisdieetillä olevat kalat saivat ruokaa yhden prosentin verran. Valitsemamme prosentit perustuivat Lawrencen ym. (2012) tutkimukseen, jossa he osoittavat, että ruokittaessa seeprakaloja yhdellä prosentilla kehonpainostaan kalojen kasvunopeus pysähtyy tai muuttuu jopa negatiiviseksi. He myös osoittivat, että ruokittaessa seeprakaloja viidellä prosentilla kehonpainostaan kasvunopeus paranee huomattavasti. Halusimme kuitenkin kasvattaa *ad libitum* -dieetin kalojen ravinnonsaantia kahdeksaan prosenttiin ollaksemme varmoja, että ruokaa on kaloilla varmasti riittävän paljon ottaen myös huomioon mahdolliset mittavirheet kalojen painojen sekä ruoan mittauksessa. Kokeeseen valitut 108 kalaa olivat jaettu eri ruokavalioihin määrällisesti tasaisesti niin, että 36 kalaa oli koko mittauksen ajan nälkiintymisdieetillä (SS), 36 yltäkyläisellä eli *ad libitum* -ruokavaliolla (AA) ja 36 kaloista vaihtoivat ruokavaliota tutkimuksen puolivälissä, aloittaen ensin nälkiintymisdieetillä ja siirtyen n. 28. päivän kohdalla yltäkyläiselle ruokavaliolle (SA).

### 2.3 Kasvun seuranta

Seurasimme kalojen pituuden ja painon kehitystä viikoittain lauantaisin yhteensä 12:n viikon ajan. Tutkimuksessa käyttämiämme välineitä olivat vaaka, pehmeästä paperista muotoiltu ”tyyny”, pieni lusikka ja haavi, nukutusaine, pipetti, seeprakalojen kiertovesisysteemistä otettua vettä, petrimalja, kaksipuolinen lasta, viivoitin, järjestelmäkamera ja kolmijalka, päällystetty ruutupaperi, kärryt, sekä irtonaiset laput kalojen koodeista.

Taarasimme vaa’an pehmeästä paperista valmistetun tyynyn ollessa vaa’alla, asettelimme kameran kohtisuoraan kalojen mittaamiseen tarkoitetun ruutupaperin ylle ja valmistimme nukutusliuoksen. Nukutusliuos tehtiin petrimaljalle lisäämällä

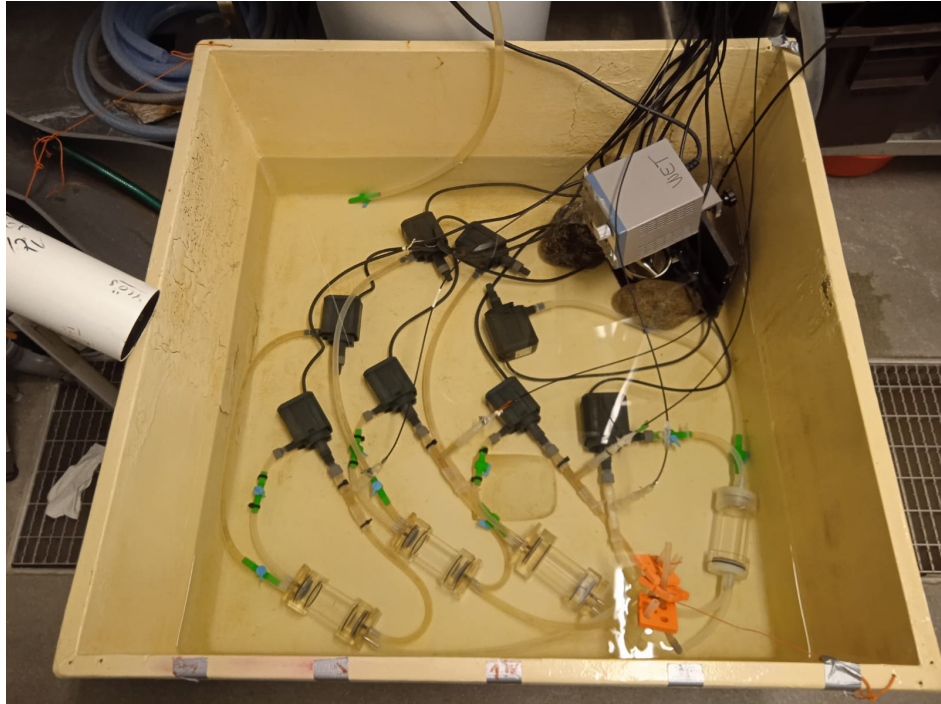
pipetillä nukutusainetta, 2-fenoksietanolia, seeprakaloille turvalliseen kiertovesisysteemistä otettuun veteen. Ensimmäisillä viikoilla kalojen ollessa pieniä 2-fenoksietanolia lisättiin noin yksi mikrolitra 35:een millilitraan vettä, ja viimeisillä viikoilla kalojen kasvettua noin neljä mikrolitraa 35:een millilitraan vettä. Liuos sekoitettiin tarkasti, jotta se oli varmasti tasaisesti konsentroitunut. Kalojen tuli menettää tajuntansa muutamassa sekunnissa, jotta kalojen stressaantuminen pystyttiin minimoimaan kuitenkin tappamatta niitä liian suurella nukutusaineen konsentraatiolla. Mikäli kalojen rauhoittumisessa kesti kauemmin kuin muutama sekunti, lisäsimme nukutusainetta hyvin vähän kerrallaan.

Haimme kerrallaan joukon kaloja (noin 15–22) kärryillä seeprakaloille lämpötilaoptimoidusta huoneesta toiseen huoneeseen, jossa suoritimme mittaukset. Tästä joukosta pyydystimme kalat yksitellen haavilla ja asetimme ne nukutusliuokseen. Sen jälkeen, kun yksi henkilö siirsi kalan tankista petrimaljalle, toinen henkilö otti tankin, pesi sen vedellä ja tiskiharjalla ja täytti uudella vedellä seeprakalojen kiertovesisysteemistä. Kun kala menetti tajuntansa, se siirrettiin mahdollisimman ripeästi lusikan ja lastan avulla paperityynylle, jonka päällä kala punnittiin analyysivaa'alla. Vaa'asta kala siirrettiin ruutupaperin päälle niin, että kala oli mahdollisimman suorassa ja näkyi viivoittimen ja kalan koodilapun kanssa kuvassa. Välittömästi kuvan ottamisen jälkeen kala asetettiin puhdistettuun tankkiinsa virkoamaan. Sama prosessi toistettiin jokaiselle tutkimukseen osallistuvalla kalalla viikoittain eli yhteensä kahdeksan kertaa. Tutkimuksen yhteispituus vaihteli kalakohtaisesti 55–57 päivän välillä, koska respirometritutkimus piti osalla kaloista toistaa respirometrin toimintahäiriöistä johtuen. Painot (0,0001 gramman tarkkuudella) ja kuvista Fiji-ohjelman avulla mitatut pituudet (0,001 millimetrin tarkkuudella) kirjattiin ylös.

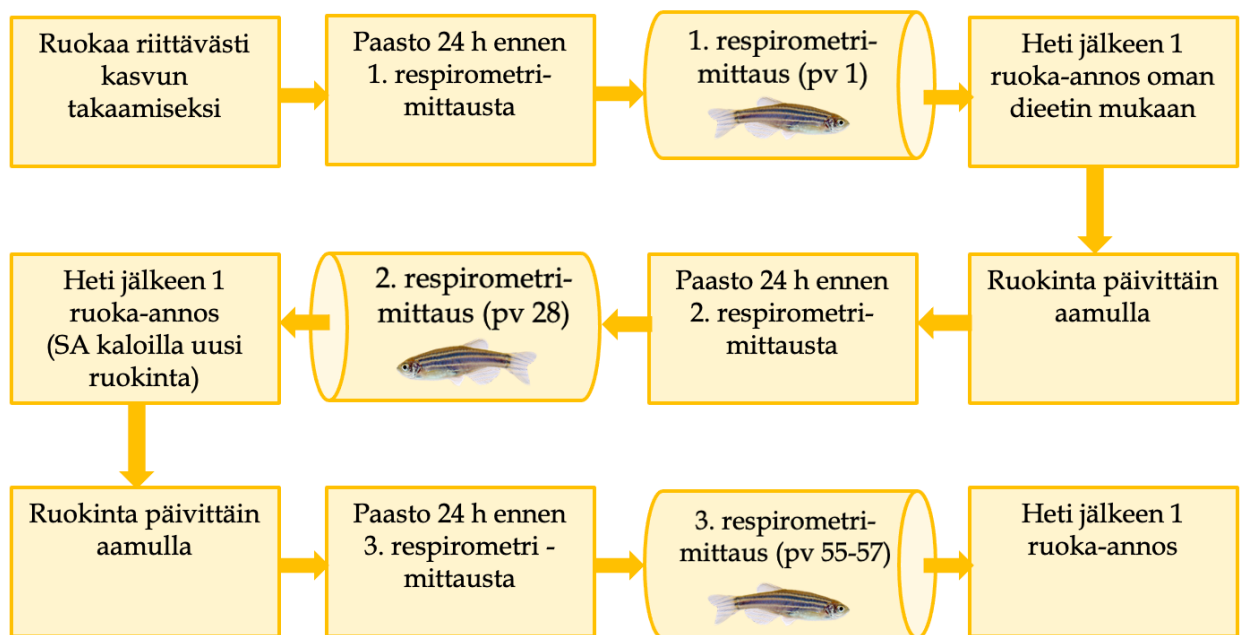
## **2.4 Respirometrikoe**

Respirometri mittaa ja tulkitsee hapen kulutuksen nopeutta, mikä antaa arvion aineenvaihduntanopeudelle. Mittasimme respirometrikokeella seeprakalojen aineenvaihdunnan nopeutta kolme kertaa: ennen, kuin kalat siirtyivät

ruokintajärjestelyihin, ruokintajärjestelyiden puolivälissä ja ruokintajärjestelyiden lopussa. Näin saimme tietää SA-ruokintakäsittelyllä olleiden seeprakalojen aineenvaihduntanopeuden mahdollisen muutoksen ruokintajärjestelyn vaihtuessa. Ennen respirometrikoetta kalat paastosivat tasan 24 tuntia. Ennen respirometrikokeen aloittamista tarkistimme testikammiot mahdollisten ilmakuplien varalta ja virtauksen estymisten osalta. Respirometrikoeseen tarvittavat materiaalit olivat pieni haavi ja lasikuppi sekä respirometrialteisto (Kuva 2). Käyttämämme respirometri oli jaksottaisesti suljettava respirometri (Loligo®). Kaloja mitattiin neljä kerrallaan, ja jokainen koekerta kesti 12 tuntia, jolloin kaikkien kalojen mittaamiseen kului noin kolme viikkoa. Kala pyydystettiin sen tankista haavilla ja siirrettiin pieneen respirometrialtaan vedellä täytettyyn lasikuppiin, josta kala oli helppo ujuttaa testauskammioon. Kun kalat oli asetettu niille määrättyihin testauskammioiden, kaloja yllytettiin liikuttamalla käsiä ympärillä ja ravistamalla kammiota hennosti, saadaksemme mitattua kalan aineenvaihdunnan maksiminopeutta. Respirometrikoetta aloitettiin, yleisvalo sammutettiin ja huoneeseen laitettiin tunnin ajastuksella toimiva automaattivalo päälle. Huoneeseen ei menty ennen kokeen loppua. Alkuylläytyksen jälkeen ja automaattivalon sammuttua kalat pääsivät rauhoittumaan pimeässä ilman häiriöitä, jolloin saimme mitattua niiden lepoaineenvaihduntanopeutta. Kokeen loputtua kalat vaihdettiin heti uuteen nelikkoon, ja mitatut kalat saavat ruoka-annoksen, mutta eivät enää muuta ruokaa sinä päivänä. Sykli ruokinnan ja respirometrimittausten välillä on selvennetty kuvassa 3.



Kuva 2. Tutkimuksessa käytetty respirometrialitteisto.

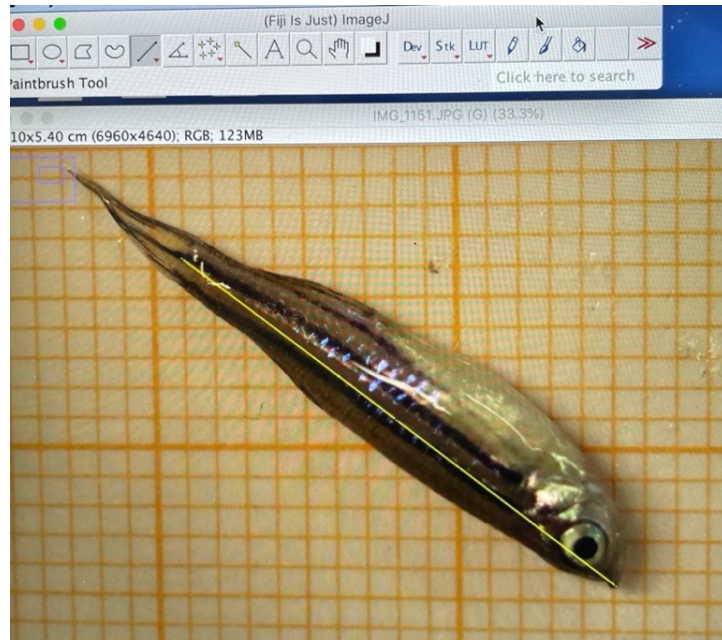


Kuva 3. Kaavio syklistä ruokinnan ja respirometrimittauksen välillä.

## 2.5 Aineiston analysointi

Mittasimme kalojen pituudet kasvun seurannassa otetuista kuvista tietokoneella Fiji-ohjelmalla (versio 1.0). Tarkistimme ensin mittaustarkkuuden kuvasta

mittaamalla kuvan viivoittimen yhden senttimetrin pituisen välin, ja kalibroimme mittaustyökalun niin, että se ilmoitti välin pituudeksi myös yhden senttimetrin. Mittaustarkkuuden ollessa kunnossa mittasimme kalat kuvista niiden kuonon kärjestä kohtaan, josta pyrstöevä alkaa (Kuva 4).



Kuva 4. Seeprakalan mittaaminen valokuvasta Fiji-ohjelmalla.

### 2.5.1 Pituuden ja painon kasvukertoimet

Keräsimme lopulliseen aineistoon seeprakalojen pituudet ja painot tutkimuksen alussa, eli heti ensimmäisen respirometrimittauksen jälkeen, keskellä tutkimusta, eli heti toisen respirometrimittauksen jälkeen, sekä tutkimuksen lopussa kolmannen respirometrimittauksen jälkeen. Laskimme aineistosta kasvukertoimet kalojen pituudelle ja painolle valintalinjoittain ja ruokintakäsittelyittäin käyttäen kaavoja

$$kasvukerroin_{pituus} = \frac{loppupituus - alkupituus}{aika}$$

sekä

$$kasvukerroin_{paino} = \frac{loppupaino - alkupaino}{aika}$$

(Fulton 1904). Jaoimme aineiston kasvukertoimia varten kahteen jaksoon, jolloin laskemisessa käytetty aika oli 28 päivää, eli aika, jonka kala vietti jakson ruokintakäsittelyllä. Laskimme kasvukertoimen erikseen ensimmäisen ja toisen mittauksen välille sekä toisen ja kolmannen mittauksen välille, jolloin toinen mittaus toimi ensimmäisessä jaksossa loppupituutena ja toisessa jaksossa alkupituutena.

### 2.5.2 Kuntokertoimet

Laskimme myös jokaiselle kalalle kuntokertoimen kolmessa tutkimuksen vaiheessa, tutkimuksen alussa, keskellä ja lopussa, kaavalla

$$\text{kuntokerroin} = 100 \times \left( \frac{\text{paino}}{\text{pituus}^3} \right)$$

(Fulton 1904).

### 2.5.3 Aineenvaihduntanopeus

Respirometrin tulokset kerättiin laitteiston tietokoneen tuottamasta kaaviosta. Perusaineenvaihduntaa arvioitiin laskemalla koko mittausjakson kolmen pienimmän arvon keskiarvo.

### 2.5.4 Aineiston tilastollinen tarkastelu

Laskimme ensin keskiarvot, 95% luottamusvälit, keskihajonnat ja mediaanit aineiston muuttujille, eli painojen ja pituuksien kasvukertoimille ja kuntokertoimille. Tämän jälkeen hyödynsimme mitatun datan analysoimisessa varianssianalyysia. Testasimme varianssianalyysillä kunkin yksilön valintalinjan ja dieetin yhdistelmän vaikutusta kasvukertoimiin, kuntokertoimiin, sekä aineenvaihduntanopeuteen. Hyödynsimme myös Tukeyn HSD -testiä sekä Kolmogorov-Smirnovin testiä, joiden avulla selvitimme, onko valintalinjoilla ja dieetillä tilastollisesti merkitsevää vaikutusta kalojen kasvuun ja aineenvaihduntaan. Kolmogorov-Smirnov-testeillä testasimme mallien



residuaalien jakaumien normaalisuutta. Teimme kaikki analyysit RStudio-tilasto-ohjelmointiympäristössä (versio 1.4.1717).

### 3 TULOKSET

Emme löytäneet poikkeavuuksia normaalijakaumasta Kolmogorov-Smirnov-testeillä.

#### 3.1 Pituuden ja painon kasvukertoimet

Vaihtuvan ruokintakäsittelyn (SA) pituuden kasvukertoimien keskiarvot olivat kaikilla valintalinjoilla huomattavasti suurempia toisessa nälkiinnyttämisen jälkeen jaksossa ensimmäiseen jaksoon verrattuna (Taulukko 1). Myös painon kasvukertoimien keskiarvot olivat suurempia toisessa jaksossa kaikilla valintalinjoilla, vaikkakin suurikokoisten valintalinjalla luottamusvälit hieman limittyivät (Taulukko 2).

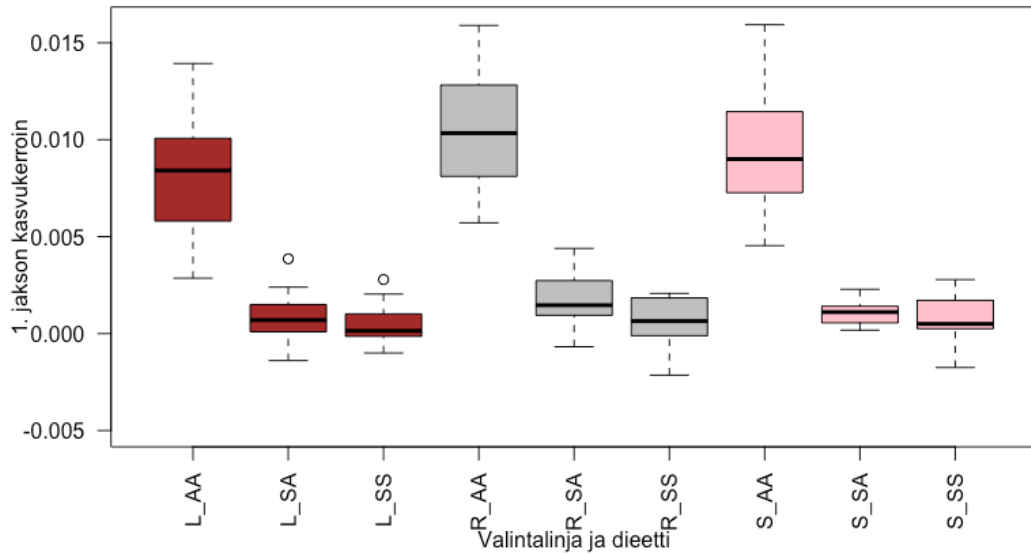
Taulukko 1. Pituuden (mm) kasvukertoimien tunnusluvut valintalinjojen ja dieettien mukaan. L = suurikokoisten valintalinja, R = kontrollilinja ja S = pienikokoisten valintalinja. AA = *ad libitum/ad libitum*, SA = *nälkiintyminen/ad libitum* ja SS = *nälkiintyminen/nälkiintyminen*.

Valintalinja ja dieetti	Keskiarvo		95 % luottamusväli		Keskihajonta		Mediaani	
	1. jakso	2. jakso	1. jakso	2. jakso	1. jakso	2. jakso	1. jakso	2. jakso
L_AA	0,008	0,004	0,006 - 0,010	0,002 - 0,006	0,003	0,003	0,008	0,005
L_SA	0,001	0,010	0,000 - 0,000	0,008 - 0,011	0,001	0,003	0,001	0,011
L_SS	0,000	0,000	0,000 - 0,001	0,000 - 0,000	0,001	0,001	0,000	0,000
R_AA	0,010	0,005	0,008 - 0,012	0,003 - 0,007	0,003	0,003	0,010	0,005
R_SA	0,002	0,010	0,001 - 0,003	0,009 - 0,011	0,002	0,002	0,001	0,010
R_SS	0,001	0,000	0,000 - 0,001	-0,001 - 0,001	0,001	0,001	0,001	0,000
S_AA	0,009	0,008	0,007 - 0,011	0,006 - 0,010	0,003	0,004	0,009	0,009
S_SA	0,001	0,011	0,001 - 0,001	0,009 - 0,012	0,001	0,002	0,001	0,011
S_SS	0,001	0,000	0,000 - 0,002	-0,001 - 0,001	0,001	0,001	0,001	0,000

Taulukko 2. Painon (g) kasvukertoimien tunnusluvut valintalinjojen ja dieettien mukaan. L = suurikokoisten valintalinja, R = kontrollilinja ja S = pienikokoisten valintalinja. AA = ad libitum/ad libitum, SA = nälkiintyminen/ad libitum ja SS = nälkiintyminen/nälkiintyminen.

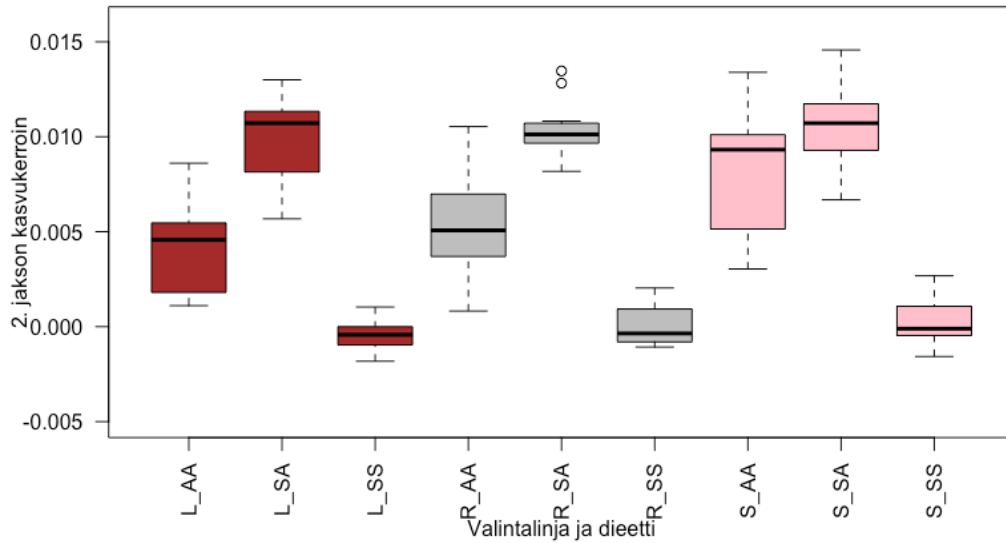
Valintalinja ja dieetti	Keskiarvo		95 % luottamusväli		Keskihajonta		Mediaani	
	1. jakso	2. jakso	1. jakso	2. jakso	1. jakso	2. jakso	1. jakso	2. jakso
L_AA	0,002	0,001	0,001 - 0,002	0,000 - 0,002	0,001	0,010	0,002	0,001
L_SA	-0,003	0,002	-0,008 - 0,003	0,002 - 0,003	0,009	0,001	0,000	0,002
L_SS	0,000	0,000	0,000 - 0,000	0,000 - 0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
R_AA	0,002	0,001	0,001 - 0,002	0,001 - 0,002	0,001	0,001	0,002	0,001
R_SA	0,000	0,002	0,000 - 0,000	0,002 - 0,003	0,000	0,001	0,000	0,002
R_SS	0,000	0,000	0,000 - 0,000	0,000 - 0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S_AA	0,002	0,002	0,001 - 0,002	0,001 - 0,002	0,001	0,001	0,002	0,002
S_SA	0,000	0,003	0,000 - 0,000	0,002 - 0,004	0,000	0,001	0,000	0,002
S_SS	0,000	0,000	0,000 - 0,000	0,000 - 0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Käyttäessämme varianssianalyysin vastemuuttujana seeprakalojen pituuden kasvukertoimia ensimmäisessä ja toisessa jaksossa löysimme merkitseviä eroja niin ensimmäisestä ( $F_{8, 97} = 46,05$ ; p-arvo  $< 0,001$ ) kuin toisesta jaksosta ( $F_{8, 93} = 51,61$ ; p-arvo  $< 0,001$ ). Tukeyn HSD -testillä löysimme ensimmäisessä jaksossa merkitseviä eroja verratessa AA-ruokintakäsittelyä SS- ja SA-ruokintakäsittelyyn. Erot käsittelyjen välillä eivät riippuneet verrattavista valintalinjoista. SA- ja SS-ruokintakäsittelyjen välillä ei ollut merkitsevää eroa millään verratulla yhdistelmällä, eikä samassa ruokintakäsittelyssä eri valintalinjojen välillä (Kuva 5). Tukeyn testin p-arvot löytyvät kaikille verratuille pareille taulukosta 3.



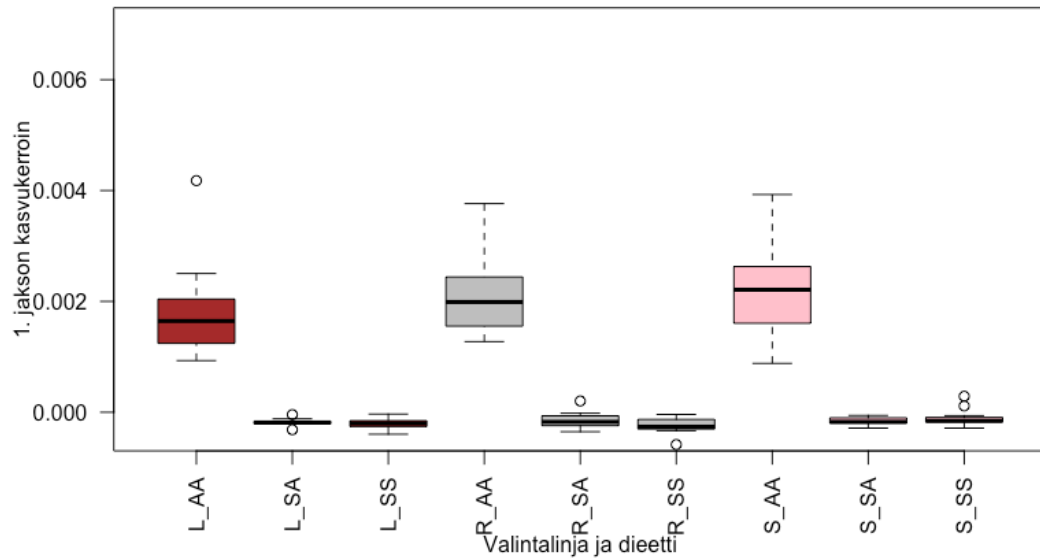
Kuva 5. Erot ensimmäisen jakson pituuden kasvukertoimissa valintalinjojen ja dieettien välillä. L = suurikokoisten valintalinja, R = kontrollilinja ja S = pienikokoisten valintalinja. AA = *ad libitum/ad libitum*, SA = *nälkiintyminen/ad libitum* ja SS = *nälkiintyminen/nälkiintyminen*.

Toisessa jaksossa SS-ruokintakäsittely erosi merkittävästi SA- ja AA-ruokintakäsittelyistä kaikilla valintalinjapareilla. Myös SA-ruokintakäsittelyn ja AA-ruokintakäsittelyn välillä löytyi merkitsevää eroa kaikilla muilla verrattavilla pareilla (Kuva 6), paitsi verrattaessa pienikokoisten kalojen AA-käsittelyä kaikkien kolmen valintalinjan SA-käsittelyihin. Merkitsevää eroa ei löytynyt samassa ruokinnassa eri valintalinjojen väliltä, paitsi AA-käsittelyssä, jossa pienikokoiset kalat kasvoivat suurikokoisia kaloja merkitsevästi nopeammin (p-arvo = 0,003). Tukeyn testin p-arvot kaikille verratuille pareille löytyvät taulukosta 3.



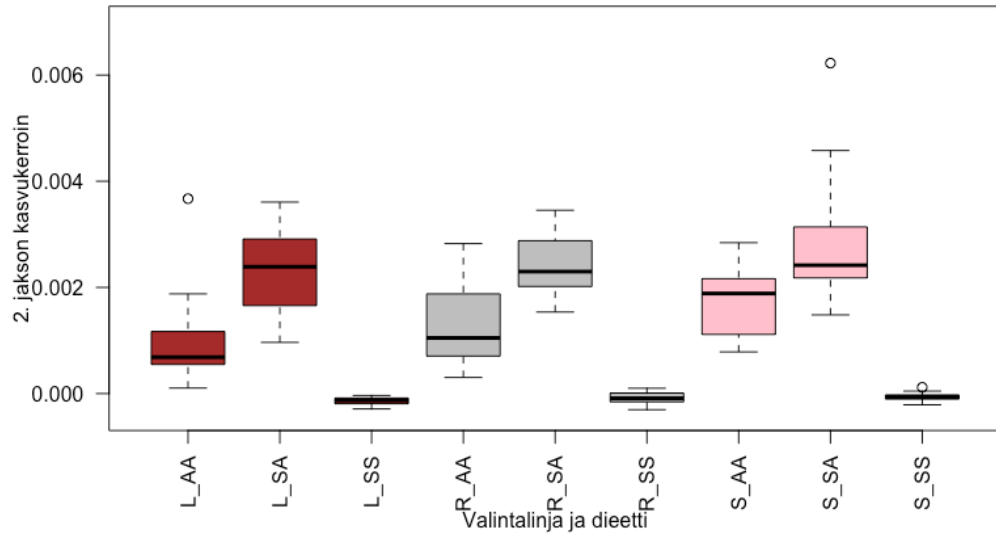
Kuva 6. Erot toisen jakson pituuden kasvukertoimissa valintalinjojen ja dieettien välillä. L = suurikokoisten valintalinja, R = kontrollilinja ja S = pienikokoisten valintalinja. AA = *ad libitum/ad libitum*, SA = *nälkiintyminen/ad libitum* ja SS = *nälkiintyminen/nälkiintyminen*.

Käyttäessämme varianssianalyysin vastemuuttujana painon kasvukertoimia löysimme merkitseviä eroja sekä ensimmäisestä ( $F_{8, 96} = 3,571$ ; p-arvo = 0,001) että toisesta jaksosta ( $F_{8, 93} = 28,75$ ; p-arvo < 0,001). Tukeyn testillä voimme todeta, että ensimmäisessä jaksossa AA-ruokintakäsittely eroaa SA- ja SS-ruokintakäsittelystä merkitsevästi kaikilla valintalinjapareilla, kun taas SA- ja SS-ruokintakäsittelyjen välillä ei ole eroa (Kuva 7). Valintalinjojen välillä ei ollut merkitsevää eroa samassa ruokinnassa. Tukeyn testin p-arvot kaikille verratuille pareille nähdään taulukosta 3.



Kuva 7. Erot ensimmäisen jakson painon kasvukertoimissa valintalinjojen ja dieettien välillä. L = suurikokoisten valintalinja, R = kontrollilinja ja S = pienikokoisten valintalinja. AA = *ad libitum/ad libitum*, SA = *nälkiintyminen/ad libitum* ja SS = *nälkiintyminen/nälkiintyminen*.

Toisessa jaksossa löysimme Tukeyn testillä merkitsevyyttä SS- ja SA-ruokintakäsittelyjen välillä sekä SS- ja AA-ruokintakäsittelyjen välillä kaikilla valintalinjapareilla (Kuva 8). Myös AA- ja SA-ruokintakäsittelyjen välillä oli merkitsevää eroa kaikilla muilla pareilla, paitsi verrattaessa pienikokoisten linjan AA-käsittelyä muiden kahden linjan SA-käsittelyihin, ja verrattaessa kontrollilinjaa AA-käsittelyä suurikokoisten linjan SA-käsittelyyn. Valintalinjojen välillä ei ollut merkitsevää eroa samassa ruokinnassa. Tukeyn testin p-arvot kaikille verratuille pareille nähdään taulukosta 3.



Kuva 8. Erot toisen jakson painon kasvukertoimissa valintalinjojen ja dieettien välillä. L = suurikokoisten valintalinja, R = kontrollilinja ja S = pienikokoisten valintalinja. AA = *ad libitum/ad libitum*, SA = *nälkiintyminen/ad libitum* ja SS = *nälkiintyminen/nälkiintyminen*.

Taulukko 3. Tukeyn HSD-testien p-arvot jokaiselle varianssianalyysin perusteella merkitsevälle vastemuuttujalle, sekä luokkien väliset erot jokaisen valintalinjan ja dieetin yhdistelmäluokan välillä. Keltainen väri = merkitsevä p-arvo.

Valintalinjat ja dieetit	1. mittauksen pituuden kasvukerroin	2. mittauksen pituuden kasvukerroin	1. mittauksen painon kasvukerroin	2. mittauksen painon kasvukerroin	2. mittauksen kuntokerroin	3. mittauksen kuntokerroin	2. mittauksen SMR	3. mittauksen SMR
L_SA-L_AA	0,000	0,000	0,006	0,006	0,028	1,000	0,011	0,856
L_SS-L_AA	0,000	0,000	0,719	0,005	0,017	0,043	0,306	0,436
R_AA-L_AA	0,163	0,955	1,000	0,996	0,999	0,996	0,227	0,326
R_SA-L_AA	0,000	0,000	0,751	0,001	0,000	0,998	0,996	0,004
R_SS-L_AA	0,000	0,001	0,699	0,010	0,001	0,005	0,061	0,001
S_AA-L_AA	0,837	0,003	1,000	0,440	0,828	0,984	1,000	1,000
S_SA-L_AA	0,000	0,000	0,767	0,000	0,001	1,000	0,007	0,871
S_SS-L_AA	0,000	0,002	0,792	0,017	0,037	0,067	0,924	0,242
L_SA-L_SA	1,000	0,000	0,427	0,000	1,000	0,034	0,912	0,011
R_AA-L_SA	0,000	0,000	0,002	0,055	0,004	0,998	0,000	0,996
R_SA-L_SA	0,985	0,999	0,395	1,000	0,908	0,996	0,109	0,259
R_SS-L_SA	1,000	0,000	0,447	0,000	0,995	0,004	0,999	0,000
S_AA-L_SA	0,000	0,601	0,002	0,788	0,000	0,991	0,003	0,994
S_SA-L_SA	1,000	0,994	0,432	0,483	0,988	1,000	1,000	1,000
S_SS-L_SA	1,000	0,000	0,404	0,000	1,000	0,054	0,396	0,004
R_AA-L_SS	0,000	0,000	0,513	0,000	0,002	0,002	0,000	0,000
R_SA-L_SS	0,882	0,000	1,000	0,000	0,926	0,215	0,828	0,000
R_SS-L_SS	1,000	1,000	1,000	1,000	0,997	0,998	0,998	0,408
S_AA-L_SS	0,000	0,000	0,502	0,000	0,000	0,002	0,133	0,157
S_SA-L_SS	0,999	0,000	1,000	0,000	0,992	0,013	0,865	0,012
S_SS-L_SS	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	0,989	1,000
R_SA-R_AA	0,000	0,000	0,549	0,014	0,000	0,817	0,029	0,751
R_SS-R_AA	0,000	0,000	0,492	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S_AA-R_AA	0,962	0,088	1,000	0,895	0,991	1,000	0,456	0,754
S_SA-R_AA	0,000	0,000	0,571	0,000	0,000	1,000	0,000	0,995
S_SS-R_AA	0,000	0,000	0,601	0,001	0,006	0,005	0,009	0,000
R_SS-R_SA	0,942	0,000	1,000	0,000	1,000	0,036	0,371	0,000
S_AA-R_SA	0,000	0,205	0,538	0,517	0,000	0,723	0,946	0,036
S_SA-R_SA	0,998	1,000	1,000	0,718	1,000	0,971	0,081	0,242
S_SS-R_SA	0,969	0,000	1,000	0,000	0,871	0,293	1,000	0,000
S_AA-R_SS	0,000	0,000	0,481	0,000	0,000	0,000	0,019	0,000
S_SA-R_SS	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,001	0,997	0,000
S_SS-R_SS	1,000	1,000	1,000	1,000	0,989	0,996	0,779	0,768
S_SA-S_AA	0,000	0,138	0,560	0,012	0,000	0,999	0,002	0,995
S_SS-S_AA	0,000	0,000	0,591	0,000	0,000	0,004	0,744	0,075
S_SS-S_SA	1,000	0,000	1,000	0,000	0,978	0,023	0,327	0,005

### 3.2 Kuntokertoimet

Vaihtuvalla dieetillä kuntokertoimen keskiarvo oli toisessa mittauksessa eli nälkiinnytyksen jälkeen muita mittauksia pienempi, vaikkakin pienikokoisten valintalinjalla luottamusvälit hieman limittyivät (Taulukko 4). Jatkuvalla nälkiinnyttämisellä kuntokertoimen keskiarvo laski suurikokoisten linjalla ja kontrollilinjalla toisessa ja kolmannessa mittauksessa, vaikkakin luottamusvälit aavistuksen limittyivät. Pienikokoisten valintalinjalla kuntokertoimen luottamusvälit limittyivät selvästi kaikissa mittauksissa. Yltäkylläisellä dieetillä kuntokertoimen keskiarvo kasvoi ensimmäisen ja toisen mittauksen välillä pienikokoisten ja suurikokoisten valintalinjoilla (Taulukko 4). Kaikilla valintalinjoilla oli yltäkylläisellä dieetillä huonoin kuntokertoimen keskiarvo

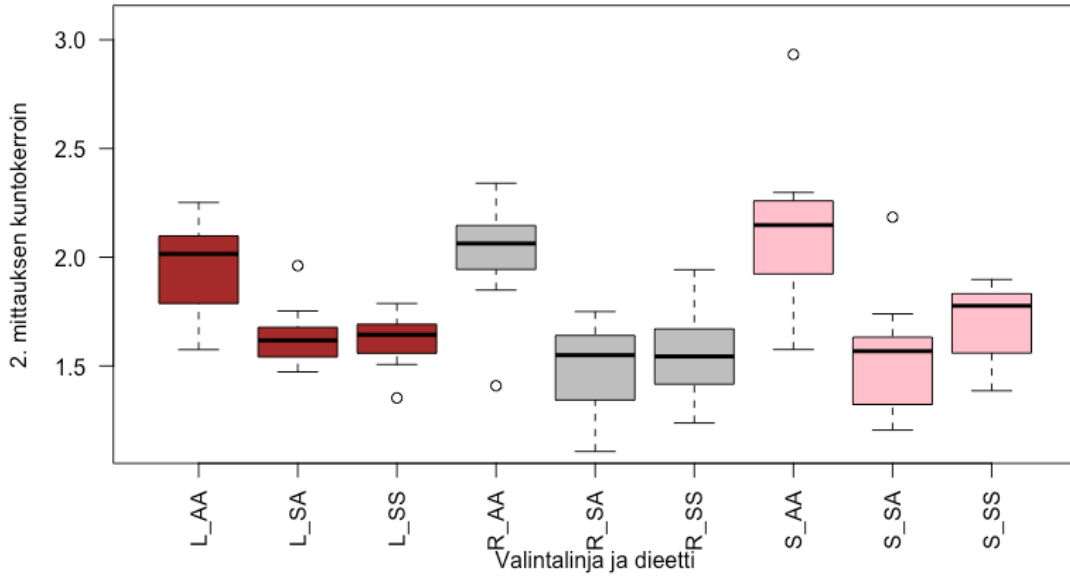
ensimmäisessä mittauksessa, eli kalat selkeästi kerryttivät painoa. Kokeen lopussa huonoin kuntokertoimen keskiarvo oli näлкиintymisdieetillä kaikilla valintalinjoilla, joskin pienikokoisten valintalinjalla luottamusvälit limittyivät hieman (Taulukko 4).

Taulukko 4. Kuntokertoimien tunnusluvut valintalinjojen ja dieettien mukaan. L = suurikokoisten valintalinja, R = kontrollilinja ja S = pienikokoisten valintalinja. AA = *ad libitum/ad libitum*, SA = *näлкиintyminen/ad libitum* ja SS = *näлкиintyminen/näлкиintyminen*.

Valintalinja ja dieetti	Keskiarvo			95 % luottamusväli			Keskihajonta			Mediaani		
	1. mittaus	2. mittaus	3. mittaus	1. mittaus	2. mittaus	3. mittaus	1. mittaus	2. mittaus	3. mittaus	1. mittaus	2. mittaus	3. mittaus
L_AA	1,175	1,967	1,970	1,675 - 1,828	1,838 - 2,096	1,788 - 2,151	0,120	0,203	0,270	1,730	2,016	1,884
L_SA	1,182	1,634	1,980	1,735 - 1,909	1,541 - 1,726	1,814 - 2,146	0,137	0,138	0,247	1,795	1,618	1,937
L_SS	1,798	1,625	1,566	1,721 - 1,875	1,550 - 1,701	1,470 - 1,662	0,122	0,119	0,152	1,807	1,644	1,575
R_AA	1,828	2,027	2,071	1,684 - 1,972	1,874 - 2,180	1,804 - 2,339	0,226	0,241	0,421	1,800	2,063	2,049
R_SA	1,769	1,499	1,879	1,609 - 1,928	1,378 - 1,619	1,757 - 2,001	0,251	0,189	0,192	1,800	1,550	1,826
R_SS	1,771	1,549	1,478	1,637 - 1,906	1,427 - 1,672	1,337 - 1,618	0,212	0,193	0,220	1,728	1,544	1,500
S_AA	1,739	2,117	2,101	1,604 - 1,874	1,897 - 2,337	1,877 - 2,326	0,212	0,347	0,314	1,743	2,148	2,158
S_SA	1,749	1,536	2,018	1,576 - 1,922	1,348 - 1,723	1,713 - 2,323	0,272	0,279	0,454	1,710	1,568	1,849
S_SS	1,777	1,643	1,579	1,560 - 1,993	1,427 - 1,859	1,378 - 1,779	0,340	0,321	0,299	1,839	1,776	1,558

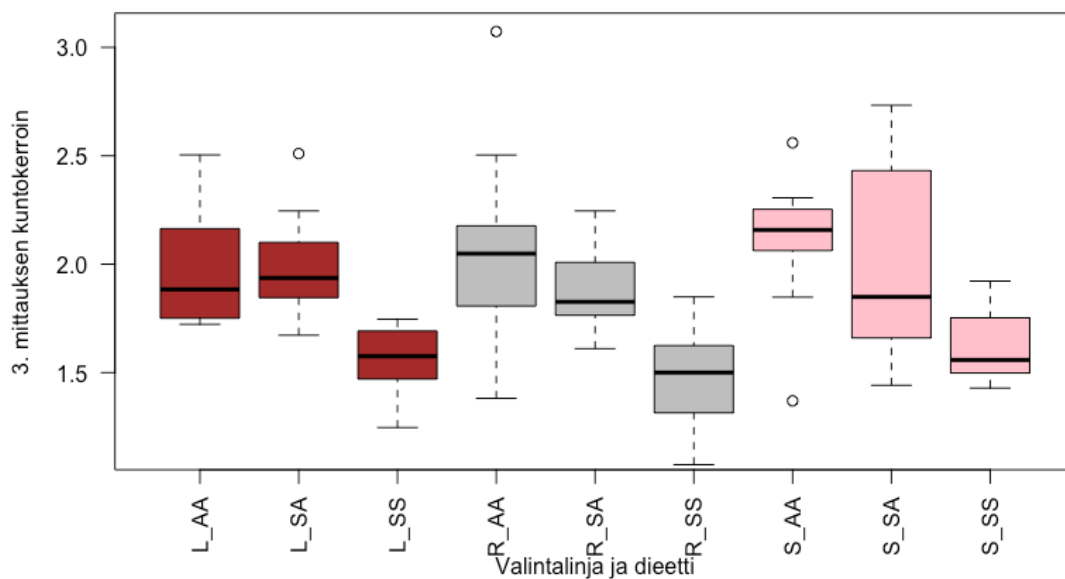
Varianssianalyysillä löytyi merkitseviä eroja, kun vastemuuttujana oli toisen ( $F_{8, 96} = 11,82$ ;  $p$ -arvo  $< 0,001$ ) tai kolmannen mittauksen kuntokerroin ( $F_{8, 93} = 7,436$ ;  $p$ -arvo  $< 0,001$ ). Merkitseviä eroja ei sen sijaan löytynyt selitettäessä valintalinjalla ja dieetillä ensimmäisen mittauksen kuntokerrointa ( $F_{8, 99} = 0,245$ ;  $p$ -arvo  $= 0,981$ ). Tukeyn testillä ja kuvasta 9 näemme, että toisessa mittauksessa merkitseviä eroja löytyi verrattaessa AA-ruokintakäsittelyä SS- ja SA-ruokintakäsittelyyn. Erot ruokintakäsittelyjen välillä olivat merkitseviä verrattavista valintalinjoista huolimatta. Erot SS- ja SA-ruokintakäsittelyjen välillä eivät olleet merkitseviä millään valintalinjaparilla, eikä eroja löytynyt myöskään samassa ruokintakäsittelyssä eri linjojen välillä. Taulukosta 3 nähdään Tukeyn testin  $p$ -arvot kaikille verratuille pareille.





Kuva 9. Erot toisen mittauksen kuntokertoimissa eri valintalinjojen ja dieettien välillä. L = suurikokoisten valintalinja, R = kontrollilinja ja S = pienikokoisten valintalinja. AA = *ad libitum/ad libitum*, SA = nälkiintyminen/*ad libitum* ja SS = nälkiintyminen/nälkiintyminen.

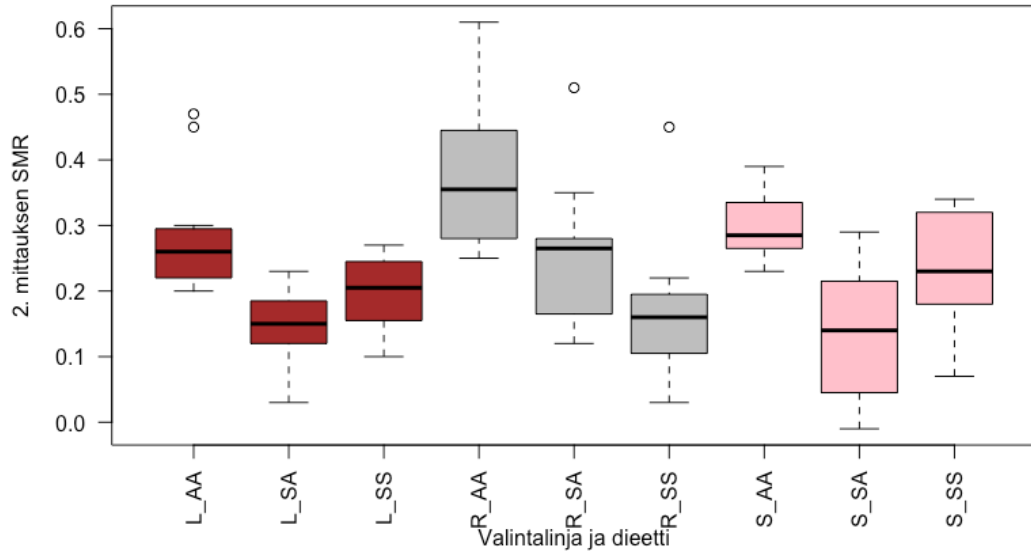
Kolmannessa mittauksessa keskiarvoissa erot olivat lähtökohtaisesti merkitseviä verrattaessa SS-ruokintakäsittelyä SA- tai AA-ruokintakäsittelyihin (Kuva 10), mutta myös poikkeavuuksia löytyi. Erot eivät olleet merkitseviä kontrollilinjaa SA-käsittelyn ja suurikokoisten tai pienikokoisten linjan SS-käsittelyjen välillä. Myös verrattaessa pienikokoisten linjan SS-käsittelyä suurikokoisten linjan SA- ja AA-käsittelyihin, erot kallistuivat hyvin pienesti ei-merkitsevän puolelle. Erot SA- ja AA-ruokintakäsittelyjen välillä eivät olleet merkitseviä millään valintalinjaparilla, eikä eroja löytynyt myöskään samassa ruokintakäsittelyssä eri linjojen välillä. Taulukosta 3 löytyy Tukeyn testin p-arvot kaikille verratuille pareille.



Kuva 10. Erot kolmannen mittauksen kuntoskerroimissa eri valintalinjojen ja dieettien välillä. L = suurikokoisten valintalinja, R = kontrollilinja ja S = pienikokoisten valintalinja. AA = *ad libitum/ad libitum*, SA = *nälkiintyminen/ad libitum* ja SS = *nälkiintyminen/nälkiintyminen*.

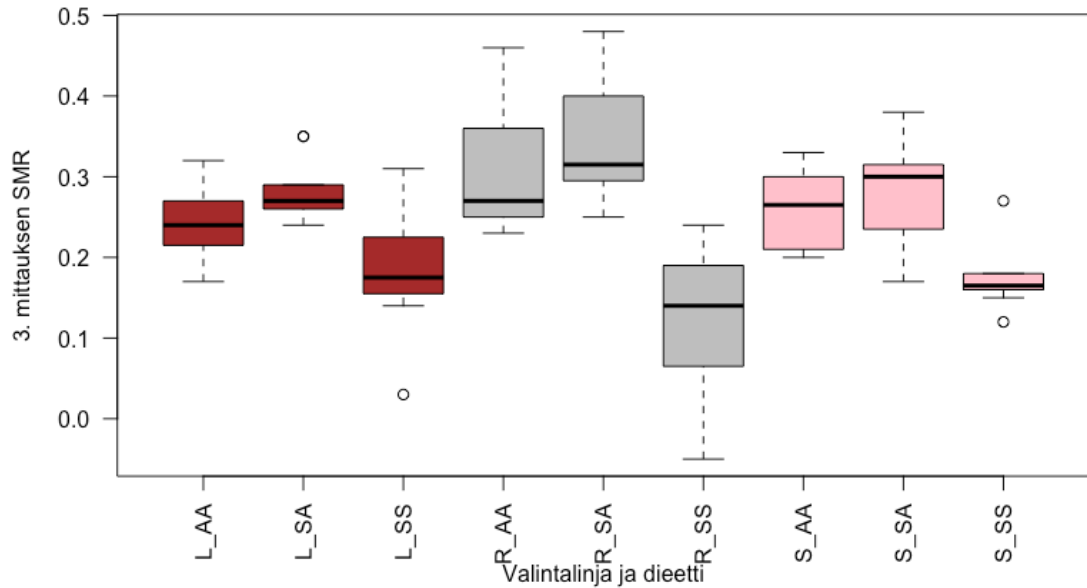
### 3.3 Aineenvaihduntanopeus

Varianssianalyysillä löysimme merkitseviä eroja niin toisessa aineenvaihduntamittauksessa ( $F_{8, 95} = 8,923$ ;  $p$ -arvo  $< 0,0001$ ) kuin kolmannessakin aineenvaihduntamittauksessa ( $F_{8, 92} = 14,39$ ;  $p$ -arvo  $< 0,0001$ , kun vastemuuttujana oli toinen tai kolmas aineenvaihduntamittaus. Aineenvaihdunnan toisessa mittauksessa löysimme Tukeyn HSD -testillä tilastollisesti merkitsevää eroa SA-ruokintakäsittelyn ja AA-ruokintakäsittelyn välillä kaikilla muilla valintalinjapareilla, paitsi verrattaessa kontrollilinjaa SA-käsittelyä pienikokoisten ja isokokoisten valintalinjojen AA-käsittelyihin. AA- ja SS-käsittelyt erosivat merkitsevästi neljällä vertailtavalla parilla: verrattaessa kontrollilinjaa AA-käsittelyä kaikkien kolmen linjan SS-käsittelyihin ja verrattaessa pienikokoisten linjan AA-ruokintaa kontrollilinjaa SS-käsittelyyn. SA- ja SS-ruokintakäsittelyjen välillä ei ollut eroa millään valintalinjapareilla, eikä eroa ollut myöskään samassa ruokinnassa eri valintalinjojen kesken (Kuva 11). Tukeyn testin  $p$ -arvot kaikille verratuille pareille on esitetty taulukossa 3.



Kuva 11. Erot toisessa aineenvaihduntamittauksessa valintalinjojen ja dieettien välillä. L = suurikokoisten valintalinja, R = kontrollilinja ja S = pienikokoisten valintalinja. AA = *ad libitum/ad libitum*, SA = *nälkiintyminen/ad libitum* ja SS = *nälkiintyminen/nälkiintyminen*.

Aineenvaihdunnan kolmannessa mittauksessa SA- ja AA-ruokintakäsittelyjen välillä ainoat merkitsevät erot olivat verrattaessa kontrollilinjaa SA-käsittelyä pienikokoisten ja isokokoisten valintalinjojen AA-käsittelyihin, päinvastoin, kuin toisessa mittauksessa. AA- ja SS- käsittelyjen välillä merkitsevää eroa oli nyt viidellä vertailtavalla yhdistelmällä: verrattaessa kontrollilinjaa AA-käsittelyä kaikkien kolmen linjan SS-käsittelyihin ja verrattaessa pienikokoisten ja isokokoisten linjan AA-käsittelyä kontrollilinjaa SS-käsittelyyn. Päinvastoin kuin toisessa aineenvaihduntamittauksessa, SA- ja SS-ruokintakäsittelyt erosivat nyt merkitsevästi kaikilla valintalinjapareilla (Kuva 12). Merkitsevää eroa ei löytynyt valintalinjojen välillä samassa ruokinnassa. Tukeyn testin p-arvot kaikille verratuille pareille on esitetty taulukossa 3.



Kuva 12. Erot kolmannessa aineenvaihduntamittauksessa valintalinjojen ja dieettien välillä. L = suurikokoisten valintalinja, R = kontrollilinja ja S = pienikokoisten valintalinja. AA = *ad libitum/ad libitum*, SA = nälkiintyminen/*ad libitum* ja SS = nälkiintyminen/nälkiintyminen.

#### 4 TULOSTEN TARKASTELU

Odotetusti tutkimuksessamme kaikki kalat kasvoivat niin piteuden kuin painonkin suhteen heikoiten SS-dieetillä. SA-dieetillä huomasimme kompensoivaa kasvua jokaisella valintalinjalla. Kompensoivaa kasvua havaittiin sekä kasvu- että kuntokertoimissa, mutta kasvukertoimissa kompensoiva kasvu oli suurempaa. Millään valintalinjaparilla ei kuitenkaan ollut merkitsevää eroa keskenään kompensoivan kasvun suhteen. Jokaisen valintalinjan kalat pystyivät jossain määrin muuttamaan aineenvaihduntanopeuttaan plastisesti ravinnonsaannin määrän muuttuessa SA-dieetillä eikä aineenvaihduntanopeuden plastisuudessa ei ollut merkitsevää eroa eri valintalinjojen välillä.

#### 4.1 Ruokintakäsittelyn vaikutus kasvuun perinnöllisesti erilaistuneilla seeprakalapopulaatioilla

Seeprakalojen kasvukertoimet niin pituuden kuin painonkin suhteen korreloivat vahvasti verraten meneillään olevaan ruokintakäsittelyyn valintalinjasta riippumatta. Nälkiintymisdieetillä olleiden kalojen kasvukertoimet olivat kaikista pienimmät jokaisella valintalinjalla niin ensimmäisessä kuin toisessakin mittausjaksossa. *Ad libitum* -dieetillä olleiden kalojen kasvukertoimet olivat ensimmäisessä jaksossa suurimmat. Koko tutkimuksen ajan *ad libitum* -dieetillä olevilla kaloilla oli kuitenkin tutkimuksemme toisessa jaksossa pienempi kasvukerroin kuin SA-dieetillä olevilla kaloilla. Tätä voimme selittää kompensoivalla kasvulla, jota myös Motta ym. (2021) havaitsi paastottaessaan nuoria lehtikaloja (*Pterophyllum scalare*). Tutkimuksessaan Motta ym. (2021) paastotti kaloja 0–15 päivää, jonka jälkeen ruokki kaloja kolmekymmentä päivää. Näiden kolmenkymmenen päivän jälkeen riippumatta paaston kestosta kalojen pituudet tai painot eivät eronneet keskenään. Tämä kertoo paastonneiden kalojen nopeammasta kasvukertoimesta aivan kuten tutkimuksemme tuloksissakin.

Havaitsimme silmämääräisesti tarkasteltaessa kompensoivaa kasvua pienikokoisten kalojen linjassa vähemmän kuin kontrolli- ja isokoisten kalojen valintalinjassa. Kompensoivasta kasvusta kertoi se, että suurikokoisten ja kontrollikalojen valintalinjoilla pituuden kasvukerroin oli suurempi vaihtuvalla kuin *ad libitum* -dieetillä, kun taas pienikokoisten valintalinjalla ero ei ollut merkitsevää. Tätä voimme selittää mahdollisesti sillä, että pienikokoisten valintalinjan kalojen kasvunopeus oli jo lähellä maksimikasvunopeutta. Tämä puolestaan saattaa liittyä pienikokoisten kalojen nopeampaan elinkiertoon, niiden nopeampaan nuoruusvaiheen kasvuun ja aikaiseen sukukypsymiseen (Uusi-Heikkilä ym. 2015). Valintalinjojen välillä löysimme merkitsevää eroa pelkästään pienikokoisten ja suurikokoisten välillä *ad libitum* -dieetillä pituuden kasvukertoimen suhteen toisessa mittausjaksossa. Pienikokoisten kalojen valintalinjalla oli suurempi kasvukerroin kuin suurikokoisten valintalinjalla mikä saattaa viitata siihen, että perinnöllisesti pienikokoisilla kaloilla on taipumus jatkaa

nopeaa kasvua niin kauan kun ravintoa on saatavilla runsaasti. Tämä puolestaan voi olla merkki paremmasta kelpoisuudesta, sillä nopeasti kasvaneilla yksilöillä on todennäköisesti ollut pienten valintalinjojen sisällä merkittävästi parempi lisääntymismenestys, kuin hitaasti kasvaneilla. Luonnossa yksilön nopea kasvutahti voi myös merkitä yksilön parempaa kelpoisuutta esimerkiksi sukukypsyyden nopeammassa saavuttamisessa (Gerlach ym. 2007). Toisaalta kontrollilinjan kalojen pituuden kasvunopeus hidastui toisessa jaksossa, mikä saattaa ehdottaa sitä, että kontrollilinjan kalat käyttävät runsasta ravintoa hyödyksi muun kehityksen edistämiseen tai korkeampaan aktiivisuuteen (Uusi-Heikkilä ym. 2015). Tulos saattaa myös liittyä pienempikokoisten kalojen nopeampaan elinkiertoön verrattaessa elinkierron nopeutta suurempikokoisilla kaloilla. Kuitenkaan SS-dieetillä olleet kalat eivät eronneet eri valintalinjojen välillä keskenään, joten ravinnon määrän ollessa äärimmäisen niukkaa ei geneettisellä perimällä tutkimuksemme mukaan olisi vaikutusta seeprakalojen kasvukertoimiin tai sitä kautta kelpoisuuteen. Yksi selittävä tekijä saattaa olla äärimmäisen niukka ravinnonsaanti ja siitä saadun energian käyttäminen elintoimintojen ylläpitämiseen valintalinjasta riippumatta. SA-dieetin kohdalla emme löytäneet eri valintalinjojen välillä selkeää merkitsevää eroa pituuden tai painon kasvukertoimissa, mikä viittaisi siihen, että geneettisellä perimällä ei ole vaikutusta kompensoivaan kasvuun.

Kuntokerrointa käytetään ymmärtämään kalan terveyttä, selviytymistä ja lisääntymiseen liittyviä tekijöitä (Le Cren 1951). Tutkimuksessamme seeprakalojen kuntokertoimissa oli toisessa mittauksessa merkitseviä eroja verratessa *ad libitum* -ruokintakäsittelyä nälkiinnyttämiskäsittelyyn ja vaihtuvaan ruokintaan, ja kolmannessa mittauksessa merkitseviä eroja verrattaessa nälkiinnyttämisruokinnalla olleiden kalojen kuntokertoimia *ad libitum* -ruokinalla ja vaihtuvalla ruokinalla olleiden kalojen kuntokertoimiin. Tämä on luonnollista, sillä toisen mittauksen kohdalla vain *ad libitum* -ruokinnalla olleet kalat ovat päässeet kasvamaan muiden nälkiintyessä, ja vastaavasti kolmannessa mittauksessa SS-käsittelyn kalat ovat jatkaneet nälkiintymistä, kun taas AA ja nyt myös SA kalat ovat saaneet reilusti ruokaa. SA-ruokintakäsittelyllä olleiden kalojen

harppaus kuntokertoimissa kertoo kompensoivasta kasvusta, jota havaittiin myös kasvukertoimissa. Tulokset mukailevat Hvas ym. (2022) tutkimusta Atlantin lohella (*Salmo salar*), jossa ryhmää kaloja pidettiin paastolla kahdeksan viikon ajan ja sen jälkeen annettiin palautua normaalissa ruokinnassa viisi viikkoa. Heti paaston jälkeen kontrollikaloilla oli selkeästi parempi kuntokerroin, mutta viiden viikon normaalin ruokinnan jälkeen paastolla olleiden kalojen kuntokertoimet kohosivat selvästi kontrollikaloja korkeammaksi. Vaikka tutkimuksessamme on havaittavissa kompensoivaa kasvua, ei se ole niin selkeää kuin Hvas ym. (2022) tutkimuksessa. Pienikokoisten linjan ja suurikokoisten linjan SA-käsittelyn kuntokertoimet kohosivat kontrollilinjan kuntokerrointa suoraviivaisemmin.

Kun kuntokerrointa tarkasteltiin eri valintalinjojen suhteen, huomattiin, että tutkimuksen lopussa suurikokoisten valintalinjalla paras kuntokerroin oli vaihtuvalla dieetillä olleilla kaloilla, kun taas kontrollilinjalla ja pienikokoisten linjalla yltäkyläinen dieetti johti parhaimpaan kuntokertoimeen. Tästä ei voida todeta selkeästi parasta dieettiä kaikille kaloille geneettisestä perimästä huolimatta.

#### **4.2 Erot aineenvaihdunnassa ja sen plastisuudessa**

Tutkimuksessamme emme löytäneet merkittäviä eroja aineenvaihdunnan plastisuudesta eri valintalinjojen välillä millään dieetillä. Tutkimuksemme perusteella aineenvaihdunnan plastisuus ei siis riipu yksilön geneettisestä perimästä yksilön koon perusteella eikä näin ollen myöskään vaikuta aineenvaihdunnan plastisuuden kautta yksilön kelpoisuuteen. SA-dieetillä aineenvaihdunta oli yleisesti ottaen jokaisella valintalinjalla plastista. Myös Auer ym. (2015b) totesi lajinsisäisessä tutkimuksessaan, että aineenvaihdunta todella on plastista ravinnonsaannin määrän ollessa vaihtelevaa. Tutkimuksessaan Auer ym. (2015b) huomasi kuitenkin myös korrelaation kompensoivan kasvun ja aineenvaihduntanopeuden välillä. Emme löytäneet kompensoivaa kasvua vastaavaa ilmiötä aineenvaihduntanopeuden suhteen. Myöskään eroja valintalinjojen, eli eri geneettistä perimää olevien kalojen, välillä emme löytäneet, mikä on linjassa Uusi-Heikkilä ym. (2015) kanssa. Valintalinjasta riippumatta

kolmannessa aineenvaihduntamittauksessa kaikilla SS-dieetillä olleilla kaloilla oli alhaisin aineenvaihduntanopeus, mikä saattaa kertoa sen olevan yksi selviytymisstrategia pitkään ravinnonpuutteessa olevilla yksilöillä. Jos ravinnonsaanti on äärimmäisen niukkaa pidennetyllä ajanjaksolla, on vain luonnollista, että yksilöt kuluttavat mahdollisimman vähän energiaa niin suoranaisesti esimerkiksi kasvuun kuin myös elintoimintojen ylläpitoon ja loppupeleissä aineenvaihduntanopeuteen.

Burton ym. (2021) väittää, että ruokavalio ei ole yksiselitteinen tekijä lajinvälisessä lepoaineenvaihdunnan tutkimuksessa vaan mahdollisesti rajoittuu joihinkin yksilön kokemiin elintoimintojen vaihtokauppoihin. Burton ym. (2011) myös kertoo, että lajinsisäisesti yksilön äidillä olisi merkittävä vaikutus jälkeläistensä lepoaineenvaihduntoihin. Vaikka käytimme tutkimuksessamme geneettisesti kolmea erilaistunutta valintalinjaa, valintalinjan sisällä seeprakalayksilöt tulivat kuitenkin useasta eri naaraasta, emmekä siksi tällaista yhteyttä voineet todentaa.

Tutkimuksen tuloksiin on mahdollisesti vaikuttanut kahden seeprakalan kuoleminen kesken tutkimuksen, sillä niitä emme pystyneet korvaamaan vastaavilla varayksilöillä. Nämä kalat olivat molemmat *ad libitum* -ruokinnalla, toinen pienikokoisten valintalinjalta ja toinen suurikokoisten valintalinjalta. Ongelmat respirometrikokeen aikana, kuten kalan karkaaminen respirometrialtaaseen ja laitteiston tekniset ongelmat, ovat osaltaan saattaneet vaikuttaa aineenvaihdunta mittauksiin. Myös inhimilliset virheet, esimerkiksi kalan painon kirjaaminen väärin tai väärän ruoka-annoksen antaminen, ovat mahdollisia.

### 4.3 Yhteenveto

Oletimme kalojen perusaineenvaihdunnan ja kasvun olevan hidasta, kun ravinnon määrä on vähäistä ja vastaavasti korkeampaa, kun ravintoa on tarjolla runsaasti. Oletimme myös kalojen aineenvaihdunnan ja kasvun nopeuksien muuttuvan ravinnonsaannin muutoksien myötä. Tutkimuksemme tulokset vahvistivat nämä hypoteesit oikeiksi. Kuitenkaan emme löytäneet todisteita tukemaan



hypoteesiamme siitä, että pienikokoisen valintalinjan kalat pärjäisivät vertailtavia valintalinjoja heikommin aineenvaihdunnan säätelyssä ruokintakäsittelyn vaihtuessa. Tämä hypoteesi siis kumoutui eikä geneettisellä perimällä tutkimuksessamme olisi vaikutusta kelpoisuuteen aineenvaihdunnan kautta. Tätä voi kuitenkin selittää esimerkiksi valintalinjojen vuosien palautuminen alkuperäisestä koon perusteella kalastamisesta tai se, ettemme tiedä, mitkä geenit tarkalleen näillä valintalinjoilla eroavat. Selkeää eroa pienikokoisten ja suurikokoisten valintalinjojen välillä oli vain kasvukertoimessa koko tutkimuksen ajan *ad libitum* -dieetillä olleilla kaloilla, mikä oli ainut kelpoisuuteen liitettävä löydös - suurikokoisilla kaloilla saattaa olla parempi kelpoisuus luonnossakin silloin kun ravintoa on yltäkyläisesti saatavilla.

## KIITOKSET

Kiitämme ohjaajiamme Silva Uusi-Heikkilää ja Tiina Sävilammia jatkuvasta tuesta ja avusta sekä joustavasta yhteistyöstä. Kiitokset myös Silva Uusi-Heikkilän Akatemian projektille tutkimuksemme rahoittamisesta. Haluamme kiittää suuresti maisteriopiskelijaa Nicolàs Merinoa teknisestä avusta sekä konkreettisesta opastamisesta kalojen käsittelyssä ja tutkimuksen toteuttamisessa.

Kiitämme myös työpariamme puolin ja toisin toimivasta tiimityöskentelystä ja panoksesta LuK-projektiin ja katsomme meidän ansaitsevan LuK-tutkielmasta saman arvosanan.

## KIRJALLISUUS

- Auer S., Dick C., Metcalfe N. & Reznick D. 2018. Metabolic rate evolves rapidly and in parallel with the pace of life history. *Nature Communications* 9.
- Auer S., Salin K., Rudolf A., Anderson G. & Metcalfe N. 2015a. The optimal combination of standard metabolic rate and aerobic scope for somatic growth depends on food availability. *Functional Ecology* 29: 479-486.
- Auer S., Salin K., Rudolf A., Anderson G. & Metcalfe N. 2015b. Flexibility in metabolic rate confers a growth advantage under changing food availability. *Journal of Animal Ecology* 84: 1405-1411.
- Brown J.H., Gillooly J.F., Allen A.P., Savage V.M & West G.B. 2004. Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* 85: 1771-1789.
- Burton T., Killen S.S., Armstrong J.D. & Metcalfe N.B. 2011. What causes intraspecific variation in resting metabolic rate and what are its ecological consequences? *Proceedings of the Royal Society B* 278: 3465-3473.
- Fulton T.W. 1904. The rate of growth of fishes. *Fisheries Board of Scotland. Annual Report* 22 part 3: 141-241.
- Gerlach G., Hodgins-Davis A., MacDonald B., & Hannah R. C. 2007. Benefits of kin association: Related and familiar zebrafish larvae (*Danio rerio*) show improved growth. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61: 1765-1770.
- Hvas M., Nilsson J., Vågseth T., Nola V., Fjellidal P.G., Hansen T.J., Oppedal F., Stien L.H. & Folkedal O., 2022, Full compensatory growth before harvest and no impact on fish welfare in Atlantic salmon after an 8-week fasting period. *Aquaculture* 546: 737415.
- Khan F.R. & Alhewairini S.S. 2018. Zebrafish (*Danio rerio*) as a Model Organism. Teoksessa: Streba L., Gheonea D.I & Schenker M. (toim.), *Current Trends in Cancer Management*. IntechOpen, United Kindom.
- Kim Keonhee E., Jang Taehwan & Lee Kwang Pum. 2020. Combined effects of temperature and macronutrient balance on life-history traits in *Drosophila melanogaster*. Implications for life-history trade-offs and fundamental niche. *Oecologia* 193: 299-309.
- King J. & McFarlane G. 2003. Marine fish life history strategies: Applications to fishery management. *Fisheries Management and Ecology* 10: 249-264.
- Lawrence C., Best J., James A. & Maloney K. 2012. The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture* 368-369: 103-108.
- Le Cren E.D. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology* 20: 201-219.

- Motta J.H., Glória L., de Souza A.B., Filho J.C.F. & Polese M. 2021. Effect of fasting on freshwater angelfish *pterophyllum scalare* (lichtenstein; pisces: Cichlidae) development. *Latin American Journal of Aquatic Research* 49: 125-135.
- Pettersen A.K., White C.R. & Marshall D.J. 2016. Metabolic rate covaries with fitness and the pace of the life history in the field. *Proceedings of the Royal Society B* 283: 20160323.
- Scholer M.N., Arcese P., Puterman M.L. Londoño G.A. & Jankowski J.E. 2019. Survival is negatively related to basal metabolic rate in tropical Andean birds. *Functional Ecology* 33: 1436-1445.
- Uusi-Heikkilä S., Sävilammi T., Leder E., Arlinghaus R., & Primmer C.R. 2017. Rapid, broad-scale gene expression evolution in experimentally harvested fish populations. *Molecular ecology* 26: 3954–3967.
- Uusi-Heikkilä S., Whiteley A.R., Kuparinen A., Matsumura S., Venturelli P.A., Wolter C., Slate J., Primmer C.R., Meinelt T., Killen S.S., Bierback D., Polverino G., Ludwig A. & Arlinghaus R. 2015. The evolutionary legacy of size-selective harvesting extends from genes to populations. *Evolutionary Applications* 8: 597-620.